

原 著

脂肪酸結合タン白の脂肪酸代謝に対する影響

宮 沢 昌 子 橋 本 隆

信州大学医学部生化学教室

EFFECTS OF FATTY ACID BINDING PROTEINS
ON FATTY ACID METABOLISM

Shoko MIYAZAWA and Takashi HASHIMOTO

Department of Biochemistry, Faculty of Medicine,
Shinshu University

MIYAZAWA, S. and HASHIMOTO, T. *Effects of fatty acid binding proteins on fatty acid metabolism.* Shinshu Med. J., 27 : 288-298, 1979

The 12,000 molecular weight proteins were isolated from rat liver cytosol by gel filtration and isoelectric focusing. Five protein preparations with different isoelectric points were obtained : fraction I, pI 5.0 ; fraction II, pI 5.3 and 5.9 ; fraction III, pI 7.6 and fraction IV, pI 9.0. The fraction IV contained the 10,000 molecular weight protein with the 12,000 one. The effects of these proteins on fatty acid metabolism were studied. Fraction I exhibited low affinity for long chain fatty acid but fractions II, III and IV exhibited high affinity. β -Oxidation of mitochondria was inhibited by fractions II and IV, but not by fraction III. The peroxisomal β -oxidation was strongly inhibited by all fractions except fraction I. The palmitoyl-CoA synthetase activities in microsomes, mitochondria and peroxisomes were inhibited by fraction II. The glycerolphosphate acyltransferase activities in microsomes and mitochondria were enhanced by fractions II and III but inhibited by fraction IV. It has been shown that rat liver cytosol contains several fatty acid binding proteins with the molecular weight of 12,000 and these proteins exhibit different effects on some reactions of fatty acid metabolism. It remains, however, unsolved whether the effects of fraction IV are due to the 12,000 or 10,000 molecular weight proteins.

(Received for publication ; March 19, 1979)

Key words : 脂肪酸結合タン白 (fatty acid binding protein)

β -酸化 (β -oxidation)

パルミトイル CoA 合成酵素 (palmitoyl-CoA synthetase)

グリセロールリン酸アシルトランスフェラーゼ (glycerolphosphate acyltransferase)

I 緒 言

最近, 種々の細胞に脂肪酸結合タン白が存在し, このタン白が脂肪酸代謝に何らかの影響を有すると考えられる知見が報告された。Arias らのグループは肝細

胞可溶画分に Y, Z と命名された 2 種の有機アニオン結合タン白が存在することを見出した¹⁾。Y タン白は血漿ビリルビンや肝機能検査に使用されるプロモスルフォタレイン (BSP) 等の肝細胞内への輸送に関与する。一方 Z タン白の分子量は 12,000 で脂肪酸²⁾, 特

に脂肪酸アシル-CoA³⁾を強く結合し、ミクロゾームのグリセロールリン酸アシルトランスフェラーゼを活性化する^{4) 5)}。Ockner らは小腸粘膜、肝その他の組織に脂肪酸を特異的に結合する分子量12,000のタン白を見出し、小腸での脂肪酸の吸収に本タン白が重要な役割を果すことを示唆し、このタン白を fatty acid binding protein と名付けた⁶⁾⁻⁸⁾。この脂肪酸結合タン白量は動物のホルモン条件を変えても著しい変化はない^{9) 10)}が抗脂血薬剤である clofibrate を投与すると約2倍増量する¹¹⁾⁻¹⁵⁾。

脂肪酸代謝に対する脂肪酸結合タン白の作用についての解析には主として細胞レベルの実験系が使用され、かつその生理的役割は脂肪酸の結合に拮抗する flavaspidic acid を添加することによっておきた代謝変化より推定されてきたため、決定的な知見が得られていない。

本研究では、脂肪酸結合タン白の生理的役割に関する基礎的知見を得るため、無細胞系での脂肪酸の活性化、β-酸化およびグリセリド合成等の反応に本タン白がどのような作用を有するかについて検討した。

II 実験方法

A. 分子量 12,000 タン白の調製

ウィスター系雄性ラット(体重 200-250g)を用いた。脂肪酸結合タン白を誘導するため、ラットを di-(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) 含有飼料(2%, w/w)で2~4週間飼育した。40gのラット肝臓に200mlの0.25M蔗糖-1mM EDTA溶液を加えホモジェナイズし、106,000×g, 60分間遠心し、可溶画分を得た。この画分を透析チューブに入れ、25% (w/v) ポリエチレングリコール (# 6000) 水溶液に対し透析することによって10~20ml程度にまで濃縮し、生じた沈澱を遠心によって除去した。この標品にBSP(終濃度 10mM)を加えセファデックス G-75 カラム(容量 800ml)でゲルろ過し、粗分子量12,000分画を得た。この画分を25% (w/v) ポリエチレングリコール溶液に対し透析し濃縮した後、セファデックス G-50 カラム(容量 180ml)でゲルろ過した。セファデックス G-50 カラムによるゲルろ過を繰り返しおこなって分子量12,000分画を精製した。ゲルろ過の溶出には10mMリン酸カリウム緩衝液, pH 7.5を使用した。分子量12,000タン白の検出はBSP測定¹⁾とタン白測定(脂肪酸結合タン白はトリプトファンを含有しないためLowry法¹⁶⁾による測定値とA₂₈₀nmとの

