

ミクロソームのエステラーゼに及ぼす洗浄剤の効果

小笠原八十吉*・草間 正夫**

(昭和58年8月31日受理)

Effect of Detergents on the Microsomal Esterase from Hog Liver

Yasokichi OGASAWARA and Masao KUSAMA

(Received August 31, 1983)

緒 言

著者らはすでに、磨砕、凍結融解、加温および保蔵などの処理が進むにつれて、ミクロソーム顆粒内のエステラーゼは、その顆粒外に遊離していき、ライソソーム顆粒膜を膨潤崩壊させると共に、いっぽうでは、崩壊ライソソームから遊離したカテプシンによって、エステラーゼ自身も失活していく経過をたどることを明らかにした¹⁾。それゆえに、ミクロソーム顆粒内エステラーゼの遊離化の程度は、ライソソーム顆粒の安定性を大きく左右していくものである。

最近、食品工業の分野に応用した洗浄剤の開発はめざましいものがある^{2)~10)}。著者らもすでに、トライトンなどの洗浄剤は、ライソソーム膜の破壊処理にきわめて効果的であることを明らかにした¹⁾。したがって、洗浄剤を利用したミクロソームにおけるエステラーゼの変化を検討していくことは、生鮮食品内におけるライソソームの挙動を明らかにしていく上にも、大いに役立つものと考えられる。

本報においては、アニオン、カチオンおよびノニオン洗浄剤のうち、特に9種類をとりあげ、去勢豚肝のミクロソームにおけるエステラーゼ活性ならびにその蛋白質に及ぼすそれら洗浄剤の効果を比較検討した。以下その結果について報告する。

実験方法

1 ミクロソーム分画の調製法

前報¹⁾に準拠して調製し、その全操作を0°Cの冷室内

で行なった。去勢豚の肝臓20gに、GGs液(pH7.0の0.1Mグリシルグリシン緩衝液を含む0.25Mショ糖液)の160mlを加え、ホモジナイザーで均一化した後モスリンで濾過し、ホモジネート153mlを得た。それを、750×gで10分間遠心分離した上澄液を、さらに15,000×gで10分間遠心分離した。得られた上澄液を、145,000×gで2時間超遠心分離した沈殿物をGGs液に溶かし、さらに145,000×gで3時間密度勾配超遠心法¹²⁾によって分離し、ミクロソーム分画を得た。

2 洗浄剤の添加法

GGs液を含むミクロソーム分画(20mg蛋白質/ml)の5mlに、所定濃度の洗浄剤を含むGGs液の5mlを加え、1分間攪拌後4分間放置した。これらの全操作は0°Cの冷室内で行なった。

3 遊離型と結合型の決定法

洗浄剤添加処理後、145,000×gで2時間超遠心分離した(0°C下)。その上澄液の測定結果から、遊離型のエステラーゼ活性と蛋白質量を、また、その沈殿物の測定結果から、結合型のエステラーゼ活性と蛋白質量を決定した。

