

葉および種子の脂質 IV

植物リパーゼの活性と脂質

野田 万次郎

MANJIRO NODA : Lipids of leaves and seeds. IV.
Plant lipase activity and lipids.

要旨：植物リパーゼが有機溶媒による脱脂によって活性低下を起こしやすい現象について、ヒマシリパーゼを試料として検討を行なった。

ヒマ種子を直接有機溶媒で処理して脱脂したものでは通常リパーゼは完全に失活する。しかし緩衝液を用いて抽出した粗酵素液から、注意して冷エーテルまたは非イオン界面活性剤で結合脂質を除去してゆくと、酵素中の脂質含量の減少とともにリパーゼ活性は低下するが、なお活性は残存し、これに抽出した脂質を添加すると活性はかなり回復する。

このリパーゼ活性発現に必須の脂質はアセトン可溶性の中性脂質部にあり、特にリシノール酸を含むトリグリセリドに顕著な効果が認められた。したがってヒマシリパーゼは脂質-タンパク質複合体として酵素作用を発揮するものと考えられる。

I. 緒 言

植物リパーゼ (EC 3.1.1.3), 特に植物種子のリパーゼは種子の発芽および成熟期におけるトリグリセリドの分解と生成に密接な関係を持ち、米または米ヌカの貯蔵中における油脂の変質などにも重要な影響を与える酵素であるが、その酵素としての特性は二、三の代表的な植物リパーゼを除いては、まだ十分な研究が行なわれているとは言い難い現状である。

植物種子リパーゼの性質が動物リパーゼと異なる点の一つは、有機溶媒による脱脂によって、そのリパーゼ活性が著しく低下する場合が多く、物によっては完全に失活することもあるという点である。これに対し、代表的な動物リパーゼの一つである膵臓リパーゼは、アセトン、メタノール、エーテルなどの溶媒を使って完全に脱脂しても、その活性の著しい低下は認められない。

以上のような植物種子リパーゼの特性から考えると、そのリパーゼ活性発現には、ある種の脂質の共存が必須であって、脂質-タンパク質複合体として、はじめて独自の酵素活性が現われるのではないかという推定も生れてくる。この報告では、これらの点を明らかにするために、ヒマ (*Ricinus communis*) 種子リパーゼ

(ヒマシリパーゼ) を試料として実験を行なった結果を報告する。

なお最近の Ory¹⁾ の報告によれば、ヒマシリパーゼの活性発現に必要な脂質として、リシノール酸の環状四量体をあげているが、この点についても考察を加えた。

II. 試料と方法

1. ヒマシリパーゼの調製と脱脂

実験に供したヒマ種子は、観賞用の園芸品種、紅ヒマ「平安殿」で、本学農場で栽培採種した完熟種子である。

ヒマシリパーゼの調製は主として Ory らの方法^{2), 3)} に準じて行なった。ヒマ種子 60 粒 (19~20g) を 1 夜水につけた後、0.02M リン酸緩衝液 (pH 7.0, 0.05M システインおよび 0.01M EDTA 含有) 100ml を加えて摩擦し、ホモジナイズする。これをろ過し、口液を 11,000×g で 30 分間遠心分離し、上層に分離した脂肪層を分取する。これに上記リン酸塩緩衝液 50ml を加えて粗酵素溶液とする。

またこれをエーテル脱脂する場合は、上記の分取した上層の脂肪層に等容の冷飽和食塩水 (0.05M システイン含有, pH 7.0) と冷エーテルとを加え、かきませた後 4°C で 1 時間放置し、これを低速で遠心分離する。

3層に分離した中層の固形物を集め、同様の操作でさらに数回冷エーテル抽出をくり返すと、次第にリパーゼ中の脂質は少なくなる。脱脂したものに上記のリン酸塩緩衝液を加えてホモジナイズし、これを流水透析後、凍結乾燥して酵素標品とする。

非イオン界面活性剤を使つての脱脂条件はつぎの通りである。上記のエーテル脱脂する前の粗酵素液 5ml に、0.1~10%ポリオキシエチレン・ノニルフェニルエーテル (10モル付加物) 溶液 50ml を加え、2時間室温ではげしく振り混ぜた後、12,000×gで20分間遠沈して下層の沈殿物を集める。これに水を加えて分散させ、同様に遠心分離して沈殿物を水洗する操作を数回くり返し、最後にこれに0.02Mリン酸塩緩衝液 (pH 7.0) 5ml を加えて分散させ、これを酵素液とした。さらに脱脂を続ける必要がある場合は、同様のポリオキシエチレン・ノニルフェニルエーテル液による振り混ぜ脱脂をなお数回くり返した後、上記のように水洗と遠沈で活性剤および抽出脂質を除去する。このようにして種々の程度に脂質を含んだリパーゼ試料を得た。