比が他のタン白に比べ大となる)によっておこなった。

B. 細胞分画

ラット肝臓を用いた。ミトコンドリアとミクロゾームは de Duve らの方法によって分画した¹⁷⁾。またペルオキシゾームは DEHP 投与ラット肝臓の軽ミトコンドリア画分を蔗糖密度勾配遠心法による分画によって得た¹⁸⁾。ペルオキシゾーム, ミトコンドリアおよびミクロゾームは0.25M蔗糖-1mM EDTAで遠心により洗滌し、同液に懸濁した。β-酸化についての実験には新鮮顆粒標品を用いた。他の酵素活性測定には凍結保存(-20°C)顆粒を用いた。

C. 測定法

β-酸化能は[U-¹⁴C] パルミチン酸を基質とし、酸可溶画分への放射能の移行速度を測定することによって求めた¹⁹⁾。蔗糖密度勾配遠心法によってもミトコンドリアとペルオキシゾームを完全に相互分離することはできないのでミトコンドリアβ-酸化系はKCNによって阻害されるがペルオキシゾームβ-酸化系は阻害されないことを利用し、KCNによって阻害されるものをミトコンドリアβ-酸化能とし、KCNによって阻害されないものをペルオキシゾームβ-酸化能とした。

パルミトイル-CoA 合成酵素活性は[U-¹⁴C] パルミチン酸から[U-¹⁴C] パルミトイル-CoAの生成速度を測定する Bar-Tana らの方法によった²⁰⁾。

グリセロールリン酸アシルトランスフェラーゼ活性は山下の方法によって測定した²¹⁾。放射能の測定はトルエン-トリトン X-100 系のシンチレーターを用い液体シンチレーションスペクトロメーターで測った。グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ(G6PDH)活性の測定は Kawaguchi と Bloch の方法によった²²⁾。タン白量は牛血清アルブミン(BSA)を基準として Lowry 法¹⁶⁾によって測定した。等電点電気泳動による分画のタン白定量は Lowry 法で発色する ampholyte を除去するため、各分画のタン白を HClO₄ (0.3M) で沈澱させこの沈澱を酸で洗滌した後 0.1M NaOH にとかし Lowry 法で測った。

細胞顆粒分画時、各分画の相互分離の程度をグルタミン酸デヒドロゲナーゼ、尿酸酸化酵素、および NADPH 依存チトクロム C 還元酵素活性を測定することによって確認した¹⁹⁾。SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動は Weber と Osborn の方法²³⁾によった。

D. 試 薬

[U-¹⁴C] パルミチン酸 (928mCi/m mole), [1(3-¹⁴C)] グリセリン (30mCi/m mole) は The Radiochemical Centre 社より, BSA は Sigma 社より, CoA, ATP, ADP, NAD, NADP, G 6 PDH は Boehringer 社より, アンフォライン (pH 3.5-10) は LKB Produkter 社より購入した。BSP は第一製薬株式会社より, clofibrate, ethyl-(trimethylchroman-5) isobutyrate (EOB) はエーザイ株式会社より供与をうけた。パルミトイル CoA, [1-¹⁴C] グリセ

ロール-3-リン酸は合成した²¹⁾。[U-¹⁴C] パルミトイル-CoA は [U-¹⁴C] パルミチン酸を用い上記方法²¹⁾に準じて調製した。

Ⅲ 結 果

A. 分子量 12,000 タン白の分画

分子量12,000タン白を等電点電気泳動によって分画した。図1に示すように pI 5.0 (分画Ⅰ), pI 5.3 と pI 5.9 (分画Ⅱ), pI 7.6 (分画Ⅲ), pI 9.0 (分画Ⅳ) の4分画のタン白を得た。各分画をポリエチレングリ

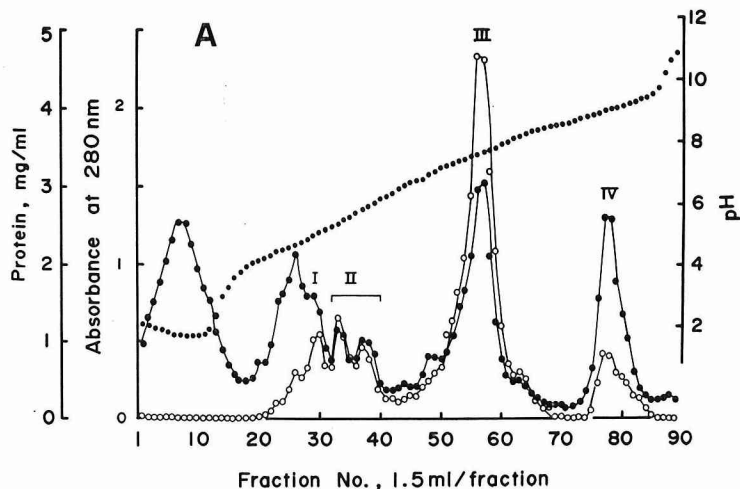
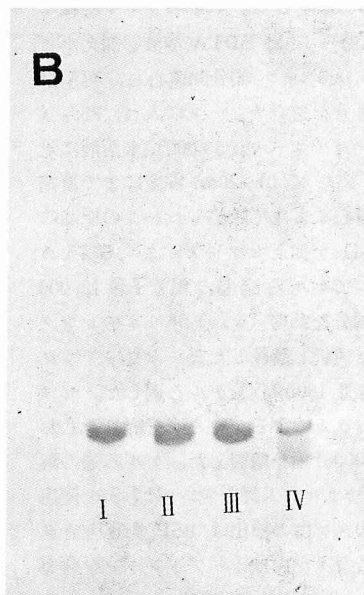


