

養殖ウナギのリゾチーム活性の特性

誌名	日本水産學會誌
ISSN	00215392
著者	川原, 逸朗 楠田, 理一
巻/号	54巻6号
掲載ページ	p. 965-968
発行年月	1988年6月

養殖ウナギのリゾチーム活性の特性

川原逸朗, 楠田理一

(1987年11月18日受付)

Properties of Lysozyme Activities in Cultured Eel

Itsuro Kawahara* and Riichi Kusuda*

Some properties of lysozyme activities of the skin mucus extract, serum and kidney extract in eel *Anguilla japonica* were examined. Lysozyme activity was measured by the turbidimetric method using acetone-ether dried cells of *Micrococcus lysodeikticus* as substrate. The optimum pH and temperature for the lysozyme activity of skin mucus extract were pH 6 and 30°C whereas those of serum and kidney extract were pH 8 and 50°C. Lysozyme activities of samples after heating in an acidic buffer (pH 4) were relatively stable but those in neutral (pH 7) or alkaline buffers (pH 9) were liable to be inactivated. The activities were inactivated by addition of chitin and bentonite, and inhibited by incubation with 1 mM EDTA and iodine.

Micrococcus lysodeikticus を基質に用いるリゾチーム活性の測定方法は、グラム陽性菌の *M. lysodeikticus* の細胞壁にペプチドグリカンが多く含まれているために、リゾチームによって溶菌されやすい性質を利用したもので、溶菌法として多用されている。この方法を用いて、リゾチームの持つ溶菌作用の pH 依存性などの特性を検討した例は比較的多い。例えば、溶菌作用の pH 依存性については、ニワトリの卵白のリゾチームでは 7.5 付近、環形動物のシロガネゴカイの 1 種では 6.0~6.5、植物のパパイアでは 4.5 が至適 pH とされている。¹⁾ 魚類においても、ティラピアの肝臓²⁾ やニジマスの体表粘液³⁾ などで検討されており、それぞれ 5.2 および 6.0 が至適 pH であるとされている。このように、リゾチームの持つ溶菌作用の至適 pH は、その存在する生物起源の違いによって相違がみられることが知られている。このような相違は、温度依存性や熱安定性など、ほかの性質にも認められている傾向である。したがって、リゾチーム活性が認められた生物では、その活性の特性を検討し、従来報告されている性質と比較することが必要であると思われる。そこで、本報では前報⁴⁾ で比較的高い活性が認められたウナギについて、体表粘液、血清ならびに腎臓の 3 つの部位を選び、各部位に存在するリゾチーム活性の pH および温度依存性、各種 pH 下における熱安定性ならびにリゾチーム吸着材と各種阻害剤などの影響を検討した。

実験方法

供試魚 高知県南国市内の養鰻場から魚体重 152~185 g のウナギを 20 尾購入後、60 l のアクリル水槽に 5 日間馴致したものをを用いた。

試料およびその調製法 各個体から得た体表粘液、血清および腎臓を実験に供した。試料は前報⁴⁾ と同様の方法で調製し、5 尾分をプールしたのちに体表粘液および腎臓は -20°C で、血清は -80°C で凍結保存した。

pH 依存性の検討 pH 5.0, 6.0, 6.5, 7.0, 8.0, 9.0 の 0.01 M リン酸緩衝液で菌体懸濁液を作製し、各 pH の緩衝液で希釈した試料 1 ml と、これらの菌体懸濁液 2 ml を混合したのちに、35°C で 60 分間反応させ、前報⁴⁾ の測定方法に従って各 pH におけるリゾチーム活性を測定した。

温度依存性の検討 pH 7.0 の 0.01 M リン酸緩衝液で菌体懸濁液を作製し、この懸濁液 2 ml に希釈した試料 1 ml を混合したのちに 20, 30, 35, 40, 50, 60°C の各温度で反応させ、前報⁴⁾ の方法に従って各温度におけるリゾチーム活性を測定した。

各種 pH 下における熱安定性の検討 各試料を pH 4.0 の 0.1 M 酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液、pH 7.0 の 0.01 M Sørensen のリン酸緩衝液および pH 9.0 の 0.05 M Tris-HCl 緩衝液で希釈し、20, 40, 60, 80, 95°C の各温度で 10 分間、加熱処理を行った。その後、ただちに流水で冷却し、前報⁴⁾ の方法に従ってリゾチーム活

* 高知大学農学部水産病理学講座 (Fish Disease Laboratory, Faculty of Agriculture, Kochi University, Nankoku, Kochi 783, Japan).

