

## ラット小腸 $\alpha$ -glucosidase の活性解離基の同定

岡田 秀紀・小野寺 秀一・塩見 徳夫

### Identification of Essential Ionizable Groups in Rat Intestinal $\alpha$ -Glucosidase

Hideki OKADA, Shuichi ONODERA and Norio SHIOMI  
(March 2001)

#### 緒 言

$\alpha$ -glucosidase ( $\alpha$ -D-glucoside glucohydrolase EC 3.2.1.20) は、 $\alpha$ -グルコシド結合をもつ基質の非還元末端から  $\alpha$ -D-glucose を遊離する典型的な *exo*-type の酵素で、微生物、植物および動物に広く存在し、比較的 low molecular weight の基質のみに作用するものから、さらには soluble starch や glycogen のような高分子の基質にも作用するものまで、酵素の起源によりその基質特異性は多様である。

これらの  $\alpha$ -glucosidase のうち動植物起源の酵素は、多糖類水解作用をも示し soluble starch や glycogen のような  $\alpha$ -グルカンを水解することが知られている。Miller ら<sup>21)</sup> がウシ血液の *trans*- $\alpha$ -glucosidase が、maltose のみならず soluble starch や glycogen から直接 glucose を生成することを報告したのをはじめとして、哺乳動物起源の  $\alpha$ -glucosidase に関する報告は多数ある。小腸の  $\alpha$ -glucosidase については、現在までのところ小腸上皮細胞の微絨毛膜に maltase, sucrase, isomaltase, lactase および trehalase と呼称される 5 種類の二糖類水解酵素が膜消化酵素として alkaline phosphatase, dipeptidase, lipase, cholesterolester 水解酵素とともに存在する<sup>20,22,32)</sup> ことが知られ、その生理的役割についても明らかにされてきている<sup>2,20)</sup>。

小腸酵素のタンパク質化学的研究は、Dahlqvist がブタ小腸より sucrase, maltase の可溶化<sup>4)</sup>, maltase と isomaltase の可溶化<sup>5,6)</sup> に初めて成功して以来飛躍的に進み、sucrase と isomaltase が複合体 (S-I complex) を形成していることがラット<sup>12,17)</sup> ウサギ<sup>3,11,15)</sup> などで報告された。またラット<sup>16)</sup>, ヒト<sup>14)</sup> の glucoamylase やラット<sup>9,10,16)</sup>, ウサギ<sup>25,27,28)</sup>,

ブタ<sup>7,30)</sup> などの maltase-glucoamylase 複合体 (M-G complex) についても報告されており、これらの酵素あるいはその複合体は消化のみならず、吸収にも関係するのではないかと考えられている<sup>26)</sup> が、その詳細についてはまだよくわかっていない。また、酵素そのものの性質についても不明な点が多く、その名称の妥当性についても疑問が持たれている。

本研究では、これらの疑問点を解明することを目的として、より詳細に反応機構を解析するために活性発現に直接関与する活性解離基について検討を行った。

#### 材料および方法

##### 1. ラット小腸

ラット小腸は、北海道大学農学部食品栄養学講座より恵与された新鮮なラット小腸を冷凍保存 (-40°C) しておいたものを解凍して使用した。

##### 2. 試薬

glucose, maltose, soluble starch (和光純薬工業株式会社) は市販の特級試薬を用いた。なお、水分含有率は 5% とした。ATP, NADH, ジチオスレイトール (DTT), hexokinase, glucose-6-phosphate dehydrogenase (シグマアルドリッチ株式会社) は分析用特級試薬を用いた。その他明記しない試薬についても市販の特級試薬を用いた。

Sephadex G-200, DEAE-Sephacel CL-6B (アマシャムファルマシアバイオテック株式会社) Toyopearl HW-55F, Toyopearl HW-65F (東ソー株式会社) は常法に従い膨潤, カラム充填および所定の緩衝液による平衡化を行って使用した。

### 3. 酵素活性の測定および酵素の単位

酵素活性は、基質より遊離する glucose を、Glucose-AR II 発色剤 (和光純薬工業株式会社) を用いて酵素法<sup>23)</sup> で測定した。基質として maltose を用いた時を maltase 活性とし、maltase 1 unit とは、以下の標準反応条件において 1 分間に 1  $\mu$ mole の maltose を加水分解する酵素量と定めた。なお、比活性の表示はタンパク質 1 mg あたりの unit 数で表した。