Fig. 1. Isoelectric focusing (A) and SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (B) of the 12,000 mol. wt. fraction in cytosol proteins from rat liver. The protein fractions were subjected to isoelectric focusing in the LKB apparatus. A linear 0-50% (w/v) sucrose density gradient composed of twenty-one 5 ml steps was set up. This gradient contained a 1% solution of carrier ampholytes, pH 3.5-10.0 (Ampholine, LKB Produkter AB, Sweden). The potential difference of the column was 500V and stabilized for 48hr at 4°C. —, pH; ●—●, A₂₈₀ nm; ○—○, Protein contents assayed by the method of Lowry *et al.*



コール溶液に対し透析し濃縮し、10mM リン酸カリウム緩衝液、pH 7.5 に対し透析した。分画 I, II および III は SDS ディスク電気泳動で単一標品であり、分子量 12,000 と推定された。分画 IV は分子量 12,000 のタン白の他に分子量約 10,000 のタン白の混在をみとめた。最終標品の分画 I, II, III の Lowry 法による測定値 (mg/ml)/ A_{280nm} 比は 2.5~3 であった。分画 IV のその比は約 1 であった。このことは各タン白のトリプトファン含有量を反映し、前三者のタン白にはトリプトファンが存在しないことを示唆する。

各タン白の有機アニオンとの結合能を測定した。BSP または [U- ^{14}C] パルミチン酸と 25°C, 10分ブレインキューベートした後セファデックス G-25 カラムでゲルろ過をしたところ分画 I の結合能は低く、分画 II, III および IV は高い結合能を示した。しかし、BSP や [U- ^{14}C] パルミチン酸はセファデックス G-25 への吸着が強いためゲルろ過法では、定量的扱いができなかった。平衡透析法では [U- ^{14}C] パルミチン酸

や [U- ^{14}C] パルミトイル-CoA が装置内壁や透析膜に吸着するため結合定数を測定することができなかった。

長鎖脂肪酸アシル-CoA はグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼを阻害する²²⁾。そこで分子量 12,000 のタン白添加によって本酵素のパルミトイル-CoA 阻害が減少することを利用して 12,000 タン白とパルミトイル-CoA の結合定数を推定した。

図 2 に示すように分画 I の脱阻害の能力は弱く、分画 II, III, IV は強い脱阻害作用を示した。分子量 12,000 のタン白とパルミトイル-CoA が 1:1 の結合をすることによってパルミトイル-CoA の阻害作用がなくなると仮定すると分画 II, III および BSA とパルミトイル-CoA との解離定数は約 $10^{-6}M$ と推定された。なお分画 IV は他のタン白とは異なり、シグモイド状の活性化を示した。

B. 抗脂血薬剤投与による肝臓脂肪酸結合タン白の増量

Clofibrate 等抗脂血薬剤は肝臓脂肪酸結合タン白を増量させることが知られている¹¹⁾⁻¹⁵⁾。我々は clofibrate の chlorophenyl 基を chroman 基にした ethyl-(trimethylchroman-5)isobutyrate (EOB) およびプラスチック可塑剤として大量に使用されている di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) も clofibrate と同様抗脂血作用があることを認めている¹⁵⁾。図 3 に示すように EOB と DEHP の投与によって分子量 12,000 画分のパルミチン酸結合能は clofibrate 投与とほぼ同等対照群の約 2 倍に増加した。BSP 結合能も抗脂血薬剤投与によってそれぞれ約 2 倍の増加があった (未発表)。肝臓可溶画分の分子量 12,000 のタン白は図 1 に示しているように単一のものではない。したがって、薬剤投与によって分子量 12,000 のタン白が増量してもどの pI 値のタン白が増量したのか不明である。また脂肪酸結合タン白は可溶画分のみ存在するものではなく顆粒画分にも存在する可能性が示されている⁷⁾。それ故薬剤投与による肝細胞可溶画分の脂肪酸結合能の増大は本タン白の細胞内分布の変化による可能性もある。

C. β -酸化能に対する脂肪酸結合タン白の影響

今まで脂肪酸の β -酸化はミトコンドリアでおこなわれると考えられてきた。しかし最近ペルオキシゾームに β -酸化能が存在し、この系が抗脂血薬剤で誘導されることが明らかとなった¹⁸⁾¹⁹⁾²⁴⁾²⁵⁾。

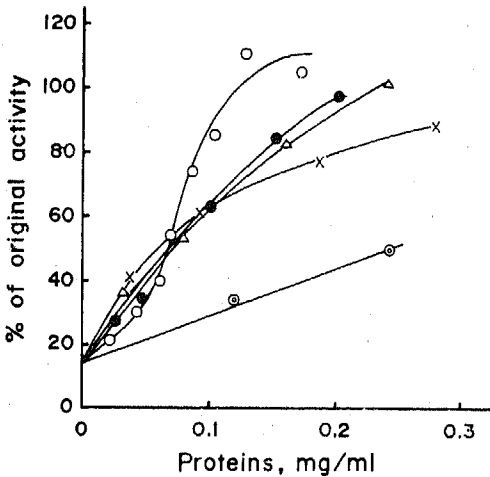


Fig. 2. Protection against palmitoyl-CoA inhibition of glucose 6-phosphate dehydrogenase by fatty acid binding proteins. The enzyme activity was inhibited to 15% by addition of 8 μM palmitoyl-CoA. The assay mixture contained 8 μM palmitoyl-CoA and various amounts of proteins. The reaction was started by addition of the enzyme.

