ヒジキ中の新 activator フィトールによる 膵エステラーゼ活性の促進*

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 49 年 9 月 20 日 受 理

Stimulation of Pancreatic Esterase Activity by Phytol Isolated from *Hizikia Fusiformis* (Studies on the Lipase Activator in Marine Algae Part V)

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, one of the three lipase-activators isolated from *Hizikia fusiformis* has been identified as phytol, a terpene, and considered to be a new, typical activator, most effective among them. However, only triacetin has been thus far used as the substrate for testing the activator activity with the crude porcine pancreatic lipase. Hence, it was attempted to see which enzyme activity, so-called lipase or esterase, in the crude preparation is susceptible to the stimulation of phytol, by the use of various substrates and inhibitors.

A remarkable stimulation with phytol was observed only when the soluble substrates such as methyl butyrate and monopropionin as well as triacetin were employed, while no stimulation was observed when emulsions of insoluble substrates such as tributyrin and olive oil were employed.

The esterase activity thus stimulated by phytol was distinguishable from the lipase activity by the effect of DFP; the esterase activity and its stimulation were significantly inhibited by DFP, while none of the lipase activity was affected.

Thus, the enzyme activity susceptible to phytol stimulation was found not to be the typical lipase activity but the esterase activity in the crude preparation. Therefore, this stimulation by phytol should be added as a new differentiating feature between pancreatic lipase and esterase activities.

The addition of NaCl or pre-heating of the enzyme at 60°C abolished the stimulation by phytol.

(Received September 20, 1974)

緒 言

筆者らはこれまで、ヒジキの不ケン化物中に存在する豚膵リパーゼの活性促進物質 (activator) の検索を行ない⁽¹⁾, 先に単離したフコステロール^(2,3)よりも活性の強い三つの activator をステロール抽出残渣^(4,5)から単離

し, その一つがジテルペン的一种, フィトールであることを初めて明らかにした⁽⁶⁾.

一方, 最近「リパーゼ」と「エステラーゼ」の区別を中心とした定義の提唱が膵臓⁽⁷⁻⁹⁾や肝臓等⁽¹⁰⁾の酵素について, 再び試みられるようになってきた。

そこで今回は, このように活性の強い, 一群の activator の典型とみなしうる新 activator-フィトールを用い, その作用の対象が酵素標品中のいわゆる「リパー

* 海藻からのリパーゼ活性促進物質に関する研究 (第 5 報). 前報, 文献 (6) 参照.

ゼ」なのか,あるいは狭義の「エステラーゼ」なのかを,基質特異性,熱安定性, pH 安定性および阻害剤の影響等の面から検討した.その結果,この activator の作用を受けるのは,典型的なリパーゼ活性ではなく,水溶性基質を分解するエステラーゼ活性であることが判明した.

実験方法

1. フィトールの単離 基本的には前報⁽⁶⁾と同じ方法でフィトールを単離し (Fig. 1), 以下の実験の activator として用いた. また,市販フィトール (東京化成, 特級) を同様に精製し, activator として併用した.

2. 試薬

1) 基質: メチルブチレート (特級), トリアセチン (特級), オリーブ油 (以上, 和光純薬), モノプロピオン (特級), モノオレイン, トリプロピオン, トリブチリン (特級), トリカプロイン, トリオレイン (以上, 東京化成), モノアセチン (半井化学薬品).

2) 阻害剤: *p*-クロロマーキュリ安息香酸ナトリウム (PCMB, 半井化学薬品, 特級), モノヨード酢酸 (IAA, 柳島製薬, 特級), 大豆トリブシンインヒビター (SBTI, Sigma 社, 2×結晶), ジイソプロピルフルオロホスフェート (DFP, BDH Chemicals 社).

