

# トレハロース生成に関与する新規な酵素

津崎桂二・久保田倫夫

新規なトレハロース生成反応が真正細菌から古細菌まで広く細菌に見つけられた。従来、知られていた生合成反応とは異なり、UDP-グルコースやリン酸化糖などを必要とせず、高分子の $\alpha$ -1,4-グルカンやマルトースからトレハロースを生成する反応であった。高分子グルカンからのものは分子内転移酵素 (MTSase) と加水分解酵素 (MTHase) の2反応によるもので、マルトースからの反応は分子内転移酵素 (トレハロース生成酵素) によるものであった。これら新規な酵素の発見は、細菌におけるトレハロース生合成の新しい展開のきっかけになると思われた。

**Key words** 【トレハロース】【分子内転移】【加水分解】

はじめに トレハロース [→今月の Key Words (p. 865)] は非還元性のグルコ2糖で、その名称の由来は1859年に Berthelot らが象鼻虫の分泌物“トレハラマンナ”から分離したことに遡る<sup>1)</sup>。その後、自然界に広く分布していることがわかり、細菌、酵母、キノコなどの菌類や藻類、コケ、シダなどの植物、エビ、昆虫などの無脊椎動物に見いだされている<sup>2)</sup>。その含有量は生物種によってさまざまであるが、たとえば、パン酵母や食用キノコのホンシメジには乾燥重量あたり10%以上も含有する<sup>3)</sup>。ヒトは直接トレハロースを生合成しないが、小腸粘膜や腎臓にその分解活性があり<sup>4)</sup>、食物として摂取したトレハロースを消化・吸収している。本糖質は良質な甘味や加工特性に優れており、食品素材として期待されている。そのほかにも、蛋白質の安定化<sup>5,6)</sup>や核酸や細胞膜など生体成分を乾燥や凍結から保護する作用<sup>7,8)</sup>など、生理的な機能も示すことから、化粧品や医薬品への応用も試みられており、高収率・大量製造が期待されている。

近年の酵素化学の発展とあいまって、種々の糖質が酵素反応によって製造されている。トレハロース生成においても、2,3の反応がすでに提案されていたが(図1)、いずれも工業的な大量製造までには実現されていなかった。トレハロース-6-リン酸合成酵素とトレハロースホスファターゼとが関与する2段階反応は多くの生物種でトレハロース生合成に関与しているものであるが<sup>9)</sup>、基質にUDP (GDP)-グルコースとグルコース6-リン酸とを必要とするため、工業的な規模での利用は不可能であった(高価であり工業的製造がむずかしいため)。食品素材としてすでに製造されているマルトースやグルコースを基質としたマルトースホスホリラーゼ/トレハロースホスホリラーゼ系<sup>10)</sup>やトレハララーゼ反応<sup>11)</sup>はトレハロースの生成率に問題があった。ともかくも、食品など産業素材としてトレハロースを大量に製造するには、これらの反応では基質・酵素の供給や反応生成率、製造コストなどが満足できなかったというわけである。そこで、大量かつ安価に流通してい

Keiji Tsusaki, Michio Kubota, 林原生物化学研究所天瀬研究所 (〒700 岡山市天瀬南町7-7) [Hayashibara Biochemical Laboratories, Inc., Amase Institute, Amaseinami, Okayama 700, Japan]  
Novel Enzymes Catalyzing Trehalose Formation

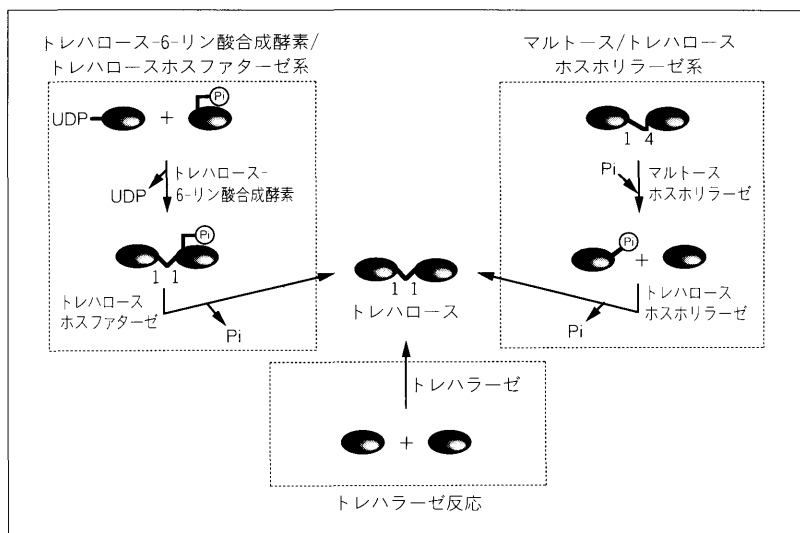


図 1 既知のトレハロースの生成

るデンプンを利用して、トレハロースを高収率で得られる新しい酵素反応が存在すれば、その工業利用は有望であると考えられた。この考えに基づき、筆者らがトレハロースを生成する微生物を広く検索したところ、これまで知られている酵素系とはまったく異なる、2つの新規なトレハロース生成系が細菌に存在することを見いだした<sup>12,13</sup>。1つは、デンプンの基本構造である $\alpha$ -1,4-グルカンを基質としたトレハロース生成反応であった。もう1つの反応は、マルトースを直接トレハロースに変換する分子内転移酵素トレハロース生成酵素によるものであった。

