

ミニレビュー

澱粉枝切り酵素 —構造、機能、産業利用、生理的役割—

岩本 博行

澱粉枝切り酵素 (starch debranching enzyme) は、アミロペクチンやグリコーゲンの分岐を形成する α -1,6-グルコシド結合を特異的に加水分解する酵素で、微生物と植物に分布する。その生理的役割は、微生物では α -ポリグルカンの分解であり、植物では発芽時における種子胚乳澱粉や葉の同化澱粉の分解に加え、アミロペクチンの生合成にも重要な役割を果たしている。一方動物には澱粉枝切り酵素は存在せず、グリコーゲンの分岐鎖はグリコーゲン脱分岐酵素により分解される。澱粉枝切り酵素はその基質特異性の違いにより、大きくプルラナーゼとイソアミラーゼに分類される¹⁾。両酵素はいずれもアミロペクチンの枝切りを行うが、イソアミラーゼがグリコーゲンによく作用するのに対して、プルラナーゼはグリコーゲンを極めてゆっくりとしか加水分解しない。一方、澱粉やグリコーゲンと同じ α -ポリグルカンであるプルランは、イソアミラーゼがほとんど作用できないのに対して、プルラナーゼは文字通りよい基質とする。プルランとは黒色酵母 *Pullularia pullulans* (*Aureobasidium pullulans*) が生産する水溶性の粘性多糖であり、マルトトリオース (G3) が α -1,6-グルコシド結合で鎖状に連結したフレキシブルな構造を持つ²⁾。プルラナーゼにとってプルランは生理的な基質ではないため、プルラナーゼという名称が適切かどうか議論があるが、イソアミラーゼとの基質特異性の違いを明瞭に表すことも確かであり、微生物、植物由来のいずれの酵素に対してもプルラナーゼという名称が一般的に用いられる。

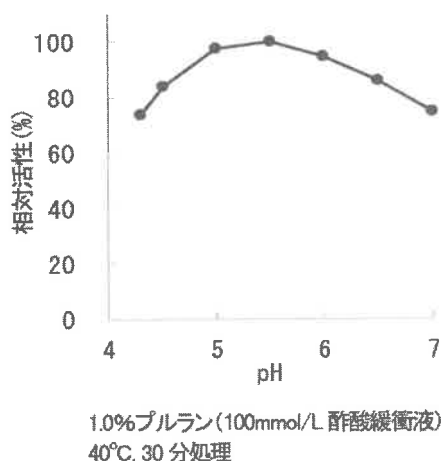
キーワード： 澱粉枝切り酵素、プルラナーゼ、イソアミラーゼ、アミロペクチン生合成

プルラナーゼ

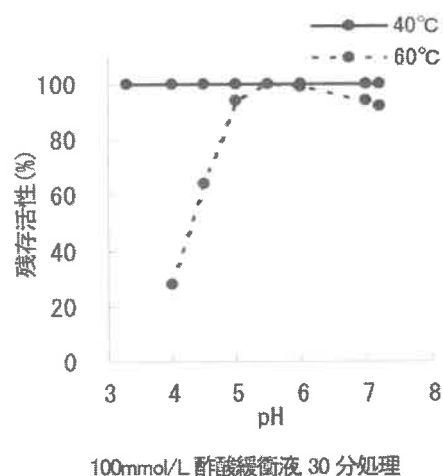
プルラナーゼ (pullulanase, pullulan 6- α -glucanohydrolase, EC 3.2.1.41) は 1961 年 Bender と Wallenfels により *Aerobacter aerogenes* (*Klebsiella pneumoniae*)³⁾ から発見され、その後様々な起源の微生物プルラナーゼが報告されている⁴⁾。一方、植物にもプルラナーゼが存在することが報告され、R-酵素またはリミットデキストリナーゼとも呼ばれる⁵⁾。微生物由来プルラナーゼには、 α -1,6 結合に加えて α -1,4 結合も加水分解するものがあり、 α -1,6 結合のみを切断する酵素を Type I プルラナーゼ、 α -1,4 結合と α -1,6 結合の両方を加水分解する酵素を Type II プルラナーゼ (またはアミロプルラナーゼ) と呼ぶ⁶⁾。特に *Archaea* (古細菌、始原菌) が持つプルラナーゼは、ほとんどが Type II プルラナーゼであると言われる。Type II プルラナーゼは Type I プルラナーゼと異なるファミリーに属する酵素であり、同一の活性中心で α -1,4、 α -1,6 結合の両方を加水分解するもの⁷⁾と、1 本のポリペプチド鎖中に α -1,4 結合と α -1,6 結合を加水分解する 2 つの酵素が連結したものがある⁸⁾。

プルナーゼをプルランに作用させると、 α -1,6 結合のみを切断してほぼ完全にマルトリオースにまで分解する。本酵素は分岐部分から 2 残基のグルコースを持つマルトシル側鎖をよく加水分解し、アミロペクチンを β -アミラーゼで消化した生成物である β -リミットデキストリンの分岐鎖を完全に枝切りする。一方、グ

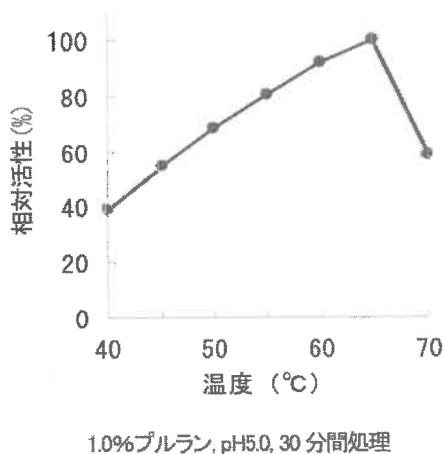
pH と活性



pH 安定性



反応温度と活性



熱安定性

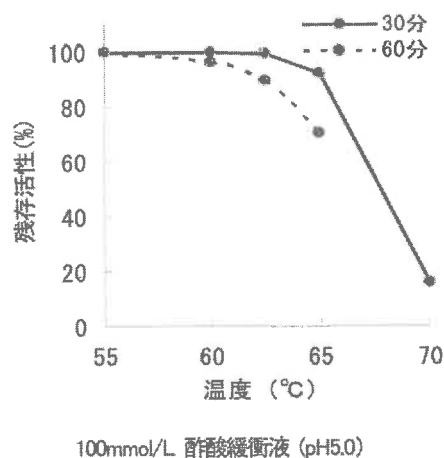
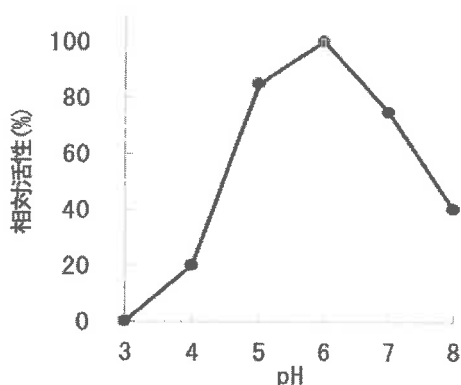


