

杉浦 衛, 田中英郎, 浅野 弘: 酵素剤の研究 (29)*

微生物の産生する Lipoprotein Lipase の研究 (その1)

微生物ならびに動物臓器の Lipoprotein Lipase の酵素的性質 (その1)

**Mamoru Sugiura, Hidero Tanaka, Hiroshi Asano: Studies
on Enzyme Preparations (XXIX)**

Studies on Lipoprotein Lipase Produced by Microbe (1)

Enzymatic properties of Lipoprotein Lipase produced by microbe and animal (1)

Summary

The purification and some properties of lipoprotein lipase produced by *Pseudomonas* sp. were described in this paper.

The enzyme was purified about 1100 fold from crude enzyme. The purified enzyme was homogeneity by Tiselius electrophoresis. The optimum pH of this enzyme was about pH 7.3 and with its stability, this enzyme was relatively stable at pH 4.0~7.0. The various bivalent cations had almost no effect on enzyme. As a result of studies on specificity of substrate and various inhibitors, it was demonstrated that microbial lipoprotein lipase was greatly similar to that of the animal tissues except some properties. The activity of animal tissues was inhibited by sodium chloride, protamine sulfate, sodium taurocholate, sodium fluoride, atoxyl and heparin. Whereas, that of the *Pseudomonas* sp. was not inhibited by atoxyl and heparin.

緒 言

前報において著者らは、微生物なかでも *Pseudomonas* 属の産生する Lipoprotein Lipase (以下 LPL) の活性測定法の改良¹⁾について報告を行なった。本報はそれをもとに *Pseudomonas* 属の産生する LPL の精製を行ない、その結果、得られた単一酵素について諸性質を検討すると共に、一部動物組織の LPL との比較実験を試みただけでその詳細を以下報告する。

実 験

I. 試料酵素

(A) 微生物起源; *Pseudomonas* 属の一菌株を液体培養し、それをアルコール沈降して得られたものを粗酵素

(B) 蛋白測定法; 280 m μ の吸光度をもって表示した。

とした。

(B) 動物起源; 各種動物組織をアセトン乾燥粉末として調製した。すなわち、新鮮な組織を細切し、3 倍量冷アセトン (-25°C) にて homogenize する。この操作を3回繰り返して後濾過、残渣をアセトンで十分洗滌し、真空乾燥する。

II. 測定法

(A) 活性測定法; 前報に準じて行なった¹⁾。なお脂酸の定量は Dole 法²⁾である。

* 前報 (28) 杉浦 衛, 伊藤万蔵, 田中英郎: 薬剤学²⁸ (2) 129 (1068)

