[農化 第 47 卷, 第 5 号, p. 293~299, 1973]

リパーゼ活性に対するヒジキ不ケン化物中の ステロールの影響*

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 47 年 11 月 4 日 受理

Effect on the Lipase Activity of the Sterol Isolated from
the Unsaponifiable Matter of *Hizikia fusiformis*
(Studies on the Lipase Activator in Marine Algae Part II)

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

The isolation of sterol as lipase activator from *Hizikia fusiformis* (hiziki) and its effect on lipase activity were described, except for the identification of the isolated sterol with fucosterol, which is to be reported elsewhere.

The sterol (hiziki sterol), comprising the major part of the sterols in hiziki unsaponifiable matter which had been shown in the previous report to have a remarkable activating activity, was isolated and its effect on lipolysis using triacetin as substrate and commercial pig pancreatic lipase as enzyme was examined in comparison with that of unsaponifiable matter under various conditions. With the saturated activator concentrations, the ratio of the accelerating effect to control (without activator) was 30% in the case of hiziki sterol and 120% in the case of unsaponifiable matter, respectively.

Thus, it was found that hiziki sterol, though expected to be responsible for the remarkable activating activity of the unsaponifiable matter, exhibited only a weak activation on lipase. However, when the order of addition of activator used thus far was reversed, the hiziki sterol proved to have a substantial accelerating effect (80%).

With other sterols, e.g. cholesterol and β -sitosterol etc., an accelerating effect similar to that of hiziki sterol was observed.

(Received November 4, 1972)

緒 言

最近, リパーゼ活性はある種の脂質が酵素蛋白に結合することにより発現することが, 組織リパーゼ^(1~5)および植物種子リパーゼ^(6,7)等で見出されてきた。筆者らは, このような酵素活性における脂質の役割に注目し, 前報⁽⁸⁾において, ヒジキ脂質中の不ケン化物分に豚膵リ

パーゼ活性を明瞭に促進する物質 (activator) の存在することを, 酵素動力学的に明らかにした。

本実験では, この activator の本体を明らかにするため, まず前報⁽⁸⁾で用いたヒジキ不ケン化物から, 予備実験で activator の有効成分と予想したステロールを単離することを試み, ついでこの物質のリパーゼ活性に対する影響について, 酵素動力学的解明を行なった。なお, ヒジキ不ケン化物から単離したステロールの同定については, 褐藻類特有のフコステロール^(9~11)であることを明

* 海藻からのリパーゼ活性促進物質に関する研究 (第 2 報)。前報, 文献 (8) 参照。

らかにし, 詳細は別に報告⁽¹³⁾中である。この単離したステロールは, 前報⁽⁸⁾の条件では, リパーゼ活性に対して, ごくわずかの促進作用を示すにとどまった。しかし, 反応条件を変えることにより, このヒジキステロールは不ケン化物の場合に, かなり近い促進作用を示すことが認められた。

また, このような activator としての促進作用が, 海藻ステロールにのみ特異的かどうかを明らかにするため, その作用を 2, 3 の他の動植物ステロールと比較した。

実験方法

1. 薄層クロマトグラフィー (TLC) 定性用 TLC は, 吸着剤としてシリカゲル G または H (Merk 社製) を用いて 250 μ の層の厚さにし, 溶媒系として石油エーテル-エーテル-酢酸 (80:20:1) またはベンゼン-酢酸エチル (5:1) を用いて展開した。一方, 分取用 TLC は 1 mm の層の厚さにし, 上述の展開剤で上昇法二重展開後, ステロールおよびそのアセテート区分をクロロホルムで溶出した。スポットの検出には, 濃硫酸または三塩化アンチモンクロロホルム溶液を用いた。

2. Activator の単離 前報⁽⁸⁾で activator として用いたヒジキ不ケン化物 (ステロール含量 [ジギトニン]⁽¹³⁾ およびトマチン沈殿法⁽¹⁴⁾) は, フコステロールとして約 55%) 約 12 g より, Fig. 1 に示すとおり, 結晶分別法, アセチル化法および TLC 法を中心とする分画法により, 約 700 mg のステロールを単離し, mp, $[\alpha]_D^{25}$, TLC, GLC, IR, MS および NMR により同定した (詳細は別報⁽¹²⁾を参照)。なお, activator 作用の比較には, 動植物界に存在するステロール, すなわち動物界からコレステロール (東京化成製特級), 植物界から β -シトステロール (国産化学製) およびスチグマステロール (東京化成製特級) をそれぞれ用いた。

