Japanese Society of Pharmaceutical Health Care and Sciences

Rhizopus japonicus sp. 由来のリパーゼ活性*1

金久保好男,*a 鈴木 満, 迫 光子, 山口裕子*2
東北大学医学部附属病院薬剤部*2

Lipase Activity Derived from *Rhizopus japonicus* sp.*1

YOSHIO KANAKUBO,*a MITSU SUZUKI,
MITSUKO HASAMA, and YUKO YAMAGUCHI*2
Hospital Pharmacy, Tohoku University School of Medicine*2

(Received July 30, 1981)

The effects of Fe ion on lipase activity of two kinds of *Rhizopus japonicus* sp. were studied. The enzyme activities with Fe and without Fe were compared in various pH values. In sample A, almost same activities were observed at pH 3.2, 4.0, 5.0 and 6.0, while in sample B, the activity was low at pH 3.2 without Fe ion and increased in proportion to pH values. Activity was almost same at pH 4.0, 5.0 and 6.0, but increased at pH 3.2 with Fe and almost same at pH 3.2, 4.0, 5.0 and 6.0. It was found that samples A and B had the same components, but the different molecular states in protein as tested by the electrophoresis method and molecular filtering. In low pH values, sample B was in higher molecular state than sample A. However, in the presence of Fe ion, it changed to the low molecular state. It was considered that the lipase activity accelerated in the presence of Fe ion influenced the molecular state.

Keywords——lipase; *Rhizopus japonicus* sp.; Fe ion; lipase activity; protein; electrophoresis; molecular filtering

前報[1]では，総合消化酵素剤の胃溶部分に含まれる微生物消化酵素のなかに鉄イオンの存在によってリパーゼ活性が著しく促進される種類のあることを報告した．鉄イオンによってリパーゼ活性が促進される作用は，キレート試薬 EDTA の添加により消失することから，リパーゼ活性が促進されるのは明らかに鉄イオンが関与しているためと推定された．しかし，鉄イオンがリパーゼ活性を促進する作用の機構を解明するには至らなかった．今回，消化酵素剤より純度の高い2種類（A, B）の *Rhizopus japonicus* sp. 菌体内リパーゼを入手する機会を得たので，リパーゼ活性におよぼす鉄イオンの影響と共に鉄イオンがリパーゼ活性を促進する作用の機構について検討した．

実験方法

リパーゼ活性の測定法および鉄イオンの添加については，前報[1]と同様の方法で行った．試料は水抽出液とし，濃度は 0.1% に調製して用いた．また，試料Bは鉄イオン以外の金属イオンの影響についても確かめた．一方，鉄イオンがリパーゼ活性を促進する機構を検討[2,3]するために電気泳動法や分子ろ過を行い，試料 A, B の蛋白成分について比較検討した．電気泳動にはカヤガキ免疫電気泳動装置，定電流 TS-104 N 型およびミツミ SJ, 1060 D 型を用いた．

実験結果

1. 鉄イオンの影響

1) リパーゼ活性と鉄イオン

試料 A の pH 3.2, 4.0, 5.0, 6.0 におけるリパーゼ活性，および基質に鉄イオンを添加した場合の活性を Fig.

*1 本報を「リパーゼ活性におよぼす鉄イオンの影響」第2報とする．日本薬学会第97年会（東京，1977年4月）および第17回日本薬学会東北支部大会（仙台，1978年10月）で発表．

*2 仙台市星陵町 1-1; 1-1, Seiryo-cho, Sendai-shi, 980 Japan

*a 現：千葉大学医学部附属病院薬剤部

NII-Electronic Library Service

Japanese Society of Pharmaceutical Health Care and Sciences

1に示した．試料Aは鉄イオンを添加しない反応系では，いずれのpHにおいても平均的なリパーゼ活性がみられ，鉄イオンを添加した場合はpH 3.2, 4.0でいくぶん活性は抑制ぎみであるが，鉄イオンによる大きな影響は認められなかった．

