



Title	クジラリパーゼに関する研究：第1報 ミンク腓リパーゼ
Author(s)	石原, 義雄; ISHIHARA, Yoshio
Citation	北海道大學水産學部研究彙報, 11(1), 23-28
Issue Date	1960-05
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/23094
Type	departmental bulletin paper
File Information	11(1)_P23-28.pdf



クジラリパーゼに関する研究

第1報 ミンク豚リパーゼ

石原義雄

(北海道大学水産学部水産化学教室)

Studies on Whale Lipase

I. Lipase of the pancreas of little finner

Yoshio ISHIHARA

Abstract

Acetone powder of the pancreas of whale (*Balaenoptera acuto-rostrata* LAC.) was prepared in a manner essentially similar to that described by Meyer *et al.* (1947). Whereas for ox-lipase about 20-30 hrs. was required to perform perfect extraction with glycerin from its acetone powder, for whale-lipase only 3 hrs. was needed at 30°C. Optimum pH with Michaelis' ammonium buffer was 8.9 for both lipases. Effects of egg albumin and CaCl₂ as activators on lipase action were examined. Lipase of whale pancreas was activated principally with the latter by a 700% increase. Whale-lipase digested various fish liver oils and whale oils as well as olive oil, but ox-lipase so acted upon fish liver oils less, and whale oils much less than olive oil.

緒言

リパーゼに関する研究は Eberle (1834), C. Bernard (1856) により膵液が脂肪分解能を有する事を発見した事に始まり、以後 Willstätter¹⁻³⁾ 一派を始め多数の報告あり。中、水産動物リパーゼに就てはコウイカ・ヤリイカ・ジャコウダコ⁴⁾、ブタイ⁵⁾、クサフグ・キヌベラ・カエルウオ⁶⁾等の肝膵臓、イソギンチャクの腸間膜⁷⁾、カスベの膵液⁸⁾、サバ・イワシ・ニシン・カツオ・ブリ⁹⁾等の膵臓抽出液、サバ・メンハーデン・アカダイ¹⁰⁾等の肝臓・膵臓・幽門垂に就ての報告が見られるが、一部魚類の特有器官である幽門垂にはかなり強力なものから殆んど存在せぬ¹¹⁾ものまで魚種により大きく異なるようである。

鯨類における臓器酵素としては胃ペプシン¹²⁾、膵トリプシン¹³⁾、肝臓・腎臓カテプシン¹⁴⁾並びにアルギナーゼ (arginase)¹⁵⁾等に就て報告されているが、リパーゼに関する報告は高田¹⁶⁾の胃リパーゼが第3胃に多く存在 (ペプシンは第2胃)¹²⁾する事、豚リパーゼが相当強力な活性を有する事を定性的に観察しているのみで、この他は詳細な報告は見当らぬ。温血動物でありながら水棲という環境に適応する為に厚く豊富な脂肪層 (体重の約20%前後を占む) に囲繞されている事よりして旺盛な脂肪代謝、従つてそのリパーゼも極めて強力なるべき事が予想される。更にまたマッコウクジラのような異常な脂質代謝 (多量のワックスと相当量の比較的低級な脂肪酸を含有する) を行つている種属のリパーゼの特異性は興味を惹く所である。これに関し、ワックス様脂質を外膜に有する結核菌に対する作用が明かに認められたが、詳細は細菌学教室坂井教授と共同実験中で別の機会に報告する。

いま1頭当たり平均10kgの膵臓としても、近海捕鯨のみで3000~4000頭、これに北洋・南氷洋捕鯨を加える時は年間優に10000頭を越える漁獲量 (1958/59年度では実に12000頭に達す) を考えると、インシュリン資源と共に酵素資源としても豊富貴重な存在と考える。ここに牛と対比しつつミンクの豚リパーゼの酵素化学的な性質を観察したので報告する。

実験の部

試料

北海道網走沖で捕殺したミンク（コイワシクジラ）（*Balaenoptera acuto-rostrata* Lac.）の死後10時間前後の鮮度極めて良好なものを解剖後直ちに凍結輸送， -35°C 附近に凍結貯蔵したものを供試した。この凍結貯蔵物は相当長期にわたって活性を保持する。牛の脾臓は屠殺直後の成牛のものを供試。