図1 *Bacillus brevis*由来プルナーゼ(クライスターゼ® PL45)の諸性質
(天野エンザイムのパンフレットより引用)

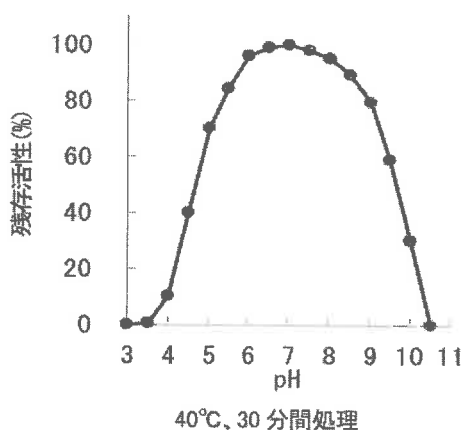
ルコース 1 残基からなるグルコシル側鎖は切断できない。

Bacillus および *Klebsiella* 由来のプルラーナーゼは、サイクロデキストリンやマルトオリゴ糖により強く阻害され、その阻害様式は拮抗型である⁹⁾。阻害の強さは、 α -および γ -サイクロデキストリンの阻害物質定数 (K_i) が 100 μM 程度であるのに対して、 β -サイクロデキストリンの阻害物質定数 (K_i) は 1 μM 以下と、100 倍程度阻害が強い。*Klebsiella* 由来プルラーナーゼとマルトオリゴ糖との複合体¹⁰⁾、および *Bacillus* 由来プルラーナーゼと α -サイクロデキストリンとの複合体の X 線結晶構造解析¹¹⁾はすでに報告され、これら基質ア

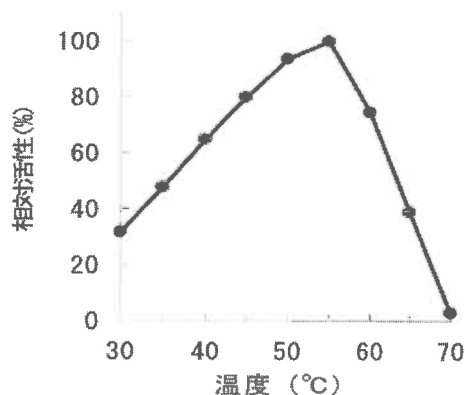
pH と活性



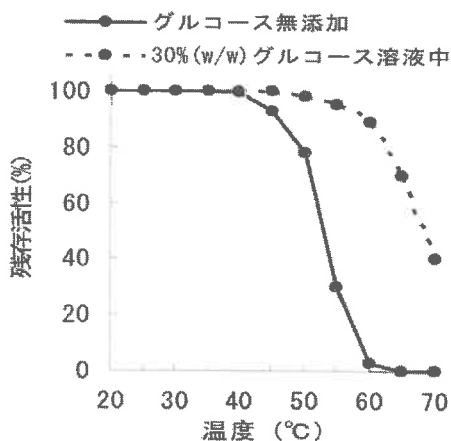
pH 安定性



反応温度と活性



熱安定性



pH6.0、30 分間処理

図2 *Klebsiella pneumoniae* 由来プルラーナーゼ
(プルラーナーゼ「アmano」3)の諸性質(天野エンザイムのパンフレットより引用)

ナログは酵素の活性中心に結合することにより酵素活性を拮抗的に阻害する（後述の「澱粉枝切り酵素の構造と機能」の項参照）。

工業的に利用される微生物由来プルラーゼの例として、図 1 および図 2 にそれぞれ天野エンザイムから市販されている *Bacillus brevis* 由来プルラーゼ（クライスターゼ®PL45）と *Klebsiella pneumoniae* 由来プルラーゼ（プルラーゼ「アマノ」3）の諸性質を示す。両酵素とも至適 pH は pH 5～6 付近であるが、*Bacillus* 由来プルラーゼの方が *Klebsiella* 由来酵素に比べて pH プロファイルがやや酸性側に偏っている。一方、至適温度は *Klebsiella* 由来酵素が 55℃であるのに対して、*Bacillus* 由来酵素は 65℃と顕著に高く、耐熱性、pH 安定性ともに優れている。このため工業的な澱粉の糖化行程には主として熱安定な *Bacillus* 由来プルラーゼが用いられるが、*Klebsiella* 由来プルラーゼも特定の食品の製造・加工に用いられる。

イソアミラーゼ

イソアミラーゼ (isoamylase, glycogen α -1,6-glucanohydrolase, EC 3.2.1.68) は、アミロペクチンの分岐鎖を分解する酵素として酵母抽出液に見いだされ、イソアミラーゼと命名された。本酵素は当初、アミロペクチンに作用させると青色のヨウ素澱粉反応を呈するためアミロース合成酵素だと考えられたが、後に青色の呈色はアミロペクチンの分岐鎖が除去されるためであることが判明した。なお酵母 *Saccharomyces* 由来の酵素は、1 本のポリペプチド鎖中にオリゴ-1,4 \rightarrow 1,4-グルカノトランスフェラーゼ (EC 2.4.1.25) とアミロ-1,6-グルコシダーゼ (EC 3.2.1.33) が連結したグリコーゲン枝切り酵素であり、本稿で述べるイソアミラーゼとは異なる酵素である¹²⁾。現在最も研究が進んでいるイソアミラーゼである土壌細菌 *Pseudomonas amyloclavata* 由来の酵素は、1968 年原田らによって初めて報告され¹³⁾、勝矢らにより X 線結晶構造解析が行われた¹⁴⁾。イソアミラーゼは *Pseudomonas* 以外にも多くの微生物や植物に分布し、特に植物由来酵素はアミロペクチンの生合成に重要な役割を担っている（後述の「植物における澱粉枝切り酵素」の項参照）。

