魚類の β -グルクロニダーゼ分布

永山文男・斎藤佑尚・林 昌郎

(1967 年 9 月 4 日受理)

Distribution of β -Glucuronidase in Fish.

Fumio NAGAYAMA, Yuji SAITO, and Masaro HAYASHI*

β -Glucuronidase (E. C. 3.2.1.31) is known to be widely distributed in animal tissues¹⁾, but the information about the enzyme in fish has scarcely been available. In this experiment, the enzyme distribution in various fish tissues was investigated by the chemical³⁾ and histochemical⁴⁾ methods.

Although the enzyme activity of tissue varies with fish species, the most active tissue is, in general, the liver or kidney followed by spleen (Table 1). The granules showing the enzyme reaction are widely distributed in the tissues of liver (Figs. 1~3), pancreas (Fig. 3), spleen (Figs. 10~13), and heart (Fig. 14). In the kidney, the enzyme is localized mostly in the convoluted tubule (proximal segment), and less activity is seen in the interstitial tissue (Figs. 4~9). The general aspect of the enzyme localization, being similar with that in mammals, suggests that the metabolism of glucuronides may be actively carried out in these organs of fish.

The enzyme activities of the alimentary tracts of fishes do not show much difference with species (Table 1). However, the localization of enzyme seems to suggest some relation between the enzyme and feeding habit of fish (Figs. 15~18, and Table 2), and the importance of the enzyme in food digestion.

β -グルクロニダーゼ (E. C. 3.2.1.31) は動物組織中に広く分布することが知られており¹⁾, 体内でのグルクロン酸化合物の代謝および食物の消化に関与すると考えられる。SARKER ら²⁾はカワマスの肝臓、腎臓、および脾臓が、哺乳動物と同様に強いグルクロニダーゼ活性をもつことを報告しているが、その後魚類グルクロニダーゼの分布および特性についての研究例がみられない。

著者らは、魚類グルクロニダーゼの生理的意義および酵素の特性を明らかにするための一連の研究を行なっているが、本報では、組織中の分布についての化学的および組織化学的観察結果を述べる。

実験方法

試料 できるだけ生理状態の良好と判定された活魚を供試した。ハゼ以外はすべて養殖魚である。

酵素活性の測定 FISHMAN ら³⁾の方法をやや改変して用いた。すなわち、0.07 M 酢酸バッファー (pH 5.0) で希釈した組織ホモジネート 0.5 ml に、5 mM フェノールフタレン・グルクロン酸 0.1 ml と、上記と同じバッファー 0.4 ml を加え 37°C で 10 分間反応させる。5 % トリクロル酢酸-酢酸バッファー混液 (2:1) 3 ml を加えて反応を停止、生じた沈澱を除き、澄液 2 ml にアルカリ・グリシン溶液 (原報通り) 2.5 ml と蒸留水 1.5 ml を加える。540 m μ の吸光値から遊離フェノールフタレン量を求め、新鮮組織 1 g 当り 1 時間に遊離するフェノールフタレンの μ g で酵素活性を表わす。

酵素の組織化学的検出法 HAYASHI ら⁴⁾の方法によつた。すなわち 1 % 塩化カルシウムを含む 4 % ホルマリンで氷室中 1 夜固定した 5 mm 角の組織を 1 % アラビアゴムを含む 0.88 M しょ糖液に 1 夜浸

* 東京水産大学 (Tokyo University of Fisheries, Minato-ku, Tokyo)

した後 10~15 μ の凍結切片とする。これを 0.25 mM のナフトール AS-BI グルクロン酸と 1.8 mM のパロゾアニリンのジアゾニウム塩を含む pH 5.2 の基質溶液中で 37°C, 30 分~5 時間反応させる。酵素の所在は鮮赤色の染色で示される。