* 1. アセトン・パウダー調製

アセトン・パウダーの調製には Willstätter¹⁾ 法と Meyer *et al.*¹⁷⁾ の之の変法があるが主として後者に従つて（溶媒の使用量少量で済む）次のように行つた。凍結貯蔵のミンク脾臓の脂肪塊及び繊維を出来る限り除去したものを、氷結状態のまま低温下肉挽器に2~3回通してペースト状にする。このもの1kgを取り3倍量の冷アセトンを攪拌しながら少量宛添加（ドライアイスを利用すると便利である）、低温に約3時間放置後プフナー漏斗で吸引濾過、次に2倍量のアセトンを加えて同様処理を2回繰返した後、冷アセトン・エーテル等量混液2倍量加えて2回、最後に2倍量の冷エーテルで2回処理す。ここに得られた脱水物を更に真空デシケーター内で速やかに乾燥白色粉末とす。このもの低温下真空内貯蔵する時は数年間にわたって安定である。

収量—ミンク：241g (24.1%)，牛：215g (21.5%)

2. 酵素液調製

浸出剤には稀アンモニア液も用いられているが、安定性の遙かに大きいグリセリンを用いて次のように行つた。前記のアセトン・パウダーに16倍量の87%グリセリンを加え 30°C に一定時間放置後3500 r. p. m. 40分遠心して半濁液を取り、これに3~5倍量の水を添加後更に30分遠心すると透明なグリセリン浸出液が得られる。

3. 活性測定

Willstätter¹⁾ のアルカリ滴定法により次のように行つた。

オリーブ油（ケン化価193.0，酸価1.6，比重0.9200）2ml， 0.2N $\text{NH}_4\text{Cl}-\text{NH}_4\text{OH}$ 緩衝液（pH 8.9）10ml，2% CaCl_2 液0.5ml，3%アルブミン液（武田製卵アルブミン）0.5ml及び酵素液1.0ml（87%グリセリン抽出原液をそのまま乃至は3~5倍稀釈液を供試）より成る反応混液を30ml共栓瓶に取り 40°C 恒温水槽中1時間振盪下消化後，アルコール30ml，エーテル15mlを以て反応液を洗出し，分解生成した脂肪酸を 0.1N KOH アルコール溶液によりフェノールフタレインを指示薬として滴定，盲験値を差引き常法により分解度をケン化価に対する百分率として計算す。

一般油脂分解の場合もこれに準ず。

実験結果並びに考察

1. 浸出時間

対照に牛の脾臓を用いてグリセリンのクジラリパーゼ浸出能力を比較した。

牛・ミンク脾臓のアセトン・パウダーには87%グリセリンを16倍量加え 30°C に於て浸出，オリーブ油の分解度を時間の経過と共に測定した結果が第1表の如くである。活性測定の酵素液はグリセリン抽出原液の3倍稀釈液を供試。

これによるとミンク脾リパーゼは‘Lyo-form’が主で 30°C 約3時間で殆んど全部が浸出せられて強力な活性を示すが，牛の脾リパーゼは 30°C 20~30時間を要し‘Desmo-form’が多量なる事を示す。浸出の難易はこのような酵素の結合形態の他に組織の脆弱性も関係しているものと考えるが，Boissonas¹⁸⁾ (1948)も豚の脾リパーゼの最高浸出には36時間を要する事を報告している。相対的な活性比較の場合にはこのように浸出時間を顧慮するを要す。各組織の最適浸出時間により調製した酵素液を以て測定しなければならない。以下ミンクリパーゼは3時間，牛リパーゼは20時間の浸出液を供試した。

