

アユにおける溶菌性物質の分布ならびに性状

誌名	日本水産學會誌
ISSN	00215392
巻/号	528
掲載ページ	p. 1443-1447
発行年月	1986年8月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



アユにおける溶菌性物質の分布ならびに性状^{*1}

伊丹利明, 高橋幸則, 川原逸朗

(1986年1月16日受理)

Bacteriolytic Activity in Organs of Ayu and Its Enzymatic Properties

Toshiaki Itami,^{*2} Yukinori Takahashi,^{*2} and Itsuro Kawahara^{*2}

The bacteriolytic activity was examined on the homogenates of some organs of Ayu *Plecoglossus altivelis*: the mucus on the body surface, kidney, intestine, mucus on gill surface and serum. The enzymatic properties of the bacteriolytic activity of the skin mucus and kidney were also investigated. The activity was determined by the turbidimetric method using acetone-ether-dried cells of *Micrococcus lysodeikticus* as the substrate.

The skin mucus showed the highest bacteriolytic activity, followed in order by the kidney, intestine and gill mucus, but the serum didn't lyse the cells. The maximal activity of the bacteriolysis by the skin mucus appeared in 0.0075 M phosphate buffer of pH 6.5 at 35°C. And the kidney showed the maximal activity in 0.01 M phosphate buffer of pH 7.0 at 35°C. The bacteriolytic activity of both the skin mucus and the kidney heated at 100°C for 10 min in the acidic buffer (pH 3.5) were relatively stable but those in neutral (pH 7.0) or the alkaline (pH 9.0) buffer were liable to be inactivated, as shown by the lysozyme from the hen egg-white.

養殖魚類の適正な飼育管理法や疾病の予防対策を確立するためには、感染に対する魚類の特異的防御機構だけでなく、非特異的な防御機構についても解明する必要がある。

著者らは過去に、ストレスを負荷したコイの各組織に付着・増殖する細菌数の変化から、体表粘液の中には非特異的な抗菌活性物質が存在するのではないかと推論した。¹⁾ さらに、コイの体表粘液からリゾチムを分離・粗精製して、その酵素化学的性状を明らかにした。²⁾

魚類のリゾチム活性については、サケ *Onchorhynchus keta* やキンメダイ *Beryx splendens* など8種類の海産魚の主として消化器系,³⁾ *Tilapia Tilapia mosambica*, *Scat Scatophagus argus* および Target perch *Theraoh puta* の肝臓と鰓,⁴⁾ *Chimaera monstrosa*, *Etmopterus spinax* および *Raja radiata* の造血管や脾臓,⁵⁾ *Plaice Pleuronectes platessa* の体表粘液、腎臓、脾臓など,⁶⁾ *Plaice*^{7,8)} および Lump sucker *Cyclopterus lumpus*⁹⁾ の血清、ならびに海水飼育したニジマス *Salmo gairdneri* の体表粘液¹⁰⁾ にそれぞれ認められている。しかし、魚類の非特異的な感染防御機構を解明するには、当該物質の感染門戸における溶菌活性などの作用を明らかにする必要がある。

そこで本報では、養殖魚類として産業上重要なアユを用いて、ピブリオ病の感染門戸と考えられる体表(粘液)や鰓(粘液)などにおける溶菌性物質の *Micrococcus lysodeikticus* に対する活性ならびに酵素化学的性状について検討したので報告する。

実験方法

供試魚および試料の調製 平均体重 45 g のアユ 50尾を供試した。供試魚を tricaine methansulfonate で麻酔したのち、体表粘液、血清、鰓粘液、腎臓および腸管を採取した。体表粘液は、0.0075 M リン酸緩衝液 (pH 6.5, 以下 PB と略す) を用いて前報²⁾ と同様にして採取した。血清は、心臓穿刺によって採血したのち、25°C に 2 時間放置後、6°C で 3,000 rpm, 20 分間の遠心分離によって得た。鰓粘液は、心臓穿刺および尾部切断によって十分放血させたのち、鰓を摘出し、4°C の PB に 1 時間浸漬して粘液を溶出させた。腎臓および腸管は、摘出後すみやかに PB 中に浸漬した。血清を除くすべての組織および粘液は、ホモジナイズしたのち PB で全容を 4 ml とし、4°C で 15,000 rpm, 20 分間遠心分離した。この上澄液をポアサイズが 0.45 μm のミリポアフィルターで濾過したものを試料とした。

^{*1} 魚類における感染およびその防御機構に関する研究—III. (Studies on Mechanisms of Bacterial Infection and Protection in Fish—III).