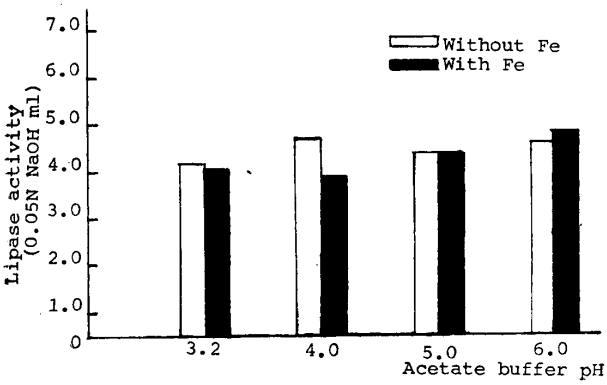

Fig. 1. Lipase Activity of Sample A

試料Bは Fig. 2に示されるように，鉄イオンを添加しない基質のリパーゼ活性はpHによって大きな差異が認められた．すなわち，pH 3.2の活性はpH 4.0, 5.0, 6.0に比較すると著しく低く，pH 3.4, 3.6, 3.8とpHの上昇と共にリパーゼ活性は増大した．他方，鉄イオンを添加した場合は，活性の低いpH 3.2においてもpH 4.0, 5.0, 6.0と同程度のリパーゼ活性が認められた．

以上の結果から，鉄イオンの影響が認められた試料Bについて，鉄イオンとの関連を検討することとした．なお，反応前後の基質のpHを測定したが，いずれの場合も変動は認められなかった．

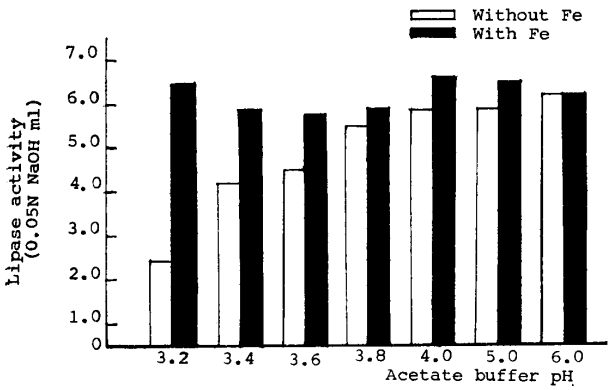

Fig. 2. Lipase Activity of Sample B

2) リパーゼ活性曲線

試料Bについて，鉄イオンの影響の著しいpH 3.2におけるリパーゼ活性の進行状態を経時的に鉄イオンを添加しない反応系と添加した系で比較した．リパーゼ活性曲線は，Fig. 3にみられるように鉄イオンを添加しない場合は1分後から，ほとんどリパーゼ活性の増加はみられないが，鉄イオンを添加した系は反応時間の経過と共にリパーゼ活性が増加した．

3) 反応中の基質への鉄イオンの添加

Fig. 3から，試料BのpH 3.2のリパーゼ活性は鉄イオンを添加した場合，時間の経過と共に促進されたことから，反応中の基質に鉄イオンを経時的（反応開始1, 5, 10, 20分後）に添加してみたところ，Fig. 4の結果を得た．鉄イオンの影響は，いずれの添加時点においてもリパーゼ活性の促進がみられたが，添加時が早いほど活性促進の影響は大きく，反応を開始してから10, 20分後の鉄イオンの添加は影響が少なかった．

4) 鉄イオンとキレート試薬 EDTA

これまでの試料Bに対する鉄イオンの影響をより確かめるために，鉄イオンを添加した反応系に反応を開始してから，1, 5, 10, 20分後に0.01 M EDTA標準液を加えたところ，Fig. 5に示される結果を得た．いずれの反応も30分後のリパーゼ活性は，反応開始時に鉄イオンを添加した場合より低く，キレート試薬EDTAの添加が早いほどリパーゼ活性の増加はみられなかった．なお，EDTA標準液のリパーゼ活性に対する影響は認められなかった．