標準反応液は、0.5% maltose 200  $\mu$ l, 酵素溶液 100  $\mu$ l, 0.1 M リン酸カリウム緩衝液 (pH 6.7) 200  $\mu$ l の 500  $\mu$ l とし、これを 37°C で 5 分間反応させた。反応停止には、2 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.0) 1 ml を用いた。続いて所定の緩衝液 (0.2% フェノール, 0.08% 4-アミノアンチピリンを含む 0.1 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.0)) に 0.24% になるように溶解した Glucose-AR II 発色剤 200  $\mu$ l を加え 37°C で 1 時間発色させたのち 505 nm の吸光度を測定し、標準曲線から遊離 glucose を定量した。

$pK_e$  値測定の実験では、maltose を基質とした場合、基質終濃度 168  $\mu$ M とし各 pH の Britton-Robinson 緩衝液 (40 mM リン酸, 40 mM 酢酸, 40 mM ホウ酸-0.2 M NaOH) 中で 5 分間反応させ、100°C で 3 分間煮沸し、反応を停止させた。室温に戻したのち、1.25 mM  $MgCl_2$ , 375  $\mu$ M ATP, 37.5  $\mu$ M NADP, 0.625 mM DTT を含む 62.5 mM Tris-HCl 緩衝液を 2 ml 加え、その後、5  $\mu$ g hexokinase, 0.1 U glucose-6-phosphate dehydrogenase を含む酵素溶液 20  $\mu$ l を加えて NADPH 生成反応を開始し、40 分室温に放置し反応を完結させた。生成した NADPH は、励起波長を 340 nm とし、460 nm における蛍光から測定し、標準曲線から遊離 glucose 量を測定した。

Soluble starch を基質とした場合は、迅速スミス分解法<sup>31)</sup> によって非還元末端グルコース濃度を測定して得られた値、すなわち 1% (w/v) あたり 1.42 mM とし、基質終濃度を 100  $\mu$ M に調整して maltose と同様に測定した。

### 4. タンパク質量の測定

各精製標品については、比吸光係数 ( $E_{1\%}^{1cm}$ ) を 15.9 とし 280 nm の吸光度より求めた。また精製過程では、比吸光係数を 10 と仮定して算出した。ただし、Sephadex G-200 カラム 溶出画分については Lowry 法<sup>18)</sup> により、牛血清アルブミンを標準タンパク質としてタンパク質量を求めた。

### 5. ディスク電気泳動法

ポリアクリルアミドゲル電気泳動は Reisfeld らの方法<sup>24)</sup> に従い pH 8.3 の  $\beta$ -アラニン-酢酸緩衝液系で、カラム (0.5  $\phi$   $\times$  7 cm) 1 本あたり 3 mA の定電流で行った。ゲル濃度は 5.0% とし、試料 50~100  $\mu$ l (10~50  $\mu$ g タンパク質) をグリセロール 100  $\mu$ l と混合し、マーカーとして BPB を上層の泳動用緩衝液に適宜添加した。タンパク質の染色はクマシーブリリアントブルー G-250 を用いて行い、7% 酢酸中で脱色した。

### 6. ラット小腸 $\alpha$ -glucosidase の精製

凍結保存しておいたラット小腸 (60 匹分) から空腸部分を切り出し、反転して粘膜を擦取した。この粘膜 (100 ml) を 4 倍量の 5 mM EDTA を含む 0.1 M リン酸カリウム緩衝液中でホモジナイズし、遠心分離 (15,000  $\times g$ , 1 時間) して沈殿を回収した。得られた沈殿を 1% Triton X-100 を含む 200 ml の同緩衝液にけん濁して、0°C で 1 時間ゆるやかに攪拌しながら可溶化を行った。この可溶化液を超遠心分離 (110,000  $\times g$ , 1 時間) して得られた上清を crude extract (1,497 mg, 1,016 units) とした。2 倍量の冷アセトン処理によりタンパクを沈澱させたのち遠心分離 (8,000  $\times g$ , 20 分間) を行ってタンパクを回収し、再度 0.1% Triton X-100 を含む同緩衝液に溶解した。その後、Sephadex G-200 カラム, DEAE-Sephadex CL-6B カラム, Toyopearl HW-55F カラム, Toyopearl HW-65F カラムの各クロマトグラフィにより本酵素を精製し (Table 1), ポリアクリルアミドゲル電気泳動により単一のバンドである事を確認した。