本稿では、おもに $\alpha$ -1,4-グルカン\*1からのトレハロース生成反応をとり上げ、それにかかわる酵素の性質や構造について紹介する。

### 1. $\alpha$ -1,4-グルカンからのトレハロース生成

微生物の生体内に貯蔵する糖質は、おもにグリコーゲンとトレハロースとの両形態として存在することが知られている<sup>14</sup>。細胞の生育や環境の変化などによって、グリコーゲンがトレハロースに変換されることは観察されていたが、従来、この変換反応は糖ヌクレオチドやリン酸化糖を経由するトレハロース-6-リン酸合成酵

素/ホスファターゼ系によるものと考えられていた。筆者らはこのようにリン酸化合物を経由するのではなく、直接的にトレハロース生成する反応系が存在するのではないかと発想して、グリコーゲンの基本骨格である $\alpha$ -1,4-グルカンを基質として用い、細菌のトレハロース生成反応を調べてみた。

土壌から分離した細菌 *Arthrobacter* sp. Q36 株の培養物をマルトペンタオース(グルコースの鎖長が5の $\alpha$ -1,4-グルカン)に作用させると、ある種のオリゴ糖を中間体とし

て経由し、トレハロースとマルトトリオースが生成することがわかった<sup>12</sup>。このトレハロース生成反応はリン酸やリン酸化糖を必要とせず、糖質のみを基質とするもので、その中間体もグルコースのみからなる非還元性オリゴ糖(マルトトリオシルトレハロース)であっ

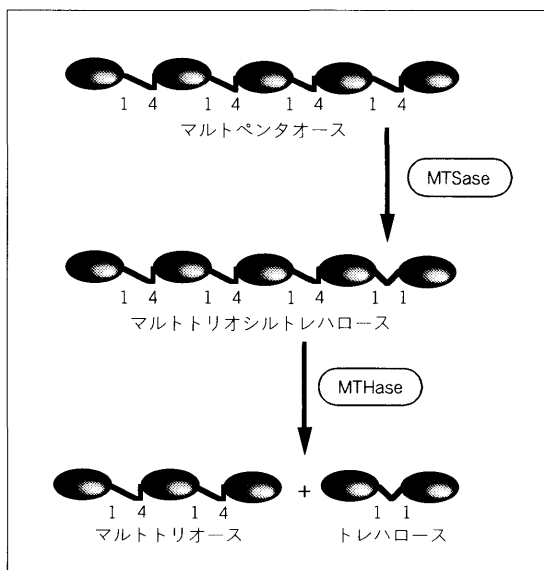


図 2 新規酵素 MTSase と MTHase によるトレハロース生成

\*1 D-グルコースが $\alpha$ -1,4結合して連なった多糖。重合度の少ないものはマルトオリゴ糖と、また重合度の大きいものはアミロースとよばれている。

表 1 *Arthrobacter* 属と *Sulfolobus* 属の MTSase, MTHase

性質	<i>Arthrobacter</i> sp. strain Q36		<i>Sulfolobus acidocaldarius</i> ATCC33909	
	MTSase	MTHase	MTSase	MTHase
分子量	81 K	62 K	74 K	59 K
反応至適 pH	pH 7.0	pH 6.5~7.0	pH 5.0~5.5	pH 5.5~6.0
反応至適温度	40 °C	45 °C	75 °C	75 °C
pH 安定性	pH 6.0~9.5	pH 5.0~10.0	pH 4.5~9.5	pH 5.5~9.5
温度安定性	40 °C 以下	45 °C 以下	85 °C 以下	85 °C 以下

た。そこで、培養物から酵素を精製したところ、2種類の酵素を単離することができた<sup>15,16)</sup>。図2に示すように、1つの酵素はマルトペンタオースの還元末端側のグルコシド結合を $\alpha$ -1,4から $\alpha$ , $\alpha$ -1,1に変換して、非還元性のマルトトリオシルトレハロースを生成する作用を有しており、おそらく分子内転移酵素の一種と考えられた(MTSase:後述)。もう1つの酵素は中間体のマルトトリオシルトレハロースに作用し、マルトトリオースとトレハロースとの間の $\alpha$ -1,4-グルコシド結合を特異的に切断する加水分解酵素(MTHase:後述)であることがわかった。つまり、*Arthrobacter* 属のトレハロース生成は、分子内転移酵素(MTSase)と加水分解酵素(MTHase)との2反応によるものであることが明らかにされた。すでに知られていたトレハロース-6-リン酸合成酵素/トレハロースホスファターゼ系やマルトース/トレハロースホスホリラーゼ系の酵素はリン酸化糖など、リン酸化物を基質とするものであるのに対して、新しく発見された酵素系はグルコースからなる $\alpha$ -1,4-グルカンのみを基質とするトレハロース生成反応であることがその特徴であった。