3. 酵素および基質 酵素は今回は, 和光純薬製 (Wako) の豚膵リパーゼのみを用いた。その理由は前報⁽⁸⁾で明らかのように, 起源の同じ Wako (この酵素はその後, 小麦胚リパーゼではなく, NBC 由来の豚膵リパーゼであることが明らかになったので, 訂正としてすでに本誌 45 巻, 第 9 号, 記事 N 108 (1971) に掲載済み) と NBC (NBC 製 Porcine 448) の 2 酵素間に, ヒジキ不ケン化物の促進作用に基本的な差が認められなかったからである。基質は, トリアセチンを用いた。

Fig. 1. Isolation of Activator from the Unsaponifiable Matter in *Hizikia fusiformis*.

*Estimated by the precipitation methods with digitonin⁽¹³⁾ and tomatine.⁽¹⁴⁾

**Solvent system for preparative TLC (1 mm layer of silica gel G): (a) petroleum ether-ether-acetic acid (80:20:1), (b) benzene-ethyl acetate (5:1).

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

Substrate	triacetin	0.25 ml
Buffer	0.2 M phosphate buffer	1.0 ml
Activator*		1.0 mg
Enzyme**	pig pancreatic lipase (Wako)	20.0 mg
pH		7.4
Temperature		27°C
Time		90 min
Total volume: 10 ml		

*1.0 mg of hiziki sterol or unsaponifiable matter was dissolved in 1.0 ml of ether. Before the addition of enzyme, activator was added to substrate and mixed with buffer.

**Enzyme preparation (Wako) was suspended in 1.0 ml cold distilled water by using a Teflon homogenizer and, after centrifugation, the supernatant containing 3.6 mg of protein and 0.2 mg of lipids was used as the enzyme solution.

The activity was measured by titrating the acid liberated from triacetin with 0.05 N alcoholic NaOH (end point, pH 9.5) with a pH-stat and recorder (TOA type HS-2 A). Other conditions were the same as described previously.⁽⁸⁾

4. 酵素活性の測定法 肝リパーゼ活性の測定は、基本的には前報⁽⁸⁾に従い、反応液組成および反応条件は Table I のとおりである。活性は反応により遊離する酸を、今回は東亜電波の HS-2 A 型 pH スタットによるアルカリ滴定法で測定し、終点を pH 9.5 とした。酵素は今回はテフロンホモジナイザーを用いて懸濁し、遠心分離により不溶部を除いた上澄液を酵素液として用いた。これには、酵素標品 20 mg 当り 3.6 mg の蛋白質のほか、0.2 mg の脂質が含まれていた。この脂質の分離・同定については、今回は行なわなかった。なお、脂質の定量は Folch の水洗法⁽¹⁶⁾に準じ、酵素液を凍結乾燥後、テフロンホモジナイザーを用いて、クロロホルム-メタノール (2:1) で 4~5 回抽出し、その抽出物の重量を測定して求めた。その他の反応液の振盪条件等は、前報⁽⁸⁾と同様に行なった。これらの反応条件におけるヒジキステロールの促進効果の検討に際しては、同時に前回有効と認めた不ケン化物画分を activator の対照として用いて比較した。

実験結果

1. 単離したヒジキステロールの同定

ヒジキ不ケン化物より分離・精製したステロールを、標品フコステロール (東京工大天然物化学研の池川氏⁽¹⁶⁾が分離したもの) を用いて、次のように同定した。まず、このヒジキステロールの TLC は、Fig. 2 に示すと

Fig. 2. Thin-layer Chromatogram of the Sterol Isolated from Hiziki Unsaponifiable Matter.

1: standard fucosterol, 2: hiziki sterol, 3: unsaponifiable matter.