イソアミラーゼは、プルラーゼと異なりプルランをほとんど加水分解できない。pH 3.5、25℃での *Pseudomonas amyloclavata* 由来イソアミラーゼのプルランに対する k_{cat} (分子活性) は 1 s^{-1} 前後または 1 s^{-1} 以下であり、グリコーゲンに対する *Bacillus* や *Klebsiella* 由来プルラーゼの k_{cat} と同程度である。このことから、イソアミラーゼとプルラーゼは、それぞれプルランとグリコーゲンをほぼ加水分解できないという基質特異性の違いで峻別される事がわかる。代表的な産業用イソアミラーゼである *Pseudomonas amyloclavata* 由来酵素の至適 pH は 3.5 と低く、至適温度は 52℃である。至適温度は *Bacillus* 由来プルラーゼに比べて著しく低く、*Klebsiella* 由来プルラーゼと同程度である。

イソアミラーゼとプルラーゼの基質に対する作用パターンについては、いくつか報告がある。*Pseudomonas* 由来イソアミラーゼがアミロペクチンのほとんどの枝分かれを切断するのに対して、プルラーゼは外側にある枝のみ切断可能で、内部にある分岐鎖には作用しないとされる¹⁵⁾。*Pseudomonas* 由来イソアミラーゼが持つこの様な性質により、同酵素は産業用途に加え、澱粉の構造解析に不可欠な酵素となっている。加水分解する分岐鎖の鎖長については、一般にプルラーゼは短い枝を好み、イソアミラーゼは長い枝を好むとされるが、イソアミラーゼもマルトシル側鎖を加水分解することができる。一方、いずれの酵素もグルコース 1 残基からなるグルコシル側鎖には作用できない。シクロデキストリンによる阻害につい

では、*Klebsiella* および *Bacillus* 由来プルラナーゼに対するシクロデキストリンの阻害物質定数 (K_i) が μM オーダーであるのに対して (β -シクロデキストリンではサブ μM オーダー)、*Pseudomonas* 由来イソアミラーゼに対しては mM オーダーであり、シクロデキストリンによる阻害はプルラナーゼに比べて著しく弱い。またプルラナーゼと異なり、 α 、 β 、 γ -シクロデキストリン間で阻害の強さに顕著な差はない。

澱粉枝切り酵素の産業利用

産業用酵素としての澱粉枝切り酵素は、そのほとんどすべてが食品加工用途である。資料が少々古いが、食品化学新聞（平成 23 年 1 月 13 日）によると、2010 年の食品加工用酵素市場の総額は 189 億 4 千万円であり、その中でグルコアミラーゼ／プルラナーゼ混液は 13 億 2 千万円と全体の約 7% を占める。この状況は現在でもそう大きく変わっていないと推定される。澱粉枝切り酵素は主に澱粉糖化工程に用いられ、グルコアミラーゼや β -アミラーゼと併用することにより、グルコースシラップやハイマルトースシラップの収率を向上させる。

一般的なブドウ糖（グルコース）および麦芽糖（マルトース）の製造工程は、まず pH 6 付近に調整した約 35% の澱粉乳液に耐熱性 α -アミラーゼを加え、ジェットクッカーを用いて 5~10 分程度 105℃ に保持して糊化した後、95℃ 付近で約 2 時間酵素反応を行い、液化澱粉を得る¹⁶⁾。その後、ブドウ糖の製造では pH を 4.5 付近に調整してグルコアミラーゼ／プルラナーゼを加え、60℃ 付近で約 2 日間反応を行う。一方麦芽糖の製造では、液化澱粉の pH を 5.5 付近に調整して β -アミラーゼとプルラナーゼを加え、60℃ 付近で約 2 日間酵素反応を行う。ブドウ糖の製造工程では、グルコアミラーゼが α -1,6 結合を切る反応速度が α -1,4 結合を切る速度に比べて遅いので、これを補う目的で澱粉枝切り酵素が用いられる。一方麦芽糖の製造では、 β -アミラーゼはアミロペクチンの非還元末端からマルトース単位で α -1,4 結合を加水分解するが、 α -1,6 結合の手前で反応が停止し β -リミットデキストリンが残る。プルラナーゼはこの β -リミットデキストリンを非常に効率よく枝切りするので、マルトースの収率を飛躍的に高める。

次に、産業用澱粉枝切り酵素開発の歴史について、「日本酵素産業小史」（日本酵素協会、p. 79, 2009）から抜粋して紹介する。まず 1973 年、A.E. スティレー社がグルコアミラーゼと α -1,6 グルコシダーゼを併用して澱粉液化液の糖化を行うと、ブドウ糖の収率が上がることを報告した。日本では 1978 年に天野製薬（現 天野エンザイム）が *Bacillus sectramas* 由来のプルラナーゼを開発し、1979 年には通産省工業技術院発酵研究所（現（国研）産業技術総合研究所）の高橋義幸が、グルコアミラーゼと *Bacillus cereus* 由来 α -1,6 グルコシダーゼを併用することによりブドウ糖の収率を上げた。1981 年林原は、*Pseudomonas amyloclavata* 由来のイソアミラーゼを開発し、グルコアミラーゼと併用することによりブドウ糖の収率をあげた。続いて 1981 年にはノボ・インダストリーが、工業用途で使いやすい pH 4.5、60℃ で高い活性を持つ *Bacillus acidopulluliticus* 由来のプルラナーゼを開発し、「プロモザイム」の商品名で商品化した。その後 1992 年に天野エンザイムは、より耐熱性の高い *Bacillus* 由来のプルラナーゼを、ナガセ生化学工業（現 ナガセケムテックス）は同年 *Bacillus circulans* 由来のプルラナーゼを、また大和化成は 1995 年に *Bacillus brevis* 由来のプルラナーゼ「クライスターゼ PLF」を市場に出した。この様に、現在も産業用澱粉枝切り酵素の弛まぬ開発が続けられている。

