

氏名(本籍) 小むらたけし 毅  
学位の種類 農学博士  
学位記番号 農第305号  
学位授与年月日 昭和61年3月13日  
学位授与の要件 学位規則第5条第2項該当

学位論文題目 海藻の腴エステラーゼ活性促進物質に  
関する研究

論文審査委員 (主 査)

教授 松田和雄 教授 山下恭平

助教授 長山英男

# 論文内容要旨

## 第 I 章 緒 論

これまで海藻中に種々の生理活性物質が知られている中で、褐藻ステロール (“pelvesterol” と命名) には *in vitro* でトリアセチンを基質とする腓リパーゼ活性促進作用のあることが古く (1936) 白浜により報告されている。しかし、その後の研究は全くみられない。

一方、近年 (1969)、リパーゼの活性発現には脂質が関与すること、肝リパーゼが中性脂肪を介してエステラーゼと相互変換すること等が知られて来た。

従って著者は、海藻より、今日まで不明のままである “pelvesterol” を含む腓リパーゼ活性促進物質 (activator) を分離・精製し、その構造と作用機作を解明することは、腓脂肪分解酵素の新しい activator の発見の可能性があるのみならず、酵素の活性化機構の理解にも役立つと考えた。

そこで本研究は、食用海藻 (ヒジキ、アサクサノリ) の不ケン化物画分からのステロールを含めた activator の精製・単離とその構造並びに作用様式の解明を主目的とした。なお、activator の作用の対象となる酵素の性格 (腓リパーゼかエステラーゼか) についてもある程度の手掛りを得ようとした。

結果の要点は、海藻より単離した強力な新 activator の一つはフィトールであること、この activator の構造特異性は低く、レチノール、パラチオン等も同様の促進作用を示すこと、activator の作用の対象はリパーゼ標品中のエステラーゼ活性であること、及びその作用機構は他の脂肪分解酵素の活性化機構とは異なるものであること等である。

## 第 II 章 ヒジキ不ケン化物中の activator の存在

著者は、白浜の “pelvesterol” を含めてヒジキ中の activator の存在を全体的に追究する方針で whole の不ケン化物画分を出発物として検索を始めた。

まず、褐藻ヒジキ (*Hizikia fusiformis*) 10 kg より不ケン化物画分を抽出し、その豚腓リパーゼ活性 (基質トリアセチン) に対する作用の酵素動力学的検討を Table I の条件で試みた。その結果、この不ケン化物は種々の条件で明瞭な促進作用 (mg 当り 2.2 倍) を示した (Fig. 1)。

次に、この不ケン化物から、activator の本体と予想される主成分のステロ

ールを分別結晶，TLC 法等により単離し，これを mp,  $[\alpha]_D$ , TLC, GLC, IR, NMR及びMSの分析により，褐藻特有のフコステロールであると同定した。従って，白浜が fuco-sterol と予想した “pelvesterol” の本体が本研究により初めて明らかとなった。しかし，この fuco-sterol は意外にも極く僅かの促進作用（1.3倍）を示すにとどまった（Fig. 1）。なお，他の動植物ステロール類も同様であるが，コレステロールはかなりの促進作用を示した。

従って，fuco-sterol が不ケン化物中の activator の主体ではなかったため，その抽出の残渣を追求したところ，この画分により強い活性（2倍）が認められた。これをさらに TLC で分画して得た12の fraction のいずれにも基本的に活性が存在した。

### 第三章 新 activator の構造と促進作用

残渣画分中には複数の activator の存在が示唆されたので，これより活性の強い二，三の新 activator の単離を試みた。その結果，その一つがフィトールであることを，TLC, IR, MSの分析により初めて明らかにした。このフィトールは，出発物の不ケン化物または残渣画分よりもリパーゼ活性を顕著に促進（3.8 - 4.0倍）することが判明した（Fig. 2）。なお，フィトールにこの種 activator 作用の存在を証明したのは本研究が最初である。また，他の

