

二糖類水解酵素阻害剤 AO-128 のラットに おける食後高血糖抑制作用

小 高 裕 之, 三 木 七 美
池 田 衡, 松 尾 隆 夫

武田薬品工業株式会社研究開発本部生物研究所

Effect of a Disaccharidase Inhibitor, AO-128, on Postprandial Hyperglycemia in Rats

Hiroyuki ODAKA, Nanami MIKI, Hitoshi IKEDA
and Takao MATSUO

*Biology Research Laboratories, Research and Development Division,
Takeda Chemical Industries, Ltd., Osaka 532*

Nippon Eiyō Shokuryō Gakkaishi (*J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci.*) 45, 27~31 (1992)

The inhibitory actions of AO-128, an *N*-substituted derivative of valiolamine, on intestinal α -glucosidase activity and postprandial hyperglycemia were examined in rats. AO-128 showed about 20-30-fold more potent inhibition of semi-purified porcine small intestine disaccharidases and about 190-3,900-fold more potent inhibition of purified rat small intestine sucrase-isomaltase (S-I) complex than acarbose, a typical α -glucosidase inhibitor. On the other hand, the inhibitory activity of AO-128 on α -amylase was only 1/3,400 that of acarbose. AO-128 suppressed the elevation of blood glucose after oral administration of sucrose, maltose or starch, but had no effect on the elevation due to ingestion of glucose, fructose or lactose. In rats receiving AO-128, adipose tissue weight was reduced, and intestinal disaccharidase activities were inhibited completely, even though the S-I complex content was increased.

Key Words disaccharidase inhibitor, postprandial hyperglycemia, sucrase-isomaltase complex, rat.

(Received August 7, 1991)

糖代謝異常を伴う糖尿病、肥満、ある種の高脂血症の治療にはまず食事療法が適用され、標準体重より算出した必要かつ十分な栄養所要量をバランスよく摂取することを原則として、摂取エネルギー量の制限や食物繊維の摂取などが指示される。しかし、食事療法では調理上の工夫と患者の忍耐が要求され、心理的圧迫をもたらすので必ずしも満足すべき結果が得られない。また、糖代謝異常をもたらす疾患では食後の高血糖が増幅されるので、その調節が不十分であると血糖の変動をきたし、糖尿病性合併症の進展にもつながる。これらの問題を解決するため、糖質の消化、吸収を抑制する物質の天然物からの単離、化学合成および応用研究が活発に行われてい

る。微生物が産生する疑似オリゴ糖である amylostatin, trestatin や acarbose などは消化管の α -グルコシダーゼを阻害することが報告されている^{1)~3)}。これらの α -グルコシダーゼ阻害剤の共通点はいずれも鍵構成成分に疑似アミノ糖バリエナミンを有することである。一方、*Streptomyces hygroscopicus* sub sp. *limoneus* の培養液からバリエナミンよりも強い酵素阻害活性を示すバリオールアミンが単離され⁴⁾、これを化学修飾し二糖類水解酵素を強力に阻害する AO-128 が見いだされた⁵⁾。

本報では、AO-128 の α -グルコシダーゼ阻害作用、およびラットにおける糖質負荷後の血糖上昇抑制作用を代表的な α -グルコシダーゼ阻害剤である acarbose と比較検討した。さらに AO-128 投与ラットの小腸二糖類水解酵素活性および酵素タンパク量の変化についても検討

した。

方 法

1. 酵素および阻害剤

ブタ小腸粘膜から部分精製した⁹⁾ スクララーゼおよびマルターゼは北陸大学薬学部亀田幸彦博士から分与を受けた。ブタ膵 α -アミラーゼはシグマ社から購入した。スクラーゼ-イソマルターゼ (S-I) 複合体は Cogoli らの方法⁷⁾ に準じて、7~9 週齢雄 Jcl:SD ラット小腸粘膜から精製した。精製酵素は電気泳動的に分子量約 20 万の単一バンドを示すことを確認した。酵素阻害剤として AO-128 (武田薬品工業) および acarbose (Bayer 社) を用いた。