有機溶媒による直接脱脂は、ヒマ種子 12粒 (3.8~4.0g) にアセトン、エーテル、メタノール、エタノール、クロロホルム、またはこれらの混合物をそれぞれ加えて摩砕し、ホモジナイズ後ろ過して不溶物を集め、同様の溶媒抽出をさらに数回くり返して行なつた。この脱脂粉末を0.02Mリン酸塩緩衝液 (pH 7.0) 10ml に分散させ、低速で遠心分離して沈殿する固形物を除いた液の 5ml を採って酵素活性を測定した。

2. 酵素活性の測定

上記酵素液 5ml に、0.2M酢酸緩衝液 (pH 4.5) 25ml と、0.5ml のエーテルに溶かした基質のトリリシノレインまたはトリオレイン 200mg とを加え、1分間ホモジナイズした後、35°Cの恒温槽中で40分間はげしく振り混ぜる。つぎに反応液の 2ml を採って、これにエタノールを加え、全容を 10ml とする。この試料液の中に含まれる残留エステル結合量をヒドロキサム酸法で比色定量する。また反応開始直前の液についても、同様の操作でエステル結合量を測定し、両者の値の差から加水分解率を算出し、酵素活性の目安とする。

ここに使われたヒドロキサム酸法は Snyder らの方法⁴⁾の改変法によつた。すなわち上記の試料液 2ml を内径 24mm の試験管に採り、これに 2ml のアルカリ性ヒドロキシルアミン液 (水酸化ナトリウム 4g を水 3ml に溶かし、エタノールで 50ml とした液と、塩酸ヒドロキシルアミン 4.2g を 2.5ml の水に溶かし、エタノールで 50ml とした液とを混合し、生じた沈殿をろ過したろ液) を加え、65°Cで2分間加熱後、5分間

室温で放冷する。これに 5ml の過塩素酸鉄試薬 (過塩素酸鉄 5g を 70% 過塩素酸 10ml, 水 10ml に溶かし、冷エタノールを加えて 100ml とし、冷蔵保存液とする。この 4ml をとって、これに 70% 過塩素酸 3ml を加え、冷エタノールで 100ml としたもの) を加えて振り混ぜ、20分後に 530m μ で比色定量する。なお検量線用の標準試料としては、パルミチン酸メチルエステルを使用している。

3. 試料脂質

基質または活性回復用に使つた諸脂質はつぎのようにして調製されたものである。

トリリシノレイン、ジリシノレオ-トリグリセリド、モノリシノレオ-トリグリセリド、ジリシノレイン、モノリシノレインなどのリシノール酸を含むグリセリドは、ヒマ種子からクロロホルム-メタノール (1:1) で抽出した脂質またはその臍臓リパーゼ分解物をベンゼン、ベンゼン-エーテル、エーテル、エーテル-メタノール、メタノールで順次溶出するケイ酸カラムクロマトグラフィーで分別し、さらに必要に応じて薄層クロマトグラフィーで分離精製して得たものである。

トリオレインはオレイン酸とグリセリンとから合成した粗製品を、上記と同じケイ酸カラムクロマトグラフィーで精製して得ている。

リシノール酸はヒマシ混合脂肪酸から、常法により蒸留法と鉛塩-アルコール法とによつて精製単離されたものである。

モノガラクトシルジグリセリドは、ヨモギ葉から抽出した脂質からケイ酸カラムクロマトグラフィーで分別、単離したものを使用した⁵⁾。

ホスファチジルコリンとホスファチジルエタノールアミンとは、ナタネ種子脂質を、クロロホルム-メタノール系展開溶媒を使うケイ酸カラムクロマトグラフィーで分離して得たものである。

またヒマ種子抽出脂質をアセトンで処理し、アセトン可溶の主としてグリセリドと脂肪酸を含む部分を「中性脂質」、アセトン不溶の主としてリン脂質と糖脂質を含む部分を「複合脂質」と名づけて使用した。