Table 1. Activity and extraction time of acetone powder

Time	Little finner-lipase		Ox-lipase	
	Acidity increase (0.1 N KOH)	Digestion ratio	Acidity increase (0.1 N KOH)	Digestion ratio
hrs.	ml	%	ml	%
0.5	10.15	16.0	1.06	1.7
1	11.38	17.9	3.62	5.7
3	12.12	19.1	4.31	6.8
5	12.24	19.3	6.16	9.7
8	12.06	19.0	6.20	9.8
10	10.20	16.1	6.39	10.1
15	11.13	17.6	6.68	10.8
20	9.90	15.6	7.47	11.8
30	8.80	13.9	7.60	12.0
40	7.95	12.5	6.85	10.8

2. 至適 pH

酵素の至適 pH は標品の純度、緩衝液の種類、基質等により大きな影響を受けるものであるが、殊にリパーゼの場合は乳化性に支配され易い。ここに同一条件下で牛・ミンク両リパーゼの至適 pH を比較して見た。0.2N NH₄Cl-NH₄OH 緩衝液、酵素液 1.0ml (グリセリン抽出原液の 5 倍稀釈液) について 40°C 1 時間消化を行つた結果が第 2 表に示す通りである。

Table 2. Dependence of digestion of olive oil on pH by whale- or ox-lipase

Lipase	pH									
		8.04	8.27	8.49	8.67	8.86	9.10			
Little finner	Acidity increase (0.1 N KOH)	ml	3.86	3.60	7.02	7.97	9.05	6.45		
	Digestion ratio	%	6.1	5.7	11.1	12.6	14.3	10.2		
Ox	Acidity increase (0.1 N KOH)	ml	1.39	2.40	3.29	3.98	4.68	2.02		
	Digestion ratio	%	2.2	3.8	5.2	6.3	7.4	3.2		

これ迄の報告によるとヒマシリパーゼの至適 pH が 4.7~5.0 (発芽に伴い中性附近へ移行す)、胃リパーゼ¹⁹⁾²⁰⁾ は pH 5.5~8.6 (動物の種類、標品の精製度により大きく変移す)、乳汁リパーゼ²¹⁾ は pH 8.0 附近であるのに対し豚リパーゼは pH 8.5~8.9¹⁾ とされているが本実験条件の下ではミンク・牛共にその豚リパーゼは至適 pH 8.9 を示す。

3. アルブミン及び CaCl₂ の影響

これ迄の膵リパーゼに対する代表的な 'activator' としては、アルカリ性反応に於ける胆汁酸²²⁾²³⁾, 卵白アルブミン¹⁾²⁴⁾, 可溶性 Ca 塩¹⁾²⁵⁾²⁶⁾ 等が知られているが、これらは基質と酵素の接触を促進する吸着性、乳化作用、及び反応生成物(主として高級脂肪酸)の反応系外への除去などになるものと考えられている。クジラ・牛両リパーゼが卵白アルブミン及び Ca⁺⁺ によりどの程度影響を受けるかを観察した結果が第3表の如くである。実験Iでは87%グリセリン抽出原液1.0ml, 実験IIではこの酵素原液の3倍稀釈液1.0mlを供試した。

Table 3. The effects of egg albumin and CaCl₂ on lipase action

Activator			Little finner-lipase					
No.	CaCl ₂	Albumin	Experiment 1 **			Experiment 2 *		
			Acidity increase (0.1 N KOH)	Digestion ratio	Degree	Acidity increase (0.1 N KOH)	Digestion ratio	Degree
	mg	mg	ml	%		ml	%	
1	—	—	1.64	2.6	100	2.46	3.9	100
2	10	—	11.39	18.0	692	13.16	20.8	533
3	—	15	2.15	3.4	131	2.73	4.3	113
4	10	15	11.45	18.1	695	13.60	21.5	552

Ox-lipase					
Experiment 1 **			Experiment 2 *		
Acidity increase (0.1 N KOH)	Digestion ratio	Degree	Acidity increase (0.1 N KOH)	Digestion ratio	Degree
ml	%		ml	%	
1.45	2.3	100	2.28	3.6	100
4.68	7.4	322	6.14	9.7	269
1.83	2.9	122	2.53	4.0	111
4.62	7.3	317	6.20	9.8	272

