

## 澱粉枝切り酵素プルラナーゼとシクロデキストリンとの相互作用

岩本博行\*, 廣瀬順造\*, 廣海啓太郎\*

### Interaction of Starch-debranching-enzyme Pullulanase with Cyclodextrins

Hiroyuki IWAMOTO, Junzo HIROSE, and Keitaro HIROMI

#### ABSTRACT

Starch-debranching-enzyme hydrolyzes the  $\alpha$ -1,6-glucosidic linkages of starch and other  $\alpha$ -glucans. Isoamylase and pullulanase belong to this enzyme group, and are key enzymes for the industrial production of glucose, maltose and other oligosaccharides from starch. In this paper, we examined the interaction between pullulanase from *Klebsiella pneumoniae* and  $\alpha$ -,  $\beta$ -, and  $\gamma$ -cyclodextrins by means of inhibition studies of the enzyme activity, UV and fluorescence difference spectroscopy, and flow calorimetry. All the above cyclodextrins were found to be competitive inhibitors, but the inhibition and dissociation constants of  $\beta$ -cyclodextrin were two orders of magnitude less than those of  $\alpha$ - and  $\gamma$ -cyclodextrins. The UV and fluorescence spectral change (excitation at 295 nm) induced by the addition of  $\beta$ -cyclodextrin were significantly different from those of other cyclodextrins. In the calorimetric analysis, only  $\beta$ -cyclodextrin showed a positive entropy change upon binding with the enzyme. Moreover, preliminary kinetic studies were done on the binding of the enzyme with cyclodextrins by following the increase of the fluorescence intensity with a micro-stopped-flow apparatus. The apparent first-order rate constants,  $k_{app}$ , for  $\alpha$ - and  $\gamma$ -cyclodextrins were independent of the concentration of cyclodextrins. In contrast,  $\beta$ -cyclodextrin showed a hyperbolic cyclodextrin concentration dependence of  $k_{app}$ . Judged from these results, the binding mode of  $\beta$ -cyclodextrin is subtly different from those of  $\alpha$ - and  $\gamma$ -cyclodextrins.

Key Words : Starch-debranching-enzyme, Pullulanase, Cyclodextrin, Enzyme Kinetics, Fluorometric Analysis

#### 1. 緒 言

澱粉枝切り酵素は、澱粉やアミロペクチンなどの $\alpha$ -1,6-グルコシド結合を特異的に加水分解する酵素で、澱粉からブドウ糖 (Glucose) や麦芽糖 (Maltose), その他のオリゴ糖類を工業的に生産する際になくてはならない重要な酵素である。澱粉枝切り酵素はイソアミラーゼとプルラナーゼに大別され、この両酵素は分

---

\* 食品工学科

子的な性状や基質特異性がかなり異なる<sup>1,2)</sup>。これまでいくつかの酵素についてその遺伝子がクローニングされているが<sup>3-5)</sup>、イソアミラーゼやプルラーゼのアミノ酸配列は、活性発現に関与する一部領域を除いて他のアミラーゼ ( $\alpha$ -,  $\beta$ -アミラーゼやグルコアミラーゼなど) と相同性が低い。特に細菌 *Klebsiella aerogenes* 由来のプルラーゼは単量体で分子量が約12万と大きく、N末端アミノ酸であるシステイン残基にパルミチン酸が共有結合しているなど他の澱粉分解酵素には見られない特徴を持っている<sup>5)</sup>。さらにこの酵素は、N末端アミノ酸から10残基ほどセリン (およびスレオニン) リッチな配列が続いたあと、Gly-X-X-という繰り返しからなるコラーゲンヘリックス様配列が約20残基続く。酵素をコラゲナーゼで処理すると、N末端付近で切断され見かけ上分子量が小さくなるため、本来プルラーゼはN末端付近で3重らせん構造を取る3量体ではないかと考えられている<sup>6)</sup>。この様に、プルラーゼは産業的に重要な酵素であるばかりでなく、アミラーゼの中で極めて特異な性質を持つ酵素であり、その意味でも興味深い研究対象である。

以上の理由から、われわれは細菌 *Klebsiella pneumoniae* 由来のプルラーゼをとりあげ、酵素と基質アナログである環状デキストリン (シクロデキストリン) との相互作用を、阻害実験、吸収および蛍光差スペクトル、結合反応の速度論など種々の角度から研究した。その結果、7つのグルコース残基からなる  $\beta$ -シクロデキストリンは、6つおよび8つのグルコース残基からなる  $\alpha$ -,  $\gamma$ -シクロデキストリンとはかなり異なる挙動を示すことを見いだした。本論文は特にこの点に注目して、既報の欧文誌2報 (Ref., 7 & 8) の内容をとりまとめたものである。

## 2. 材料および方法

### 1) 酵素および試薬

細菌 *Klebsiella pneumoniae* 由来のプルラーゼは、(株)林原生物化学研究所より恵与された結晶標品を、さらに精製することなく用いた。この標品の純度は、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で95%以上であった。なお本標品には微量の  $\alpha$ -アミラーゼが含まれているが、本実験で用いた実験条件下ではその活性が無視できるほど小さいことを確認した。酵素濃度は280 nmでの紫外吸収をもとに、分子量117,000、 $E_{280\text{nm}}^{1\%}$ が13.3として計算した<sup>7)</sup>。基質として用いたプルランや  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -シクロデキストリンも(株)林原生化研から恵与されたものをそのまま用いた。

