

## II. 機能性評価実験法

### 1. 酵素活性制御機能

#### 1) $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害活性測定法

##### (1) パン酵母由来 $\alpha$ -グルコシダーゼの阻害活性測定法

九州大学大学院農学研究院 松井 利郎

### はじめに

本法は、パン酵母由来  $\alpha$ -グルコシダーゼ ( $\alpha$ -D-glucopyranoside hydrolase) 並びに合成基質 *p*-nitrophenyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside (*p*-NPG) を用いて、酵素反応の結果生じた *p*-nitrophenol の 400 nm での吸光度の変化から対象試料の阻害性を評価する方法である。

### 準備するもの

#### 1. 実験器具

- ・インキュベータ (37°C, Dry Thermo Unit DTU-2B, TAITEC 社)
- ・ボルテックスミキサー
- ・マイクロピペット (ニチリョー, ギルソンなど) 及びチップ
- ・試験管 (13 × 100 mm)
- ・分光光度計 (UV-1200, 島津製作所株)

#### 2. 試薬調製

- ・ 50 mM phosphate buffer (100 mM NaCl を含む, pH 7.0) ; 50 mM リン酸二水素カリウム溶液 (0.680 g/100 mL-水) を 50 mM リン酸水素二ナトリウム (3.581 g/200 mL-水) で pH 7.0 に調整する. 調製液 200 mL に NaCl (1.169 g) を添加する.
- ・ パン酵母由来  $\alpha$ -グルコシダーゼ (9 U/mg) ; 0.1 mg/mL-50 mM phosphate buffer
- ・ 7mM *p*-nitrophenyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside (*p*-NPG) ; 2.22 mg/10 mL-50 mM phosphate buffer
- ・ 0.5M Tris ; 0.606 g/10 mL-水

#### 3. 検体

種々の抽出法で調製した試料を測定することが出来る。水への溶解性が低い試料に関しては、10% DMSO に溶解して使用する。しかしながら、溶媒である DMSO が  $\alpha$ -グルコシダーゼ活性の低下を引き起こすことから、Control 及び Blank の測定においても水の代わりに 10% DMSO を用いて反応を行う (固定化 AGH 活性測定法についても同様)。

## プロトコール

1. 検体溶液 (10  $\mu$ L) に対して 32mU  $\alpha$ -グルコシダーゼ溶液 (40  $\mu$ L) を添加し, 37°C で 5 分間プレインキュベートする.
2. 0.7mM *p*-NPG 溶液 (950  $\mu$ L) を加えて 15 分間反応させる.
3. 0.5M Tris (1 mL) を添加し反応停止後, 被検溶液の 400 nm における吸光度を測定する.

## 計算方法

$\alpha$ -グルコシダーゼ阻害率は次の式を用いて行う.

$$\text{阻害率 (\%)} = \{(C-S) / (C-B)\} \times 100$$

C : Control の 400 nm における吸光度

S : Sample の 400 nm における吸光度

B : Blank の 400 nm における吸光度

なお, 阻害率が 50%を示したときの酵素反応時における検体終濃度を IC<sub>50</sub> 値と定義し, これを  $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害活性の尺度とする (固定化  $\alpha$ -グルコシダーゼ活性測定法についても同様).

## おわりに

本アッセイ系はきわめて簡便であり, かつ短時間で多検体の測定が可能であることから, 糖尿病予防を目的とする機能性食品研究において主流となっている. また, 同様の方法でラット小腸由来  $\alpha$ -グルコシダーゼの阻害活性測定も可能である.

## (2) 固定化 $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害活性測定

九州大学大学院農学研究院 松井 利郎

### はじめに

$\alpha$ -グルコシダーゼは小腸上皮微絨毛膜上に存在するイソマルターゼ-スクラーゼ複合体及びマルターゼ-グルコアミラーゼ複合体の複合糖質分解酵素である。従って、その触媒特性は膜から切り出された遊離の状態と比較して大きく異なり、生体における  $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害性を適切に評価するためには小腸膜結合状態を反映した固定化  $\alpha$ -グルコシダーゼ担体を用いて評価しなければならないと考えられる。

そこで、生体内における  $\alpha$ -グルコシダーゼの触媒特性を反映した擬似固定化担体の作製と、固定化担体を用いた  $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害活性測定法について以下に述べる。

