

*Bacillus macerans*에서 정제한 α -cyclodextrin glucanotransferase의 구조와 칼슘이온이 기능에 미치는 영향 : X-ray 연구

† 최 희 욱 · ¹홍 순 강

† 전북대학교 자연과학대학 과학기술학부 화학과, ¹초당대학교 공과대학 환경공학과
(접수 : 2004. 3. 31., 게재승인 : 2004. 4. 25.)

Structure and Ca^{2+} -ion effects on the Function of α -cyclodextrin Glucanotransferase from *B. macerans* : An X-ray study

Hui-Woog Choet* and Soon Kang Hong¹

† Department of chemistry, College of Natural Science, Chonbuk National University, Chonju 561-756, Korea

¹Department of environmental engineering, College of Technology Chodang University, Muan 534-701, Korea

(Received : 2004. 3. 31., Accepted : 2004. 4. 25.)

The X-ray structure of the cyclodextrin-glucanotransferase of *Bacillus macerans* was solved by molecular replacement at 2.0 Å resolution. The refined structure has a crystallographic R-factor of 16.6% ($R_{free} = 20.5\%$). A new metal binding site occupied by two Ca^{2+} -ions was found at an accession channel of the active site. There is a large accumulation of negative charges that bind these Ca^{2+} -ions, thereby connecting segment $\beta 13$ - αG (residue 254-276) to the main body of domain A (at αH , residue 283-297). The segment $\beta 13$ - αG contains the catalytic residue Glu258 between subsite 1 and -1 and Tyr260 (subsite 2) which is located at the entrance of the active site. The Ca^{2+} -site 3a,b may have a major role for the activity and specificity of this CGTase, although it is not even conserved for the α -subclass of CGTases.

Key Words : X-ray, CGTase, crystal, molecular replacement, Ca^{2+} -ion

서 론

Cyclodextrin glucanotransferase (EC 2.4.1. 19, CGTase)는 전분이나 이와 관련된 α -1,4-glucan으로부터 분자내 당전이 반응을 통하여 고리형의 당인 cyclodextrin (CD)을 생성하는 반응을 촉매하는 효소이다. 사이클로덱스트린 (CD)은 6,7, 혹은 8개의 glucose unit (G6, G7, G8)로 구성된 고리형의 올리고 saccharide이며 고리를 이루고 있는 글루코스의 수에 따라 각각 α -, β -, and γ -CD라 칭해진다(1-4). 효소 CGTase는 고리화의 반응을 촉매할 뿐만 아니라 커플링 (coupling) 반응과 분자간 당전이 반응을 통해 불균등화 (disproportionation)의 반응과 당을 가수 분해하는 반응을 촉매하기도 하는 것으로 보고 되어져 있다(5). 촉매 작용에 의해 생성되는 사이클로덱스트린이 산업적으로 이용 가치가 높아 이 효소에 대한 연구

가 기초과학에서 뿐만 아니라 산업 공학에서도 활발하게 진행되고 있다.

지금까지 알려진 CGTase의 구조(6-15)는 A에서 E까지의 다섯 개의 domain으로 구성되어져 있다(Fig. 1a, b).

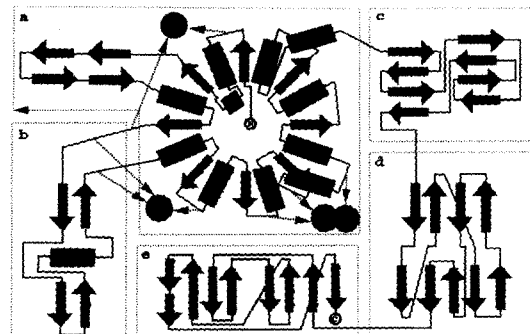


Figure 1a. A 2-dimensional representation of the secondary structure elements of CGTase from *Bacillus macerans*. Helices are represented by squares (red color) and β -sheet strands by bolts (blue color) and calcium ion by circles (green color) The residue numbers at the domain borders are indicated.

