



Hormone Sensitive Lipase(ホルモン感受性リパーゼ)に関する研究

松原, 嘉雄

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1970-02-18

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙0148

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2000148>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・(本籍)	松 原 嘉 雄 (大阪府)
学位の種類	医 学 博 士
学位記番号	医 博 ろ 第 107 号
学位授与の要件	学 位 規 則 第 5 条 第 2 項 該 当
学位授与の日付	昭 和 45 年 2 月 18 日
学位論文題目	「Hormone Sensitive Lipase (ホルモン感受性 リパーゼ) に関する研究」

審 査 委 員	主 査 教 授	辻 昇 三 教 授	平 田 美 穂
	教 授	友 松 達 弥	

論 文 内 容 の 要 旨

生体内の脂肪代謝を研究する場合、脂肪組織より脂肪酸が遊離される機構を知ることは重要である。本論文は脂肪酸遊離の機構とその調節を究明せんとしたものである。

脂肪酸遊離の過程には、Korn により発見された Lipoprotein Lipase (LPL) が重要な役割を持っていると云われ、中田は LPL の営性を詳細に検討した結果、lipolysis の調節はこの LPL の活性化、不活性化によると考えている。なるほど、LPL は FFA を遊離すべき種々の条件下においてその活性増加を示したが、絶食状態下では血中 FFA 値が上昇するにもかかわらず、LPL 活性は低下を示し、この点を説明し得る新たな因子が予想されるに至った。1961年 Rizack 等は白鼠副睪脂中に Epinephrine に感受性を有し、絶食時に活性を増加する lipolytic activity を発見し、Epinephrine Sensitive Lipase と名付けた。著者は、脂肪酸動員機構の解明には、LPLとあわせてこの Epinephrine Sensitive Lipase (本論文では Hormone Sensitive Lipase, HSL と称す) についての検討が必要と考え以下の実験を行った。

I 基 礎 実 験

1) 実 験 動 物

標準飼料にて飼育せる体重150〜200gのウイスター系雄性白鼠を用いた。

2) 実 験 方 法

酵素源液：5%牛血清 Albumin 添加 Krebs—Ringer Phosphate buffer (pH7.4) 中にて preincubation した白鼠臓器を、0.25M Sucrose 溶液中にて homogenize し、その12,000×g 遠沈上清を用いた。

酵素活性の測定：酵素源液、20% Fatgen 牛 Albumin phosphate buffer を含む medium 中の FFA

を Dole の方法により incubation 前後について夫々測定し、1 時間当り $100\mu\text{eq}/\ell$ の FFA の増加を示す酵素活性を 1 単位として、組織単位として、組織単位湿重量当りに換算表示した。なお、LPL 活性の測定は、中田の方法を用いた。

3) 実験結果

反応 medium 中より Fatgen を除去すると全く FFA 形成は認められないので、この酵素源液は Lipase 作用を有するものと考えられ、Hormone Sensitive Lipase と称し assay の条件を種々検討した結果、次の至適条件を設定し得た。

Substrate (20% Fatgen)	0.1ml
Enzyme	0.4ml
Phosphate buffer (pH6.8)	0.2ml
20% bovine albumin solution (pH6.8)	0.5ml
distilled water	1.8ml
Incubation temperature	400°C

II 酵素活性の特異性の検討

1) 各種薬剤の影響

別表に示す如く、HSL は各種薬剤に対する態度において、LPL と明白な相違を示す。また、膵 Lipase とも、至適 pH を異にする点、bile salt により activate されない点等により区別され得る。

2) 絶食による影響

白鼠の水のみ与えて42時間絶食させると、組織 LPL 活性は低下するが、HSL 活性は逆に増加を示す。この変化は副睪脂において著明 (HSL+222%, LPL-52%) に認められるが、心筋においては絶食による変化は少ない。