2. 酵素活性およびタンパクの測定

α -アミラーゼ活性は市販のキット (和光純薬) を用い、二糖類水解酵素活性はグルコースオキシダーゼ法⁸⁾ を用いる Dahlqvist の方法⁹⁾ に準じて測定した。酵素活性を 50% 阻害するのに必要な化合物の濃度 (IC_{50}) を求める場合、基質濃度として、水溶性デンプン (和光純薬) は 10 mg/ml, スクロース (和光純薬) およびマルトース (和光純薬) は 37 mM, イソマルトース (シグマ社) は 3.7 mM を用いた。S-I 複合体の酵素反応速度定数 (V_{max} および K_m) および解離定数 (K_i) を求める場合の基質および化合物濃度は、スクロースが 7.4~37.0 mM (AO-128 は 1.9×10^{-9} M, acarbose は 1.9×10^{-7} M), イソマルトースが 0.74~3.7 mM (AO-128 は 3.7×10^{-9} M, acarbose は 3.7×10^{-6} M), マルトースが 3.7~18.5 mM (AO-128 は 1.9×10^{-9} M, acarbose は 1.9×10^{-7} M) とした。小腸粘膜の酵素活性は Dahlqvist の方法⁹⁾ に従い、小腸粘膜表面を洗浄した後、スライドガラスでかきとり、そのホモジネートを酵素源として測定した。ホモジネートの透析前後での酵素活性には差がなかった。タンパクの定量は Lowry らの方法¹⁰⁾ に準じて測定した。

3. 食後高血糖抑制作用の検討

20 時間絶食した 6~8 週齢の雄 Jcl:SD ラットに糖質とともに AO-128 を単回経口投与 (0.43 mg/kg) し、投与直前、投与 30, 60, および 120 分後に尾静脈より採血し、血糖値をグルコースオキシダーゼ法⁸⁾ によって測定した。糖質はグルコース、フルクトース、ラクトース、マルトースおよびスクロースの場合はいずれも 2.5 g/kg, 水溶性デンプンの場合は 1.0 g/kg を投与した。阻害剤の用量依存性を検討する場合はスクロースあるいは水溶性デンプンとともに用量の異なる AO-128 あるいは acarbose を経口投与した。阻害剤無投与および投与時の血糖上昇面積を比較することによって、血糖上昇に対する阻害剤の 50% 抑制用量 (ED_{50}) を算出した。血

糖上昇面積 (Δ glucose area) は以下の計算式によって算出した。血糖上昇面積 ($\text{mg/dl} \cdot \text{h}$) = $(a+2b+3c+2d) \times 1/4 - 2a$ (a, b, c および d はそれぞれ 0, 30, 60 および 120 分後の血糖値)。さらに、AO-128 を腹腔内投与 (1.05 mg/kg) した場合、スクロース経口投与後の血糖値の上昇が抑制されるかどうかについて検討した。

4. ラット小腸粘膜のスクラーゼ-イソマルターゼ複合体量の測定

Olsen らの方法¹¹⁾ に準じて、ラット小腸粘膜スクラーゼ-イソマルターゼ (S-I) 複合体をウサギで免疫し、抗血清を作成した。この抗血清はゲル拡散法による検討によって、S-I 複合体との特異性が高いことを確認した。また、S-I 複合体と十分量の抗血清とを反応させると酵素活性は消失し、このときの反応生成物量の 22.2% が S-I 複合体であった。この抗血清を用いて AO-128 投与ラットの腸 S-I 複合体量の変化を測定した。