### 7. 反応速度論的解析<sup>13)</sup>

#### (1) $pK_e$ の測定

$pK_e$  (遊離の酵素における活性解離基の  $pK$ ) の測定は以下のようにして行った。すなわち  $pK_e$  値は  $V/K_m$  の pH 依存性から Dixon plot によって求められる<sup>8)</sup> が、Michealis-Menten の速度式

$$v = \frac{V \cdot s}{K_m + s}$$

は  $K_m \gg s$  が成り立つ時

$$v = \left( \frac{V}{K_m} \right) s$$

となる。従って、測定する pH で  $K_m \gg s$  が成立する一定の低基質濃度下においては、 $v$  は  $V/K_m$  に比例することから  $v$  の pH 依存性から  $pK_e$  を求めることができる。実際には、 $pK_{e1}$  (酸性側  $pK_e$ ) と  $pK_{e2}$

Table 1. Purification procedure for rat intestinal  $\alpha$ -glucosidase.

Procedure	Total Protein (mg)	Total activity for maltose (unit)	Specific activity (U/mg)	Purification (-fold)	Recovery (%)
Crude extract	1,497 <sup>a)</sup>	1,016	0.68	1	100
Sephadex G-200	260.7 <sup>a)</sup>	725	2.8	4.1	71.4
DEAE-Sepharose CL-6B	38.8 <sup>a)</sup>	700	18.0	26.5	68.9
Toyopearl HW-55F	15.4 <sup>a)</sup>	563	34.8	51.2	55.4
Toyopearl HW-65F	8.2 <sup>b)</sup>	447	54.5	80.1	44.0

a)  $E_{1\text{cm}}^{1\%}$  at 280 nm was 10, b)  $E_{1\text{cm}}^{1\%}$  at 280 nm was 15.9.

(アルカリ性側  $pK_e$ ) の差が 3 pH 単位以上の場合、最大活性の 1/2 を示す pH をそれぞれ  $pK_{e1}$  および  $pK_{e2}$  とみなすことができる。

## (2) 解離熱 ( $\Delta H_e$ ) の算出

遊離の酵素における活性解離基の解離熱は  $pK_e$  の温度変化から van't Hoff の式<sup>8)</sup>

$$\frac{d \ln K_e}{d(1/T)} = \frac{-\Delta H_e}{R}$$

すなわち

$$\Delta H_e = 2.3 R \frac{d(pK_e)}{d(1/T)}$$

を用いて求められる。ここで  $R$  は気体定数、 $T$  は絶対温度である。従って、異なる温度で  $pK_e$  値を測定し、温度に対して  $pK_e$  値をプロットして得られた直線の傾きから解離熱を算出できる。

## (3) 解離に伴う荷電の変化の型式

活性解離基の  $pK_e$  値は溶媒の誘電率の影響を受ける場合がある。すなわちカルボキシル基のように、解離に際して新たに正負のイオンを生じる型では、アミノ基のように荷電の符号の変化のない型に比べて、溶媒の誘電率の影響を受け易く、低い誘電率の溶媒中で  $pK$  が増加する (解離が抑制される) ことが期待される。



従って、適当な有機溶媒を加えて誘電率を低くした場合の  $pK_e$  値のずれを測定することで活性解離基の解離に伴う荷電の変化の型が推定できる。

## 結果および考察

### 1. $pK_e$ 値の測定

$pK_e$  (遊離の酵素における活性解離基の  $pK$ ) 値は、低濃度基質を用いた反応系<sup>13)</sup> で pH-速度曲線により求めた。酵素溶液 0.1 ml (maltose に対して 0.054  $\mu\text{g}$ , soluble starch に対して 0.053  $\mu\text{g}$ ), Buritton-Robinson 緩衝液<sup>1)</sup> 0.2 ml, 0.42 mM

