

Purity of commercial enzymes was investigated with the use of ultraviolet absorption spectra and of absorption ratio. As the results it was found that with the regards to the origin of commercial enzymes, these plant origin had higher purity than there from animal and bacterial origin. And that with regards to enzyme preparations, proteinase and cellulase preparations had generally high purity, but lipase preparations had low purity.

### 文 献

- 1) J. H. Northrop, M. Kunitz, R. M. Herriott, "Crystalline Enzymes", Columbia Univ. Press (1948)
- 2) M. Bier, "Electrophoresis-Theory, Method and Application", Academic Press (1959)
- 3) L. Ornsten, Ann. New York Acad. Sci., **121**, 321 (1964)
- 4) H. K. Schachman, "Ultracentrifugation in Biochemistry" Academic Press (1959)
- 5) 安藤鋭郎, 寺山宏, 西沢一俊, 山川民夫, 生化学研究法II, 499, 朝倉書店 (1967)
- 6) L. C. Craig, "Analytical Method of Protein Chemistry", **1**, 121, Pergamon Press (1960)
- 7) P. A. Albertsson, "Partition of Cell Particles and Macromolecules", Almqvist & Wiksells (1960)
- 8) 杉浦衛, 伊藤万蔵, 田中英郎, 薬剤学授稿中, 第15回東海薬学会総会において発表 (1966年11月)

杉浦 衛, 伊藤万蔵, 田中英郎, 平工誠治: 酵素剤の研究 (32)\*

微生物の産生するLipoprotein lipase の研究 (その2)

Lipoprotein lipase の活性測定法について

Mamoru Sugiura, Manzo Ito, Hidero Tanaka, Seiji Hiraku:

Studies on Enzyme Preparations (XXXII)\*

Studies on Lipoprotein Lipase Produced by Microbe. (2)

On the determination method of lipoprotein lipase activity.

### 緒 言

Hahn<sup>1)</sup> および Anderson<sup>2)</sup> らによってその存在が発見された clearing factor は, 後 Korn<sup>3)</sup> により lipoprotein lipase と命名され, その後 Robinson<sup>4)</sup> 一派, Korn<sup>3)</sup> らをはじめとする多くの研究者によりその概念も徐々に確立されてきた。それにより今では生体内における“いわゆる” lipoprotein lipase としての生理的意義は, かなり解決されてきた感があるが, 反面その本体に関しては多くの課題が残されており, ひいてはそれが現在, 活性測定法にも大きな影響をおよぼしているように思われる。

著者らも最近有馬<sup>5)</sup> らによって発見された微生物なかでも *Pseudomonas* 属の産生する lipoprotein lipase (以下 LPL) を治療酵素として開発すべく, その精製を行ってきたがその途上, 使用している測定法が活性の再現性に多々欠ける事実<sup>6)</sup> に遭遇した。

もとより LPL の測定法は, 大別して脂肪乳剤による光学的な方法すなわち比濁法<sup>6)</sup> と, 遊離脂肪酸<sup>7)</sup> あるいはグリセロール<sup>8)</sup> 定量を行なう化学的な方法に分類されるが, 少なくとも現在では, 活性を感度よく定量的に, しかも再現

\* 前報 (31) 杉浦衛, 伊藤万蔵, 小木曾太郎, 田中英郎, 佐々木正憲

性よく追求するには遊離脂酸 (以下 NEFA) の測定, 特に Dole 法<sup>9)</sup>がすぐれているのは事実のようである.

しかしこの方法においても, i) 被検酵素の種類, ii) 基質の種類と濃度, iii) 基質の処理条件等の相違が大きな問題点となり, そのため方法は研究者によりまちまちで未だにその標準化は行なわれていない実情である. たとえば, 人工乳剤, リポタンパク質等を用いそれを血漿と予め incubate することにより, いわゆる活性化基質を形成させ, 反応後 NEFA を Dole 法にて測定する Korn<sup>10)</sup> および岡庭ら<sup>11)</sup>の方法, また先に述べたごとく脂濁血漿を基質として比濁でみる方法<sup>12)</sup>, さらに  $\beta$ -リポタンパクを基質としその分解率を算定する村上ら<sup>13)</sup>の方法等, 多数報告されている.