澱粉枝切り酵素の構造と機能

澱粉枝切り酵素（イソアミラーゼおよび Type I プルラナーゼ）は α -アミラーゼファミリーに属し、CAZy (Carbohydrate Active Enzymes, <http://www.cazy.org>) のデータベース¹⁷⁾では GH (Glycoside Hydrolase) ファミリー13に分類される。このファミリーには、澱粉枝切り酵素以外に α -アミラーゼ (EC 3.2.1.1)、サイクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ (EC 2.4.1.19)、ネオプルラナーゼ (EC 3.2.1.135)、 α -グルコシダーゼ (EC 3.2.1.20) など多くの酵素が含まれ、(B/ α)₈バレル構造からなる共通の活性ドメイン (Aドメイン) を持つ。 α -アミラーゼファミリーに属する酵素のAドメインには、活性中心を形成する4つの保存領域 I~IVが見られ、澱粉枝切り酵素にもこれら保存領域が含まれる。Jaspersen らは様々な澱粉加水分解酵素のアミノ酸配列を比較し、ドメイン構造を系統的に分類した^{18,19)}。 α -アミラーゼファミリーにおける澱粉枝切り酵素の構造的な特徴の一つは、Aドメイン中に独立したBドメインが存在せず、AドメインよりもさらにN末端側に追加のドメイン (Nドメイン) が存在することである。これまでに結晶構造が明らかにされた澱粉枝切り酵素としては、*Pseudomonas amyloclavata* 由来イソアミラーゼ¹⁴⁾、*Klebsiella pneumoniae* 由来プルラナーゼ¹⁰⁾、*Bacillus subtilis* sp. 由来プルラナーゼ¹¹⁾などがあるが、最近になって大腸菌由来のグリコーゲン枝切り酵素 (GlgX)²⁰⁾や、植物由来の澱粉枝切り酵素としては初めて大麦由来リミットデキストリナーゼ²¹⁾の結晶構造が報告された。本稿では、この中で代表的な澱粉枝切り酵素である *Pseudomonas amyloclavata* 由来イソアミラーゼと、*Klebsiella pneumoniae* 由来プルラナーゼを取り上げ、その構造と機能について述べる。

イソアミラーゼの構造¹⁴⁾

Pseudomonas amyloclavata 由来のイソアミラーゼは、最初に結晶構造が明らかにされた澱粉枝切り酵素である。本酵素は 750 残基よりなる分子量約 80 kDa の単量体酵素で、N、A、Cという3つのドメインからなる (図3)。活性中心があるAドメインは 468 残基のアミノ酸からなり、そのN末端側には 160 残基よりなるNドメインが、C末端側には 122 残基からなるCドメインが存在する。Nドメインの最初の半分は、6本の β -ストランドと1本の短い α -ヘリックスが β -サンドイッチ構造を形成し、本酵素の立体構造解析により初めてその構造が明らかになった。一方、Cドメインは α -アミラーゼのCドメインと類似しており、A、Cドメイン間には主鎖間に1本も水素結合がなく、主に疎水性相互作用のみで接している。Aドメインは α -アミラーゼファミリー酵素に共通する (B/ α)₈バレル構造を持つが、A85とA86の2つの β -ストランド間の α -ヘリックスが欠損しており、一部崩れたバレル構造をとっている。また、A87ストランドとA7ヘリックスの間に長いループ (520-554) と一巻きの短い α -ヘリックス A7a (514-519) が挿入されており、この部分がA87ストランドの上に積み上がることで基質結合クレフトをより深くしている。この構造はイソアミラーゼに特徴的であり、 α -アミラーゼやプルラナーゼでは見られない。一方、本酵素には3つジスルフィド (SS) 結合 (389:396, 520:590, 712:740) と1つのCa²⁺が存在し、酵素の安定性を高めていると考えられる。Ca²⁺はAドメインとNドメインの間にあり、 α -アミラーゼ間で保存されているCa²⁺結合位置 (A

ドメインとBドメインの間)とは異なる。本酵素の触媒残基は、 α -アミラーゼとのアミノ酸配列および立体配置の相同性から Asp375、Glu435、Asp510 と推定される。

プルラナーゼの構造¹⁰⁾

三上らは、*Klebsiella pneumoniae* 由来プルラナーゼとそのグルコース (G1)、マルトース (G2)、イソマルトース (isoG2)、マルトトリオース (G3) およびマルトテトラオース (G4) 複合体の結晶構造を分解能 1.7–1.9 Å で解析した。精密化されたモデル中には、全構成アミノ酸残基 1150 残基のうちの 920–1052 アミノ酸残基、952–1212 の水分子、4 または 5 個の Ca^{2+} 、および酵素に結合した糖分子が含まれる。本酵素は分子量約 120 kDa の 1 本のポリペプチド鎖からなり、全体は N 1 (39-172)、N 2 (32-38 および 173-287)、N 3 (288-395)、A (396-966)、C (967-1083) という 5 つのドメインからなる (図 4)。このうち N 3、A、C の 3 つのドメインは *Pseudomonas* 由来イソアミラーゼの N、A、C ドメインと相同性があり、N 1 および N 2 ドメインはプルラナーゼに独自のドメインである。N 1、N 2、N 3 および C ドメインは 2 枚の β -シートからなる β -サンドイッチ構造を取り、活性中心を含む A ドメインは α -アミラーゼやイソアミラーゼ