maltose あるいは 0.25 mM soluble starch 0.2 ml の計 0.5 ml を 37°C で反応させた。その結果を Fig. 1 に示す。酸性側の活性解離基 1 は, maltose が基質の場合,  $pK_{e1}=4.52$ , soluble starch が基質の場合,  $pK_{e1}=4.58$  であった。アルカリ側の解離基 2 の  $pK_e$  は, maltose が基質の場合,  $pK_{e2}=8.19$ , soluble starch が基質の場合,  $pK_{e2}=7.92$  であった。活性解離基の  $pK$  は, 遊離の状態と基質が結合した状態とでは異なることが知られており, 基質の違いにより基質結合下での  $pK$  ( $pK_{es}$ ) も差が生じる。しかし, 遊離の酵素の  $pK$  は基質の種類にかかわらず一定であることが期待され, 今回の結果も maltose と soluble starch ではほぼ同一の値となった。広範なタンパク質, ペプチドの解離基について得られる標準  $pK_e$  値<sup>8)</sup> (Table 2) との比較から, 解離基 1 はカルボキシル基 ( $pK=3.0\sim 4.7$ ) と推定された。解離基 2 については, アミノ基 ( $pK=7.6\sim 10.6$ ), イミダゾール基 ( $pK=5.6\sim 7.0$ ) またはスルフヒドリル基 ( $pK=7.5\sim 10.3$ ) のいずれかと考えられた。

### 2. 解離熱の算出

解離基 1 と解離基 2 をさらに詳細に判定するために, 解離熱を算出した。上記と同様な方法で 20°C, 25°C, 30°C, 40°C, 45°C の各温度における  $pK_e$  値を測定し, maltose および soluble starch を基質として得られた  $pK_e$  値の温度依存性を Fig. 2 に示した。van't Hoff の式<sup>8)</sup> を用いて解離熱 ( $\Delta H_e$ ) を算出したところ, maltose を基質とした場合, 解離基 1 は  $\Delta H_e = -2.1$  kcal/mol, 解離基 2 は  $\Delta H_e = 3.7$  kcal/mol であった。soluble starch を基質とした場合, 解離基 1 は  $\Delta H_e = -2.0$  kcal/mol, 解離基 2 は  $\Delta H_e = 5.4$  kcal/mol であった。各解離基の標準  $\Delta H$  値の中には今回の結果と完全に一致するものは見いだされなかったが, これらの標準  $\Delta H$  値はアミノ酸単独での値であり, タンパク質中では変化し得ることが多くの酵素で確認されている。今回の結果について

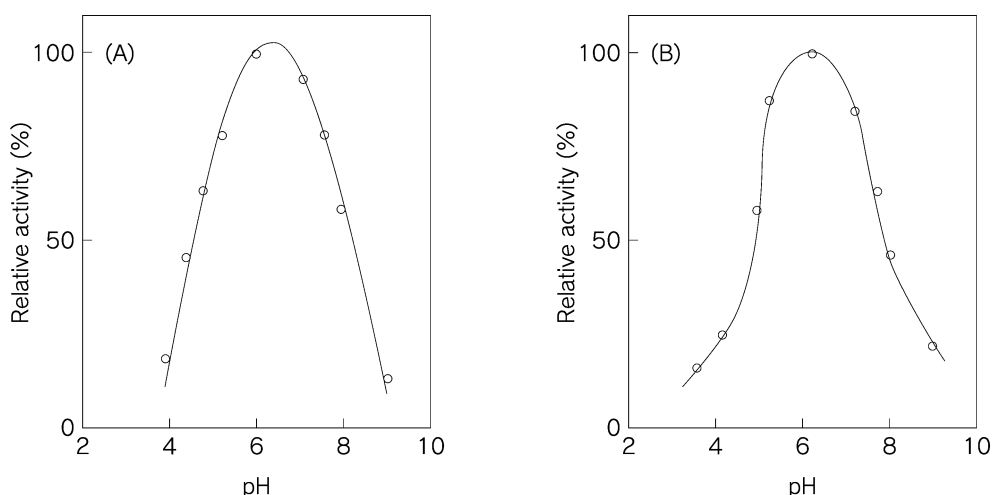


Fig. 1. Effect of pH on hydrolyses of maltose (A) and soluble starch (B) by rat intestinal  $\alpha$ -glucosidase.

A reaction mixture containing 0.1 ml of enzyme solution ( $5.4 \times 10^{-2} \mu\text{g}$  of protein for maltose,  $5.3 \times 10^{-2} \mu\text{g}$  of protein for soluble starch), 0.2 ml of Britton Robinson buffer, 0.2 ml of 0.42 mM maltose or 0.25 mM soluble starch was incubated at  $37^\circ\text{C}$ .

