白ネズミ小腸粘膜の二糖類水解酵素によるグルコシルスクロースならびにマルトシルスクロースの水解様式

山田和彦*, 合田敏尚*
細谷憲政*, 森内幸子**

* 東京大学医学部保健学科保健栄養学教室

** 日本女子大学家政学部食物学科

Hydrolysis of Glucosyl-Sucrose and Maltosyl-Sucrose by Rat Intestinal Disaccharidases

Kazuhiko YAMADA,* Toshinao GODA,* Norimasa HOSOYA,*
Sachiko MORIUCHI**

* *Department of Nutrition, School of Health Sciences, Faculty of Medicine, University of Tokyo, Bunkyo-ku, Tokyo*

** *Department of Food and Nutrition, School of Home-Economics, Japan Women's University, Bunkyo-ku, Tokyo*

The mode of hydrolysis of glucosyl-sucrose (G_2F) and maltosyl-sucrose (G_3F) was studied with brush border membranes and purified sucrase-isomaltase complex from rat intestinal mucosa. Hydrolytic products of ^{14}C labeled G_2F and G_3F were separated by paper chromatography.

The time course of the chromatographic profiles showed that both G_2F and G_3F were initially hydrolyzed from the glucose of non-reducing end by glucoamylase from brush border membranes and maltase activity of purified sucrase-isomaltase complex, and then the produced G-F was finally hydrolyzed to glucose and fructose by sucrase from brush border membranes and purified sucrase-isomaltase complex.

(Received September 20, 1980)

小腸粘膜の微絨毛膜には、種々の二糖類水解酵素などの膜消化酵素が局在し、食物の最終段階の消化ならびに吸収に関与している¹⁾。食物中に含まれるでん粉などの多糖類は、だ液、すい液中の α -アミラーゼの作用によって水解され、最終的にはマルトオリゴ糖として、蔗糖などの二糖類とともに、小腸粘膜において膜消化を受けるとされている。一方、蔗糖にでん粉の加水分解物を結合させたグルコシルスクロース (G_2F)、マルトシルスクロース (G_3F) などの人工甘味料が開発されており、抗う蝕性の甘味料として、う蝕抑制の立場から注目されている²⁾。

これまで、著者らは G_2F ならびに G_3F は天然に存在する二糖類と同様に、小腸粘膜微絨毛膜の膜消化酵素によって水解されることを明らかにした³⁾。さらに、その際的水解の様式を検討し、ブドウ糖側から水解されるも

のと推察した⁴⁾。しかしながら、果糖側あるいは中間のグルコシド結合が水解される可能性については明らかでなかった。そこで、 ^{14}C でラベルした G_2F ならびに G_3F を用いて、微絨毛膜ならびに精製したスクラーゼ・イソマルターゼ複合体 (S-I 複合体) による G_2F 、 G_3F の水解過程を経時的に観察した。

実験方法

1. 小腸粘膜微絨毛膜ならびにスクラーゼ・イソマルターゼ複合体の精製

体重約 280 g の成熟雄白ネズミを 18 時間の絶食の後、断頭、屠殺し、ただちに小腸を取り出し、粘膜を剝離した。この小腸粘膜から塩化カルシウムを用いる Kessler らの方法に従って微絨毛膜を調製した⁵⁾ (微絨毛膜標品)。さらに、パパインによって微絨毛膜から膜消化酵素を可溶化し、得られた上清からセファデックス G-200 カラムクロマトグラフィー、DEAE セファデッ

* 〒113 東京都文京区本郷 7-3-1

** 〒112 東京都文京区目白台 2-8-1

Table 1. Hydrolyzing activities of brush border membrane and purified sucrase-isomaltase complex of adult rat small intestine against glucosyl-sucrose (G_2F), maltosyl-sucrose (G_3F), starch and disaccharides.

	$G_2F^a)$	$G_3F^a)$	Sucrose ^{b)}	Isomaltose ^{b)}	Maltose ^{b)}	Starch ^{a)}
Brush border membrane	129	102	45	27	217	113
Sucrase-Isomaltase complex	231	447	887	416	1439	70

^{a)} μ moles-glucose-released/mg protein/hr.

^{b)} μ moles-substrate-hydrolyzed/mg protein/hr.