3. リパーゼおよびエステラーゼ活性に対する activator 効果の測定法 Table I に示すとおり, エステラーゼの基質としては, これまでの水溶性のトリアセチンのほかに, メチルブチレート, モノプロピオンを, 水に十分溶解した基質濃度, つまり「溶液の状態」で用い, この分解に対するフィトールの効果を測定した. 一方, リパーゼの基質としては, 不溶性のトリブチリン, トリオレイン, オリーブ油の3種を用い, トリブチリンは水に懸濁した油滴状態 (非乳化法) で, 後者二つは,

Table I. Determination of Lipase- and Esterase-Stimulating Activities

Triacetin (substrate*)	0.25 ml
Phytol (activator)	1.0 mg
0.2 M Phosphate buffer (pH 7.4)	1.0 ml
"Wako" pancreatic lipase**	20.0 mg
Total volume: 10 ml, 90 min at 27°C	

* Other substrates used and their concs. (ml/10 ml):

- a) for esterase activity,
 methyl butyrate 0.15 } as water solutions
 monopropanoin 0.20 }
 b) for lipase activity,
 tributyrin 0.10 } as water-insoluble state
 triolein 0.50 } as gum arabic
 olive oil 0.50 } emulsions (10%)

** Enzyme conc. used (mg/10 ml): for triacetin and other esterase substrates, 20; for tributyrin, 4; for triolein and olive oil, 40.

アラビアゴムによるエマルジョン (Waring ブレンダー, 0~5°C で10分間攪拌) の状態でみた. その他, モノアセチン (溶液), モノオレイン (エマルジョン), トリプロピオン, トリカプロイン (共に水懸濁液) の分解活性に対しても同様に測定した.

Activator の促進効果は, Table II (注) に示すとおり, フィトール無添加のコントロール活性に対する添加時の活性増加の%で表した. 酵素濃度 (mg/10 ml) は, トリブチリンの場合 4.0, トリオレイン, オリーブ油の場合 40.0 (ただし, 後2者は 32°C で反応) としたほかは, すべてこれまでと同様 20.0 とした. なお, その他の反応条件は, すべてこれまでと同じである^(1,2).

4. 阻害剤および NaCl の効果の測定 阻害剤は, あらかじめ酵素液と次の条件で preincubate した後, 残存活性を測定 (Table I の条件) した. すなわち, PCMB, IAA, SBTI の場合は, pH 7.4 (リン酸塩緩衝液, 終濃度 0.02 M), 37°C, 30分 (ただし, SBTI は15分), DFP は pH 7.4 (0.1 M), 28°C, 120分反応させた. なお, フィトール無添加および添加の場合の阻害率は, それぞれ $(C-CI) \times 100 / C$, $(P-PI) \times 100 / P$ (ただし, Cはコントロールの酵素活性, CIは阻害剤作用後の残存酵素活性, Pはフィトール添加の酵素活性, PIは阻害剤作用後フィトールを加えた場合の残存酵素活性) から求めた.

NaCl の場合は, 酵素との preincubation なしに反応液に添加してその効果をみた.

Fig. 1. Isolation of Phytol from Hiziki.

実験結果

1. リパーゼ活性とエステラーゼ活性に対する activator 作用の基質特異性の面からの比較

まず、ヒジキより単離・同定したフィトールを activator として用い、Table I の測定条件で、リパーゼ活性とエステラーゼ活性に対する activator 効果を比較した。その結果 (Table II), メチルブチレートを用いたエステラーゼ活性では約 100%, モノプロピオンでは 50%, トリアセチンでは 280% の促進効果がみられた。これに対し、トリブチリン, トリオレイン, オリーブ油を用いたリパーゼ活性では、いずれも全く促進がみられなかった。なお、モノアセチンでは約 50%, トリプロピオン, トリカプロイン, モノオレインではすべて 0% であった。

2. リパーゼとエステラーゼの酵素学的性質の比較ならびにこれに対するフィトールの作用

上の結果から、フィトールはリパーゼ活性ではなく、エステラーゼ活性に対して促進作用を示すことが判明したので、以下、エステラーゼ活性の代表基質にはトリアセチンを、リパーゼ活性にはトリブチリンをそれぞれ用い、両酵素の酵素学的性質の差異について、フィトールの効果と関連させて検討した。