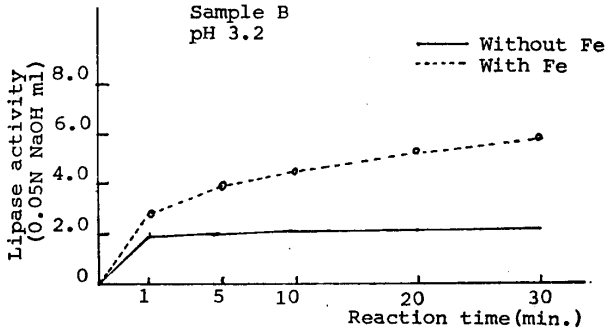

Fig. 3. Reaction Time and Lipase Activity

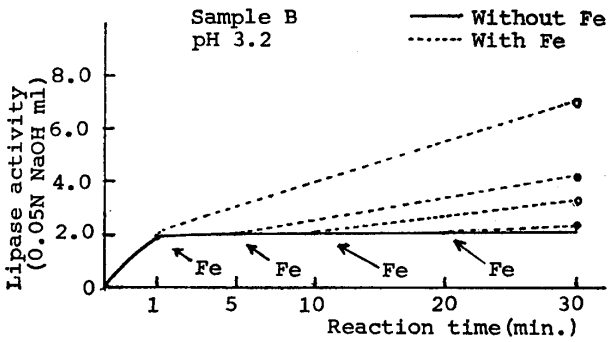

Fig. 4. Effect of Fe Ion Added during Reaction

NII-Electronic Library Service

Japanese Society of Pharmaceutical Health Care and Sciences

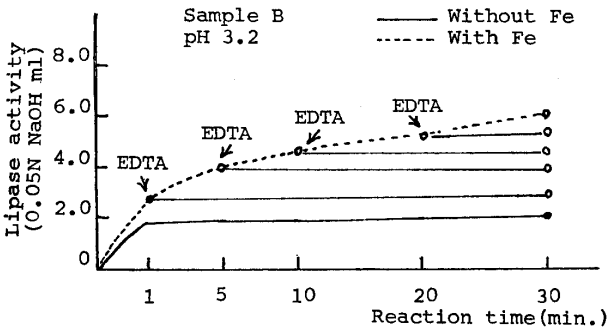

Fig. 5. Metal-chelating Reagent Added during Reaction

5) 鉄イオンの濃度による影響

Fig. 5 からキレート試薬 EDTA の添加によってリパーゼ活性の促進が抑制されたことは，鉄イオンの影響が消失したものと考えられた．このことから試料Bのリパーゼ活性に対する鉄イオンの影響が確認されたので，さらに鉄イオンの濃度を高めて濃度による影響を検討した．鉄イオンの濃度をこれまでの濃度より5倍，10倍と高めた場合は，Fig. 6にみられるように，いずれの濃度においても同程度であり，この濃度範囲ではリパーゼ活性におよぼす影響に差異が認められなかった．

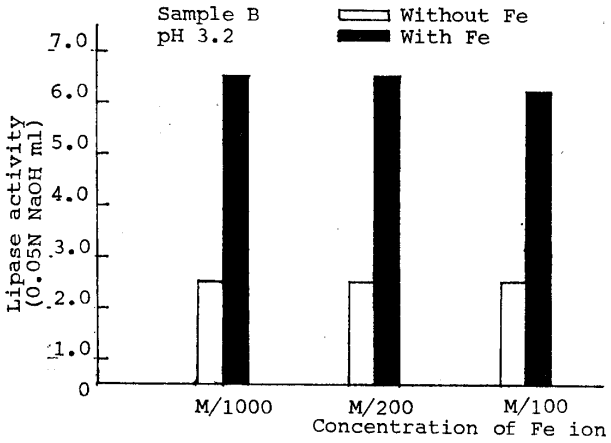

Fig. 6. Effect of Fe Ion

6) 鉄イオン以外の金属イオンの影響

試料Bについて，鉄イオン以外の Ca^{2+}, Mg^{2+}, Cu^{2+}, Zn^{2+}, Co^{2+} などの金属イオンの影響を検討したが，Table 1 に示されるように，いずれの金属イオンも鉄イオンほどのリパーゼ活性の促進は認められなかった．

2. 試料の蛋白成分について

これまでの事実から，鉄イオンによりリパーゼ活性が促進される影響は，試料Bの特異性によるものと考えられたので，試料 A と B の蛋白成分について比較検討した．

Table 1. Effect of Metal Ions on Sample B

pH	3.2	M^{2+}	4.0	M^{2+}	5.0	M^{2+}	6.0	M^{2+}
Mg	2.42	3.35	5.95	6.25	5.74	5.78	6.47	6.44
Ca	〃	3.29	〃	5.70	〃	5.66	〃	6.51
Co	〃	3.14	〃	6.05	〃	5.86	〃	6.14
Cu	〃	3.33	〃	6.29	〃	5.47	〃	6.42
Zn	〃	3.60	〃	6.33	〃	6.36	〃	7.24