† Corresponding Author : Department of chemistry, College of Natural Science, Chonbuk National University, 561-756 Chonju, Korea

Tel : +82-063-270-3418, Fax : +82-063-270-3408

E-mail : hwchoe@chonbuk.ac.kr

Domain A가 TIM-barrel을 형성하고 있고 domain B는 가장 넓게 펼쳐져 domain A에 끼워져 있으며, domain C에서 E는 순차적으로 domain A를 감싸는 구조를 가지고 있다. *Bacillus circulans* 251 CGTase의 경우에 domain E가 전분과 결합하는 도메인으로 알려져 있고, 실제로 maltose 2 분자가 결합하고 있으며 제3의 maltose 분자는 domain C에 결합되어 있다(8).

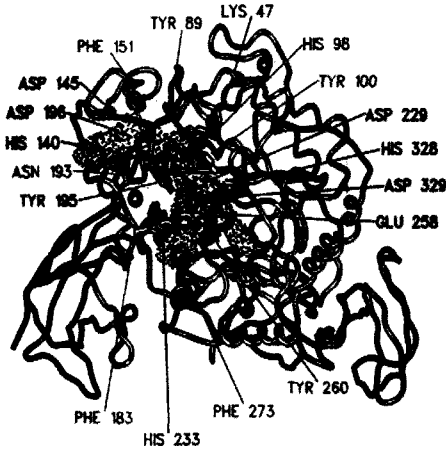


Figure 1b. CGTase backbone with important residues. Substrate binding cavity depicted by green mask (Brown balls: Ca(1) top, Ca(2) left, Ca(3a,b) right bottom).

기질의 비정상적인 구조 (α -glycosidic bond)와 반응에서의 구조의 유지를 위해 공유 결합의 중간체를 사용하는 2중 치환 반응 기작 (2개의 연속적인 Walden 전환)이 제안되었고, glycosylase와 transferase 부류에서는 이런 반응 기작이 입증되어 있다(8). 효소학적으로 유사한 α -amylase는 CGTase의 domain A에서 C와 구조적으로 동질성을 가지고 있고, 반응 기작도 CGTase의 반응 기작과 유사하다(16-18). *Bacillus circulans* strain 251 CGTase의 경우에 촉매 부위에는 Asp229, Glu257 그리고 Asp328이 domain A에 위치해 있고, Glu257이 양성자 주개(10, 11), 그리고 Asp229가 염기 또는 친 핵성으로 작용하고, Asp328은 기질에 결합하는 데 관여하는 것으로 알려져 있다. 활성 부위 (domain A) 내에 기질의 결합을 위하여 고리형의 기질인 6개 혹은 7개의 부차적인 활성 자리와 선형의 기질에 대한 부차적 결합 자리가 제안되어 있다(12, 13). Domain A에 sugar 결합부위는 당 전이의 "받개"인 2 분자의 sugar 결합 부수 자리들 (1과2)과 "주개"와 결합하는 7개의 부수적인 자리 (-1에서 7)를 포함하고 있다는 점이 특징이다.

CGTase들 사이에 매우 높게 보존되어 있는 활성 부위의 4개의 방향족 잔기는 α -amylase들에서는 발견되지 않는다. Alkalophilic *Bacillus* sp 1011에서 발견되는 CGTase는 Phe183과 Phe259가 당 전이의 "받개"와 협력적으로 결합한다. 이들은 amylose의 비 환원성 말단이 활성 부위의 중앙에 결합할 때 고리화에 하는 데 중요한 역할을 한다. Phe283은 전이 상태에서의 안정화에 관련하고 있다. Tyr195는 고리화 반응에 필요한 것으로 알려져 있다. 이것은 고리화를 위한

template에 사용된다고 제외되어져 있다(15).

활성 부위 내에 4개의 histidine 잔기 (His98, His140, His233, His 327)들이 *Bacillus circulans* CGTase의 고리화 반응에 매우 중요한 역할을 하는 것으로 입증되어 있다(20, 21). 전반적으로 domain A의 활성 부위 안에 효소 CGTase들의 기질 또는 아날로그와의 상호 작용은 여러 유기체들에서 정제하여 밝힌 구조에서 잘 설명되어져 있다. 특히, β -CGTase에 관해서는 더욱 잘 규명되어져 있다. 본 연구에서는 α -, β -, γ -CGTase 사이에 특이성의 차이들을 구조적인 면에서 보찰하고자 하였다.

재료 및 방법

효소의 정제, 활성도 측정 및 결정화

CGTase는 *B. macerans* 균주 IFO3490에서 분리 정제하였고 활성도 측정과 생성물 (CD)분배의 분석은 Stavn & Gramm(22)과 Lejeune 등(23)의 방법을 사용하였다.