3) 組織別分布

白鼠副睪脂の他に、心筋、肺、肝にても同様の方法を用いて HSL 活性の測定は可能であり、正常白鼠においては、副睪脂 $3.48 \pm 0.41 \text{ u/g}$ 、心筋 $2.78 \pm 0.29 \text{ u/g}$ 、肺 $7.33 \pm 0.78 \text{ u/g}$ 、肝 $12.08 \pm 1.38 \text{ u/g}$ であった。

4) 細胞内分布

Schneider 氏法により白鼠心筋の mitochondria を分離すると、HSL 活性は mitochondria 層に、LPL 活性は $10,000 \times g$ 遠沈上清にのみ認められた。

III 動物実験: in vitro, in vivo における各種薬剤負荷の影響

物質代謝、殊に脂肪代謝に関係を有する種々のホルモン、薬剤につきその HSL, LPL 活性に対する影響を検討した。

1) 脳下垂体前葉ホルモン

天然単純 ACTH 0.1 iu/ml を in vitro に添加すると副睪脂 HSL は増加し (+31%), $25 \text{ iu}/100 \text{ g}$ 体重の腹腔内注射によっても60分後+160%の増加を示した。肺、肝 HSL 活性も略々同様の変化を示すが、心筋 HSL は in vitro (-48%), in vivo (-19%) と共に低下した。同量の in vivo 負荷にて

LPL 活性は全組織において増加を示した。

牛 Growth Hormone $0.1\text{mg}/\text{ml}$ の *in vitro* 添加では各組織 HSL 活性は有意に増加し、 $0.1\text{mg}/100\text{g}$ 体重腹腔内注射によっても、肺、肝、副睪脂 HSL は 4 時間後 活性増加したが、心筋 HSL 活性は逆に -35% の低下を示した。LPL 活性も略々類似の変化を示した。

強力な脂肪酸動員作用を有する牛下垂体抽出物である H factor を $100\text{r}/\text{ml}$ *in vitro* に添加すると副睪脂 HSL の著明な活性増加を見た。

2) Catecholamine 及び Reserpin

Epinephrine $0.1\text{mg}/\text{ml}$ の *in vitro* 添加により、HSL 活性は著明に増加し、殊に心筋 ($+197\%$)、副睪脂 ($+142\%$) において著るしい。 $0.1\text{mg}/100\text{g}$ 体重の腹腔内注射でも、HSL, LPL 両 Lipase 活性は、各組織において増加を示した。

Norepinephrine を用いた実験でも略々同様の成績を得た。

Reserpin $0.1\text{mg}/\text{ml}$ の *in vitro* 添加は心筋、副睪脂 HSL 活性を夫々 -67% 、 -30% と低下させ、 $0.1\text{mg}/100\text{g}$ 体重腹腔内注射にても、心筋、副睪脂 HSL 及び LPL 活性は共に低下した。

3) 3', 5'-cyclic AMP 及び caffein, Theophyllin

近年、Epinephrine ACTH の phosphorylase 賦活機序に 3', 5'-cyclic AMP の形成が関与している事実が証明されているが、両 Lipase の活性化にも 3', 5'-cyclic AMP が関係しているか否かを検討した。

3', 5'-cyclic AMP の *in vitro* の添加では $1\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で各組織において著明な HSL 活性賦活作用を認めた。また $0.1\mu\text{g}/100\text{g}$ 体重の皮下注射にても両 Lipase 活性は各組織において活性増加した。

一方、cyclic AMP 分解酵素の阻害剤である Caffein Theophyllin も *in vitro*, *in vitro* 負荷に両 Lipase 活性を増加せしめた。

IV 考接及び結語

脂肪代謝、殊に脂肪酸動員の機構に関する研究は未だ解明されない分野が多く、FFA 遊離のメカニズムにも多くの支配因子が予想されている。本論文にて述べた HSL も Korn, 中田等の LPL と共にその一端を担っているものと考えられる。