### 【ラット小腸アセトンパウダーからの $\alpha$ -グルコシダーゼの可溶化と精製】

#### 準備するもの

##### 1. 実験器具

- ・フタ付き三角フラスコ (300 mL)
- ・乳鉢 (ホモジナイズ処理時に使用)
- ・ヒートスターラー (37°C)
- ・シェーカーのついたウォーターバス (37°C)
- ・パストールピペット
- ・ゴム付きガラス棒
- ・透析膜 (Size : 18/32, 三光純薬株)
- ・限外ろ過装置 (攪拌型ウルトラホルダー, ADVANTEC 社)

##### 2. 試薬調製

- ・PCC buffer (0.1 M リン酸三カリウム-0.05 M クエン酸三カリウム, 0.154 M KCl を含む, pH 7.0) ; 50 mM クエン酸三カリウム-水和物溶液 (3.240 g/200 mL-水) を 100mM リン酸二水素カリウム (0.680 g/50 mL-水) で pH 7.0 に調整する。調製液 200 mL に KCl (2.296 g) を添加する。
- ・10 mM potassium phosphate buffer (pH 6.8) ; 10 mM リン酸二水素カリウム (0.680 g/500 mL-水) を 10 mM リン酸水素二カリウム (0.871 g/500 mL-水) で pH 6.8 に調整する。

## プロトコール

1. ラット小腸アセトンパウダー (Sigma-Aldrich) 2.5 g に対して 1 wt (%) パパイン (papaya latex 由来, 25.0 mg), 5 mM EDTA (184 mg) 及び 10 mM L-システイン塩酸塩一水和物 (220 mg) を含む PCC buffer (ヒートスターラーを用いて溶解させる) 125 mL を加え, ホモジナイズ処理する (3 分間).
2. 37°C で 1 時間の酵素反応によって,  $\alpha$ -グルコシダーゼを膜から可溶化する (フタ付き三角フラスコを使用し, ウォーターバス中 90 rpm で行う).
3. 反応終了後, 10,000  $\times$ g, 1 時間 (4°C) の遠心分離を行い, 上清を回収する.
4. 上清に対して 40% 飽和濃度に到達するまで硫酸アンモニウム (243 g/L-上清) を加える.
5. 4°C で 1 時間静置した後, 再度 10,000  $\times$ g, 30 分 (4°C) の遠心分離を行う.
6. 上清に対して 60% 濃度 (132 g/L-上清) で硫酸分画を行う.
7. 静置後, 50,000  $\times$ g, 30 分 (4°C) の超遠心分離を行う.
8. 回収された沈殿物を 10 mM potassium phosphate buffer に対して 4°C で一晩透析する (沈殿物はゴム付きガラス棒で少しずつ少量の buffer に溶かし込む).
9. 透析によって生じた沈殿物を 10,000  $\times$ g, 30 分 (4°C) の遠心分離により除去した後, 上清を限外濾過 (M.W.<200,000) により濃縮し, 凍結乾燥する.

## プロトコールのポイント

1. ラット小腸アセトンパウダーのホモジナイズ処理及び硫酸分画は, 泡立っていないように行う.
2. 透析を行う際, 透析を始めてから 1 時間後, 次の日の朝及び昼に 10 mM potassium phosphate buffer を交換する.
3. 限外ろ過を行う際は, N<sub>2</sub> ガスのレギュレーターを少しずつ開けて行う.

### 【固定化 $\alpha$ -グルコシダーゼ担体の作製】

アミノ基特異的な活性担体 (臭化シアン活性化セファロース 4B) を  $\alpha$ -グルコシダーゼ固定化用担体とし, 前項で得られた遊離状態の粗精製  $\alpha$ -グルコシダーゼの固定化を行う.

## 準備するもの

1. 実験器具
  - ・ PP 製反応容器 (18 mL, 国産化学株)
  - ・ マルチ固相合成器 (MICRO MIXER MT, TAITEC 社)

## 2. 試薬調製

- 0.1 M borate buffer (0.5 M NaCl を含む, pH 7.5) ; 0.1 M ホウ酸 (1.855 g/300 mL-水) を 0.1 M 四ホウ酸ナトリウム十水和物 (1.907 g/50 mL-水) で pH 7.5 に調整する. 調製液 300 mL に NaCl (8.766 g) を添加する.
- $\alpha$ -グルコシダーゼ (前項で調製したもの) ; 3 mg/1.5 mL-0.1 M borate buffer
- 0.2 M  $\beta$ -alanine ; 26.7 mg/1.5 mL-0.1 M borate buffer
- 0.1 M citrate buffer (0.5 M NaCl を含む, pH 4.0) ; 0.1 M クエン酸一水和物 (2.10 g /100 mL-水) を 0.1 M クエン酸三ナトリウム水和物 (2.942 g/100 mL-水) で pH 4.0 に調整する. 調製液 100 mL に NaCl (2.922 g) を添加する.
- 人工腸液 (50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -0.2 M NaOH, pH 6.8, 日本薬局方準拠) ; 50 mM リン酸二水素カリウム (6.800 g/882 mL-水) を 0.2 M NaOH で pH 6.8 に調整する.

