ヒジキ不ケン化物中のフコステロール抽出残渣の 膵リパーゼ活性促進作用*

小村 毅, 長山英男**, 和田せつ

(仙台白百合短期大学, **東北大学抗酸菌病研究所)

昭和 48 年 7 月 4 日 受 理

Stimulation of Lipase Activity by the Residual Fraction after Extraction of Fucosterol from Hiziki Unsaponifiable Matter (Studies on the Lipase Activator in Marine Algae Part III)

By Takeshi KOMURA, Hideo NAGAYAMA** and Setsu WADA
Sendai Shirayuri Junior College, Izumi, Miyagi-ken; **The Research
Institute for Tuberculosis, Leprosy and Cancer,
Tohoku University, Sendai

In the previous report, fucosterol was found not to be mainly responsible for the remarkable accelerating effect of the unsaponifiable matter of *Hizikia fusiformis* (hiziki) on pancreatic lipase activity. Therefore, in the present report, the effect of the residual fraction (residue) after extraction of fucosterol from the unsaponifiable matter was investigated.

First, the residue was found to exhibit essentially the same remarkable (100~120%) accelerating activity as the unsaponifiable matter on lipolysis tested with triacetin as substrate under various conditions.

Further, the residue, when added with fucosterol, was observed to show a synergistic stimulation of the effect of fucosterol, which possesses only a weak activity by itself.

The residue was further separated into 12 fractions by preparative TLC, and each fraction was found to exhibit an activating effect essentially similar to that observed with the whole residue.

(Received July 4, 1973)

緒 言

筆者らはすでに、ヒジキ不ケン化物画分に豚膵リパーゼ活性を著明に促進する物質 (activator) が存在すること⁽¹⁾, その有効成分と予想して単離・同定した⁽²⁾褐藻類特有のフコステロールは、不ケン化物に比べごくわずかにしか促進作用を示さないこと, しかし反応条件を変えることにより促進作用がかなり増加することを報告した⁽³⁾. そこで、フコステロール以外の activator の本体をさらに追求したところ、フコステロール抽出の残渣画分に強い活性のあることを認めた.

今回は、この残渣そのものの促進作用を酵素動力学的に明らかにするとともに、そのフコステロールに対する相乗作用の有無、および残渣を TLC で分画した場合の活性の分布について検討した. その結果、この残渣はリパーゼ活性に対して、フコステロールよりもはるかに強い促進作用を示し、かつフコステロールとの間で、ある程度の相乗作用を示すことが明らかとなった. また、残渣を TLC で分けたいずれの画分にも、基本的には残渣と同じ程度の活性が存在することが判明した.

実 験 方 法

1. Activator の調製 本実験に用いた activator は、Fig. 1 に示すとおり、次の 2 段階に分けて調製し

* 海藻からのリパーゼ活性促進物質に関する研究 (第 3 報). 前報, 文献 (2) 参照.

Fig. 1. Preparation of Residual Fraction and its Fractionation by Preparative TLC.

た。

(1) 残渣画分: まず, 最初の残渣画分の調製は, 前報⁽²⁾で述べたヒジキ不ケン化物約 12g から, メタノールによる分別結晶法でフコステロールを主とする粗ステロールを分離した際の母液から, 約 5.5g の粘稠性黒褐色の物質を得た。以下, これを「残渣」と略して前半(実験 1 および 2)の activator として用いた。なお, この残渣には不ケン化物と比べ, TLC による定性およびジギトニン沈殿法⁽³⁾による定量からみて, フコステロールの存在がきわめて少ないことを認めた。

(2) 残渣の TLC 法による画分: 上述(1)で得た残渣のうち 900mg を, 0.5mm のケイ酸薄層プレート (20×20cm) 18 枚にスポットし, 比較的分離の良かった展開剤であるベンゼン-酢酸エチル (19:1) で 2 重展開後, 三塩化アンチモンまたは硫酸により発色させ, 生じたバンドを 12 のフラクションに分けて, おのおのかきとり, ガラスフィルターに移して, クロロホルムおよび酢酸エチルで充分溶出し, 濃縮・乾燥したものを TLC-フラクションとした。これを後半(実験 3)の activator として用いた。