○—○, fraction I; ×—×, fraction II; △—△, fraction III; ○—○, fraction IV; ●—●, BSA.

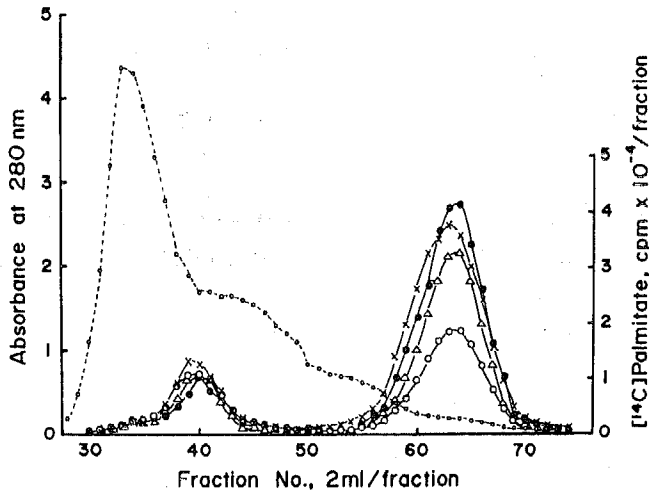


Fig. 3. Increase in fatty acid binding capacity of the 12,000 mol. wt. fraction of cytosol proteins from livers of rat received hypolipidemic agents. Rats were fed with a control diet (Oriental M, powder), or clofibrate (0.3%, w/w), EOB (0.3%, w/w) or DEHP (2%, w/w) containing diets *ad libitum* for 2 weeks. Livers were homogenized with 4 volumes of 0.25M sucrose-1 mM EDTA. The 106,000 × g supernatant fraction corresponding to 1 g of wet weight of liver was preincubated with [U-¹⁴C] palmitate (1 μCi) at room temperature. Ten min later, the mixture was subjected to Sephadex G-75 column (180 ml) and eluted with 10 mM potassium phosphate buffer pH 7.5. Protein concentrations were shown as absorbance at 280 nm (○---○).

Radioactivity : ○—○, control; ●—●, clofibrate; ×—×, EOB; △—△, DEHP.

図4に示されるように、ミトコンドリアβ酸化系に対しBSAは低濃度では阻害がなく高濃度でやや活性低下作用を示した。脂肪酸結合タン白は各分画によりその作用に差異があった。即ち分画Ⅱは強い阻害を示し、分画ⅢはBSAと同程度の弱い阻害作用を示した。また分画Ⅳはシグモイド状の阻害を示した。

ペルオキシゾームβ酸化系は低濃度BSAによって阻害をうける¹⁰⁾。この系に対しては各脂肪酸結合タン白すべて阻害的に作用した。

D. 脂肪酸アシル-CoA合成酵素に対する効果

脂肪酸代謝の出発となる脂肪酸アシル-CoA合成酵素に対する各分画の効果を調べた。脂肪酸アシル-CoA合成酵素は、ミクロソーム、ミトコンドリアおよびペルオキシゾームに存在する。3顆粒での脂肪酸炭素鎖長を変えた場合にはそれぞれ異なった基質特異性を有することから複数種の酵素の存在が示唆されている。

本実験ではパルミチン酸を基質として用いた。

図5に示すように分子量12,000のタン白は各顆粒パルミチル-CoA合成酵素に対しほぼ同様な阻害作用を示した。各タン白のうち分画Ⅱは分画ⅢとⅣに比べより強い阻害を示した。

E. グリセロールリン酸アシルトランスフェラーゼに対する効果

グリセロール-3-リン酸に脂肪酸-CoAの脂肪酸を転移するアシルトランスフェラーゼはミクロソームとミトコンドリアに存在する。

図6に示すように、ミクロソームの酵素活性は低濃度BSAにより活性化され高濃度では逆に阻害作用が著明となった。しかし分画Ⅱ、Ⅲは高濃度でも活性化を示し分画Ⅳでは逆に低濃度でも阻害が著明であった。一方ミトコンドリア系ではミクロソーム系に比べ分画Ⅱ、Ⅲによる促進効果がやや大きく分画Ⅳの阻害が小さかったが各タン白の作用はミクロソーム系に対するものと同様であった。