4. 脂質の添加による酵素活性の回復

前記のように非イオン界面活性剤を使つて脱脂し、活性の低下した酵素 50mg を、0.02Mリン酸塩緩衝液 (pH 7.0) 5ml に分散し、これに酵素のタンパク質量と等量の各種脂質を加え、低温において5分間ホモジナイズまたは超音波処理後、2時間4°Cで放置、最後に2分間再びホモジナイズした。このものについてリパーゼ活性を測定した。

5. その他の分析法

脂質の薄層クロマトグラフィーはシリカゲルGプレートを使用し、石油エーテル-エーテル-酢酸 (70:30:1 または 50:50:1), あるいはクロロホルム-メタノール-アセトン (80:16:4) などで展開した。検出は50%硫酸または2,7'-ジクロロフルオレセインなどによった。またリン脂質の検出はモリブデン青試薬 (Dittmer 試薬)⁶⁾ によっている。

酵素中の脂質量は、酵素のクロロホルム-メタノール (1:1) 抽出物の重量測定によって定量した。また脂質中のリンの定量は Bartlett法⁷⁾, タンパク質の定量は Lowryらの方法⁸⁾, 窒素の定量は Sloane-Stanley法⁹⁾ によった。

III. 実験結果

1. ヒマシリパーゼの一般的性質

粗酵素液を1回冷エーテル抽出によって脱脂して得た酵素は、なお16.8%の脂質を含み、最適pH4.5、最適温度35°Cで、40°C以上または10°C以下では活性は激減する。Ca²⁺ により活性化され、Ba²⁺, Fe³⁺, Hg²⁺ によって阻害される。この脂質含量のリパーゼで、30°Cにおける比活性は126mU/mgタンパク質であった。

なお酵素分解生成物の薄層クロマトグラフ分析結果によると、この酵素は基質のトリグリセリドのエステル結合に対する位置特異性はなく、またすみやかに脂肪酸とグリセリンにまで完全に加水分解し、したがって酵素分解中のモノ-およびジグリセリドの蓄積は少ない。ただしリシノール酸を含むトリグリセリドをやや選択的に分解する傾向は認められる。

2. リパーゼ活性に与える脱脂の影響

前記の酵素活性測定法によって、トリリシノレインを基質とし、各種の条件で脱脂調製した酵素について、その活性を測定した結果を Table 1 に示す。同表のうち、特に注記しないものは、ヒマ種子をそれぞれの溶媒で直接脱脂して得た酵素液、またはポリオキシエチレン・ノニルフェニルエーテル溶液で粗酵素液を脱脂したもののリパーゼ活性であって、その調製法については前に記した。また対照としてあげた無処理のものは、前記のエーテル脱脂前の粗酵素液のことである。酵素反応の温度は35°C、時間は40分、pH 4.5 であった。

Table 1 に見られるように、本酵素は脱脂によって著しい活性の減退または失活が認められる。特にヒマ種子を直接有機溶媒で脱脂したものはエーテル抽出以外は完全に失活し、これにいかなる脂質を加えても活性は回復しなかった。しかし酵素の水溶液から冷エーテル抽出によって内在脂質の一部を注意して除去して

Table 1. Effect of extraction of lipids on lipase activity.

Treatment	Ester bonds hydrolyzed, %
None	82.6
Acetone	- 2.3
Diethyl ether	3.1
Diethyl ether*	15.2
Methanol	- 1.5
Ethanol	- 0.8
Chloroform	- 3.2
1.0% Surfactant	28.9
1% Surfactant	19.4
10% Surfactant (3×)**	3.8

* An enzyme solution after partial removal of the endogenous lipids by repeated ether extraction from aqueous crude enzyme solution.

** Removal of lipids with surfactant was repeated three times.

いったものは、なおかなりの活性を残存していたが、これも完全に脱脂するとやはり活性は失われた。非イオン界面活性剤で脱脂した場合は、活性はかなり残存し、後記のようにある種の脂質を加えたときに活性の回復が認められたが、この場合も界面活性剤の濃度を高くして脂質の除去率を大とすると活性は低下する。

このような界面活性剤による脱脂の場合、種々の程度に脱脂して調製した酵素中に内在する脂質量とそのリパーゼ活性との関係を調べた結果が Fig. 1 であって、酵素に結合している脂質の減少が酵素活性を著しく低下せしめることを示している。