2. 酵素活性の測定法 活性の測定は, Table I に示すように前報⁽²⁾と同様に行なった。なお activator の添加方法は, すべて残渣 1mg をエーテル 1ml に溶解して基質 (トリアセチン) 側に加えるこれまでの添加順序

(S-A) で行ない, また activator の対照としては, 同量のフコステロールおよび不ケン化物を同時に用いた。

実験結果

1. 脂リパーゼ活性に対する残渣の影響の検討

(1) 残渣による促進効果の経時的变化: まず, 残渣画分のリパーゼ活性に対する促進効果を, Table I の条件で, 酵素反応の時間を追いつながら, 不ケン化物およびフコステロールと比較して検討した。

その結果 Fig. 2 に示すとおり, activator 無添加の対

Table I. Reaction Mixture and Reaction Conditions for Assaying the Activator Effect on Lipase Activity

Substrate	triacetin	0.25ml
Activator*		1.0 mg
Enzyme	pig pancreatic lipase (Wako)	1.0 ml solution**
Buffer	0.2 M phosphate (pH 7.4)	1.0 ml
Distilled water		7.75 ml
Total volume: 10ml, at 27°C, 90 min		

* 1.0mg of residual fraction, unsaponifiable matter or fucosterol in 1.0ml of ether. ** Prepared from the suspension of 20mg of Wako enzyme in 1.0ml of distilled water, as in the previous report.⁽²⁾ The addition of activator was carried out in S-A order⁽²⁾ used thus far. Other reaction conditions were the same as described in the previous report.⁽²⁾

Fig. 2. Time Course of Effect of Residual Fraction on Lipase Activity.

Reaction conditions, except for incubation time, were the same as shown in Table I.

□—□ residue, ▲—▲ unsap. (hiziki unsaponifiable matter), ○—○ fucosterol, ●—● control (ether 1.0ml in place of activator).

照に比べ、フコステロールを加えた場合は、前報⁽²⁾と同様に促進効果が弱いのにに対し、残渣を加えた場合は、著しい促進効果が認められ、不ケン化物のそれとほとんど同じ値を示した。

(2) 各種基質濃度における残渣の促進効果：基質濃度を Fig. 3 に示すように変化させて、残渣の影響をみた結果、対照に比べ残渣は不ケン化物と同様に、基質濃度 0.6 ml/10 ml までは次第に促進効果が増加し、それ以

Fig. 3. Effect of Residual Fraction on Lipase Activity under Various Substrate Concentrations.

Reaction conditions, except for substrate concentrations, were the same as shown in Table I.

□—□ residue, ▲—▲ unsap., ○—○ fucosterol, ●—● control.

Fig. 4. Effect of Residual Fraction on Lipase Activity under Various Enzyme Concentrations.

Reaction conditions, except for enzyme concentrations, were the same as shown in Table I.

□—□ residue, ▲—▲ unsap., ○—○ fucosterol, ●—● control.

上では減少するのがみられた。これに対し、フコステロールの効果は、やはり低かった。

(3) 各種酵素濃度における残渣の促進効果：Fig. 4 に示すとおり、酵素濃度を変えて残渣の影響を検討した。この場合も同様に、残渣を加えた場合は酵素濃度とともに活性が著しく増加し、その効果はフコステロールよりも強く、不ケン化物とほぼ同じであることがわかる。

(4) リパーゼ活性におよぼす残渣濃度の影響：上述の検討により設定した基本条件、すなわち反応時間 90 分、基質濃度 0.25 ml/10 ml、酵素濃度 20 mg/10 ml を用い、残渣の濃度を変化させたときの効果を調べた。その結果、Fig. 5 から明らかなように、対照に比べ、残渣の濃度とともに活性が次第に促進され、0.5 mg 付近から平衡に達するのが認められた。この飽和点における対照の活性に対する促進効果は、不ケン化物が約 3.2 倍、フコステロールが約 1.5 倍であるのにに対し、残渣は約 3 倍であった。