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

Substrate	triacetin	0.25 ml
Activator*		1.0 mg
Enzyme	pig pancreatic lipase (Wako) solution**	1.0 ml
Buffer	0.2 M phosphate (pH 7.4)	1.0 ml
Distilled water		7.75 ml

Total volume : 10ml, at 27°C, 90 min

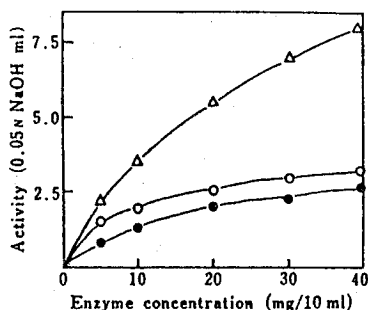


Fig. 1. Effect of Activator on Lipase Activity under Various Enzyme concentrations.

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

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

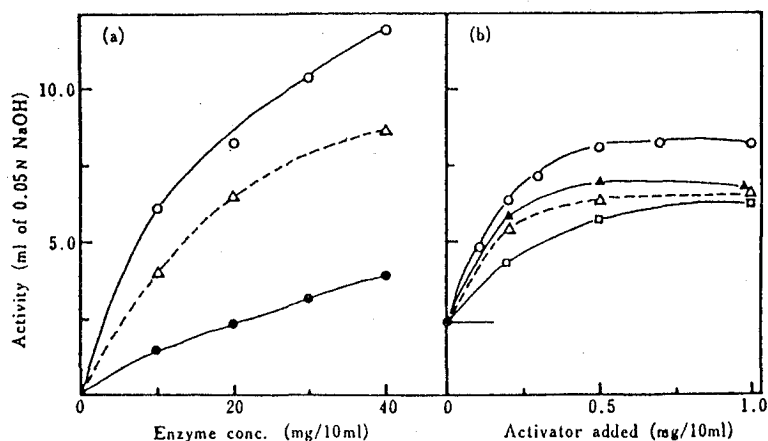


Fig. 2. Effect of Phytol on Lipase Activity.

(a) tested under various enzyme concentrations, (b) effect of phytol concentrations.

The reaction conditions, except for enzyme concentrations or phytol concentrations, were the same as shown in Table I.

○—○ +phytol, ●—● control, Δ---Δ +residue, ▲—▲ +unsaponifiable matter, □—□ +Fr.6.

activator A-3 と A-9 の構造は、それぞれ活性の極めて強い (3.9 倍) OH 基のないテルペン、及び精製前よりも活性が低い  $3\beta$ -OH の  $\Delta^5$ -ステロールであると推定した。

以上の事から、不ケン化物中の activator の主体は、ステロールではなくテルペンであることが判明した。

#### 第IV章 Activator の構造特異性

そこで、他のテルペン及びフィトール類似体を用いて activator の作用に対する構造の特異性について検討した。

1) テルペン類： この中では farnesol ( $C_{15}$ ) と retinol ( $C_{20}$ ) に最も強い促進能があり、従って activator の作用には炭素鎖長  $C_{15} - C_{20}$  が最適であった (Table II)。しかし、同じ炭素数でも cadinene ( $C_{15}$ )、manool ( $C_{20}$ ) 等の環状テルペンは極めて効果が低かった。位置異性体間には差がなかった。

2) 脂肪族アルコール類： 一連の飽和の場合 ( $C_6 - C_{20}$ )、 $C_{12} - C_{14}$  付近が最適 (2.8 倍) であり、しかし同じく長鎖の  $C_{18}$ 、 $C_{20}$  でも不飽和は極めて有効であった (3.2 倍)。これは分子が途中 ( $C_9$ 、 $C_{12}$  等) で折れ曲っている

ためと考えられ、この点フィトール及び retinol の場合（共に主鎖の C12 で曲る）と共通していた（Fig. 3）。一方、オレイン酸等のエステル及び Na 塩は無効であり、むしろフィトールの作用を阻害した。

