

ラット小腸粘膜のオリゴ糖分解酵素

— 特に α -1, 3-グリコシド結合の分解 —

曾根良昭¹⁾・佐藤知子¹⁾・矢埜みどり²⁾・賀来華江¹⁾・三崎 旭¹⁾

(¹⁾ 大阪市立大学生活科学*, ²⁾ 京都短大**)

Isolation and Characterization of Rat Intestinal 1, 3- α -D-Glucosaccharide Hydrolase

Yoshiaki SONE¹⁾, Tomoko SATO¹⁾, Midori YANO²⁾, Hanae KAKU¹⁾
and Akira MISAKI¹⁾

¹⁾ Faculty of Science of Living, Osaka City University
and ²⁾ Kyoto Junior College

A glucosidase having specificity towards α -(1 $\rightarrow$ 2)-, α -(1 $\rightarrow$ 3)-, and α -(1 $\rightarrow$ 4)-D-glucosidic linkages, was solubilized from the rat small intestinal mucosa by papain treatment. The glucosidase was purified in a highly homogeneous state by successive chromatographies on DEAE-Sephacel and Sephacryl S-400 columns. The molecular weight of purified enzyme was 300,000, as estimated by Sephacryl S-400 gel filtration, and its isoelectric point was found to be 4.5.

The purified enzyme hydrolyzed kojibiose, nigerose, *O*- α -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)-*O*- α -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-*O*- α -D-glucopyranose (elsinotriose), maltose, maltotriose and amylose at a relative hydrolysis rate of 26, 18, 65, 100, 98, and 4, respectively. However, α , α -trehalose, panose, sucrose, isomaltose, maltitol and *p*-nitro-

* 所在地：大阪市住吉区杉本 3-3-138 (〒558)

** 所在地：京都府福知山市字堀 3370 (〒620)

phenyl α -D-glucopyranoside were not hydrolyzed.

動物腸管での二糖やそれより重合度の大きいオリゴ糖類の消化吸収には小腸上皮刷子縁膜に存在する二糖及びオリゴ糖分解酵素が重要な役割を果たしている。これらオリゴ糖分解酵素として、刷子縁膜に存在する sucrase-isomaltase 複合体や maltase-glucoamylase, trehalase についての多くの酵素化学的研究のほかに、腸粘膜酵素の欠落や、機能の低下による、いわゆる brush border membrane disease の予知、治療の面からの研究もある。しかし、近年、ダイエタリーファイバーとして注目されている、いわゆる難消化性植物多糖に対する腸管粘膜酵素の働きや、その消化吸収に関する研究は少ない。そこで、我々は、マルトオリゴ糖、カキ glycogen の α -amylase 分解物、及び茶の寄生菌である *Elusinoe leucospila* の生産する、 α -1, 4-glucoside 結合した三糖または四糖が α -1, 3-glucoside 結合で連なった glucan である Elsinan¹⁾ から α -amylase 作用で得られたオリゴ糖(三糖)の、ラット小腸管による消化、吸収を反転腸膜法により検討したところ、ラット小腸粘膜中に α -1, 3-glucoside 結合を水解する活性を見いだした。この酵素活性画分の単離、精製を行ったのでここに報告する。

実 験 方 法

腸管粘膜は、生後8週齢の Wister 系の雄ラット(体重、約 180g、静岡実験動物より購入)より得た小腸を生理食塩水にて洗浄後、反転し、スライドガラスにてかきとり調製した。膜結合粗酵素画分は腸管粘膜をテフロンホモゲナイザーにてホモゲナイズし、遠心後残渣を papain にて 37°C、1時間反応させたものを、105,000 $\times g$ 、1時間、超遠心し、その上清をもちいた。

酵素活性の測定は、酵素液(0.1ml)、基質溶液(0.1m)及び0.8mlの 1.0M sodium malate buffer, pH 7.0 を用いて、基質より遊離する glucose を Dahlqvist の glucostat を用いる方法²⁾にて測定した。基質には maltose, sucrose, nigerose, maltotriose 及び elsinotriose (G1 $\rightarrow$ 3G1 $\rightarrow$ 4G, elsinan の α -amylase 分解物より調製した)を用いた。酵素 1 unit は 37°C にて 1 分間に 1 μ mole の基質に作用する酵素活性とした。

