

Study of Trehalose-relating Enzymes

(Received November 4, 2005)

Tomoyuki Nishimoto*

*Amase Institute, Hayashibara Biochemical Laboratories Inc.
 (7-7, Amase-minamimachi, Okayama 700-0834, Japan)*

Abstract: Trehalose (α -Glc-(1 \leftrightarrow 1)- α -Glc) is widely distributed in nature such as microorganisms, insects, plants, and invertebrates. This sugar exists not only as an energy source but also as an important functionality-material that protects the organization from damage by various stresses such as drying, freezing, and osmotic pressure. Therefore, organisms have various trehalose-related enzymes that participate in degradation or synthesis of trehalose to adjust the concentration in response to the environment. In this study, we obtained trehalase, trehalose synthase or trehalose phosphorylase producing bacterium from soil or an already identified bacterium. The trehalose-related enzymes are classified from the catalyst style into three groups named the degradation, the intramolecular transglucosylation, and the intermolecular transglucosylation. Three enzymes we screened were different from other kinds of trehalose-related enzymes. In addition, we clarified some properties of these enzymes, and examined the synthesis of useful oligosaccharides. Trehalase, which hydrolyzes trehalose to glucose, was purified from the *Bacillus* sp. T3 cultures. Trehalose synthase, which catalyzes the interconversion of maltose and trehalose by intramolecular transglucosylation, was purified from cell-free extracts of *Pimelobacter* sp. R48 and the thermophilic bacterium *Thermus aquaticus* ATCC 33923. Trehalose phosphorylase, which catalyzes the reversible phosphorolytic cleavage of trehalose, was purified from a cell-free extract of thermophilic anaerobe, *Thermoanaerobacter brockii* ATCC 35047. Trehalose synthase was useful for not only the synthesis of trehalose but also the production of trehalulose (1-*O*- α -D-glucopyranosyl-D-fructose) from sucrose. Moreover, a non-reducing disaccharide, α -galactosyl α -glucoside, was synthesized for the first time by trehalose phosphorylase using galactose as an acceptor.

Key words: trehalose, trehalase, trehalose synthase, trehalose phosphorylase

トレハロースに関連する新規酵素に関する研究**

西本友之*

株式会社林原生物化学研究所 (700-0834 岡山市天瀬南町 7-7)

トレハロース (α -Glc-(1 \leftrightarrow 1)- α -Glc) は、微生物、昆虫、植物、無脊椎動物など自然界に広く分布している。トレハロースは生物にとってエネルギー源であるだけでなく、乾燥、凍結、浸透圧といったさまざまなストレスによる組織の損傷から保護する重要な機能性物質として存在している。したがって、生物は環境に応じてトレハロース濃度を調節するため、分解または合成に関与する多様な酵素を有している。本研究では、微生物におけるトレハロース代謝に関与する酵素を検索しトレハロースおよび有用オリゴ糖の酵素合成法の確立を目的に、得られた3種類のトレハロース関連酵素について特性を調べた。

1. トレハラーゼ (EC 3.2.1.28)

トレハラーゼ (系統名: α , α -トレハロースグルコハイドロラーゼ, EC 3.2.1.28) は、トレハロースを加水分解し、グルコースを生成する酵素である。本酵素は微生物 (カ

ビ¹⁻³), 酵母⁴, バクテリア⁵), 海藻類⁶, 昆虫⁷, 動物組織⁸) から精製され諸性質が報告されている。トレハラーゼは生物にとって重要であるばかりでなく、その特異性から研究分野での利用も期待できる。ブタ膵臓由来の標品が市販されているものの、高価であることと α -グルコシダーゼ様の活性が混在していることから、研究用ツールとしては適していない。そこで、容易な供給源として微生物に注目し、土壌分離菌からトレハラーゼ生産菌のスクリーニングを行った。その結果、トレハラーゼ高生産株として、*Bacillus* sp. T3 を取得した⁹)。トレハラーゼは、トレハロースを炭素源とする培地で培養したときに誘導的に生産された。培養液の遠心上清の酵素活性は溶菌とともに増加したことから、本酵素は菌体内酵素と考えられた。本酵素を電気泳動的に単一にまで精製し、諸性質を調べた。SDS-PAGE およびゲル濾過分析の結果から、本酵素はモノマー酵素で、分子量はトレハラーゼとしては比較的小さい58,000 と見積もられた。最適温度は50°C, 最適pHは7.8付近であり、微生物由来トレハラーゼとしては最適pHがややアルカリ側であった。また、*Labosphaera* sp. 由来トレ

* Tel. +81-86-231-6731, Fax. +81-86-231-6738, E-mail: nishimoto@hayashibara.co.jp

** 平成17年度日本応用糖質学会奨励賞受賞講演

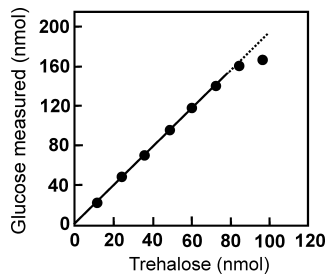


Fig. 1. Calibration curve for trehalose determination using the trehalase and glucose-oxidase method.

The reaction mixture (pH 7.5) containing trehalose (0–96 nmol) and trehalase (0.1 U) was incubated at 45°C for 120 min. The glucose content in the reaction mixture was assayed by the glucose-oxidase method. Regression equation (trehalose 0–72 nmol): $Y = 1.97(\pm 0.0052)X$; Y, glucose measured (nmol); X, trehalose (nmol).

ハラーゼで観察されるグルコースの縮合反応¹⁰⁾は認められなかった。基質特異性を検討した結果、グルコースから構成される二糖の中でトレハロースのみに作用し、ネオトレハロース、コージビオース、ニゲロース、マルトース、イソマルトース、セロビオースには全く作用しなかった。次に、トレハロースの微量定量法について検討した。トレハロースを 0–96 nmol 含む反応液にトレハラーゼ精製標品を 0.1 units 添加し、pH 7.0 で 45°C、120 分間作用させた後、グルコース・オキシダーゼ法により生成したグルコース量を測定した (Fig. 1)。70 nmol 付近まで良好な直線性が得られた。グルコース量から換算した計算上のトレハロース回収率は 98.5% であった。良好な直線性と高い回収率は、5 μ mol マルトース共存下でも変化しなかった。以上の結果から、本トレハラーゼは反応液中のトレハロースの微量定量に適用可能であることがわかった。なお、本研究は *Bacillus* 属細菌由来トレハラーゼの酵素的性質を明らかにした最初の例である。

2. トレハロース生成酵素 (EC 5.4.99.16)