4 エステラーゼ活性の測定法

著者らのすでに報告したp-ニトロフェノール酢酸エステル法¹³⁾に準拠して測定した。

5 蛋白質量の測定法

著者らのすでに報告したCu-Folin呈色法¹⁾に準拠して測定した。

結 果

1 アニオン洗浄剤による

エステラーゼの失活と遊離化

アニオン洗浄剤の例として、まずDOC(Na Deoxy-

* 化学第一研究室

** 栄養学第四研究室

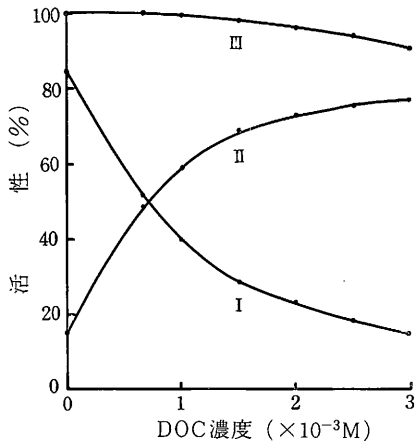


図1 エステラーゼに及ぼす DOC の効果
I : 結合型 II : 遊離型 III : 総活性

cholate) をとりあげ、その結果を図1に示した。ミクロソーム顆粒内外の結合型と遊離型の活性を合せたエステラーゼ総活性(図1のIII)は、添加する DOC 濃度が $5 \times 10^{-4} \text{ M}$ 以上では次第に減少傾向を示し、 $3 \times 10^{-3} \text{ M}$ に及べば、当初の総活性の約90%を残存していた。このときの10%に及ぶ消失は、添加した DOC によるエステラーゼの失活を示すものである。ミクロソームの結合型エステラーゼは、DOC 濃度の増すにつれて減少していき、 $3 \times 10^{-3} \text{ M}$ では、当初の総活性の14%付近のエステラーゼが残存するに過ぎなくなった(図1のI)。いっぽう、ミクロソーム顆粒から遊離したエステラーゼは、DOC 濃度の増すにつれて増大していき、 $3 \times 10^{-3} \text{ M}$ に達すれば、当初の総活性の約77%が遊離型に移行した(図1のII)。

図2または図3は LS (Na Lauryl sulfate) または DBS (Na Dodecyl benzene sulfonate) を添加した場合の結果である。ミクロソームの結合型と遊離型を合せたエステラーゼ総活性は、LS または DBS 濃度の増すにつれて、急速に減少していき、 $3 \times 10^{-3} \text{ M}$ では、当初の総活性の44%または13%付近が残存するに過ぎなくなった(図2と図3のIII)。これから見れば、LS では当初の総活性の56%が失活するにとどまったが、DBS ではその87%に及ぶ極端な失活をあらわした。けれども、いずれの場合にも、 $5 \times 10^{-4} \text{ M}$ 付近までは、かかる失活は全く認められなかった。LS と DBS のいずれの場合にも、 $1.5 \times 10^{-3} \text{ M}$ 付近に及べば、結合型は急速に減少して、10数%が残るに過ぎなくなり、したがって、遊離型は80%にまで達した。さらに $3 \times 10^{-3} \text{ M}$ に及べば、いづ

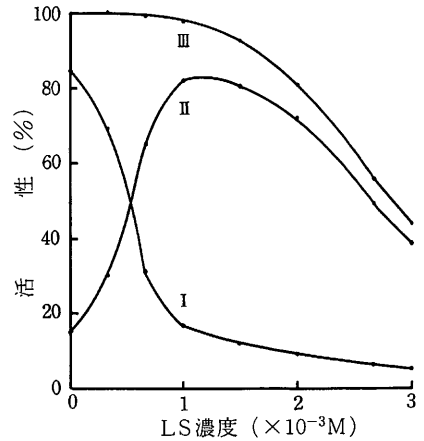


図2 エステラーゼに及ぼす LS の効果
I : 結合型 II : 遊離型 III : 総活性

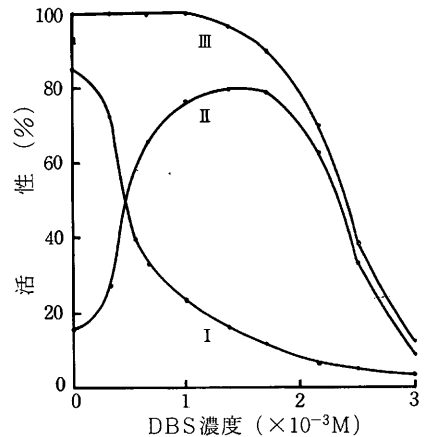


図3 エステラーゼに及ぼす DBS の効果
I : 結合型 II : 遊離型 III : 総活性

れの結合型も、当初の数%のみになり、いっぽう、このときの遊離型は、LS では当初の39%を、また、DBS ではその9%のみを示すにとどまった。このような遊離型の減少は、いうまでもなく失活によるものである。