Solvent system: (a) petroleum ether-ether-acetic acid (80:20:1), (b) benzene-ethyl acetate (5:1), detection of spots: 25% SbCl_5 (in CHCl_3).

おり、標品フコステロールと同じ R_f 値を示す単一のスポットを与えた。また、その含量はヒジキ不ケン化物中の総ステロール (ジギトニンおよびトマチンと沈殿する) の大部分を占めることが、同様に TLC により認められた。ヒジキステロールの mp は $123.5\sim 124^\circ\text{C}$, $[\alpha]_D^{25}$ は -36° (CHCl_3) で、文献値⁽¹⁷⁾ (mp $123\sim 124^\circ\text{C}$, $[\alpha]_D^{25} = -38.5^\circ$) と良く一致し、かつこのものは GLC 分析でも、標品と同じ保持時間 (SE-30 のカラムでは 11.17 分, OV-17 では 10.15 分) の単一のピークを与えた。IR は標品フコステロールのスペクトル [$\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$: 3420 cm^{-1} (OH 基), 800 cm^{-1} と 840 cm^{-1} (Δ^6) および 820 cm^{-1} (Δ^{24})] と良く一致し、さらに MS も m/e 412 にきれいな分子イオン (M^+) ピーク、および m/e 314 に $\Delta^{24(28)}$ -ステロールに特徴的なピークを示し、標品のフラグメンテーションパターンと完全に一致した。NMR も同様に、標品とシグナルピーク [δ 値 (ppm): 0.73 (3H, singlet, CH_3), 1.63 (3H, doublet, $J=7\text{ Hz}$, $\text{C}=\text{CH}-\text{CH}_3$), 3.53 (1H, broad, CHOH), 5.20 (1H, multiplet, $\text{C}=\text{CH}-\text{CH}_3$) および 5.37 (1H, multiplet, $\text{C}=\text{CH}$)] が一致した。

以上の分析結果から、ヒジキステロールは褐藻類特有のフコステロール⁽⁹⁻¹¹⁾であると同定した。なお、詳しい同定は別報⁽¹²⁾を参照。

2. リパーゼ活性に対する activator の影響の検討

(1) Activator による促進効果の経時的変化:

Table I の条件で、反応時間を追って activator として

Fig. 3. Time Course of Activator Effect on Lipase Activity.

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

O—O + hiziki sterol (isolated sterol 1.0 mg), $\Delta-\Delta$ + unsap. (hiziki unsaponifiable matter 1.0 mg), $\bullet-\bullet$ control (ether 1.0 ml, in place of activator).

単離したヒジキステロールの影響を、不ケン化物と比較してみた。その結果、Fig. 3 に示すとおり、activator 無添加（エーテルのみ）の対照に比べて不ケン化物を加えた場合は、前報⁽⁶⁾と同様に、時間とともに基質の分解がさらに進み著明に促進されるのに対して、ヒジキステロールの場合は、ごくわずかな促進作用が認められるに留まった。以下の実験には、反応時間を 90 分とした。

(2) 各種基質濃度における activator の促進効果：基質濃度を、反応液 10 ml 中のトリアセチンの ml 数で示して、Fig. 4 に示すように変化させ、この条件においてヒジキステロールの影響を検討した。この場合も上と同様に、促進効果は不ケン化物が著しいのに対し、ヒジ

Fig. 4. Effect of Activator on Lipase Activity under Various Substrate Concentrations.

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

○—○ +hiziki sterol, △—△ +unsap., ●—● control.

Fig. 5. Effect of Activator on Lipase Activity under Various Enzyme concentrations.

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

○—○ +hiziki sterol, △—△ +unsap., ●—● control.