結果および考察

組織の酵素活性 Table 1 に示したように、同一魚種でも個体により酵素活性にやや差があるが、一般に、腎臓と肝臓の活性が最も高く、脾臓がこれに次ぐ。中でもハマチ、ニジマス、およびウナギのこれら臓器の酵素活性は、いままでに報告されているいろいろな動物についての値¹⁾ とくらべてもかなり高い。このことは、魚類においても、腎臓や肝臓で内部的なグルクロン酸の代謝が活発に行なわれていることを示すものである。腎臓に付属するスタニウス小体もグルクロニダーゼ活性を示すが、その意義は明らかでない。

ハゼでは心臓の酵素活性が特異的に他の臓器の活性より高いが、他の魚類では心臓の活性は腎臓の 1/10 のものが多い。

消化管のグルクロニダーゼ活性は、肝臓や腎臓などの内部器官に比べて低い。ここに得られた値は、哺乳

Table 1. Distribution of β -glucuronidase in fish tissues.

The enzyme activity is shown by μ g phenolphthalein/
hour/g moist tissue.

(a)

Species	Liver	Kidney	Spleen	Heart
Goby, <i>Acanthogobius flavimanus</i>	1,000 1,200	1,630 2,600	935 1,180	4,050 11,400
Yellowtail, <i>Seriola quinqueradiata</i>	28,000 23,500	14,000~21,000 20,300	8,000 4,500	2,800
Eel, <i>Anguilla japonica</i>	13,200	13,800~16,200	4,000	850
Rainbow trout, <i>Salmo gairdnerii</i>	16,000 11,500	19,000~21,000 11,900~13,500	7,700 4,600	1,800 1,400
Tilapia, <i>Tilapia nilotica</i>	6,000 2,070	5,600 3,340	5,250 2,650	5,800 1,730
Carp, <i>Cyprinus carpio</i>	8,500~5,100 800	2,450 5,100	2,250 4,250	200 500
Goldfish, <i>Carassius auratus</i>	3,550	4,300	3,000	400
Silver carp, <i>Hypophthalmichthys molitrix</i>	1,800	3,100	1,500	280
Grass carp, <i>Ctenopharyngodon idellus</i>	5,100	7,000	1,500	280

(b)

Species	Alimentary tracts (anterior $\rightarrow$ posterior)	Muscle	Miscellaneous
Yellowtail	570~1,200~650	40~90	serum, nil
Eel	1,680~1,480	50	
Rainbow trout	2,100~3,200~2,900 1,220~1,020~1,840~1,640	40 30	serum, 2; egg, 80~100 sperm, 1,220~1,360
Tilapia	242~200	23~46	egg, 216
Carp	1,840~1,380~1,160	30	sperm, 1,000; serum, nil
Silver carp	280~240	40	
Grass carp	1,880~1,180	10	

動物について報告されているものとほぼ同等であり、草食性の草魚においても、カタツムリの消化管にみられるような高い酵素活性が認められず、一方、肉食性であるハマチの消化管にも活性がみられる。CORNER⁵⁾は、海産の軟体類のグルクロニダーゼ活性を比較し、草食性のものが肉食性のものより高い酵素活性を有することを報告しているが、本実験の測定値から、魚類における食性とグルクロニダーゼ活性の直接的な相関を推論することは難しい。しかし魚類の消化管には、グルクロン酸を含む化合物を加水分解する能力があることが明らかであり、グルクロニダーゼが内部的なグルクロン酸の代謝だけでなく消化機能とも関連するものと考えられる。

組織中のグルクロニダーゼ分布 本実験で用いた検出法は、従来の方法より特異性と感度の点で優れるといわれるが、化学的な活性の測定値と比較すると、酵素の分布状態（散在か局在か）によつて差があるが、一般に1g当り1000単位以下の活性の低い組織での酵素検出はかなり難しい。典型的な染色標本図をPlate I および II に示した。