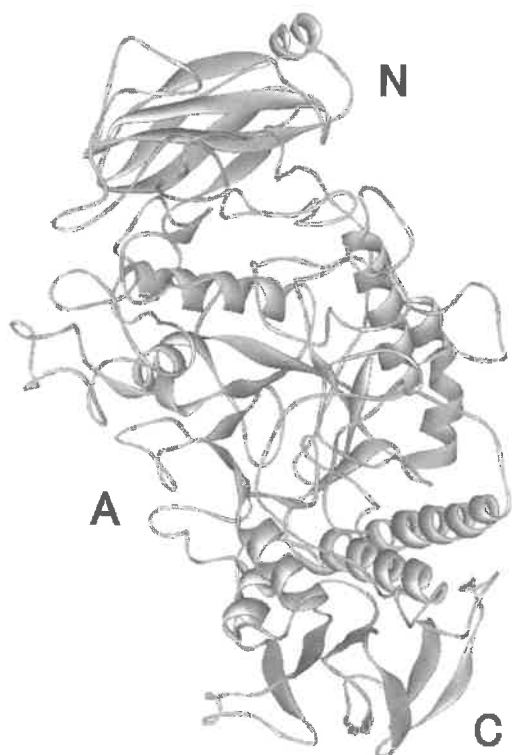


図3 *Pseudomonas amyloclavata*由来イソアミラーゼの結晶構造¹⁴⁾
N, A, CはそれぞれN, A, Cドメインを示す。

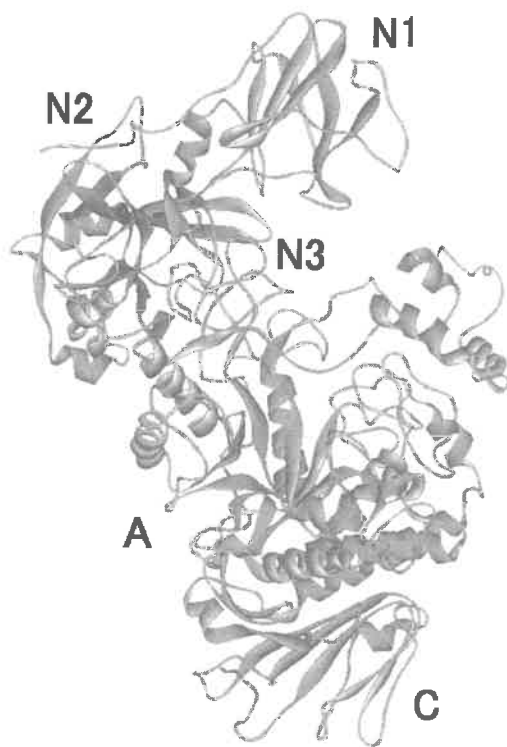


図4 *Klebsiella pneumoniae*由来プルラナーゼの結晶構造¹⁰⁾
N1, N2, N3, A, CはそれぞれN1, N2, N3, A, Cドメインを示す。

同様 $(\beta/\alpha)_8$ バレル構造を持つ。酵素分子にはN1ドメインに1つ、Aドメインに3つ、Cドメインに1つ、合計5個の Ca^{2+} 結合サイトが存在する。N1ドメインは澱粉結合ドメイン (CBM41) であり、G3 および G4 複合体でのみ明瞭な電子密度が観察される。これは、N2、N3、A、Cドメインがお互いに水素結合やファンデルワールス相互作用により強固に結びついているのに対して、N1ドメインは他のドメインと水素結合を持たず孤立して存在し、G3、G4 複合体以外の結晶中では位置が固定されていないためだと推定される。なお G3 および G4 複合体には、N1ドメイン中の一方の β -シート表面にマルトースが結合しており、マルトースの2つのグルコース環は Trp80 と Trp95 とスタッキング相互作用している。

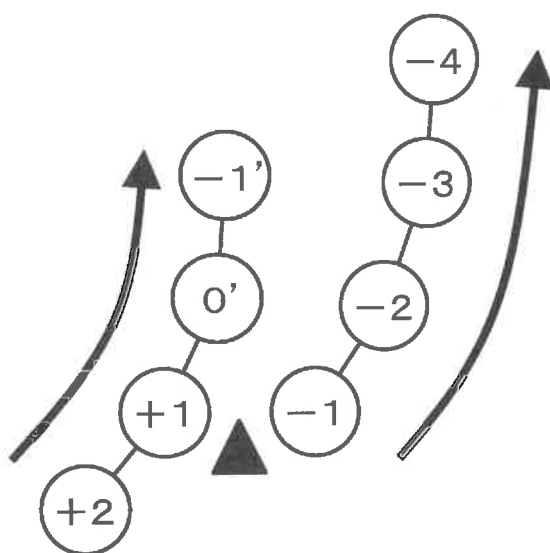


図5 *Klebsiella pneumoniae*由来プルラーナーゼのサブサイト構造の模式図¹⁰⁾
数字はサブサイト番号、▲は加水分解位置(α-1,6結合)を示す。

Klebsiella 由来プルラーナーゼでは、酵素と鎖長の異なるマルトオリゴ糖との複合体の立体構造が明らかにされたため、*Pseudomonas* 由来イソアミラーゼではよくわからなかった澱粉枝切り酵素のサブサイト構造や、分岐構造の認識機構に関する多くの情報が得られた。図5は、活性中心のサブサイト構造を模式的に示したものである。まず G1 はサブサイト-2 に結合し、G2 複合体では2分子の G2 がサブサイト-2~-1 とサブサイト+1~-+2 に結合する。さらに G3 複合体では2分子の G3 がサブサイト-3~-1 とサブサイト 0'~-+2 に、G4 複合体では2分子の G4 がサブサイト-4~-1 とサブサイト-1'~-+2 に結合し、ちょうど分岐構造を模したパラレルな結合様式を示す。G4 複合体ではサブサイト-2 (枝) と 0' (幹)、およびサブサイト-3 (枝) と-1' (幹) に結合したグルコース残基間に水素結合がかかり、隣りあった Cys 残基が形成するジスルフィド結合 (Cys643 : Cys644) の壁が主鎖 (幹) と分岐鎖 (枝) を分離する。なお、温度因子 (B ファクター) から判断してサブサイト-2 の親和力が最も強いと推定され、このことがプルラーナーゼが短い枝を効率よく加水分解できる理由の1つだと考えられる。本酵素の触媒残基は Glu706 と Asp677 であり、反応機構は α -アミラ

ーゼと相同だと思われる。

本酵素で興味深いのは、保存領域Ⅲを含む 706-710 のループが、基質や基質アナログが結合することによってアポ型（オープン構造）から活性型（クローズド構造）へと主鎖のコンホメーションを変え、induced-fit motion を生じることである（図6）。この際 Gly707 と Trp708 の二面角が大きく変化し、Trp708 の側鎖が約 90°回転してサブサイト+2 に結合したグルコース残基とスタッキング相互作用する。同時に、酸塩基触媒残基である Glu706 が約 4.4Å 押し出され、触媒に適した位置へと移動する。このような induced-fit motion は *Pseudomonas* 由来イソアミラーゼでは見られない。なお、この仕組みが澱粉枝切り酵素の基質特異性と何らかの関わりがあるかどうかは不明である。

最後に、本酵素の基質結合部位の構造を膵臓 α -アミラーゼと比較すると、分岐鎖を認識するサブサイト-1、-2、-3 の構造はよく保存されているのに対して、主鎖を認識するサブサイトの構造は全く異なる。このことから、 α -1,6 結合を加水分解するという基質特異性は、主鎖側を認識する部位の構造が決めていると考えられる。一方プルラナーゼとイソアミラーゼの活性中心を比較すると、プルラナーゼの基質結合クレフトはイソアミラーゼより浅く、幅広い。また、プルラナーゼでは Phe746 の側鎖が基質結合クレフトに突き出しているなどの差異が見られるが、両酵素の基質特異性の違いを生み出す構造的背景についてはよくわかっていない。