キステロールはわずかである。以下の実験には、基質濃度 0.25 ml/10 ml を用いた。

(3) 各種酵素濃度における activator の促進効果：酵素濃度を変えてヒジキステロールの影響をみた結果は、Fig. 5 のとおりである。この場合も、活性は濃度とともにあまり増加せず、その効果が不ケン化物に比べ、それほど強くないことがわかる。以下の実験には、20 mg/10 ml の酵素濃度を用いた。

(4) リパーゼ活性におよぼす activator 濃度の影響：上述の検討により確立した諸条件、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、ヒジキステロール濃度を変えて、その促進効果を検討した。その結果、Fig. 6 に示すとおり、これまでと同様に、無添加の対照に比べわずかではあるが、ステロール濃度とともに次第に促進し、0.5 mg から平衡に達するのが認められる。この飽和点での促進効果は、不ケン化物が 120~130% であるのに対し、ヒジキステロールは 30~40% であった。

3. リパーゼ活性におよぼす activator 添加順序の影響

以上により、ヒジキステロールはリパーゼ活性に対して、ごくわずかしき促進作用を示さないことが判明したので、次に activator 添加の条件を検討してみた。すなわち、これまでの Table I に示した条件のように、基質に activator を加えて振盪混合後、酵素を加えて反応させる（この反応条件を以下、S-A と略す）方法を変更して、今回は良く混合した基質溶液に、activator と酵素を同時に加えて反応させ（以下、E-A と略す）、その

Fig. 6. Effect of Activator Concentration on Lipase Activity.

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

○—○ +hiziki sterol, △—△ +unsap., ●—● control.

影響を次の諸条件により検討した。

(1) 経時的变化：反応時間を追って，activator 添加順序による促進効果の影響をみた。その結果 Fig. 7 に示すとおり，対照に比べて，ヒジキステロールを E-A の添加順序で加えた場合は，時間とともに基質の分解がさらに進み，これまでの S-A の条件よりも，かな

Fig. 7. Effect of the Order of Activator Addition on Lipase Activity: Its Time Course.

Reaction conditions, except for the changed order of activator addition, were the same as described under Fig. 3.

a) In E-A order (enzyme and activator added after mixing substrate with buffer; a new order of addition): ●—● +hiziki sterol, ▲—▲ +unsap., ■—■ control.

b) In S-A order (enzyme added after mixing substrate and activator; the order used thus far): ○—○ +hiziki sterol, □—□ control.

Fig. 8. Effect of the Order of Activator Addition on Lipase Activation under Various Substrate Concentrations.

Reaction conditions, except for the changed order of activator addition, were the same as described under Fig. 4.

a) In E-A order: ●—● +hiziki sterol, ▲—▲ +unsap., ■—■ control.

b) In S-A order: ○—○ +hiziki sterol, □—□ control.

り明確な促進効果が認められ，かつ不ケン化物のそれに近づいた。

(2) 基質濃度：Fig. 8 に示すように，基質濃度を変えた場合，E-A の条件では基質濃度 0.5 ml/10 ml までは，かなりのヒジキステロールによる促進効果の増加が認められた。

(3) Activator 濃度：2-(4) と同じ条件 (反応時間 90 分，基質濃度 0.25 ml/10 ml，酵素濃度 20 mg/10 ml) で，ヒジキステロール濃度を変えて，その添加順序の影響をみた。その結果，Fig. 9 に示すとおり，E-A

Fig. 9. Effect of Activator Concentrations on Lipase Activity in Two Adding Orders.

Reaction conditions, except for the changed order of activator addition, were the same as described under Fig. 6.

a) In E-A order: ●—● +hiziki sterol, ▲—▲ +unsap., ■—■ control.

b) In S-A order: ○—○ +hiziki sterol, △—△ +unsap., □—□ control.

Fig. 10. Activating Effect of Other Sterols on Lipase Activity.

Reaction conditions were the same as described under Fig. 9.

a) In E-A order: ▲—▲ +unsap., ●—● +cholesterol, ⊙—⊙ +β-sitosterol, ×—× +stigmasterol, ■—■ control.

b) In S-A order: △—△ +unsap., ○—○ +cholesterol, ⊗—⊗ +β-sitosterol, ⊠—⊠ +stigmasterol, □—□ control.