Table 2.  $pK$  values and heat of ionization ( $\Delta H$ ) of some groups present in proteins.<sup>8)</sup>

Group		$pK(25^\circ\text{C})$	$\Delta H(\text{kcal/mol})$
Carboxyl	$-\text{C} \begin{array}{l} \text{O} \\ \parallel \\ \text{OH} \end{array} \rightleftharpoons -\text{C} \begin{array}{l} \text{O} \\ \parallel \\ \ominus \end{array} + \text{H}^{\oplus}$	$\alpha$ 3.0~ 3.2	} $\pm 1.5$
		$\beta, \gamma$ 3.0~ 4.7	
Ammonium	$\oplus\text{-NH}_3 \rightleftharpoons \text{-NH}_2 + \text{H}^{\oplus}$	$\alpha$ 7.6~ 8.4	} 10~13
		$\epsilon$ 9.4~10.6	
Sulfhydryl	$-\text{SH} \rightleftharpoons -\text{S}^{\ominus} + \text{H}^{\oplus}$	7.5~10.3	6~7
Phenolic hydroxyl	$\text{C}_6\text{H}_5\text{-OH} \rightleftharpoons \text{C}_6\text{H}_5\text{-O}^{\ominus} + \text{H}^{\oplus}$	9.1~10.8	6
Imidazorium	$\text{HN}^{\oplus}\text{NH} \rightleftharpoons \text{HN}^{\oplus}\text{N} + \text{H}^{\oplus}$	5.6~ 7.0	6.9~7.5
Guanidinium	$-\text{HN}-\text{C} \begin{array}{l} \text{NH}_2 \\ \parallel \\ \oplus \\ \parallel \\ \text{NH}_2 \end{array} \rightleftharpoons -\text{HN}-\text{C} \begin{array}{l} \text{NH} \\ \parallel \\ \text{NH}_2 \end{array} + \text{H}^{\oplus}$	11.6~12.6	12~13

も可能なものとして解離基1はカルボキシル基 (標準  $\Delta H = -1.5 \sim 1.5 \text{ kcal/mol}$ ), 解離基2はイミダゾール基 (標準  $\Delta H = 6.9 \sim 7.5 \text{ kcal/mol}$ ) またはスルフヒドリル基 (標準  $\Delta H = 6 \sim 7 \text{ kcal/mol}$ ) のいずれかと考えられる。

### 3. メタノール添加の影響

推定した解離基を明確にするため, メタノールを添加し, pH-速度曲線に対する誘電率低下の影響を調べた。反応液組成は,  $pK_e$  測定の場合に準じ, 終濃度30%になるようにメタノールを加えた。

maltose を基質とした場合, 解離基1の  $pK_e$  値はアルカリ側へ移行し, 解離基2の  $pK_e$  値は, メタノール無添加の場合と同一であった (Fig. 3)。また, soluble starch でも maltose の場合と同様に解離基1の  $pK_e$  値は, アルカリ側へ移行し, 解離基2ではまったく変化しなかった。スルフヒドリル基のように解離に伴い新たに正, 負の電荷を生じる場合 ( $-\text{SH} \rightarrow -\text{S}^- + \text{H}^+$ ), 誘電率の変化の影響を受けやすいが, イミダゾール基のように解離の前後で電荷の変化がない場合 ( $+\rightarrow+$ ) には, 誘電率の変化の影響を受けにくいことから, 解離基2はイミダゾール

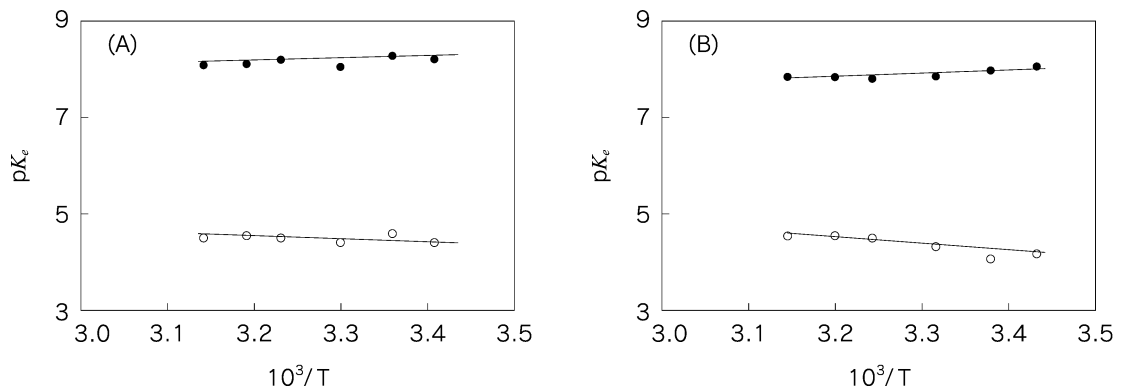


Fig. 2. Temperature dependence of  $pK_{e1}$  and  $pK_{e2}$  on hydrolyses of maltose (A) and soluble starch (B) by rat intestinal  $\alpha$ -glucosidase.  
 ○,  $pK_{e1}$ ; ●,  $pK_{e2}$