著者らも従来より人工乳剤として Fatgen を用い, ヒト血漿により活性化基質となし, NEFA を Dole法<sup>9)</sup>にて測定することにより活性表示を行ってきたが, それも脂質濃度およびヒト血漿の不安定さが活性の再現性に大きく原因していることを認め, 以下基質条件等について検討したところ良好なる結果を得たのでその詳細を報告する.

## 実験方法

### i) 活性測定法

基質 1.0ml, M/10-リン酸緩衝液 0.5ml の混液を 37°C 10 分予温後, 稀釈酵素液 0.5ml を添加, 37°C 20 分反応を行なう. その後停止液 (iso-propylalcohol: n-heptane: 2N-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>=40:20:1) 5.0ml で強振, 反応を停止する. 次いで n-heptane 3.0ml, 精製水 2.0ml を加え 15 秒間はげしく振り生成遊離脂酸を heptane で抽出後, 安

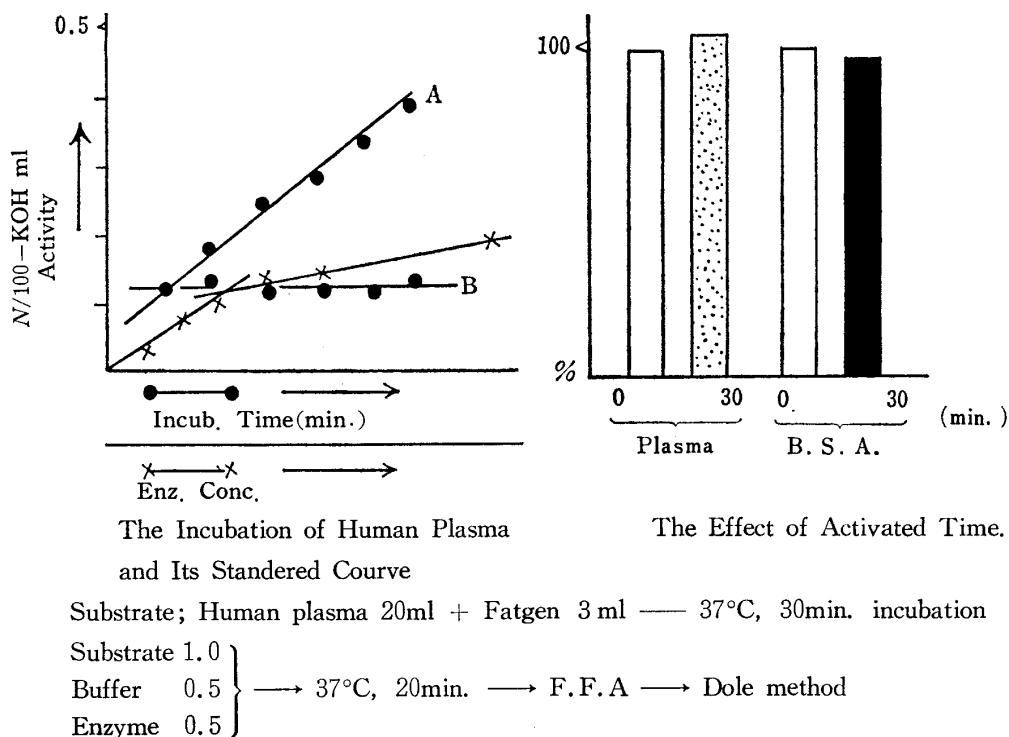


Fig. 1 The Determination Method of LPL Activity

全ピペッターにて heptane 層 3.0ml を滴定管に分取, 0.1%チモールブルー 2 滴を加え N/100-KOH (アルコール性) で窒素ガス攪拌下, 黄緑色を呈するまで滴定する. (Aml) 別に停止液と稀釈酵素液の添加を逆順序にし以下同様に操作したものを空実験とする. (Bml) 活性はすべて N/100-KOH の ml 数にて表示した. すなわち (A-B)ml×稀釈倍数である.