2 カチオン洗浄剤による

エステラーゼの失活と遊離化

カチオン洗浄剤の例として、まず CDBC (Cetyltrimethyl benzylammonium chloride) をとりあげ、その結果を図4に示した。ミクロソームのエステラーゼ総活性は、CDBC 濃度が増すにつれて減少していき、 $3 \times 10^{-3} \text{ M}$ では、その39%を残すに過ぎなくなった。このときの61%の消失は、CDBC による失活を示すものである。その結

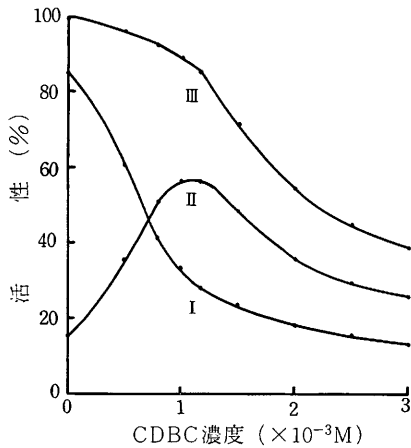


図4 エステラーゼに及ぼす CDBC の効果
I : 結合型 II : 遊離型 III : 総活性

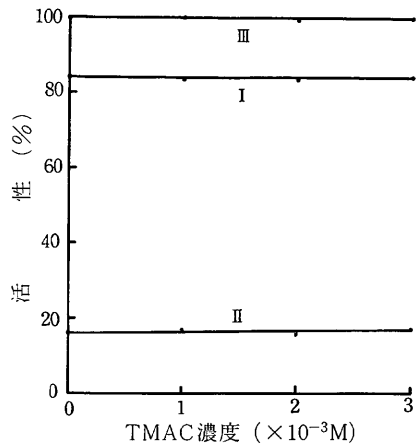


図6 エステラーゼに及ぼす TMAC の効果
I : 結合型 II : 遊離型 III : 総活性

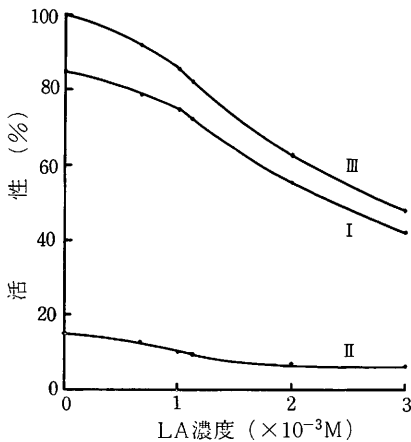


図5 エステラーゼに及ぼす LA の効果
I : 結合型 II : 遊離型 III : 総活性

合型は、CDBC 濃度を増せば急速に減少していき、 $3 \times 10^{-3} \text{ M}$ ではその13%を残すのみになった。いっぽう、遊離型は、 $1 \times 10^{-3} \text{ M}$ 付近までは CDBC 濃度を増すにつれて急速に増大したが、さらに濃度を増せば失活によるエステラーゼの損失が甚だしく、 $3 \times 10^{-3} \text{ M}$ にいたれば、当初の26%を示すにとどまった。Cetavlon (Cetyltrimethylammonium bromide) についても検討したが、図4に示す CDBC の結果とよく一致した傾向を得たので、その図はここには割愛した。

図5または図6は LA (Laurylamine) または TMAC (Tetramethylammonium chloride) を添加した場合の結果である。図6に示す TMAC の場合には、 $3 \times 10^{-3} \text{ M}$

にいたるまで、エステラーゼの失活は認められず、また、結合型や遊離型にも増減は見られず、一定であった。けれども、図5に示す LA の場合には、 $3 \times 10^{-3} \text{ M}$ にいたるまで、濃度が増すにつれて、その総活性も、また、その結合型や遊離型も、共に次第に減少していったが、これらの減少傾向は、いずれも失活によるものと考えられた。