一般に長鎖脂肪酸アシル-CoAを基質とする反応系

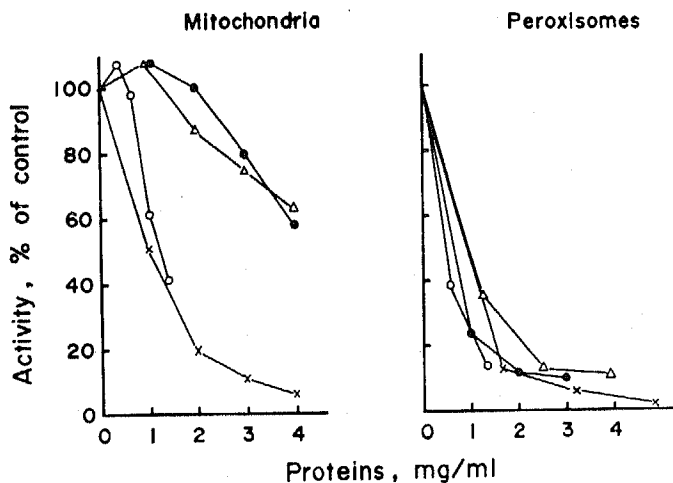


Fig. 4. Effects of fatty acid binding proteins on β -oxidation. Measurement of rate of β -oxidation was carried out using $[U-^{14}C]$ palmitate ($50 \mu M$) as a substrate. Activities without the additions of proteins (100%) were 1.0 nmole/min per mg of mitochondrial protein and 8.0 nmoles/min per mg of peroxisomal protein, respectively.
 x—x, fraction II; \triangle — \triangle , fraction III; \circ — \circ , fraction IV; \bullet — \bullet , BSA.

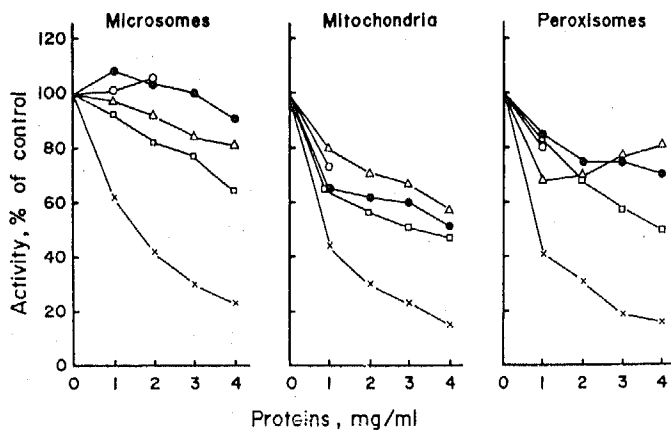


Fig. 5. Effects of fatty acid binding proteins on palmitoyl-CoA synthetase. The concentration of $[U-^{14}C]$ palmitate was $200 \mu M$. The activities without additions of proteins (100%) were 80, 40 and 67 mU/mg of microsomal, mitochondrial and peroxisomal protein, respectively.
 x—x, fraction II; \triangle — \triangle , fraction III; \circ — \circ , fraction IV;
 \square — \square , cytosolic proteins; \bullet — \bullet , BSA

では、その活性は基質依存性を示すと同時に過剰の基質による阻害が著明である。図6に示された BSA や分子量12,000のタン白の活性化作用が脱阻害に由来するものかどうか明らかにするため、基質濃度を変え各

タン白の効果調べた。図7に示すように低濃度パルミトイル-CoA 領域で BSA と分画IVは阻害を示したが分画IIとIIIは軽度ではあるが活性化を示した。したがって BSA と分画IVはパルミトイル-CoA と結合し、

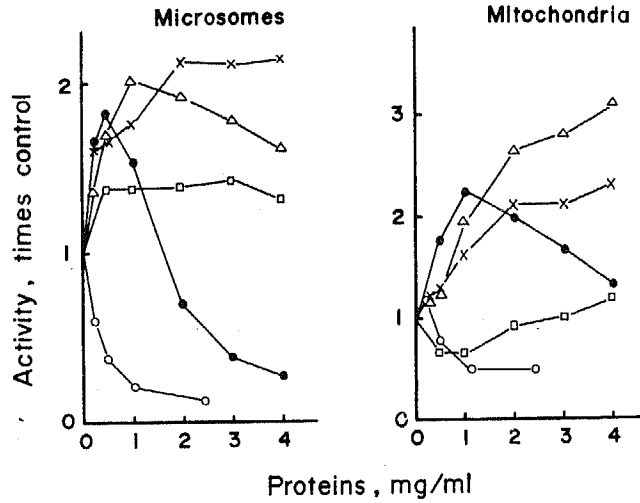


Fig. 6. Effects of fatty acid binding proteins on glycerol phosphate acyltransferase. The concentration of palmitoyl-CoA was 30 μ M. The activities without additions of proteins in microsomes and mitochondria were 0.69 and 0.14 mU/mg protein, respectively.

×—×, fraction II; Δ — Δ , fraction III; \circ — \circ , fraction IV;
 □—□, cytosolic proteins; ●—●, BSA.

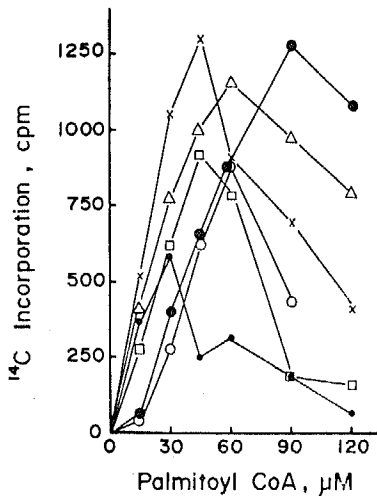


Fig. 7. Effects of fatty acid binding proteins on glycerol phosphate acyltransferase activity in microsomes at various concentrations of palmitoyl-CoA.