クス A-25 カラムクロマトグラフィーを用いて、スクラーゼ・イソマルターゼ複合体を分離、精製した⁶⁾ (S-I 複合体標品)。

2. ペーパークロマトグラフィーを用いる G_2F , G_3F の水解過程の観察

G_2F あるいは G_3F に対する水解能を、微絨毛膜標品と S-I 複合体とで一致させるために、いずれかを適宜、水で希釈したものを酵素液として用いた。それぞれの酵素液に対し、 ^{14}C によって還元末端から果糖とブドウ糖をラベルした $G_2F(G-G^*-F^*)$ あるいは $G_3F(G-G-G^*-F^*)$ を含む 6 mM の基質を 37°C で反応させた。10 分ごとに反応液から一部採取し、100°C、2 分間の処理で反応を止め、反応産物をペーパークロマトグラフィーによって分離した。ペーパークロマトグラフィーは、 n -ブタノール：ピリジン：水 = 6 : 4 : 3 の溶媒を用い、上昇法により、東洋濾紙 No. 51 A で 24 cm まで展開した。標準液として、同時に果糖、蔗糖、 G_2F , G_3F の混液を展開させておき、フロログルシンを用いる方法⁷⁾ によりケトヘキソースを検出してそれぞれの位置を確認した後、ろ紙を 0.5 cm ずつ切り、その放射能をトルエン系のシンチレーターを用いて測定した。マルトース、グルコースの位置については、文献⁸⁾ による R_f 値を参考にした。

3. G_2F ならびに G_3F の水解能の測定

微絨毛膜標品ならびに S-I 複合体標品による G_2F , G_3F の水解能は、グルコースオキシダーゼを用いる Dahlqvist の方法⁹⁾ に従って測定した。 G_2F ならびに G_3F は、0.1 M マレイン酸緩衝液 (pH 6.0) に溶解して基質液とした。水解能は、たん白質 1 mg が 1 時間に遊離するブドウ糖量 μ mole で示した。たん白質量は、Lowry らの方法¹⁰⁾ によって測定した。

4. 試 薬

G_2F ならびに G_3F は、林原生物化学研究所のご厚意により供与していただいた。 ^{14}C でラベルした G_2F ならびに G_3F (いずれも 0.513 mCi/mmole) は、大阪市立工業研究所より供与いただいたものを用いた。グルコースタット試薬は藤沢薬品 K.K. より購入した。

実験結果ならびに考察

1. 小腸粘膜微絨毛膜ならびに精製スクラーゼ・イソマルターゼ複合体による G_2F , G_3F の水解能

G_2F , G_3F は、微絨毛膜において、おもにグルコミラーゼによって水解されるが、S-I 複合体によっても水解される可能性のあることを先に報告した⁴⁾。そこで、 G_2F , G_3F の水解過程の観察に用いた微絨毛膜標品ならびに精製 S-I 複合体標品の、オリゴ糖に対する水解能を観察した (Table 1)。微絨毛膜標品では、マルターゼ活性、グルコミラーゼ活性にほぼ匹敵する程度に、 G_2F , G_3F を水解することが示された。この水解能は、スクラーゼ活性よりも高いものである。一方、精製 S-I 複合体標品の場合にも、マルターゼ活性、スクラーゼ活性には及ばないものの、 G_2F , G_3F に対するかなりの水解能が観察された。このように、 G_2F , G_3F に対する水解能は、微絨毛膜にも S-I 複合体にも存在することが示されたが、その際の水解様式を微絨毛膜と S-I 複合体とで比較するため、酵素反応液中の水解能を微絨毛膜標品と S-I 複合体標品とで一致させて、 G_2F , G_3F の水解様式を検討した。

2. 二糖類水解酵素による G_2F , G_3F の水解様式

G_2F が微絨毛膜ならびに精製 S-I 複合体によって水解される過程を Fig. 1 に示した。微絨毛膜では、 G_2F から蔗糖 (GF) へのピークの移行が認められるのに対し、果糖 (F) の明らかなピークは出現しなかった。精製 S-I 複合体においても同様に、 $G_2F \rightarrow GF$ の変化がまず見られた。さらに時間的に遅れて、ブドウ糖 (G) と果糖 (F) のピークが出現した。それゆえ、 G_2F は、微絨毛膜によっても S-I 複合体によっても、ブドウ糖側からブドウ糖を一つずつ遊離させる様式で水解されるとみなされる。 G_2F から GF への移行の速度と、GF のピークが現われた後のピークの変化のしかたには、微絨毛膜と S-I 複合体とで差が認められるが、これは、微絨毛膜ではグルコミラーゼによるマルターゼ活性が、S-I 複合体ではスクラーゼによるスクラーゼ活性がそれぞれ優位にはたっているためと推察される。

Fig. 1. Time study of hydrolysis of glucosyl-sucrose (G_2F) by brush border membranes (a) and purified sucrase-isomaltase complex (b) of rat intestine.

6 mM of G_2F containing ^{14}C -labeled G_2F (0.513 mCi/mmmole) was incubated with either brush border membranes (a) or purified S-I complex (b). An aliquot taken from the incubation mixture every ten minutes was applied on a filter paper (Toyo, 51 A) and developed with n -butanol : pyridine : water = 6 : 4 : 3. ^{14}C Radioactivity of each 0.5 cm piece was determined by liquid scintillation counter. Authentic samples were developed at the same time and stained by phloroglucinol method. The points of maltose and glucose were marked for the reference according to reference 8. GGF; G_2F , GG; maltose, GF; sucrose, G; glucose, F; fructose.