### 2) 定常状態での反応速度論の実験

酵素活性はプルランを基質とし、酵素反応による還元力の増加を測定することにより求めた。なお本酵素は基質に対する  $K_m$  値が極めて小さいので、還元力の定量は鉄イオンの還元を利用した高感度な Park-Johnson法<sup>9)</sup>をさらに高感度に改良して測定した。酵素反応の条件は、緩衝液として0.05 M 酢酸緩衝液、pH 5.6, を用い、測定温度は25℃、酵素濃度は  $6 \times 10^{-10}$  Mで行った。シクロデキストリンによる阻害実験では、プルラン濃度を0~0.016% (プルラン1%は、 $\alpha$ -1,6-グルコシド結合濃度に換算して20.6 mMに相当)、 $\alpha$ -,  $\gamma$ -シクロデキストリン濃度を0~160  $\mu$ M、 $\beta$ -シクロデキストリン濃度を0~2.4  $\mu$ Mとして実験を行った。阻害物質定数 ( $K_i$ ) の決定は、フローカロリメトリーの実験条件とそろえるため、0.02 M グリセロール-2-リン酸緩衝液、pH 5.8, イオン強度0.1 (食塩で調整) 中でも行った。

### 3) 吸収差スペクトルの測定

シクロデキストリン添加により生じる吸収差スペクトルは、0.05 M 酢酸緩衝液、pH 5.6, 中で、島津 UV-3100型分光光度計を用いて25℃で測定した。測定は対照セルと試料セルに同濃度の酵素溶液を入れ、サンプルセル側に高濃度のシクロデキストリン溶液を加えて攪拌し、差スペクトルを測定した。また迷光による影響を防ぐため、背景の酵素の吸収が1.5を越えない条件で測定を行った。

### 4) 蛍光差スペクトルの測定と蛍光滴定

蛍光差スペクトル測定および蛍光滴定は、日立850型蛍光光度計を用い、3)と同じ測定条件で酵素濃度0.3  $\mu$ Mで実験を行った。蛍光差スペクトル測定では、励起波長にトリプトファンとチロシンの両方が励起される280 nmとトリプトファンだけが励起される295 nmの2波長を用いた。一方蛍光滴定実験は、励起波

長 280 nm で、シクロデキストリン添加による 325 nm の蛍光強度の増加を指標として実験を行った。また蛍光強度は、滴定時の希釈による影響を補正した。シクロデキストリンの解離定数 ( $K_d$ ) は、自作の非線形最小二乗法プログラムにより求めた。

### 5) 蛍光ストップフロー測定

大塚電子 RA-401 型マイクロストップフロー装置と浜松ホトニクス の重水素ランプ (235 W) を用いて、酵素にシクロデキストリンが結合する際の蛍光強度変化を、測定時の酵素濃度  $10 \mu\text{M}$  で追跡した<sup>10)</sup>。実験は、酵素とシクロデキストリンの 2 液を、窒素ガスドライブのストップフロー装置内で混合させ、296nm のカットフィルターを透過してくる蛍光強度を、浜松ホトニクス のエンドオンタイプのホトマルで検出した。印加電圧は 550 V、窒素ガス圧は  $3 \text{ kg/cm}^2$  で行った。緩衝液等は、3) と同様である。

### 6) 熱測定実験

酵素とシクロデキストリンの結合にともなう標準エンタルピー変化の測定は、大阪府立大学農学部の高橋克忠氏が自作したフローカロリメトリー (配管は金製) を用いて、同大学生物物理化学研究室において深田はるみ氏により行われた。実験は、緩衝液として 0.02 M グリセロール-2-リン酸緩衝液, pH 5.8, イオン強度を食塩で 0.1 に調整したものをを用い、25℃で行われた。測定に使われた装置は、5 ml のハミルトンシリンジに入れた酵素およびシクロデキストリン溶液を、120 秒間にわたり流速  $2.290 \times 10^{-3} \text{ ml/s}$  で押し出し、カロリメトリー内のミキサーで 2 液を混合した際に生じる熱を測定するものである<sup>11)</sup>。なお、反応熱は希釈および粘質液の混合熱を補正している。測定時の酵素濃度は、24~34  $\mu\text{M}$ ,  $\alpha$ -および  $\gamma$ -シクロデキストリン濃度は 7 mM,  $\beta$ -シクロデキストリン濃度は 0.5 mM であった。

## 3. 結 果

### 1) 基質プルランに対する反応速度パラメータ

阻害実験を行う前に、0.05 M 酢酸緩衝液, pH 5.6, 25℃での基質プルランに対するミカエリス定数 ( $K_m$ ) および分子活性 ( $k_{cat}$ ) を求めた。速度パラメーターは、10 種類の異なる基質濃度における反応初速度を測定し、非線形最小二乗法プログラムにより求めた。

その結果、基質プルランに対する  $K_m$  値は  $0.0034 \pm 0.0004\%$  ( $\alpha$ -1,6-グルコシド結合の濃度に換算して  $70 \pm 8 \mu\text{M}$ ),  $k_{cat}$  は  $53.2 \pm 0.2 \text{ s}^{-1}$  と求められた。一方、40℃で同様の実験を行ったところ、 $K_m$  は  $0.0056 \pm 0.0004\%$ ,  $k_{cat}$  は  $132 \pm 3.5 \text{ s}^{-1}$  という値が得られた。この値は、以前横林らにより報告された  $K_m = 0.0017\%$ ,  $k_{cat} = 129 \text{ s}^{-1}$  という値に近い<sup>12)</sup>。

### 2) シクロデキストリンの阻害形式と阻害物質定数

$\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -シクロデキストリンの阻害形式は、Cornish-Bowden プロットにより求めた<sup>13)</sup>。図 1

はその一例として、 $\beta$ -シクロデキストリンの場合を示している。Cornish-Bowden プロットは、基質濃度 ( $s$ ) を何点かかえて、 $s$  を反応初速度 ( $v$ ) で割った値 ( $s/v$ ) を、阻害剤濃度 ( $i$ , この場合シクロデキストリン濃度) に対してプロットするもので、次の (1) 式からわかるように、拮抗阻害の場合は各直線が平行になる。

