

不拮抗阻害剤を用いたラット小腸グルコシダーゼのアフィニティー精製

応用生物科学専攻 食資源科学講座 食品機能化学 辻 裕貴

1. はじめに

哺乳動物の小腸で糖の消化吸収を担う α -グルコシダーゼには、マルターゼ・グルコアミラーゼ (MG), スクラーゼ・イソマルターゼ (SI) の 2 つのユニットが存在する。これら α -グルコシダーゼに対する阻害剤は、食後の血糖値上昇を抑制するため糖尿病の治療薬として有用である。ところが、阻害剤の候補化合物を探索する際、阻害活性は MG, SI の混合物を対象として算出する場合が多いため、阻害剤が主にどの酵素に作用しているか不明瞭な場合が多い。これは阻害剤の構造活性相関研究の際にも当てはまり、構造改変によりどの酵素に対する活性が変化したのか不明瞭になってしまう。そこで本研究ではこれらの酵素の効率的な精製法の開発を目的とした。

2. 方法

不拮抗阻害剤である 2-アミノレゾルシノール (**1**) をリガンドとしたアフィニティークロマトグラフィー法により MG, SI の精製を行うこととした。不拮抗阻害剤は基質の共存下でのみ酵素と親和性を示すため、酵素の精製時に共存させる基質を変えることで MG, SI の精製が可能だと考えられたためである。化合物 **1** のベンゼン環 4 位にアミド結合を介してアルキルアミンを導入した化合物を市販のゲルと結合しアフィニティーゲル (**2**) を作成した。アフィニティーゲル (**2**) を用いて酵素を吸着させる際には基質を添加し、溶出時には基質を除去することで、各酵素の選択的な精製が可能かどうか確かめた。得られた画分の精製度は酵素比活性により決定した。

3. 結果と考察

ラット小腸アセトンパウダーより調製した粗酵素を **2** により精製したところ、粗酵素と比べてマルターゼの比活性の大幅な上昇が確認された。特に比活性の高い精製画分について、Native-PAGE, SDS-PAGE 及び、マルターゼのポリクローナル抗体を用いた Western blot 分析を行った。これらの解析結果から、精製画分の主成分が MG ユニットであることが確認された。一方、スクラーゼに関しては、粗酵素と比べた比活性上昇はさほど見られなかった。

次に、精製効率向上のために **2** の作成条件の最適化と保存条件の検討を行った。methanol 溶媒下でゲルに対してリガンドを 3 当量, DMAP を 1 当量加え, 4 °C で 24 時間反応させることで 94% のカップリング効率を示した。保存溶媒としては, methanol が最適であった。得られた **2** を用い, 再度マルターゼ精製を試みたが, 精製効率は向上しなかった。