ii) 供試酵素

*Pseudomonas* 属の産出する LPL 部分精製標品

実験 I Fatgen- 血漿系基質の検討

i) Blank 値の検索

従来使用してきた活性測定法, 特に基質 (Fatgen-血漿系) としての妥当性について検討した. ヒト血漿(A)(B)それぞれ 20ml に人工乳剤・Fatgen (大日本製薬 K.K) 3ml を混合, 37°C に incubate し, 経時的にとり出し常法によりその NEFA を測定した. その結果 Fig. 1 のごとく血漿(A)の場合には時間の経過と共に NEFA が増加する傾向が見られるが, 反面(B)の場合には殆んどその NEFA に変化が無かった. これより, 血漿の何んらかの調製条件の相違により blank 値の増加, すなわち血漿中にリパーゼ様物質の存在が予測され, このことは基質 (triglyceride の活性化物質) として不適當で, 活性の再現性に大きく影響するものと思われる.

ii) 検量曲線

blank 値の増加が認められないヒト血漿を用い従来法により活性検量曲線を作成した. その結果, N/100-KOH にて 0.10~0.13ml までにおいては直線性を示し定量的に反応が進行するが, それより高酵素濃度においては直ちに「折点」を生じる為, 再現性よく, 定量的に活性測定できる範囲は非常に狭いと考えられる.(Fig. 1)

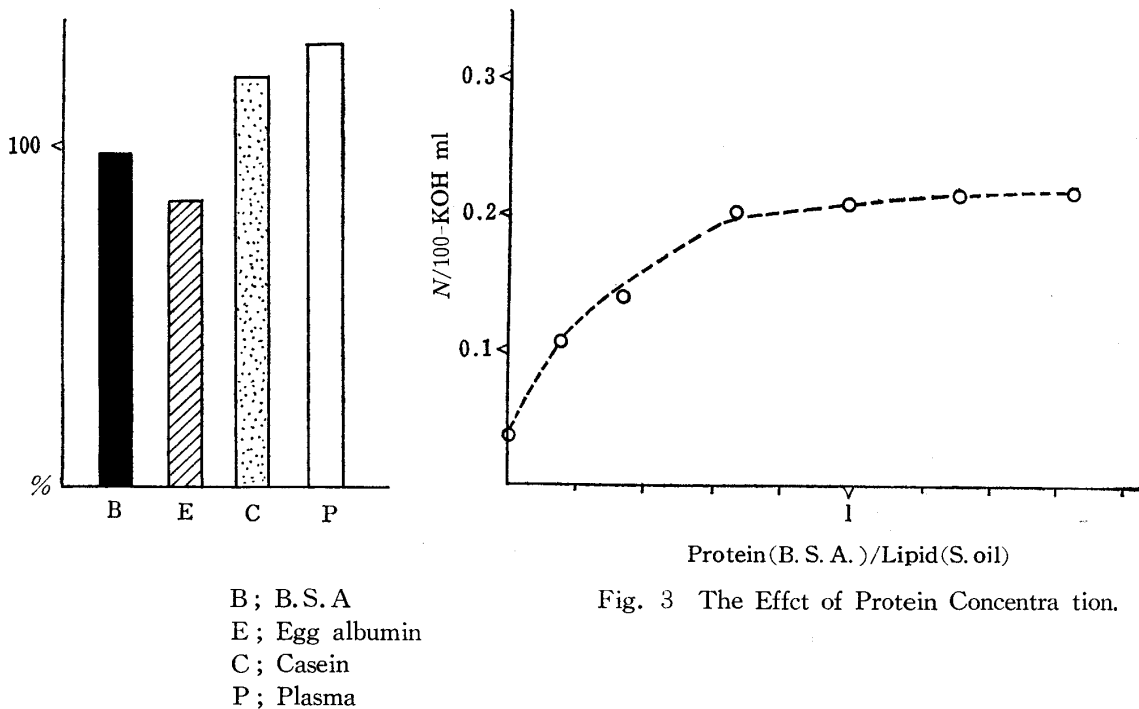


Fig. 2 The Effect of Various Protein in Substrate to Enzyme Activity

Fig. 3 The Effect of Protein Concentration.