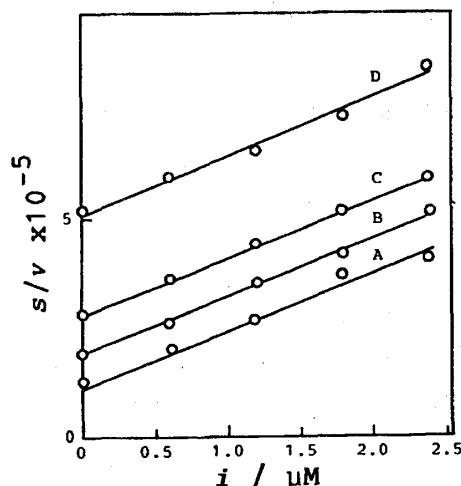


図1  $\beta$ -シクロデキストリンでの  $s/v \sim i$  プロット。基質プルラン濃度は、A: 0.002%, B: 0.004%, C: 0.008%, D: 0.016%, 反応条件は、0.05 M 酢酸緩衝液, pH 5.6, 25℃。

$$s/v = (K_m/K_i \cdot V_{\max}) \cdot i + (s + K_m)/V_{\max} \quad (1)$$

図1からわかるように、 $\beta$ -シクロデキストリンでは各直線が平行になっているので、その阻害形式は拮抗型であることがわかる。図には示さないが、 $\alpha$ -、および $\gamma$ -シクロデキストリンも同様に拮抗型の阻害を示す。

次に各シクロデキストリンの阻害物質定数( $K_i$ )を、Dixonプロットにより求めた<sup>14)</sup>。Dixonプロットは、 $s$ を何点かかえて、 $i$ に対して $1/v$ をプロットするもので、 $K_i$ を計算する際に $K_m$ や $V_{max}$ の値を必要としないので、これらの値に含まれる誤差の影響を受けることなく正確な $K_i$ 値を求めることができる。拮抗阻害でのDixonプロットの式を次に示す。

$$1/v = (K_m/V_{max} \cdot s) + (1/V_{max}) + (K_m/V_{max} \cdot s)(i/K_i) \quad (2)$$

式(2)からわかるように、各直線は第2象限で交差し、その交点の横軸座標の値が $-K_i$ となる。図2に $\beta$ -シクロデキストリンの例を示す。0.05 Mの酢酸緩衝液、および0.02 Mのグリセロール-2-リン酸緩衝液中での $K_i$ 値をまとめたのが表1である。この表からわかるように、2つの緩衝液系ではpHがわずかに異なるが、得られた $K_i$ 値は極めて近いことがわかる。また、 $\beta$ -シクロデキストリンの値を他の $\alpha$ -、 $\gamma$ -シクロデキストリンの値と比較すると、 $\beta$ -シクロデキストリンの値が他の約100分の1であることがわかる。これは標準Gibbsエネルギー変化で約10kJ/molの差に相当する。このことは、 $\beta$ -シクロデキストリンが $\alpha$ -や $\gamma$ -シクロデキストリンと比べて約100倍酵素との結合が強いことを示している。

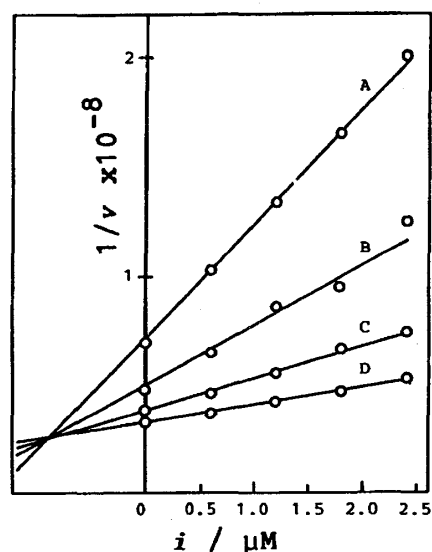


図2  $\beta$ -シクロデキストリンでの $1/v \sim i$ プロット。基質濃度および反応条件は図1と同じ。

### 3) 紫外吸収差スペクトル

図3に、 $25 \pm 0.1^\circ\text{C}$ で測定した、 $\alpha$ -、 $\beta$ -、 $\gamma$ -シクロデキストリン添加による紫外吸収差スペクトルを示す。いずれも最終濃度が $K_i$ 値の10倍以上になるようにシクロデキストリンを加えており、この条件下では酵素分子のほとんどにシクロデキストリンが結合していると考えられる。図からわかるように、 $\alpha$ -および $\gamma$ -シクロデキストリンによる吸収差スペクトルはよく似ており、285 nmと293 nmに山が、290 nmに谷が見られる。これに対して $\beta$ -シクロデキストリンでは、山、谷ともに短波長側に3~4 nmシフトしていることがわかる。さらに $\beta$ -シクロデキストリンでは301 nm付近に大きな谷が観察されるが、これは $\alpha$ -、 $\gamma$ -シクロデキストリンでは見られない。

表1  $\alpha$ -、 $\beta$ -、 $\gamma$ -シクロデキストリンの阻害物質定数( $K_i$ )。

表には、グルコシル- $\alpha$ -、およびグルコシル- $\beta$ -シクロデキストリンの値も併記した。

	$K_i/\mu\text{M}$	
	0.05 M acetate buffer, pH 5.6	0.02 M glycerol 2-phosphate buffer, pH 5.8
$\alpha$ -Cyclodextrin	85 $\pm$ 23	79 $\pm$ 14
6-O- $\alpha$ -Glucosyl- $\alpha$ -cyclodextrin	82 $\pm$ 21	—
$\beta$ -Cyclodextrin	0.92 $\pm$ 0.21	1.4 $\pm$ 0.2
6-O- $\alpha$ -Glucosyl- $\beta$ -cyclodextrin	0.97 $\pm$ 0.23	—
$\gamma$ -Cyclodextrin	100 $\pm$ 12	76 $\pm$ 15

### 4) 蛍光差スペクトルおよび解離定数( $K_d$ )の測定

シクロデキストリン添加による蛍光差スペクトルの測定は、2つの励起波長について行った。1つはトリプトファンとチロシンの両方が励起される280 nm、もう1つはチロシンが励起されない295 nmである。図4、5にそれぞれの励起波長での蛍光差スペクトルを示した。図4からわかるように、280 nmで励起した