## プロトコール

1. 担体 (臭化シアン活性化セファロース 4B) 50 mg を 1 mM HCl (2 mL) で 15 分間振とうする.
2. 1 mM HCl (2 mL, 1 分間  $\times$  5 回) 及び 0.1 M borate buffer (2 mL, 1 分間  $\times$  1 回) で洗浄する.
3. 1 mL の  $\alpha$ -グルコシダーゼ溶液を加え, 20°C で 2 時間インキュベートすることによって  $\alpha$ -グルコシダーゼを固定化する.
4. 反応終了後,  $\alpha$ -グルコシダーゼ溶液をろ過して回収する. 担体を 0.1 M borate buffer (2 mL, 20 秒間  $\times$  3 回) で洗浄し, ブロッキング剤 (0.2 M  $\beta$ -alanine) を含む 0.1 M borate buffer (1mL) により未反応の活性基をブロックする (20°C, 2 時間).
5. 担体は 0.5 M NaCl を含む 0.1 M citrate buffer (2 mL, 1 分間  $\times$  3 回), 0.1 M borate buffer (2 mL, 1 分間  $\times$  3 回), 次いで人工腸液 2 mL (1 分間  $\times$  3 回) を用いて洗浄し, 目的とする固定化  $\alpha$ -グルコシダーゼを得る. なお, 調製品は人工腸液中, 4°C で保存する (1 ヶ月間は使用可).
6. 4. で回収した  $\alpha$ -グルコシダーゼ溶液及び原液中のタンパク質濃度を Lowry (DC プロテインアッセイキット, Bio-Rad 社) により定量する.

## <タンパク質定量法 ; DC プロテインアッセイ>

- 1) Sample 溶液 25  $\mu$ L に水 175  $\mu$ L, A 試薬 (A 試薬 : S 試薬 = 1 mL : 20  $\mu$ L) 及び B 試薬 800  $\mu$ L を添加し, 37°C で 15 分間インキュベートする.
- 2) 被検溶液の 750 nm における吸光度を測定する.

## プロトコールのポイント

1. 固まった臭化シアン活性化セファロース 4B は使用しない。
2. 洗浄の際、洗浄液は壁に付けて壁についたセファロースを洗い落とす。α-グルコシダーゼ溶液及び β-alanine 溶液は壁につけないように添加する。

## 計算方法

酵素の吸着率は以下の式より算出する。

$$\text{吸着率 (\%)} = (1 - \text{反応後の } \alpha\text{-グルコシダーゼ溶液の吸光度} / \alpha\text{-グルコシダーゼ原液の吸光度}) \times 100$$

吸着率が 60%以上になれば固定化 α-グルコシダーゼ阻害活性測定法に使用可能である。

## 後片付け

DC プロテインアッセイキットは試薬中に重金属を含むため、廃液は重金属廃液とすること。

### 【固定化 α-グルコシダーゼ阻害活性測定法】

#### 準備するもの

1. 実験器具
  - ・ エッペンドルフチューブ (1.5 mL)
  - ・ 多孔性フィルターの装備されたミニカラム (~12 mL 容量)
  - ・ 回転式インキュベータ (37°C, NATURAL INCUBATOR, COMPACT, IWAKI 社)
  - ・ 試験管 (13 × 100 mm)
  - ・ マイクロピペット (ニチリョーまたはギルソンなど) 及びチップ
  - ・ インキュベータ (37°C, Dry Thermo Unit DTU-2B, TAITEC 社)
  - ・ 分光光度計 (UV-1200, 島津製作所株)
  - ・ 針付きのプラスチックシリンジ (反応停止のろ過に使用する)
2. 試薬調製
  - ・ 人工腸液
  - ・ 基質溶液 (終濃度: 10 mM マルトース); 40.0 mg/10 mL-人工腸液
  - ・ 基質溶液 (終濃度: 45 mM スクロース); 171.2 mg/10 mL-人工腸液
  - ・ Control Blank; 基質溶液 90 μL に検体の溶媒 10 μL を加える。
  - ・ Sample Blank; 基質溶液 90 μL に検体 10 μL を加える。