* There was used a original glycerol enzyme solution

** There was used a threefold diluted enzyme solution

両者共に Ca⁺⁺ による影響非常に大で、クジラリパーゼでは無添加の場合の550~700%であるのに対し、牛リパーゼでは300%前後に止まる。対照の活性が同程度であるので、クジラリパーゼの方が遙かに Ca⁺⁺ の影響を大きく受けている事が解る。両者共に卵アルブミンの賦活作用は余り認められない。これに就て Platt & Dawson²⁷⁾ もアルブミンの賦活作用を特別に認めていない。但し長時間の消化の場合にはリパーゼの安定性に寄与する為に好影響を与えるようである。

4. 各種油脂類の分解能

構成脂肪酸を定性的・定量的に異にする各種天然油脂に対する各種膵リパーゼの分解能は興味を惹く所であるが、他の加水分解酵素に比較してリパーゼはこの特異性は余り顕著でないとされているが、豚リパーゼ

に就てヤシ油・ヒマシ油・糠油・パーム核油等の植物油分解能大なる事が報告されているので、ミンク並びに牛の腓リパーゼの各種天然油脂に対する分解能を比較してみた。酵素液はグリセリン抽出原液の5倍稀釈液を供試。結果は第4表の如くである。

Table 4. The hydrolysis of little finner- and ox-pancreas lipase
on various natural oils
Digestion ratio for 30, 60 & 180 min. at 40 °C

Oils	Acid Value	Sap. Value	Iodine Value	Little finner-lipase			Ox-lipase		
				30min.	60	180	30min.	60	180
Olive oil	2.1	193.0	80.2	8.4	10.9	15.8	4.3	6.3	8.6
Cotton seed oil	0.8	192.3	107.0	8.6	11.6	16.0	4.2	6.2	8.2
Castor oil	0.99	182.2	85.4	8.0	12.7	18.7	4.9	7.0	10.0
Rice-bran oil	17.8	210.5	102.8	9.2	12.1	17.9	5.5	8.6	12.8
Sardine oil	4.8	192.8	170.5	7.4	10.5	17.6	2.1	3.8	6.2
Pollack liver oil	1.4	185.8	165.0	6.9	10.6	16.3	2.5	4.3	5.3
Cod liver oil	0.63	181.7	165.2	6.0	9.9	15.2	2.0	4.1	5.5
Flat fish liver oil	2.8	179.2	95.0	6.2	10.5	14.9	2.8	3.9	4.9
Shark liver oil	2.1	154.4	113.3	6.5	10.6	13.8	1.9	2.7	3.9
Finback oil	0.4	190.8	111.7	7.1	11.1	16.5	2.3	4.2	5.8
Sperm oil	8.5	127.8	85.8	6.8	10.4	14.0	1.5	1.8	2.7

小野³¹⁾によるとヒマシリパーゼはヒマシ油・オリーブ油等の植物油に対する分解能が、イワシ油・タラ肝油・鯨油等の動物油よりも大で、豚腓リパーゼは逆に動物油に対する分解能の方が大であるとしているが、一方 Hartwell²⁸⁾、伊藤²⁹⁾、清水³⁰⁾等は豚腓リパーゼがヤシ油・ヒマシ油・糠油を強く分解する事を報告している。本実験では、ミンクリパーゼは動物油に対して植物油と大差なく分解するが、牛リパーゼは動物油に対する分解能可なり劣る事が認められる。特に抹香油に対する分解能が小さい。

また Chrzaszes *et al.*³²⁾によると、豚・牛・羊の腓リパーゼの活性度を大体 4.0:2.5:1.5 としているが、ミンクは牛に対して約2倍の活性度を有している。特に抹香油に対する分解能で大差を示し、牛リパーゼはミンクの約2倍に過ぎない。クジラリパーゼは強力な活性を有する事が認められる。

要 約

新鮮ミンク膵臓よりアセトン・パウダーを調製し、そのリパーゼの種々の性質を牛膵臓リパーゼと比較した。

1. グリセリンによる浸出に於てミンクリパーゼは 'Lyo-form' が主で 30°C 3時間で殆んど完了し強力な活性を示すが、牛腓リパーゼは20~30時間を要し 'Demo-form' の多い事が認められる。
2. Michaelis の NH₄Cl-NH₄OH 緩衝液を用いオリーブ油分解における至適 pH を測定し両者共に 8.9 なる事を示した。