정제된 CGTase를 centricon (Amicon)을 이용하여 20 mg/ml의 농도로 농축하고, 0.2 M NaCl과 5 mM CaCl₂을 포함하는 0.1 M PIPES 완충 용액 (pH 7.0)에 22%(w/v)의 PEG 6,000과 1 : 1의 비율로 혼합하여 sitting drop vapor diffusion 법에 의해 상온에서 결정화하였다.

Ca²⁺-이온의 제거

얻어진 α -CGTase 결정을 CaCl₂ 대신에 EGTA가 함유된 결정화 완충용액에 단계별로 배어들게 하였고, EGTA의 농도는 1-5 mM을 3-5일에 걸쳐 단계별로 증가시켜가며 배어들게 하였다. 전체의 배어드는 시간이 3일을 초과하지 않은 EGTA의 최종 농도가 2 mM인 조건에서 회절하는 결정을 얻을 수 있었다.

X-ray 자료 수집

유리관에 넣은 결정을 45 kV, 65 mA (200 micron)로 작동된 FR 571 (Enraf-Nonius) rotating anode generator에 의해 발생한 Cu-K α radiation과 graphite monochromator를 사용하여 Mar-Research image plate scanner로 수집하였다. 수집한 자료는 MOSFLM(18)과 CCP4 suite의 SCALA/TRUNCATE를 써서 값을 구하였다.

분자 대체 모델 조립과 구조의 세밀화

Bacillus macerans CGTase의 구조 계산을 위해 처음 사용한 모델은 *Bacillus circulans*의 CGTase 구조였다. 회전뿐만 아니라 축을 따라 병렬의 움직임으로 3.7 Å에서 AMORE를 써서 R = 45.1%, corr=0.54의 유일한 해답을 찾게 되었다. 격자 내에 찾아진 모델의 위치는 rigid body refinement (R = 43.1, corr. = 0.63)에 의하여 더욱 개선되었다. 모델의 조립과 실제 공간의 짜맞춤은 program O와 정밀화는 XPLOR를 사용하여 수행하였다. Simulation과 그 다음의 위치와 하나 하나의 온도 요인의 세밀화 작업도 수행하였다. 물이 없는 최종 모델을 low-Ca²⁺ 구조의 최초 모델로써 사용하였고, 전에 언급한 바와 같이 세밀화 작업을 수행하였다. 부수적으로 Ca²⁺-이온의 점유 정도가 정밀하게 계산되었다. Ca²⁺-이온이

있는 CGTase 와 Ca²⁺-이온이 없는 CGTase의 구조의 비교는 program, LSQMAN과 MOLEMAN을 이용하여 수행하였다. Ca²⁺-이온이 있는 구조와 EGTA를 이용하여 Ca²⁺-이온을 빼낸 구조 사이 차이의 의미는 좌표에서 0.4 Å의 이동을 보일 때를 차이가 나는 것으로 간주하였다. 위치의 세밀화에 의한 좌표의 반복성은 모든 원자에 대해 0.05 Å 이하의 RMS 차이로 주어진다. 단백질의 mask와 기질의 상은 program, MAMA와 NSCMASK을 써서 계산하였다.

결과 및 고찰

*Bacillus macerans*에서 분리 정제한 α-CGTase 결정 (0.3 × 0.3 × 0.4 mm)은 orthorhombic space group인 P2₁2₁2₁이고 a=66.79 Å, b=79.66 Å, c=141.16 Å이며 2.0 Å의 분해능을 보였다. 3차원의 구조를 규명하는 데 필요한 결정학적 자료는 Table 1에 나타낸 바와 같다.