iii) 基質の活性化

従来より LPL 基質として人工乳剤の使用に際しては, 血漿のごとき蛋白と予め incubate し, activated triglyceride を調製する必要性が報告されているのでその追試を行なった. すなわち血漿と Fatgen を混合, 直後に活性を測定した場合と, それを 37°C 30 分 incubate した後活性を測定した場合を比較するとき Fig. 1 にみるごとく全く活性値に変化が無いことが認められた.

またこのことは血漿の代りに bovine serum albumin (以下 B.S.A) を使用した場合においても同様の結果を得た。

## 実験Ⅱ 活性測定法特に基質の改良について

### i) ヒト血漿に代る蛋白質の選択

前記検討したごとく血漿の品質条件の差異により基質としての妥当性に欠ける事実が判明したので、先ず蛋白の選択を行なった。

蛋白として図示するとき B.S.A, egg albumin, casein, そして従来の血漿について、その蛋白量を micro biuret 法により算出された吸光係数をもとに全ての蛋白について同一にした。

すなわち B.S.A 80mg, egg albumin 112mg, casein 100mg, ヒト血漿 98 O.D. をそれぞれ 2 ml 中に含有するように調製, Fatgen 2 ml (ゴマ油として 400mg) との混合液を基質とし、酵素量を一定にし常法により活性を測定した。結果は B.S.A による活性を 100% とした相対値でもって示した。Fig. 2 のごとく, casein, ヒト血漿は B.S.A に比し高い活性値を示すが、前者は調製上の点において、後者は組成の不統一において B.S.A に劣り、また egg albumin は 83% 程度であるため、B.S.A がヒト血漿に代る蛋白として最適なることを認めた。

### ii) 肪質量と蛋白量の比

蛋白として使用する B.S.A の肪質 (ゴマ油としての Fatgen) に対する量的関係について検討した。

すなわち Fatgen 0.75ml (ゴマ油 150mg) に B.S.A 25~250mg を含むそれぞれの溶液 5 ml を混合し、50 万倍稀釈酵素液を使用し常法により活性を測定した。

その結果ゴマ油 150mg に対しては B.S.A 100mg 以上でもはやその活性値に変化は無く、B.S.A をそれ以上増量添加する意義は殆んど認められないことが観察された。それを (P)蛋白(B.S.A)/(F)肪質(ゴマ油)にて表示すれば Fig 3 のごとく、P/F 0.66 が混合比として最適であると判定した。

### iii) 基質濃度の増加と検量線

実験 I, ii) において観察したごとく、基質として低肪質濃度の場合には定量的に酵素反応の進行する直線範囲が非常にせまく、これは測定法として不適であることはまぬがれぬ事実である。

そこで著者らは広い酵素濃度範囲において原点を通る直線を得るため、基質濃度の増加にともなう検量線の作成を行なった。すなわち表示のごとき基質系にて常法により活性を測定した。(Table I)