1. 肝臓 実質細胞全般に強い活性がみられ、一般に細胞の位置による染色の差はない。ニジマス (Fig. 1) ではSUZUKI⁶⁾がモルモットで観察したように細胞質全面に強い染色がみられ、ハマチ (Fig. 2) やウナギでは顆粒状染色がみられる。コイ科の魚では、肝組織に多数の顆粒状染色があるだけでなく、脾組織にもかなり著しい可染性顆粒がみとめられる (Fig. 3)。このような顆粒状の染色は、一般⁷⁾にいわれているように、ミクロゾームおよびリゾゾームの酵素活性に基づくものと考えられる。

2. 腎臓 最も高い活性は腎臓の中央部の尿細管にみられ、特に管腔に近い細胞質中に著しい顆粒状染色が認められる (Figs. 4~8)。また Figs. 4, 5 でも明らかなように尿細管の細胞核は全く酵素反応を示さない。腎の前部に近い尿細管の活性は低く、また中央部でも酵素活性のない管がみられる。CAMPBELL⁸⁾はマウス腎臓のグルクロニダーゼは主に基部曲節 (proximal convoluted segment) の細胞に含まれると報告し、またSUZUKI⁶⁾もラットについて、グルクロニダーゼは端部曲節 (distal convoluted segment) および集合管 (collecting tubules) にはなく基部曲節にのみ分布すると報告しているが、魚類でも同様と考えられる。しかし、本実験に供した魚類では間質細胞にもかなりの酵素活性があり、特にウナギの場合、尿細管よりむしろ間質の細胞に明瞭な酵素反応が認められる (Fig. 9)。スタニウス小体では、微細な可染性顆粒が比較的均質に分布し、酵素の特異的な局在性は認められない (Fig. 5)。

3. 脾臓 一般に顆粒状の染色が髄質中に散在するが、ハマチ (Fig. 10) と草魚 (Fig. 11) では不明瞭ではあるが可染性顆粒の集合性が認められ、またウナギ (Fig. 12) ではその集合が顕著である。ハゼとニジマスでは主に赤脾髄、コイ (Fig. 13) では赤脾髄と白脾髄の境界付近に顕著な酵素活性がある。

4. 心臓 ハゼ (Fig. 14) とハマチの心臓で、心筋にそつて比較的大型の可染性顆粒が多数みられるが、他の魚種については明らかでない。

5. 消化管 魚種により、腸のグルクロニダーゼ分布状態がやや異なり、ニジマス (Figs. 15, 16)、ウナギ、ハクレンなどでは、固有層の酵素活性が高いが、コイ (Fig. 17) や草魚 (Fig. 18) では粘膜上皮の活性が高い。これらの傾向をまとめてみると Table 2 のようになり、ニジマスやウナギのグループとコイや草魚のグループとは明らかに異なる酵素分布を示し、ハクレンがそれらの中間に位置するように思われる。

マスの幽門垂は腸と全く同じような酵素の分布を示すが、胃で粘膜下組織に高い酵素活性が認められる。

Table 2. Intensity of β -glucuronidase reaction in the tissue of fish intestine.

Species	
Rainbow trout	lamina propria > tunica intermuscularis and submucosa > epithelium
Eel	lamina propria
Silver carp	lamina propria > epithelium
Carp	epithelium > tunica intermuscularis and submucosa > lamina propria
Grass carp	epithelium > tunica intermuscularis > lamina propria

消化管内の酵素分布と食性との関連性,あるいは, β -グルクロニダーゼが魚類の生理に対してどのような意義を有するかなどの点については,さらに動的な観察を必要とするであろう。

要 約

1. 魚類各組織のグルクロニダーゼ分布を化学的および組織化学的に観察した。
2. 腎臓,肝臓および脾臓が高い酵素活性を示すだけでなく,消化管にもかなりの活性があることから,消化におけるグルクロニダーゼの機能を推定した。
3. 各組織中の酵素の分布を詳細に検討した。