本実験においては 4 週齢時から AO-128 (5 mg/100 g 飼料) 添加市販飼料 (CE-2, 日本クレア) を 13 日間与えられた雄 Jcl:SD ラットを用いた。小腸は長さによって上下を 2 等分し、重量を測定した後、粘膜をスライドガラスでかきとり、タンパク量、S-I 複合体重量、およびスクラーゼおよびマルターゼ活性を測定した。また、体脂肪量の指標として副腎丸周囲脂肪組織重量を測定した。

5. 統計処理

2 群間の平均値の有意差検定は Student's *t*-test によった。また、4 群間の平均値の有意差検定には Duncan の多重比較を用い、二要因分散分析を行った。

結 果

1. AO-128 および acarbose の α -グルコシダーゼ阻害作用

AO-128 は acarbose に比べてブタ小腸のスクラーゼおよびマルターゼに対して 33 および 23 倍、ラット小腸の S-I 複合体のスクラーゼ、マルターゼおよびイソマルターゼ活性に対して 190, 270 および 3,900 倍強い阻害作用を示したが、ブタ膵 α -アミラーゼに対する阻害作用は acarbose の 1/3,400 倍であった (Table 1)。

AO-128 および acarbose は S-I 複合体のスクラーゼ、マルターゼおよびイソマルターゼを拮抗的に阻害した (Fig. 1)。S-I 複合体の V_{max} , K_m および阻害剤による K_i を調べた (Table 2)。 K_i は AO-128 のほうが acarbose よりも小さく、スクラーゼ活性に対して 1/260 倍、マルターゼ活性に対して 1/240 倍、イソマルターゼ活性に対して 1/5,300 倍であった。

2. AO-128 および acarbose の食後高血糖抑制作用

AO-128 を経口投与した場合、単糖であるグルコース

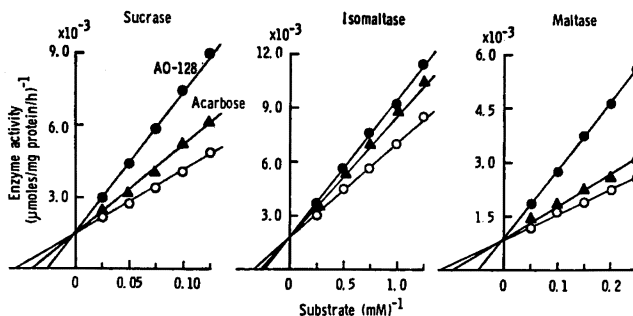


Fig. 1. Lineweaver-Burk plot of sucrase, maltase and isomaltase activities of sucrase-isomaltase complex from rat intestinal mucosa with or without AO-128 (1.9×10^{-9} M for sucrase and maltase, and 3.7×10^{-9} M for isomaltase) or acarbose (1.9×10^{-7} M for sucrase and maltase, and 3.7×10^{-6} M for isomaltase).

Table 1. Inhibitory activities of AO-128 and acarbose on α -glucosidase.

	IC ₅₀ (M) on α -glucosidases	
	AO-128	Acarbose
Porcine small intestine		
Sucrase	4.6×10^{-9}	1.5×10^{-7}
Maltase	1.5×10^{-8}	3.4×10^{-7}
Porcine pancreas		
α -amylase	2.0×10^{-2}	5.9×10^{-6}
Rat small intestine		
Sucrase	3.9×10^{-9}	7.3×10^{-7}
Isomaltase	1.7×10^{-8}	6.6×10^{-5}
Maltase	6.4×10^{-9}	1.7×10^{-6}

およびフルクトース,あるいはラクトース負荷後の血糖値はまったく影響を受けなかったが,スクロース,マルトースおよびデンプン負荷後の血糖上昇は著明に抑制された (Fig. 2)。

スクロースおよびデンプン負荷後の血糖上昇は阻害剤の用量に依存して抑制された (Fig. 3)。AO-128 の ED₅₀ はスクロースの場合 0.1 mg/kg, デンプンの場合 0.4 mg/kg であったが,acarbose の ED₅₀ はスクロースの場合 3.5 mg/kg, デンプンの場合 2.5 mg/kg であった。一方, AO-128 を腹腔内投与した場合,スクロース負荷後の血糖値は影響を受けなかった (データは示さない)。