Table. I The Increase of Fatgen (Sesami Oil) in Substrate

|   | oil conc. |
|---|-----------|
| 1. Fatgen 0.65ml (130mg) + B.S.A 85mg + Aq. Dest. 9.35ml  | 0.65 %    |
| 2. Fatgen 1.30ml (260mg) + B.S.A 170mg + Aq. Dest. 8.70ml | 1.30      |
| 3. Fatgen 1.95ml (390mg) + B.S.A 255mg + Aq. Dest. 8.05ml | 1.95      |
| 4. Fatgen 2.60ml (520mg) + B.S.A 340mg + Aq. Dest. 7.40ml | 2.60      |
| 5. Fatgen 3.25ml (650mg) + B.S.A 425mg + Aq. Dest. 6.75ml | 3.25      |
| 6. Fatgen 3.90ml (780mg) + B.S.A 510mg + Aq. Dest. 6.10ml | 3.90      |

それによると、反応系基質濃度(ゴマ油としての肪質濃度)の増加に従い原点を通る直線の範囲は延長されたが、3.25%以上では脂質濃度の増加による意義は無いように観察された。(Fig. 4)

一方これを酵素濃度 50 万倍 (2 $\mu$ g/ml), 25 万倍 (4 $\mu$ g/ml) において基質濃度の変化にともなう活性値を plot すると、Fig. 5 のごとく 50 万倍稀釈酵素液では基質濃度 2.6% で分解は最高となるが、25 万倍稀釈酵素液におい

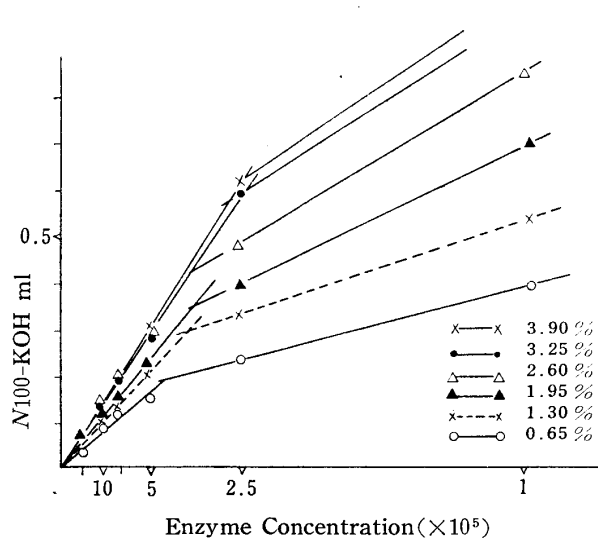


Fig. 4. The Increase of Fatgen (sesami oil) in Substrate and Enzyme Activity

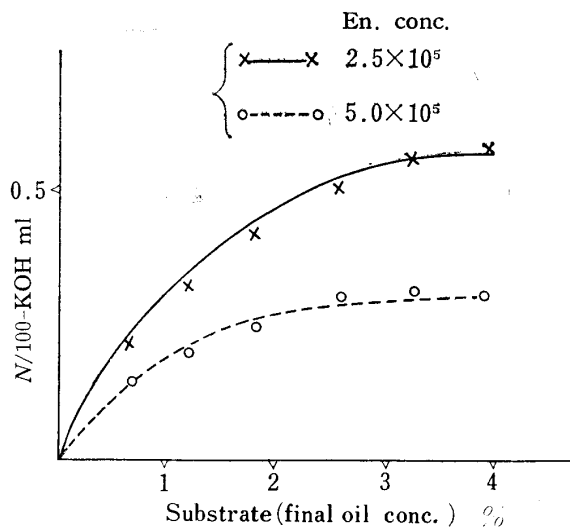


Fig. 5. The Effect of Substrate Concentration

ては 3.25% で最高であった。この点は  $N/100\text{-KOH}$  滴定数において 0.585ml まで直線性を有することを示している。

iii) 検量線

Fatgen 3 ml (ゴマ油 600mg) と 7 ml 中に B.S.A 400mg を含む溶液とを混合して得た基質液 1 ml を使用し常法により検量線を作成した。酵素量は 10 万倍液より 200 万倍液の範囲において選んだ。その結果  $N/100\text{-KOH}$  滴定数 0.4ml まで直線性を示した。