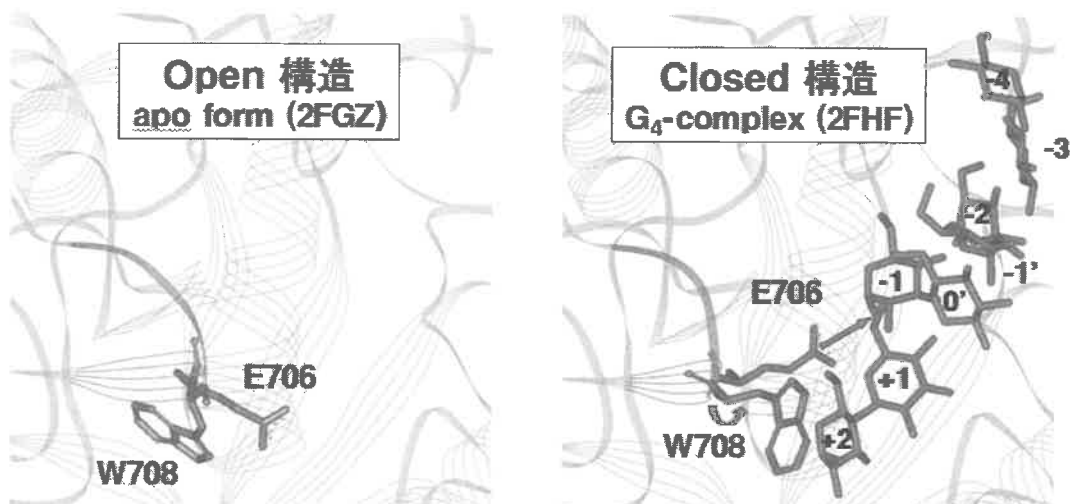


図6 *Klebsiella pneumoniae* 由来プルラナーゼの保存領域Ⅲを含むループ(706-710)のオープン構造(アポ型、2FGZ)からクローズド構造(G4複合体、2FHF)へのコンホメーション変化¹⁰⁾

植物における澱粉枝切り酵素の生理的役割

澱粉枝切り酵素を持つ微生物は、イソアミラーゼかプルラーゼのどちらか一方のみを発現するのに対して、光合成を行う植物では通常イソアミラーゼとプルラーゼの両方を持つことから、植物における両酵素の機能分担について興味を持たれてきた¹²⁾。

植物における澱粉枝切り酵素の主たる生理的役割は、発芽時における胚乳澱粉の分解である。澱粉枝切り酵素は登熟中期に生合成され²²⁾、乾燥種子中では酵素活性がほとんど消失するが、種子の発芽時に再び遺伝子発現が上昇する²³⁾。これにより、発芽時に α -アミラーゼによって可溶化された胚乳澱粉を、 β -アミラーゼとともに澱粉枝切り酵素が分解してマルトースを生成し、さらに α -グルコシダーゼの働きによりグルコースへと分解されて胚成長のエネルギー源として利用される。

高等植物のゲノム中にはプルラーゼ遺伝子が1つ存在するのに対して、イソアミラーゼには通常ISA1、ISA2、ISA3の3つのアイソザイムが存在する。酵素学的な性質としては、プルラーゼとISA3は水溶性で安定な単量体構造をとるのに対して、ISA1はホモ複合体を形成する。一方ISA2は、活性発現に関与する触媒アミノ酸残基が置換されているため活性を持たず、ISA1とヘテロ複合体を形成する^{24,25)}。また、ISA1は幅広い鎖長の分岐鎖を加水分解するのに対して、ISA3はアミロペクチンよりもグリコーゲンや β -リミットデキストリンのような短い分岐鎖を持つ基質をよく切断する²⁶⁾。

植物由来澱粉枝切り酵素のその他の生理的役割としては、トウモロコシやイネの*sugary*変異体 (ISA1変異体) の解析により、アミロペクチンの生合成にも重要な役割を持つ事が明らかになった。*sugary*変異体とは、アミロペクチンの一部またはすべてがグリコーゲンに類似したフィトグリコーゲン (植物グリコーゲン) に置きかわったものである。*sugary*変異体では、穀粒中のプルラーゼ活性が野生型に比べて顕著に低下することから、当初プルラーゼがアミロペクチンの生合成に深く関わっているのではないかと考えられたが、Jamesらの遺伝子解析により*sugary*変異体ではISA1が欠損していることが明らかになり²⁷⁾、イソアミラーゼがアミロペクチンの生合成に不可欠な酵素であることが証明された²⁸⁻³⁰⁾。アミロペクチンとグリコーゲンは、いずれも α -1,4結合で連結したポリグルカン鎖に α -1,6結合で分岐鎖が付加した構造を持つが、グリコーゲンでは短い枝がランダムかつ密に形成される。これに対してアミロペクチンでは、分岐が集中する非晶質の部分と、分岐がほとんどない結晶性部分に明確に分かれており、全体にクラスター (房) 状の構造をとる。つまりアミロペクチン分子には枝分かれに適切な部位と不適切な部位があり、イソアミラーゼは不適切な位置に付加された分岐鎖をトリミングすることにより、クラスター構造を整形する役割を持つと推定される^{31,32)}。

活性を持たないISA2については、双子葉植物 (ジャガイモ、シロイヌナズナ) がISA1/ISA2ヘテロ複合体のみを持つのに対して、単子葉植物 (トウモロコシ、イネ) ではISA1ホモ複合体とISA1/ISA2ヘテロ複体の両方を持ち、植物種間で複合体の構成が異なる^{24,25,33)}。内海らは、澱粉生合成における両複合体の役割についてISA2の遺伝子制御解析を行って調べた結果、イネアミロペクチンの生合成にはISA1ホモ複合体が重要であり、ISA1/ISA2ヘテロ複合体だけでは正常なアミロペクチン合成が行われないことを示した³⁴⁾。なお、ISA1、ISA2複合体がどのように不適切な枝分かれを認識し切断しているのか、そのメカニズムについてはまだ明らかにされていない。

アミロペクチン生合成におよぼすプルラナーゼの関与については、藤田らがイネの3種類のプルラナーゼ欠損変異体を用いた解析を行ったが、アミロペクチンの構造に顕著な差異は見られなかった³⁶⁾。一方 Wattebledらは、シロイヌナズナのISA2/プルラナーゼ二重変異系統で澱粉含量が92%減少する事を見だし、プルラナーゼがアミロペクチンの生合成においてISA1の機能を部分的に補うと報告した³⁸⁾。一方同化澱粉の分解に関してはISA3の機能を部分的に補うことから、プルラナーゼは澱粉合成と分解の双方に補助的に関与していると推察される³⁷⁾。