古細菌の一種である *Sulfolobus* 属が $\alpha$ -1,4-グルカンからトレハロースを生成することはすでに報告されていたが<sup>17)</sup>、その酵素の精製や反応様式は不明であった。最近になって、*Sulfolobus* 属から MTSase と MTHase とが単離され<sup>18~20)</sup>、そのトレハロース生成が *Arthrobacter* 属のものとはほぼ同じ反応であるとわかった。筆者らが調べたかぎりでは、この2つの酵素による $\alpha$ -1,4-グルカンからのトレハロース生成系は、*Arthrobacter* 属や *Sulfolobus* 属だけでなく、*Brevibacterium* 属や *Micrococcus* 属、*Rhizobium* 属など、真正細菌のグラム陽性・陰性菌から古細菌まで幅広く細菌に存在することがわかり<sup>12)</sup>、おそらく細菌における1つのトレハロース生合成系と考えてよい。そのうち、真正細菌 *Arth-*

*robacter* 属と古細菌 *Sulfolobus* 属の酵素は蛋白質精製や遺伝子解析などが比較的よく研究されており、これらを中心に解説を進めていきたい。

## II. MTSase

*Arthrobacter* 属、*Sulfolobus* 属からそれぞれ精製された分子内転移酵素(MTSase)は、分子量や作用最適条件、安定性などに違いがあるものの(表1)、基質特異性はほとんど同じで、グルコースの鎖長が3以上のマルトオリゴ糖( $\alpha$ -1,4-グルカン)を基質として、それぞれに対応するマルトオリゴシルトレハロース(MT)を生成する。そこで、筆者らは本酵素の名称をマルトオリゴシルトレハロース生成酵素(maltooligosyl trehalose synthase; MTSase)としたわけである。この名称は、スクロースからイソマルチュロースを生成する分子内転移酵素がイソマルチュロース生成酵素(EC 5.4.99.11)とすでに命名されていたこと<sup>21)</sup>を踏襲したものである。MTSaseの反応は可逆的であり、MTの $\alpha$ , $\alpha$ -1,1-結合を $\alpha$ -1,4-結合に変え、マルトオリゴ糖に戻す反応も触媒するが、その平衡は $\alpha$ , $\alpha$ -1,1-結合側に傾いており、MTを60~92%(*Arthrobacter* 属)<sup>15)</sup>、45~89%(*Sulfolobus* 属)<sup>18,22)</sup>の割合で生成する。反応の速さは基質の鎖長に依存しており、鎖長の長いマルトオリゴ糖ほど作用を受けやすく、マルトオリゴ糖よりもさらに鎖長の長いアミロースにも容易に作用してアミロシルトレハロースを生成する。一方、鎖長が短くなるにつれてその作用性は下がることもわかっている。作用の可能な鎖長は3までで、鎖長が2のマルトースやトレハロースにはまったく作用しない。

マルトースやトレハロースのみに作用する分子内転移酵素トレハロース生成酵素(表2)は、筆者らのグループが別に *Pimelobacter* 属や *Thermus* 属などの細菌から単離している<sup>23,24)</sup>。トレハロース生成酵素と MTSase との相違はそれぞれの基質特異性に表われており、前者は鎖長が2のマルトースやトレハロースのみに作用し、鎖長が3以上になるとまったく作用しない酵素であるのに対して、後者はその逆でマルトースやトレハロースには作用しないが、鎖長が3以上のマ

表 2 *Pimelobacter* 属と *Thermus* 属のトレハロース生成酵素

性質	<i>Pimelobacter</i> sp. strain R48	<i>Thermus aquaticus</i> ATCC33923
分子量	65 K	110 K
反応至適 pH	pH 7.5	pH 6.5
反応至適温度	20 °C	65 °C
pH 安定性	pH 6.0~9.0	pH 5.5~9.5
温度安定性	30 °C 以下	80 °C 以下

ルトオリゴ糖や MT に作用する酵素である。

MTSase は、グリコーゲンやデンプンなど  $\alpha$ -1,6-結合を含むグルカンには作用性が低下することがわかっている。作用点 (還元末端) の近傍に  $\alpha$ -1,6-結合が存在すると、酵素が作用できなくなることがその原因であろう。作用性を高めるためには、グリコーゲンやデンプンの  $\alpha$ -1,6-結合をイソアミラーゼで加水分解してアミロース化すればよい<sup>25)</sup>。イソアミラーゼ反応はデンプンからオリゴ糖を製造する際、すでに工業的利用がなされているが、興味あることに、細菌もこの反応をトレハロース生成に利用しているらしい。*Sulfolobus* 属のトレハロース遺伝子を解析すると、MTSase 遺伝子の直前にイソアミラーゼ遺伝子が存在しており、加水分解酵素 (MTHase) 遺伝子とともにトレハロース合成オペロンを構成していることがわかり<sup>26)</sup>、この3つの酵素が、グリコーゲンからのトレハロース生成に関与するらしい。