3. 酵素活性の回復に必要な脂質

つぎに、このようなヒマシリパーゼの活性発揮のために必要な脂質は、いかなる種類の脂質であるかを知る一つの手がかりとして、10%ポリオキシエチレン・ノニルフェニルエーテルで3回反復脱脂して活性の低下した酵素と、脱脂前の粗酵素とから、それぞれクロロホルム-メタノール (1:1) で脂質成分を完全に抽出し、この両者の抽出脂質の組成を薄層クロマトグラフィーで分析し、比較してみた。その結果は Fig. 2 のとおりであって、明らかに界面活性剤で処理した活性の低い酵素中の脂質は、未処理の活性の高い酵素の脂質に比べて、複合脂質を主とする極性脂質の比率が大きいことを示している。すなわち、これは酵素活性に関係する脂質は、複合脂質部よりも、むしろいわゆる中性脂質部 (非極性脂質部) に含まれているらしいことを暗示している。

そこで界面活性剤によって脱脂されて活性の低下した低脂質含量の酵素に、ヒマ種子脂質中のアセトン可

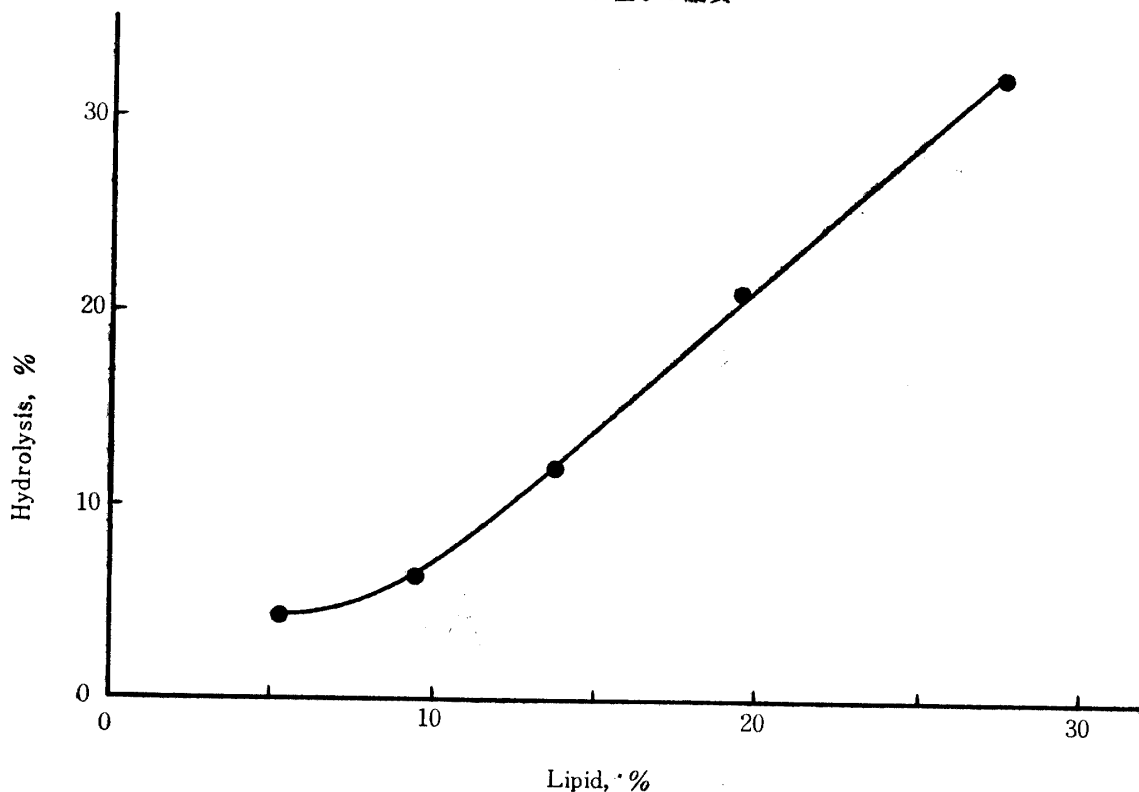


Fig. 1. Effect of endogenous lipids of lipase preparations on their activity.