—, no addition; ×—×, fraction II (2 mg/ml); Δ — Δ , fraction III (2 mg/ml); \circ — \circ , fraction IV (0.6 mg/ml); □—□, cytosolic proteins (2mg/ml); ●—●, BSA. (2mg/ml)

反応系からの基質除去の可能性があることを示唆する。それに対し分画Ⅱ, Ⅲはタン白非添加の最大値に比べタン白添加群は約2倍の活性を示した。このことは至適条件下では各タン白は何らかの機構で活性化作用を示すものと思われる。なお高基質濃度での各タン白の見掛け上の活性化作用は過剰基質結合による脱阻害と考えられる。

IV 考 察

肝臓可溶画分より分子量12,000のタン白画分を得て、これを密度勾配等電点電気泳動をおこない、pI 5.0, 5.3, 5.9, 7.6および9.0のタン白に分けた。Ockner と Manning⁷⁾は小腸粘膜の分子量12,000のタン白を等電点電気泳動にかけると pI 5.55 と pI 5.68 の2つのピークに分離されることを報告している。また Ketterer ら²⁰⁾はラット肝臓可溶画分より分離精製されたタン白は密度勾配等電点電気泳動で pI 5.0, pI 5.9, pI 7.6 に分離しこの3者のゲル等電点分離法では pI 7.6 のタン白は単一タン白帯を与えること、pI 5.0 と pI 5.9 のタン白はそれぞれ3つのタン白帯に分離することを示した。しかし密度勾配等電点電気泳動で分離された3つのタン白を再度電気泳動するとそれぞれのタン白とも3つのピークに分離すること、各

ピークのアミノ酸分析結果が同一であることなどから同一タン白であると推定されている。しかし、同一タン白であっても pI 値の異なる分画はそれぞれ異なった脂肪酸結合能を示す²⁶⁾。今回我々が分離した pI 5.0, 5.3, 5.9, 7.6 および 9.0 のタン白のあるものは同一のものである可能性がある。我々の今回分離した分画 I, II および III は他の報告者と同様の pI 値を示し分画 I は脂肪酸との結合能が低い II, III は高いこととも合致している。しかし分画 IV に関しては未だ報告がないので新しいタン白であるのか、我々の分離条件で生じた新しい存在様式のものであるかは不明である。しかし分画 II に対する抗体は分画 I, II 及び III とは交叉したが分画 IV とは交叉しなかったこと (図 8)、タン白の紫外部吸収 ($A_{280 \text{ nm}}$) の差などから分画 IV は分画 II や III とは異なったタン白と推定される。分画 IV による効果が分子量 12,000 あるいは 10,000 のいずれのタン白によるものかは今のところ不明ではある。

脂肪酸結合タン白の脂肪酸代謝への作用に関しては主として肝臓還流、分離肝細胞などの系に flavaspidic acid を加え脂肪酸結合タン白を飽和する方法が利用されてきた。flavaspidic acid 添加については脂肪酸の肝細胞内へのとりこみが増加するという報告⁵⁾、と減少するという報告²⁷⁾²⁸⁾がある。しかし脂肪酸のグリセリド画分へのとりこみが flavaspidic acid 添加によって阻害されることは多くの研究者の成績が一致している^{5) 27)28)}。また flavaspidic acid は長鎖脂肪酸からのケトン体合成活性には影響せず CO_2 への転換をやや増加させる²⁷⁾²⁸⁾。これらのことは、ミクロソームのグリセロールリン酸アシルトランスフェラーゼ活性が脂肪酸結合タン白添加によって著明な活性化をうけること⁴⁾と一致した現象である。

脂肪酸結合タン白はミトコンドリアとペルオキシゾーム両系の β -酸化を阻害し、ミクロソーム、ミトコンドリアおよびペルオキシゾームのバルミトイル-CoA 合成酵素を阻害した。その阻害の程度は各分画によって異なり、かつ脂肪酸との結合能と阻害の強さとの相関関係は見出せなかった。脂肪酸と顆粒画分の結合能がきわめて大きいこと、タン白結合脂肪酸が酵素反応の基質になるかどうか不明なことなどのため、これらの実験から結論を得ることは不可能であるが、少なくともこれらタン白の主たる作用は脂肪酸を結合し、反応系での脂肪酸量低下効果と思われる。