MTSase の活性は、マルトオリゴ糖を MT に変換する分子内転移作用のみであろうか？ 実際、いくつか他の反応も触媒することがわかっている。その1つはフラクトシル基も分子内転移できることで、マルトオリゴシルフラクトースの1,2-結合を1,1-, 1,3-, 1,6-結合に変換する作用を有している。水分子への糖転移(水解作用)も触媒する。しかし、マルトオリゴ糖への分子内転移作用と比べると、これらの反応は微弱であり、細菌の中で本来機能している作用とはいえない。

トレハロース生成酵素もグルコシル基の分子内転移以外

に、フラクトシル基転移や加水分解作用を微弱に触媒することがわかっている。これらの副反応を含めトレハロース生成酵素反応が MTSase のものとよく類似していることや、その一方で両酵素の特異性は基質の重合度においてまったく相違していることは、 $\alpha$ -1,4-グルコシル結合を  $\alpha$ ,  $\alpha$ -1,1-結合に変換するという新規な酵素反応を解明するうえで重要な知見と考えられる。

蛋白質構造面から MTSase やトレハロース生成酵素をみると、少なからず興味ある点が見いだされている。*Arthrobacter* 属と *Sulfolobus* 属の MTSase 1次配列を比較すると、30%程度の相同性が認められ、部分的によく保存されている領域が存在している<sup>26~28)</sup>。類縁酵素の配列との相同性について検索すると、知られているトレハロース関連酵素の配列とは似ておらず、むしろ  $\alpha$ -アミラーゼを中心とする  $\alpha$ -アミラーゼファミリー酵素<sup>29)</sup> と類似することがわかった。トレハロース生成酵素も同様に  $\alpha$ -アミラーゼファミリー酵素と類似していた<sup>30,31)</sup>。 $\alpha$ -アミラーゼファミリーはデンプンやグリコーゲンなどの  $\alpha$ -1,4-結合や  $\alpha$ -1,6-結合に作用し、加水分解や転移作用を触媒する酵素群で、 $\alpha$ -1,1-結合を生成したり加水分解する酵素は含まれていない。また、このファミリーの1次配列中には相同領域が存在し<sup>32)</sup>、その領域のアミノ酸残基が触媒や基質結合に機能している<sup>33,34)</sup>。その領域やアミノ酸残基は、MTSase やトレハロース生成酵素の配列中にも保存されている (図3)。 $\alpha$ -アミラーゼファミリーと類似するところを反応について考えてみると、MTSase やトレハロース生成酵素も  $\alpha$ -アミラーゼファミリーと同じ、基質の

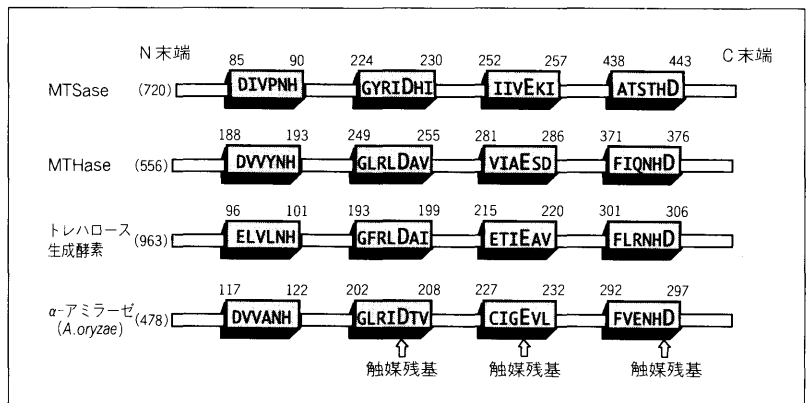


図 3 トレハロース生成酵素と  $\alpha$ -アミラーゼとの相同領域

$\alpha$ -1,4-グルカンと結合し、作用するという共通点を有していることがわかる。保存領域のアミノ酸残基が MTSase やトレハロース生成酵素でも、おそらく基質結合や作用に関係しているのであろう。実際に、保存領域に存在する Asp 残基や Glu 残基に部位特異的変異を導入すると、MTSase やトレハロース生成酵素の触媒作用はまったく消失し、これらカルボキシル残基が触媒基であることがわかった。また、トレハロース生成酵素の1次配列は、 $\alpha$ -アミラーゼファミリーのなかでもマルターゼ（マルトース加水分解酵素）のものと同相性が高く、相同性と基質（マルトース）結合に関係があることも示唆されている。しかし、 $\alpha$ ,  $\alpha$ -1,1-結合を生成する反応機構（ $\alpha$ -アミラーゼファミリーはその反応を触媒しない!）についてはどうであろうか。 $\alpha$ -アミラーゼファミリーと類似した機構で  $\alpha$ ,  $\alpha$ -1,1-結合を生成しているのであろうか、それとも独自の反応機構が存在するのであるか？ 現在のところ、それに対して明確な解答は出ていないが、いくらか興味ある知見は得ている。種々の MTSase 間で保存されている Lys 残基に部位特異的変異を導入して他の残基に置換したところ、変異した MTSase の分子内転移活性（ $\alpha$ ,  $\alpha$ -1,1-結合生成反応）は大きく減少しており、その逆に水解活性（アミラーゼ様反応）は上昇し、その結果として水解活性が優勢なアミラーゼ様酵素に変化しうることがわかった（丸田ら：未発表）。この Lys 残基は  $\alpha$ -アミラーゼファミリー酵素には保存されていない残基であることから、おそらく、MTSase 反応には  $\alpha$ -アミラーゼファミリー酵素と類似した反応機構以外に、 $\alpha$ ,  $\alpha$ -1,1-結合生成のための MTSase 独自の機構が存在し、その機構に Lys 残基が関与すると考えられる。しかし、この Lys 残基はトレハロース生成酵素の配列中には保存されていないし、トレハロース生成酵素と MTSase との間では、 $\alpha$ -アミラーゼファミリーと類似する領域以外に相同領域はほとんど存在しないこともわかっている。すると、トレハロース生成酵素の  $\alpha$ ,  $\alpha$ -1,1-結合生成機構には MTSase とは異なった残基が働いているのではないだろうか。