3. AO-128 投与ラットにおける小腸二糖類水解酵素活性および S-I 複合体量,および脂肪組織重量の変化

AO-128 投与ラットの飼育期間中の摂食量は対照ラッ

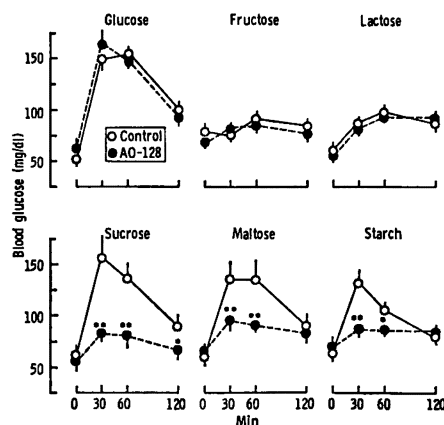


Fig. 2. Effects of AO-128 on carbohydrate absorption in rats.

Mean \pm SD for 5 or 6 rats. * $p < 0.05$ or ** $p < 0.001$ vs the corresponding control.

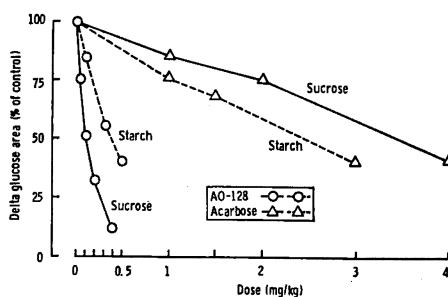


Fig. 3. Dose-response curves of inhibitory actions of AO-128 or acarbose on carbohydrate absorption in rats.

Table 2. Kinetic constants of disaccharidases in purified sucrase-isomaltase complex of rat small intestine.

Substrates	V_{max}^*	K_m^{**} (mM)	K_i (M)	
			AO-128	Acarbose
Sucrose	844	23.3	1.6×10^{-9}	4.1×10^{-7}
Isomaltose	695	4.2	7.0×10^{-9}	3.7×10^{-5}
Maltose	1166	8.1	1.5×10^{-9}	3.6×10^{-7}

* μmol substrate hydrolyzed/h/mg protein. ** Mean of two determinations.

Table 3. Effect of AO-128 on body weight, food intake, epididymal fat pad weight, and mucosal protein and sucrase-isomaltase complex content and disaccharidase activities of upper and lower parts of small intestine in rats.

	Control		AO-128		F value		
	Upper part	Lower part	Upper part	Lower part	Drug (D)	Segment (S)	$D \times S$
Body weight (g)	184 ± 14^a		173 ± 10^b		4.7*		
Food intake (g/13 days)	230 ± 18^a		217 ± 17^a		2.6		
Fat pad weight (mg)	771 ± 147^a		320 ± 97^b		66.0		
Mucosal protein (mg)	466 ± 49^b	378 ± 30^c	542 ± 50^a	463 ± 39^b	35.2**	38.6**	0.1
Mucosal sucrase-isomaltase complex content							
(mg)	1.02 ± 0.27^a	0.60 ± 0.23^b	1.24 ± 0.27^a	1.07 ± 0.21^a	20.0**	14.4**	2.5
($\mu\text{g}/\text{mg}$ protein)	30.9 ± 6.8^a	20.6 ± 9.8^b	30.0 ± 6.5^a	34.0 ± 9.1^a	6.6*	2.5	6.8*
Mucosal sucrase activity ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ protein/h)							
	11.0 ± 3.6^a	8.6 ± 2.5^b	4.9 ± 1.2^c	5.4 ± 1.5^c	38.7**	1.8	3.7
Mucosal maltase activity ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ protein/h)							
	32.9 ± 12.0^a	16.8 ± 5.9^b	12.0 ± 4.6^b	10.2 ± 2.4^b	37.3**	16.0**	9.7**

Mean \pm SD without a common superscript letter (^a, ^b or ^c) differs significantly ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test. Significance was determined by analysis of variance (* $p < 0.05$ and ** $p < 0.001$). $n=10$.