^{*2} 水産大学校増殖学科 (Department of Aquaculture and Biology, Shimonoseki University of Fisheries, Shimonoseki 759-65, Japan).

溶菌活性の測定 前報²⁾と同様に, *Micrococcus lysodeikticus* を用いて溶菌活性を測定した。ただし, 試料の添加量はタンパク質量にして $100 \mu\text{g}$ とし, これに PB を加えて全容を 1.5 ml とした試料希釈溶液に基質液 2.5 ml を混合した。反応温度は 35°C とし, 溶菌活性値は前報²⁾と同様に unit で表示した。タンパク質量の測定には Lowry ら¹¹⁾の方法を用いた。

次に, 体表粘液および腎臓中の溶菌性物質について酵素化学的性状を検討するために, その反応至適条件および各種 pH 条件下における熱安定性を下記の方法によって調べた。

反応至適 pH 0.0075 M PB を用いて, pH $5.0 \sim 8.0$ における溶菌活性を調べた。反応温度は体表粘液で 30°C , 腎臓で 35°C とした。

反応至適温度 0.0075 M PB (pH 6.5) を用いて, 反応温度 $10 \sim 60^\circ\text{C}$ における溶菌活性を調べた。

反応至適モル濃度 モル濃度を $0.001 \sim 0.075 \text{ M}$ に調整した PB (pH 6.5) を用いて溶菌活性を調べた。反応温度は体表粘液で 30°C , 腎臓で 35°C とした。

各種 pH における熱安定性 前報²⁾と同様にして, 各種 pH 条件下における熱安定性を検討した。

結 果

各部位における溶菌性物質の分布 Ayu の体表粘液, 鰓粘液, 腎臓, 腸管および血清における溶菌性物質の分布状況を, 各部位の活性値として Fig. 1 に示した。溶菌活性は体表粘液, 腎臓, 腸管, 鰓粘液および血清の順に高く, それぞれ $20.0, 11.8, 7.6, 5.8, 0$ units であった。

溶菌性物質の酵素化学的性状

1. 反応至適 pH 体表粘液および腎臓における溶菌性物質の反応至適 pH を, 各種 pH 条件下の溶菌活性として Fig. 2 に示した。各 pH における体表粘液および腎臓の活性は, それぞれ pH 6.5, pH 7.0 で高く, pH 6.0 以下の酸性域では両部位ともに低かった。

2. 反応至適温度 体表粘液および腎臓の反応至適温度を, 各種温度条件下の溶菌活性として Fig. 3 に示した。各温度における活性は体表粘液, 腎臓ともに 35°C で最も高く, それぞれ $37.0, 18.0$ units であった。しかし, 20°C 以下および 50°C 以上での活性は, 両部位ともに著しく低下した。

3. 反応至適モル濃度 体表粘液および腎臓の反応至適モル濃度を, 各種モル濃度条件下の溶菌活性として Fig. 4 に示した。各モル濃度における活性は, 体表粘液で 0.0075 M , 腎臓では 0.01 M で最も高く, それぞれ $33.8, 18.2$ units であった。

4. 各種 pH における熱安定性 体表粘液および腎臓

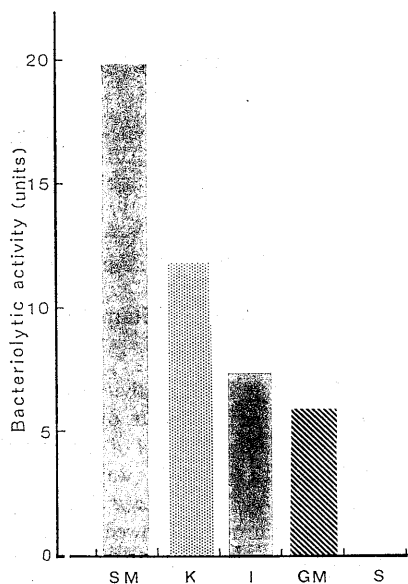


Fig. 1. Bacteriolytic activity of the skin mucus (SM), kidney (K), intestine (I), gill mucus (GM) or serum (S) in Ayu, measured by the turbidimetric method using acetone-ether-dried cells of *Micrococcus lysodeikticus* as the substrate.