反応機構の解明には、部位特異的変異や立体構造解析など構造的な研究だけでなく、反応速度や熱力学などのさまざまな観点からアプローチしていかなければならない。今後、研究の進展とともに MTSase やトレハロース生成酵素の  $\alpha$ ,  $\alpha$ -1,1-結合生成反応が完全に解

明されることを期待したい。

### III. MTHase

$\alpha$ -1,4-グルカンからのトレハロース生成は、先に述べた MTSase の作用によってマルトオリゴ糖やアミロースが非還元性の MT やアミロシルトレハロースに変換され、続いて、これから紹介する加水分解酵素 MTHase の作用によってトレハロースが遊離することによって起こる。

*Arthrobacter* 属や *Sulfolobus* 属から単離された加水分解酵素（表1）は、 $\alpha$ -1,4-結合のみからなるマルトオリゴ糖やアミロースにはほとんど作用しない（微弱に加水分解する）が、 $\alpha$ ,  $\alpha$ -1,1-結合を含む MT やアミロシルトレハロースには容易に作用し、マルトオリゴ糖とトレハロースとの間の  $\alpha$ -1,4-グルコシド結合を特異的に加水分解して、トレハロースを生成する<sup>16,19,35</sup>。そこで反応様式に準じて、筆者らは酵素の名称をマルトオリゴシルトレハローストレハロ加水分解酵素 (maltooligosyl trehalose trehalo-hydrolase; MTHase) とした。 $\alpha$ -1,4-グルコシド結合を加水分解することと、その生成物のアノマーが  $\alpha$  型であることから  $\alpha$ -アミラーゼの一種と考えられ、そのアミノ酸1次配列も  $\alpha$ -アミラーゼのものと同相性している<sup>26,27,36</sup>。しかし、基質のトレハロース構造を認識して、隣接する  $\alpha$ -1,4-グルコシド結合を加水分解するという MTHase の反応機構は、これまでわかっている  $\alpha$ -アミラーゼの反応機構では十分に説明しきれない。部位特異的変異解析によって筆者らは、特定の His 残基がトレハロース構造の認識に関与しているらしいとの結果を得ているが（津崎ら：未発表）、現在のところ満足できる解釈には至っていない。

MTHase の基質特異性は特徴的で、作用点の近傍に  $\alpha$ -1,6-結合が存在する分枝オリゴシルトレハロースや、グルコース-1,4-トレハロース-4,1-グルコースといった構造内部にトレハロースを含むオリゴ糖には作用せず、末端にトレハロースが結合した  $\alpha$ -1,4-グルカン (MT やアミロシルトレハロース) に作用する。MT は自然界にはまれな糖質で、 $\alpha$ -グルコシダーゼの転移産物と思われる低分子のグルコシルトレハロースが見いだされているが、この低分子基質には MTHase の作用性は弱い。MTHase の本来の基質は高分子の MT やアミロ

シルトレハロースと考えられ、これら高分子基質は分子内転移酵素 MTSase の作用によってのみ生成する。このことは、MTSase と MTHase との反応が密接に関連していることの一端を示しているものであろう。

2つの酵素の反応条件もよく一致しており(表1)、同時に両反応が続けて起こることは可能である。MTSase と MTHase とを同時に長鎖の  $\alpha$ -1,4 グルカン(アミロース)に作用させると、どうなるであろうか。まず、MTSase がアミロース(グルコース重合度を N とする)をアミロシルトレハロースに変換する。反応は分子内転移であるからアミロシルトレハロースの重合度は N のままである。続いて、MTHase がそのアミロシルトレハロースを加水分解して、アミロース(重合度 N-2)とトレハロース(重合度 2)を生成する。生成したアミロースは、再度2つの酵素の作用を受け、アミロース(重合度 N-4)とトレハロースを生成する。このくり返しが続き、トレハロースは蓄積する。最終的にアミロースの重合度が2以下(マルトースかグルコース)になると反応は止まる。算術上の計算はともかく、1分子のアミロースから多分子のトレハロースが生成することは理解できたと思う。実際、アミロースに MTSase と MTHase とを同時に作用させると、トレハロースの生成率はアミロースの重合度に依存して増加し、80%以上の純度でトレハロース生成することもわかっている。おそらく、細菌の細胞内でもこのような効率的なトレハロース生成反応が起こっていると筆者は考えている。