1) pH 安定性: まず、両酵素活性の pH 安定性について比較した。すなわち、酵素を Fig. 2 に示す各 pH で preincubate 後、すべて反応の至適 pH 7.4 に戻し、常法 (Table I) により残存活性とフィトールの促進効果を測定し、これらを pH 5.0 で処理した場合の残存リパーゼ活性に対する割合で表した。その結果 (Fig. 2),

Table II. Activation by Phytol of Lipolysis of Various Substrates

Substrates	Activity (ml of 1/20N NaOH)*1		Activation**	Note
	Control act. (-phytol)	Phytol act. (+phytol)		
Methyl butyrate	1.8	3.7	100%	} esterase activity
Monopropionin	2.7	4.3	50	
Triacetin	2.4	9.2	280	
Tributyryn	7.2	7.5	0%	} lipase activity
Triolein	10.8	10.0	0	
Olive oil	9.7	9.5	0	

* Determined by the methods shown in Table I.

** Calculated as follows:

$$\text{Activation (\%)} = \frac{\text{phytol activity} - \text{control act.}}{\text{control activity}} \times 100$$

Fig. 2. pH Stability of Enzyme Activities and their Activation by Phytol.

Esterase activity (against triacetin): ●---● control, ○—○ +phytol; lipase activity (against tributyrin): ▲---▲ control, △—△ +phytol.

* Relative % to the maximal control activity against tributyrin observed at pH 5.0.

Enzyme solutions were preincubated at each pH indicated at 40°C for 60 min, and added with phytol at the time of the assay, as shown in Table I. The buffers used: pH 3.0~8.0, MacIlvain; pH 8.0~10.0, Michaelis.

エステラーゼ活性の場合、コントロール(●)はブロードな pH 4~7 において安定なのに対し、フィトールの効果(○)は pH 5.0 で最大であった。一方、リパーゼ活性の場合は、逆にコントロール活性(▲)の方が pH 5.0 で最も安定であり、フィトールを加えると(△)むしろ低下し、この点エステラーゼ活性の場合と異なる挙動を示した。

2) 熱安定性: 熱安定性の比較を Fig. 3 に示した。図(a)は各温度において酵素を pH 5.0 で 15 分間 preincubate した場合で、エステラーゼ活性(●)は 45°C まで安定である。フィトールによりその活性(○)は著しく促進されるとともに、前処理温度の上昇に伴って活性化は次第に増大する傾向があるが、60°C ではほぼ完全に消失した。これに対しリパーゼ活性(▲)は、50°C まで安定で、かつ活性がフィトールでむしろ阻害される(△)点、エステラーゼ活性と差がみられた。

55°C, pH 7.0 における preincubation 時間と残存活性(%)の関係を表した失活曲線が図(b)である。すなわち、エステラーゼ活性の方がリパーゼ活性よりも失活

Fig. 3. Thermal Stability of Enzyme Activities and their Activation by Phytol.

(a) Effect of heating temperature. Enzyme solutions were preheated at the temp. indicated, at pH 5.0 for 15 min.

(b) Effect of incubation time. Enzyme solutions were preheated for the time indicated at pH 7.0 and 55°C.

* Relative % to the control activity or its phytol activation observed with the unheated enzyme.

Esterase activity (against triacetin): ●---● control, ○—○ +phytol; lipase activity (against tributyrin): ▲---▲ control, △—△ +phytol.

度が約 15~20% ほど高く、やや差がみられた。また、この際、フィトールによるエステラーゼの促進部分は、ほぼその酵素の失活度に応じて失われた。

3) 阻害剤の影響: 両酵素活性の区別を実験方法 4 により試みた (Table III)。PCMB は両者ともその濃度

Table III. Effects of Inhibitors on Enzyme Activities and on Phytol Activation

Inhibitors* (conc.)	Inhibition (%)			
	Esterase ^{a)}		Lipase ^{b)}	
	control	+phytol	control	+phytol
PCMB (M)				
1×10 ⁻⁵	16(11)**	13(8)	26	22
1×10 ⁻⁴	20(16)	24(10)	38	34
1×10 ⁻³	32(27)	32(30)	45	40
IAA (M)				
1×10 ⁻³	0	0	0	-10
1×10 ⁻²	0	5	-10	-18
SBTI (%)				
0.02	30	25	50	47
0.04	33	50	55	51

* Preincubated with enzyme at pH 7.4 (0.02 M phos. buffer), 37°C for 30 min (15 min, with SBTI).