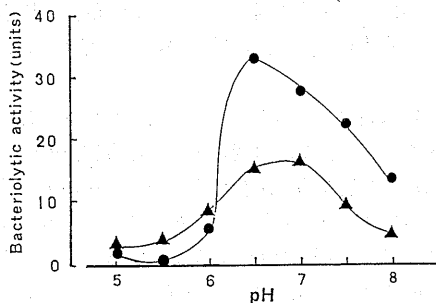


Fig. 2. Effect of pH on the bacteriolytic activity of the homogenates of the skin mucus (●) or the kidney (▲) in Ayu. The activity was measured by the turbidimetric method using acetone-ether-dried cells of *M. lysodeikticus* as the substrate in 0.0075 M phosphate buffer incubated at 30°C for the skin mucus or at 35°C for the kidney.

の各種 pH における熱安定性を, 未処理試料の溶菌活性に対する加熱処理試料の比活性として Fig. 5 に示した。pH 3.5, 7.0 および 9.0 で加熱処理した各試料の比活性は, 体表粘液でそれぞれ 58.2, 11.7, 10.0% であり, 腎臓ではそれぞれ 59.3, 9.2, 0.8% であったのに対して, 卵白リゾチームではそれぞれ 79.0, 76.9 および 27.1% であった。このように, 体表粘液および腎臓に含まれる溶菌性物質は, 卵白リゾチームと同様に, アル

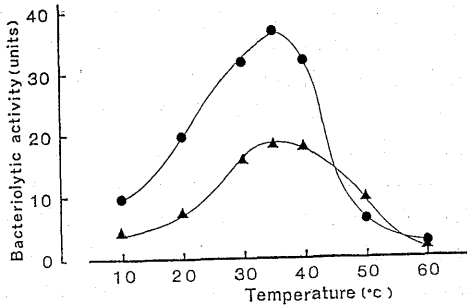


Fig. 3. Effect of temperature on the bacteriolytic activity of the homogenates of the skin mucus (●) or the kidney (▲) in Ayu. The activity was measured by the turbidimetric method using acetone-ether-dried cells of *M. lysodeikticus* as the substrate in 0.0075 M phosphate buffer of pH 6.5.

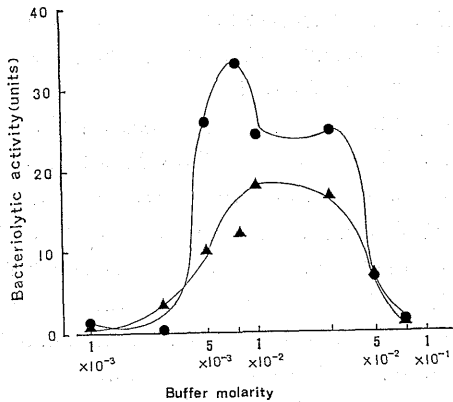


Fig. 4. Effect of buffer molarity on the bacteriolytic activity of the homogenates of the skin mucus (●) or the kidney (▲) in Ayu. The activity was measured by the turbidimetric method using acetone-ether-dried cells of *M. lysodeikticus* as the substrate in the phosphate buffer of pH 6.5 incubated at 30°C for the skin mucus or at 35°C for the kidney.

カリ性域よりも酸性域での熱安定性が高い傾向が認められた。

考 察

本実験において、アユの体表粘液、鰓粘液、腎臓および腸管の各試料は *M. lysodeikticus* に対して溶菌活性を示した。このことは基質特異性から考えて、溶菌性物質の主体がリゾチームであることを示唆しているものと思われる。リゾチームの魚体内分布については、望月、松宮³⁾がサケ *Onchorhynchus keta*、キンメダイ *Beryx splendens* など8種類の海産魚について報告している。これによると、*M. lysodeikticus* に対して高い溶菌活性

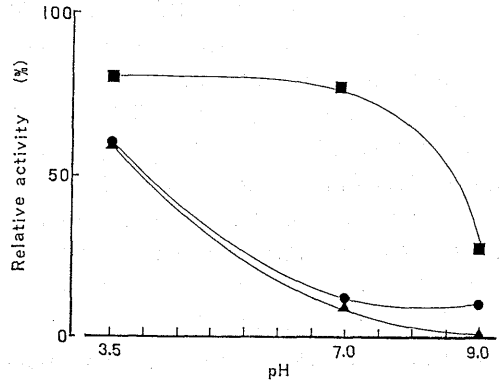


Fig. 5. Thermostability of the homogenates of the skin mucus (●) or the kidney (▲) in Ayu, and of the lysozyme (■) purified from hen egg-white. Each of the samples was heated at 100°C for 10 min in various buffers of pH 3.5, 7.0, or 9.0, then the bacteriolytic activity was determined by the turbidimetric method in the optimal condition for each sample.