3 ノニオン洗浄剤による

エステラーゼの失活と遊離化

ノニオン洗浄剤の例として Lubrol W (Cetylalcohol-Polyoxyethylene 縮合物) と Tween 80 (Polyoxyethylene-Sorbitan monooleate) をとりあげ、その結果を図7と図8に示した。図7に示すように、 $3 \times 10^{-3} \text{ M}$ にいたるまで Lubrol W によるエステラーゼの失活は認められなかった。結合型は急速に減少していき、 $3 \times 10^{-3} \text{ M}$ に及べば、その約27%を残すに過ぎなくなったが、これは、失活に基因しない減少である。遊離型は次第に増大していき、 $3 \times 10^{-3} \text{ M}$ にいたれば、約72%に達した。

図8に示す Tween 80 の場合には、 $3 \times 10^{-3} \text{ M}$ 付近に及べば、12%付近の弱い失活をあらわした。その結合型は次第に減少し、また、その遊離型は増大していき、 $3 \times 10^{-3} \text{ M}$ にいたれば、前者は53%付近を残し、また、後者は35%付近に達した。

4 洗浄剤による蛋白質の遊離化

ミクロソーム顆粒における蛋白質の遊離化に及ぼす洗浄剤の効果を検討し、その結果を図9に示した。

添加した3種のアニオン洗浄剤は、いずれもミクロソ

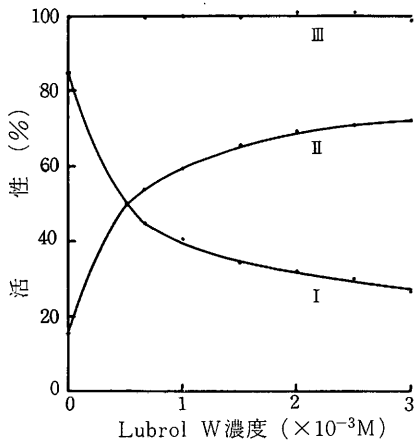


図7 エステラーゼに及ぼす Lubrol W の効果
I : 結合型 II : 遊離型 III : 総活性

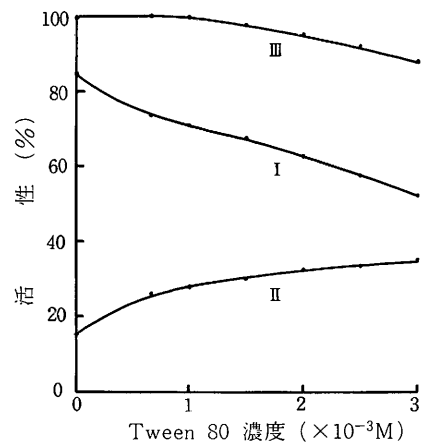


図8 エステラーゼに及ぼす Tween 80 の効果
I : 結合型 II : 遊離型 III : 総活性

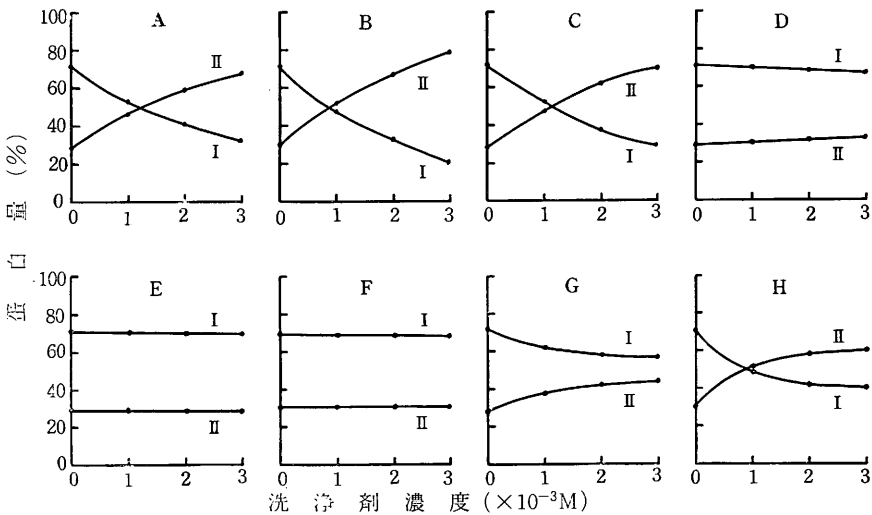


図9 ミクロソーム蛋白質の遊離化に及ぼす洗剤の効果

I : 結合型 II : 遊離型

A : DOC B : LS C : DBS D : Cetavlon E : CDBC F : TMAC G : Tween 80 H : Lubrol W

ームにおける蛋白質の遊離化に役立った。いずれの場合にも、その濃度を増すにつれて、次第に結合型蛋白質量は減少していき、いっぽう、遊離型蛋白質量は増大していった。LS, DBS, または DOC の $3 \times 10^{-3} \text{ M}$ に及べば、その遊離型は、それぞれ当初の総蛋白質量の79, 71, または68%に達した。この場合洗剤を加えなかったものでも、30%の遊離型を含んでいた。この30%をさし引けば、洗剤に基因した遊離値になる(図9のA, B, C)。

カチオン洗剤の場合には、Cetavlonによるわずかな