興味あることに、遺伝子レベルにおいても両酵素の関連性が示唆されている。MTSase 遺伝子 (*treY*) と MTHase 遺伝子 (*treZ*) とは、*Arthrobacter* 属、*Sulfolobus* 属とも染色体上で近接して存在している(図4)。*Arthrobacter* 属では、未同定遺伝子 → *treY* → *treZ* の順で並んでおり、*treY* の終止コドンを含む4塩基が *treZ* と重複した構造になっている<sup>27)</sup>。一方、*Sulfolobus* 属では、*treZ* → イソアミラーゼ遺伝子 (*treX*) → *treY* の順で並んでおり、それぞれの遺伝子は *Arthrobacter* 属の場合と同様に4塩基ずつ重複している<sup>26)</sup>。遺伝子群の前にはプロモーター配列や転写終結シグナル配列が存在しており、トレハロース生合成オペロンを形成していることが示唆されている。中温性(30°C付近)の真正細菌である *Arthrobacter* 属も、系統的に縁遠い好熱(70°C付近)好酸性の古細菌である *Sulfolobus* 属

もトレハロース生合成の遺伝子がオペロンを形成していることは注目に値する。

大腸菌のトレハロース生合成は異なる酵素系であるが、その酵素遺伝子 *ostA*(トレハロース-6-リン酸合成酵素)と *ostB*(トレハロースホスファターゼ)もトレハロース生合成オペロン *ostBA* を形成している<sup>37)</sup>。*Thermus* 属のトレハロース生成酵素遺伝子 (*treS*) の上流には *ostB* 様の配列が存在することがわかり<sup>31)</sup>、*Thermus* 属では2つのトレハロース生合成系(トレハロース生成酵素系とトレハロースホスファターゼ系)を有している可能性がある。

細菌とトレハロースとのかわりかは、単にエネルギー貯蔵糖としてだけでなく、細菌が環境から受けるさまざまなストレス(温度、乾燥、浸透圧、酸素など)にตอบสนองする糖質として位置づけることができる<sup>38-40)</sup>。ストレスに対応するため、おそらく細胞は複雑な反応を示し、その1つとしてトレハロース生合成が起こると

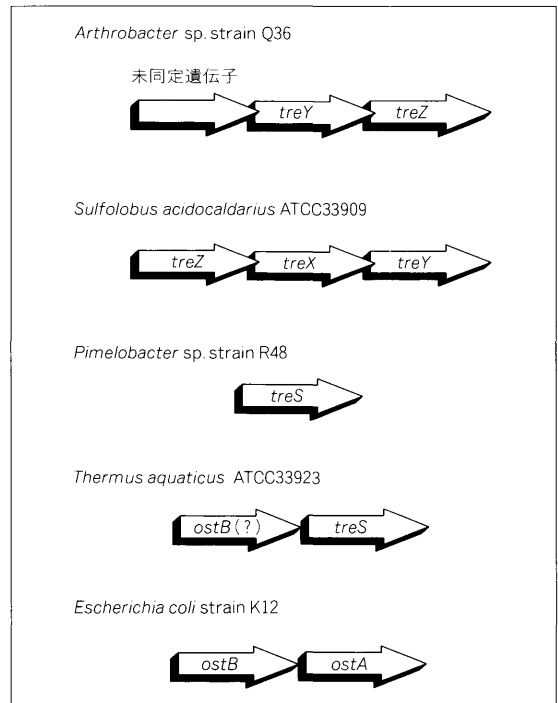


図4 細菌のトレハロース遺伝子  
 トレハロース遺伝子の DNA 配列は遺伝子データベース (DDBJ, GenBank など)に登録されている。アクセッション No.: *Arthrobacter* sp. strain Q36 : D63343, *Sulfolobus acidocaldarius* ATCC33909 : D83245, *Pimelobacter* sp. strain R48 : D78198, *Thermus aquaticus* ATCC33923 : D86216。

考えられる。そのような観点からトレハロース遺伝子をみると、その発現や制御の機構を明らかにすることは細胞応答のネットワークを解きほぐす一端になるかもしれない。今後、詳細なトレハロース遺伝子の研究が待たれる。

おわりに 本稿では、MTSase と MTHase を中心にトレハロース生成する新規な酵素反応を紹介した。この2つの酵素やトレハロース生成酵素は、これまで知られていたり

ン酸やリン酸化糖を要求する反応とは異なり、 $\alpha$ -1,4-グルカンのみを反応の基質とするもので、これら新規な酵素の発見は細菌におけるトレハロース生合成の新しい展開のきっかけとなるのではないかと。少なくとも、MTSase/MTHase 系は、細菌の生体内貯蔵糖としてグリコーゲンからトレハロースを生成する反応を合理的に説明していると思われる。