従来、トレハロースは酵母菌体中から抽出・精製することで化粧品用や試薬用トレハロースは製造されていた。近年になり、食品用途でのトレハロースの有用性が認識され、トレハロースを安価に工業生産するための試みが数多く行われた。たとえば、微生物による醗酵生産^{11,12)}はその一例である。また、酵素法によるトレハロース合成として、マルトースホスホリラーゼ (MPase, EC 2.4.1.8) とアノマー反転型トレハロースホスホリラーゼ (TPase, EC 2.4.1.64) によりマルトースから生成する方法^{13,14)}、スクロースホスホリラーゼ (EC 2.4.1.7) とアノマー保持型トレハロースホスホリラーゼ (EC 2.4.1.231) によりスクロースとグルコースから生成する方法¹⁵⁾、トレハラーゼによる縮合反応を利用してグルコースから生成する方法¹⁰⁾などが報告された。しかしながら、酵素の供給や低収率などの問題からトレハロースの安価な製造は困難であった。そのような状況下で、われわれはマルトオリゴシルトレハロース生成酵素 (MTSase, EC 5.4.99.15)^{16,17)} とマルトオリゴシル

Table 1. TSase producing bacteria.²⁶⁾

<i>Pimelobacter</i> sp. R 48*	<i>Thermus filiformis</i> ATCC 43280
<i>Pseudomonas putida</i> H 262*	<i>Thermus ruber</i> ATCC 35948
<i>Thermus aquaticus</i> ATCC 25105, 27634, 33923	
<i>Thermus</i> sp. ATCC 43814	<i>Thermus</i> sp. ATCC 43814, 43815

*from soil.

トレハローストレハロハイドロラーゼ (MTHase, EC 3.3.1.141)^{18,19)}が共同的に作用することでマルトオリゴ糖から効率的トレハロースを合成する反応系を見出した^{20,21)}。これら 2 種の酵素を含む酵素剤にイソアミラーゼ (EC 3.2.1.68)、シ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)、グルコアミラーゼ (EC 3.2.1.3) を組み合わせることで高濃度の澱粉液化液から 85% 以上のトレハロース生成率を実現した^{22–25)}。現在、この方法によりトレハロースの工業的製造が行われている。MTSase/MTHase 系の発見とほぼ同時期に、トレハロース生成に関わる新規酵素としてトレハロース生成酵素 (TSase, EC 5.4.99.16) が発見された。我々は澱粉からのトレハロース製造方法として、前記 MTSase と MTHase の組み合わせおよび TSase によるマルトースからの変換方法について種々検討したが、澱粉からのトレハロース生成率、反応の容易さから MTSase/MTHase 系を採用することにした。しかし、TSase も酵素化学的に極めて興味深い性質を有しており、以下に概説する。

土壌分離菌 *Pimelobacter* sp. R 48 培養液中にマルトースからトレハロースを生成する酵素活性を見出した²⁶⁾。本酵素は分子内糖転移反応により、マルトースとトレハロースの相互変換を触媒する新規ムターゼであった²⁷⁾。MTSase もまた α -1,4 グルコシド結合と α , α -1,1 グルコシド結合の相互変換を触媒する酵素であるが、MTSase が重合度 3 以上のマルトオリゴ糖に作用するのに対し、TSase はマルトースのみに作用する点が大きく異なっている。公知菌株からさらに検索した結果、好熱性細菌である *Thermus* 属の多くの菌株もまた TSase を生産することがわかった (Table 1)。これらの株の中から、*Thermus aquaticus* ATCC 33923 株を選択し、精製酵素を用いて詳細に検討した²⁸⁾。*P.* sp. R 48 由来 TSase の温度安定性が 30°C までであるのに対し *T. aquaticus* ATCC 33923 由来酵素の温度安定性は 80°C であり、50°C もの差が認められた。

本酵素の活性 1 単位をマルトースから 1 分間に 1 μ mol のトレハロースを生成する酵素量と定義し、その測定はマルトースを基質とした反応液をトレハラーゼで完全分解後、増加するグルコース量からトレハロース量を算出する方法で行った。この活性測定に先に見出したトレハラーゼが有効に利用できたことは、本研究を進める上で大いに貢献したと思われる。さらにトレハラーゼは、トレハロースの結合エネルギーを測定する際にも利用した。

1) 反応機構に関する検討

グルコースと α -または β -グルコース 1-リン酸の混合物

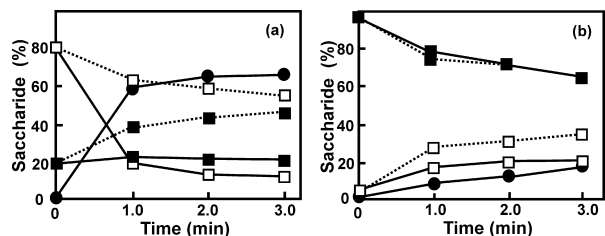


Fig. 2. Time course of TSase reaction with α -maltose or β -maltose as substrates.

(a) Products from α -maltose; (b) Products from β -maltose. Reaction mixtures containing 0.1% substrate, trehalose synthase (12,000 U/g-substrate), and 20 mM acetate buffer (pH 6.5) were incubated at 50°C. Samples were collected at intervals and frozen rapidly by immersing the micro test tube in cooled methanol (-80°C) to stop the reaction. After lyophilization, the sugar compositions were analyzed by GLC. —, with enzyme; ·····, without enzyme; ●, trehalose; □, α -maltose; ■, β -maltose.

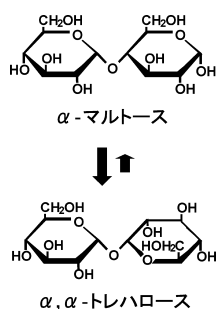


Fig. 3. Reaction scheme of TSase.

に対し TSase は全く作用せず、無機リン酸の有無は酵素活性に全く影響しなかった。さらに、マルトースと放射能ラベルされたグルコースを含む基質に TSase を作用後、TLC クロマトグラムおよびそのオートラジオグラムを調製した。TLC クロマトグラムにおいてマルトースはトレハロースに変換されていたが、オートラジオグラムにおいて放射活性を有する反応生成物は認められなかった。これらの結果は、①TSase はホスホリラーゼ様活性を有しない、②TSase はグルコースに対する分子間転移反応を原則的に触媒しない、ことを示している。次に、高純度の無水結晶マルトース (β -マルトース純度：約 80%) または 1 含水結晶マルトース (α -マルトース純度：約 98%) に TSase を作用させ、分単位の糖組成変化を GLC 分析により調べた (Fig. 2)。アノマーの化学的変化を差し引いて考えると、TSase は α -マルトースにのみ作用し、 β -マルトースには作用しないと考えられた。以上の結果から、TSase は α -マルトースとトレハロースの相互変換を分子内糖転移反応により触媒するムターゼであると結論した (Fig. 3)。

2) 基質特異性

種々の糖質を用いて TSase の基質特異性を検討した結果、本酵素はマルトースとトレハロース以外に弱いながらスクロースにも作用しトレハロース (1-O- α -D-glucopyranosyl-D-fructose) を生成することがわかった²⁹⁾。この反応は非可逆的であり、トレハロースからのスクロース生成は認められなかった。スクロース濃度 10%

Table 2. K_m and V_{max} of TSase for various substrates.