トと差はなかったが、体重および脂肪組織重量は対照ラットに比べて 94 および 42% に有意に低下した (Table 3)。小腸粘膜のタンパク量は上部および下部とも、1.2 倍にいずれも対照に比べて有意に増加した (Table 3)。AO-128 投与ラットの S-I 複合体量は対照に比べて小腸上部においては 1.2 倍に増加したが有意差はなく、タンパク当りの含量には変化が認められなかったが、小腸下部においては 1.8 倍、タンパク当りの含量も 1.8 倍と有意に増加した (Table 3)。スクラーゼおよびマルターゼ活性は小腸上部のほうが下部よりも高く、AO-128 による抑制は上部のほうが大きかった。すなわち、AO-128 投与ラット小腸粘膜のスクラーゼの比活性は上部で 45%，下部で 62% に、マルターゼの比活性は上部で 36%，下部で 61% にそれぞれ低下した (Table 3)。

考 察

ブタ小腸粘膜から部分精製した酵素標品で比較したスクラーゼおよびマルターゼ活性に対する AO-128 の阻害活性は、acarbose よりも 20~30 倍強かった。また、ブタ膵 α -アミラーゼに対する阻害活性は acarbose の 1/3,400 倍であった。すなわち、AO-128 は特異的かつ強力に二糖類水解酵素を阻害することがわかった。一方、ラットの S-I 複合体のスクラーゼ、マルターゼおよびイソマルターゼ活性に対する AO-128 の 50% 阻害濃度は acarbose に比べてきわめて低く、190~3,900 倍阻害作用が強かった。ラットからの精製標品とブタからの部分精製標品との間でみられた阻害作用の差には種差あるいは酵素の精製度が関与していると考えられる。In vitro でラット膵 α -アミラーゼに対する阻害作用は検討

しなかったが、*in vivo* における AO-128 の高血糖抑制作用はスクロース負荷後のほうがデンプン負荷後よりも強く、一方、acarbose の作用はデンプン負荷後のほうがスクロース負荷後よりも強かった成績は、ラットにおいても α -アミラーゼ阻害の特異性は AO-128 のほうが acarbose よりも低いことを示唆する。ヒトが日常摂取している総エネルギーの 60~70% を糖質が占め、糖質の大部分がデンプンに由来している¹²⁾。AO-128 は α -アミラーゼ阻害作用は弱い、強力なマルターゼ阻害作用を有し、デンプン消化の最終段階を強力に抑制すると考えられる。一方、acarbose の二糖類水解酵素阻害作用は弱かったが、 α -アミラーゼ阻害作用をもつので両者の相乗効果が期待される。しかし、膵からの α -アミラーゼ分泌は通常組成の食事を摂取していても、必要量の 25 倍にも達するといわれている¹³⁾ので、必然的にその阻害には大量の化合物摂取薬剤が必要となろう。ラットにおける AO-128 のスクロースおよびデンプン負荷後の高血糖抑制作用は前者では 35 倍、後者では 6 倍 acarbose よりも強かったことから、二糖類水解酵素活性の阻害が、 α -アミラーゼ阻害に比べて糖質の消化吸収の抑制に効率のよい方法であると考えられる。