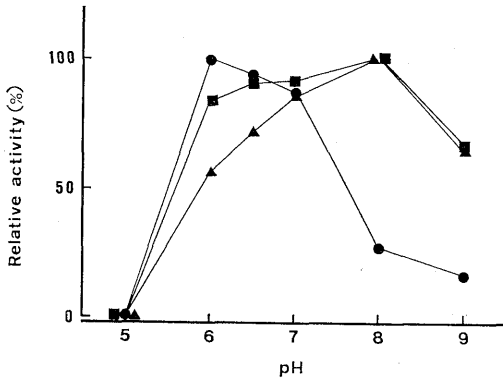


Fig. 1. Effect of pH on the lysozyme activity of skin mucus extract (●), serum (▲) and kidney extract (■) of eel *Anguilla japonica*.

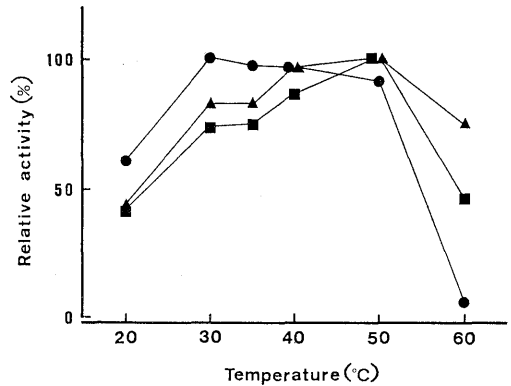


Fig. 2. Effect of temperature on the lysozyme activity of skin mucus extract (●), serum (▲) and kidney extract (■) of eel *Anguilla japonica*.

性を測定した。

リゾチーム吸着材の影響 リゾチーム吸着材はキチンおよびベントナイトを用いた。いずれの試料も、リゾチーム活性が卵白リゾチーム 1 μg に相当する量の試料に対して 5 mg の吸着材を添加し、4°C で 30 分間反応させた。吸着材添加試料は反応終了後ただちに 3,000×g で 5 分間の遠心分離を行い、吸着材を除去したのちに、前報⁴⁾の方法に従ってリゾチーム活性を測定した。

各種阻害剤などの影響 EDTA, ヨウ素, イミダゾール, N-アセチルグルコサミン, 塩酸グアニジンおよびアンチパインの 6 種の物質について検討した。調製菌体懸濁液と試料の混合液に最終濃度が 1 mm となるように各種阻害剤を添加し、前報⁴⁾の方法に従ってリゾチーム活性を測定した。

結 果

リゾチーム活性の pH 依存性を検討した結果は Fig. 1 に示すとおりである。体表粘液では pH 6.0 で、血清および腎臓では pH 8.0 で最高の活性を示した。

リゾチーム活性の温度依存性を検討した結果は Fig. 2 に示すとおりである。体表粘液では 30°C 付近で、血清および腎臓では 50°C 付近で最高の活性を示した。

リゾチーム活性の各種 pH 下における熱安定性を検討した結果は Fig. 3 に示すとおりである。体表粘液、血清および腎臓ではいずれも酸性側の pH 域で熱に安定性が高い傾向を示し、この pH 域では 95°C の加熱処理を行っても、25~40% の活性が残存した。

リゾチーム活性に及ぼす吸着材の影響を検討した結果は Table 1 に示すとおりである。体表粘液、血清および腎臓ではいずれもキチンあるいはベントナイトを添加すると、その上清の活性は低下した。しかし、対照の卵白リゾチームに比べてキチン処理による活性低下の割合が小