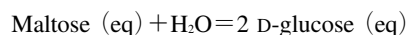
	K_m (mM)	V_{max}^{*1} (mmol/min)	V_{max}/K_m
Maltose	34.5	102 ^{*2}	2.96
Trehalose	158	208 ^{*3}	1.32
Sucrose	96.5	9.51 ^{*4}	0.099

*1 At pH 7.0, 60°C. Production of trehalose, *2 maltose, *3 trehalose, *4

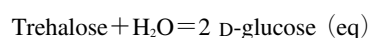
w/v, 40°C, 100 u/g-sucrose, pH 6.5 の条件で 96 時間作用させた結果、トレハロースの生成率は 81.0% にも達した。Michaelis-Menten タイプの速度式を適用して Lineweaver-Burk の逆数プロットからマルトース、トレハロースおよびスクロースに対する速度パラメータを求めた (Table 2)。TSase がマルトースやトレハロースと比較してスクロースに作用しにくいのは V_{max} が小さいためであることがわかった。パラチノース生成酵素 (EC 5.4.99.11) はスクロースをパラチノースとトレハロースに変換する酵素である。この酵素を産生する微生物の中で、*Pseudomonas mesoacidophila* MX-456³⁰⁾ および *Agrobacterium radiobacter* MX-232³¹⁾ はスクロースを主としてトレハロースに変換する酵素である。TSase もまたパラチノース生成酵素と同じ活性を有していた。

3) トレハロース生成率に与える反応温度の影響

反応の平衡はトレハロース生成に傾いており、マルトースからのトレハロース生成率はおおよそ 70% であった。詳細には、マルトースとトレハロースの平衡時における比率は反応温度に依存しており、温度が低くなるに従ってトレハロース生成率は高くなる。この現象の原因として反応温度が低くなるに従って加水分解物作用 (水への糖転移) が抑制されることが挙げられる。しかしながら、温度により平衡状態におけるマルトースとトレハロースの比率も変化していることから、別の要因が考えられた。マルトースのトレハロースへの変換はすなわち α -1,4 グルコシド結合の α , α -1,1 グルコシド結合への変換であり、結合エネルギーの変化が生じている。よって、変換反応における熱測定および平衡定数の温度依存性からマルトースのトレハロースへの変換に伴うエンタルピー変化 (ΔH) を評価することで先に挙げた現象が理解できるのではないかと考えた^{32,33)}。グルコアミラーゼを用いたマルトースの加水分解およびトレハラーゼを用いたトレハロースの加水分解における熱測定を MicroCal 社製滴定型カロリメーターで行った結果、



$$\Delta H = -3.90 \pm 0.12 \text{ kJ/mol (50}^\circ\text{C)}$$



$$\Delta H = +6.03 \pm 0.16 \text{ kJ/mol (50}^\circ\text{C)}$$

であった。

よって、それらの差からアノマーが平衡状態にあるマルトースがトレハロースに変換されたときの ΔH は、 $-9.93 \pm 0.20 \text{ kJ/mol (50}^\circ\text{C)}$ と評価された。また、50°C でマルトースおよびトレハロースに TSase を作用させたときの熱測定

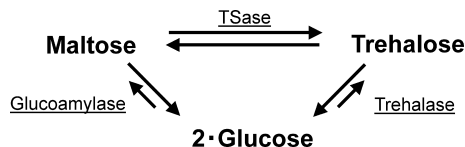


Fig. 4. Reaction scheme of the interconversion between maltose and trehalose.

と平衡時の糖組成分析を行った。各基質の加水分解物に伴う ΔH を補正した結果、相互変換における ΔH は、

$$\text{Maltose (eq)} = 0.322 \text{ maltose (eq)} + 0.668 \text{ trehalose} \\ \Delta H = -6.53 \pm 0.27 \text{ kJ/mol (50}^\circ\text{C)}$$

$$\text{Trehalose} = 0.328 \text{ maltose (eq)} + 0.672 \text{ trehalose} \\ \Delta H = +3.44 \pm 0.06 \text{ kJ/mol (50}^\circ\text{C)}$$

であった。よって、それらの差からアノマーが平衡状態にあるマルトースがトレハロースに変換されたときの ΔH は、 $-9.97 \pm 0.28 \text{ kJ/mol (50}^\circ\text{C)}$ と評価された。さらに、種々の温度におけるマルトースに対するトレハロースの比率の経時変化から、各温度の平衡定数 K ($[\text{Trehalose}]/[\text{Maltose}]$) を求めた。Vant Hoff の式 ($d \ln K/dT = \Delta H/RT^2$) に基づき平衡定数 K の対数を絶対温度 T の逆数に対してプロットして得られる一次比例関係から、アノマーが平衡状態にあるマルトースがトレハロースに変換されたときの ΔH は、 $-9.86 \pm 0.28 \text{ kJ/mol (50}^\circ\text{C)}$ と評価された。

以上、3 とおりの方法で評価された ΔH はともによく一致しており、Fig. 4 に示した反応スキームの熱力学的整合性が立証された。この反応スキームの成立は、マルトースとトレハロースの平衡がその変換ルートに関係なく反応温度により決定されることを示唆している。すなわち、反応温度が低くなるに従いトレハロース生成率が高くなる現象が熱力学的に説明できた。単糖の異性化反応に関する熱力学的アプローチについてはいくつか報告されているが、二糖間の結合様式の変換に関する熱力学的アプローチは少ない。