### 3) レチノールの activator 作用

フィトールに極めて構造類似（Fig. 3）の retinol（ビタミン A）は、フィトールと同様の著明な促進作用を示すことが種々の検討から明らかとなった（Fig. 4）。ビタミン A（V. A）誘導体の効果は、V. A acetate, V. A > aldehyde > palmitate の順で、V. A 酸は無効であった。この点抗夜盲症作用の場合と類似した。さらに脂溶性ビタミン類の効果〔V. A > K<sub>1</sub> > D<sub>2</sub> > E > β-ionone, K<sub>3</sub>（殆ど無効）の順〕から、有効なのは核の部分ではなく、側鎖の部分と推定した。

以上の事から、この種 activator の構造特異性は極めて低く、いわゆる“群特異性”であり、基本的には最適炭素鎖長（主鎖で C<sub>12</sub> - C<sub>14</sub>）の存在と、不飽和の中性鎖状炭化水素鎖（アルキル基、イソプレレン鎖等）部分の必要性が明らかとなった。

### 4) パラチオンの activator 作用

上述の activator とは構造の異なる（Fig. 3）parathion（胥 non-specific

TABLE II. Stimulating effects of terpenes with different chain lengths on the esterase activity. The conditions were as described in the legend to Fig. 2, except that the concentrations (mg/10 ml) of terpenes used were 0.5.

Number of carbon atoms	Isoprenoid compound	Relative activation <sup>a</sup> (%)
10	Geraniol	8
13	β-Ionone	7
15	Farnesol	87
20	Retinol	92
20	Phytol	100
29	Fucosterol	24
30	Lanosterol	22
30	Squalene	20
40	β-Carotene	5

<sup>a</sup> % relative to the activation by phytol.

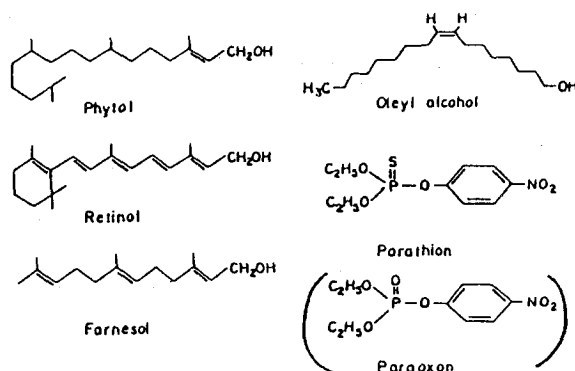


Fig. 3. Structures of the major activators.

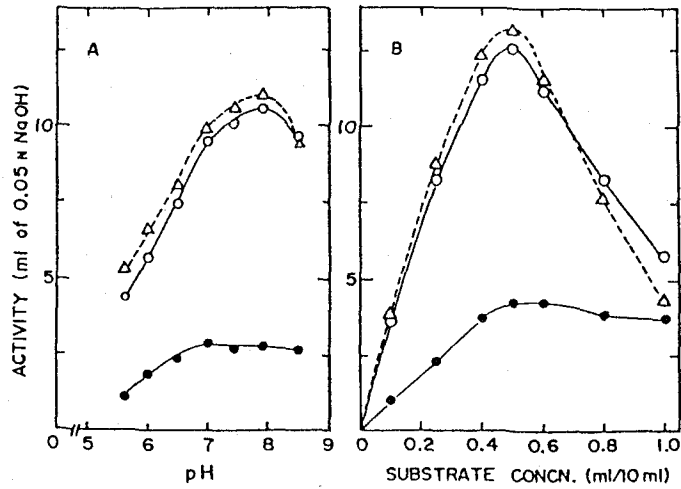


Fig. 4. Effect of retinol on the esterase activity tested at various reaction pH's (A) and substrate concentrations (B). The reaction conditions, except for the pH (using phosphate buffer) or substrate (triacetin) concentration, respectively, were the same as shown in Table I.  
 ●, control (without activator); ○, +retinol (1 mg); Δ, +phytol (1 mg).

lipase の阻害剤)もフィトール の場合 ( $1.3 \times 10^{-4} M$ ) と類似の促進作用 ( $5 \times 10^{-4} M$  で 3.7 倍) を示すことを初めて見い出した。ただし、殺虫作用の活性体である paraoxon (セリン酵素阻害剤) は逆に阻害作用 (98%) を示した。