このような水解様式は G_2F の水解過程にも認められた (Fig. 2)。微絨毛膜、S-I 複合体のいずれの場合も $G_2F \rightarrow G_2F \rightarrow GF \rightarrow G$, F のようにピークが移行している。 G_2F から直接に果糖あるいは蔗糖を遊離する反応が起こっていないことは、マルトース (GG) のピークが認められないことから推察される。また、 G_2F の水解過程に見られた微絨毛膜と S-I 複合体との間のピーク移行速度パターンの差は、 G_2F の水解過程の場合にも同様に認められた。

以上のように、 G_2F , G_3F は、小腸粘膜の二糖類水解酵素によってブドウ糖側からブドウ糖を一つずつ遊離す

る様式で水解されることが示された。小腸粘膜に存在するグルコアミラーゼは、マルトオリゴ糖を非還元末端からブドウ糖を一つずつ水解すると考えられており、マルトオリゴ糖の還元末端に果糖の結合した構造をもつ G_2F , G_3F の場合にも同様の様式で水解するものと推察される。また、S-I 複合体は、 α -限界デキストリンを非還元末端側から α -1, 4 グルコシド結合あるいは α -1, 6 グルコシド結合を一つずつ切断する様式で水解することが報告されている¹¹⁾。したがって、精製した S-I 複合体が G_2F , G_3F の非還元末端側のブドウ糖を水解する活性をもつことが推察され、著者らの得た結果と一致している。しかしながら、S-I 複合体による G_2F , G_3F の水

Fig. 2. Hydrolysis of maltosyl-sucrose (G_2F) by brush border membranes (a) and purified sucrase-isomaltase complex (b) of rat intestine.

Method and abbreviations were the same as described in Fig. 1. GGGF; G_3F .

解能がグルコミラーゼによる水解能よりも低いことから、実際の小腸粘膜微絨毛膜においては G_2F , G_3F はおもにグルコミラーゼによってまず非還元末端側からブドウ糖が水解され、蔗糖になった後は、S-I 複合体のスクラーゼによって、非還元末端側からブドウ糖を認識することにより、最終的な水解が行なわれるものと推察される。これらの水解様式は、天然のオリゴ糖を水解する場合と同様なものであると考えられる。

要 約

成熟雄白ネズミ小腸粘膜から調製した微絨毛膜標品ならびに精製したスクラーゼ・イソマルターゼ複合体を用いて、 ^{14}C でラベルしたグルコシルスクロース (G_2F) ならびにマルトシルスクロース (G_3F) の水解様式を、経時的に観察した。

その結果、 G_2F , G_3F は、微絨毛膜標品によっても精製スクラーゼ・イソマルターゼ複合体によっても同様に、非還元末端であるブドウ糖側からブドウ糖を一つづ

つ遊離する様式で水解されることが示された。この水解様式は、天然のオリゴ糖の場合と同様であると考えられる。

文 献

- 1) Crane, R.K.: Handbook of Physiology (Code, C.F., Heidel, W., ed.), Section 6, Alimentary Canal, Vol. 5, p. 2535 (1968), American Physiological Society (Washington)
- 2) 池田 正, 平沢正知, 落合邦康, 土居優子, 岡田英子: 歯科基礎医学誌, 19, 373 (1977)
- 3) 山田和彦, 佐々木光美, 森内幸子, 細谷憲政: 栄養と食糧, 31, 267 (1978)
- 4) 水野清子, 山田和彦, 細谷憲政, 森内幸子: 栄養と食糧, 33, 193 (1980)
- 5) Kessler, M., Acuto, O., Storelli, C., Murer, H., Müller, M. and Semenza, G.: *Biochim. Biophys. Acta*, 506, 136 (1978)
- 6) 佐々木光美, 山田和彦, 森内幸子, 細谷憲政: 栄養と食糧, 32, 201 (1979)
- 7) 日本化学会編: 実験化学講座, 23, 386 (1957), 丸善 (東京)
- 8) 友田正司: 生物化学実験法Ⅱ, 糖質化学実験法,

- 蛋白質・核酸・酵素, 別冊, p. 27 (1968), 共立出版(東京)
- 9) Dahlqvist, A. : *Anal. Biochem.*, 7, 18 (1964)
- 10) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. : *J. Biol. Chem.*, 193, 265 (1951)
- 11) Gray, G.M., Lally, B.C. and Conklin, K.A. *J. Biol. Chem.*, 254, 6038 (1979)
- (昭和55年9月20日受理)