この新規な酵素を利用して、すでにトレハロースの工業製造が実現しており<sup>41,42)</sup>、現在では食品や化粧品などに大量供給されている。その製造法(図5)は、実に細菌が細胞内でトレハロース生合成している反応を模倣したものであるといわなければならない。細菌ではおそらくグリコーゲンを出発基質としているのに対して、工業製法は類似した多糖のデンプンを始発原料としている。イソアミラーゼ反応によってデンプンをアミロース化したのち、MTSase 反応によってアミロシルトレハロース化し、MTHase 反応によってトレハロースを遊離させる。細胞内と同様に、この3つの酵素は同一の反応タンク中で作用し、MTSase と MTHase 反応がくり返されることにより効率的にトレハロース生成する。むしろ工業的には、さらに効率を上げるためにいくつかの工程や、食品や化粧品などの用途に安全に提供するために精製や結晶化の工程が加わっていることは当然であるが、基本的に細胞内反応と同じである。本稿では紹介できなかったが、この酵素反応を工業的に利用するにはたぶん技術的な開発もあった

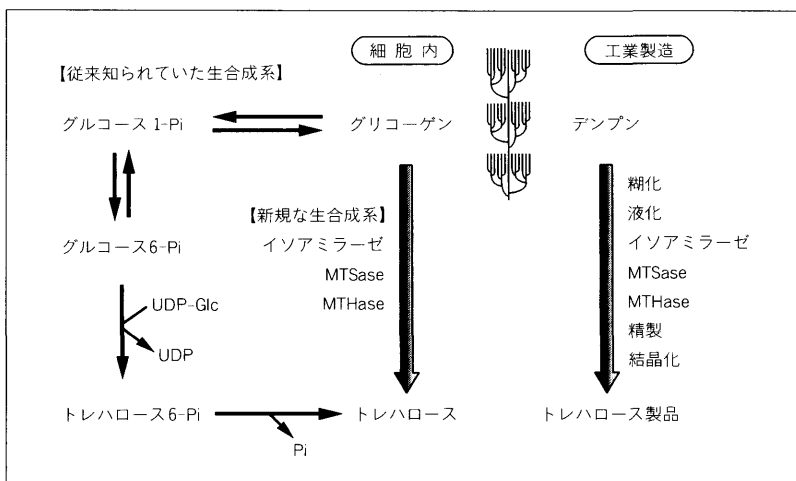


図5 細胞内トレハロース生成と工業製造方法

ことを最後につけ加えておかなければならない。

文 献

- 1) Berthelot, M. : *Ann. Chim. Phys.*, **55**, 269-296 (1859)
- 2) Elbein, A.D. : *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, **30**, 227-256 (1974)
- 3) 吉田 博・菅原龍幸・林 淳三 : 日本食品工業学会誌 **29**, 451-459 (1982)
- 4) Bergoz, R., Vallotton, M. : *Ann. Nutr. Metabol.*, **26**, 291-295 (1982)
- 5) Carpenter, J. F., Crowe, L. M., Crowe, J. H. : *Biochim. Biophys. Acta*, **923**, 109-115 (1987)
- 6) Crowe, J. H. : *Biochim. Biophys. Acta*, **947**, 367-384 (1988)
- 7) Coutinho, C., Bernardes, E., Felix, D., Panek, A. D. : *J. Biotechnol.*, **7**, 23-32 (1988)
- 8) Reed, R. H., Borowitzka, L. J., Mackay, M. A., Chudek, J. A., Foster, R., Warr, S. C. R., Moore, D. J., Stewart, W. D. P. : *FEMS Microbiol. Rev.*, **39**, 51-56 (1986)
- 9) Cabib, E., Leloir, L. F. : *J. Biol. Chem.*, **231**, 259-275 (1958)
- 10) Murao, S., Nagano, H., Ogura, S., Nishino, T. : *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 2113-2118 (1985)
- 11) Nakano, H., Moriwaki, M., Washino, T., Kitahata, S. : *Biosci. Biotech. Biochem.*, **58**, 1435-1438 (1994)
- 12) Maruta, K., Nakada, T., Kubota, M., Chaen, H., Sugimoto, T., Kurimoto, M., Tsujisaka, Y. : *Bio-*

