中性脂肪分解酵素の研究*

白井厚治** 松岡信夫** 斎藤 康**

熊谷 朗** 溝渕真人***

I. はじめに

中性脂肪分解酵素は、長鎖の脂肪酸エステルを水解する Lipase と短鎖の脂肪酸エステルを水解する Esterase とに区別されている。

すでに、奥田ら¹⁾は、肝を用いた実験から肝 Esterase が、ある修飾をうけることにより Lipase に変換すること、すなわち Lipase は Esterase の modified enzyme であることを報告した。私達は既に血中 nonspecific carboxyl esterase が血管壁で Lipase に変換する結果を報告した²⁾。今回血中の中性脂肪の異化機構を明らかにする目的で heparin 静注後、血中に出現する Lipase と Esterase の性質について検討したので、報告する。

II. 実験方法

1. 実験動物と Post heparin plasma の調整

Wistar 系雄ラット200~250 g を用い、10 u/100 g 体重の heparin を静注し、5 分後に採血し、post heparin plasma を得た。実験目的に応じてこれを部分精製して用いた。

2. Lipase 活性の測定

反応液は、Triolein 1.0 mM, 1.25 $\mu\text{Ci/ml}$ glycerol tri [1- C^{14}] oleate (Specific Activity 50 $\mu\text{Ci}/\mu\text{mole}$), Triton X-100 0.2%, Bovine serum albumin 5%, 0.2 M NH_4Cl 緩衝液 (pH 8.0) の混液を超音波処理3分ない、その 100 μl に酵素液 100 μl を加え、37°C, 60分インキュベーションし、Belfrage の方法³⁾で、水解されたオレイン酸の放射活性を測定した。

III. Esterase 活性の測定

0.2 M glyceroltributyrate, 1 $\mu\text{Ci/ml}$ glycerol tri (1- C^{14}) butyrate (Specific Activity 50 $\mu\text{Ci}/\mu\text{mole}$) 含有のエタノール溶液25 μl に60 mM カリウムリン酸緩衝液 pH 8.0, 酵素液を加え、最終容量 500 μl とし、インキュベーションは、37°C, 60分ない methanol-chloroform-heptane (1.41 : 1.25 : 1.0 by vol) 混液3.25 ml を加え、反応停止し、さらに 0.1 N NaOH/1 ml を加える。5 分間振とう後、遠心 1,500 rpm 5 分ない、その上清 1 ml 中の水解された butyrate の放射活性を、Triton-Toluene (1 : 3) scintillator 8 ml を加え、測定した。この液相分配による脂質分離の有効性は、薄層クロマトグラフィーで確認した。

IV. 結果と考察

Heparin 静注後、血中の Lipase 活性及び Esterase 活性が、著明に上昇することが知られている⁵⁾。preheparin plasma と postheparin plasma を、Ultrogel ACA 34 で、ゲル濾過を行なうと、Fig. 1に示すごとく preheparin plasma では、tube No. 20付近に Esterase 活性のみがみられた（この画分を serum esterase fraction=SEF と呼ぶ）。postheparin plasma では、新たに tube No. 10 付近に Lipase 活性と Esterase 活性がみられた。すなわち新たにヘパリン静注後出現した Lipase と Esterase は、主に tube No. 10 付近に溶出されたことを示している（この画分を postheparin lipolytic activity fraction=PHLA-F と呼ぶ）。

次に Lipase と Esterase の性質の差について検討した。基質として methylbutyrate を用い、その濃度による SEF の水解活性を調べた (Fig. 2)。

* 1979年6月、第11回日本動脈硬化学会において発表

** 千葉大学医学部第2内科

*** 東京大学医学部神経内科

Fig. 1 Elution Profile of Pre and Postheparin Plasma on Ultrogel ACA34.

カラムサイズは、 1.8×36 cm のものを用い、 60 mM リン酸カリウム緩衝液 pH 8.0 で溶出し、 5 ml ずつ採取した。上段は、preheparin plasma の、下段は、postheparin plasma の溶出パターンを示す。後者の溶出パターンのうち、tube No 10 付近に溶出される画分を postheparin lipolytic activity fraction (PHCA-F) と呼ぶ。

Fig. 2 Effect of Esterase and Lipase on Methylbutyrate Hydrolysis.

種々の濃度の Methylbutyrate を含む 0.2 M 塩化アンモニウム緩衝液 (pH 8.0) 0.5 ml に、酵素液 0.5 ml を加え、 37°C 60 分インキュベーション後、Dole の方法④で遊離した脂肪酸を測定した。Esterase 酵素液は、preheparin plasma を ultrogel ACA34 (Fig. 1) でゲル濾過した No. 20 のフラクションを用い、Lipase 酵素液は、postheparin plasma を Ultrogel ACA34 (Fig. 1) で、ゲル濾過した No. 10 のフラクションを用いた。

Fig. 3 Effect of Trypsin Treatment on Esterase and Lipase of Postheparin Lipolytic Activity Fraction.

Postheparin plasma を Fig. 1 に示した Ultrogel ACA34 カラムクロマトグラフィーを行ない、分取した Tube No. 9 ~ 11 の画分に Trypsin を加え、 37°C 、30 分前処理した後、Trypsin inhibitor を加え Lipase 活性と Esterase 活性を測定した。

Fig. 4 Effect of Trypsin on Methylbutyrate Hydrolysis by Postheparin Lipolytic Activity Fraction.

