白ネズミ小腸粘膜の二糖類水解酵素に対する α -グルコシダーゼ阻害剤 BAY g 5421 の阻害機構

合 田 敏 尚*, 山 田 和 彦*
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

Effects of α -Glucosidase Inhibitor BAY g 5421 on Rat Intestinal Disaccharidases

Toshinao GODA,* Kazuhiko YAMADA,* 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*

Effects of α -glucosidase inhibitor BAY g 5421 on the disaccharidases were studied with rat intestinal brush border membranes and purified sucrase-isomaltase complex (S-I complex).

Among the disaccharidases in brush border membranes, glucoamylase was the most sensitive, whereas isomaltase was the most insensitive to BAY g 5421. In an inhibitor concentration of 10 μ M, the inhibition of glucoamylase was 92.3%, that of sucrase, maltase, and isomaltase was 82.3%, 70.9% and 7.2%, respectively. Kinetic studies revealed that BAY g 5421 inhibited sucrase, isomaltase, and glucoamylase competitively.

Inhibitory effects of BAY g 5421 on the purified S-I complex were similar to those on disaccharidases of brush border membranes.

(Received September 20, 1980)

小腸粘膜微絨毛膜には、種々の膜消化酵素が局在しており、食物の消化の最終段階と吸収の初発段階に関与している¹⁾。二糖類を水解する膜消化酵素として、スクラーゼ、イソマルターゼ、グルコアミラーゼ、ラクターゼ、トレハラーゼなどがあり、そのなかで、スクラーゼとイソマルターゼとは複合体を形成して存在することが知られている²⁾。近年、これらの二糖類水解酵素のなかでも、 α -グルコシダーゼを特異的に阻害する酵素阻害剤 BAY g 5421 (Acarbose, *M.W.*=645) が開発され、糖尿病、肥満などの治療剤としての可能性が注目されている^{3,4)} (Fig. 1)。

Caspary らは、小腸粘膜の二糖類水解酵素に対する BAY g 5421 の阻害機構を、白ネズミ、ヒトにおいて観

察し、BAY g 5421 が、二糖類水解酵素のなかでも α -グルコシダーゼを特異的に阻害すること、さらに、スクラーゼに対する阻害形式は拮抗型であることを報告している^{5,6)}。

しかしながら、スクラーゼ以外の α -グルコシダーゼ活性、すなわち、イソマルターゼ活性、マルターゼ活性、グルコアミラーゼ活性に対する阻害形式は明らかではない。また、スクラーゼ・イソマルターゼ複合体 (S-I 複合体) を膜から単離した場合にも、同様の阻害作用が観察されるかどうかは明らかでない。

そこで、白ネズミ小腸粘膜から微絨毛膜ならびに S-I 複合体を単離、精製し、BAY g 5421 による、スクラーゼ活性、イソマルターゼ活性、マルターゼ活性、グルコアミラーゼ活性に対する阻害形式を観察した。

* 〒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

Fig. 1. Structural features of BAY g 5421, the complex oligosaccharide with potent inhibitory action on intestinal α -glucosidases.

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

Wistar 系成熟雄白ネズミの小腸から、粘膜を剥離し、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精製した⁷⁾。また、S-I 複合体は、微絨毛膜からパパインによって可溶化された画分を、セファデックス G-200 カラムクロマトグラフィー、DEAE セファデックス A-25 カラムクロマトグラフィーを用いて、単離、

精製した⁸⁾。

2. 酵素活性ならびにたん白質量の測定

二糖類水解酵素活性の測定は、グルコースオキシダーゼ法を用いる Dahlqvist の方法⁹⁾に従った。基質ならびに BAY g 5421 は、0.1 M マレイン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.0) に溶解して用いた。

阻害曲線を観察する場合には、酵素反応液中の基質濃度は、マルトース、スクロースは 28 mM、イソマルトースは 2.8 mM、水溶性デンプンは 10 mg/ml となるようにした。さらに、酵素反応液中の BAY g 5421 濃度を、 1.0×10^{-6} M から 2.0×10^{-4} M まで変化させて、BAY g 5421 の濃度による阻害度の変化を観察した。水溶性デンプンに関してのみ、さらに BAY g 5421 の低濃度 (2.0×10^{-9} M まで) での効果も観察した。