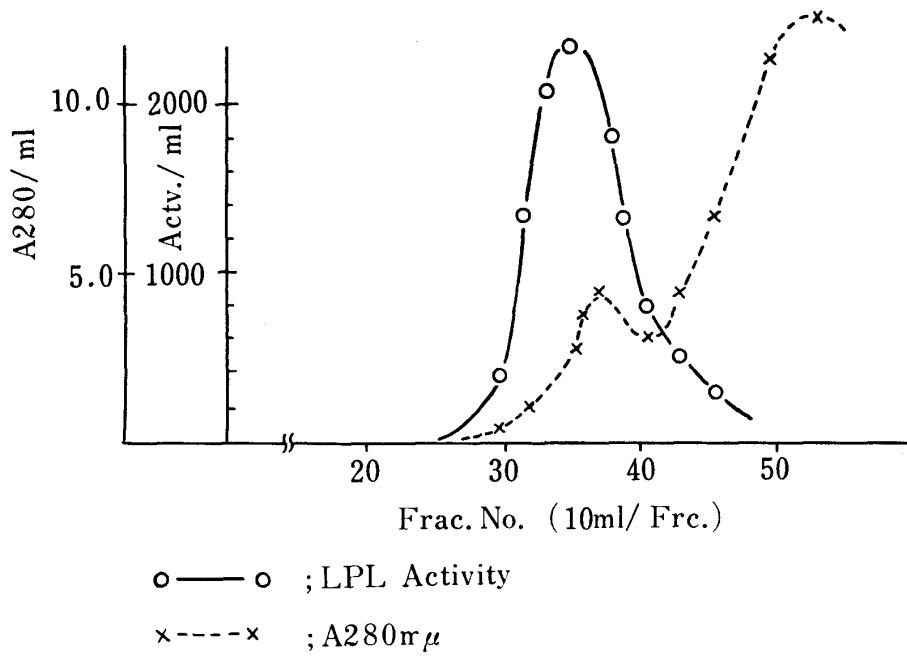
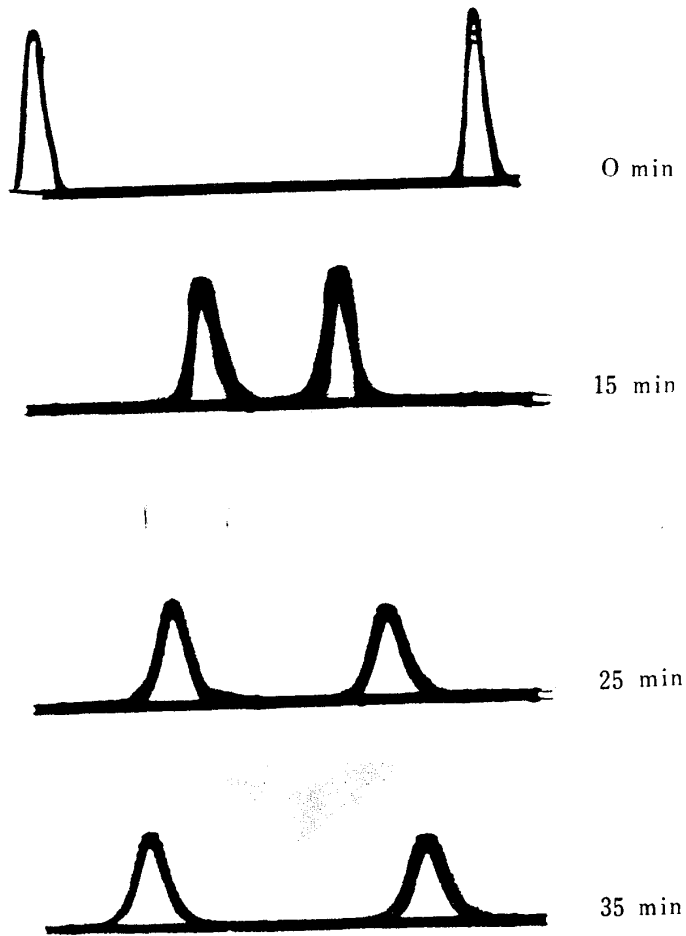


Fig.1 Sephadex G-100 gel chromatography



(+) Ascending

Fig.2 Electrophoretic Pattern of Pseudomonas sp.

III. *Pseudomonas* 属の産生する LPL の精製

粗酵素を5倍量の精製水に懸濁し, 30分攪拌下, 酵素抽出を行ない, その後10,000 r. p. m, 10分遠心して不溶物を除去し得られた上清を粗酵素液とした。先ず粗酵素液を pH 6.0 に調整し, 硫酸 0.2 飽和にて 4°C, 2時間塩析を行なった後, 遠心した。得られた沈澱を少量の精製水に溶解し, 不溶物を遠心後, Sephadex G-100 にてゲル濾過を行なった。

その結果, Fig. 1 のごとく活性区分が最初に溶出され狭雑蛋白類と明確に分離することが出来た。本ゲルマトにより比活性は約10倍に上昇し, 活性区分の凍結乾燥標品は Fig. 2 に示すごとく, チゼリウス電気泳動的に単一なる挙動を示した。

以上, 精製過程を総括すると Table 1 のごとく, 最終単一標品は 1500,000u/g で, 比活性が粗酵素の 1,100 倍, 活性収率は 44% であった。

Table. 1 The Purification Scheme of LPL

	Total actv. (u.)	Total protein	S. A.	Actv. %
Crude enzyme	504,000	420,000	1.2	100
Extraction x 5 Aq. Dist. Cf. (4,000 r. p. m. 5 min)				
Sup.	429,000	39,000	11.0	85
Salting out 0.2 sat. (NH ₄) ₂ SO ₄ Cf.				
Ppt. (dissolved in Purf. water) Cf. (4,000 r. p. m. 10 min)				
Sup.	376,000	2,520	150.0	75
Sephadex G-100 Concentration (Carbowax 6,000)				
Lyophilization	224,000	166	1350.0	44

IV. 精製標品の性質

1. 紫外外部吸収スペクトル

2% 酵素液を調製し紫外外部吸収を測定したところ Fig. 3 のごとく λ_{\max} 280m μ , λ_{\min} 252m μ であった。

2. 至適 pH

pH 3~8 (McIlvaine buffer), pH 8~11 (Ammonia buffer) の各緩衝液を使用し, 常法により活性を測定したところ, pH 7.0 において最大活性を示した。Fig. 4