結 果 及 び 考 察

カキ glycogen の構造については本研究第 1³⁾、2 集⁴⁾において明らかにしたように、glycogen 粒子の中心近くは、分岐が多く、中層部では比較的長い α -1, 4-鎖を持つ構造である。これをブタすい臓の α -amylase により分解を行い、得られた α -1, 6-結合を含む分

岐の多い α -limit dextrin の消化, 吸収を反転腸膜法にて malto-oligo 糖と比較観察したところ, 直鎖の重合度 1-7 の malto-oligo 糖と同様, glucose として消化吸収される事が, 明らかとなった。また, *E. leucospila* 菌体外多糖である Elsinan のダイエタリーファイバー効果を検討したところ, 食餌性血清コレステロール降下作用をもつ⁵⁾ 一方, 此の多糖は図 1 に示すように唾液およびすい液の α -amylase で α -1, 3 結合を含む三糖 (エルシノトリオース) まで分解される事実から, この三糖 [O - α -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)- O - α -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- O - α -D-glucopyranose] のラット小腸での, 消化吸収を, 反転腸膜法にて検討した。その結果, 非環元末端側に α -1, 3 結合を持つにも拘らず膜酵素で分解された後, glucose として消化吸収されることを見いだした。さらにラット小腸粘膜より papain 処理により得られた膜結合粗酵素画分を elsinotriose に作用させたところ, まず α -1, 3-glucoside 結合が水解されて glucose と maltose が生じ, さらに maltose が

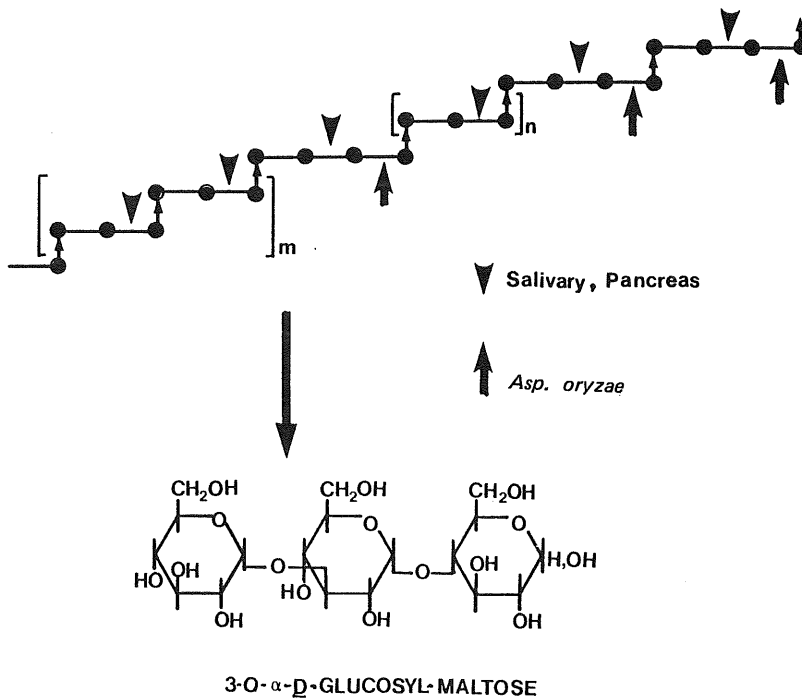


Fig. 1. Action pattern of human salivary, hog pancreas, and *Asp. oryzae* α -amylase on elsinan

● 3-O-substituted D-glucose,

● 4-O-substituted D-glucose

glucose まで分解されることが明らかになった。現在までラット小腸管での α -1,3-glucoside 結合の加水分解活性については報告が見あたらないので、我々は α -1,3-glucosidase の活性を指標として、その酵素の単離、精製を試みた。

図2にはラット小腸粘膜より papain 処理にて得た粗酵素画分を DEAE-Sephacel column にて column chromatography を行った結果を示すが、maltase 活性及び elsinotriose 水解活性（以下 maltase/nigerase 活性とする）蛋白は、pH 8.0 の buffer 中にて DEAE-Sephacel column に吸着し、NaCl 濃度、約 0.2 M にて溶出した。さらにこの maltase/nigerase 活性画分を図3に示すように Sephacryl S-400 column にてゲルろ過を行うことにより sucrase 活性と分離することができた。図4に示すように Sephacryl S-400 column chromatography により得られた酵素画分をさらに Sephacryl S-400 にてゲルろ過を行うと、maltase 活性と nigerase 活性とが同一の retention volume で溶出され、電気泳動的にほぼ均一な酵素が得られた。これまでの精製過程から、このラット小腸粘膜の maltase と nigerase (α -1,3-glucoside 結合水解活性) は一致するものと考えられる。表1にそれぞれの精製過程における、nigerose, maltose, isomaltose, sucrose に対する活性をまとめた。