図 6 に示したように分画 II と III は、グリセロール

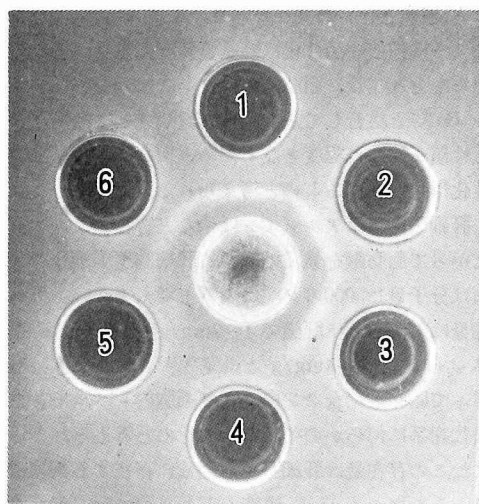


Fig. 8. Ouchterlony double diffusion patterns of the 12,000 mol. wt. proteins. Wells marked 1-6 contained 10 μg of fraction I, 10 μg of fraction II, 10 μg of fraction III, 10 μg of fraction IV, 40 μg of fraction IV, and 5 μg of fraction II, respectively, and the center well contained 9.8 mg of antifraction II globulin. The diffusion was allowed to proceed at room temperature for 12 hr and then at 4°C for one day. Diffusion plate was prepared from 1% agar in 0.15M NaCl containing 5mM sodium phosphate (pH 7.2), 1mM EDTA and 0.02% sodium azide. The anti-fraction II was formed by the injection of 2 mg fraction II in complete Freund's adjuvant into the foot pads of an albino rabbit and a booster injection of 1 mg fraction II intravenously. Partial purification of γ -globulin was accomplished by three repeated precipitations with ammonium sulfate (33% saturation). The γ -globulin fraction was finally dissolved in saline and dialyzed against the same solution.

リン酸アシルトランスフェラーゼを著明に活性化したが分画 IV は逆に強い阻害を示している。しかし、本酵素は基質であるバルミトイル-CoA による基質阻害も強くうける。添加タン白量を一定にしてバルミトイル-CoA 量を変化させたところ図 7 に示すように脂肪酸結合タン白の活性化作用はバルミトイル-

CoA 濃度と密接な関係があり、Mishkin らの報告⁴⁾のように数倍の活性化は高基質濃度で得られることが明らかとなった。脂肪酸結合タン白は過剰パルミトイル-CoA と結合して基質阻害を軽減させる効果と最大活性値が約 2 倍程度となるため、何らかの機構での活性化作用を有するものと考えられる。

肝細胞内にはアルブミンは殆んど存在しない²⁰⁾。したがって脂肪酸を強く結合する肝細胞可溶画分のタン白は分子量 12,000 のタン白のみと考えてよい。その存在量は対照ラット肝臓で 1~2mg/g, clofibrate 投与ラットでは、3~4mg/g と推定¹³⁾¹⁴⁾されている。したがって脂肪酸結合タン白はほぼ細胞内レベルで各脂肪酸代謝系に何らかの効果を示すものと考えられよう。またこの存在量は肝細胞可溶画分に存在する長鎖脂肪酸とそのアシル-CoA 濃度ともモル比で同レベルであることも興味ある問題である。

V. 要 約

1. ラット肝可溶画分より分子量 12,000 のタン白を分離し、更に等電点電気泳動により 4 つの画分——pI 5.0 画分 (分画 I), pI 5.3-5.9 画分 (分画 II), pI 7.6 (分画 III) および pI 9.0 (分画 IV, 分子量約 1 万のタン白も含有)——を得た。
2. それぞれの画分は脂肪酸の代謝に対し異なった効果を示した。
3. ミトコンドリア β -酸化系に対しては分画 II と IV が阻害を示したが分画 III は影響がなかった。ペルオキシゾーム β -酸化系に対してはいずれの分画も著しい阻害を示した。
4. パルミチン酸の活性化については分画 II が著しい阻害を示した。
5. 脂肪酸のエステル化の初発酵素であるグリセロールリン酸アシルトランスフェラーゼに対しては、分画 II および III は促進効果を示し、分画 IV は阻害を示した。
6. 以上の効果が脂肪酸結合タン白の生理的濃度内でおきることなどからこのタン白が *in vivo* で脂肪酸代謝に対し関与していると推測した。

文 献

- 1) Levi, A. J., Gatmaitan, Z. and Arias, I. M.: Two hepatic cytoplasmic protein fractions, Y and Z, and their possible role in the hepatic uptake of bilirubin, sulfobromophthalein, and other anions. *J. clin. Invest.*, 48: 2156-2167, 1969
- 2) Mishkin, S., Stein, L., Gatmaitan, Z. and Arias, I. M.: The binding of fatty acids to cytoplasmic proteins: Binding to Z protein in liver and other tissues of the rat. *Biochem. biophys. Res. Commun.*, 47: 997-1003, 1972
- 3) Mishkin, S. and Turcotte, R.: The binding of long chain fatty acid CoA to Z, a cytoplasmic protein present in liver and other tissues of the rat. *Biochem. biophys. Res. Commun.* 57: 918-926, 1974
- 4) Mishkin, S. and Turcotte, R.: Stimulation of monoacylglycerophosphate formation by Z protein. *Biochem. biophys. Res. Commun.*, 60: 376-381, 1974
- 5) Michkin S., Stein, L., Fleishner, G., Gatmaitan, Z. and Arias, I. M.: Z protein in hepatic uptake and esterification of long-chain fatty acids. *Amer. J. Physiol.*, 228: 1634-1640, 1975
- 6) Ockner, R. K., Manning, J. A., Poppenhausen, R. B. and Ho, W. K. L.: A binding protein for fatty acids in cytosol of intestinal mucosa, liver, myocardium, and other tissues. *Science*, 117: 56-58, 1972
- 7) Ockner, R. K. and Manning, J. A.: Fatty acid-binding protein in small intestine. Identification, isolation, and evidence for its role in cellular fatty acid transport. *J. clin. Invest.*, 54: 326-338, 1974
- 8) Ockner, R. K. and Manning, J. A.: Fatty acid binding protein. Role in esterification of absorbed long chain fatty acid in rat intestine. *J. clin. Invest.*, 58: 632-641, 1976
- 9) Reyes, H., Levi, A. J., Gatmaitan, Z. and Arias, I. M.: Organic anion-binding protein in rat liver: Drug induction and its physiologic consequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, 64: 168-170, 1969
- 10) Reyes, H., Levi, A. J., Gatmaitan, Z. and Arias, I. M.: Studies of Y and Z, two hepatic cytoplasmic organic anionbinding proteins: Effect of drugs, chemicals, hormones,

