The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	トリグリセライドリパーゼに関する研究
Author(s)	山田, 晴雄
Citation	大阪大学, 1984, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/33950
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【37】

氏名・（本籍）	山田晴雄（やまだ はるお）
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 6417 号
学位授与の日付	昭和59年3月24日
学位授与の要件	医学研究科 生理系専攻 学位規則第5条第1項該当
学位論文題目	トリグリセライドリパーゼに関する研究
論文審査委員	（主査） 教授 藤井 節郎 （副査） 教授 坂本 幸哉 教授 中川 八郎

論文内容の要旨

（目　的）

高脂血症や動脈硬化症など，リポ蛋白代謝の異常がもたらす諸疾患についてはよく知られているが，その発症機序に関しては不明な点が多い。血中のリポ蛋白代謝，特に脂肪分解に係る酵素にはリポプロテインリポーゼ（ＬＰＬ）と肝性リパーゼ（Ｈ－ＴＧＬ）が関与し，ヘパリン静注後の血中にはこれら２種の酵素が速やかに出現し血中リポ蛋白の異化が促進される。しかしながら，これら酵素の生化学的諸性質を初めとして血中リポ蛋白代謝における生理的役割に関しては充分な検討が行われていない。そこで本研究では，ラット副睾丸脂肪組織に存在するＬＰＬの諸性質を明らかにするためその精製を試みるとともに，肝臓に存在するＨ－ＴＧＬの血中リポ蛋白代謝における役割を明らかにするため，Ｈ－ＴＧＬの肝臓における存在様式とヘパリンによる血中への遊離機序について検討を行ったので報告する。

（方法ならびに成績）

1)ラット脂肪組織からのＬＰＬの精製；ＬＰＬ活性は，〔^{14}C〕triolein を基質とし30℃で反応後遊離した〔^{14}C〕oleic acid をBelfrage の方法で測定した。

まず脂肪組織のアセトン粉末よりＬＰＬの可溶化について検討した結果，0.1％Triton Ｘ－100を含む緩衝液で抽出することにより90％以上が可溶化した。この方法により抽出したＬＰＬをheparin－Sepharose，hydroxylapatite，Ultrogel AcA 34 gel filtrationの操作を順次行うことにより精製した。最終標品の比活性は1,500倍，収率は7％であった。ＳＤＳ－ＰＡＧＥで分子量は75,000，ゲルロ過で150,000と二量体を形成しているものと考えられる。酵素活性はserumにより活性化され1ＭＮａＣｌにより阻害された。酵素の安定化には20％ glycerol －1Ｍ ＮａＣｌ－ 0.1％Triton Ｘ－100 を

含む緩衝液が効果的であった。

2)H－TGLの肝臓における存在様式とヘパリンによる遊離機序；ラットを用いて分離肝灌流法により検討した。まず，H－TGLの細胞内局在性を明らかにするため肝臓を種々の酵素で処理した。実験系として，0.02％F．heparinum enzyme，0.1％trypsin，0.01％collagenase をそれぞれ含むKRBで37℃，20分間肝灌流を行い，灌流液中に遊離したH－TGL活性を測定するとともに，更に肝臓をヘパリンで灌流し肝に残存するH－TGL活性を測定した。この結果，glycosaminoglycanを特異的に水解するF・heparinum enzyme で肝臓を処理すると，その灌流液中にH－TGLの遊離が見られ，20分間の灌流で肝全活性の約70％が遊離した。一方，trypsin および collagenase による処理群では灌流液中への酵素遊離はなく，また残存活性も認められなかったことにより，H－TGLはこれらprotease処理により失活したものと考えられる。

次に，上記酵素処理群の肝臓に対しH－TGLの再結合実験を行った。結合に使用したH－TGLはpost－heparin plasma より heparin－Sepharose で精製した画分を用いた。無処理群の肝臓に結合したH－TGL活性を100％とすると，F。heparinum enzyme 及び trypsin 処理群の肝臓では約60％の結合低下が見られたが，collagenase 処理では無処理群と変化がなかった。以上の成績から，H–TGLは肝臓の細胞膜表面上に糖および蛋白を含む物質を介して存在しているものと考えられた。

次に，膜に存在するH－TGL結合成分の分離と定性を試みた。結合成分の分離にはH－TGLをligand にしたH－TGL－Sepharose affinity chromatographyを使用した。まず，ラットに〔^{35}S〕Na_2SO_4（1 mci／body）を腹腔内投与し2時間後に肝臓を摘出した。常法によりplasma membraneを調製後，Oldberg らの方法により4MGdn・HClで膜の可溶化を行った。可溶画分をH－TGL－Sepharose chromatography で分画し吸着部分をヘパリンで溶出した。この溶出画分を4MGdn・HClで平衡化したSepharose CL－4Bでゲルロ過を行うとKav＝0.4であった。SDS－PAGEにより分子量約80,000にmain bandが認められた。また，この画分を papain 処理し，ゲルロ過を行うとKav＝0.64 となり低分子化した事より，蛋白を含む物質であることが明らかとなった。次にこの画分をDEAE－Sephacel chromatographyを行い，吸着画分を0.2－1.5 MNa Clのlinear gradientで溶出した結果，papain 水解後の物質はheparan sulfate に相当する位置に溶出した。

（総　括）

ラット脂肪組織に存在するLPLは，微量でしかも不安定なため充分な精製が行われていなかった。リポ蛋白代謝の実験には精製が容易で多量に得られるミルクLPLが汎用されているが，この酵素は組織に存在するLPLとは免疫学的に異なり，またそのリポ蛋白代謝もその挙動が異なる，との指摘がある。そこで本研究においては，ラット脂肪組織に存在するLPLの性質を明らかにするためその精製を試みた。この結果，0.1％Triton X－100 によってLPLはアセトン粉末から90％以上が可溶化され，最終標品はSDS－PAGEで分子量は75,000であり，ゲルロ過では二量体を形成した。

H－TGLの肝臓における存在様式は，種々の酵素で肝臓を処理した結果から，糖及び蛋白を含む物質，特にheparan sulfateを含むproteoglycan を介して細胞表面上に存在し，ヘパリンによる血中への遊離は，膜結合成分に比べ，より負荷電の強いヘパリンに結合して血中へ出現するものと考えられる。

論文の審査結果の要旨

本研究は，血中のリポ蛋白代謝，特に脂肪分解に関与するＬＰＬおよびＨ－ＴＧＬの生理的役割を明らかにするため，酵素化学的諸性質および細胞内局在性について検討した。その結果，従来より精製が困難とされていたＬＰＬについてその性質を明らかにするとともに，Ｈ－ＴＧＬは肝臓の非実質細胞画分の細胞膜表面上に proteoheparan sulfateを介して存在することを示唆した。以上のように本研究は，高脂肪血症や動脈硬化症など諸疾患の病態を解明する上でも意義があり，医学博士の学位論文として充分価値あるものと認める。