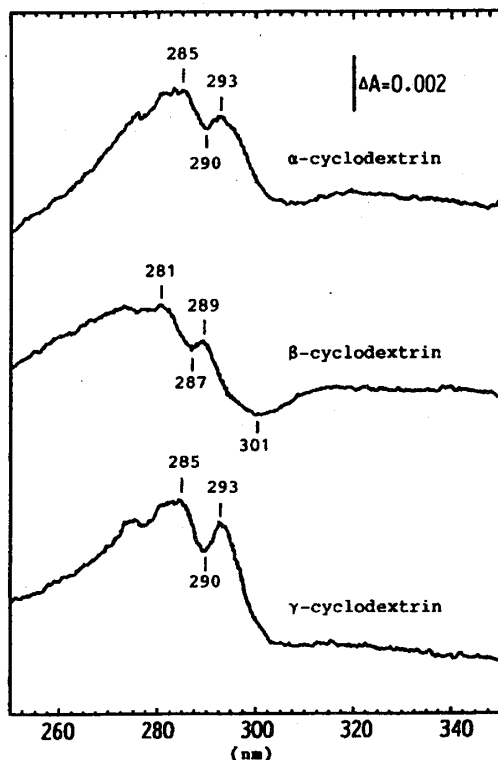


図3 プルナーゼに $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -シクロデキストリンが結合したときの紫外吸収差スペクトル。測定時の酵素濃度は $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -シクロデキストリンについて、それぞれ $5.09 \mu\text{M}$ ,  $4.0 \mu\text{M}$ ,  $5.12 \mu\text{M}$ , シクロデキストリン濃度は,  $\alpha$ -,  $\gamma$ -シクロデキストリンが $990 \mu\text{M}$ ,  $\beta$ -シクロデキストリンは $11.76 \mu\text{M}$ 。

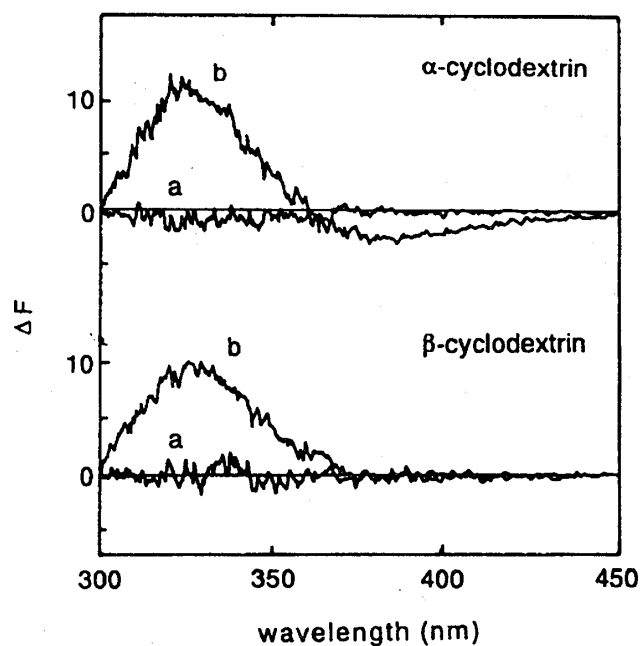


図4 プルナーゼに $\alpha$ -,  $\beta$ -シクロデキストリンが結合した時の蛍光差スペクトル。励起波長は $280 \text{ nm}$ , 酵素濃度は $0.3 \mu\text{M}$ , シクロデキストリン濃度は,  $\alpha$ -シクロデキストリンが $400 \mu\text{M}$ ,  $\beta$ -シクロデキストリンが $10 \mu\text{M}$ 。a はシクロデキストリン添加前, b は添加後。

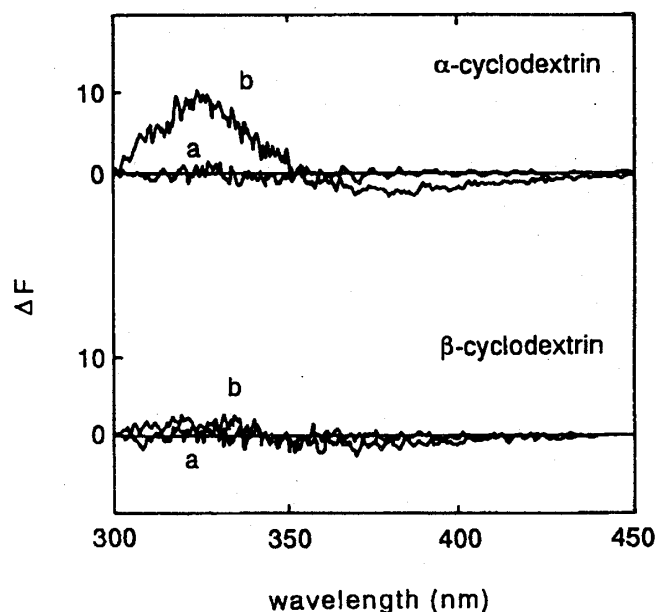


図5 励起波長 $295 \text{ nm}$ における $\alpha$ -,  $\beta$ -シクロデキストリン結合によるプルナーゼの蛍光差スペクトル。測定条件は図4と同じ。

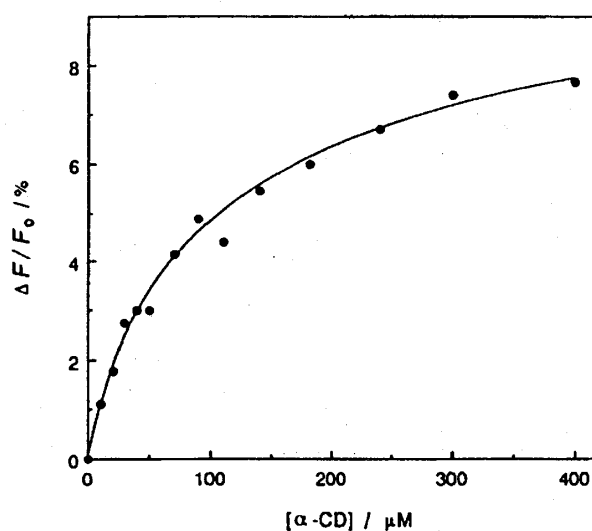
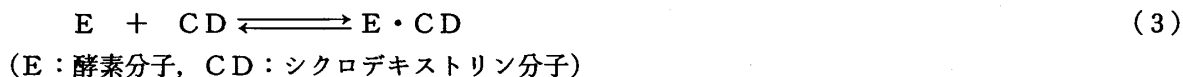