この表から明らかなように、精製酵素には、isomaltase-sucrase 活性は含まれず、nigerase

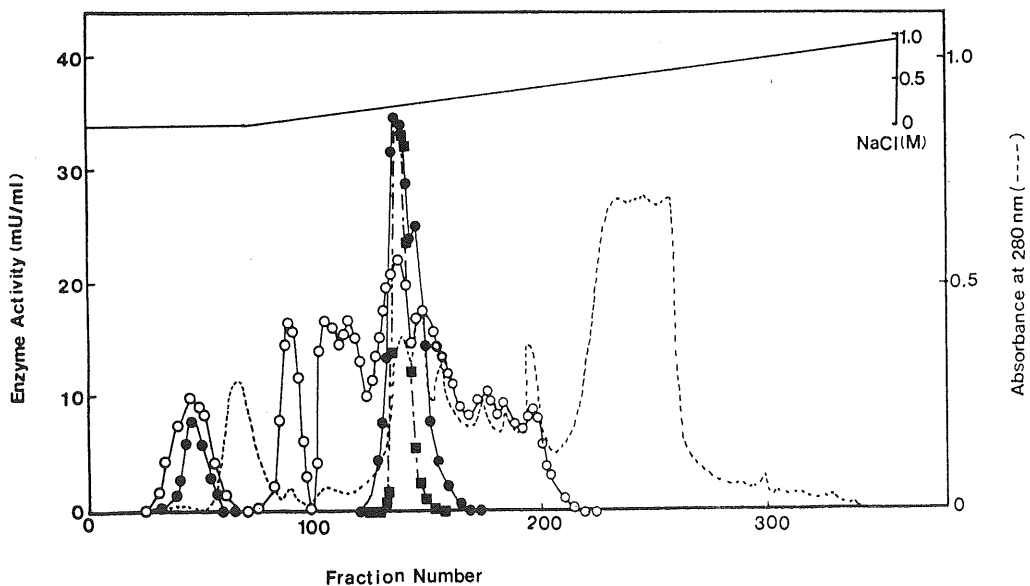


Fig. 2. DEAE-Sephacel column chromatography of the papain-solubilized enzyme fraction substrate; ●-● Maltose, ○-○ Sucrose, ■-■ Elsinotriose

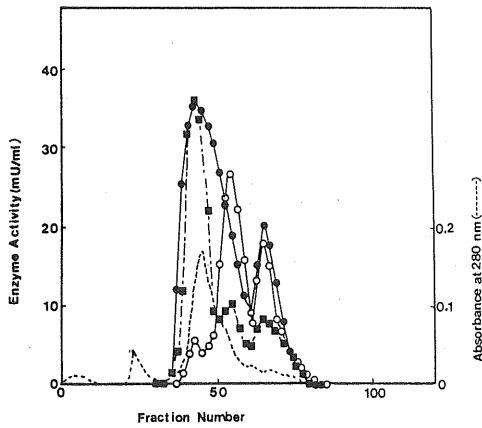


Fig. 3. First Sephacryl S-400 chromatography of the glucosidase fraction from the DEAE-Sephacel column chromatography
Substrate; ●● Maltose, ○○ Sucrose, ■■ Elsinotriose

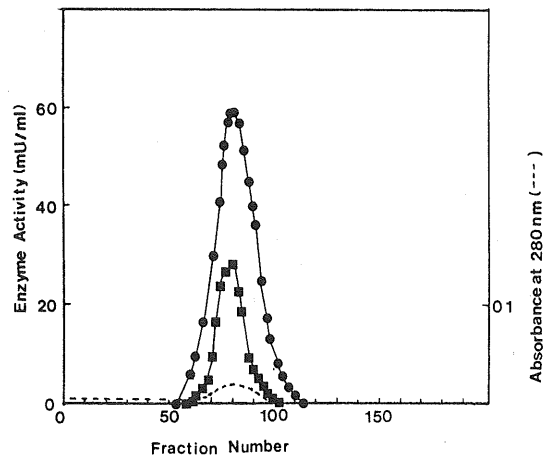


Fig. 4. Second Sephacryl S-400 chromatography of the glucosidase fraction from the first Sephacryl S-400 column chromatography
Substrate; ●● Maltose, ■■ Elsinotriose