Table 1. Crystallographic data

	CGT	CGT+EGTA
Cell (P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁ 1 molecule/a.u.)		
a [Å]	66.79	66.65
b [Å]	79.66	80.10
c [Å]	141.16	141.07
Data		
NO. of observations	209344	95322
NO. of unique reflections	38315	20422
Resolution (last shell)[Å]	2.0(2.03)	2.7(2.76)
Completeness(last shell) [%]	88.7(83.1)	95.6(100)
R _{merge} [†] (last shell)[%]	4.8(6.3)	9.2(15.6)
Model		
No. of protein atoms	5229	5229
No of Ca ²⁺ ions	4	2
No. of water molecules	358	107
R _{free} [‡] [%]	20.5	22.9
R _{cryst} [%]	16.6	16.2
R.m.s deviations from ideality		
bond distances [Å]	0.011	0.006
bond angles [°]	1.599	1.311
dihedral angles [°]	25.96	25.59
ΔB bonded(average B) [Å ²]	2.2(13.1)	4.5(21.7)
Occupancy[B (Å ²)]		
Ca(1)	1.01(6.5)	1.06(29.9)
Ca(2)	0.89(4.9)	0.95(41.7)
Ca(3a)	0.94(7.9)	0.0
Ca(3b)	0.94(10.3)	0.0
Ramachandran geometry		
Most favoured [%]	90.1	89.6
Additionally allowed [%]	9.6	10.1
Generously allowed [%]	0.3	0.3

[†] R_{merge} = 100% * Σ |I_i - <I>| / Σ |<I>| |<I>| = average Intensity

[‡] R_{free} = 100% * Σ | |F_o - |F_c || / Σ | |F_o |

5% of the reflections were used for R_{free} calculation

여러 CGTase의 아미노산 서열을 비교해 보면, 몇몇 개의 CGTase에서 한두 개의 아미노산이 삽입되어 있거나 빠져 있는 것들이 발견된다. β-CGTase와 α-CGTase사이에 구조상의 유일한 차이점은 β-CGTase가 보존성이 높은 disulfide 결합 (잔기 15-53, Ca²⁺-위치 1)을 지니고 있는 반면에 *B. macerans* α-CGTase에서는 이런 구조 성분이 결여되어 있다는 점이다. 이런 점을 제외하고는 α-CGTase와 β-CGTase의 구조에서 특별하게 구분되는 차이점을 찾아볼 수 없으나, 단 하나의 흥미로운 예외를 볼 수 있었다. 다시 말해서 *B. macerans* α-CGTase의 구조에는 분자 대체 모델을 사용하여 계산하는 동안 새로운 Ca²⁺-site 3이 보여지는데, 정밀화의 계산 후에는 이는 2개의 Ca²⁺-이온이 서로 아주 가까이 인접해서 결합되어 있다는 점이다(Fig. 2).

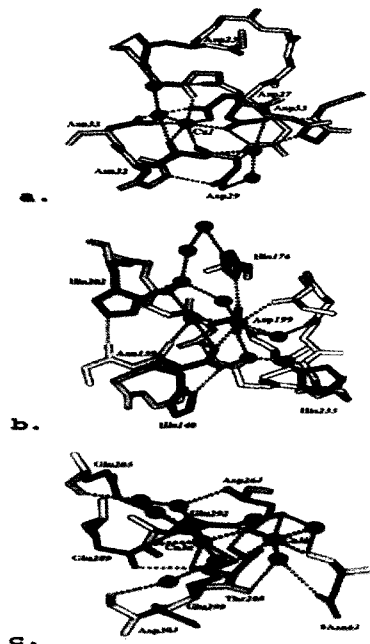


Figure 2. Co-ordination in Ca-binding sites (H- and Ca-bonds dotted, to water green, to Ca magenta, others gray a(top). Ca(1) with important acidic residues(red) b(middle). Ca(2) with four histidine residues(blue) c(bottom). Ca(3a,b) with highly negatively charges residues).

모든 β-CGTase의 구조에서 아주 잘 보존되어 있는 Ca²⁺-결합 자리는 오직 하나의 Ca²⁺-이온을 차지하고 있으나, *B. macerans* α-CGTase에서 새로 발견된 Ca²⁺-결합 자리는 두 Ca²⁺-이온이 서로 4 Å의 간격을 두고 떨어져 있다는 것이 구조의 정밀화 계산에 의해 찾아졌다. Ca²⁺-이온쌍이 3개의 산성을 띄는 아미노산 잔기와 결합하고 있는 양상을 보인다. Glu292는 2개의 Ca²⁺-이온과 대칭으로 결합되어 있고 Glu292와 Asp264는 비대칭으로 칼슘 이온에 결합하고 있는 양상을 보인다. 비대칭으로 결합하고 있는 후자의 경우엔 같은 산소에 의해 두 칼슘이온이 결합되어져 있고 두개의 산소가 하나의 Ca²⁺-이온에 결합하고 있는 양상을 보인다.