4) TSase 遺伝子の解析^{34,35)}

Pimelobacter sp. R 48 および *T. aquaticus* ATCC 33923 の TSase 遺伝子 (*TreS*) をクローニングし、タンパク質一次配列を決定した。*P. sp.* R 48 由来 *TreS* 遺伝子 (1719-bp) にコードされるアミノ酸配列は 573 残基で、精製酵素タンパクは遺伝子から推定される配列の N 末端側の 5 残基が欠損した形であることがわかった。一方、*T. aquaticus* ATCC 33923 由来 *TreS* 遺伝子 (2892-bp) にコードされるアミノ酸配列は 963 残基であった。両タンパクには 390 アミノ酸残基もの相違が認められたが、N 末端領域の配列は高い相同性が認められた。また、TSase のアミノ酸配列中には、 α -アミラーゼ (EC 3.2.1.1) や CGTase, イソアミラーゼ, ブランチングエンザイム (EC 2.4.1.18), MTSase, MTHase などの α -アミラーゼファミリー酵素間で保存されている領域が存在していた (Fig. 5)。これら保存領域の中で A 領域と C 領域のヒスチジンは基質との結合に関与する残基、B 領域のアスパラギン酸、C 領域のアスパラギン酸は同ファミリーに共通する触媒残基である。これらの残基が TSase にも存在していることから、本酵素も α -アミラーゼファミリーに属する酵素と考えられた。

T. aquaticus ATCC 33923 *TreS* 遺伝子の upstream には 720-bp からなる別のオープンリーディングフレーム (ORF) が存在していた。この ORF から推定されるアミノ酸配列は、*E. coli* 由来⁴³⁾ や *Saccharomyces cerevisiae* 由来⁴⁴⁾ トレハロース-6-リン酸ホスファターゼ (TPPase, EC 3.1.3.12) と相同性を有していた。TPPase はトレハロース-6-リン酸合成酵素 (EC 2.4.1.15) とともに広く生物界においてトレハロース生合成システムの一部として機能していることが知られている。おそらく、このリン酸依存型トレハロース合成経路が *TreS* 遺伝子近傍に存在しているものと推定される。最近、耐塩性菌 *Rhodobacter sphaeroides* のゲノム解析から先の 2 経路に、MTSase および MTHase が関与するトレハロース合成系を加えた 3 経路に関与する遺伝子が一つのゲ

Enzyme	Homologous Region		
	A-region	B-region	C-region
TSase (<i>T. aquaticus</i>)	(96) ELVLT (101)	(193) GFRLD (199)	(301) FIRNS (306)
TSase (<i>Pimelobacter</i> sp.)	(103) DFVMT (108)	(201) GFRLD (207)	(317) FLRNS (322)
MTSase (<i>Arthrobacter</i> sp.)	(87) DIVPN (92)	(233) GLRID (239)	(478) TLST (483)
MTSase (<i>S. acidocaldarius</i>)	(85) DIVPN (90)	(224) GYRID (230)	(438) ATST (443)
MalS (<i>S. Carlsbergensis</i>)	(106) DLVMT (111)	(210) GFRID (216)	(344) YIEN (349)
TAA (<i>A. oeryzae</i>)	(117) DVVMT (122)	(202) GLRID (208)	(292) FVEN (297)
CGTase (<i>B. stearrowthermophilus</i>)	(135) DFAPN (140)	(225) GIRFD (231)	(324) FIDN (329)
Iam (<i>P. amylocleramosa</i>)	(317) DVVMT (322)	(396) GFRFD (402)	(528) FIDV (533)
BE (<i>B. stearrowthermophilus</i>)	(238) DWVPC (243)	(304) GFRVD (310)	(414) LPFS (419)

Fig. 5. Putative catalytic and substrate-binding residues in TSase and amylolytic enzymes.

The following enzymes are shown: TSase, trehalose synthases from *Thermus aquaticus* ATCC 33923 and *Pimelobacter* sp. R 48; MTSase, maltotriose trehalose synthases from *Arthrobacter* sp. Q 36³⁶⁾ and from *Sulfolobus acidocaldarius* ATCC 33909³⁷⁾; MalS, maltase from *Saccharomyces carlsbergensis*³⁸⁾; TAA, α -amylase (EC 3.2.1.1) from *Aspergillus oryzae*³⁹⁾; CGTase, cyclomaltodextrin glucanotransferase (EC 2.4.1.19) from *Bacillus stearrowthermophilus*⁴⁰⁾; Iam, isoamylase (EC 3.2.1.68) from *Pseudomonas amylocleramosa*⁴¹⁾; BE, Branching enzyme (EC 2.4.1.18) from *Bacillus stearrowthermophilus*.⁴²⁾ The putative catalytic residues are highlighted in black. The putative substrate-binding residues are shaded.

Table 3. Properties of TPase from various microbial origins.

Property	<i>T. brockii</i> ATCC 35047	<i>E. gracilis</i> ⁴⁹⁾	<i>M. varians</i> No. 39 ⁵⁰⁾	<i>Plesiomonas</i> sp. SH-35 ⁵¹⁾	<i>C. ferruginea</i> KY 2039 ⁵²⁾
Molecular mass					
SDS-PAGE	88000	ND	105000	88000	98000
Gel filtration	190000	ND	570000	200000	400000
Isoelectric point	5.4	ND	4.8	4.5	4.6
Optimum pH	7.0–7.5	7.0	7.0	7.0	6.5
Optimum temp. (°C)	70	40	32	50	45
pH stability	6.0–9.0	6.0–8.0	5.5–7.5	6.0–9.0	ND
Thermal stability (°C)	below 60	below 40	below 30	below 45	ND

ND, not determined.

ノム中に見出された⁴⁵⁾。本菌は、塩ストレス条件下で適合溶質としてトレハロースを蓄積することが知られている。特に、*TreS* 遺伝子はトレハロースの分解に関与しているらしい。*Thermus* 属菌の場合も、複数のトレハロース合成系により、蓄積するトレハロース濃度を調節しているのかもしれない。

3. トレハロースホスホリラーゼ (EC 2.4.1.64)

従来、トレハロースは1 kg 当たりおよそ3万円と高価であったため、食品用途の糖質を開発原料としては不適當であった。2. で述べたように、*Arthrobacter* 属細菌由来 MTSase と MTHase を利用し澱粉を原料としたトレハロースの工業的製造が開始され、高純度結晶トレハロースが従来の100分の1の価格で入手可能になった。このことを契機に、トレハロースに作用する新規酵素のスクリーニングを行った。その結果、公知菌である嫌気性古細菌 *Thermoanaerobacter brockii* の菌体中にトレハロースから非還元性三糖セラギノース (α -Glc-(1 \rightarrow 2)- α -Glc-(1 \leftrightarrow 1)- α -Glc) 生成活性を見出した⁴⁶⁾。本活性は、既知酵素トレハロースホスホリラーゼ (TPase) とコージビオースを加リン酸分解する新規酵素コージビオースホスホリラーゼ (KPase, EC 2.4.1.230) の共同作用に由来することを明らかにした (Fig. 6)⁴⁷⁾。すなわち、TPase によりトレハロースからグルコースと β -glucose 1-phosphate (β -G 1 P) が生成し、次いで KPase が β -G 1 P を供与体としてトレハロースにグルコシル転移することでセラギノースが生成する。KPase はグル

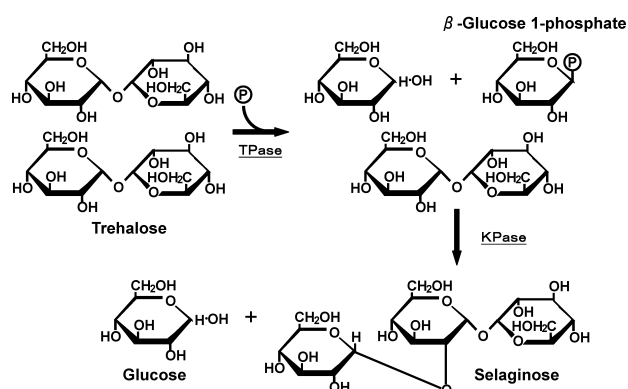


Fig. 6. The synthesis scheme of selaginose from trehalose by TPase and KPase.