- and cholestasis. *J. clin. Invest.*, 50 : 2242-2252, 1971
- 11) Foliot, A., Christoforov, B., Housset, E., Petite, J.-P., Ploussard, J.-P. and Étienne, J.-P. : Accroissement de la concentration hépatocytaire en protéine Z et induction de l'activité bilirubine-glucuronyl-transférase hépatique chez le rat par le clofibrate. *Biol. Gastroenterol.*, 7 : 332-333, 1974
 - 12) Foliot, A., Housset, E., Fiessinger, J.-N., Christoforov, B. and Petite, J. P. : Influence of clofibrate (ethylchlorophenoxyisobutyrate) on hepatic Z protein in rats. *Digestion*, 12 : 256, 1975
 - 13) Fleischner, G., Meijer, D. K. F., Levine, W. G., Gatmaitan, Z., Gluck, R. and Arias, I. M. : Effect of hypolipidemic drugs, nafenopin and clofibrate. On the concentration of ligandin and Z protein in rat liver. *Biochem. biophys. Res. Commun.*, 67 : 1401-1407, 1975
 - 14) Renaud, G., Foliot, A. and Infante, R. : Increased uptake of fatty acids by the isolated rat liver after raising the fatty acid binding protein concentration with clofibrate. *Biochem. biophys. Res. Commun.*, 80 : 327-334, 1978
 - 15) 桜井武彦, 進藤泰子, 藪手吾一, 橋本 隆 : 抗脂血薬剤の作用機序について. *薬理と治療*, 6 : 2001-2007, 1978
 - 16) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. : Protein measurement with the Folin's phenol reagent. *J. biol. Chem.*, 193 : 265-275, 1951
 - 17) de Duve, C., Pressman, B. C., Gianetto, R., Wattiaux, R. and Appelmans, F. : Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat liver tissue. *Biochem. J.*, 60 : 604-617, 1955
 - 18) Osumi, T. and Hashimoto, T. : Enhancement of fatty acyl-CoA oxidizing activity in rat liver peroxisomes by di-(2-ethylhexyl) phthalate. *J. Biochem.*, 83 : 1361-1365, 1978
 - 19) Shindo, Y. and Hashimoto, T. : Acyl-coenzyme A synthetase and fatty acid oxidation in rat liver. *J. Biochem.*, 84 : 1177-1181, 1978
 - 20) Bar-Tana, J., Rose, G. and Shapiro, B. : In "Methods in Enzymology", Lowenstein, J. M. (ed.), Vol 35 (B), pp. 117-122, Academic Press, New York, 1975
 - 21) 山下 哲 : 生化学実験講座 9 脂質の代謝. 日本生化学会編, pp. 230-238, 東京化学同人, 東京, 1975
 - 22) Kawaguchi, A. and Bloch, K. : Inhibition of glucose 6-phosphate dehydrogenase by palmitoyl coenzyme A. *J. biol. Chem.*, 249 : 5793-5800, 1974
 - 23) Weber, K. and Osborn, M. : The reliability of molecular weight determination by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. biol. Chem.*, 244 : 4406-4412, 1969
 - 24) Lazarow, P. B. and de Duve, C. : A fatty acyl-CoA oxidizing system in rat liver peroxisomes : Enhancement by clofibrate, a hypolipidemic drug. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 73 : 2043-2046, 1976
 - 25) Lazarow, P. B. : Three hypolipidemic drugs increase hepatic palmitoyl-coenzyme A oxidation in the rat. *Science*, 197 : 580-581, 1977
 - 26) Ketterer, B., Tipping, E. and Hackney, J. F. : A low-molecular-weight protein from rat liver that resembles ligandin in its binding properties. *Biochem. J.*, 155 : 511-521, 1976
 - 27) Burnett, D. A. and Ockner, R. K. : Studies of the role of fatty acid binding protein (FABP) in the utilization of free fatty acid (FFA) by isolated hepatocytes. *Clin. Res.*, 24 : 432 A, 1976
 - 28) Wu-Rideout, M. Y. C., Elson, C. and Shrago, E. : The role of fatty acid binding protein on the metabolism of fatty acids in isolated rat hepatocytes. *Biochem. biophys. Res. Commun.*, 71 : 809-816, 1976
 - 29) Peters, T., Jr. : The biosynthesis of rat serum albumin. I. Properties of rat albumin and its occurrence in liver cell fractions.

宮沢昌子・橋本 隆

J. biol. Chem., 237 : 1181-1185, 1962

(54. 3. 19 受稿)