を示した部位は、サケでは腎臓、筋肉、腸であり、キンメダイでは胃、肝臓であった。Sankaran and Gurnani⁴⁾は *Tilapia*, *Scat* および *Target perch* の肝臓と鰓に、*M. lysodeikticus* に対する溶菌活性を認めたとしている。Fänge ら⁵⁾は、*Chimaera monstrosa*, *Etmopterus spinax* および *Raja radiata* の造血器や脾臓に高い溶菌活性が認められたことを明らかにしている。さらに、Plaice,^{7,8)} Haddock,⁷⁾ ニジマス¹²⁾ および *Lumpsucker*⁹⁾ の血清にリゾチーム活性が認められている。このように、リゾチーム活性は海産魚や淡水魚の各組織に広く分布することが知られている。

本実験において、アユの体表粘液、鰓粘液、腎臓、腸および血清のうちで、最も高い溶菌活性を示した部位は体表粘液であった。一般に、魚類の体表は外部からの細菌によって侵襲を受けやすい部位であることから、この部位における粘液の溶菌活性が高かったことは、体表が生体防御上重要な部位であり、かつ粘液中の溶菌性物質がこの部位で、重要な防御的役割を果たしているのではないかと推察される。

体表と同様に、鰓も外部からの攻撃を受けやすい部位であるが、鰓粘液の溶菌活性は体表粘液のそれよりも低かった。この原因としては、試料中に血液が混入したために試料中のタンパク質濃度が高くなり、結果的に溶菌性物質の相対濃度が低くなった可能性も考えられる。

本実験における腎臓の溶菌活性は、体表粘液について高かった。溶菌活性が腎臓で高かった原因は、前腎が白血球を産生する器官¹³⁾であり、リゾチームが白血球由来する物質¹⁴⁾であるためではないかと思われる。

次に、腸管の *M. lysodeikticus* に対する溶菌活性は、キンメダイやサケ³⁾でも認められており、今回アユにも認められた。体表と同様に腸管も細菌の侵襲を受けやすい部位であることから、腸管内の溶菌酵素は他の消化酵素と協同して作用するとともに、腸内細菌叢の維持や病原細菌の増殖を抑制しているものと考えられる。

本実験では、血清の溶菌活性は認められなかった。魚類における血清の溶菌活性については、Plaice,⁸⁾ ニジマス¹²⁾および Lump sucker⁹⁾で明らかにされており、生殖時期や季節によって活性が変化することも知られている。したがって、今回アユの血清に溶菌活性が認められなかったのは、このような性的変動あるいは季節に起因した可能性も考えられる。

次に、アユの体表粘液および腎臓の溶菌活性について、その反応至適条件を検討した結果、まず反応至適 pH は体表粘液で pH 6.5、腎臓では pH 7.0 付近であった。Hjelmeland ら¹⁰⁾は、降海型のニジマスの体表粘液を用いて、*M. lysodeikticus* に対する溶菌活性の至適 pH を調べたところ、pH 6.0 であったとしている。著者らが過去に、コイの体表粘液について *M. lysodeikticus* に対する溶菌活性の至適 pH を調べたところ、pH 6.5 であった。^{*}このように、アユの体表粘液の溶菌活性は、ニジマスやコイの体表粘液とはほぼ同様の反応至適 pH を示した。しかし、前報²⁾において著者らが明らかにしたように、コイの体表粘液から分離・粗精製したリゾチームは、pH 7.2 と 9.0 の 2 つの反応至適 pH を有していた。このことから、魚類の体表粘液における溶菌活性の至適 pH はリゾチーム単独のそれではなく、*M. lysodeikticus* に溶菌作用を示す複合物質の反応至適 pH である可能性が考えられる。

Hjelmeland ら¹⁰⁾は降海型のニジマスの体表粘液を用いて、*M. lysodeikticus* に対する溶菌活性の温度依存性を調べたところ、反応至適温度は 30~40°C であったとしている。著者らが過去に、コイの体表粘液について調べた結果では 20°C が至適温度であり、10~50°C の温度域では至適条件下の溶菌活性の 70% 以上の値を示し、幅広い反応温度域をもつことが明らかになっている。^{*}本実験におけるアユの体表粘液および腎臓の反応至適温度は、いずれも 35°C であったが、至適条件下の活性の 70% 程度の値を示したのは 30~40°C の範囲であり、コイにくらべて反応温度域が狭い傾向がみられた。この原因が両者の生態および生息環境の差異を反映したのか、あるいは生体防御物質の種類や作用の違いによるのかは不明である。