Table 1. Purification of mucosal glucosidase

Purification Step	Total Vol. (ml)	Total Prot. (mg)	Enzyme activity							
			Nigerose		Maltose		Iso-maltose		Sucrose	
			T.A.	S.A.	T.A.	S.A.	T.A.	S.A.	T.A.	S.A.
Papain-Solubilized	57.0	136.8	504	3.7	2738	20.0	214	1.6	260	1.9
DEAE-Sephacel	2.8	3.8	294	77.1	1426	374.2	300	78.8	22	374.2
Sephacryl S-400	5.5	0.4	139	374.4	174	434.9	—	—	—	—

T.A.; Total activity ($\times 10^{-3}$ U)

S.A.; Specific activity ($\times 10^{-3}$ U/mg protein)

活性としては、120 倍、maltase 活性としては 20 倍、粗酵素より比活性が上昇した。この酵素の等電点は図 5-A に示すように、約 4.5、分子量は図 5-B に Sephacryl によるゲルろ過により約 3×10^5 であった。Flanagan⁶⁾らはラットの小腸粘膜の maltase/glucoamylase の等電点、及び分子量はそれぞれ 4.2, 5×10^5 と報告している。本精製酵素の、maltose, nigerose に対する最適 pH は 6.5-7.0 であり、Flanagan らの maltase/glucoamylase のそれとほぼ等しい値であった。基質特異性に関しては表 2 に示すように精製酵素は maltose, nigerose のほかに、 α -1, 2-結合した kojibiose に対しても作用するが、sucrose, trehalose, isomaltose, laminaribiose, gentiobiose には作用せず、また合成基質である *p*-nitrophenyl α -D-glucopyranoside および maltose を還元して得られる maltitol には作用しなかった。

本酵素を現在まで報告されている小腸粘膜の二糖類分解酵素の基質特異性と比較すると、Flanagan らは精製 maltase/glucoamylase は maltose, soluble starch, *p*-nitrophenyl

Table 2. Hydrolyses of saccharides by purified mucosal glucosidase

Saccharide	Structure	Hydrolysis (%)	Substrate concentration	K _m (mM)
Trehalose	α -G1 $\rightarrow$ α 1G	—	1.3 mM	
Kojibiose	α -G1 $\rightarrow$ 2G	21.8	1.3 mM	13.6
Sucrose	β -F2 $\rightarrow$ α 1G	—	1.3 mM	
Nigerose	α -G1 $\rightarrow$ 3G	15.0	1.3 mM	26.6
Maltose	α -G1 $\rightarrow$ 4G	84.1	1.3 mM	1.6
Maltitol	α -G1 $\rightarrow$ 4G(red.)	—	1.3 mM	
Isomaltose	α -G1 $\rightarrow$ 6G	—	1.3 mM	
Laminaribiose	β -G1 $\rightarrow$ 3G	—	1.3 mM	
Gentiobiose	β -G1 $\rightarrow$ 6G	—	1.3 mM	
Elsinotriose	α -G1 $\rightarrow$ α 3G1 $\rightarrow$ 4G	55.0	0.88 mM	
Mltotriose	α -G1 $\rightarrow$ α 4G1 $\rightarrow$ 4G	81.9	0.88 mM	
Panose	α -G1 $\rightarrow$ α 6G1 $\rightarrow$ 4G	—	0.88 mM	
<i>p</i> - α -NPG	<i>p</i> -nistor-phenyl α 1G	—	1.0 mM	
Amylose	(α -G1 $\rightarrow$ 4G) _n	3.1	0.44 mg/ml	

G: Glucopyranose

F: Fructofuranose

Substrates concentrations were adjusted to 2.7×10^{-3} moles of glucosidic bonds/liter.

Substrates were incubated with the enzyme for 30 min at 37°.

K_m value was calculated from Lineweaver-Burk plot.