(Fig. 6)

v) 活性測定法

Table II にまとめて示した。なお力価は当測定条件において  $1 \mu\text{eq}$  の遊離脂肪酸を生ぜしめる酵素量を 1 単位 (u) としている。

vi) 再現率

8 サンプルを 1 群とし、5 群の結果より算式した。  $\mu = 100 \pm 2.6\%$  を得た。

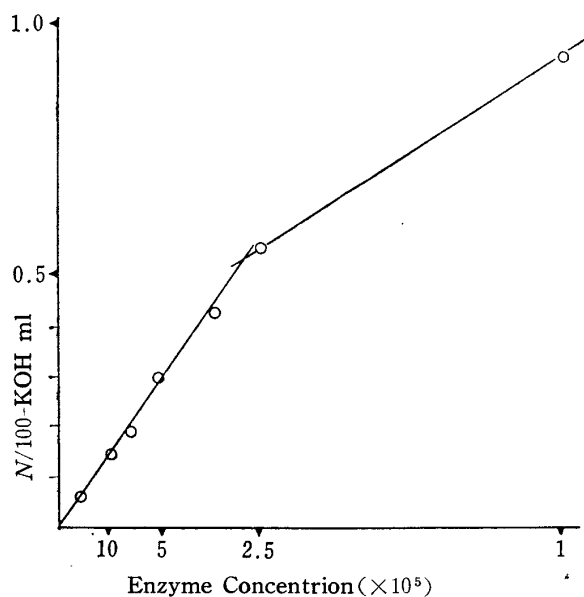


Fig. 6. The Standard Curve of LPL

Table. II. The Determination Method of LPL

1. Method

Substrate; Fatgen 3 ml + B.S.A 0.4g in 7 ml

|                      |       |                                 |   |
|----------------------|-------|---------------------------------|---|
| Substrate            | 1.0ml | } 37°C, 20min. → + Stopper 5 ml | { iso-Propanol 400ml<br>n-Heptane 100ml<br>2N-H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 10ml |
| N/10-phos. bf. pH. 7 | 0.5ml |                                 |   |
| Enzyme sol.          | 0.5ml |                                 |   |

+ n-Heptane 3 ml + Aq. Dest. 2 ml → Heptane layer 3 ml →  $N/100\text{-KOH}$  titration

## 2. Substrate

|         | Quant. | Conc. | Ratio |
|---------|--------|-------|-------|
| Oil     | 60mg   | 3%    | 1.00  |
| Protein | 40mg   | 2%    | 0.66  |

## 3. Activation of substrate

No activated time

## 4. Activity

$$U/g = 4/3 \times F \times (S - B) \text{ ml} \times \text{Dilution}$$

S; Sample ml

B; Blank ml

## 結 論

- i) ヒト血漿に代る蛋白としては bovine serum albumin が最適である.
- ii) 人工乳剤 (Fatgen) の蛋白 (B.S.A) による活性化操作は意義がなかった.
- iii) 基質として最適なる脂肪(ゴマ油)/蛋白(B.S.A) は 0.66 であった.
- iv) 反応系中基質濃度 (脂質濃度) は 3.25% において *N*/100-KOH 0.585ml まで直線性を有することが判明した.
- v) Fatgen 3 ml と B.S.A 7 ml (400mg) の基質系においては, *N*/100-KOH 滴定数 0.4ml まで定量的に活性を測定することが可能である. なおこのとき反応系濃度は, 脂質 3%, 蛋白 2% である.

以上 LPL 活性測定法, なかでも基質の改良について検討を行なったが, 基質の選択がすなわち酵素の本質に関連する限り, その本体および生体における LPL の生物学的役割がなお完全に確立されていない現在, 基質の妥当性を極言することは勿論不当である.

しかし最近著者らが, 微生物なかでも *Pseudomonas* 属より, 本測定を用いて精製法を確立し蛋白的に単一な LPL 標品を得ることに成功したことは, 今後生体における LPL の消長, および疾病との関連に関する研究と相まって, LPL の酵素的解明に大きな意義をもたらすものと確信する.