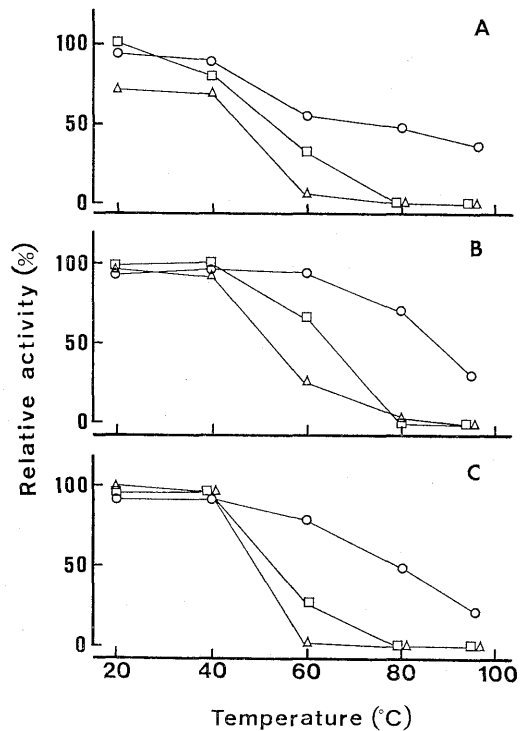


Fig. 3. Thermostability of the lysozyme activity of skin mucus extract (A), serum (B) and kidney extract (C) of eel *Anguilla japonica* at pH 4 (○), 7 (□) and 9 (△).

さい傾向が認められた。

リゾチーム活性に及ぼす 6 種の阻害剤などの影響を検討した結果は Table 2 に示すとおりである。試験した 6 種の阻害剤などのうち、酸化剤としてのヨウ素に大きな阻害効果がみられたほか、EDTA にも多少の阻害効果が認められた。

Table 1. Effect of chitin and bentonite on the lysozyme activity of eel and hen's egg-white

Compounds	Relative activity (%)			
	Skin mucus extract	Serum	Kidney extract	H.E.L.*
None	100	100	100	100
Chitin	64	29	30	3
Bentonite	8	0	3	0

* Hen's egg-white lysozyme.

考 察

ウナギのリゾチーム活性の pH 依存性について検討した結果、体表粘液では pH 6.0、血清および腎臓では pH 8.0 で最高の活性を示した。このことから、それぞれの試料の至適 pH は最高活性を示した pH 付近にあるものと思われる。前報⁵⁾において、著者らはブリの体表粘液、血清および腎臓のリゾチーム活性の pH 依存性を検討し、体表粘液では 7.0 付近、血清および腎臓では 8.0 付近が至適 pH であることを報告した。また、クロホシマンジュウダイ科の scat の肝臓²⁾は 6.2 と 9.2、plaice の血清⁶⁾は 5.4、ニジマスの体表粘液⁸⁾は 6.0 が至適 pH であるとされており、ウナギの各試料の至適 pH は、体表粘液ではニジマスと、血清および腎臓ではブリと一致した。一方、本実験で得られた結果を試料間で比較してみると、血清と腎臓の至適 pH は一致したが、体表粘液は異なる傾向が認められた。このように、リゾチーム活性の至適 pH が同一個体でも部位によって異なる原因は、試料中に混在するほかの物質による影響が考えられる。しかし、コクチョウ卵白¹⁾で報告されているように、2 種類のリゾチームが存在する可能性もあり、今後さらに検討する必要があると思われる。

リゾチーム活性の温度依存性を検討した結果、体表粘液では 30°C、血清および腎臓では 50°C で最高の活性を示した。しかし、体表粘液の活性は 35、40 および 50°C でも、血清および腎臓では 40°C でもそれほど大きな差

は認められなかった。このことから、リゾチーム活性の至適温度は、体表粘液では 30~50°C、血清および腎臓では 40~50°C 付近の比較的広い温度域にあるものと思われる。前報⁵⁾において、ブリのリゾチーム活性の温度依存性を検討した結果、体表粘液、血清および腎臓のいずれも 40°C 付近が至適温度であり、この温度域を離れると活性は著しく低下し、至適温度域の狭い傾向が認められた。これらのことから、ウナギとブリのリゾチーム活性の温度依存性は、多少異なるものと思われる。

リゾチーム活性の各種 pH 下での熱安定性について検討した結果、いずれの試料においても酸性域で安定であり、中性およびアルカリ性域では不安定であった。魚類のリゾチーム活性の各種 pH 下での熱安定性については高橋⁷⁾がコイの体表粘液から得た粗精製リゾチームで検討している。すなわち、コイの粗精製リゾチームはアルカリ性域よりも酸性域での熱安定性が高い傾向があるとしており、本実験で認められた傾向はコイと一致するものと思われる。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として知られている。¹⁾