3. リパーゼの代表的な *activator* である卵白アルブミン, CaCl_2 による賦活作用を検討した所, 両リパーゼ共に主として CaCl_2 によるもので, その分解度の上昇はミンクに対して約 550~700% であるのに対し牛では約 300% であつた。
4. 各種天然油脂に対する分解能を比較して, ミンクリパーゼは大体オリーブ油と同程度に魚油・鯨油を分解し得るに対し牛リパーゼは明かに劣る。特に牛の抹香油分解能はクジラの約 1/2 程度に過ぎない。

一連の本研究遂行に当り斎藤恒行教授の御指導御鞭撻に対し心からの謝意を表す。

(本研究は文部省科学研究費—斎藤恒行教授分担水産動物油脂に関する研究—によつた)

文 献

- 1) Willstätter, R., Waldschmidt-Leitz, E. & Memmen, F. (1923). *Z. physiol. Chem.* 125, 93.
- 2) ————— & Memmen, F. (1923). *Ibid.* 129, 1.
- 3) ————— (1924). *Ibid.* 138, 216.
- 4) Romijn, C. (1935). *Arch. neerland zool.* 1, 373; *Chem. Abst.* 30, 1396.
- 5) 石田 (1935). 動雑 47, 694.
- 6) — (1936). *Annotationes Zoological Japonenses* 15, 263.
- 7) — (1936). *Ibid.* 15, 285.
- 8) Babkin, B. P. (1929). *Biol. Bull. Marine Biol. Lab.* 57, 272.
- 9) 佐々木・小田切 (1951). 農化 24, 350.
- 10) Chesley, L. C. (1934). *Biol. Bull.* 66, 133; *Chem. Abst.* 28, 4489.
- 11) 服部・塚元 (1936). 衛生化学 8, 341.
- 12) 斎藤・石原 (1956). 農化 30, 427.
- 13) 高田 (1925). *J. J. M. Biochem.* 1, 73; 石川 (1948). 日水誌 14, 107.
- 14) 内野・松尾 (1942). 東北医 31, 159.
- 15) 内野・友田 (1943). *Ibid.* 32, 231.
- 16) 高田 (1932). *J. J. Med. Science II. Biochem.* 1, 11, 73.
- 17) Meyer, K. H., Fisher, E. H. & Bernfeld, P. (1947). *Helv. Chim. Acta* 30, 75.
- 18) Boissonas, R. A. (1948). *Ibid.* 31, 1577.
- 19) Waldschmidt-Leitz, E. & Sehäffner, A. (1940). *Methoden der Fermentforschung.* 1547p. Leipzig; Thieme.
- 20) Noyes, H. M., Sugiura, K. & Folk, K. G. (1923). *J. Biol. Chem.* 55, 653.
- 21) Itoh, R. & Kamisasanuki, K. (1941). *J. Biochem. Japan* 33, 269.
- 22) Willstätter, R. & Bamann, E. (1928). *Z. physiol. Chem.* 173, 17.
- 23) Balls, A. K., Matlack, M. B. & Tucker, I. W. (1937). *J. Biol. Chem.* 122, 125.
- 24) Willstätter, R. & Memmen, F. (1924). *Z. physiol. Chem.* 133, 229.
- 25) Steudel, H. (1947). *Biochem. Z.* 318, 205.
- 26) Schönheyder, F. & Volqvartz, K. (1945). *Acta Physiol. Scand.* 10, 62; 11, 349.
- 27) Platt, B. S. & Dawson, E. R. (1925). *Biochem. J.* 19, 860.
- 28) Hartwell, G. A. (1938). *Biochem. J.* 32, 462.
- 29) 伊藤 (1937). 生化 12, 190.
- 30) 清水 (1951). 生化 23, 105.
- 31) 小野 (1939). 農化 15, 1085.
- 32) Chrzaszcz, T. & Janick, M. (1938). *Biochem. Z.* 296, 20.