コースと β -G 1 P からコージオリゴ糖を生成することから、 α -1,2 グルコシル結合に関する新規ホスホリラーゼであることがわかった。

1) TPase の酵素的性質⁴⁸⁾

T. brockii は高い生育温度 (培養温度: 60°C) を有することから、TPase は高い耐熱性をもつことが期待された。本 TPase の酵素的性質を既知 TPase とともに Table 3 にまとめた。本酵素の反応最適 pH は既知酵素と同様に中性付近であったが、最適温度および熱安定性は最も高い値であった。安定性の面から、工業的に適した酵素と考えられた。なお、最近 Inoue 等が *Bacillus stearothersophilus* SK-1 株由来 TPase の諸性質について報告している⁵³⁾。*B. stearothersophilus* 由来 TPase の最適温度は *T. brockii* 由来耐熱性 TPase より高く、およそ 75°C であった。

T. brockii 由来耐熱性 TPase の作用は既知 TPase と同様にトレハロースに特異的で、ネオトレハロース、コージビオース、ニゲロース、イソマルトース、ソフォロース、ラミナリビオース、セロピオース、ゲンチオピオースには作用しなかった。また、セラギノースや 4-O- α -D-グルコシルトレハロース (α -Glc-(1 \rightarrow 4)- α -Glc-(1 \leftrightarrow 1)- α -Glc) にも作用しなかった。

2) TPase を用いたガラクトシルグルコシドの酵素合成

T. brockii 由来耐熱性 TPase の受容体特異性を検討した⁴⁸⁾。既知 TPase と同様、D-グルコース以外に、キシロース、フコース、グルコサミンなどへの糖転移が認められた。グルコシルキシロシド、フコシルグルコシドなどのヘテロ非還元性二糖が生成していると考えられる。一方、既知酵素では受容体にならないとされている D-ガラクトースが良好な受容体となり、非還元性二糖ガラクトシルグルコシド (Gal-G, α -Gal-(1 \leftrightarrow 1)- α -Glc, Fig. 7) が生成した⁵⁴⁾。Gal-G の化学合成については Lee⁵⁵⁾ および Bassily⁵⁶⁾ により報告されているが、酵素合成は本 TPase を用いることで初めて可能になった。さらに、Gal-G 高純度結晶標品 (純度

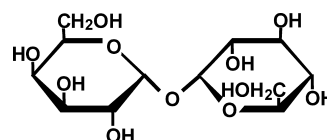


Fig. 7. Structure of galactosyl glucoside (Gal-G).

98%以上)を得ることに成功した⁵⁷⁾。Gal-G結晶は水分が5.43% (w/w)であることから、1含水結晶と考えられた。融点は121°Cで、25°Cにおける溶解度は222 g/水100 gであった。本結晶は相対湿度75%までほとんど吸湿性を示さず、取り扱いが容易であった。BassilyらもGal-G結晶を得たと報告しているが、その融点が165から170°Cであることから、今回得られた結晶はBassilyらのものとは異なる結晶であると考えられる。Gal-Gの性質の一つとして酵素分解を受けにくいことが挙げられる。 α -ガラクトシダーゼにより僅かに加水分解されるが、他のグリコシダーゼ(α -グルコシダーゼ、 β -グルコシダーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、トレハラーゼ)の作用は全く受けなかった⁵⁴⁾。また、最近Gal-Gが病原性大腸菌などの生産するベロ毒素を中和する活性をもつことが報告された⁵⁸⁾。特に、このような医薬品用途には高純度であることが要求される。TPaseを用いたD-ガラクトースへの糖転移、アルカリ処理、脱塩処理、結晶化を組み合わせることで容易に高純度Gal-Gの調製が可能である。

最近、*T. brockii*由来TPaseが単糖だけでなくイソマルトース、ゲンチオビオース、メリビオースなどのグルコース6位誘導体である二糖にも糖転移活性を有し、対応するトレハロース誘導体三糖を選択的に合成することを見出した⁵⁹⁾。TPaseの有用性がますます広がりつつある。

3) KPaseを用いたオリゴ糖の合成

KPaseは β -G1Pを供与体とし α -1,2グルコシル転移を特異的に触媒するユニークな酵素である。本酵素を用いてコージビオースやより重合度の高いコージトリオース、コージテトラオースといった一連のコージオリゴ糖⁶⁰⁾、スクロースを受容体として対応するヘテロオリゴ糖も合成が可能である⁶¹⁾。マルトースを受容体とした場合新規三糖 α -Glc-(1 \rightarrow 2)- α -Glc-(1 \rightarrow 4)- α -Glcが得られるが⁶¹⁾、 β -G1Pの供給を考慮しマルトースにMPaseとKPaseを同時に作用させることを試みた⁶⁰⁾。反応条件を最適化することで、非還元末端に α -1,2グルコシル基を有する広義でのコージオリゴ糖を生成率約70%で得ることができた。*in vitro*消化性試験結果から、三糖以上のコージオリゴ糖を経口摂取した場合、小腸ではほとんど消化吸収されず大腸に到達するものと推察された。ソバ α -グルコシダーゼ⁶²⁾やCGTase⁶³⁾もまた α -1,2グルコシル転移を触媒することが知られているが、KPaseのような高い特異性は有していない。

4. おわりに

3種類のトレハロース関連酵素、トレハラーゼ、TSase、TPaseはトレハロースというキーワードで結ばれているものの、それぞれ加水分解物酵素、分子内糖転移酵素、加リン酸分解酵素と全く異なる糖質関連酵素である。しかしながら、一連の流れの中でお互いが重要なツールとなりきわめて円滑に研究を進めることができた。また、TSaseやTPaseが少なからず加水分解物活性を有すること、TPaseがグルコース6位誘導体である二糖を受容体として糖転移