## 第V章 アサクサノリ不ケン化物中の activator の存在

これまでの褐藻ヒジキと比較するため、紅藻アサクサノリ (*Porphyra tenera*) 中の activator について検索した。

ノリ (1 kg) から分離した不ケン化物は、全く促進作用を示さなかったが、これをさらに TLC 法で9つに分画すると、全く促進効果を示さない画分 (非 activator 群) の他に明瞭な効果を示す activator 群が存在した (Table III)。

この activator 群の中から、ヒジキの場合と同様、フィトールを単離・同定した。さらにこのフィトール画分の促進作用は、非 activator の添加により完全に消失した。従って、不ケン化物の非促進作用は、非 activator 群中の

“interferor” の存在によると推定した。この点でアサクサノリの場合はヒジキとは異なっていた。

Table III. STIMULATING ACTIVITY AND  
YIELD OF TLC-FRACTIONS

Fractions*	Yield (mg)	Stimulation <sup>b</sup> (%)	Note
F1	45.4	100	$\beta$ -Carotene fraction
F2	24.4	70	Pigment
F3	20.0	50	Semi-oil
F4	85.6	-10	Semi-solid
F5	74.4	-10	Oily liquid
F6	35.6	130	Phytol fraction
F7	17.6	80	Sterol fraction
F8	29.6	50	Pigment
F9	57.4	60	Viscous
Total	380.0 mg/400 mg unsaponifiable matter		

\* 9 fractions separated by TLC from unsaponifiable matter of *Porphyra tenera*.

<sup>b</sup> expressed as the % increase in TA-esterase activity compared with the control by the addition of 0.5 mg of each fraction.

## 第VI章 Activator作用の対象となる酵素の性格

前章までの結果より、海藻からリパーゼの強力な新 activator フィトールを得たが、近年、リパーゼとエステラーゼの定義が再び論議されて来た。そこで、これまでのトリアセチン水解で認められたフィトールの作用の対象は、両酵素のいずれであるかを基質特異性及び酵素化学的性質等の面から検討した。

### 1) 対象がリパーゼかエステラーゼか

まず、フィトールの作用は、不溶性基質（エマルジョン）を用いた典型的リパーゼ活性では全く認められず、水溶性基質（真の溶液）を用いたエステラーゼ活性でのみ著明に認められた（Table IV）。

さらに、メチルエステルを基質としたカルボキシルエステラーゼ（Ca Ease）活性もフィトールで促進され、Dixon らの報告した肝エステラーゼと類似の基質特異性のパターンを示した（Fig. 5）。

従って、この activator 作用の対象は酵素標品中のいわゆるリパーゼ活性ではなく、（カルボキシル）エステラーゼ活性であることが判明した。この事は、

さらにルブロール（界面活性剤）及び人血清（本研究が最初）の阻害作用（共にエステラーゼ活性のみに）の面からも一層強く支持された。

一方、このフィトール促進性 CaEase は、リパーゼよりも熱に弱く、SDS, Triton X-100 等で阻害される点、ラット豚コレステロールエステラーゼ (ChEase) の場合と良く類似していたが、 $Hg^{2+}$  で阻害された豚膵 ChEase とは明瞭に異っていた。また、最近 (1980), 人膵の精製 CaEase は、レチノールの脂肪酸エステ

ル、トリブチリン等を分解する ChEase と同一酵素であることが知られて来た。そこで、一つの試みとして、実際に精製 ChEase 標品を用いて activator 作用の対象が CaEase 活性も示す ChEase であるか否かを検討した。

## 2) 対象が ChEase である可能性

まず、粗製（豚及び牛）膵 ChEase 標品を用いた場合、トリアセチン (TA) 水解はこれまでの場合と同様、著明に (3.7 ~ 4.0 倍) 促進された (Fig. 6)。しかし、この促進作用は精製酵素標品 (牛膵) では全く認められなかった。

Table IV. Activation by Phytol of Lipolysis of Various Substrates

Substrates	Activity (ml of 1/20N NaOH)*		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:

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

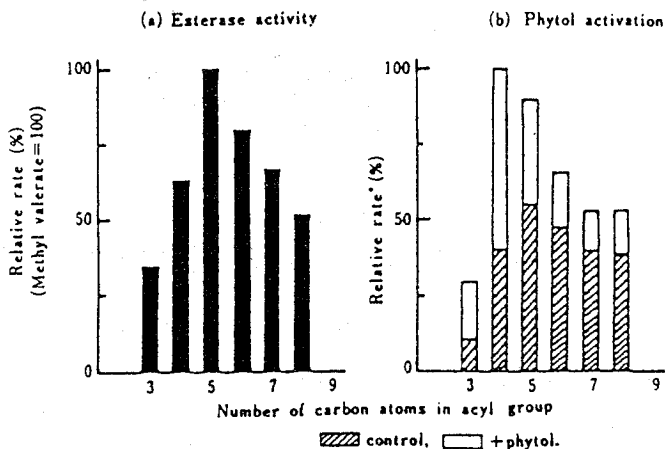


Fig. 5. Effects of Chain Length of the Acyl Group in Methyl Esters on Esterase Activity and on Phytol Activation.

\* The activity on methyl butyrate ( $C_4$ ) in the presence of phytol was taken as 100%.



次に、この原因の一つとして cofactor を考え、この面を検討した結果、牛豚 ChEase の場合は、粗酵素の熱水抽出物 (cofactor) の添加により、この促進作用は明瞭に回復することが判明した。胆汁酸塩でも同様に還元した (Fig. 7)。なお、典型的基質の水解では殆ど促進がなかった。ただし、豚豚酵素ではこのような回復は認められなかった。

故に、牛の場合、その対象となる酵素は、小分子基質 (TA) の水解にのみこの種 activator を cofactor (胆汁酸塩等) 共存下で要求する CaEase であると示唆された。

## 考 察

本研究は、海藻不ケン化物から豚エステラーゼの新 activator を単離し、その構造並びに作用様式を明らかにすることを主目的とし、これより酵素の性格及びその作用機構について示唆を得ようとしたものである。

ヒジキ不ケン化物中の activator の本体を検索したところ、白浜が予想した fucoesterol は活性が極めて弱く、“pelvesterol” の場合 (著明な促進) とは異なった。しかし、その抽出残渣中に一群の activator の存在及びその典型的な新

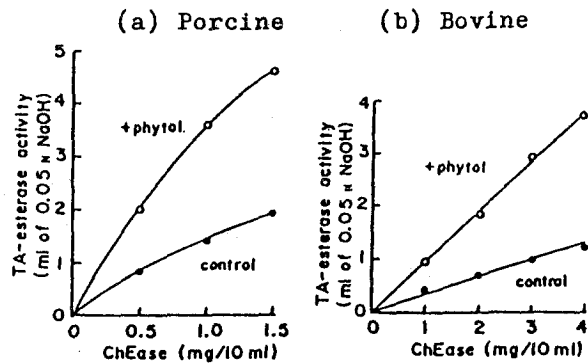


Fig. 6. Effect of Phytol on TA-esterase Activity of Crude Pancreatic ChEase.

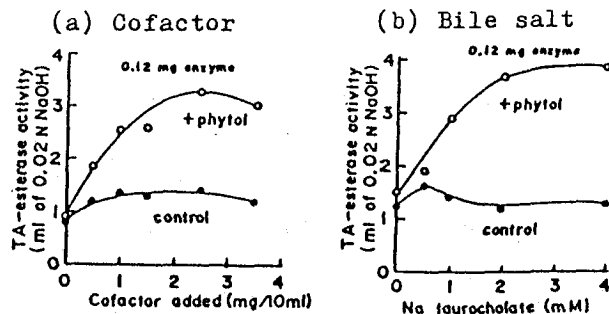


Fig. 7. Effect of Cofactors or Bile Salt on TA-esterase Activity of purified ChEase.

