The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	ミセル可溶化系におけるリパーゼ触媒脂質分解反応に関する速度論的研究
Author(s)	中原, 裕
Citation	大阪大学, 1984, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/34897
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

【16】

氏名・（本籍）	中原　裕（なかはら　ひろし）
学位の種類	薬学博士
学位記番号	第　6631　号
学位授与の日付	昭和59年10月18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	**ミセル可溶化系におけるリパーゼ触媒脂質分解反応に関する速度論的研究**
論文審査委員	（主査） 教授　枡井雅一郎 （副査） 教授　池原　森男　教授　北川　勲　教授　冨田　研一

論文内容の要旨

リパーゼ（Glycerol-ester hydrolase, EC 3.1.1.3.）は水に不溶の脂質の加水分解を触媒する酵素であり，その触媒反応は油—水界面で起こる不均一反応である。リパーゼ活性の測定には通常基質はエマルションの形で用いられるが，リパーゼ活性は全基質濃度ではなくエマルション滴の界面積に依存することが知られている。エマルション系は熱力学的に不安定な系で，その分散状態は熱力学的には定まらないため，有効な基質濃度のコントロールや正確な評価を行うことは容易ではない。このことがリパーゼ活性測定法の信頼性を低下させ，またリパーゼ触媒脂質分解反応の解析を立遅らせる原因となっている。最近，基質の単分子膜系や基質をsiliconized-glass beadsに平衡吸着させた系が開発され，脂質分解反応の定量的な解析が可能となってきたが，実験上の制約も多い。

一方，ミセルに可溶化した基質もリパーゼにとって有効であることが見出されている。ミセル可溶化系の分散状態は熱力学的に定まり，また界面活性剤あるいは基質の親水性—疎水性バランスを変えることにより分散状態をコントロールすることも可能である。この様な点において，ミセル可溶化系はリパーゼ活性の測定系として優れていると考えられ，またリパーゼ触媒脂質分解反応に関する定量的な知見を与えてくれる可能性を持っている。しかしながら，ミセル可溶化系におけるリパーゼ触媒脂質分解反応を定量的に解析した報告は見あたらない。

以上の様な観点から，著者はリパーゼの中でも最も広く研究されている膵臓リパーゼを用い，ミセル可溶化系におけるリパーゼ触媒脂質分解反応について速度論的な検討を試みた。

基質として脂肪酸鎖長の異なる数種の脂肪酸ビニルエステル，界面活性剤としてsodium deoxycholate, sodium taurodeoxycholate, octa-oxyethylene dodecyl ether，および平均オキシエチレン鎖長の異な

る3種のpolyoxyethylene nonylphenyl ether について検討した結果，過剰の界面活性剤による阻害が認められたが，測定されたリパーゼ活性の信頼性が高いことが明らかとなった。

また，速度論的な解析より，反応機構を明らかにし，更に反応に及ぼす基質の脂肪酸鎖長およびミセルサイズの影響について考察した。

すなわち，反応は，

Step 1）基質を可溶化したミセル（MS）界面へのリパーゼ（E）の結合——EMS complexの形成：E＋MS⇌EMS

Step 2）ミセル界面におけるactive complexの形成

——ESM complexの形成：EMS⇌ESM

Step 3）基質の分解：ESM→E＋M＋Pを経て進行すること，また界面活性剤による阻害はリパーゼの界面に対する結合部位に対して基質フリーのミセル(M)が基質を可溶化したミセルと拮抗する（Step 4——EM complexの形成：E＋M⇌EM）ためであり，fully competitive inhibition mechanismにより説明できることを明らかにした。

EM complex形成による反応阻害の程度は，EM complexに対するEMS complexの相対的な安定性により定まるが，その相対的な安定性は基質の脂肪酸鎖長とミセルサイズの影響を受けることが明らかとなった。すなわち，サイズの小さなミセルにおいてはEM complexに比較してEMS complexが不安定であり，基質の脂肪酸鎖長が短い程著しいことが認められた。一方，サイズの大きなミセルにおいてはEMS complexとEM complexとの間には安定性の差異はなく，基質の脂肪酸鎖長による差異も認められなかった。これらの結果は，ミセル—基質間，ミセル—酵素間の相互作用の差異に基づくものであることを示した。

ESM complex形成過程もまた，基質の脂肪酸鎖長とミセルサイズの影響を受けることが明らかとなった。すなわち，脂肪酸鎖長の減少はmaximum velocityを増大させることが認められたが，これはEMS complexにおいて基質とミセルとの相互作用が，鎖長の減少により減弱し，ESM complex の形成が促進されたためであると考えられる。一方，ミセルサイズの増大は逆にmaximum velocityを減少させることが認められたが，これはミセル内における基質の相対濃度の低下によりESM complex の形成が抑制されたためと考えられる。

また，各stepの相対的な速度には3種類の可能性が考えられるが，そのうち，Step 1（E＋MS⇌EMS），4（E＋M⇌EM），5（EM＋S⇌EMS），が速い平衡にあり，Step 2（EMS→ESM）が律速段階であるというcaseが最も有力であることを示した。

以上の様な知見から，ミセル可溶化系はリパーゼ活性の測定系として優れていること，また脂質分解反応の定量的な解析に有効な系であることが明らかとなった。

論文の審査結果の要旨

本論文は，速度論的手法をミセル可溶化系に対して行なうことにより，リパーゼ触媒脂質分解反応の解析を詳細に行なって機構を明らかにし，リパーゼ活性測定法の信頼性を高める結果に導いた。従来エマルジョン系で行なわれてその信頼性が乏しいものであったり，実験上の制約の多い各種の方法が考案されているリパーゼ活性測定法に，格段の向上をもたらす基礎をきずいたものである。よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。