3. 至適温度

Fig. 5 に示すような各温度にて活性を測定し, 至適温度 60°C なる結果を得た。

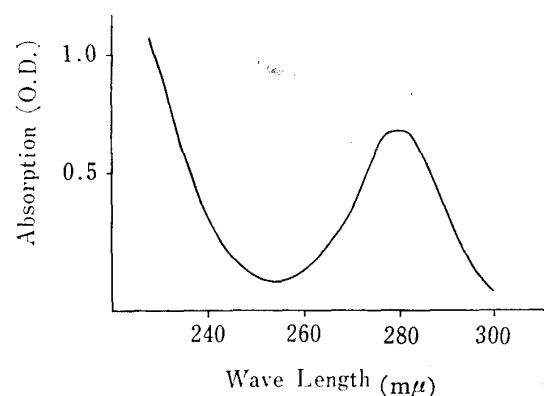


Fig. 3 UV Spectrum of LPL

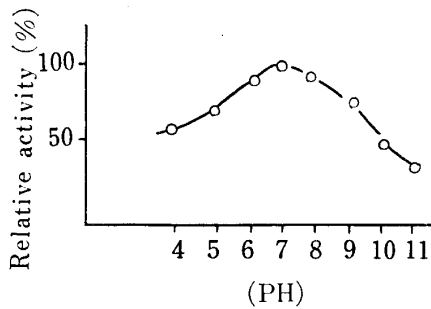


Fig. 4 The Optimum pH

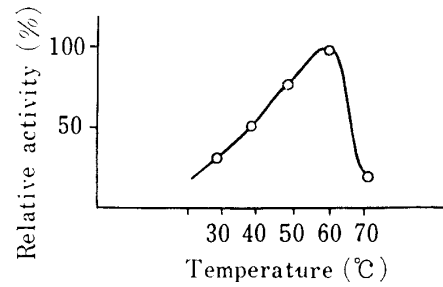


Fig. 5 The Optimum Temperature

4. 安定 pH 域

稀釈酵素液を pH3~8 (McIlvaine buffer), pH8~11 (Ammonia buffer) の各種 pH の緩衝液と 1 時間および 4 時間, 5°C に放置し, その後 HCl, NaOH にて pH7.0 に調整後, 常法にて活性を測定した。その結果, pH 4.0~7.5 においてきわめて安定なる酵素であることが判明した。Fig. 6

5. 温度安定性

稀釈酵素液を 20°C, 37°C, 50°C, 60°C, 70°C の各温度に 30 分, 60 分, 90 分放置したところ, 20°C には 90 分後も全く安定で, 60°C, 90 分にて約 50% の残存活性を有している。しかし 70°C では 30 分後にすでに 90% 失活し, 60 分後では活性の殆んどが失われた。Fig. 7

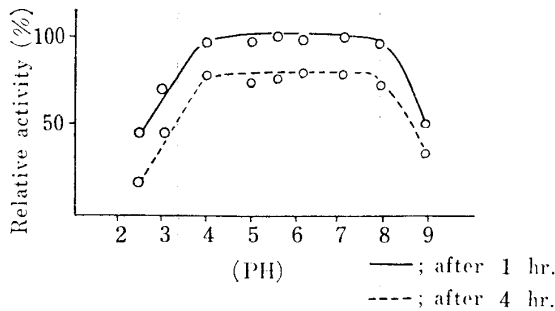


Fig. 6 pH Stability

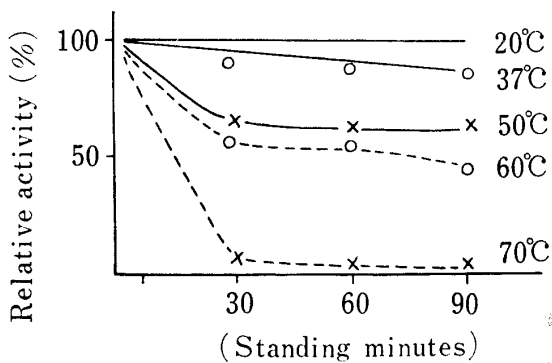


Fig. 7 Stability on Temperature

Table.2 The Effect on Metal ions to LPL Activity from Pseudomonas sp.