안 쪽에 있는 Ca²⁺-3a는 추가적으로 Glu289와 결합되어 있고 Ca²⁺-3b는 대칭에 관련된 #Asn62와 결합을 형성하고 있다. 안 쪽의 Ca²⁺은 단백질 표면에 들어 있는 두 개의 물 분

자가 추가적으로 결합하여 7개의 배위자를 가진다. 물 두 분자의 첫 번째 (w31)는 또 다른 물 분자 (w32)와 결합하고 Asp299의 카아보닐 산소에 결합되어 있다. 두 번째 물 분자 (w41)의 리간드는 Glu289-Oε에 결합되어 있다. 이것은 Asp264-N과 Glu292의 곁 사슬에 인접해 있는 물 (w17)과 물 (w15) 그리고 Glu285에 결합된 물 (w16)에 결합된 4 분자의 밀집된 물의 한 부분이다. 바깥 쪽의 Ca²⁺-이온 (3b)은 2 분자의 물 (w18, w19)의 결합 뿐만 아니라 Thr298-O와 #Asn62-Nδ 그리고 #Asn62-N과 Asp264-Nδ에 추가적으로 결합된 수소결합을 형성할 수 있는 위치를 유지함으로써 리간드를 완성시키고 있다. 흥미로운 사실은 이 칼슘 이온 주위에 음의 하전을 띤 아미노산 잔기들이 밀집되어 있다는 점이다(Table 2).

Table 2. Ca-coordination(bond length)

Ca(1)	dist.(Å)	Ca(2)	dist.(Å)
D27-Oδ1	2.43	N139-Nδ2	2.51
D29-O	2.49	I190-O	2.51
N32-Nδ2	2.37	D199-Oδ1	2.61
N32-Oδ1	2.26	D199-Oδ2	2.50
G51-O	2.45	H232-O	2.36
D53-Oδ2	2.42	w5-O	2.41
W2-O	2.37	w7-O	2.46
		w8-O	2.36

Ca(3a)	dist.(Å)	Ca(3b)	dist.(Å)
D264-Oδ1	2.40	D264-Oδ1	2.68
E289-Oε2	2.51	D264-Oδ2	2.40
E292-Oε1	2.45	E292-Oε2	2.44
E299-Oε1	2.58	E299-Oε2	2.47
E299-Oε2	2.62	w31-O	2.44
w41-O	2.19	w32-O	2.35
w42-O	3.02	#N62-O	3.24

그로 인하여 연결 부분 β13-αG 가 CGTase의 구조의 중심인 domain A (αH, 잔기 283-297)와 연결되어 있다. β13-αG 부분은 활성 부위의 입구에 위치한 subsite 1과 -1 그리고 Tyr260 (subsites) 사이의 촉매 부위의 잔기 Glu258을 포함하고 있다. 비록 α-CGTase 부류에서도 잘 보존되어 있지는 않지만 *Bacillus macerans* CGTase에서 찾아진 Ca²⁺-위치 3a,b가 α-CGTase 활성도와 α-CD를 주로 생성시키는 특이성에 주된 역할을 하지 않나 하고 추측한다.

이런 유추를 지지해 주는 실험 결과는 Ca²⁺-이온의 농도를 변화시켜 가며 싸이클로덱스트린의 생성을 실험과 결과 칼슘이 CD 전체의 수율과 특이성에 영향을 미치는 것을 볼 수 있었다(Table 3).

Table 3. Activity and Specificity as a function of Metallation+

Metallation Condition	α-CD	β-CD	γ-CD	%	Total activity %
10 mM EGTA	100	0	0		1.9
2 mM EGTA dialyzed	53	34	13		98.1
5 mM Ca †	46	39	15		99.6
10 mM Ca	45	43	12		100.0
20 mM C	44	42	14		106.8
	45	41	14		103.