酵素反応速度定数 (V_{max} , K_m) ならびに BAY g 5421 存在下における解離定数 (K_i) を観察する場合には、酵素活性の 50% 阻害度をあたえる程度の BAY g 5421 の濃度を、各酵素活性につき 2 点ずつ取り、BAY g 5421 を含まないものとの三つの系において Lineweaver-Burk plot を行ない、 V_{max} , K_m , K_i を計算により求めた。用いた基質濃度、BAY g 5421 の濃度は、酵素反応液中の濃度で、スクロース 9.3 mM ~ 112 mM (BAY g 5421 : 0, 2.0×10^{-6} M, 4.0×10^{-6} M), マルトース 0.71 mM ~ 28 mM (BAY g 5421 : 0, 2.0×10^{-6} M, 4.0×10^{-6} M), イソマルトース 0.56 mM ~ 28 mM (BAY g 5421 : 0, 1.0×10^{-4} M, 2.0×10^{-4} M), 水溶性デンプン

Fig. 2. Inhibitory effect of BAY g 5421 on the disaccharidases activities of brush border membranes and the purified sucrase-isomaltase complex from rat intestinal mucosa.

The ordinate shows the remained activity as the percent of original activity.

—○—, —△—, —□—, —×—; sucrase, isomaltase, maltase, glucoamylase activity of brush border membranes, respectively.

...●..., ...▲..., ...■..., sucrase, isomaltase, maltase activity of purified sucrase-isomaltase complex, respectively.

1.0 mg/ml~20 mg/ml (BAY g 5421: 0, 2.0×10^{-7} M, 1.0×10^{-6} M) であった。

たん白質量の測定は、ウシ血清アルブミンを標準とし、Lowry らの方法¹⁰⁾に従って行なった。酵素活性値は、たん白質 1 mg が 1 時間に水解する基質量 μmole の単位を用いて表わした。ただし、グルコミラーゼ活性は、たん白質 1 mg が 1 時間に遊離するグルコース μmole の単位を用いて表わした。

3. 試 薬

グルコスタット試薬は藤沢薬品 K.K. より、マルトースは和光純薬より、スクロースは国産化学より購入した。水溶性デンプンは Merck 社製品を用いた。イソマルトースは林原生物化学研究所より供与いただいたものを用いた。BAY g 5421 はバイエル薬品 K.K. より供

与いただいた。

実験結果ならびに考察

1. BAY g 5421 による二糖類水解酵素の阻害効果

成熟白ネズミ小腸粘膜から精製した微絨毛膜ならびに S-I 複合体を用いて、BAY g 5421 の阻害効果を、スクラーゼ活性、イソマルターゼ活性、マルターゼ活性、グルコミラーゼ活性について観察した。Fig. 2 に示すように、いずれの酵素活性も、BAY g 5421 の濃度が増大するに従い、阻害効果が増大した。また、スクラーゼ活性、イソマルターゼ活性に対する阻害効果は、微絨毛膜と S-I 複合体とで差が認められなかった。しかしながら、各酵素活性に対する阻害効果を比較すると、酵素によって著しい差異があることが示された。微絨毛膜についてみると、 $10 \mu\text{M}$ の BAY g 5421 の濃度における各

Fig. 3. Lineweaver-Burk plot of sucrase (a), isomaltase (b), and glucoamylase (c) activities of rat intestinal brush border membranes with or without BAY g 5421.

Ordinate ($1/V$) was expressed as ($\mu\text{moles-substrate-hydrolyzed/mg protein/hour}$)⁻¹ for (a) and (b) and ($\mu\text{moles-glucose-released/mg protein/hour}$)⁻¹ for (c), and abscissa ($1/S$) was expressed as (mM)⁻¹ for (a) and (b), and (mg/ml)⁻¹ for (c). 'I' denotes the concentration of BAY g 5421.

Fig. 4. Lineweaver-Burk plot of sucrase (a), isomaltase (b), and maltase (c) activities of purified sucrase-isomaltase complex from rat intestine with or without BAY g 5421.

Ordinate ($1/V$) was expressed as ($\mu\text{moles-substrate-hydrolyzed/mg protein/hour}$)⁻¹ and abscissa ($1/S$) was expressed as (mM)⁻¹. 'I' denotes the concentration of BAY g 5421.