Metal ions	Concentration (Mol)*		
	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴
Mn ²⁺	95.8	104.6	102.5
Zn ²⁺	94.6	97.5	97.5
Ca ²⁺	104.3	105.4	106.3
Mg ²⁺	100.4	101.7	101.7
K ⁺	102.1	101.7	101.3
Na ⁺	102.1	102.5	102.1
Ba ²⁺	103.7	102.3	104.6
Fe ²⁺	97.7	102.7	104.6
Cu ²⁺	88.5	103.7	104.6
Hg ²⁺	31.0	88.0	92.6

* Final Concentration
Contra; 100%

6. 各種金属イオンの影響

Table 2 のごとき各種二価カチオン (いずれも塩化物) を選択し, それを終濃度 10⁻²~10⁻⁴Mol になるよう調製, 反応系に添加, それらによる影響を観察した。

その結果, Hg^{2+} を除き, いずれのカチオンによるも全く影響されず, 無機イオンに対しきわめて安定なる性質を有するものと思われる。

7. 阻害剤による影響

³⁾ Korn, ⁴⁾ Hollet, ⁵⁾ Brown, ⁶⁾ Shore, ⁷⁾ Robinson らは LPL が Protamine sulfate, 高濃度 Heparin, Bile salts, 高濃度塩化ナトリウム, Atoxyl, Quinine, により阻害を受け, Sodium fluoride により影響を受けないとし, これら阻害剤に対する挙動を基質特異性と共 LPL の本質を裏付けるものとして報告している。

そこで著者らもこの点につき動物組織の LPL と比較検討した。

Table 3 The Effect on Inhibitors to LPL Activity from Animal tissues and Pseudomonas sp.

Inhibitors		Dog	Chicken	Cattle	Pig	Rabbit	Psd. sp. **
Name	Conc. *	pancreas	heart	heart	heart	heart	
NaCl	1.0 M	7	21	75	60	45	84
Protamine sulfate	10mg/ml	3	45	65	42	29	88
Heparin	1mg/ml	39	68	91	95	73	96
Atoxyl	10mg/ml	54	6	73	37	42	98
NaF	0.2 M	1	14	65	92	33	90
	0.4 M	0	3	20	25	27	51
	0.8 M	0	3	16	25	31	23
Sod. taurocholate	M/2500	—	74	98	—	73	98
	M/250	—	14	33	50	5	83
	M/25	—	7	20	8	—	56

Control; 100%

* Additional Concentration

** Pseudomonas sp.

すなわち, Table 3 に示すごとく犬膵臓, 牛, 豚, 鶏, 兎の心筋を前記の方法に従い調製, 抽出したものを酵素液として使用した。また阻害剤は, 表示のごときものを選択し各濃度にて, それらの影響を観察した。数値は, 残存活性を無添加の場合を 100% とした相対活性で示している。

その結果, 動物組織においては犬膵臓, 鶏心筋, 兎心筋の LPL が, Protamine sulfate, Heparin, Sodium chloride, Sodium taurocholate, Atoxyl などにより阻害を受け, 牛, 豚心筋では Sodium chloride, Protamine sulfate, Atoxyl により強く阻害される。しかし, Heparin では大した影響は受けませんが, Sodium fluoride によっては, いずれの組織の LPL も強く阻害される。

それに対し Pseudomonas LPL は, Sodium chloride, Protamine sulfate, Sodium fluoride Sodium taurocholate により阻害され, Atoxyl, Heparin では阻害されない結果を得た。

以上の結果を総括すると Table 4 のようになる。

8. 各種油脂に対する分解

3%-PVA (ポリビニールアルコール) 乳化各種油脂を調製し, その 1 ml を基質として反応系に添加,

Table 4 The Effect on Inhibitors to LPL Activity from Animal tissues and Pseudomonas sp.

Inhibitors	Animal tissues	Psd. sp.*
Sodium chloride	—	—
Sodium Fluoride	—	—
Protamin sulfate	—	—
Heparin	—	±
Atoxyl	—	±
Sod. Taurocholate	—	—

(—); Inhibit
(+); Noeffect

* ; Pseudomonas sp.