+ 30min reaction at 40°C

† purification condition, Reaction time 30 min. at 40°C

요약

2 Å의 분해능을 가진 *Bacillus macerans*에서 분리 정제한 cyclodextrin glucanotransferase의 결정 구조를 X-ray를 이용하여 분자 대치법을 사용하여 밝혔다. 정확한 구조는 16.6% (R_{free} = 20.5%)의 결정학적 R-factor를 가지고 있다. 두개의 Ca²⁺-이온이 점유된 새로운 금속 결합자리는 활성 자리의 도달 채널에서 발견되었다. Ca²⁺-이온에 결합하는 음의 하전을 띤 아미노산 잔기들이 많이 밀집되어 있고 이 때, domain A (αH에서 아미노산 잔기 283-297)의 중심부에 연결 부분은 β 13-αG 이었다. β13-αG 부분은 활성 자리의 입구에 위치한 subsite 1에서 -1 과 Tyr260 (subsites) 사이에 있는 촉매 부위 Glu258을 포함하고 있다. 비록 α-CGTase 부류에서 잘 보존되어 있지는 않으나, 새로운 Ca²⁺-자리 3a,b가 이 α-CGTase의 활성도와 생성물의 특이성에 중요한 역할을 하리라 추측된다.

감사

본 연구는 2003년도 한국 학술 진흥 재단 사업 지방대학 육성 지원과제 (과제번호 KRF-2003-002-C00122)의 지원으로 수행하였으며 학술 진흥 재단의 지원에 감사드립니다.

Abbreviations

- CD, cGx : Cyclodextrin
 CGTase : Cyclodextrin glucanotransferase
 EGTA : Ethylene glycol-O,O'-bis-[2-amino-ethyl]-N,N,N',N',-tetraacetic acid
 PIPES : Piperazine-N,N'-bis-[2-ethane sulfonic acid] TIM : Triose isomerase
 G6 : maltohexaose
 G7 : maltoheptaose
 G8 : maltooctaose

REFERENCES

- Saenger, W. (1980), Cyclodextrin inclusion compounds in research and industry, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **19**, 344-362.
- Depinto, J. A. and L. L. Campbell (1968), Purification and properties of the cyclodextrinase of *Bacillus macerans*, *Biochemistry* **7**, 114-120.
- Kobayashi, S., K. Kainuma, and S. Suzuki, (1978), Purification and some properties of *Bacillus macerans* cyclodextrinase (cyclodextrin) glucanotransferase, *Carbohydr. Res.* **61**, 229-238.
- Bender, H. (1977), Cyclodextrin glucanotransferase from *Klebsiella pneumoniae*. 1. Formation, purification and properties of the enzyme from *Klebsiella pneumoniae* M 5 al, *Arch. Microbiol.* **111**, 271-282.
- Bender, H. (1990), Studies of the mechanism of the cyclisation reaction catalysed by the wildtype and a truncated alpha-cyclodextrin glycosyltransferase from *Klebsiella pneumoniae* strain M 5 al, and the beta-cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* strain 8. *Carbohydr. Res.* **206**, 257-267.
- Uitendhaag, J. C. M., R. Mosi, K. H. Kalk, B. A. van der Veen, L. Dijkhuizen, S. G. Withers, and B. W. Dijkstra (1999), X-ray structures along the reaction pathway of cyclodextrin