遊離化は認められた。けれども、CDBC や TMAC の場合には、終始遊離蛋白質量は30%付近を、また、結合型のそれは70%付近を保ちつつ、一定であった。したがって、これらのカチオン洗剤は、蛋白質の遊離化には役立たなかった(図9のD, E, F)。

いっぽう、ノニオン洗剤の場合には、その濃度の増すにつれて、ある程度の遊離化を促進していった。そして、 $3 \times 10^{-3} \text{ M}$ にいたれば、その遊離型は、Lubrol W では当初の総蛋白質量の約60%に達したが、Tween 80 の

それでは42%付近にとどまった。これらから30%をさし引けば、洗浄剤による遊離値になる(図9のG, H)。

考 察

本実験で用いたマイクロソーム分画は、いずれも pH 7.0 の 0.1 M グリッソグリン緩衝液に溶かした 0.25 M ショ糖液であった。このような溶液中では、遠心分離中も、また、活性測定中もマイクロソームはかなり安定であった。それにもかかわらず、洗浄剤無添加区における遊離型エステラーゼ活性は、総活性の15%を、また、遊離型蛋白量は、総蛋白量の約30%をあらわした。

洗浄剤によるエステラーゼの失活率のうち、特に 3×10^{-3} M の場合をあげれば、DBS は87%、Cetavlon と CDBC は61%、LS は56%、LA は52%、Tween 80 は12%、そして、DOC は9%を示し、TMAC と Lubrol W による失活は認められなかった。すでに Carruthers ら¹⁴⁾は、カチオン洗浄剤の TMAC のメチル基を、エチル基、プロピル基、またはブチル基で置換すれば、そのアルキル基の鎖の長いもの程、エステラーゼの失活を高めることを明らかにしている。著者らの本実験から見れば、アニオンやカチオン洗浄剤による失活が強かったが、アニオン系のもでも DOC のように、ノニオン系のもと同様に、弱い失活にとどまるものもあった。Carruthers ら¹⁴⁾は、DOC は、LA または Cetavlon によるエステラーゼの失活を抑制することを指摘している。このことは、LS によるエステラーゼの失活を、ノニオン系 Lubrol W が抑制する¹⁴⁾のと対比して興味あることである。

実際に、エステラーゼが失活すれば、その結合型と遊離型を的確に測定することはできにくい。けれども、洗浄剤のある濃度付近では、最高の遊離型活性をあらわしていく。したがって、失活と遊離の適切なバランスを得たときに、その洗浄剤に基因した遊離型活性の最高値に達する。かかる最高値をあげるならば、LS, DBS, または DOC は、それぞれ83, 80, または77%を示し、アニオン系のもが有効であった。カチオン系とノニオン系のもものでは、Lubrol W, CDBC, Cetavlon, または Tween 80 は、それぞれ72, 57, 57, または36%を示した。洗浄剤を加えないものでも、すでに15%の遊離型活性を示したから、各値から15%をさし引けば、洗浄剤に基因した遊離値になる。TMAC によるエステラーゼの失活や遊離化は認められなかったし、さらに、LA による失活は