を触媒することなどから、酵素の曖昧さを実感した。これらの事実は、研究に際し固定観念をもたないことがいかに重要であるかを示唆している。本研究を通じて得られた教訓とトレハロース、セラギノース、Gal-Gといった非還元性糖質に対する興味が、その後の一連の環状四糖(環状ニゲロシルニゲロース、*cyclo*-(1 \rightarrow 6)- α -D-Glcp-(1 \rightarrow 3)- α -D-Glcp-(1 \rightarrow 6)- α -D-Glcp-(1 \rightarrow 3)- α -D-Glcp-(1 \rightarrow)^{64,65)}、環状マルトシルマルトース、*cyclo*-(1 \rightarrow 6)- α -D-Glcp-(1 \rightarrow 4)- α -D-Glcp-(1 \rightarrow 6)- α -D-Glcp-(1 \rightarrow 4)- α -D-Glcp-(1 \rightarrow)⁶⁶⁾の発見に繋がったように思える。環状ニゲロシルニゲロースの開発に際しても、その生成に関与する6- α -グルコシルトランスフェラーゼの酵素活性測定に前述のMPaseが適用できた。また、KPaseを用い分岐環状ニゲロシルニゲロースが合成できた⁶⁷⁾。このように、研究における「よい流れ」は現在も続いている。よい流れとオリジナルの酵素、糖質をさほどの制限なく使用できる環境という利点を生かし、さらなる新規酵素、有用オリゴ糖の開発に挑戦したい。

最後に、本研究は株式会社林原生物化学研究所天瀬研究所においてなされたもので、本研究に関し終始一貫してご指導・ご鞭撻いただきました辻阪好夫博士、株式会社林原常務取締役栗本雅司博士、株式会社林原生物化学研究所取締役福田恵温博士に深く感謝申し上げます。熱測定に際してご指導、ご助言をいただきました大阪府立大学高橋克忠前教授、ならびに深田はるみ助教授に感謝申し上げます。また、株式会社林原生物化学研究所天瀬研究所所長茶園博士をはじめとする同研究所の所員の皆様、共同研究者の皆様にお礼申し上げます。

文 献

- 1) K. Horikoshi and Y. Ikeda: Trehalase in Conidia of *Aspergillus oryzae*. *J. Bacteriol.*, **91**, 1883-1887 (1966).
- 2) A.R. Prasad and R. Maheshwari: Purification and properties of trehalase from the thermophilic fungus *Humicola lanuginosa*. *Biochim. Biophys. Acta*, **525**, 162-170 (1978).
- 3) P. Vijayakumar, W. Ross and E.T. Reese: Alpha, alpha-trehalase of *Trichoderma reesei*. *Can. J. Microbiol.*, **24**, 1280-1283 (1978).
- 4) P.J. Kelly and B.J. Catley: A purification of trehalase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Anal. Biochem.*, **72**, 353-358 (1976).
- 5) A.E. Hey and A.D. Elbein: Partial purification and properties of a trehalase from *Streptomyces hygroscopicus*. *J. Bacteriol.*, **96**, 105-110 (1968).
- 6) H. Nakano, M. Moriwaki, T. Washino, T. Kino, H. Yoshizumi and S. Kitahata: Purification and some properties of a trehalase from a green alga, *Lobosphaera* sp. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **58**, 1430-1434 (1994).
- 7) B.G. Talbot, J.G. Muir and R.E. Huber: Properties of a free and a solubilized form of bound alpha, alpha-trehalase purified from honey bee thorax. *Can. J. Biochem.*, **53**, 1106-1117 (1975).
- 8) M. Nakano, Y. Sumi and M. Miyakawa: Purification and properties from rat intestinal mucosal cells. *J. Biochem.*, **81**, 1041-1049 (1977).
- 9) T. Nakada, S. Ikegami, T. Nishimoto, H. Chaen, T. Sugimoto and M. Kurimoto: Purification and characterization of trehalase