Table 1. Kinetic constants of disaccharidases in brush border membranes and purified sucrase-isomaltase complex of rat small intestine.

	Substrate	$V_{\max}^a)$	$K_m^b)$	$K_i^c)$ for BAY g 5421
Disaccharidases in brush border membrane	Sucrose	84.0	16.3	6.6×10^{-4} (2.0)
	Isomaltose	51.7	2.41	5.1×10^{-2} (100)
	Maltose	235	1.72	—
	Soluble starch	148 ^{d)}	2.45 ^{d)}	2.9×10^{-5} (0.2)
Sucrase-isomaltase complex	Sucrose	1406	20.0	6.3×10^{-4} (2.0)
	Isomaltose	690	2.61	4.3×10^{-2} (100)
	Maltose	1224	3.23	6.4×10^{-4} (2.0)

a) μ moles-substrate-hydrolyzed/mg protein/hr.

b) mM

c) μ moles-glucose-released/mg protein/hr.d) μ g/ml() indicates the concentration of BAY g 5421, μ M.

酵素活性に対する阻害率は、グルコアミラーゼ活性 92.3%，スクラーゼ活性 82.3%，マルターゼ活性 70.9%，イソマルターゼ活性 7.2% となり、この程度の BAY g 5421 の濃度では、イソマルターゼに対する阻害効果は、グルコアミラーゼ、スクラーゼに対する阻害効果に比較し、著しく小さなものであった。Caspary らは同様に、白ネズミ小腸の微絨毛膜を用いて、 α -グルコシダーゼに対する BAY g 5421 の阻害効果を観察し、 6.2μ M の BAY g 5421 の濃度における阻害率が、グルコアミラーゼ活性 95%，スクラーゼ活性 73.4%，マルターゼ活性 63.4%，イソマルターゼ活性 <10% であったと報告している⁶⁾。BAY g 5421 の濃度の違いを考慮するならば、著者らの得た値とよく一致している。

2. BAY g 5421 による二糖類水解酵素の阻害形式

各二糖類水解酵素に対する BAY g 5421 の阻害効果が明らかとなったので、次に、50% 程度の阻害率を与える BAY g 5421 の濃度を、それぞれの酵素について 2 点ずつ定め、kinetics を行なって、BAY g 5421 による阻害形式を検討した。

微絨毛膜の各酵素活性について Lineweaver-Burk plot を行なったところ、スクラーゼ、イソマルターゼ、グルコアミラーゼ活性に対する BAY g 5421 の阻害形式は、すべて拮抗型のものであった (Fig. 3)。マルターゼ活性に対しては、BAY g 5421 を加えた場合に Lineweaver-Burk plot で直線性が得られず、阻害形式が明らかにならなかった。微絨毛膜におけるマルターゼ活性には、グルコアミラーゼ、S-I 複合体など複数の酵素が関与しており、BAY g 5421 による阻害効果がそれらの酵素間で異なるためと推察される。微絨毛膜標品においては、このように、複数の酵素による見かけ上の酵素活

性が示されているので、さらに、白ネズミ小腸粘膜から単離、精製した S-I 複合体について、スクラーゼ活性、イソマルターゼ活性、マルターゼ活性に対する BAY g 5421 の阻害形式を検討した (Fig. 4)。

微絨毛膜の場合と同様に、S-I 複合体の場合も、スクラーゼ活性、イソマルターゼ活性に対する拮抗型の阻害形式が観察された。マルターゼ活性についても Lineweaver-Burk plot で直線性が得られ、明らかな拮抗阻害を受けていた。このことから、S-I 複合体のスクラーゼ活性部位ならびにイソマルターゼ活性部位は、いずれも BAY g 5421 による拮抗阻害を受けるものと推察される。