見られたが、エステラーゼの遊離化は認められなかった。

マイクロソームにおける蛋白質の遊離化は、ノニオン系によるよりもアニオン系による場合が高かった。いっぽう、カチオン系による蛋白質の遊離化は認められなかった。蛋白質とエステラーゼにおける遊離化の程度を比較すれば、おおむね一致した結果をあらわした。しかし、CDBC や Cetavlon のように、蛋白質の遊離化は認められなかったにもかかわらず、エステラーゼ活性の遊離化は42%も促進されているものもあった。このことは、エステラーゼは他の蛋白質に比較すれば、遊離化し易い状態にあることを示唆するものである。すでに Krisch¹⁵⁾ および Moul'e¹⁶⁾も、エステラーゼはマイクロソーム膜にきわめてゆるく結合していて、容易に遊離化することを指摘している。また、Carruthers ら¹⁴⁾は、グルコースホスファターゼに比較すれば、エステラーゼは著しく遊離化し易いことを明らかにしている。これらはネズミの肝マイクロソームにおける結果であったが、本実験で検討した豚肝におけるそれらの場合にも、ほぼ一致した傾向をあらわしたものと考える。

要 約

(1) 去勢豚肝のマイクロソームにおけるエステラーゼならびに蛋白質に及ぼす9種類の洗浄剤の効果について比較検討した。

(2) アニオンおよびノニオン洗浄剤は、マイクロソームのエステラーゼや蛋白質を遊離化した。いっぽう、カチオン洗浄剤は、それらを全く遊離化しないか、あるいはある程度遊離化した。

(3) アニオン系、3種のカチオン系、および Tween 80 などの洗浄剤は、エステラーゼを失活したが、TMAC や Lubrol W による失活は認められなかった。

(4) 各洗浄剤によるエステラーゼの遊離化から見れば、エステラーゼはマイクロソーム膜にゆるく結合しているものと考えられた。

文 献

- 1) 小笠原八十吉：食工誌，18, 191 (1971)
- 2) D. L. Shungu, J. B. Cornett and G. D. Shockman : *J. Bacteriol.*, 138, 598 (1979)
- 3) T. Inoue : *New Food Ind.*, 22 (2), 12 (1980)
- 4) L. M. Hjelmeland, D. W. Nebert and A. Chrambach : *Anal. Biochem.*, 95, 201 (1979)

- 5) E. Racker, B. Violand, S. O'Neal, M. Alfonzo and J. Telford : *Arch. Biochem. Biophys.*, **198**, 470 (1979)
- 6) Y. Fujita : *New Food Ind.*, **22** (3), 6 (1980)
- 7) C. Starace and H. C. Barfoed : *Kirk-Othmer Encycl. Chem. Technol.*, **9**, 138 (1980)
- 8) A. O. Akinsola and D. A. J. Wase : *Biotechnol. Lett.*, **1**, 457 (1979)
- 9) T. Taniguchi and M. Suzuki : *New Food Ind.*, **22** (2), 8 (1980)
- 10) G. T. Taylor : *FEMS Microbiol. Lett.*, **6**, 103 (1979)
- 11) A. L. Tappel, S. Shibko, 小笠原八十吉 : *化学と生物*, **3**, 401 (1965)
- 12) E. L. Kuff and W. C. Schneider : *J. Biol. Chem.*, **206**, 667 (1954)
- 13) 小原哲二郎・小笠原八十吉 : *農化誌*, **32**, 867 (1958)
- 14) C. Carruthers and A. Baumler : *Arch. Biochem. Biophys.*, **99**, 458 (1962)
- 15) K. Krisch : *Biochem. Z.*, **337**, 531 (1963)
- 16) Y. Moulé, C. Rouiller and J. Chauveau : *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **7**, 547 (1960)

Summary

Effects of nine kinds of detergents on esterase and protein of hog liver microsome were studied. Anionic and nonionic detergents solubilize microsomal esterase and protein, whereas cationic ones partially or do not entirely solubilize them. Anionic detergents, three kinds of cationic ones, and Tween 80 inactivate esterase, but tetramethylammonium chrolide and Lubrol W have no inhivitory effect on them. These results suggest that esterase is loosely bound to microsomal membrane.