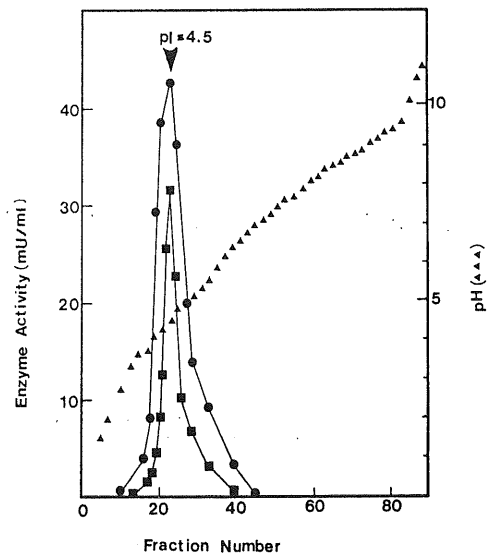


Fig. 5A. Isoelectric focussing of the mucosal glucosidase
Substrate; ●-● Maltose,
■-■ Elsinotriose

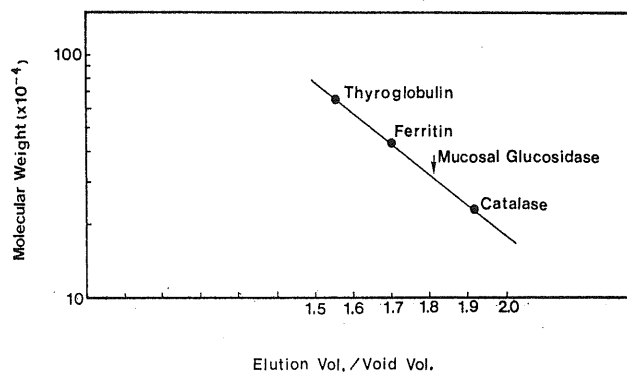


Fig. 5B. Estimation of the molecular weight of mucosal glucosidase by Sephacryl S-400 gel filtration

α -D-glucopyranoside を 152 : 1.4 : 1.5 の速度比で加水分解することを報告した。また、Kolinska⁷⁾らはほぼ精製された glucoamylase が maltose, starch, isomaltose, *p*-nitro-phenyl α -D-glucopyranoside に対して 42.7 : 28.4 : 7.6 : 0.72 の活性化をもつことなどを報告している。今回我々が精製した maltase/nigerase が現在まで報告されている maltase / glucoamylase と同一のものなのか、異なった酵素蛋白なのかについては今後検討を要する。また Torres⁸⁾らはイヌ肝臓より中性付近に最適 pH をもつ α -glucosidase を精製しているが、その基質特異性、maltose, nigerose, kojibiose に対する親和性などは本精製酵素のそれらと非常に類似している。

なお、ここには示さなかったが、我々はラット小腸粘膜のホモジネートより、papain 消化する事なく同様な活性をもつ maltase/nigerase 酵素画分をえたが、この場合は膜結合性の酵素が機械的な抽出にて可溶化したものと考えられる。

以上の結果よりラット小腸粘膜には α -1, 4- glucoside 結合の他、 α -1, 2-, α -1, 3- glucoside 結合を加水分解するグルコオリゴ糖分解酵素が存在するが、この酵素活性の発現は、いわゆる maltase による可能性が高い。このことは従来消化されないと思われていた α -1, 2-, α -1, 3- glucoside 結合を有するグルコオリゴ糖、或は多糖 (α -glucan) がラットの消化管にて水解後吸収されてエネルギー源となることを意味する。これに関連して人間の小腸粘膜にもこのような基質特異性をもつ酵素が存在するか否か栄養学的に非常に興味深い。

文 献

1. MISAKI, A., H. NISHIO and Y. TSUMURAYA (1982) Carbohydr. Res. 109:207
2. DAHLQVIST, A. (1968) Anal. Biochem. 22:99
3. 三崎 旭, 角田みどり (1984) 微量栄養素研究 1 : 27
4. 三崎 旭, 角田みどり (1985) 微量栄養素研究 2 : 161
5. 三崎 旭, 角田万里子, 国松 洋, 第 37 回日本栄養, 食糧学会総合講演 (大阪) 1983
6. FLANAGAN, P. R. and G. G. FORSTNER (1978) Biochem. J. 173:553
7. KOLINSKA, J. and J. KRAMI (1972) Biochim. Biophys. Acta. 284:235
8. TORRES, H. and J. M. OLAVARRIA (1964) J. Biol. Chem. 239:2427