activator として不ケン化物よりも活性の強いフィトールの存在を初めて証明した。そして、これにより少くとも量的には不ケン化物の著明な促進作用が説明可能となり、本研究の当初の目的を達した。

Activator の構造特異性を検討中、それぞれ抗夜盲症作用、幼若ホルモン (JH) 活性、殺虫作用をもつことで知られている retinol, farnesol, parathion にもフィトールと同じ強い activator 作用のあることが分り、この点共通の新しい作用と思われる。

activator の構造特異性の研究から次の事が示唆された。即ち、activator 作用に対する最適炭素鎖長の存在とアルキル部分の必要性及び逆のアシル部分の拮抗的阻害作用から、酵素の疎水領域には activator が結合する primary acyl site が存在すること (Fig. 8), V. A, 不飽和脂肪族アルコール等にも共通して activator 作用があり、activator の構造特異性が広がったことが、一方の腓 CaEase の基質特異性 (V. A エステル等も水解) が広いことと良く符号すること等である。さらに、activator 作用の対象酵素は、特異的基質水解には activator を要求せず、溶液状小分子基質の水解にのみ activator を要求する CaEase とみられるに至った。故に、この作用は古典的鑄型モデルでは説明困難である。

従って、activator の作用機構を次のように理解した (Fig. 8)。この種 activator (フィトール, レチノール等) は、胆汁酸塩共存下で疎水性の低い基質 (TA) 溶液を “lipophile” 化し、本来の基質 (レチノールエステル, トリブチリン等の胆汁酸塩ミセル溶液) に近い形状とするため、非特異的基質 (TA) でも CaEase の触媒部位に “induced fit” が起こるようになると思われる。従って、これは他の

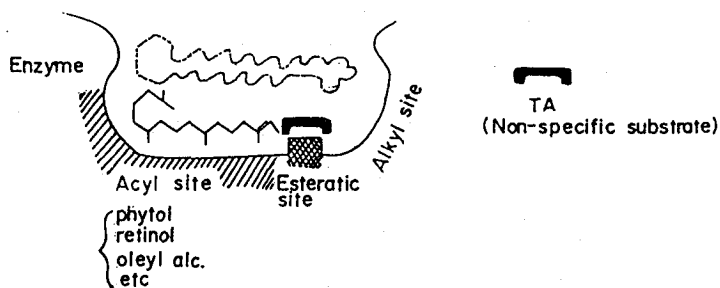


Fig. 8. Possible Configuration of Activator Binding Site.

リパーゼの脂質による修飾機構（酵素の相互変換）とは異なる新しいタイプの機構と考えられる。

この事は今後、酵素の精製と kinetics の面から証明する必要がある。

## 主 論 文

1. 海藻からのリパーゼ活性促進物質に関する研究（第一報） リパーゼ活性に対するヒジキ不ケン化物の影響  
小村 毅，長山英男，和田せつ  
日農化誌 45, 337 (1971)
2. Activation of Lipase by Unsaponifiable Matter from Marine Brown Alga *Hizikia fusiformis*  
T. Komura, H. Nagayama and S. Wada  
Abstracts of Papers, 9th International Congress of Biochemistry, Stockholm, p. 402 (1973)
3. 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  
日農化誌 47, 293 (1973)
4. ヒジキ不ケン化物中のフコステロール抽出残渣の腓リパーゼ活性促進作用  
小村 毅，長山英男，和田せつ  
日農化誌 47, 813 (1973)
5. The Identification of Fucosterol in Marine Brown Alga *Hizikia fusiformis*.  
T. Komura, S. Wada and H. Nagayama  
Agric. Biol. Chem. 38, 2275 (1974)
6. ヒジキ不ケン化物からのフィトールの単離とその腓リパーゼ活性促進作用  
小村 毅，長山英男，和田せつ  
日農化誌 48, 459 (1974)
7. ヒジキ中の新 activator フィトールによる腓エステラーゼ活性の促進  
小村 毅，長山英男，和田せつ