最後に

澱粉枝切り酵素は、産業的には主に澱粉糖化工業においてブドウ糖や麦芽糖の収率向上を目的に使用され、この用途には *Bacillus* 由来のプルラナーゼが多く用いられる。しかしながら本酵素は耐熱性などの点で十分な性能を持つとは言えず、さらに有用な酵素を開発する余地がある。一方日本では、*Pseudomonas* 由来イソアミラーゼや *Klebsiella* 由来プルラナーゼも食品加工用途に使用され、酵素の性質の違いを利用した使い分けが行われる。特に前者は澱粉などの構造解析に不可欠な研究用酵素でもある。このような状況を踏まえ、今後様々な特徴を持つ澱粉枝切り酵素の開発が期待される。

文 献

- 1) Manners, D. J. : Specificity of debranching enzymes. *Nat. New Biol.*, 234(48), 150-151(1971).
- 2) Bender, H., Lehmann, J., and Wallenfels, K. : Pullulan, an extracellular glucan from *Pullularia pullulans*. *Biochim. Biophys. Acta*, 36, 309-316(1959).
- 3) Bender, H., and Wallenfels, K. : Untersuchungen an Pullulan. II. Spezifischer Abbau durch ein bakterielles Enzym. *Biochem. Z.*, 334, 79-95(1961).
- 4) Domań-Pytka, M., and Bardowski, J. : Pullulan degrading enzymes of bacterial origin. *Crit. Rev. Microbiol.*, 30(2), 107-121(2004).
- 5) Lee, E. Y., and Whelan, W. J. : Glycogen and starch debranching enzymes. *The Enzymes* 5 (3rd ed.) New York, Academic Press, 191-234(1972).
- 6) Bertoldo, C., and Antranikian, G. : Starch-hydrolyzing enzymes from thermophilic archaea and bacteria. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 6(2), 151-160(2002).
- 7) Mathupala, S. P., Lowe, S. E., Podkovyrov, S. M., and Zeikus, J. G. : Sequencing of the amylopullulanase (apu) gene of *Thermoanaerobacter ethanolicus* 39E, and identification of the active site by site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.*, 268(22), 16332-16344(1993).
- 8) Hatada, Y., Igarashi, K., Ozaki, K., Ara, K., Hitomi, J., Kobayashi, T., Kawai, S., Watabe, T., and Ito, S. : Amino acid sequence and molecular structure of an alkaline amylopullulanase from *Bacillus* that hydrolyzes alpha-1,4 and alpha-1,6 linkages in polysaccharides at different active sites. *J. Biol. Chem.*, 271(39), 24075-24083(1996).

- 9) Iwamoto, H., Ohmori, M., Ohno, M., Hirose, J., Hiromi, K., Fukada, H., Takahashi, K., Hashimoto, H., and Sakai, S. : Interaction between pullulanase from *Klebsiella pneumoniae* and cyclodextrins. *J. Biochem.*, 113(1), 93-96(1993).
- 10) Mikami, B., Iwamoto, H., Malle, D., Yoon, H. J., Demirkan-Sarikaya, E., Mezaki, Y., and Katsuya, Y. : Crystal structure of pullulanase: evidence for parallel binding of oligosaccharides in the active site. *J. Mol. Biol.*, 359(3), 690-707(2006).
- 11) Mikami, B., Malle, D., Yoon, H. J., Demirkan-Sarikaya, E., Iwamoto, H., Katsuya, Y., Murata, K., and Utsumi, S. : X-ray crystallographic analysis of type I pullulanase from *Klebsiella pneumoniae* and *Bacillus subtilis*. *Acta Crystallographica*, A62, s153(2006).
- 12) Lee, E. Y., and Whelan, W. J. : Glycogen and starch debranching enzymes. *The Enzymes* 5 (3rd izd.) New York, Academic Press, 191-234(1972).
- 13) Harada, T., Yokobayashi, K., and Misaki, A. : Formation of isoamylase by *Pseudomonas*. *Appl. Microbiol.*, 16(10), 1439-1444(1968).
- 14) Katsuya, Y., Mezaki, Y., Kubota, M., and Matsuura, Y. : Three-dimensional structure of *Pseudomonas* isoamylase at 2.2 Å resolution. *J. Mol. Biol.*, 281(5), 885-897(1998).
- 15) Harada, T., Misaki, A., Akai, H., Yokobayashi, K., and Sugimoto, K. : Characterization of *Pseudomonas* isoamylase by its actions on amylopectin and glycogen: comparison with *Aerobacter pullulanase*. *Biochim. Biophys. Acta.*, 268(2), 497-505(1972).
- 16) Taji, N. : Industrial utilization of alpha-amylases. in "Handbook of Amylase and Related Enzymes (The Amylase Research Society of Japan ed., Pergamon Press)", 196-198(1988).
- 17) Henrissat, B., and Davies, G. : Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 7(5), 637-644(1997).
- 18) Jespersen, H. M., MacGregor, E. A., Sierks, M. R., and Svensson, B. : Comparison of the domain-level organization of starch hydrolases and related enzymes. *Biochem. J.*, 280 (Pt 1), 51-55(1991).
- 19) Jespersen, H. M., MacGregor, E. A., Henrissat, B., Sierks, M. R., and Svensson, B. : Starch- and glycogen-debranching and branching enzymes: prediction of structural features of the catalytic (beta/alpha)8-barrel domain and evolutionary relationship to other amylolytic enzymes. *J. Protein Chem.*, 12(6), 791-805(1993).
- 20) Song, H. N., Jung, T. Y., Park, J. T., Park, B. C., Myung, P. K., Boos, W., Woo, E. J., and Park, K. H. : Structural rationale for the short branched substrate specificity of the glycogen debranching enzyme GlgX. *Proteins*, 78(8), 1847-1855(2010).
- 21) Vester-Christensen, M. B., Abou Hachem, M., Svensson, B., and Henriksen, A. : Crystal structure of an essential enzyme in seed starch degradation: barley limit dextrinase in complex with cyclodextrins. *J. Mol. Biol.*, 403(5), 739-750(2010).
- 22) Guglielminetti, L., Yamaguchi, J., Perata, P., and Alpi, A. : Amylolytic Activities in Cereal Seeds under Aerobic and Anaerobic Conditions. *Plant Physiol.*, 109(3), 1069-1076(1995).