^{a)} substrate: triacetin; ^{b)} substrate: tributyrin.

** (): Methyl butyrate was used as the substrate of esterase.

SBTI: soy bean trypsin inhibitor.

に従って、約 30~40% 阻害したが、阻害度はリパーゼの方がやや高い。

なお、メチルブチレートをを用いたエステラーゼ活性 (○) で示すの場合も、ほぼ同様に低い。同じ SH 試薬でも、IAA は両酵素活性とも全く阻害せず、むしろリパーゼ活性をわずかに促進するようである。SBTI による阻害は、リパーゼ活性の方がやや高い程度であった。また、フィトールの作用も、これと同程度の阻害を受けた。

次に、DFP の影響により両酵素活性の区別を試みた (Fig. 4)。なお、これまでの基質以外に、メチルブチレートおよびオリーブ油についても調べた。トリアセチンとメチルブチレートに対するエステラーゼ活性は、ともに DFP の濃度に従って

阻害され、これに応じフィトールの作用も減少した。一方、トリブチリンとオリーブ油を基質としたリパーゼ活性は、コントロール、フィトール添加ともに、ほとんど

Fig. 4. Effects of DFP on Enzyme Activities and on Phytol Activation.

Esterase activity: against triacetin (●---●) control, ○—○ +phytol, methyl butyrate (■---■) control, □—□ +phytol; lipase activity: against tributyrin (▲---▲) control, △—△ +phytol, olive oil (●---●) control, ○—○ +phytol.

* DFP was preincubated with the enzyme solution at pH 7.4 (0.1 M phosphate buffer), 28°C for 120 min.

Fig. 5. Effects of NaCl on Enzyme Activities and on Phytol Activation.

Esterase activity (against triacetin): ●---● control, ○—○ +phytol; (against methyl butyrate: ■---■ control, □—□ +phytol); lipase activity (against tributyrin): ▲---▲ control, △—△ +phytol.

* NaCl was added at the same time with the substrate and enzyme.

阻害されず、この点エステラーゼ活性の場合と明らかに区別できた。

4) NaCl の影響: Fig. 5 に示すように、エステラーゼのコントロール活性自体は、NaCl の濃度に従って増加するのに対し、そのフィトールの効果は促進される部分のみが逆に阻害され、2M では全く認められなくなった。一方、リパーゼ活性は、コントロール、フィトール添加ともに NaCl で減少し、この点エステラーゼ活性の挙動と異なった。また、メチルブチレートの場合も、トリアセチンの場合と同様であった。なお、このような NaCl の効果は KCl でも全く同様に認められた。

以上種々の検討から、フィトールはいわゆる典型的なリパーゼ活性ではなく、エステラーゼ活性に対して促進作用を示すことが明らかとなった。

考 察

筆者らは前回、ヒジキから腩リパーゼの新 activator としてフィトールを単離・同定したが、一方、Desnuelle ら⁽⁷⁻⁹⁾は以前から「腩リパーゼはエマルジョンおよびミセル溶液⁽¹¹⁾の基質に、エステラーゼは“真の溶液”状態の基質に作用する」と定義してきた。そこで今回は、このフィトールの作用を受けるのはいずれの酵素であるかを種々検討した。

その結果、その作用の対象はエステラーゼ活性であることが明らかとなった。すなわち、フィトールの促進効

果がリパーゼの典型的基質（エマルジョンの状態）では全く認められず、エステラーゼの基質（“溶液”の状態）を用いた場合にのみ顕著に認められた (Table II)。さらに、その対象がエステラーゼ活性であることは、DFP の影響 (Fig. 4) の面からもいっそう支持された。