2. リパーゼ活性におよぼす残渣とフコステロールとの相乗作用の検討

以上の種々の検討により、不ケン化物中の activator の主体は残渣にあることが明らかになったので、次にこの残渣とフコステロールとの間で、活性促進における相乗作用がみられるか否かについて検討した。

まず、残渣の一定量 (0.2 mg) にフコステロールの濃度を変えて加えた場合の影響は、Fig. 6 (a) のとおりである。すなわち活性は、フコステロール単独では濃度を増しても弱いのにに対し、これに残渣 0.2 mg を加えると

Fig. 5. Effect of Concentration of Residual Fraction on Lipase Activity.

Reaction conditions, except for residue concentrations, were the same as shown in Table I.

□—□ residue, ▲—▲ unsap., ○—○ fucosterol, ●—● control.

Fig. 6. Effects of Residual Fraction and Fucosterol on Lipase Activity.

Reaction conditions, except for the constant level of residue or fucosterol, were the same as described under Fig. 5.

(a) At the constant residue level (fucosterol added to a constant amount of residue): □—□ residue (0.2mg) + fucosterol, ●—● residue+fucosterol (calculated values, assuming additive effect of both activators), ■—■ residue (0.2mg), ○—○ fucosterol, ●—● control.

(b) At the constant fucosterol level (residue added to a constant amount of fucosterol): ○—○ fucosterol (0.1mg) + residue, ●—● fucosterol+residue (calculated), □—□ residue, ○—○ fucosterol (0.1mg), ■—■ control.

両者が仮に相加的作用を示すとした場合の計算値の点線 (●—●) とは異なり、実測値は実線 (□—□) のようになった。すなわち、フコステロール濃度の低い 0.1mg 付近では、明らかに有意と思われる相乗的效果を示し、0.5mg 以上ではむしろ阻害的作用を示した。

次に、逆にフコステロールの量を一定 (0.1mg) にして、残渣の濃度を変えて添加効果をみると、Fig. 6 (b) に示すとおり、残渣だけの活性にフコステロール 0.1mg を加えた場合は、点線 (●—●) で示した計算値と比べ、残渣 0.1mg 以上でやや相乗的作用がみられた。

3. 残渣を TLC で分画した場合の活性の分布について

上述により残渣とフコステロールは、ある濃度範囲において活性促進について相乗的作用を示すことが知られたので、次に残渣中の activator の有効成分をさらに検索するため、残渣を TLC によって分画し活性の分布を検討した。

(1) TLC-フラクションの薄層クロマトグラムおよび収量：まず予備実験として、残渣 (400mg) を TLC で 6 つのフラクションに分けて、活性の分布をみた結果、いずれのフラクションにもかなり強い活性がみられた。したがって本実験では、Fig. 1 に示した方法で 12

のフラクションに分画した。

得られた各 TLC-フラクションの収量・形状は Table II に、その定性 TLC は Fig. 7 にそれぞれ示した。その結果、量的に多いのは、フラクション 1 (以下、Fr. 1 と略す) から 3 (Fr. 3) までの油状液体と、*R_f* 値が原点付近の Fr. 12 の粘稠性物質の画分で、次に多いのは、Fr. 6 と 7 のフィトール画分 (このフィトールの同定は後述する) とフコステロールおよび未知のステロールを含む Fr. 8, Fr. 9 区分であった。また、この定性 TLC (Fig. 7) をみると Fr. 1 から Fr. 12 まで非極性の高い順に、比較的きれいに分離しているが、各フラクションはまだいくつかの成分からなっており、特に原点付近の物質が混在しているのがわかる。

(2) TLC-フラクションの活性：上述の各フラクション (Fr. 1 から Fr. 12 まで) の活性を Table I の条件で検討した結果を Fig. 8 (a) および (b) に示す。Fr. 1 から Fr. 12 までのいずれのフラクションも、activator 濃度が大体 0.5mg までは次第に活性が増加し、後は平衡に達するようであり、いずれも基本的には残渣とほぼ同じ促進効果 (mg 当り) を示した。