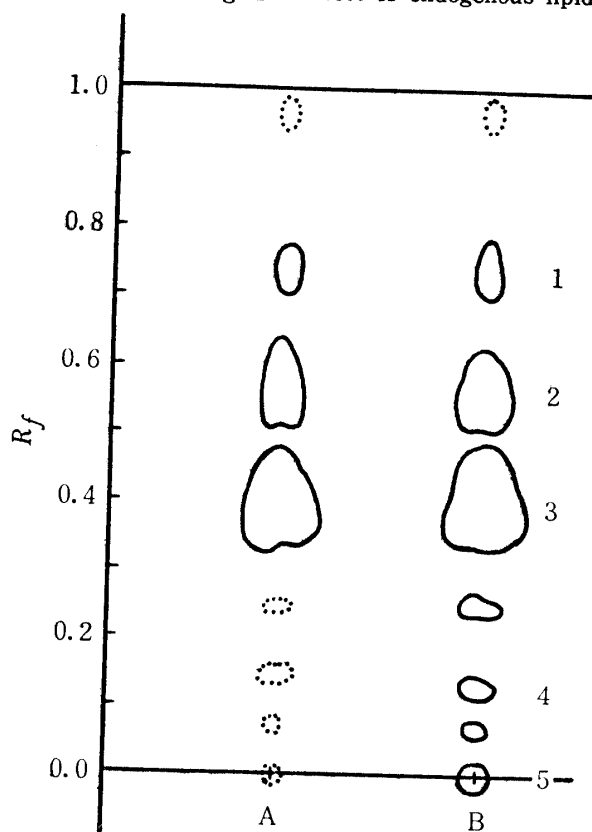


Fig. 2. Thin-layer chromatogram of bound lipids in original crude lipase (A) and a lipase preparation after surfactant treatment (B).

Adsorbent, Silica Gel-G; solvent system, petroleum ether—diethyl ether—acetic acid (50 : 50 : 1); detection method, charring with 50% sulfuric acid.

The spots identified: 1, monoricinoleo-triglyceride; 2, diricinoleo-triglyceride; 3, triricinolein; 4, monoglyceride; 5, compound lipids.

Table 2. Restoration of lipase activity.

Additive	Ester bonds hydrolyzed. %
None	4.6
Triricinolein	32.8
Diricinoleo-triglyceride	20.3
Monoricinoleo-triglyceride	13.5
Triolein	5.8
Diricinolein	11.0
Monoricinolein	8.7
Monogalactosyl diglyceride	2.1
Phosphatidyl choline	- 3.5
Phosphatidyl ethanolamine	- 2.8
Ricinoleic acid	1.4
"Neutral lipids"	24.6
"Compound lipids"	- 4.9

溶部（「中性脂質」部）とアセトン不溶部（「複合脂質」部）をそれぞれ添加して酵素活性の回復の有無を検したところ、「中性脂質」部の添加によってかなりの活性の回復が認められたが、「複合脂質」部の添加によって逆に失活することが認められた（Table 2）。

したがって本リパーゼは「中性脂質」部のある種の脂質をコファクターとして必要とすることが推定されるに至った。

この脂質が何であるかをさらに追究するために、合成または単離された種々の単一脂質をそれぞれ加え、活性回復に関する効果を調べたところ、Table 2に見

られるようにグリセリド，特にリシノール酸を含むトリグリセリドの添加が最も効果的であることを知った。これに反し，糖脂質やリン脂質，遊離リシノール酸などには効果が認められなかった。なお Table 2 のリパーゼ活性測定結果はトリオレインを基質とし，pH 4.5, 35°C で40分間反応させたときの分解率である。

IV. 考 察

以上の結果から明らかなように，ヒマシリパーゼにおいては，ヒマ種子脂質と共存している場合にリパーゼ活性が強く，共存または結合している脂質を除去するにしたがって活性が低下する傾向がある。このような傾向は一般の植物種子リパーゼに共通して見られる傾向であるが，ヒマシリパーゼの場合は特に顕著であった。しかも溶媒抽出による完全な脱脂は，特別な抽出法によらない限り失活を将来し，これにいかなる脂質を添加しても，もはや活性は回復しない。したがってヒマ種子を直接有機溶媒で処理して脱脂した場合も，リパーゼ活性は完全に失われ，脂質の添加による活性回復も望めない。おそらくこの場合は酵素タンパク質自体の非可逆的な変性のために，酵素活性を発現する脂質-タンパク質複合体を再び形成しえなくなるものと考えられる。