終わりに,試料の入手に便宜を与えられた埼玉水試大渡,田崎両技師,神奈川水試井上技師,光学装置の使用に便宜を与えられた東水大野中教授の各位に感謝の意を表する。なお本研究の一部は文部省科学研究費によつた。

文 献

- 1) G. A. LEVY and J. CONCHIE: in "Glucuronic Acid" (G. J. DUTTON, ed.), 301~364, Academic Press, New York, 1966.
- 2) N. K. SARKER and J. B. SUMNER: *Arch. Biochem.*, **27**, 453~460 (1950).
- 3) W. H. FISHMAN and P. BERNFELD: in "Methods in Enzymology" (S. COLOWICK and N. O. KAPLAN, ed.), Vol. 1, 262~269, Academic Press, New York, 1955.
- 4) M. HAYASHI, Y. NAKAJIMA, and W. H. FISHMAN: *J. Histochem. Cytochem.*, **12**, 293~297 (1964).
- 5) E. D. S. CORNER, Y. A. LEON, and R. D. BULBROOK: *J. Mar. Biol. Ass. U. K.*, **39**, 51~61 (1960).
- 6) S. SUZUKI: *Gann*, **56**, 461~466 (1965).
- 7) C. de DUVE: *Exptl. Cell. Res., Suppl.* **7**, 172~175 (1959).
- 8) J. G. CAMPBELL: *Brit. J. Exptl. Path.*, **30**, 548~554 (1949).

Explanation of Plates I and II.

β -Glucuronidase was demonstrated by the method of HAYASHI *et al.*⁴⁾ using naphthol AS-BI β -D-glucuronic acid as the substrate. The scales shown in figures are graduated in 10 μ .

- Fig. 1.** Liver of rainbow trout; the parenchyme is intensely stained ($\times 400$).
- Fig. 2.** Liver of yellowtail; fine granules stained are seen in the parenchyme ($\times 400$).
- Fig. 3.** Hepatopancreas of carp; the granules are localized in the pancreatic tissue as well as in the hepatic tissue ($\times 400$).
- Fig. 4.** Kidney of rainbow trout; the granules are localized mostly in the epithelium of of convoluted tubule of which nuclei are not stained. Black granules in the interstitial tissue are pigments ($\times 400$).
- Fig. 5.** Kidney and corpuscle of Stannius (upper left); fine granules are located in the corpuscle of Stannius and in interstitial tissue of kidney ($\times 400$).
- Fig. 6.** Kidney of yellowtail; some tubules do not exhibit the enzyme activity, and the stained granules are located in the interstitial tissue ($\times 400$).
- Fig. 7.** Kidney of goby; the granules are found only in the tubules ($\times 400$).
- Fig. 8.** Kidney of carp; same as Fig. 7 ($\times 400$).
- Fig. 9.** Kidney of eel; the granules are located only in the interstitial tissue ($\times 400$).
- Fig. 10.** Spleen of yellowtail; the granules are widely located in the splenic pulp, with some concentration ($\times 400$).
- Fig. 11.** Spleen of grass carp; same as Fig. 10 ($\times 400$).
- Fig. 12.** Spleen of eel; concentration of the granules is remarkable ($\times 400$).
- Fig. 13.** Spleen of carp; the stained granules are concentrated in the red pulp adjacent to white pulp ($\times 400$).
- Fig. 14.** Heart of goby; the large granules are localized along the heart muscle ($\times 400$).
- Fig. 15.** Intestine of rainbow trout; the most intense reaction is seen the lamina propria, with the tunica intermuscularis and the submucosa following. The basement membrane adjacent to the mucous epithelium exhibits some activity ($\times 100$).
- Fig. 16.** Intestine of rainbow trout; part of Fig. 15 ($\times 400$).
- Fig. 17.** Intestine of carp; the large granules showing the enzyme activity are located in the epithelium ($\times 400$).
- Fig. 18.** Intestine of grass carp; the most active site is the epithelium followed by the tunica inteamuscularis and lamina propria ($\times 400$).

Plate I

Plate II