Sankaran and Gurnani⁴⁾は Tilapia と Scat の肝臓を用いて、*M. lysodeikticus* に対する溶菌活性の反応至

適モル濃度を調べ、Tilapia で 0.005 M、Scat では 0.02~0.08 M で最大の活性を示したとしている。また、コイの体表粘液から粗精製したリゾチームの反応至適モル濃度は、0.01 M であった。²⁾本実験におけるアユの体表粘液および腎臓の反応至適モル濃度は、それぞれ 0.0075 M、0.01 M であった。このように、アユの体表粘液および腎臓の溶菌活性が比較的低イオン強度域で高いのは、上記部位に分布する溶菌性物質が実験時のアユの生息環境（淡水）に適応して、生体防御の機能を果たしているのではないかと思われる。

次に、アユの体表粘液および腎臓における溶菌性物質の各種 pH 条件下における熱安定性について検討したところ、両部位ともに酸性溶液中では安定であるが、中性およびアルカリ性の溶液中では不安定であった。著者ら²⁾は、コイの体表粘液から得た粗精製リゾチームの熱安定性について、酸性域では安定であるがアルカリ性域では不安定であることを明らかにした。このような現象は、卵白リゾチームをはじめとする動・植物由来のリゾチームにみられる一般的傾向である。¹⁵⁾

このように、アユの体表粘液、鰓粘液、腎臓および腸管には、*M. lysodeikticus* に対して溶菌活性を示す物質が分布していることが明らかになった。また、体表粘液および腎臓の溶菌性物質については、*M. lysodeikticus* に対して高い溶菌活性を示すだけでなく、酸性条件下での熱安定性が高いことなどから、その主体はリゾチームではないかと思われる。しかし、魚類の体表粘液、腎臓あるいは血清中にはプロテアーゼ、¹⁰⁾補体¹⁶⁻¹⁹⁾など種々の物質が存在し、溶菌活性の発現に協同ならびに相互的に作用していると考えられることから、今後リゾチームをはじめとするこれら抗菌性物質の単離・精製を進めて、各物質の生体防御の機能ならびにこれに関連する相互作用について明らかにしていきたい。また、生体防御の機構上重要と思われる体表粘液および腎臓の溶菌性物質については、各種魚病細菌に対する活性を調べる必要がある。

文 献

- 1) 高橋幸則, 藤野博文: 日水誌, **50**, 735-742 (1984).
- 2) 高橋幸則, 伊丹利明, 古根川紀潮: 日水誌 **52**, 1209-1214 (1986).
- 3) 望月 篤, 松宮政弘: 日水誌, **47**, 1065-1068 (1981).
- 4) K. Sankaran and S. Gurnani: *Indian J. Biochem. Biophys.*, **9**, 162-165 (1972).
- 5) R. Fänge, G. Lundblad, and J. Lind: *Mar. Biol.*, **36**, 277-282 (1976).

* 高橋幸則, 伊丹利明, 古根川紀潮: 昭和 59 年度日本魚病学会講演要旨集, P. 2.

- 6) C. K. Murray and T. C. Fletcher: *J. Fish Biol.*, **9**, 329-334 (1976).
- 7) T. C. Fletcher and A. White: *Experientia*, **29**, 1283-1285 (1973).
- 8) T. C. Fletcher and A. White: *Comp. Biochem. Physiol.*, **55**, 207-210 (1976).
- 9) T. C. Fletcher, A. White, and B. A. Baldo: *Comp. Biochem. Physiol.*, **57**, 353-357 (1977).
- 10) K. Hjelmeland, M. Christie, and J. Raa: *J. Fish Biol.*, **23**, 13-22 (1983).
- 11) O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275 (1951).
- 12) V. L. Vladimirov: *Bull. Off. int. Epizoot.*, **69**, 1365-1372 (1968).
- 13) R. J. Roberts: 魚病学 (佐野徳夫訳), 文永堂, 東京, 1980, pp. 31-37.
- 14) N. E. Hansen: *Acta Haematol.*, **7**, 7-87 (1974).
- 15) 山崎信行: 溶菌酵素 (船津 勝, 鶴 大典編), 講談社, 東京, 1983, pp. 34-66.
- 16) D. W. Legler, E. E. Evans, and H. K. Dupree: *Trans. Am. Fish. Soc.*, **96**, 237-242 (1967).
- 17) L. W. Harrel, H. M. Etlinger, and H. O. Hodgins: *Aquaculture*, **7**, 363-370 (1976).
- 18) D. K. Sakai: *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **47**, 565-571 (1981).
- 19) D. K. Sakai: *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **47**, 979-991 (1981).