Table II. Yield of 12 TLC-Fractions

Fr.No.	Yield(mg)	Note
1	115	oily liquid (OL)
2	82	"
3	58	"
4	26	"
5	20	"
6	40	semi-OL, phytol fr.
7	30	semi-OL, phytol fr.
8	62	viscous, fucosterol fr.
9	60	" , unknown sterol fr.
10	28	"
11	33	"
12a*	74	"
12b*	165	"

Total: 793 mg/900 mg of residual fraction,
* solvent for elution: 12a: EtOAc, 12b: CHCl₃-MeOH (9:1).

Fig. 7. Thin-layer Chromatogram of 12 TLC-Fractions.

Res.: whole residue, St. (standard): Fuco.; fucosterol, Phyt.; phytol, β -Caro.; β -carotene. Solvent: benzene-EtOAc (19:1), double development, detection of spots: 25% SbCl_3 in CHCl_3 .

Fig. 8. Activating Effect of TLC-Fractions on Lipase Activity.

Reaction conditions were the same as described under Fig. 5.

(a) In the case of Fr. 1~Fr. 6: $\bigcirc$ — $\bigcirc$ Fr. 1, $\times$ — $\times$ Fr. 2, $\triangle$ — $\triangle$ Fr. 3, $\bullet$ — $\bullet$ Fr. 4, $\blacktriangle$ — $\blacktriangle$ Fr. 5, $\odot$ — $\odot$ Fr. 6, $\square$ — $\square$ residue, $\blacksquare$ — $\blacksquare$ fucosterol, $\bullet$ — $\bullet$ control.

(b) In the case of Fr. 7~Fr. 12: $\bigcirc$ — $\bigcirc$ Fr. 7, $\times$ — $\times$ Fr. 8, $\triangle$ — $\triangle$ Fr. 9, $\bullet$ — $\bullet$ Fr. 10, $\blacktriangle$ — $\blacktriangle$ Fr. 11, $\odot$ — $\odot$ Fr. 12a, $\bullet$ — $\bullet$ Fr. 12b, $\square$ — $\square$ residue, $\bullet$ — $\bullet$ control.

考 察

すでに前報⁽²⁾において、膵リパーゼ活性を著明に促進するヒジキ不ケン化物中の activator の主体は、フコステロールではないことが明らかとなったので、今回はそのステロール抽出の残渣について検討した。

その結果、本報告で述べたとおり、リパーゼ活性に対する残渣の促進効果は、フコステロールよりも強く、不

ケン化物のそれとほとんど同じであることが判明した。——たとえば経時的变化をみた場合、残渣が不ケン化物と同様の明瞭な促進作用を示したこと (Fig. 2), および酵素濃度を変えた場合も、濃度とともに顕著な促進効果を示したこと (Fig. 4) から明らかである。また、基質濃度を変えて検討した場合も、著明な促進効果の現われる濃度範囲 (0.1~0.6 ml/10 ml) が認められ (Fig. 3), これは不ケン化物のそれと全く同様であった。ただ 0.6 ml の濃度以上から、これら activator の促進効果が減少する理由については、目下推測の域を出ないが、この付近からトリアセチンが水に不溶になるので、水と基質の界面が生成されることに、なんらかの原因があるのではないと思われる。

さらに残渣の濃度の影響でも、リパーゼ活性に対し濃度とともに明瞭な促進作用を示したが、その程度は不ケン化物よりはごくわずかに低かった (Fig. 5)。これは、その後の実験 2 から、活性促進効果において、残渣と

interact するフコステロールの最適濃度が存在するためであることが判明した。すなわち残渣単独よりも、これにフコステロールを少量 (0.1 mg) 加えた方が、相乗的作用を示して促進効果を有意に増加させた (Fig. 6 (a) および 6 (b))。ただし、フコステロール濃度が高すぎると、むしろ阻害的作用を示すようになる。このように、両 activator の濃度が低い範囲で、相乗的作用が認められたことから、残渣中にフコステロールと interact する物質が存在することが推定されたので、この点は現在検討中である。

