



Title	カルシウムおよび胆汁酸によるヒト膵臓リパーゼ活性の活性化
Author(s)	二見, 芳孝
Citation	大阪大学, 1982, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/33592">https://hdl.handle.net/11094/33592</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名・(本籍)	三 見 芳 孝
学位の種類	医 学 博 士
学位記番号	第 5 8 1 3 号
学位授与の日付	昭 和 57 年 10 月 6 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 2 項該当
学位論文題目	カルシウムおよび胆汁酸によるヒト膵臓リパーゼ活性の活性化
論文審査委員	(主査) 教 授 垂井清一郎 (副査) 教 授 垣内 史朗 教 授 中川 八郎

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### 〔目 的〕

膵臓リパーゼの活性化は、従来よりカルシウム、胆汁酸、コリパーゼ（蛋白性コファクター）、NaCl、脂肪酸、磷脂質等種々の因子の影響をうけることが知られている。カルシウムは古くからリパーゼを活性化すると言われているが、最近では脂肪酸による阻害を防ぐとも言われており、カルシウムの役割はなお明らかではない。胆汁酸はリパーゼ活性を阻害するが、コリパーゼが胆汁酸による阻害を防ぎ、その結果コリパーゼは見かけ上のリパーゼ活性を上昇させるとの報告も有る。今回私はリパーゼおよびコリパーゼを、ヒト膵臓およびヒト膵液より分離し、リパーゼ活性を出来るだけ生理的条件のもとで測定し、主としてカルシウムおよび胆汁酸のリパーゼ活性に対する役割について検討した。またコリパーゼとカルモデュリンを対比すると、ともに低分子の糖蛋白であり、耐熱性を有し、作用面でカルシウムと係わり合いを有する事実注目し、コリパーゼとカルシウムの結合の可能性についても検討を加えた。

#### 〔方法ならびに成績〕

1. ヒトリパーゼおよびコリパーゼの精製：P-Sテスト時得られた十二指腸液および法医解剖時得られた膵臓よりそれぞれ Decaro, Erlanson の報告を修正した方法により精製した。リパーゼは精製するに従い不安定になり、今回の実験では部分精製標品を使用した。部分精製されたリパーゼにコリパーゼ活性は認められなかった。精製したコリパーゼは SDS-ポリアクリルアミド電気泳動上単一のバンドを示し、分子量 11,000 の糖蛋白であった。（PAS 染色陽性）。
2. リパーゼ活性の測定：基質としてオリーブオイル懸濁液を用い、ゼラチンを安定剤として使用、

PH 8.6の条件下で30℃ 20分間インキュベートを行ない、生成された脂肪酸を Duncombe の方法で測定し、リパーゼ活性を求めた。

3. リパーゼ活性におよぼすカルシウムおよび胆汁酸の影響：カルシウムの影響を見る前に、各試薬中のカルシウム含量を原子吸光計により測定した。その結果従来より安定剤としてしばしば使用されていた10%アラビアゴムには10~20mMのカルシウムの存在が見出された。種々の安定剤を検討した結果、ゼラチンがカルシウム含量が少なく、かつアラビアゴム使用時と同じリパーゼ活性が得られた。次にリパーゼとして十二指腸液、膵粗抽出液を用い EGTAによる影響を見ると、低濃度のEGTAでリパーゼ活性は阻害された。カルシウム-EGTA バッファーを使用し、カルシウムイオンのリパーゼ活性に対する影響を見ると、コリパーゼ、胆汁酸の両者が存在しなくともリパーゼ活性を上昇させ、最大活性は両者が存在する時に得られた。カルシウムイオンの見かけ上の  $K_a$  値は  $10\mu\text{M}$ であった。カルシウムイオンはコリパーゼ、胆汁酸存在下で反応の  $V_{\text{max}}$  を増加させ基質に対する見かけ上の  $k_m$  値を低下させた。次に胆汁酸のリパーゼ活性に対する影響を見ると、カルシウムイオンおよびコリパーゼが単独で存在する時  $\text{Na}$  デオキシコール酸濃度が  $0.2\text{ mM}$  まではリパーゼ活性の上昇が見られたが、それ以上の濃度ではリパーゼ活性は阻害された。しかしコリパーゼおよびカルシウムイオンが存在すると胆汁酸による阻害は見出されず、むしろリパーゼを活性化した。 $\text{Na}$  タウロコール酸使用時も同様であった。
4. コリパーゼのリパーゼ活性におよぼす影響：コリパーゼは胆汁酸、カルシウムイオン非存在下においてもリパーゼ活性を上昇させた。
5. カルシウムイオンの結合に関して：平衡透析によるカルシウムイオンの結合実験において、精製したコリパーゼおよび部分精製したリパーゼにカルシウムイオンは結合しなかった。

#### 〔総括〕

1. 従来基質安定剤としてよく使用されていたアラビアゴムには大量のカルシウムが含まれており、これがカルシウムのリパーゼ活性における役割を不明瞭にしたものと思われる。
2. コリパーゼ自体がリパーゼ活性を上昇させる。
3. カルシウムイオンはコリパーゼおよび胆汁酸存在下で反応の  $V_{\text{max}}$  を増加させ、基質に対する見かけ上の  $k_m$  値を低下させる。
4. 胆汁酸はカルシウムイオンおよびコリパーゼ存在下でリパーゼ活性を上昇させる。この事は脂肪吸収における胆汁酸の重要な役割を考えると、より生理的であると判断される。
5. カルシウムイオンは精製コリパーゼと結合しなかった。したがってコリパーゼはカルモデュリンとは異なる作用機作で酵素活性を高めていると考えられる。
6. 最大活性はコリパーゼ、カルシウムイオンおよび胆汁酸の三者が存在する時に得られ、リパーゼ活性は各々の濃度により調節されており、三つの因子は互にその作用を増強する。
7. 以上より膵臓リパーゼは一種の不活性型として分泌され、コリパーゼ、カルシウムイオンおよび胆汁酸の作用を受けて十二指腸内で最大の活性を示すものと考えられる。

## 論文の審査結果の要旨

膵臓リパーゼ活性は種々の因子の影響を受ける事が知られている。コリパーゼ，カルシウム，胆汁酸に関しては，以前よりリパーゼ活性を阻害する，あるいは他因子による阻害を抑制すると言われていた。本論文ではヒト十二指腸液およびヒト膵臓よりリパーゼ，コリパーゼを精製し，出来る限り生理的状態でリパーゼ活性を測定し，上記三因子による影響を検討した。その結果，上記三因子はむしろリパーゼ活性を上昇させ，各々の因子が相乗的に作用し，最大活性を得るには三因子の存在が必要である事を明らかにした。