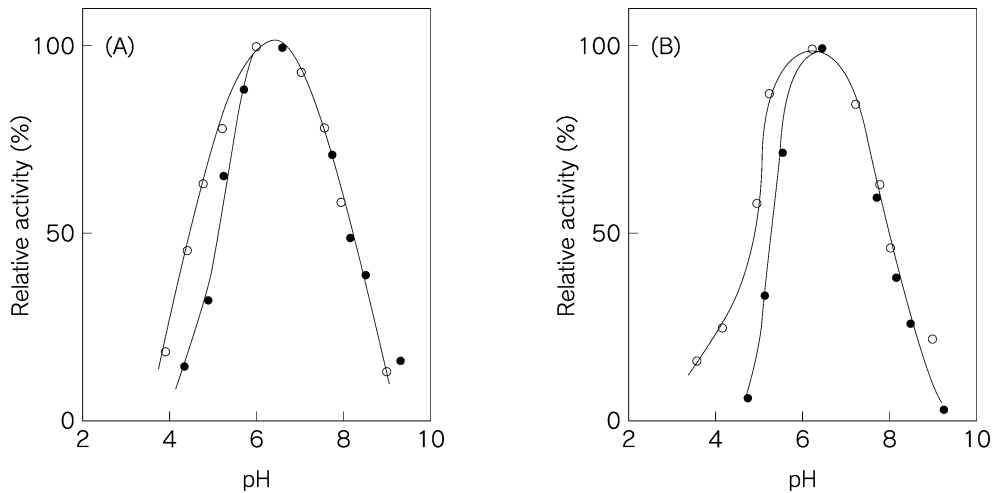


Fig. 3. Effect of methanol on hydrolyses of maltose (A) and soluble starch (B) by rat intestinal  $\alpha$ -glucosidase.  
 A reaction mixture containing 0.05 ml of enzyme solution ( $1.4 \times 10^{-4}$ mg of protein for maltose,  $6.7 \times 10^{-3}$ mg of protein for soluble starch), 0.2 ml of Britton Robinson buffer, 0.1ml of 0.85mM maltose or 0.5mM soluble starch and 0.15ml of methanol was incubated at 37°C.  
 ○, methanol 0%; ●, methanol 30%.

基であることが推定された。これらの結果を Table 3 にまとめて示した。

以上の結果より、maltoseあるいはsoluble starchのいずれを基質としても解離基1は、カルボキシル基、解離基2はイミダゾール基であると結論づけた。ラット小腸  $\alpha$ -glucosidase 以外でも中性域に至適 pH を有する  $\alpha$ -glucosidase において同様の活性解離基が報告<sup>19,29)</sup> されており、本酵素も典型的な中性  $\alpha$ -glucosidase の1つであることが確認された。

### 要 約

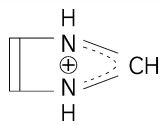
ラット小腸粘膜より TritonX-100 による可溶化および各種カラムクロマトグラフィー操作により  $\alpha$ -glucosidase を精製し、活性発現に直接関与する活性解離基を推定した。

$pK_e$  値(酸性側  $pK_{e1}$  およびアルカリ側  $pK_{e2}$ )はそれぞれ maltose を基質とした場合、4.52 および 8.19 であった。また同様に soluble starch を基質とした場合では 4.58 および 7.92 であった。解離熱 ( $\Delta H_{e1}$  および  $\Delta H_{e2}$ ) はそれぞれ maltose を基質とした場合  $-2.1$  kcal/mol および  $3.7$  kcal/mol であっ

Table 3. Characterization of essential ionizable groups of rat intestinal  $\alpha$ -glucosidase.