- from *Bacillus* sp. T 3. *J. Appl. Glycosci.*, **42**, 231-236 (1995).
- 10) H. Nakano, M. Moriwaki, T. Washino and S. Kitahata: Formation of trehalose and its 2-deoxy analogs through condensation by a trehalase from *Lobosphaera* sp. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **58**, 1435-1438 (1994).
 - 11) 大谷 勝, 臼井直規: 発酵法によるトレハロース生産とその利用. 月間フードケミカル, **2**, 91-95 (1994).
 - 12) H. Kizawa, J. Miyazaki, A. Yokota, Y. Kanegae, K. Miyagawa and Y. Sugiyama: Trehalose production by a strain of *Micrococcus varians*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **59**, 1522-1527 (1995).
 - 13) S. Murao, H. Nagano, S. Ogura and T. Nishino: Enzymatic synthesis of trehalose from maltose. *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 2113-2118 (1985).
 - 14) M. Yoshida, N. Nakamura and K. Horikoshi: Production of trehalose from starch by maltose phosphorylase and trehalose phosphorylase from a strain of *Plesiomonas*. *J. Appl. Glycosci.*, **42**, 19-25 (1995).
 - 15) 呉羽化学工業株(株), 高橋栄作, 加瀬利哉, 幸内 裕: トレハロースの製造方法, 特開平7-327691, 1995年12月19日.
 - 16) T. Nakada, K. Maruta, T. Tsusaki, M. Kubota, H. Chaen, T. Sugimoto, M. Kurimoto and Y. Tsujisaka: Purification and properties of a novel enzyme, maltooligosyl trehalose synthase, from *Arthrobacter* sp. Q 36. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **59**, 2210-2214 (1995).
 - 17) T. Nakada, S. Ikegami, H. Chaen, M. Kubota, S. Fukuda, T. Sugimoto, M. Kurimoto and Y. Tsujisaka: Purification and characterization of thermostable maltooligosyl trehalose synthase from the thermoacidophilic archaeobacterium *Sulfolobus acidocaldarius*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **60**, 263-266 (1996).
 - 18) T. Nakada, K. Maruta, H. Mitsuzumi, M. Kubota, H. Chaen, T. Sugimoto, M. Kurimoto and Y. Tsujisaka: Purification and characterization of a novel enzyme, maltooligosyl trehalose trehalohydrolase, from *Arthrobacter* sp. Q 36. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **59**, 2215-2218 (1995).
 - 19) T. Nakada, S. Ikegami, H. Chaen, M. Kubota, S. Fukuda, T. Sugimoto, M. Kurimoto and Y. Tsujisaka: Purification and characterization of thermostable maltooligosyl trehalose trehalohydrolase from the thermoacidophilic archaeobacterium *Sulfolobus acidocaldarius*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **60**, 267-270 (1996).
 - 20) 津崎桂二, 久保田倫夫: トレハロース生成に関与する新規な酵素. 蛋白質 核酸 酵素, **42**, 834-841 (1997).
 - 21) 久保田倫夫: 新たに見出されたトレハロース生成に関与する酵素系. 化学と生物, **36**, 79-80 (1998).
 - 22) 田淵彰彦, 万代隆彦, 渋谷 孝, 福田恵温, 杉本利行, 栗本雅司: 新規酵素による澱粉からのトレハロース生成. 応用糖質科学, **42**, 401-406 (1995).
 - 23) 茶園博人: 新規酵素法によるトレハロースの生産とその利用. 応用糖質科学, **44**, 115-120 (1997).
 - 24) 杉本利行, 久保田倫夫, 仲田哲也, 津崎桂二: 新規酵素による澱粉からのトレハロース製造. 農化, **72**, 915-922 (1998).
 - 25) 久保田倫夫: トレハロース. 「工業用糖質酵素ハンドブック」, 岡田茂孝・北畑寿美雄監修, 講談社, 東京, pp. 173-189 (1999).
 - 26) T. Nishimoto, M. Nakano, S. Ikegami, H. Chaen, S. Fukuda, T. Sugimoto, M. Kurimoto and Y. Tsujisaka: Existence of a novel enzyme converting maltose into trehalose. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **59**, 2189-2190 (1995).
 - 27) T. Nishimoto, M. Nakano, T. Nakada, H. Chaen, S. Fukuda, T. Sugimoto, M. Kurimoto and Y. Tsujisaka: Purification and properties of a novel enzyme, trehalose synthase, from *Pimelobactre* sp. R 48. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **60**, 640-644 (1996).
 - 28) T. Nishimoto, T. Nakada, H. Chaen, S. Fukuda, T. Sugimoto, M. Kurimoto and Y. Tsujisaka: Purification and characterization of a thermostable trehalose synthase from *Thermus aquaticus*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **60**, 835-839 (1996).
 - 29) T. Nishimoto, T. Nakada, H. Chaen, S. Fukuda, T. Sugimoto, M. Kurimoto and Y. Tsujisaka: Action of a thermostable trehalose synthase from *Thermus aquaticus* on sucrose. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **61**, 898-899 (1997).
 - 30) Y. Nagai, T. Sugitani and K. Tsuyuki: Characterization of α -glucosyltransferase from *Pseudomonas mesoacidophila* MX-45. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **58**, 1789-1793 (1994).
 - 31) Y. Nagai-Miyata, K. Tsuyuki, T. Sugitani, T. Ebashi and Y. Nakajima: Isolation and characterization of a trehalulose-producing strain of a *Agrobacterium*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **57**, 2049-2053 (1993).
 - 32) 西本友之, 仲田哲也, 茶園博人, 福田恵温, 栗本雅司, 辻阪好夫, 深田はるみ, 高橋克忠: トレハロース生成酵素によるマルトース-トレハロース変換反応の熱力学的解析. 応用糖質科学, **43**, 461 (1996) (1996年度大会要旨集).
 - 33) 西本友之: マルトースをトレハロースに変換する新規酵素に関する研究 (博士論文) (1998).
 - 34) K. Tsusaki, T. Nishimoto, T. Nakada, M. Kubota, H. Chaen, T. Sugimoto and M. Kurimoto: Cloning and sequencing of trehalose synthase gene from *Pimelobacter* sp. R 48. *Biochim. Biophys. Acta*, **1290**, 1-3 (1996).
 - 35) K. Tsusaki, T. Nishimoto, T. Nakada, M. Kubota, H. Chaen, T. Sugimoto and M. Kurimoto: Cloning and sequencing of trehalose synthase gene from *Thermus aquaticus* ATCC 33923. *Biochim. Biophys. Acta*, **1334**, 28-32 (1997).
 - 36) K. Maruta, K. Hattori, T. Nakada, M. Kubota, T. Sugimoto and M. Kurimoto: Cloning and sequencing of trehalose biosynthesis genes from *Arthrobacter* sp. Q 36. *Biochim. Biophys. Acta*, **1289**, 10-13 (1996).
 - 37) K. Maruta, H. Mitsuzumi, T. Nakada, M. Kubota, H. Chaen, T. Sugimoto and M. Kurimoto: Cloning and sequencing of a cluster of genes encoding novel enzymes of trehalose biosynthesis from thermophilic archaeobacterium *Sulfolobus acidocaldarius*. *Biochim. Biophys. Acta*, **1291**, 177-181 (1996).
 - 38) S.H. Hong and J. Marmur: Primary structure of the maltase gene of the MAL 6 locus of *Saccharomyces carlsbergensis*. *Gene*, **41**, 75-84 (1986).
 - 39) H. Toda, K. Kondo and K. Narita: The complete amino acid sequence of Taka-amylase A. *Proc. Jpn. Acad.*, **58 B**, 208-212 (1982).
 - 40) S. Sakai, M. Kubota, K. Yamamoto, T. Nakada, K. Torigoe, O. Ando and T. Sugimoto: Cloning of cyclodextrin glucanotransferase genes from *B. stesrothermophilus* and *B. macerans*. *J. Jpn. Soc. Starch Sci.*, **34**, 140-147 (1987) (in Japanese).
 - 41) A. Amemura, R. Chakraborty, M. Fujita, T. Noumi and M. Futai: Cloning and nucleotide sequence of the isoamylase gene from *Pseudomonas amyloclavata* SB-15. *J. Biol. Chem.*, **263**, 9271-9275 (1988).
 - 42) H. Takata, T. Takaha, T. Kuriki, S. Okada, M. Takagi and T. Imanaka: Properties and active center of the thermostable branching enzyme from *Bacillus stesrothermophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**, 3096-3104 (1994).
 - 43) I. Kaasen, J. McDougall and A.R. Strøm: Analysis of the otsBA operon for osmoregulatory trehalose synthesis in *Escherichia coli* and homology of the OtsA and OtsB proteins to the yeast trehalose-6-phosphate synthase/phosphatase complex. *Gene*, **145**, 9-15 (1994).
 - 44) J. McDougall, I. Kaasen and A. R. Strøm: A yeast gene for trehalose-6-phosphate synthase and its complementation of an *Escherichia coli* OtsA mutant. *FEMS Microbiol. Lett.*, **107**, 25-30 (1993).
 - 45) F. Makihara, M. Tsuzuki, K. Sato, S. Masuda, K.V. Nagashima, M. Abo and A. Okubo: Role of trehalose synthesis pathways in salt tolerance mechanism of *Rhodobacter sphaeroides* f. sp. *denitrificans* IL 106. *Arch. Microbiol.*, **29**, 1-10 (2005).
 - 46) H. Chaen, T. Nishimoto, T. Yamamoto, T. Nakada, S. Fukuda, T. Sugimoto, M. Kurimoto and Y. Tsujisaka: Formation of a nonreducing trisaccharide, selaginose, from trehalose by a Cell-free System of *Thermoanaerobium Brockii*. *J. Appl. Glycosci.*, **46**, 129-134 (1999).
 - 47) H. Chaen, T. Yamamoto, T. Nishimoto, T. Nakada, S. Fukuda, T. Sugimoto, M. Kurimoto and Y. Tsujisaka: Purification and characterization of a novel phosphorylase, kojibiose phosphorylase, from *Thermoanaerobium Brockii*. *J. Appl. Glycosci.*, **46**, 423-429 (1999).
 - 48) H. Chaen, T. Nakada, T. Nishimoto, N. Kuroda, S. Fukuda, T. Sugimoto, M. Kurimoto and Y. Tsujisaka: Purification and