図6  $\alpha$ -シクロデキストリンによるプルナーゼの蛍光滴定曲線。酵素濃度は $0.36 \mu\text{M}$ , 励起波長は $280 \text{ nm}$ , 測定した蛍光波長は $325 \text{ nm}$ 。グラフの縦軸は, シクロデキストリン添加前の $325 \text{ nm}$ での蛍光強度( $F_0$ )に対する蛍光強度変化のパーセント。

場合,  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -のいずれについても, シクロデキストリン添加により  $325 \text{ nm}$ 付近の蛍光強度が増加する。一方  $295 \text{ nm}$ 励起の場合には,  $\alpha$ -,  $\gamma$ -シクロデキストリン添加により生じる蛍光差スペクトルが  $280$

nm励起時と似ているのに対して、 $\beta$ -シクロデキストリンでは蛍光スペクトル変化がほとんど見られなかった(図5)。

次に、酵素がシクロデキストリンと結合することによって325 nm付近の蛍光強度が増大する事を利用して、325 nmでの蛍光強度を指標として、酵素とシクロデキストリンとの結合の強さを蛍光滴定により観察した。図6は、 $\alpha$ -シクロデキストリンによる酵素の蛍光滴定曲線の例である。この図から、蛍光滴定曲線が単純な飽和曲線を描く事がわかる。式(3)のように、1分子の酵素と1分子のシクロデキストリン



が結合すると仮定すると、酵素とシクロデキストリンとの解離定数( $K_d$ )は次式(4)で表すことができる。

$$K_d = [E][CD] / [E \cdot CD] \\ = ([E]_0 - [E \cdot CD])([CD]_0 - [E \cdot CD]) / [E \cdot CD] \quad (4)$$

( $[E]_0, [CD]_0$ は酵素とシクロデキストリンの総濃度,  $[E], [CD], [E \cdot CD]$ は酵素, シクロデキストリン, 酵素とシクロデキストリンの複合体の平衡時の濃度)

(4)式から、実際に観測される蛍光強度( $F_{obs}$ )は次の(5)式で表すことができる。

$$F_{obs} = F_0 + \Delta F_{E \cdot CD}([E]_0 + [CD]_0 + K_d - (([E]_0 + [CD]_0 + K_d)^2 - 4[E]_0[CD]_0)^{1/2}) / 2[E]_0 \quad (5)$$

( $F_0$ はシクロデキストリンが結合する前の初期蛍光強度,

$\Delta F_{E \cdot CD}$ は全ての酵素にシクロデキストリンが結合した時の蛍光強度の変化量)

解離定数( $K_d$ )は、得られた蛍光強度を式(5)に最小二乗法でフィッティングする事によって計算することができる。この様にして求めた各シクロデキストリンの $K_d$ 値をまとめたものが表2である。

表2 プルラナーゼ-シクロデキストリン複合体の解離定数( $K_d$ )と阻害物質定数( $K_i$ )。表にはグルコシル- $\alpha$ -, およびグルコシル- $\beta$ -シクロデキストリンの値も併記した。

	$K_d$ ( $\mu$ M)		$K_i$ ( $\mu$ M)	
$\alpha$ -Cyclodextrin	100	$\pm 5$	85	$\pm 23$
6-O- $\alpha$ -Glucosyl- $\alpha$ -cyclodextrin	48	$\pm 2$	82	$\pm 21$
$\beta$ -Cyclodextrin	$0.61 \pm 0.09$		$0.92 \pm 0.21$	
6-O- $\alpha$ -Glucosyl $\beta$ -cyclodextrin	$0.52 \pm 0.11$		$0.97 \pm 0.23$	
$\gamma$ -Cyclodextrin	102	$\pm 4$	100	$\pm 12$

##### 5) 蛍光ストップフロー法による酵素・シクロデキストリン複合体生成過程の観測

300 nm以上の蛍光強度の増加を指標に、酵素・シクロデキストリン複合体の生成過程を、蛍光ミクロストップフロー法で直接観察した。図7は、酵素に $\alpha$ -および $\beta$ -シクロデキストリンを加えたときの蛍光強度変化のタイムコースである。これらの曲線から、複合体の生成は見かけ上一次反応に従うと考えられる。次に、見かけの1次反応速度定数( $k_{app}$ )を種々のシクロデキストリン濃度で測定したものが図8である。この図から、 $\alpha$ -,  $\gamma$ -シクロデキストリンの場合には、 $k_{app}$ がリガンド濃度によらず一定( $0.5 \sim 0.6 \text{ s}^{-1}$ )であるのに対して、 $\beta$ -シクロデキストリンでは双曲線形のリガンド濃度依存性(最大で $2.9 \text{ s}^{-1}$ )を示すことがわかる。

##### 6) 酵素・シクロデキストリン複合体生成時の熱測定

まず酵素とシクロデキストリンが結合する際のエンタルピー変化( $\Delta H$ )を測定した。またこの際の標準Gibbs エネルギー変化( $\Delta G^\circ$ )は、先に求めた $K_i$ 値から式(6)により求めた。