リゾチーム吸着材がウナギのリゾチーム活性に及ぼす影響を検討した結果、いずれの試料においてもキチンあるいはペントナイトを添加すると、その上清の活性が消失あるいは低下する傾向が認められた。この原因は試料中のリゾチーム様物質が、キチンあるいはペントナイトによって吸着されたためではないかと思われる。このようなキチンあるいはペントナイトに吸着する性質は、動・植物由来のリゾチームにみられる一般的傾向である。⁸⁾しかし、ウナギの各試料のキチン処理による活性低下の割合は、対照の卵白リゾチームに比べて小さい傾向が認められた。これはウナギのリゾチーム様物質が、卵白のリゾチームに比べてキチンへの吸着力が弱いことが原因ではないかと考えられる。

阻害剤などの 6 種の物質がウナギのリゾチーム活性に及ぼす影響を検討した結果、いずれの試料においても

Table 2. Effect of various compounds on the lysozyme activity of eel and hen's egg-white

Compounds	Concentration (mM)	Relative activity (%)			
		Skin mucus extract	Serum	Kidney extract	H. E. L.*
None	—	100	100	100	100
EDTA	1	54	91	76	95
Iodine	1	0	50	0	0
Imidazole	1	100	94	100	99
N-acetylglucosamine	1	100	99	100	100
Guanidine hydrochloride	1	97	93	97	98
Antipain	2 µg/ml	96	99	99	99

* Hen's egg-white lysozyme.

化剤としてのヨウ素で顕著な阻害がみられ, EDTA でも弱い阻害が認められた。高橋ら⁹⁾は EDTA, ヨウ素, イミダゾールなど6種類の物質がマガキおよびムラサキイガイのリゾチーム活性におよぼす影響を本実験と同じ濃度で検討しており, 同様の結果を得ている。一方, 卵白リゾチームに関する研究^{10,11)}では, イミダゾールや塩酸グアニジンの阻害効果が報告されているが, それらは本実験の濃度 (1 mM) よりもかなり高い濃度での実験であり, 低濃度では効果が認められないものと考えられる。

以上のように, ウナギの体表粘液, 血清および腎臓のリゾチーム活性は, pH 6.0~8.0, 30~50°C に至適条件を持ち, 酸性域での熱安定性が高いこと, リゾチーム吸着材のキチンやペントナイト処理で活性が低下すること, リゾチーム阻害剤のヨウ素によって顕著に阻害されることなど, リゾチームの持つ一般的性質を有することが明らかとなった。しかし, 高橋ら⁹⁾がコイで報告しているように, ウナギにおいても未精製試料と粗精製試料の間には pH あるいは温度の依存性に相違が認められることも考えられるので, 今後の研究により, ウナギからリゾチーム様物質を精製し, その特性について明らかにする必要があると思われる。

文 献

- 1) 山崎信行: 溶菌酵素 (船津 勝, 鶴 大典編), 講談社, 東京, 1983, pp. 34-66.
- 2) K. Sankaran and S. Gurnani: *Indian J. Biochem. Biophys.*, **9**, 162-165 (1972).
- 3) K. Hjelmeland, M. Chritie, and J. Raa: *J. Fish Biol.*, **23**, 13-22 (1983).
- 4) 川原逸朗, 楠田理一: 日水誌, **54**, 581-584 (1988).
- 5) 楠田理一, 川原逸朗, 浜口昌巳: 日水誌, **53**, 211-214 (1987).
- 6) T. C. Fletcher and A. White: *Experientia*, **29**, 1283-1285 (1973).
- 7) 高橋幸則, 伊丹利明, 古根川紀潮: 日水誌, **52**, 1209-1214 (1986).
- 8) 林 勝哉, 井本泰治: リゾチーム, 南江堂, 東京, 1974, pp. 20-21.
- 9) 高橋計介, 森 勝義, 野村 正: 日水誌, **52**, 863-868 (1986).
- 10) K. Hamaguchi and A. Kurono: *J. Biochem.*, **54**, 111-122 (1963).
- 11) M. Shinitzky, E. Katchalski, V. Grisaro, and N. Sharon: *Arch. Biochem. Biophys.*, **116**, 332-343 (1966).