の条件では、濃度とともにかなり促進し、対照に対する飽和点での促進効果は 60~80% となり、S-A の条件より増加することが認められた。一方、不ケン化物の場合は E-A の条件にしても、S-A の場合の効果と変わらない。

4. リパーゼ活性におよぼす他のステロール類の影響

上述の結果から、反応条件を変えることにより、ヒジキステロールにも明らかにリパーゼ活性促進作用のあることがわかったので、海藻（ヒジキ）以外に、動植物界に存在する代表的なステロールについて、その作用を検討した。すなわち、動物ステロールとしてコレステロール、植物ステロールとして β -シトステロール、およびスチグマステロールを用いて比較した。その結果 Fig. 10 に示すとおり、 β -シトステロールおよびスチグマステロールの促進効果は、これまでの S-A の条件では弱い、E-A の条件にすると強くなるという点で、海藻ステロールであるヒジキステロールと共通の挙動を示した。一方、コレステロールの場合は、S-A の条件でも E-A の条件でも同じ促進効果（飽和点で 70~80%）を示し、この点不ケン化物の効果に似た挙動を示した。

考 察

リパーゼ活性に対し、著明な促進効果を示すヒジキ不ケン化物の本体について検索するに当り、まずヒジキ不ケン化物中、ステロールの占める割合は約 55% で比較的多いので、最初、予備実験として粗ステロールを用いて、リパーゼ活性促進効果をみた。その結果、この粗ステロールの段階で、すでにかんりの促進効果がみられたので、おそらく、これが activator の有効成分であろうと予想して本実験に入った。

しかし、本報告のとおり、不ケン化物から精製・単離したヒジキステロールは、最初の予想に反して、ごくわずかしかりパーゼ活性に対し促進作用を示さないという結果になった。——たとえば、基質濃度を変えて検討した場合、不ケン化物では、前報⁽⁸⁾と同様の著明な促進効果の現われる濃度範囲が認められたのに対し、ヒジキステロールでは、このような明瞭な効果は認められなかった (Fig. 4)。また、酵素濃度を変えた場合も同様で、不ケン化物では、濃度とともに著しい促進効果がみられるのに対して、ヒジキステロールでは、その効果は弱く、かつほとんど増加しない。すなわち、低い酵素濃度で、すでにヒジキステロールの促進効果が飽和に達するもの

と思われる (Fig. 5)。これに関連して、activator 濃度の場合でも対照に比べ、0.5 mg/10 ml までの活性の増加はあまり明瞭ではなく、低い濃度 (0.25~0.5 mg/10 ml) で、すでに平衡に達する (Fig. 6)。

このように、ヒジキステロールによる促進効果は、きわめて弱い。しかし、activator 添加順序を変えることにより、この促進効果はこれまでの条件 (S-A) の約 2~3 倍に増加し、不ケン化物のそれに、かなり近づくことがわかった (Fig. 7~9)。このように、あらかじめ基質と混合するよりも、酵素と混合して反応させた方が促進効果が増加するということは、おそらくヒジキステロールは基質よりも、むしろ酵素に対して、より直接的に作用し、活性化するためであろうと思われる。一方、不ケン化物では、条件を変えても、そのような促進効果の変化がなかったことから、不ケン化物中にはヒジキステロール以外の、酵素に対してより強い親和性をもった物質のあることが示唆される。

いずれにせよ、このステロールだけでは前報⁽⁸⁾の不ケン化物による著明なリパーゼ活性促進作用を完全に説明することは、まだ不可能であり、このことはその後の実験からも、いっそう明らかになった。すなわち、今までの条件 (S-A) で比較した場合、活性の最も強いのはこのヒジキステロールではなく、むしろステロール抽出の残渣にあることが認められたのである。しかも、この残渣はヒジキステロールと相乗作用を示すことが認められた。この残渣中の有効成分の単離・同定およびヒジキステロールとの相乗作用を中心としたリパーゼ活性化機構については、目下検討中である。