熱安定性の比較 (Fig. 3) および阻害剤 (DFP を除く) の影響 (Table III) からは、両酵素活性は有意には区別できなかった。ただ、SH 阻害剤 (PCMB, IAA) による阻害度が低いという結果が、Singer らの報告⁽¹²⁾、および最近 Verger らが精製腩リパーゼでみた報告^(13,14)と良く一致したので、このエステラーゼもおそらくリパーゼの場合⁽¹⁴⁾と同様、SH 酵素ではないものと推定される。すなわち、このエステラーゼは、DFP で阻害されたことから、セリン酵素であろうと思われる。また、この酵素は、肝⁽¹⁵⁾または腩^(16,17) コレステロールエステラーゼ (DFP⁽¹⁶⁾と同様、PCMB⁽¹⁷⁾や IAA で 100% 阻害される⁽¹⁵⁾)、および肝カルボキシルエステラーゼ (PCMB で阻害されない⁽¹⁸⁾)とは異なるもので、おそらく Gjesing らのいう腩“プロエステラーゼ”⁽¹⁹⁾ (DFP, SBTI とともに、50%の阻害)ではないかと予想される。

NaCl の影響の実験 (Fig. 5) で、エステラーゼの基質のトリアセチン溶液が、NaCl の添加濃度とともに次第に会合または一部不溶になることが観察されたが、Desnuelle ら⁽¹⁰⁾はこのような会合体 (ミセル) に対してはリパーゼが良く作用するとしており、また一方、腩にイオン強度に弱いエステラーゼの存在 (これは、その性質が良く似ていることから Gjesing らの“プロエステラーゼ”⁽¹⁹⁾と同じものかもしれない)を見出している⁽⁷⁾。これらのことを考え合わせると、Fig. 5 のエステラーゼ活性自体が NaCl で増加し、フィトールによる促進部分だけが逆に打ち消されたのは、この種の基質にはリパーゼの方が優先的に作用するようになり、しかもイオン強度が高まるので、いっそう不安定となるためではないかと思われる。

この NaCl の場合のように、フィトール添加のエステラーゼ活性がコントロール活性とは異なる挙動を示す傾向は、pH 安定性 (Fig. 2) および DFP の影響 (Fig. 4) の実験でも認められた。すなわち、エステラーゼ活性は、フィトール添加により、pH 5.0 にシャープな曲線を示すようになり、DFP ではコントロール活性よりも阻害されにくく、むしろリパーゼ活性の場合の挙動に似ていた。これらの理由については、目下推測の域を出な

い。ただ、前述の Desnuelle ら⁽⁷⁻⁹⁾の説とは反対に、「リパーゼ自体はエステラーゼ活性も示す」とする Wills ら^(20,21)および藤井ら^(10,22)のそれぞれ脾と肝リパーゼでみた報告が一方にあるので、このことを考えると、このフィトールで促進されるエステラーゼ活性には、エステラーゼ以外にリパーゼが一部関与するようになるためではないかということが暗示される。いずれにせよ、これらは精製した酵素を用いて証明する必要がある問題と思う。

しかし、今回筆者らが「activator 作用を受ける酵素はエステラーゼであろう」と推論したおもな根拠は、フィトールの作用の対象となる酵素の基質特異性が、Desnuelle らが分離した脾エステラーゼのそれ^(7,8)とよく一致したばかりでなく、“溶液状態”の基質に作用するという点でもよく符合したからである。従って、このことから逆に、脾リパーゼとエステラーゼ作用の区別には、これまでの DFP の作用の差^(16,23)や基質の物理的存在状態の相違⁽⁷⁻⁹⁾以外に、今回筆者らの見出したフィトール効果の有無を新しく付け加えることができるであろう。