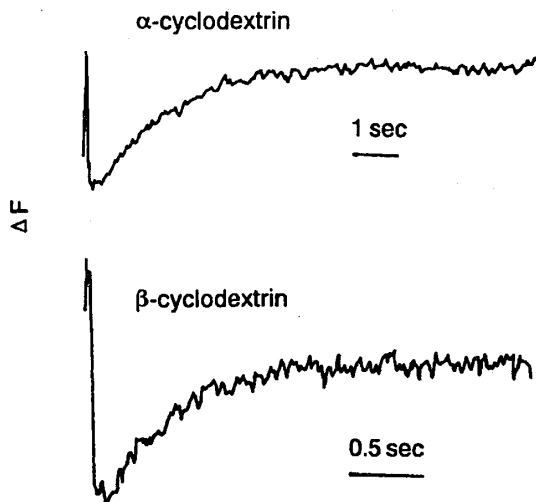


図7 プルラナーゼに $\alpha$ -、 $\beta$ -シクロデキストリンが結合する際の蛍光強度の経時変化。測定時の酵素濃度は $10\mu\text{M}$ 、シクロデキストリン濃度は、 $\alpha$ -シクロデキストリンで $0.1\text{mM}$ 、 $\beta$ -シクロデキストリンで $0.5\text{mM}$ 。測定は蛍光マイクロストップフロー装置を用いて行い、 $296\text{nm}$ のカットフィルターを透過した蛍光強度（励起波長は $280\text{nm}$ ）をモニターした。

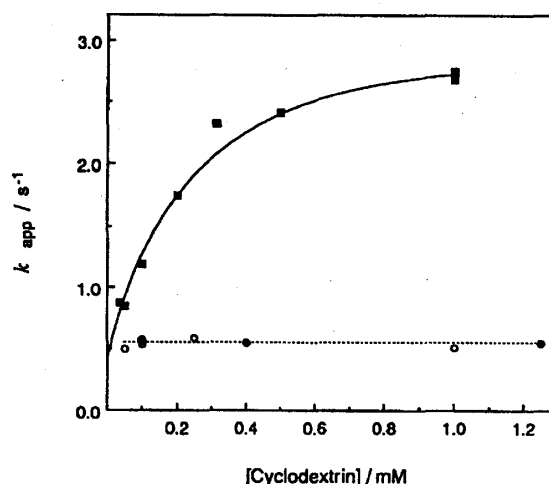


図8 みかけの1次反応速度定数 ( $k_{app}$ ) のシクロデキストリン濃度依存性。○： $\alpha$ -シクロデキストリン，■： $\beta$ -シクロデキストリン，●： $\gamma$ -シクロデキストリン

$$\Delta G^\circ = RT \ln K_i$$

( $R$ は気体定数， $T$ は絶対温度)

(6)

以上の値と、 $\Delta H$ 、 $\Delta G^\circ$ から求められる標準エントロピー変化 ( $\Delta S^\circ$ )をまとめたものが表3である。この表を見ると、 $\alpha$ -、 $\gamma$ -シクロデキストリンの場合には、酵素との複合体形成にエンタルピー項の寄与が大きいのに対して、 $\beta$ -シクロデキストリンの場合にはエンタルピー項よりもむしろエントロピー項による寄与が大きいことがわかる。

表3 プルラナーゼとシクロデキストリンが結合する際の、標準熱力学パラメータ。  $\Delta G^\circ$ ：標準Gibbsエネルギー変化， $\Delta H$ ：エンタルピー変化， $\Delta S^\circ$ ：標準エントロピー変化。

	$\Delta G^\circ$ $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	$\Delta H$ $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	$\Delta S^\circ$ $\text{J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$
$\alpha$ -Cyclodextrin	$-23.4 \pm 0.5$	$-56.6 \pm 2.4$	$-111 \pm 8$
$\beta$ -Cyclodextrin	$-33.4 \pm 0.4$	$-24.8 \pm 3.3$	$29 \pm 11$
$\gamma$ -Cyclodextrin	$-23.5 \pm 0.5$	$-36.4 \pm 4.5$	$-43 \pm 15$

#### 4. 考 察

シクロデキストリンは、6つ以上のグルコース残基が $\alpha$ -1,4-グルコシド結合で環状につながった環状オリゴ糖で、多くのアミラーゼに対して拮抗的に活性を阻害することが知られている。今回行った研究から、 $\alpha$ -、 $\beta$ -、 $\gamma$ -シクロデキストリンは、いずれもプルラナーゼに対して拮抗阻害剤として働くことが判明した。本酵素は $\alpha$ -1,6-グルコシド結合を特異的に加水分解する酵素であるが、本来マルトトリオース（3残基のグルコースが $\alpha$ -1,4-グルコシド結合で連結したもの）が $\alpha$ -1,6-グルコシド結合で長くつながったプルランを最も良い基質とする<sup>12)</sup>。このことから考えて、シクロデキストリンは酵素の $\alpha$ -1,4-グルカンを認識する部位近辺に結合する事により、基質であるプルランなどが活性中心に取り込まれるのを妨げると考えられる。またその阻害物質定数 ( $K_i$ )は、 $\alpha$ -、 $\gamma$ -シクロデキストリンで約 $10^{-4}\text{M}$ 、 $\beta$ -シクロデキストリンでは約 $10^{-6}\text{M}$ と、他のアミラーゼに見られない極めて強い結合をする酵素であることが判明した。

またシクロデキストリン結合により、トリプトファンに起因すると見られる紫外吸収差スペクトルが観測されるが、これも $\beta$ -シクロデキストリンだけが他とやや異なるスペクトルを示す。また蛍光差スペクトル

においても、チロシンの吸収がない 295 nm 励起では、 $\beta$ -シクロデキストリンの場合  $\alpha$ -,  $\gamma$ -シクロデキストリンと酵素との複合体形成に見られるような明瞭な蛍光差スペクトルを示さなかった。このことは、 $\alpha$ -,  $\gamma$ -シクロデキストリンが酵素と結合することによって、酵素表面のトリプトファン残基周辺の環境を変化させ、蛍光スペクトル変化を生じるのに対して、 $\beta$ -シクロデキストリンが結合する部位には蛍光スペクトル変化を惹起するようなトリプトファン残基が存在せず、280 nm 励起時の蛍光差スペクトルは主にチロシン残基によるものと推定される。以上の結果から、 $\beta$ -シクロデキストリンの結合部位が  $\alpha$ -および  $\gamma$ -シクロデキストリンと異なるのではないかと考え、蛍光滴定において  $\beta$ -シクロデキストリンと  $\alpha$ -,  $\gamma$ -シクロデキストリン間で競合するかどうかを調べた。図 9 は解離定数の 5 倍量の  $\beta$ -シクロデキストリンが存在する場合としない場合で、酵素を  $\alpha$ -シクロデキストリンで蛍光滴定した結果である。この図からわかる様に、 $\beta$ -シクロデキストリン存在下では、 $\alpha$ -シクロデキストリンを加えていっても顕著な蛍光強度の増加は見られず、この両者は明らかに競合していると考えられる。すなわち  $\alpha$ -と  $\beta$ -シクロデキストリンは同時に酵素に結合できず、結合部位はお互いに重なっていると考えられる。この現象は、 $\beta$ -と  $\gamma$ -シクロデキストリンの間でも見られた。