これに反し，常に水を含む系で，徐々に脱脂されていった酵素液では完全な失活が起らず，脂質の添加によって，かなりの程度にまで活性は回復する。これより見ると，リポタンパク質的な形態で水中のミセル形成が保持できる間は，酵素タンパク質の徹底的な変性が防止されているものと推量される。

このように脂質はヒマシリパーゼの基質としての意味を持っているだけではなくて，リパーゼ活性発現のために必要なコファクターであることは確実である。その場合の結合脂質の機能については詳細を明らかにすることはできないが，少なくとも反応溶液の乳化，基質と酵素とからなるミセル形成に役立ち，酵素作用を容易とすることに寄与しているものと思われる。

上記のようなヒマシリパーゼにおけるコファクターとしての脂質の必要性については，Ory¹⁾も指摘しているところであるが，彼はさらに進んでこの必要とされる脂質を追究した結果，それはリシノール酸の環状四量体であったと報告している。

本実験においても同様の見地から，一度脱脂によって活性の大部分を失った酵素に，各種の単一脂質を加え，どの脂質の添加が活性の回復に効果があるかを調査している。その結果によれば，Table 2 のようにグリセリド，とりわけリシノール酸を含むトリグリセリ

ドに明らかな効果が認められた。これらのトリグリセリドは，ヒマ種子混合脂質からクロマトグラフ的に単離されたものであって，その際 Ory の言うようなリシノール酸環状四量体¹⁾はクロマトグラム上で検出できなかった。ただ，一つの可能性として，クロマトグラム上で分離不完全であったために，このものがトリグリセリド画分中に混入してくるということは考えられる。しかし他の植物種子においても，同種のリパーゼ活性の回復が，普通の脂肪酸で構成されたグリセリド部の添加によって回復した例も見られるので，Ory のリシノール酸環状四量体のみを唯一の脂質性コファクターであると考えるのは妥当でないであろう。

この結果のように，リシノール酸を含むグリセリドの内在がリパーゼの活性に効果があるとすれば，このグリセリドと酵素タンパク質との結合様式，またグリセリド-酵素タンパク質複合体と基質トリグリセリドとによるミセル形成と両者の作用形態など，解明されねばならぬ重要な点が多いが，現段階では明らかでない。ただこの場合は，リシノレオ-グリセリド中の水酸基がこの種の結合に関して重要な役割を演じるであろうことは想像できる。

しかしいずれにしても，一般に生体内において機能脂質として重要視されているリン脂質や糖脂質は，この場合にはあまり関係がなく，貯蔵エネルギー源としてのみ見られがちの中性脂質部にこのように機能的な面が存在することは興味深いことであって，今後は中性脂質部の持つ機能的な特性についても種々の現象面で注目されねばならないものと考えられる。

引用文献

- 1) Ory, R. L. (1969) : *Lipids* 4 : 177-185.
- 2) Ory, R. L., St. Angelo, A. J. and Altschul, A. M. (1960) : *J. Lipid Res.* 1 : 208-213.
- 3) Ory, R. L., St. Angelo, A. J. and Altschul, A. M. (1962) : *J. Lipid Res.* 3 : 99-105.
- 4) Snyder, F. and Stephens, N. (1959) : *Biochim. Biophys. Acta* 34 : 244-245.
- 5) Noda, M. and Fujiwara, N. (1967) : *Biochim. Biophys. Acta* 137 : 199-201.
- 6) Dittmer, J. C. and Lester, R. L. (1964) : *J. Lipid Res.* 5 : 126-127.
- 7) Bartlett, G.R. (1959) : *J. Biol. Chem.* 234 : 466-468.
- 8) Lowry, O.H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R.J. (1951) : *J. Biol. Chem.* 193 : 265-275.
- 9) Sloane-Stanley, G. H. (1967) : *Biochem. J.* 104 : 293-295.

Summary

Lipase activity of castor bean was lost by direct treatment of castor bean meal with most organic solvents, but it remained when the bound lipids of lipase were removed from the crude lipase solution by careful extraction with cold diethyl ether or a nonionic surfactant. The activity was reduced with decreasing the lipid content in a lipase preparation,

and it was restored when the lipid extracts, especially acetone-soluble "neutral lipids", were added back to the delipidized lipase preparation with reduced activity. Obvious restoration of the lipase activity was observed on addition of ricinoleo-triglycerides which might serve as a lipid cofactor in castor bean lipase.