いずれにせよ、不ケン化物中の activator の主体は残渣にあることが明らかとなったので、残渣をさらに TLC で分けて活性の分布をみた。その結果、各フラクションの促進効果に多少の差はみられたが、activator 1 mg 当りでは、いずれも残渣と基本的にはほぼ同じ活性を示した (Fig. 8)。このことから、おそらくこれら activator の構造には、ある共通点があるものと考えられる。したがって、各フラクション間の活性の差は、Fig. 7 に示した

定性 TLC から推察すると, おのおのの精製の程度に基因するように思える。

しかし, フコステロールを含む Fr. 8 の場合は, 単離したフコステロール⁽²⁾よりも, 逆に高い活性を示した。このように他の物質が混在していた方が, 前述のような相乗作用 (Fig. 6(a) と Fig. 6(b)) により高い活性を示すこともありうるので, この精製と活性の関係については, さらに検討する必要がある。

また, その後 activator の本体をさらに追求する実験で, Fr. 6 と 7 から, 残渣あるいは不ケン化物よりも強い活性をもった物質 (油状) を TLC 法により単離し, これを定性 TLC から, ジテルペン的一种であるフィトール^(4,5)と推定した。この詳細な同定については, 目下 IR, MS 等により検討中である。なお, 他のフラクション中の activator の主成分については, 現在カラムクロマト法により分離・精製中である。

一方, これまでリパーゼ (エステラーゼを含む) 活性測定に基質としてトリアセチンのみを用いてきたが, これはいわゆる狭義^(8,9)の「エステラーゼ」と「リパーゼ」の両方の基質になりうる⁽⁸⁻¹⁰⁾ので, 現在われわれの見出した activator 作用の対象が両酵素のいずれであるかを, 基質特異性の面から検討中である。

要 約

ヒジキ不ケン化物中の activator の本体をさらに検索するため, 本報ではフコステロール抽出の残渣について検討した。すなわち, この残渣画分および残渣の TLC による分画について, 膵リパーゼ活性に対する影響を酵素動力学的に明らかにするとともに, その際, 残渣とフコステロールとの相乗作用の有無についても検討した。

(1) ヒジキ不ケン化物中の activator の有効成分は, フコステロールよりは, その抽出残渣にあることが種々の検討から明らかとなった。

(2) この残渣と低い濃度のフコステロールとの間で, リパーゼ活性促進効果において, 有意と思われる相乗的作用が認められた。

(3) 残渣を TLC 法で分けた 12 の画分のいずれにも, 基本的には残渣と同じ程度の活性 (mg 当り) が認められた。

本報告は昭和 48 年 4 月 2 日, 日本農芸化学会大会 (東京) において講演した。

なお, 本研究の費用の一部は昭和 47 年度科学研究費補助金によった。

- (1) 小村 毅, 長山英男, 和田せつ: 農化, **45**, 337 (1971).
- (2) 小村 毅, 長山英男, 和田せつ: 農化, **47**, 293 (1973).
- (3) D. R. Idler and C. A. Baumann: *J. Biol. Chem.*, **195**, 623 (1952).
- (4) 竹本常松, 竹下保義: 薬誌, **90**, 1057 (1970).
- (5) N. Ikekawa, M. Morisaki and K. Hirayama: *Phytochem.*, **11**, 2317 (1972).
- (6) 伊藤良二: 酵素研究法 II (赤堀四郎編), 朝倉書店, 1965, p. 1.
- (7) 藤井節郎, 奥田拓道: 蛋白質 核酸 酵素, **14**, 1294 (1969).
- (8) L. Sarda and P. Desnuelle: *Biochim. Biophys. Acta*, **30**, 513 (1958).
- (9) P. Desnuelle and P. Savary: *J. Lipid Res.*, **4**, 369 (1963).
- (10) P. Desnuelle: "The Enzymes," Vol. 12, ed. by P. D. Boyer, Academic Press Inc., New York and London, 1972, p. 575.