Substrate	Ionizable group (1)		Ionizable group (2)	
	$pK_{e1}$	$\Delta H$ (kcal/mol)	$pK_{e2}$	$\Delta H$ (kcal/mol)
maltose	4.52	-2.1	8.19	3.7
soluble starch	4.58	-2.0	7.92	5.4
$\Delta pK_e$ (30% MeOH)		+0.6		0

-COO <sup>-</sup>	
-------------------	---

た。また soluble starch を基質とした場合では-2.0 kcal/mol および 5.4 kcal/mol であった。メタノール添加により maltose または soluble starch のいずれを基質とした場合でも解離基 1 の  $pK_e$  値はアルカリ側へシフトしたが解離基 2 の  $pK_e$  値は変化しなかった。以上の  $pK_e$  値, 解離熱, メタノール添加の影響を総合的に判断して, 解離基 1 はカルボキシル基, 解離基 2 はイミダゾール基であると推定した。

#### 参考文献

- 1) Britton, H.T.S. and R.A. Robinson, 1931. The use of the antimony-antimonous oxide electrode in the determination of the concentration of hydrogen ion and in potentiometric titrations. The prideaux-ward universal buffer mixture. J. Chem. Soc., 1931: 458-473.
- 2) Caspary, W.F. and S. Graf, 1979. Inhibition of human intestinal  $\alpha$ -glucosidase-hydrolase by a new complex oligosaccharide. Res. Exp. Med., 175: 1-6.
- 3) Cogoli, A., A. Eberle, H. Sigrist, C. Joss, E. Robinson, H. Mosimann and G. Semenza, 1973. Subunits of the small-intestinal sucrase-isomaltase complex and separation of its enzymatically active isomaltase moiety. Eur. J. Biochem., 33: 40-48.
- 4) Dahlqvist, A., 1959. The separation of intestinal invertase and three different intestinal maltases on TEAE-cellulose by gradient elution, frontal analysis, and mutual displacement chromatography. Acta Chem. Scand., 13: 1817-1827.
- 5) Dahlqvist, A., 1960. Characterization of three different hog intestinal maltases. Acta Chem. Scand., 14: 1-8.
- 6) Dahlqvist, A., 1960. Hog intestinal isomaltase activity. Acta Chem. Scand., 14: 72-80.
- 7) Danielsen, E.M., H. Sjöström and O. Norén, 1983. Biosynthesis of intestinal microvillar proteins. Pulse-chase labeling studies on maltase-glucoamylase, aminopeptidase A and dipeptidyl peptidase IV. Biochem. J., 210: 389-393.
- 8) Dixon, M. and E.C. Webb, 1979. Enzyme Kinetics, In Enzymes, 3rd ed., pp.138-164, Longman Group Limited, London.
- 9) Flanagan, P.R. and G.G. Forstner, 1978. Purification of rat intestinal maltase/glucoamylase and its anomalous dissociation either by heat or by low pH. Biochem. J., 173: 553-563.
- 10) Flanagan, P.R. and G.G. Forstner, 1979. Enzyme activity in partly dissociated fragments of rat intestinal maltase/glucoamylase. Biochem. J., 177: 487-492.
- 11) Gitzelmann, R., T. Bachi, H. Binz, J. Lindenmann and G. Semenza, 1970. Localization of rabbit intestinal sucrase with ferritin-antibody conjugates. Biochim. Biophys. Acta, 196: 20-28.
- 12) Hauri, H.P., H. Wacker, E.E. Rickl, B. Bigler-Meier, A. Quaroni and G. Semenza, 1982. Biosynthesis of sucrase-isomaltase. Purification and NH<sub>2</sub>-terminal amino acid sequence of the rat sucrase-isomaltase precursor (pro-sucrase-isomaltase) from fetal intestinal transplants. J. Biol. Chem., 257: 4522-4528.
- 13) 廣海啓太郎, 1975. 入門酵素反応速度論 (小野宗三郎編), pp. 58-74, 共立出版, 東京.