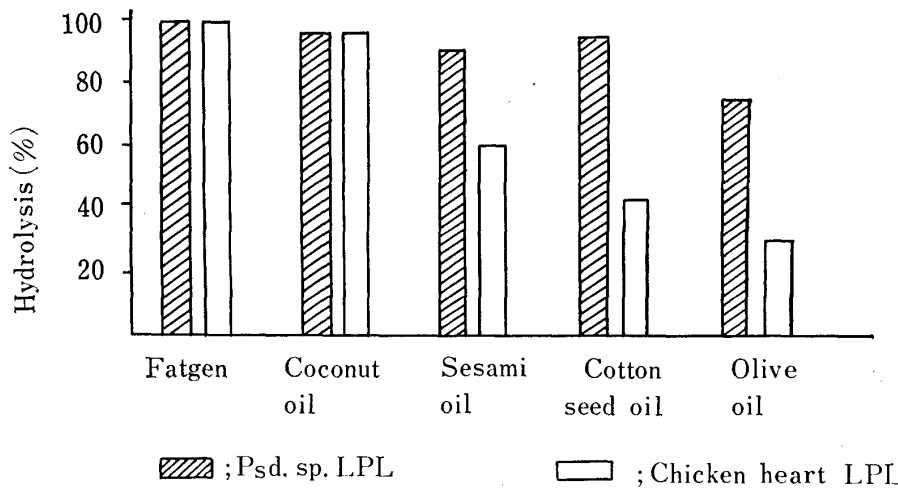


Fig. 8 Hydrolysis of Substrate by LPL in Pseudomonas sp. and Chicken heart

Pseudomonas, 鶏心筋 LPL による分解を観察した。

その結果, Fig. 8 に示すごとく Pseudomonas LPL は, 人工乳剤 Fatgen, ヤシ油, 綿実油に対し高い分解を示すが, オリーブ油基質に対しては Fatgen 基質の 77% 分解にとどまった。

また鶏心筋の LPL は, ヤシ油に対し最も高い分解を示し, それを 100% とした場合, ゴマ油 60%, 綿実油 44%, オリーブ油 32% であった。ヤシ油に対しては, 両 LPL 共高い分解を示した。

結 論

以上 Pseudomonas 属の産生する LPL について, その精製をこころみ, 単一標品の酵素性質を検討したが, 特に阻害剤の影響に関しては動物組織の LPL と挙動がきわめて類似し, このことは LPL の特徴を裏付ける事実として非常に興味あることである。

- 1) 塩析, Sephadex 等の手段により最終的に比活性を約 1000 倍に上昇することが出来た。
- 2) 精製酵素は, チゼリウス電気泳動的に単一なる凍結乾燥標品である。
- 3) 本標品は, 至適 pH が 7.0, 至適温度 60°C で, pH 4.0~7.5 においてきわめて安定なる性質を有する。

4) 温度安定性は、比較的良好で 20°C にては 90 分後でも全く失活は認められず、60°C、90 分後でも約 50% の残存活性を示している。

5) 金属イオン類によっては殆んど影響されないが、Sodium fluoride' Protamine sulfate 等の阻害剤によっては動物組織の LPL と同様、阻害を受ける結果を得た。しかし、Heparin, Atoxyl によっては動物組織の LPL が阻害されるのに対し、本酵素は影響を受けなかった。

6) 油脂類に対する分解は、人工乳剤 Fatgen, ヤシ油等はよく分解を受けるが、オリーブ油に対する分解は低かった。この傾向は動物組織(鶏心筋)においても同様であった。

LPL は生体内で広範囲に分布しており、脂質の吸収ならびに利用に關与する酵素で、特に最近、臨床酵素学的な立場より、各方面から研究がなされ、その進展がまたれる酵素のひとつである。本酵素の概略については、すでに著者らも報告したが、その他未広、Robinson、Cronhein らのすぐれた総説があるので参考されたい。

文 献

- 1) 杉浦, 田中; 岐阜薬科大学紀要, **17**, 111 (1967)
- 2) Dole, V.P; J. Clin. Invest., **35**, 150
- 3) E. D. Korn; J. Biol. Chem., **215**, 1 (1955)
- 4) C. Hollet et al; Amer. J. Physiol., **184**, 428
- 5) R. K. Brown; J. Biol. Chem., **204**, 423 (1953)
- 6) B. Shore; Proc. Soc. Exp. Biol. NY, **88**, 73
- 7) D. S. Robinson; Quart. J. Exp. Physiol., **40**, 112 (1955)
- 8) 杉浦, 有馬; 薬局, **XVII** No. 4, 41 (1966)
- 9) 末広; 醸酵協会誌, **22**, 431 (1964)
- 10) Robinson, D.S; In "Advances in Lipid Research" **1**, 133 (1963), Academic Press, New York
- 11) Cronhein, G.E; In "Lipid pharmacology" 381 (1964), Academic press, New York