## 文 献

- 1) P. F. Hahn; Science, **98**, 19 (1943)
- 2) W. G. Anderson: Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **74**, 768 (1950)
- 3) E. D. Korn: J. Biol. Chem., **215**, 15 (1955)
- 4) D. S. Robinson: Advances in Lip. Res., **1**, 133 (1963)
- 5) 有馬ら: 日本農芸化学大会にて発表 (1964)
- 6) D. Lagunoff et al.: Pro. Soc. Exp. Biol. Med., **121**, 864 (1966)
- 7) M. I. Grossmann: Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **87**, 312 (1954)
- 8) E. D. Korn: J. Biol. Chem., **215**, 1~14 (1955)
- 9) V. P. Dole: J. Clin. Invest., **35**, 150 (1956)
- 10) E. D. Korn: "Methods of Biochemical Analysis" Vol. 7, Interscience (1959)
- 11) 岡庭弘: 日新医学, **48**, 730 (1961)
- 12) N. Zöllner, et al.: Z. physical. Chem.: **307**, 112 (1957)
- 13) 村上元考ら: 最近医学, **15**, 450 (1960)
- 14) 岡庭弘: 臨床酵素学, p. 487

## Summary

In this study, we have modified the components of the substrate in the determination method of lipoprotein lipase.

In stead of human plasma, bovine seam albumin was prepered as protein in substrate, and Fatgen was used as triglyceride.

In this substrate that protein / oil was 0.66. oil was 3% in final concentration.

And then, the enzyme activity was prepered quantitavely till the 0.4 ml in  $N/100$ -KOH titration.

杉浦衛, 小木曾太郎, 羽田野良一, 田中順子: 酵素剤の研究 (33)\*1

## Xylanase の研究(1)

*Aspergillus niger* の生産する Xylanase および Glucanase について

Mamoru Sugiura, Taro Ogiso, Ryoichi Hatano, Yoriko Tanaka.

Studies on Enzyme Preparations (XXXIII)

On the Xylanase and Glucanase Produced by *Aspergillus niger*.

## Summary

The properties of xylanases and glucanases produced by *Aspergillus niger*. *Trichoderma viride* 1 and 2 were studied.

Optimum pH of these xylanase were found to be about 5, and these were stable in pH range of 4-7. Optimum temperature generally were at 50°C. All xylanases were activated with  $Ca^{2+}$ , but were inhibited by heavy metals,  $Hg^{2+}$  and  $Ag^+$ , urea, sodium lauryl sulfate and KCN.

Xylose and oligosaccharides were detected in the reaction mixture hydrolyzed by these enzymes with paper chromatographic analysis.

Optimum pH of these glucanases were found to be 5-6, and these were activated  $Ca^{2+}$ , but were inhibited with  $Hg^{2+}$  and  $Ag^+$  as strog as in xylanases.

hemicellulose は cellulose, pectin などと共に植物細胞膜の主成分をなし, 量的にもデンプンをはるかに越す炭水化物であるにもかかわらず, 近年にいたるまで栄養学的見地からは度外視されていた。しかし最近にいたり cellulose 分解酵素と共に hemicellulose 分解酵素 (xylanase, mannase など) も植物性食品の崩壊の面から食品工業および薬剤への利用がさげられるようになった。

そこで著者らは hemicellulase の酵素性質を解明するため *Aspergillus niger* (以下 *A. niger*) の産生する xylanase および glucanase の至適 pH, pH 安定性, 金属イオンおよび阻害剤の影響などについて, *Trichoderma viride* (以下 *T. viride*) の産生するそれらと比較検討した。

## 供試酵素および実験法

## 1. 供試酵素および基質

実験に使用した酵素は *A. niger* の産生する Cellulase AP (天野製薬), *T. viride* cellulase-1 (Meicellase,

\*1 前報 (32) 杉浦衛, 伊藤万蔵, 田中英郎, 平工誠治