最後に、今回分離した海藻ステロールと比較に用いた動植物ステロールの間には、促進効果に基本的な差はみられなかった (Fig. 9 と Fig. 10) ことから、海藻ステロールに限らず、ステロールであればリパーゼ活性に対して、同じような促進作用を示すのではないかということが暗示される。ただコレステロールは、条件により、やや挙動が異なっていた。すなわち、ヒジキステロールを含めた植物ステロールと異なり、これまでの反応条件 (S-A) でも、かなりの促進効果 (60~80%) を示した。この理由については、目下は推測の域を出ない。ただ植村ら⁽¹⁸⁾は、基質としてオリーブ油を用いたリパーゼ活性に対する表面活性剤の影響の実験で、コレステロールが弱い促進作用を示すことを認めている。従って、このようなステロール類の作用についてはリパーゼの acti-

vator として良く知られている界面活性剤⁽¹⁹⁻²¹⁾の役割の面からも、さらに詳しく検討する必要がある。

要 約

ヒジキ不ケン化物(ステロール含量: 55%)から、ステロールの大部分を占めるヒジキステロールを精製・単離し、その同定については、褐藻類特有のフコステロールであることを明らかにし、別報⁽¹²⁾中であるが、本報ではそのヒジキステロールの膜リパーゼ活性に対する影響について、酵素動力学的に検討した。

(1) 最初 activator の有効成分と予想したヒジキステロールは、不ケン化物と比べ、ごくわずかしかりパーゼ活性に対する促進作用を示さないことが、種々の検討から明らかとなった。

(2) しかし、これまでのヒジキステロールの添加順序を変えて反応を行なうことにより、その促進効果は、これまでと比べ約 2~3 倍に促進され、不ケン化物のそれとかなり近づくことが認められた。

(3) コレステロールや β -シトステロール等の動物ステロールにも、海藻ステロール(ヒジキステロール)とはほぼ同様な促進効果が認められた。

本報告は昭和 47 年 4 月 3 日、日本農芸化学会大会(仙台)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「奨励研究(A)」によった。

- (1) J. D. Schnatz and J. A. Cortner: *J. Biol. Chem.*, **242**, 3850 (1967).
- (2) H. Okuda and S. Fujii: *J. Biochem.*, **64**, 377 (1968).

- (3) 奥田拓道, 藤井節郎: 第 20 回酵素化学シンポジウム予稿集, p. 8 (1969).
- (4) 藤井節郎, 奥田拓道: 蛋白質 核酸 酵素, **14**, 1294 (1969).
- (5) 藤井節郎: 生化学, **43**, 1022 (1971).
- (6) 野田万次郎, 山田幸一, 松田英幸: 第 20 回酵素化学シンポジウム予稿集, p. 56 (1969).
- (7) 野田万次郎: 化学と生物, **7**, 590 (1969).
- (8) 小村 毅, 長山英男, 和田せつ: 農化, **45**, 337 (1971).
- (9) J. D. A. Miller: "Physiology and Biochemistry of Algae," ed. by R. A. Lewin, Academic Press Inc., New York, N. Y., 1962, p. 357.
- (10) J. Austin: "Advances in Steroid Biochemistry and Pharmacology," Vol. I, ed. by M. H. Briggs, Academic Press Inc., New York, N. Y., 1970, p. 73.
- (11) 竹本常松, 竹下保義: 薬誌, **90**, 1057 (1970).
- (12) T. Komura, S. Wada and H. Nagayama: *Phytochem.*, **13**, submitted.
- (13) D. R. Idler and C. A. Baumann: *J. Biol. Chem.*, **195**, 623 (1952).
- (14) J. J. Kabara, J. T. McLaughlin and C. A. Riegel: *Anal. Chem.*, **33**, 305 (1961).
- (15) J. Folch, M. Lees and G. H. Sloane Stanley: *J. Biol. Chem.*, **226**, 497 (1957).
- (16) N. Ikekawa, N. Morisaki and K. Tsuda: *Steroids*, **12**, 41 (1968).
- (17) K. Tsuda, S. Akagi, Y. Kishida, R. Hayatsu and K. Sakai: *Chem. Pharm. Bull.*, **6**, 724 (1958).
- (18) 植村光雄, 児玉篤樹, 加藤民彦, 尾藤忠旦: 名古屋工大学報, **20**, 451 (1969).
- (19) E. D. Wills: *Biochem. J.*, **60**, 529 (1955).
- (20) Y. Ota and K. Yamada: *Agr. Biol. Chem.*, **30**, 351 (1966).
- (21) 杉浦 衛, 小木曾太郎: 薬誌, **89**, 1289 (1969).