- glycosyltransferase elucidate catalysis in the alpha-amylase family, *Nature Struct. Biol.* **6**, 432-436.
7. Matsuura, Y., M. Kusunoki, W. Harada, and M. Kakudo, (1984), Structure and possible catalytic residues of Taka-amylase, *A. J. Biochem.* (Tokyo) **95**, 697-702.
 8. Knegtel, R. M., R. D. Wind, H. J. Rozeboom, R. M. Buitelaar, L. Dijkhuizen, and B. W. Dijkstra, (1996), Crystal structure at 2.3 Å resolution and revised nucleotide sequence of the thermostable cyclodextrin glycosyltransferase from *Thermotoga maritima* strain EM1, *J. Mol. Biol.* **256**, 611-622.
 9. Klein, C. and G. E. Schulz, (1991), Structure of cyclodextrin glycosyltransferase refined at 2.0 Å resolution, *J. Mol. Biol.* **217**, 737-750.
 10. Lawson, C. L., R. van Montfort, B. Strokopytov, H. J. Rozeboom, K. H. Kalk, G. E. de Vries, D. Penninga, L. Dijkhuizen, B. W. Dijkstra (1994), Nucleotide sequence and X-ray structure of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* strain 251 in a maltose-dependent crystal form, *J. Mol. Biol.* **236**, 590-600.
 11. Hofmann, B. E., H. Bender, and G. E. Schulz, (1989), Three-dimensional structure of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* at 3.4 Å resolution, *J. Mol. Biol.* **209**, 793-800.
 12. Knegtel, R. M., B. Strokopytov, D. Penninga, O. G. Faber, H. J. Rozeboom, K. H. Kalk, L. Dijkhuizen, and B. W. Dijkstra, (1995), Crystallographic studies of the interaction of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* strain 251 with natural substrates and products. *J. Biol. Chem.* **270**, 29256-29264.
 - 13a. Strokopytov, B., D. Penninga, H. J. Rozeboom, K. H. Kalk, L. Dijkhuizen, and B. W. Dijkstra (1995), X-ray structure of cyclodextrin glycosyltransferase complexed with acarbose. Implications for the catalytic mechanism of glycosidases, *Biochem.* **34**, 2234-2240.
 - 13b. Mosi, R., S. He., J. Uitdehaag, B. W. Dijkstra, and S. G. Withers (1997), Trapping and characterization of the reaction intermediate in cyclodextrin glycosyltransferase by use of activated substrates and a mutant enzyme, *Biochem.* **36**, 9927-9934.
 14. Schmidt, A. K., S. Cottaz, H. Driguez, and G. E. Schulz (1998), Structure of cyclodextrin glycosyltransferase complexed with a derivative of its main product beta-cyclodextrin, *Biochem.* **37**, 5909-5915.
 15. Strokopytov, B., R. M. Knegtel, D. Penninga, H. J. Rozeboom, K. H. Kalk, L. Dijkhuizen, and B. W. Dijkstra, (1996), Structure of cyclodextrin glycosyltransferase complexed with a maltonaose inhibitor at 2.6 Å resolution. Implications for product specificity, *Biochem.* **35**, 4241-4249.
 16. Klein, C., J. Hollender, H. Bender, and G. E. Schulz (1992), Catalytic center of cyclodextrin glycosyltransferase derived from X-ray structure analysis combined with site-directed mutagenesis, *Biochem.* **31**, 8740-8746.
 - 17a. Nakamura, A., K. Haga, S. Ogawa, K. Kuwano, K. Kimura, and K. Yamane (1992), Functional relationships between cyclodextrin glucanotransferase from an alkalophilic *Bacillus* and alpha-amylases. Site-directed mutagenesis of the conserved two Asp and one Glu residues, *FEBS Lett.* **296**, 37-40.
 - 17b. Buisson, G., E. Duée, R. Haser, and F. Payan, (1987), Three dimensional structure of porcine pancreatic alpha-amylase at 2.9 Å resolution. Role of calcium in structure and activity, *EMBO J.* **6**, 3909-3916.
 18. Holm, L., A. K. Koivula, P. M. Lehtovaara, A. Hemminki, and J. K. Knowles (1990), Random mutagenesis used to probe the structure and function of *Bacillus stearothermophilus* alpha-amylase, *Protein Eng.* **3**, 181-191.
 19. Takase, K., T. Matsumoto, H. Mizuno and K. Yamane (1992), Site-directed mutagenesis of active site residues in *Bacillus subtilis* alpha-amylase, *Biochim. Biophys. Acta* **1120**, 281-288.
 20. Nakamura, A., Haga, K., and Yamane, K. (1994), Four aromatic residues in the active center of cyclodextrin glucanotransferase from alkalophilic *Bacillus* sp. 1011: effects of replacements on substrate binding and cyclization characteristics, *Biochem.* **33**, 9929-9936.
 21. Mattsson, P., N. Battchikova, K. Sippola, and T. Korpela, (1995), The role of histidine residues in the catalytic act of cyclomaltodextrin glucanotransferase from *Bacillus circulans* var. *alkalophilus*, *Biochem. Biophys. Acta.* **1247**, 97-103.
 22. Stavn, A., and P. E. Granum, (1979), Purification and physicochemical properties of an extra-cellular cycloamylose (cyclodextrin) glucanotransferase from *Bacillus macerans*, *Carbohydr. Res.* **75**, 243-250.
 23. Lejeune, A., K. Sakaguchi and T. Imanaka (1989), A spectrophotometric assay for the cyclization activity of cyclomaltohexaose (alpha-cyclodextrin) glucanotransferase, *Anal. Biochem.* **181**, 6-11.