蛍光マイクロストップフロー実験の結果では、 $\alpha$ -,  $\gamma$ -シクロデキストリンの場合  $k_{app}$  がリガンド濃度によらず一定の値を取り、 $\beta$ -シクロデキストリンでは  $k_{app}$  が双曲線形のリガンド濃度依存性を示す。このことは、酵素とシクロデキストリンとの結合が単純な 2 分子反応によらないことを示している。特に後者は、速い 2 分子過程に遅い 1 分子過程が続く 2 段階反応に特徴的な現象である<sup>15,16)</sup>。



もし、速い 2 分子過程が蛍光強度変化を伴わなければ、 $k_{app}$  は次のように表すことができる<sup>16)</sup>。

$$k_{app} = k_{-2} + k_{+2}[CD]/(k_{-1}/k_{+1} + [CD]) \quad (8)$$

蛍光マイクロストップフロー実験の結果を、(8) 式にフィッティングする事によって計算された反応速度パラメーターを表 4 に示す。次に酵素とシクロデキストリンの結合が、(7) 式に示したような 2 段階反応に従うと仮定したときの解離定数  $K_s$  は、次の式で表される<sup>16)</sup>。

$$\begin{aligned} K_s &= [E][CD]/([E \cdot CD] + [E \cdot CD^*]) \\ &= (k_{-1}/k_{+1})/(1 + k_{+2}/k_{-2}) \end{aligned} \quad (9)$$

$\beta$ -シクロデキストリンについて、蛍光ストップフロー実験で得られた反応速度パラメーター (表 4) を式 (9) に代入して解離定数  $K_s$  を計算すると 36  $\mu$ M となる。この値は、蛍光滴定から求めた解離定数 ( $K_d$ : 0.61  $\mu$ M) と明らかに一致しない。このことは、 $\beta$ -シクロデキストリンと酵素との結合反応が、式 (7) で示したような単純な 2 段階反応ではないことを物語っている。実験結果を矛盾なく説明するためには、少なくとも式 (7) のモデルにもう 1 段階の単分子過程が必要と思われる。一方、 $\alpha$ -および  $\gamma$ -シクロデキストリンの実験結果についてはいくつかの仮説が立てられるが、現在までのところ酵素とシクロデキ

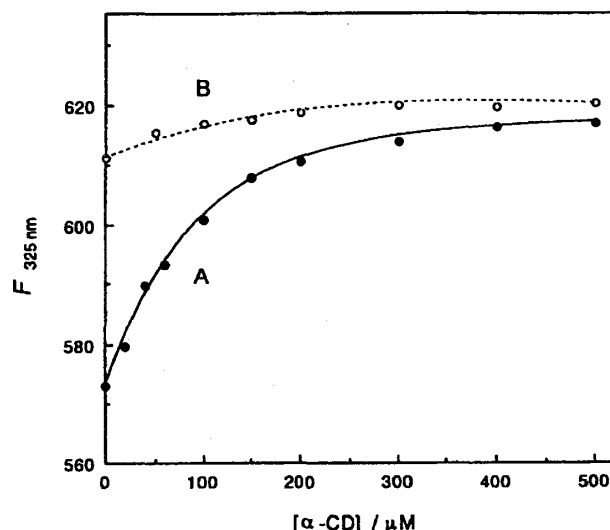


図 9  $\beta$ -シクロデキストリンが存在しないとき(A)とするとき(B, 3  $\mu$ M)の  $\alpha$ -シクロデキストリンによるプルナーゼの蛍光滴定曲線。励起波長は 280 nm, 蛍光波長は 325 nm.



ストリンの結合反応を無理なく説明できるモデルは得られていない。

最後に、表3に酵素・シクロデキストリン複合体形成時の標準熱力学パラメーターをまとめた。これまで深田らは、糖質と相互作用する蛋白質とリガンド（この場合糖質）との結合には、一般にエンタルピー項の

表4 プルラーゼにシクロデキストリンが結合する際の速度定数。各値は図8の結果から計算により求めた。

	$K_{-1}(=k_{-1}/k_{+1})$ (mM)	$k_{+2}$ (s <sup>-1</sup> )	$k_{-2}$ (s <sup>-1</sup> )	$k_{+2}+k_{-2}$ (s <sup>-1</sup> )
$\alpha$ -Cyclodextrin	<0.05	—	—	0.54
$\beta$ -Cyclodextrin	$0.37 \pm 0.12$	$2.9 \pm 0.2$	$0.3 \pm 0.2$	3.2
$\gamma$ -Cyclodextrin	<0.05	—	—	0.56