- 14) Kelly, J.J. and D.H. Alpers, 1973. Properties of human intestinal glucoamylase. *Biochim. Biophys. Acta*, 315: 113-120.
- 15) Kolinska, J. and G. Semenza, 1967. Studies on intestinal sucrase and on intestinal sugar transport. V. Isolation and properties of sucrase-isomaltase from rabbit small intestine. *Biochim. Biophys. Acta*, 146: 181-195.
- 16) Kolinska, J. and J. Kraml, 1972. Separation and characterization of sucrase-isomaltase and glucoamylase from rat intestine. *Biochim. Biophys. Acta*, 284: 235-247.
- 17) Lee, L.M.Y., A.K. Salvatore, P.R. Flanagan and G.G. Forstner, 1980. Isolation of a detergent-solubilized maltase/glucoamylase from rat intestine and its comparison with a maltase/glucoamylase solubilized by papain. *Biochem. J.*, 187: 437-446.
- 18) Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall, 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 265-275.
- 19) Matsui, H., T. Yamada, Y. Someya and S. Chiba, 1983. Comparison between two neutral  $\alpha$ -glucosidases from pig's liver and serum. *Agric. Biol. Chem.*, 47: 1817-1822.
- 20) Miller, D. and R.K. Crane, 1961. The digestive function of the epithelium of the small intestine. I. An intracellular locus of disaccharide and sugar phosphate ester hydrolysis. *Biochim. Biophys. Acta*, 52: 281-293.
- 21) Miller, K.D. and W.H. Copeland, 1956. A blood trans- $\alpha$ -glucosylase. *Biochim. Biophys. Acta*, 22: 193-194.
- 22) 森内幸子, 山田和彦, 1979. 糖質の消化, 蛋白質核酸酵素, 24: 434-442.
- 23) Papadopoulos, N.M. and W.C. Hess, 1960. Determination of neuraminic (sialic) acid, glucose, and fructose in spinal fluid. *Arch. Biochem. Biophys.*, 88: 167-171.
- 24) Reisfeld, R.A., U.J. Lewis and D.E. Williams, 1962. Disk electrophoresis of basic proteins and peptides on polyacrylamide gel. *Nature*, 195: 281-283.
- 25) Sankaran, K., S. Sivakami, A.N. Radhakrishnan and M.W. Pandit, 1983. Studies on the size and shape of rabbit intestinal glucoamylase-maltase complex. *Biochem. J.*, 213: 719-725.
- 26) Semenza, G., 1976. In the enzyme of biological membrane, Vol. 3. (A. Martonosi ed.) p. 349. Plenum Press, New York.
- 27) Sivakami, S. and A.N. Radhakrishnan, 1973. Purification of rabbit intestinal glucoamylase by affinity chromatography on Sephadex G-200. *Indian J. Biochem. Biophys.*, 10: 283-284.
- 28) Sivakami, S. and A.N. Radhakrishnan, 1976. Kinetic studies on glucoamylase of rabbit small intestine. *Biochem. J.*, 153: 321-327.
- 29) Someya, Y., H. Matsui and S. Chiba, 1984. Chemical modification of histidyl residue in the active site of brewer's yeast  $\alpha$ -glucosidase. *Agric. Biol. Chem.*, 48: 873-879.
- 30) Sørensen, S.H., O. Norén, H. Sjöström and E. M. Danielsen, 1982. Amphiphilic pig intestinal microvillus maltase/glucoamylase. Structure and specificity. *Eur. J. Biochem.*, 126: 559-568.
- 31) 竹田靖史, 1986. 澱粉・関連糖質実験法 (中村道徳, 貝沼圭二編集), pp. 135-136, 学会出版センター, 東京.
- 32) Ugolev, A.M. 1965. Membrane (contact) digestion. *Physiol. Rev.*, 45: 555-595.

### Summary

Essential ionizable groups of rat intestinal  $\alpha$ -glucosidase were identified by using kinetic methods, after the enzyme was purified by solubilization with Triton X-100, and by column chromatography. The  $pK_e$  values for maltose or soluble starch as a substrate were as follows: 4.52 ( $pK_{e1}$ , acidic side) and 8.19 ( $pK_{e2}$ , alkaline side) for maltose, and 4.58 ( $pK_{e1}$ ) and 7.92 ( $pK_{e2}$ ) for soluble starch, respectively. The values of heat of ionization ( $\Delta H_e$ , kcal/mol) for maltose or soluble starch as a substrate were as follows:  $-2.1$  ( $\Delta H_{e1}$ , acidic side) and  $3.7$  ( $\Delta H_{e2}$ , alkaline side) for maltose, and  $-2.0$  ( $\Delta H_{e1}$ ) and  $5.4$  ( $\Delta H_{e2}$ ) for soluble starch, respectively. In either substrate used, the  $pK_{e1}$  values were increased by adding methanol, although the  $pK_{e2}$  values were not affected. Consequently, essential ionizable groups were identified as the carboxyl group for the acidic

side and the imidazolium group for the alkaline side.