著者の実験によれば、HSL は至適 pH, 各種阻害剤に対する態度、細胞内分布及び絶食、Heparin 負荷時の変動において LPL とは明らかに区別されるが、Heparin 負荷時の HSL 活性の減少と、LPL 活性の増加が対称的であること、また Protamin NaCl 等の LPL 活性阻害剤が Heparin 等の negative charge 巨大分子に対する阻害作用を共通に持っている等の諸点から、HSL と LPL との間には Heparin 様の酸性ムコ多糖体分子族を介して密接な相互関係があり、生体内、組織内の微妙な生化学的变化に対応して夫々独自の役割を持ちつつ消長しているものと予想される。即ち、両 Lipase は脂肪酸の主たる供給源である脂肪組織と、脂肪酸の主たる消費臓器である心筋と共に多量に存在し、絶食状態においては脂肪組織より FFA を放出すべく他の組織に比べ脂肪組織において HSL 活性が著明に増加し、LPL 活性は低値を示すが、心筋 LPL 活性は低下せず、生体の絶食に対する酵素適応の機構がうか

がえる。飽食時はこの逆の機構が考えられ、脂肪組織 LPL 活性は lipoprotein を取り込むために高値を示す。この様な Lipase 活性の変化は、血糖値の変動が刺激となって起る血中 Catecholamine level 変動をはじめとする間脳下垂体内分泌系及び自律神経系の response によるもので、脂肪酸動員作用を有する各種ホルモン投与による両 Lipase 活性の態度も、おおむねこれに準ずるものと考えられ、脂肪組織と心筋におけるこれらホルモンによる刺激効果の差もこの点より理解し得る。

さらに本研究により明らかになった重要な事実の一つは cyclic AMP と Lipase 活性との間に密接な関係が存在する点である。即ち、HSL 活性は $10,000 \times g$ 遠沈 mitochondria 分画に認められ、ACTH, GH, Catecholamine 等の所謂 adenylyl cyclase 賦活物質や $3', 5'$ -cyclic AMP の添加により著明に活性を増加し、 $3', 5'$ -cyclic AMP 分解阻害剤である Cattein Theophyllin によっても活性増加を示す等の諸事実より $3', 5'$ -cyclic AMP がおそらく phosphorylase に対すると同様形式で Lipase を賦活するものと推論し得る。従って ACTH, GH その他の下垂体性ホルモン及び Catecholamin 等の神経性因子が促進的に Insulin Prostaglandin が adenylyl cyclase に抑制的に作用することにより組織 $3', 5'$ -cyclic AMP level を通じて Lipase 活性に対する精巧な調節機構を形成していると云える。

<別 表>

COMPARISON BETWEEN LPL & HSL

		L P L	H S L
Optimum pH		8.5	6.8
48 hrs fasting		↓	↑
Intracellular distribution		$10,000 \times g$ supernatant	mitochondrial fraction
Effects of Inhibitors	Control	100 (%)	100 (%)
	Sodium heparin	130	65
	1 % Protamin sulfate	15	68
	1 M NaCl	10	68
	1 % $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	37	136
	0.02M NaF	73	0
	0.02M NaAsO_2	10	0
	1 % Toluidine blue	0	91
	0.1% Sodium taurocholate	27	68
	0.02MP—Chlormercuri benzoate	36	205

Sodium heparin ($500 \mu/100 g$ b.w.) was intraperitoneally injected before 30min sacrifice and other inhibitors were added in the incubation medium.

論文審査の結果の要旨

本研究は脂質代謝研究上極めて重要な脂肪酸遊離機構とその調節を究明せんとしたものである。先きに神戸大学医学部第二内科の中田の研究によれば Lipoprotein Lipase (LPL と略す) は遊離脂肪酸 (FFA と略す) の増加すべき種々の条件下で活性増加を示したが、絶食状態では血中 PPA が上昇するにもかかわらず LPL 活性の低下を来す矛盾があった。これに対して1961年 Rizak は Epinephrine に感受性を有し絶食に増加する Lipolytic activity を発見し、これを Epinephrine Sensitive Lipase と名付けた。著者はこの新しい Lipase 活性 (本論文では Hormone Sensitive Lipase, HSL と略す) についての検討を行ったものである。