寄与が大きく、エントロピー的には不利であることを報告している<sup>17)</sup>。これは蛋白質と糖質との結合が、主に水素結合によって安定化されているということを示唆するものである。実際表3からわかる通り、プルラーゼと $\alpha$ -、 $\gamma$ -シクロデキストリンとの結合は、エンタルピー項の寄与が大きく、エントロピー的には不利である。一方 $\beta$ -シクロデキストリンと酵素との結合は、エンタルピー項の寄与がそれほど小さくなく、むしろエントロピー項による安定化の寄与が大きい。すなわち、 $\beta$ -シクロデキストリンと酵素との結合には、水素結合による安定化に加えて、例えば疎水結合のようなエントロピー的に有利な結合が存在することを示している。これまで $\alpha$ -、 $\beta$ -アミラーゼやシクロデキストリン結合蛋白質のように、シクロデキストリンと相互作用する蛋白質の高分解能X線結晶構造解析が行われているが、これらの蛋白質と基質、リガンドとの相互作用には、水素結合に加えて疎水的な相互作用の寄与が大きいことが報告されている<sup>18-20)</sup>。特に、三上らによる大豆 $\beta$ -アミラーゼと $\alpha$ -シクロデキストリン複合体のX線結晶構造解析の結果では、 $\beta$ -アミラーゼの383番目のロイシン残基の側鎖が、 $\alpha$ -シクロデキストリンの環内に浅く包接され、疎水的な相互作用をしていることが明らかにされた<sup>18)</sup>。シクロデキストリンは、構成されるグルコースの数が $\alpha$ で6、 $\beta$ で7、 $\gamma$ で8残基で、環内の空洞の内径、深さ、状態が異なるために、取り込むゲスト化合物の選択性が異なる<sup>21)</sup>。プルラーゼと $\beta$ -シクロデキストリンとの結合に、アミノ酸側鎖とシクロデキストリン間の疎水的相互作用が関与しているかどうかは現在のところ不明であるが、興味ある点である。

以上述べたように、*Klebsiella pneumoniae* 由来のプルラーゼは、シクロデキストリンと強く相互作用する酵素であり、その中でも特に $\beta$ -シクロデキストリンとは極めて強く結合する。分光学的、および動的な反応速度論的研究から、 $\beta$ -シクロデキストリンと $\alpha$ -、 $\gamma$ -シクロデキストリンとは、その結合位置、または結合様式が異なると推定されるが、 $\beta$ -と $\alpha$ -、 $\gamma$ -シクロデキストリンの結合位置はお互いに重なっている。今後の課題としては、 $\alpha$ -、 $\gamma$ -シクロデキストリンに比べて、 $\beta$ -シクロデキストリンと酵素との結合を安定化させている要因を解明していきたい。

## 謝 辞

以上の研究を行うにあたり、以下の方々にお世話になった。まず、(株)林原生物化学研究所には酵素、基質、基質アナログなどをご提供いただいた。また、酵素とシクロデキストリンの熱測定では大阪府立大学農学部生物物理化学研究室の高橋克忠氏、深田はるみ氏に、マイクロストップフロー装置を用いた測定には、三重大学教育学部の田中晶善氏にお世話になった。加えて、本研究をお手伝いいただいた卒業研究生の方々に感謝します。

## 参考文献

- 1) 谷口肇 (1986) 「アミラーゼー生物工学へのアプローチ」 (中村道徳, 大西正健, 坂野好幸監修, 谷口肇編), pp. 301-316, 学会出版センター
- 2) Yokobayashi, K. and Sakano, Y. (1988) Debranching Enzymes in *Handbook of Amylases and Related Enzymes, -Their Sources, Isolation Methods, Properties and Applications*, ed. by The Amylase Research Society of Japan, pp. 125-142, Pergamon Press
- 3) Amemura, A., Chakraborty, R., Fujita, M., Noumi, T., and Futai, M. (1988) J. Biol. Chem., 263, 9271-9275
- 4) Takizawa, N. and Murooka, Y. (1985) Appl. Env. Microbiol., 49, 294-298

- 5) Katsuragi, N., Takizawa, N., and Murooka, Y. (1987) *J. Bacteriol.*, **169**, 2301-2306
- 6) Charalambous, B.M., Keen, J. N., and McPherson, M.J. (1988) *EMBO J.*, **7**, 2903-2909
- 7) Iwamoto, H., Ohmori, M., Ohno, M., Hirose, J., Hiromi, K., Fukada, H., Takahashi, K., Hashimoto, H., and Sakai, S. (1993) *J. Biochem.*, **113**, 93-96
- 8) Iwamoto, H., Ohno, M., Ohmori, M., Hirose, J., Tanaka, A., Sakai, S., and Hiromi, K. (1994) *J. Biochem.*, **116**, 1264-1268
- 9) Park, J.T. and Johnson, M.J. (1949) *J. Biol. Chem.*, **181**, 149-151
- 10) Hiromi, K., Nakatani, H., Tanaka, A., and Iwamoto, H. (1991) *Anal. Sci.*, **7**, 819-821
- 11) Takahashi, K. and Fukada, H. (1985) *Biochemistry*, **24**, 297-300
- 12) Yokobayashi, K., Akai, H., Sugimoto, T., Hirao, M., Sugimoto, K., and Harada, T. (1973) *Biochim. Biophys. Acta*, **293**, 197-202
- 13) Storer, A.C. and Cornish-Bowden, A. (1977) *Biochem. J.*, **165**, 61-69
- 14) Dixon, M. (1953) *Biochem. J.*, **55**, 170-171
- 15) Eigen, M. and DeMaeyer, L. (1963) Relaxation methods in *Technique of Organic Chemistry*, 2nd ed. (Weissberger, A., ed.) Vol. VIII, pp. 895-1054, John Wiley & Sons, New York
- 16) Hiromi, K. (1979) *Kinetics of Fast Enzyme Reactions - Theory and Practice*, pp. 261-273, Halsted Press, Kodansha Ltd., Tokyo
- 17) 深田はるみ (1988) 蛋白質・核酸・酵素, **33**, 328-336
- 18) Mikami, B., Hehre, E.J., Sato, M., Katsube, Y., Hirose, M., Morita, Y., and Sacchettini, J.C. (1993) *Biochemistry*, **32**, 6836-6845
- 19) Klein, C., Hollender, J., Bender, H., and Schultz, G.E. (1992) *Biochemistry*, **31**, 8740-8746
- 20) Sharff, A.J., Rodseth, L.E., and Quioco, F.A. (1993) *Biochemistry*, **32**, 10553-10559
- 21) Bender, M.L. and Komiyama, M. (1978) *Cyclodextrin Chemistry - Reactivity and Structure, Concepts in Organic Chemistry 6*, Springer-Verlag