Lipase activity (0.05N NaOH ml)

1) 蛋白質量

試料Aの 0.5010 g，試料Bの 0.5005 g を 0.1 N NaOH に溶解して 10 ml とし，遠沈し，上清溶液を蛋白試料とした．蛋白質の定量はビューレット法に従って行ったところ，試料Aは 29.48%，試料Bは 52.35% であった．

2) 蛋白成分の電気泳動

蛋白質の定量の結果，試料AとBに含まれる蛋白質量には大きな差がみられたが，さらに電気泳動法によって蛋白成分の組成を検討した．Fig. 7に示すセルロースアセテートによる泳動はベロナール緩衝液を用い，染色剤はポンソー3R を使用した．泳動の結果，aとbの2本のバンドは試料 A, B ともに全く同様であった．

また，等電点分画法を行ったところ，Fig. 8にみられるように，試料 A, B ともに等電点 pH 8～8.6 の間の蛋白質を含有した．

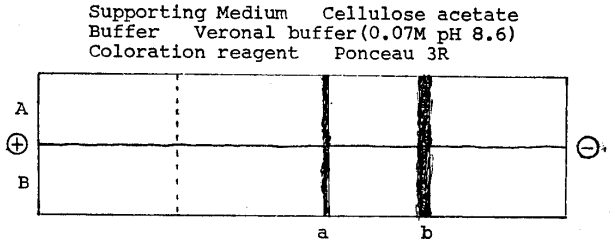

Fig. 7. Electrophoresis Analysis

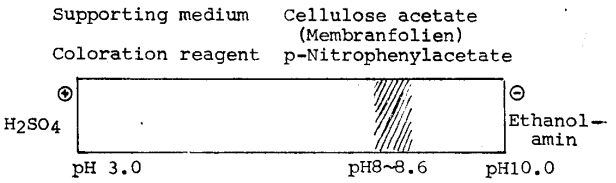

Fig. 8. Electrophoresis Analysis

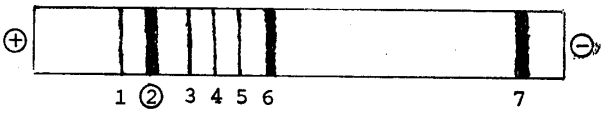

Fig. 9. Disc Electrophoresis

NII-Electronic Library Service

Japanese Society of Pharmaceutical Health Care and Sciences

さらにディスク電気泳動によって蛋白成分の分離を行ったところ，Fig. 9に示されるような7本の分画に分離された．これは試料A，Bともに同様のバンドを示すと共に試料A，Bの混合試料においても全くずれることがなかったことから，試料AとBは同じ蛋白成分からなるものと思われた．また，この蛋白成分は7種以上であり，p-ニトロフェニルアセテートに反応するバンドは(2)であった．従ってリパーゼは(2)のバンドと考えられた．

3) 分子ろ過

それぞれの電気泳動によって試料A，Bの蛋白成分について比較検討を行ったが，いずれの方法においても同一の結果を得たことから，試料A，Bが含有する蛋白成分は全く同一のものと考えられた．しかし，試料AおよびBに対する鉄イオンの影響が同一でないことから，分子ろ過を行って分子状態を検討した．ゲルタイプはSephadex G-100を用い，ベッドは直径2.5cm，高さ45cmのカラムを使用した．展開溶媒はpH 3.2, 6.0の酢酸緩衝液を用い，溶出速度は30～40 ml/hとした．また，鉄イオンとしては硫酸第一鉄を使用した．試料は各200 mgを酢酸緩衝液の4 ml に溶解し，遠沈後，上清液をゲルベッドに添加した．溶出状態は各フラクションごとにリパーゼ活性を測定し検討した．

4) 溶出曲線

Fig. 10 は pH 3.2 の緩衝液を用いた場合の溶出曲線を示しているが，試料Bはリパーゼの溶出ピークが鉄イオンを添加しない溶媒では，試料Aに比べると早くあらわれ，鉄イオンを添加した溶媒によるリパーゼの溶出ピークは，鉄イオンの影響のみられない試料A側に移行し，溶出パターンが近似した．