- 日農化誌 49, 149 (1975)
8. フィトールにより促進される膵エステラーゼの性格の検討  
小村 毅, 長山英男, 和田せつ  
日農化誌 49, 157 (1975)
9. *In Vitro* Stimulation by Retinol of Porcine Pancreatic Esterase Activity toward Esters of Short-chain Fatty Acids.  
T. Komura, S. Wada and H. Nagayama  
J. Biochem. 80, 525 (1976)
10. *In Vitro* Stimulation by Parathion of Porcine Pancreatic Carboxylesterase Activity toward Triacetin.  
T. Komura and H. Nagayama  
Agric. Biol. Chem. 45, 1019 (1981)
11. Effect of Unsaponifiable Lipid Components from the Red Alga *Porphyra tenera* on Pancreatic Carboxylesterase Activity toward Triacetin *In Vitro*.  
T. Komura and H. Nagayama  
Agric. Biol. Chem., 47, 383 (1983)

## 参 考 論 文

1. Thermal Isomerization of Sugars.  
H. Sugisawa, R. Usuki, M. Sasaki (Shida) and T. Komura  
Chem. and Ind. 812 (1966)
2. Thermal Degradation of Sugars. Quantitative Analysis of Sugars Components and Determination of Degree of Polymerization.  
H. Sugisawa and T. Komura  
Can. Inst. Food Technol. J. 3, 33 (1970)
3. 食餌組成と老化 (I)  
和田せつ, 西條まつえ, 高橋伸子, 小村 毅, 沼倉久枝, 五十嵐久子  
仙台白百合短大紀要 No.1, 31 (1970)

4. 食餌組成と老化（Ⅱ）

和田せつ，西條まつえ，高橋伸子，小村 毅，沼倉久枝，五十嵐久子  
仙台白百合短大紀要 No. 1, 36 (1970)

5. 食餌組成と老化（Ⅲ）

和田せつ，高橋伸子，小村 毅，内藤光子  
仙台白百合短大紀要 No. 3, 8 (1974)

6. カラムクロマトグラフィーによるヒジキの不ケン化物成分の部分精製

小村 毅

仙台白百合短大紀要 No. 7, 1 (1979)

## 審 査 結 果 の 要 旨

わが国でもっとも広く食用に供されている海藻の一つであるヒジキに腓膵リパーゼ活性促進作用を示す物質が含まれていることは、かなり以前に報告されているが(白浜, 1936), この物質がステロールであるということ以外、詳細な研究は行われていなかった。

著者はこの活性促進物質(activator)の本体を明らかにするため、顕著な促進作用を示したヒジキ抽出物の不鹼化物画分について分画を行い、各画分について促進作用を検討した。その結果、不鹼化物の熱メタノール抽出物から結晶として得られたフコステロールは極めて促進作用が弱く、activatorの主要な部分は、ステロールを結晶させた際の母液に存在することを認めた。そこで、著者は上記の母液中のactivatorを検索した結果、その主体はフィトールであることを明らかにした。さらに著者は、別種の海藻(紅藻)であるアサクサノリについてこの種の促進作用を検討した結果、アサクサノリから得られた不鹼化物はフィトールを含有するにもかかわらず、促進作用を示さないのはフィトールの作用を妨害する物質が存在するためであることを明らかにした。

著者がactivatorの本体として確認したフィトールは1種のテルペンであることから、著者は、他のテルペンおよびフィトール類似物質を用いて促進作用の化学構造特異性を検討した。その結果、この種のactivatorの構造特異性は“群特異性”であり、レチノール、フェルネソール、さらにパラチオン等にも共通の強い促進作用があることを見出した。また、activator分子には最適炭素鎖長( $C_{12} \sim C_{14}$ )と不飽和の鎖状炭化水素鎖部分の存在が必要であることが明らかにされた。

最後に、著者は促進作用の機作についても考察し、促進作用の対象となる酵素はリパーゼではなく溶液状基質の水解にactivatorを要求するエステラーゼであることを明らかにし、その機作は他の脂質分解酵素の脂質による修飾とは異なる新しいタイプに属することを推察した。

以上、著者の提出した論文は幾つかの新しい知見を含み審査員一同、著者は農学博士の学位を授与される資格を有するものと判定した。