先づ基礎実験として、酵素源液としては牛血清 Albumin が Krebs Ringer Phosphate bouffes (pH 7.4) 中で preincubation した白鼠副睪丸脂肪組織を0.25M Sucrose 液中で Homogenized したものの 12,000×g 遠沈上清を使用した。酵素活性の測定には酵素源液、20% Fatgen 牛 Albumin が Phosphate bouffes を含む Medium 中の FFA を Doe 法で incubation 前後に夫々測定し、1時間当りの100μg / g の FFA の増加を示す酵素活性を一単位として組織単位湿重量当りに換算表示している。LPL 活性も平行して中田法に従って測定している。

実験結果を要約すると、

先づこの酵素源液に Lipase 作用のあることを確認して、種々の Assay の条件の検討を行い、次のシステムが至適条件があるとした。

Substrate (20% Fatgen)	0.1ml
Enzyme (酵素源液)	0.4ml
Phosphate Buffer (pH. 6.8)	0.2ml
20% bovine albumin 液 (pH. 6.8)	0.5ml
Incubation time 120min Incubation 温度	40.0°C

次でこの HSL の至適 pH が6.8であること、絶食により組織活性が上昇すること以外にこのものは細胞内ミトコンドリア中に存在すること、ヘパリンにより活性抑制がおけると、その他 Ca 塩に対する態度、NaF による失活、Chloroquine benzoate により活性が増加する等の点で LPL と異なること、その他副睪脂肪以外に心筋、肺、肝においても証明されることを証明した。また各種のホルモン、薬剤を動物に負荷した場合の HSL, LPL 活性への影響を比較検索した。HSL は ACTH の in vitro 及び in vivo の影響の下で一般臓器 (副睪脂、肺、肝) では増加するが心筋では低下し、この際 LPL は全臓器で増加する。成長ホルモンの影響下でも HSL は略々同様の態度を示す。また牛下垂体よりの脂酸動員因子の in vitro 添加により副睪脂 HSL は著しく増加する。

またエピネフリンの in vitro の影響下で HSL, LPL は各組織、殊に心筋で増加する。Norepinephrine (ノルエピフリン) でも略々同様の結果をみている。またレセルピンの影響の下で in vivo 共に HSL, LPL 共に活性低下がみられた。また 3', 5' cyclic AMP の in vitro 添加により HSL, LPL 共に活性増加を示し、またこれに準ずる成績として Caffeine, Theophyllin によって活性の増加を示した。

以上の観察を行った結果から HSL は明かに LPL とは区別されが、Heparin 負荷時の HSL 活性減少と LPL 活性の増加が極めて対照的であること、また Protawiol NaCl 等の LPL 活性阻害剤が Heparin 等の negative charge 巨大分子に対する阻害作用を共通にもっている等の点から HSL と LPL との間に Heparin 様の酸性ムコ多糖類分子族を介し、密接な相互関係があり、脂酸の動員と脂酸のエネルギー源としての利用とに好都合な代謝環境を作る様に調制されていることが明かになった。この調制の機構としては血糖値の変動と介して始動されるカテュールアミンの変動を納めんとする間脳下垂体内分泌腺及び自律神経の response 等が働いている考えられる。さらにこの研究を通じて Lipase 活性と 3', 5' AMP との相関、殊に Adenyl cyclase 賦活作用を有する ACTH, GH, カテュール体と、さらに 3', 5' AMP 分解阻害剤である Theophyllin, Caffein 等が矢張り Lipase 活性を賦活することから、恐らく Phosphorylase 活性と賦活すると同じ機構が 3', 5' AMP を通じて Lipase 活性を賦活していると推定された。

以上の観察結果から Lipase 活性の代謝における基本的意義を明かにしたことは糖脂質代謝の研究に大きな進歩をもたらしたもので、医学研究上極めて有益であり、医学博士の学位を授与するに値するものと判定した。