鉄イオンの影響が認められないpH領域のpH 6.0において，溶出を行ったところ，Fig. 11 のリパーゼ溶出曲線が得られた．この溶出曲線にみられるように，試料Bの pH 6.0 の溶媒によるリパーゼの溶出は，pH 3.2において鉄イオンを添加した溶媒の溶出曲線とほぼ同様の溶出パターンを示した．この分子ろ過の結果から，試料AとBは分子状態が異なることを推定することができた．

考　　察

2種類（A, B）の *Rhizopus* 属のリパーゼについて，pH 3.2, 4.0, 5.0, 6.0におけるリパーゼ活性におよぼす鉄イオンの影響を検討したところ，試料Bの場合，pHの低いpH 3.2においてリパーゼ活性が著しく促進された．すなわち，各pHにおいて平均的なリパーゼ活性を示す試料Aは，鉄イオンの影響がほとんど認められなか

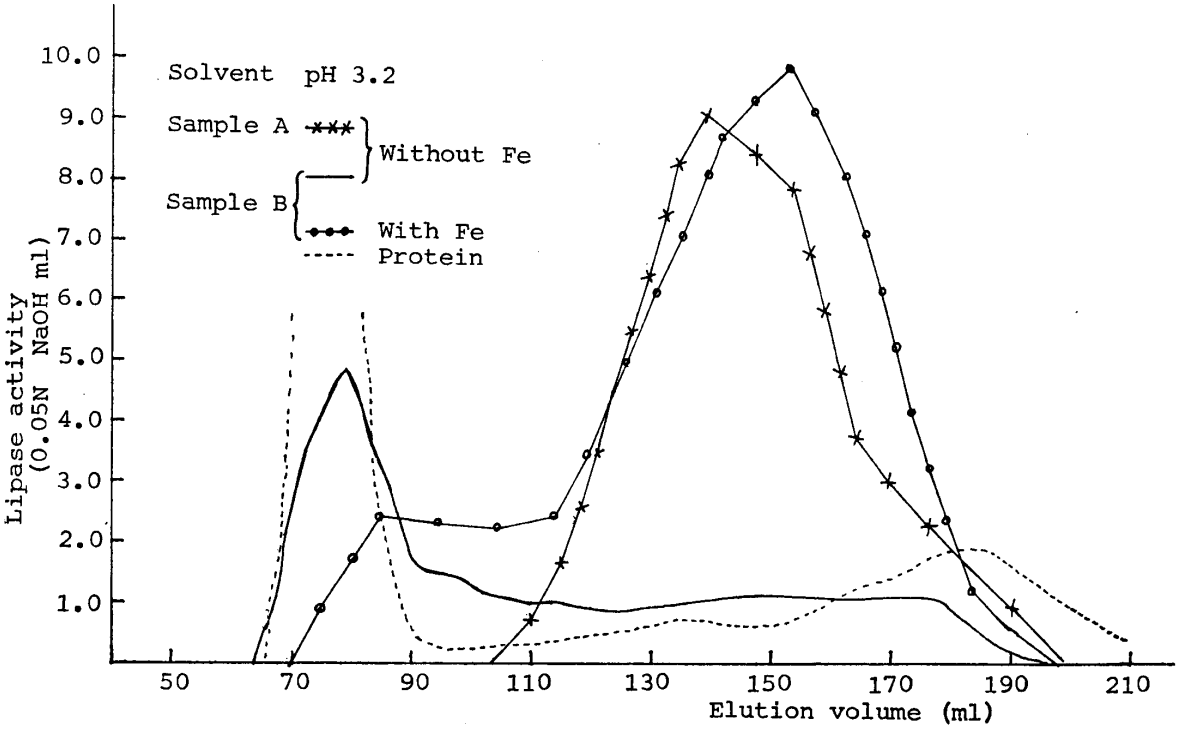

Fig. 10. Elution Curves of Sample A and B

NII-Electronic Library Service

Japanese Society of Pharmaceutical Health Care and Sciences

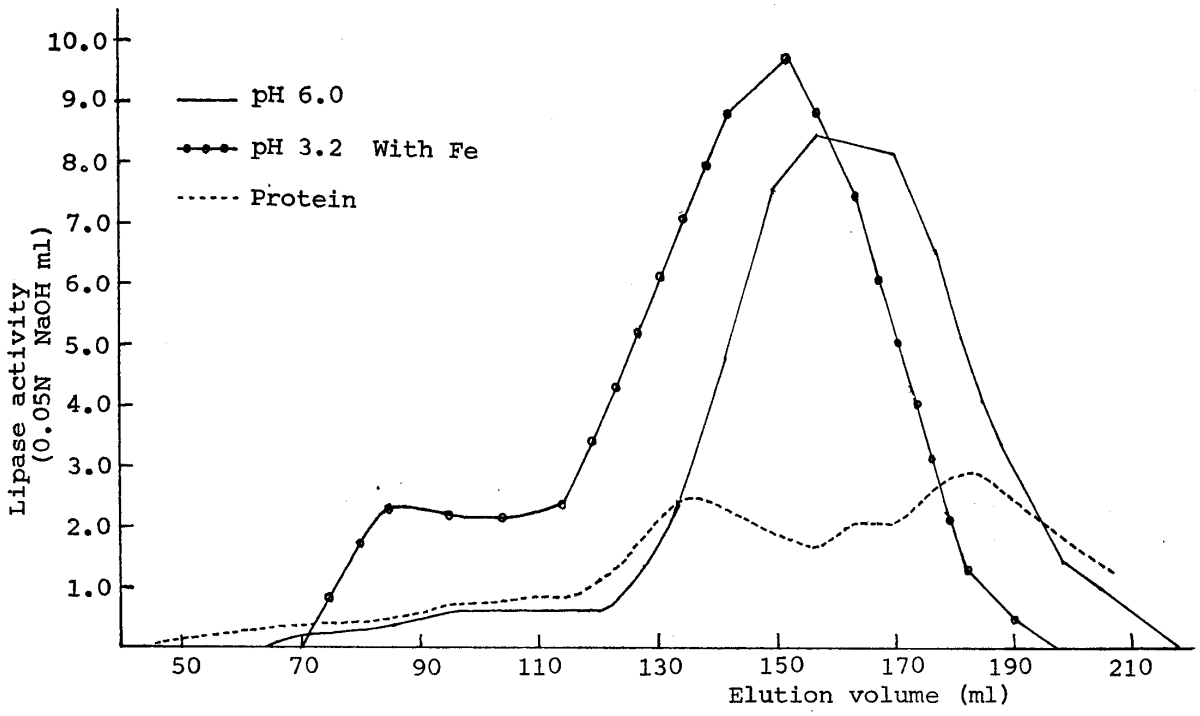

Fig. 11. Elution Curves of Sample B