要 約

先にヒジキから単離した強力な新促進物質フィトールについて、本報ではその activator 作用の対象となる酵素活性が何であるかについて検討した。

(1) フィトールの作用を受けるのは、トリブチリン、オリーブ油等の不溶性基質を分解する、いわゆる典型的なリパーゼ活性ではなく、メチルブチレート、トリアセチン等の水溶性基質を分解するエステラーゼ活性であることが明らかとなった。

(2) DFP により、リパーゼ活性は全く阻害されないのに対し、エステラーゼ活性とそのフィトールによる促進は明瞭に阻害されたことから、エステラーゼ活性がフィトールの作用の対象であることがいっそう支持された。

(3) pH 安定性では、フィトール添加のエステラーゼ活性は、広い pH に安定なコントロールの活性とは異なり、pH 5.0 付近に鋭い曲線を示し、この点むしろリパーゼ活性と似た形を示した。

(4) 熱安定性では、エステラーゼ活性はリパーゼ活性よりやや不安定であり、そのフィトールによる促進は 50°C から減少し、60°C ではほぼ完全に失われた。

(5) NaCl 添加により、エステラーゼのコントロール活性自体は増加し、かつそのフィトールで促進される部分のみが逆に打ち消され、この点リパーゼ活性と異なる挙動を示した。

本報告の一部は昭和 48 年 9 月 30 日、日本生化学会大会⁽²⁴⁾(名古屋)、および昭和 49 年 4 月 3 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 48 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) T. Komura, S. Wada and H. Nagayama: *Agr. Biol. Chem.*, **38**, 2275 (1974).
- (4) T. Komura, H. Nagayama and S. Wada: 9th Int. Cong. Biochem., Stockholm, Abst. Book, p. 402 (1973).
- (5) 小村 毅, 長山英男, 和田せつ: 農化, **47**, 813 (1973).
- (6) 小村 毅, 長山英男, 和田せつ: 農化, **48**, 459 (1974).
- (7) L. Sarda and P. Desnuelle: *Biochim. Biophys. Acta*, **30**, 513 (1958).
- (8) P. Desnuelle and P. Savary: *J. Lipid Res.*, **4**, 369 (1963).
- (9) P. Desnuelle: "The Enzymes," 3rd ed., Vol. VII, ed. by P. D. Boyer, Academic Press, New York and London, 1972, p. 575.
- (10) 藤井節郎: 生化学, **43**, 1022 (1971).
- (11) B. Entressangles and P. Desnuelle: *Biochim. Biophys. Acta*, **159**, 285 (1968).
- (12) T. P. Singer and E. S. G. Barron: *J. Biol. Chem.*, **157**, 241 (1945).
- (13) R. Verger, L. Sarda and P. Desnuelle: *Biochim. Biophys. Acta*, **207**, 377 (1970).
- (14) *idem*: *ibid.*, **242**, 580 (1971).
- (15) P. Seshadri-Sastry and J. Ganguly: *Biochem. J.*, **80**, 397 (1961).
- (16) D. K. Myers, A. Schotte, H. Boer and H. Borsje-Bakker: *ibid.*, **61**, 521 (1955).
- (17) J. Hyun, H. Kothari, E. Herm, J. Mortenson, C. R. Treadwell and G. V. Vahouny: *J. Biol. Chem.*, **244**, 1937 (1969).
- (18) A. J. Adler and G. B. Kistiakowsky: *ibid.*, **236**, 3240 (1961).
- (19) E. C. Gjessing, R. Emery and J. P. Clements: *ibid.*, **234**, 1098 (1959).
- (20) E. D. Wills: *Biochem. J.*, **69**, 17 (1958).
- (21) E. D. Wills: "The Enzymes of Lipid Meta-

- bolism," ed. by P. Desnuelle, Pergamon, Oxford, 1961, p. 13.
- (22) H. Okuda and S. Fujii : *J. Biochem.*, **64**, 377 (1968).
- (23) P. Desnuelle, M. J. Constantin and L. Sarda : *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **38**, 625 (1956).
- (24) 小村 毅, 和田せつ, 長山英男 : 生化学, **45**, 752 (1973).
-