AO-128 投与ラットの小腸二糖類水解酵素活性は著しく阻害されたが、酵素量は増加した。ことに、本来は機能が予備的と考えられる小腸下部の酵素量が AO-128 投与によって、上部と同程度まで増加した。この反応は AO-128 による食物の消化吸収阻害に対する小腸の代償反応と考えられる。しかし、 α -アミラーゼと異なり、小腸では酵素阻害に対する代償能力に限界があるため、血糖低下作用には影響はないと考えられる。また、AO-128 投与ラットの小腸粘膜のタンパク量は酵素量の増加ほど著しくはなかったが有意に増加した。この現象は糖質の消化、吸収が抑制され、消化管内に糖質が滞留したため、すなわち消化管内容物の「かさ」が増加したためと考えられる。

AO-128 投与ラットの体重は対照ラットに比べて有意に低下し、体脂肪量の指標として測定した副睾丸周囲脂肪組織重量も著しく減少し、抗肥満作用も認められた。AO-128 投与では糖質の消化吸収が遅延あるいは抑制され、一過性の高血糖の発現が軽減され、その結果、糖刺激性インスリン分泌量が少なくなり、糖質からの脂肪合成が低下し、体脂肪の蓄積が抑制されたと考えられる。

要 約

微生物の産生物バリオールアミンを化学修飾して得ら

れた AO-128 の糖質消化酵素活性に対する作用およびラットにおける食後高血糖抑制作用を検討した。

部分精製したブタ小腸スクラーゼとマルターゼに対して AO-128 は既知の α -グルコシダーゼ阻害剤である acarbose より 20~30 倍強い阻害作用を示した。またラット小腸から精製したスクラーゼ-イソマルターゼ複合体の酵素活性に対しては acarbose よりも 190~3,900 倍強い阻害作用を示し、その阻害様式は拮抗的であった。しかし、ブタ膵由来の α -アミラーゼに対する AO-128 の阻害作用は acarbose の 1/3,400 ときわめて弱かった。

AO-128 はスクロース、マルトースおよびデンプン摂取後の高血糖を低用量で強く抑制したが、グルコース、フルクトースおよびラクトース摂取後の高血糖に対しては無効であった。

AO-128 投与ラットの小腸二糖類水解酵素量は増加したが、酵素活性は著しく低下し、脂肪組織重量も減少した。

文 献

- 1) Yokose, K., Ogawa, K., Suzuki, Y., Umeda, I. and Suhara, Y. : *J. Antibiot.*, **36**, 1166 (1983)
- 2) Fukuhara, K., [Murai, H. and Murao, S. : *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 1941 (1982)
- 3) Junge, B., Heiker, F.-R., Kurz, J., Muller, L., Schmidt, D.D. and Wunsche, C. : *Carbohydr. Res.*, **128**, 235 (1984)
- 4) Kameda, Y., Asano, N., Yoshikawa, M., Takeuchi, M., Yamaguchi, T., Matsui, K., Horii, S. and Fukase, H. : *J. Antibiot.*, **37**, 1301 (1984)
- 5) Horii, S., Fukase, H., Matsuo, T., Kameda, Y., Asano, N. and Matsui, K. : *J. Med. Chem.*, **29**, 1038 (1986)
- 6) Borgstrom, B. and Dahlqvist, A. : *Acta Chem. Scand.*, **12**, 1997 (1958)
- 7) Cogoli, A., Mosimann, H., Vock, C., Von Balthazar, A.-K. and Semenza, G. : *Eur. J. Biochem.*, **30**, 7 (1972)
- 8) Werner, W., Rey, H.-G. and Wielinger, H. : *Z. Anal. Chem.*, **252**, 224 (1970)
- 9) Dahlqvist, A. : *Anal. Biochem.*, **7**, 18 (1964)
- 10) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randal, R.J. : *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951)
- 11) Olsen, W.A. and Korsmo, H. : *J. Clin. Invest.*, **60**, 181 (1977)
- 12) 厚生省保健医療局昭和 62 年国民栄養調査概要 : 栄養誌, **47**, 49 (1989)
- 13) Fogel, M.R. and Gray, G.M. : *J. Appl. Physiol.*, **35**, 263 (1973)

(1991 年 8 月 7 日受理)