ったが，pH によってリパーゼ活性に差異のある試料 B は，pH 3.2 において低いリパーゼ活性が鉄イオンにより著しく促進された．このような試料Bの特異性について，電気泳動法や分子ろ過を行って検討したところ，試料AとBは全く同一の蛋白成分からなるが，分子状態が相違していることが確認された．つまり試料Bはリパーゼ活性が低いときは高分子状態にあるが，活性が高いときは低分子状態になるものと思われた．この事実から，試料Bは pH の低い領域では試料Aに比べ高分子状態にあるが，鉄イオンが存在した場合，試料Aと同じ低分子状態に移行するものと推定された．以上の結果から，鉄イオンが試料Bのリパーゼ活性を促進する機構は，鉄イオンが試料Bの分子状態を活性の発現しやすい低分子状態に導くためと考えられた．

謝辞 本研究にご助言くださった東北大薬学部の水柿助教授に深謝します．また実験にご協力いただいた道岡氏と試料を提供していただいた大阪細菌研究所に感謝します．

文　献

1) 金久保好男，鈴木　満，迫　光子，山口裕子：病院薬学，**8**，201(1982).
2) Y. Ikeda, K. Okamura and T. Arima: Biochem. Biophys. Acta, **487**, 189 (1977).
3) 奥田拓道，犬伏フミ子，藤井節郎：生化学，**40**，423 (1968).

NII-Electronic Library Service