- sci. Biotech. Biochem.*, **59**, 1829-1834 (1995)
- 13) Nishimoto, T., Nakano, M., Ikegami, S., Chaen, H., Fukuda, S., Sugimoto, T., Kurimoto, M., Tsujisaka, Y. : *Biosci. Biotech. Biochem.*, **59**, 2189-2190 (1995)
  - 14) Lopez, M. F., Fontaine, M. S., Torrey, J. G. : *Can. J. Microbiol.*, **30**, 746-752 (1984)
  - 15) Nakada, T., Maruta, K., Kubota, M., Chaen, H., Sugimoto, T., Kurimoto, M. : *Biosci. Biotech. Biochem.*, **59**, 2210-2214 (1995)
  - 16) Nakada, T., Maruta, K., Kubota, M., Chaen, H., Sugimoto, T., Kurimoto, M. : *Biosci. Biotech. Biochem.*, **59**, 2215-2218 (1995)
  - 17) Lama, L., Nicolaus, B., Trincone, A., Morzillo, P., De Rosa, M., Gambacorta, A. : *Biotechnol. Lett.*, **12**, 431-432 (1990)
  - 18) Nakada, T., Ikegami, S., Chaen, H., Kubota, M., Fukuda, S., Sugimoto, T., Kurimoto, M., Tsujisaka, Y. : *Biosci. Biotech. Biochem.*, **60**, 263-266 (1996)
  - 19) Nakada, T., Ikegami, S., Chaen, H., Kubota, M., Fukuda, S., Sugimoto, T., Kurimoto, M., Tsujisaka, Y. : *Biosci. Biotech. Biochem.*, **60**, 267-270 (1996)
  - 20) Kato, M., Miura, Y., Kettoku, M., Shido, K., Iwamatsu, A., Kobayashi, K. : *Biosci. Biotech. Biochem.*, **60**, 546-550 (1996)
  - 21) Cheetham, P. S. J. : *Biochem. J.*, **220**, 213-217 (1984)
  - 22) Kato, M., Miura, Y., Kettoku, M., Shido, K., Iwamatsu, A., Kobayashi, K. : *Biosci. Biotech. Biochem.*, **60**, 921-924 (1996)
  - 23) Nishimoto, T., Nakano, M., Nakada, T., Chaen, H., Fukuda, S., Sugimoto, T., Kurimoto, M., Tsujisaka, Y. : *Biosci. Biotech. Biochem.*, **60**, 640-644 (1995)
  - 24) Nishimoto, T., Nakada, T., Chaen, H., Fukuda, S., Sugimoto, T., Kurimoto, M., Tsujisaka, Y. : *Biosci. Biotech. Biochem.*, **60**, 835-839 (1995)
  - 25) Yokobayashi, K., Misaki, A., Harada, T. : *Biochim. Biophys. Acta*, **212**, 458-469 (1970)
  - 26) Maruta, K., Mitsuzumi, H., Nakada, T., Kubota, M., Chaen, H., Fukuda, S., Sugimoto, T., Kurimoto, M. : *Biochim. Biophys. Acta*, **1291**, 177-181 (1996)
  - 27) Maruta, K., Hattori, K., Nakada, T., Kubota, M., Sugimoto, T., Kurimoto, M. : *Biochim. Biophys. Acta*, **1289**, 10-13 (1996)
  - 28) Kobayashi, K., Kato, M., Miura, Y., Kettoku, M., Komeda, T., Iwamatsu, A. : *Biosci. Biotech. Biochem.*, **60**, 1720-1723 (1996)
  - 29) Yamamoto, T., Shinke, R. : *in* Enzyme Chemistry and Molecular Biology of Amylase and Related Enzymes (ed. The Amylase Research Society of Japan). pp. 3-5, CRC Press, Boca Raton (1995)
  - 30) Tsusaki, K., Nishimoto, T., Nakada, T., Kubota, M., Chaen, H., Sugimoto, T., Kurimoto, M. : *Biochim. Biophys. Acta*, **1290**, 1-3 (1996)
  - 31) Tsusaki, K., Nishimoto, T., Nakada, T., Kubota, M., Chaen, H., Sugimoto, T., Kurimoto, M. : *Biochim. Biophys. Acta*, 印刷中 (1997)
  - 32) Nakamura, A., Yamane, K. : *in* Enzyme Chemistry and Molecular Biology of Amylase and Related Enzymes (ed. The Amylase Research Society of Japan), pp. 83-87, CRC Press, Boca Raton (1995)
  - 33) Matsuura, Y., Kusunoki, M., Harada, W., Kakudo, M. : *J. Biochem.*, **95**, 697-702 (1984)
  - 34) Qian, M., Haser, R., Payan, F. : *J. Mol. Biol.*, **231**, 785-799 (1993)
  - 35) Kato, M., Miura, Y., Kettoku, M., Komeda, T., Iwamatsu, A., Kobayashi, K. : *Biosci. Biotech. Biochem.*, **60**, 925-928 (1996)
  - 36) Maruta, K., Hattori, K., Nakada, T., Kubota, M., Sugimoto, T., Kurimoto, M. : *Biosci. Biotech. Biochem.*, **60**, 717-720 (1996)
  - 37) Kaasen, I., McDougall, J., Strom, A. R. : *Gene*, **145**, 9-15 (1994)
  - 38) Laere, A. V. : *FEMS Microbiol. Rev.*, **63**, 201-210 (1989)
  - 39) Larsen, P. I., Sydnes, L. K., Landfald, B., Strom, A. R. : *Arch. Microbiol.*, **147**, 1-7 (1987)
  - 40) Streeter, J. G. : *J. Bacteriol.*, **164**, 78-84 (1985)
  - 41) 田淵彰彦・万代隆彦・渋谷 孝・福田恵温・杉本利行・栗本雅司 : 応用糖質科学, **42**, 401-406 (1995)
  - 42) 杉本利行 : バイオサイエンスとバイオインダストリー, **53**, 777-779 (1995)