- 23) Burton, R. A., Zhang, X. Q., Hrmova, M., and Fincher, G.B. : A single limit dextrinase gene is expressed both in the developing endosperm and in germinated grains of barley. *Plant Physiol.*, 119(3), 859-871(1999).
- 24) Hussain, H., Mant, A., Seale, R., Zeeman, S., Hinchliffe, E., Edwards, A., Hylton, C., Bornemann, S., Smith, A. M., Martin, C., and Bustos, R. : Three isoforms of isoamylase contribute different catalytic properties for the debranching of potato glucans. *Plant Cell.*, 15(1), 133-149(2003).
- 25) Utsumi, Y., and Nakamura, Y. : Structural and enzymatic characterization of the isoamylase1 homo-oligomer and the isoamylase1-isoamylase2 hetero-oligomer from rice endosperm. *Planta.*, 225(1), 75-87(2006).
- 26) Takashima, Y., Senoura, T., Yoshizaki, T., Hamada, S., Ito, H., and Matsui, H. : Differential chain-length specificities of two isoamylase-type starch-debranching enzymes from developing seeds of kidney bean. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 71(9), 2308-2312(2007).
- 27) James, M. G., Robertson, D. S., and Myers, A. M. : Characterization of the maize gene sugary1, a determinant of starch composition in kernels. *Plant Cell.*, 7(4), 417-429(1995).
- 28) Nakamura, Y., Umemoto, T., Takahata, Y., Komae, K., Amano, E., and Satoh, H. : Changes in structure of starch and enzyme activities affected by sugary mutations in developing rice endosperm: possible role of starch debranching enzyme (R-enzyme) in amylopectin biosynthesis. *Physiol. Plant.*, 97, 491-498(1996).
- 29) Kubo, A., Fujita, N., Harada, K., Matsuda, T., Satoh, H., and Nakamura, Y. : The starch-debranching enzymes isoamylase and pullulanase are both involved in amylopectin biosynthesis in rice endosperm. *Plant Physiol.*, 121(2), 399-410(1999).
- 30) Burton, R. A., Jenner, H., Carrangis, L., Fahy, B., Fincher, G. B., Hylton, C., Laurie, D. A., Parker, M., Waite, D., van Wegen, S., Verhoeven, T., and Denyer, K. : Starch granule initiation and growth are altered in barley mutants that lack isoamylase activity. *Plant J.*, 31(1), 97-112(2002).
- 31) Nakamura, Y. : Towards a better understanding of the metabolic system for amylopectin biosynthesis in plants: rice endosperm as a model tissue. *Plant Cell Physiol.*, 43(7), 718-725(2002).
- 32) James, M. G., Denyer, K., and Myers, A. M. : Starch synthesis in the cereal endosperm. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 6(3), 215-222(2003).
- 33) Kubo, A., Colleoni, C., Dinges, J. R., Lin, Q., Lappe, R. R., Rivenbark, J. G., Meyer, A. J., Ball, S. G., James, M. G., Hennen-Bierwagen, T. A., and Myers, A. M. : Functions of heteromeric and homomeric isoamylase-type starch-debranching enzymes in developing maize endosperm. *Plant Physiol.*, 153(3), 956-969(2010).
- 34) Utsumi, Y., Utsumi, C., Sawada, T., Fujita, N., and Nakamura, Y. : Functional diversity of isoamylase oligomers: the ISA1 homo-oligomer is essential for amylopectin biosynthesis in rice endosperm. *Plant Physiol.*, 156(1), 61-77(2011).
- 35) Fujita, N., Toyosawa, Y., Utsumi, Y., Higuchi, T., Hanashiro, I., Ikegami, A., Akuzawa, S., Yoshida,

- M., Mori, A., Inomata, K., Itoh, R., Miyao, A., Hirochika, H., Satoh, H., and Nakamura, Y. : Characterization of pullulanase (PUL)-deficient mutants of rice (*Oryza sativa* L.) and the function of PUL on starch biosynthesis in the developing rice endosperm. *J. Exp. Bot.*, **60**(3), 1009-1023(2009).
- 36) Wattebled, F., Dong, Y., Dumez, S., Delvallé, D., Planchot, V., Berbezy, P., Vyas, D., Colonna, P., Chatterjee, M., Ball, S., and D'Hulst, C. : Mutants of Arabidopsis lacking a chloroplastic isoamylase accumulate phytoglycogen and an abnormal form of amylopectin. *Plant Physiol.*, **138**(1), 184-195(2005).
- 37) Wattebled, F., Planchot, V., Dong, Y., Szydlowski, N., Pontoire, B., Devin, A., Ball, S., and D'Hulst, C. : Further evidence for the mandatory nature of polysaccharide debranching for the aggregation of semicrystalline starch and for overlapping functions of debranching enzymes in Arabidopsis leaves. *Plant Physiol.*, **148**(3), 1309-1323(2008).

Annu. Rep. Fac. Life Sci. Biotechnol., Fukuyama Univ. (16), 1-15 (2018)

Mini review

Starch debranching enzyme –Structure, function, industrial use, and physiological role–

Hiroyuki Iwamoto

Department of Biotechnology, Faculty of Life Science and Biotechnology,
Fukuyama University, Fukuyama, Hiroshima 729-0292, Japan

Starch debranching enzymes are industrially important enzymes which hydrolyze α -1,6-glucosidic linkages of branched α -glucans such as amylopectin, glycogen, and pullulan. The use of starch debranching enzymes has recently been the subject of increased applications in starch-based industries especially those aimed for glucose production. Starch debranching enzymes derived from plants and bacteria are classified into two types of enzymes, pullulanase and isoamylase, based on their substrate specificities; the former preferentially cleaves pullulan and β -limit dextrin but hardly digest glycogen and the latter is characterized by opposite substrate specificity. Among starch debranching enzymes, pullulanase has been widely utilized for industrial saccharification process of starch, which enables a complete and efficient conversion of the branched polysaccharides into small fermentable sugars. In regards to the biological roles of starch debranching enzyme in plant, recent studies report that starch debranching enzyme is involved in amylopectin biosynthesis and a new model referred to as the "two-step branching and improper branch clearing model" is proposed to explain how cluster structure of amylopectin is produced. This model supposes that mainly isoamylase or in addition pullulanase remove unnecessary α -1,6-glucosidic linkages that are occasionally formed at improper positions apart from two densely branched regions of the cluster. This minireview focuses on the structure, function, industrial use and physiological roles of microbial and plant starch debranching enzymes.

Keywords: starch debranching enzyme, pullulanase, isoamylase, amylopectin biosynthesis