Fig. 5 Effect of Serum on Trypsin-treated Postheparin Lipolytic Activity fraction.

Methylbutyrate 0.153 M までは、水解される基質の量の直線的な上昇がみられ、それより高濃度では、プラトーとなった。一方 PHLA-F に Esterase の阻害剤として知られている phenylmethylsulfonylfluoride を反応液中加入して同様に検討した。0.153 M 以上の濃度でも水解活性が直線的に上昇することが認められた。Methylbutyrate は、0.153 M までは、ミセルを形成しない状態でありこれより高濃度になると懸濁液となる。すなわち Esterase は、より hydrophilic な基質に対して作用し、Lipase は、hydrophobic な状態の基質に作用していることを推測させる。

次に PHLA-F を、Trypsin で処理し、以上のことを検討した。Trypsin 処理で、Lipase 活性は著明に低下し、Esterase 活性は低下がみられなかった (Fig. 3)。

次に Trypsin 処理された PHLA-F による Methylbutyrate、水解活性の変動を調べた。Fig. 4 に示すごとく基質の濃度をかえると、Trypsin 処理された PHLA-F の水解活性は、Methylbutyrate が、0.153 M までは、変りなかったが、0.153 M 以上の状態では、活性が低下した。このことは、Trypsin 処理で、Lipase が水に解けにくい状態の基質に作用しにくくなっていることを示している。

この Trypsin 処理した PHLA-F に血清を添加すると Fig. 5 に示すごとく Trypsin 1000 $\mu\text{g/ml}$ の

前処理で、ほぼ 100% Lipase 活性が低下したが、これに血清を添加すると、Lipase 活性の回復してることがみとめられた。このことは、Trypsin によって、一度 Hydrophobicity が低下した PHLA-F が、血清中の何らかの因子によって Hydrophobicity を回復し、Lipase 活性も回復したものと推測される。

今後、さらに Lipase と Esterase の反応機構および中性脂肪の処理機構の果たす役割について、検討を加えたい。

本研究の遂行にあたり、御協力を賜った鈴木しげりさんに深甚の謝意を表します。

文 献

- 1) Okuda, H. and Fujii, S.: Relationship between lipase and esterase. *J. Biochem.*, **64**: 377-385 (1968).
- 2) 白井厚治, 松岡信夫, 斎藤 康, 熊谷 朗, 村岡俊春, 奥田拓道: 高脂質血症と動脈硬化. 動脈硬化, **6**: 63-66 (1978).
- 3) Belfrage, P., Vauchan, M., Simple liquid-liquid partition system for isolation of labeled oleic acid mixture with glycerides. *J. Lipid. Res.*, **10**: 341-344 (1969).
- 4) Dole, V. P.: A relation between non-esterified fatty acids in plasma and the metabolism of glucose. *J. Clin. Invest.*, **35**: 150-154 (1956).
- 5) Shore, B. and Shore, V.: Heparin-released lipolytic esterolytic activities of human and Rabbit plasmas, *Am. J. Physiol.*, **201**: 915-922 (1961).

Summary

Studies on Triglyceride Hydrolysis in Blood

Kohji SHIRAI*, Nobuo MATSUOKA*, Yasushi SAITO*,
Akira KUMAGAI*, Masato MIZOBUCHI**

*The Second Department of Internal Medicine, School of Medicine, Chiba University

**Department of Neurology, Institute of Brain Research, University of Tokyo

Recently, from our laboratory, it was suggested that serum nonspecific carboxyl esterase was converted to lipase in the arterial wall¹⁾. The experiments were carried out to clarify characteristics of esterase and lipase of postheparin plasma. Lipase (triolein hydrolysis) and esterase (tributyrin hydrolysis) activities were increased in blood of rats after heparin injection. Hydrolysis of methylbutyrate by serum esterase was observed to be linearly increased at the lower concentration of methylbutyrate than that of 0.153M, but no increase was observed at the higher concentration than that of 0.153M. On the other hand, post heparin plasma, to which phenylmethyl sulfonyl fluoride as an inhibitor of esterase was added, scarcely hydrolysed 0.153M of lower concentration of methylbutyrate, but linearly hydrolysed it at 0.153M to 0.459M of methylbutyrate. These results suggest that lipase acts on hydrophobic condition of methylbutyrate and esterase acts on hydrophilic condition of it as a substrate, because 0.153M methylbutyrate or lower is soluble in water and the

higher concentration of methylbutyrate than 0.153 M is insoluble in water.

Remarkable decrease of lipase activity was observed by trypsin treatment but esterase activity was not. Hydrolysis of 0.153M or lower methylbutyrate as a substrate was unchanged by trypsin treated postheparin lipolytic activity fraction (PHLA-F) compared with nontreated one. But decreased hydrolysis by trypsin-treated PHLA-F was observed when higher concentration than 0.153 M of methylbutyrate was used as a substrate.

Lipase activity of PHLA-F, which was decreased by trypsin treatment, was recovered when serum was added. Above these results suggest that trypsin treatment or serum might modify the hydrophobicity of PHLA-F.

1) Kohji Shirai, Nobuo Matsuoka, Yasushi Saito, Akira Kumagai, Toshiharu Muraoka, Hiro-michi Okuda : Hyperlipidimia and Atherosclerosis., J.Jap. Atheroscler. Soc. 6 509(1978):

Key words: carbosyl esterase, lipase, postheparin plasma lipolytic activity, trypsin