## プロトコール

1. 固定化  $\alpha$ -グルコシダーゼ担体 (10 mg-wet gel) に対して検体を溶かした溶媒 (100  $\mu$ L) 及び基質溶液 (900  $\mu$ L/人工腸液, マルトース ; 10 mM, スクロース ; 45 mM, いずれも酵素反応時における終濃度) を加え, 直ちに回転式インキュベータの回転を開始する (37°C, 4 rpm, 反応時間 : マルトース ; 30 分, スクロース ; 60 分). 反応終了後, 反応液をシリンジなどによる加圧ろ過によって回収する. 回収した溶液を Control とする.
2. 人工腸液 (1.5 mL) で 3 回カラム内を洗浄する.
3. 2. で洗浄した固定化  $\alpha$ -グルコシダーゼ担体に対して検体溶液 (100  $\mu$ L) 及び基質溶液 (900  $\mu$ L/人工腸液, マルトース ; 10 mM, スクロース ; 45 mM, いずれも酵素反応時における終濃度) を加え, 37°C で反応させる (反応時間 : マルトース ; 30 分, スクロース ; 60 分). 反応終了後, 反応液をシリンジなどによる加圧ろ過によって回収する. 回収した溶液を Sample とする. この時点で反応は終了する.
4. 生成したグルコース量をグルコース定量用キットにより定量する.

<マルトースを用いた場合 ; グルコース-テストワコー (和光純薬工業株) >

- 1) Control Blank (CB), Sample Blank (SB), Sample (S), Control (C) 各溶液 50  $\mu$ L に発色試液 1.5 mL を添加し, 37°C で 5 分間インキュベートする.
- 2) 被検溶液の 505 nm における吸光度を測定する.

<スクロースを用いた場合 ; F-kit グルコース (ロシュ・ダイアグノスティックス社) >

- 1) CB, SB, S, C 各溶液 50 $\mu$ L に水 (950  $\mu$ L), 溶液 I (500  $\mu$ L), 溶液 II (10  $\mu$ L) を加え, 37°C で 20 分間インキュベートする.
- 2) 被検溶液の 340 nm における吸光度を測定する.

## 計算方法

$\alpha$ -グルコシダーゼ阻害率は次の式を用いて行う.

$$\text{阻害率 (\%)} = \{(C - CB) - (S - SB)\} / (C - CB) \times 100$$

C : Control の吸光度

CB : Control Blank の吸光度

S : Sample の吸光度

SB : Sample Blank の吸光度

## プロトコールのポイント

温度制御可能な回転式インキュベータについては、室温制御された部屋で行うか、あるいは市販恒温槽内にインキュベータを設置するか（自作の必要あり）工夫が必要である。

## おわりに

従来の合成基質を用いた  $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害活性測定法では、本来の目的である食後過血糖の抑制作用を有する食品成分を正しく評価することは困難であると推察される。一方、本固定化  $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害測定法は、小腸上皮膜結合状態を反映した固定化  $\alpha$ -グルコシダーゼ担体を使用しており、また基質として二糖類(マルトース、スクロース)を用いるため、より腸管での挙動を反映したアッセイ系であると考えられる。なお、この固定化  $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害測定法はプレートアッセイ系にも適用されており、多検体の一斉分析が可能となっている。

## 参考文献

- 1) Oki, T., Matsui, T. and Matsumoto, K., Evaluation of alpha-glucosidase inhibition by using an immobilized assay system. *Biol. Pharm. Bull.*, **23**, 1084-1087 (2000).
- 2) Matsui, T., Ogunwande, I., Abesundara K.J.M. and Matsumoto, K., Anti-hyperglycemic Potential of Natural Products. *Mini-Rev.Med.Chem.*, **6**, 349-356 (2006).
- 3) 合田敏尚, 炭水化物(糖質)の一次機能—小腸刷子縁膜消化酵素系を用いる炭水化物の消化吸收速度の評価, 食品機能研究法, 篠原和毅, 鈴木建夫, 上野川修一編著, (光琳, 東京), pp.16-20 (2000).
- 4) Matsui, T., Shimada, M., Saitoh N. and Matsumoto, K., Alpha-glucosidase inhibition assay in an enzyme-immobilized amino-microplate. *Anal.Sci.*, **25**, 559-562 (2009).