これまで行なった Lineweaver-Burk plot により求めた各酵素活性に対する $V_{\max}$, K_m , K_i 値を Table 1 に示した。微絨毛膜から S-I 複合体を精製するに伴い、スクラーゼ活性、イソマルターゼ活性の $V_{\max}$ 値は、いずれも約 15 倍に増大したが、 K_m 値は変化しなかった。これは、S-I 複合体の精製によっても、酵素としての性状は変化しなかったことを表す。また、スクラーゼ活性、イソマルターゼ活性に対する K_i 値についても、微絨毛膜と S-I 複合体とは差が認められず、S-I 複合体は、膜に結合した状態でも膜から遊離した状態でも、同様の阻害を BAY g 5421 によって受けるものと考えられる。S-I 複合体において、BAY g 5421 による K_i 値は、スクラーゼに対して 6.3×10^{-7} M、イソマルターゼに対して 4.3×10^{-5} M であった。スクラーゼに対する K_i 値についてはいくつかの報告があり、ヒトで 1.3×10^{-6} M⁶⁾、ブタで 2.6×10^{-7} M³⁾ という数値が示されている。白ネズミについては、Caspary らはヒトの場合の 1/3 程度であったと報告しており⁶⁾、著者らの得た値と

同程度であると考えられる。

各種の二糖類水解酵素に対する BAY g 5421 の親和性を本来の基質と比較すると、イソマルターゼ 60 倍、スクラーゼ 30,000 倍となり、グルコアミラーゼにおいてはさらに著しい親和性の差異が認められた。

このように、BAY g 5421 は小腸粘膜に存在する α -グルコシダーゼを拮抗的に阻害するが、その阻害効果は S-I 複合体のスクラーゼとイソマルターゼとは著しく異なっていた。スクラーゼとイソマルターゼとは、ほぼ同じ分子量をもち、ともにマルターゼ活性をもつなど機能的にも形態的にも類似した点が多く知られる¹¹⁾ので、この阻害効果の差異は興味深い。これは、活性部位における α -1, 4 グルコシド結合と α -1, 6 グルコシド結合に対する特異性の差異によるものと推察される。

要 約

成熟雄白ネズミ小腸粘膜から微絨毛膜ならびにスクラーゼ・イソマルターゼ複合体を精製し、 α -グルコシダーゼ阻害剤である BAY g 5421 による、スクラーゼ活性、イソマルターゼ活性、マルターゼ活性、グルコアミラーゼ活性に対する阻害形式を観察した。

1) 微絨毛膜におけるそれぞれの酵素活性に対する阻害率は、 $10 \mu\text{M}$ の BAY g 5421 の存在下で、グルコアミラーゼ活性 92.3%、スクラーゼ活性 82.3%、マルターゼ活性 70.9%、イソマルターゼ活性 7.2% であり、スクラーゼ、イソマルターゼ、グルコアミラーゼ活性に対する阻害形式はいずれも拮抗型であった。

2) スクラーゼ・イソマルターゼ複合体の場合にも同様の阻害効果が観察され、スクラーゼ、イソマルターゼ、マルターゼ活性に対する阻害形式は同様に拮抗型であった。

3) K_i 値は、スクラーゼ・イソマルターゼ複合体において、スクラーゼに対して $6.3 \times 10^{-7} \text{ M}$ 、イソマルターゼに対して $4.3 \times 10^{-5} \text{ M}$ であった。グルコアミラーゼに対しては、微絨毛膜において $2.9 \times 10^{-6} \text{ M}$ であった。

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) Semenza, G.: The Enzymes of Biological Membrane, Vol. 3, p. 349 (1976), Plenum Press (New York)
- 3) Schmidt, D.D., Frommer, W., Junge, B., Müller, L., Wingender, W., Truscheit, E. and Schäfer, D.: *Naturwissenschaften*, 64, 535 (1977)
- 4) Puls, W., Keup, U., Kraus, H.P., Thomas, G. and Hoffmeister, F.: *Naturwissenschaften*, 64, 536 (1977)
- 5) Caspary, W.F., Graf, S. and Sido, B.: 84. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin, Wiesbaden (Abstract) (1978)
- 6) Caspary, W.F. and Graf, S.: *Res. Exp. Med. (Berl.)*, 175, 1 (1979)
- 7) Kessler, M., Acuto, O., Storelli, C., Murer, H., Müller, M. and Semenza, G.: *Biochim. Biophys. Acta*, 506, 136 (1978)
- 8) 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)
- 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) Semenza, G.: Pathophysiology of Carcinogenesis in Digestive Organs (Farber, E., ed.), p. 207 (1977), Univ. of Tokyo Press (Tokyo)/Univ. Park Press (Baltimore)

(昭和55年9月20日受理)