- characterization of thermostable trehalose phosphorylase from *Thermoanaerobium brockii*. *J. Appl. Glycosci.*, **46**, 399–405 (1999).
- 49) L.R. Marechal and E. Belocopitow: Metabolism of trehalose in *Euglena gracilis*. *J. Biol. Chem.*, **247**, 3223–3228 (1972).
- 50) H. Kizawa, K. Miyagawa and Y. Sugiyama: Purification and characterization of trehalose phosphorylase from *Micrococcus varians*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **59**, 1908–1912 (1995).
- 51) M. Yoshida, N. Nakamura and K. Horikoshi: Production and application of maltose phosphorylase and trehalose phosphorylase by a strain of *Plesiomonas*. *J. Appl. Glycosci.*, **42**, 19–25 (1995).
- 52) K. Aisaka, T. Masuda, T. Chikamune and K. Kamitori: Purification and characterization of trehalose phosphorylase from *Catellatospora ferruginea*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **62**, 782–787 (1998).
- 53) Y. Inoue, K. Ishii, T. Tomota, T. Yatake and F. Fukui: Characterization of trehalose phosphorylase from *Bacillus stearothermophilus* SK-1 and nucleotide sequence of the corresponding gene. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **66**, 1835–1843 (2002).
- 54) H. Chaen, T. Nakada, N. Mukai, T. Nishimoto, S. Fukuda, T. Sugimoto, M. Kurimoto and Y. Tsujisaka: Efficient enzymatic synthesis of disaccharide, α -D-galactosyl α -D-glucoside, by trehalose phosphorylase from *Thermoanaerobium brockii*. *J. Appl. Glycosci.*, **48**, 135–137 (2001).
- 55) C.K. Lee: Synthesis of α -D-glucopyranosyl α -D-Galactopyranoside. *Carbohydr. Res.*, **50**, 152–157 (1976).
- 56) R.W. Bassily, R.I. El-Sokkary, B.A. Silwanis, A.S. Nematalla and M.A. Nashed: An improved synthesis of 4-azido-4-deoxy- and 4-amino-4-deoxy- α , α -trehalose and their epimers. *Carbohydr. Res.*, **239**, 197–203 (1993).
- 57) 西本友之, 久保田倫夫, 福田恵温: 結晶 α -D-グルコシル α -D-ガラクトシドとこれを含有する糖質及びこれらの製造方法並びに用途. 特開 2004-269488.
- 58) H. Dohi, Y. Nishida, Y. Furuta, H. Uzawa, S. Yokoyama, S. Ito, H. Mori and K. Kobayashi: Molecular design and biological potential of galacto-type trehalose as a nonnatural ligand of shiga toxins. *Org. Lett.*, **4**, 355–357 (2002).
- 59) 西本友之, 久保田倫夫, 福田恵温, 三宅俊雄: グルコシル基の転移方法. 特開 2005-210925.
- 60) H. Chaen, T. Nishimoto, T. Nakada, S. Fukuda, M. Kurimoto and Y. Tsujisaka: Enzymatic synthesis of kojiligosaccharides using kojibiose phosphorylase. *J. Biosci. Bioeng.*, **92**, 177–182 (2001).
- 61) H. Chaen, T. Nishimoto, T. Nakada, S. Fukuda, M. Kurimoto and Y. Tsujisaka: Enzyme synthesis of novel oligosaccharides from L-sorbose, maltose and sucrose using kojibiose phosphorylase. *J. Biosci. Bioeng.*, **92**, 173–176 (2001).
- 62) K. Nishi, S. Chiba and T. Shimomura: Enzymatic synthesis of a branched trisaccharide, 2,4-di- α -glucosyl-glucose. *Agric. Biol. Chem.*, **39**, 727–728 (1975).
- 63) S. Chiba, S. Okada, S. Kitahata and T. Shimomura: A new trisaccharide, 2- α -maltosyl-glucose, synthesized by the transglycosylation reaction of cyclodextrin glycosyltransferase. *Agric. Biol. Chem.*, **39**, 2353–2357 (1975).
- 64) T. Nishimoto, H. Aga, K. Mukai, T. Hashimoto, H. Watanabe, M. Kubota, S. Fukuda, M. Kurimoto and Y. Tsujisaka: Purification and characterization of glucosyltransferase and glucanotransferase involved in the production of cyclic tetrasaccharide in *Bacillus globisporus* C 11. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **66**, 1806–1818 (2002).
- 65) T. Nishimoto, H. Aga, M. Kubota, S. Fukuda, M. Kurimoto and Y. Tsujisaka: Production of cyclic tetrasaccharide with 6- α -glucosyltransferase and α -isomaltosyltransferase. *J. Appl. Glycosci.*, **51**, 135–140 (2004).
- 66) K. Mukai, H. Watanabe, K. Oku, T. Nishimoto, M. Kubota, H. Chaen, S. Fukuda and M. Kurimoto: An enzymatically produced novel cyclic tetrasaccharide, *cyclo* $\{1\rightarrow 6\}$ - α -D-Glcp-(1 \rightarrow 4)- α -D-Glcp-(1 \rightarrow 6)- α -D-Glcp-(1 \rightarrow 4)- α -D-Glcp-(1 \rightarrow 6)-maltose, from starch. *Carbohydr. Res.*, **340**, 1469–1474 (2005).
- 67) H. Watanabe, T. Higashiyama, H. Aga, T. Nishimoto, M. Kubota, S. Fukuda, M. Kurimoto and Y. Tsujisaka: Enzymatic synthesis of a 2-O- α -D-glucopyranosyl cyclic tetrasaccharide by kojibiose phosphorylase. *Carbohydr. Res.*, **340**, 449–454 (2005).