魚類のアミラーゼ, α -および β -グルコシダーゼ, β -ガラクトシダーゼの分布

永山文男・斎藤佑尚

(1968年7月10日受理)

Distribution of Amylase, α - and β -glucosidase, and
 β -galactosidase in Fish.

Fumio NAGAYAMA* and Yuji SAITO*

The activities of amylase, α - and β -glucosidase, and β -galactosidase in the tissues of carp, *Cyprinus carpio*, crucian carp, *Carassius carassius*, grass carp, *Ctenopharyngodon idellus*, rainbow trout, *Salmo gairdnerii*, silver carp, *Hypophthalmichthys molitrix*, tilapia, *Tilapia nilotica*, and yellowtail, *Seriola quinqueradiata*, were investigated to see the relation between the feeding habits and the distribution of the enzymes.

The species exhibiting the strongest amylase activity of the digestive tracts is crucian carp followed by grass carp, tilapia, carp, and silver carp. Very weak or negligible activities of amylase are found in the digestive tracts of rainbow trout, eel, and yellowtail. These results may support the concept that the amylase activity of the digestive tracts depends on the feeding habit of fish. The liver and spleen of the herbivorous and the omnivorous also show the strong amylase activities, while the carnivorous does not. The activities of α -glucosidase in the tissues of grass carp, the herbivorous, are much stronger than those of eel, the carnivorous. On the other hand, the apparent correlation between the feeding habits and the activities of β -glucosidase is not found even with the digestive tracts.

The activities of β -galactosidase in the digestive tracts are stronger in the herbivorous and the omnivorous (except the carp) than in the carnivorous. The liver, kidney, and spleen have also the high activities of β -galactosidase. The intracellular distribution of β -galactosidase in the tissues of fish were confirmed by the histochemical investigations.

魚類における炭水化物分解酵素の存在についてはすでにいくつかの報告があり、能勢¹⁾ および橋本ら²⁾ の総説にもみられるように、一般に消化酵素の活性は魚の食性と相関するものと考えられている。しかし、既往の研究において用いられた酵素活性の測定法は、それぞれの研究者によつて異なるため、それらの測定値を直接比較できない場合が多い。著者ら³⁾ はさきに魚類の β -グルコシダーゼの分布について報告したが、さらに、アミラーゼ, α -および β -グルコシダーゼ, β -ガラクトシダーゼの活性を、8種類の養殖魚について測定し、魚種間あるいは組織間の酵素分布の差異を比較した。

実験方法

試料 健康状態の良好と判定された下記8種の養殖魚を実験に供した。

コイ (35 cm, 815 g, ♂), フナ (17 cm, 170 g, ♀), ウナギ (45 cm, 150 g, 性別不明), 草魚 (20 cm, 150 g, 性別不明), ニジマス (30 cm, 450 g, ♀), レン魚 (18 cm, 100 g, 性別不明), テラピア・ニロチカ (14 cm, 100 g, ♂), ハマチ (40 cm, 1,100 g, ♀)。

酵素原液の調製 各組織を 0.1~3 g 秤取し, Potter-Elvehjem ホモジナイザーで冷蒸留水と共に完全

* 東京水産大学 (Tokyo University of Fisheries, Konan 4, Minato-ku, Tokyo, 108)

に摩砕し、氷冷保存した。なお消化管はあらかじめ注射器を用いて蒸留水で内部をよく洗浄した。

アミラーゼの測定 BERNFELD⁴⁾の方法に準じ、でん粉から遊離されるマルトースを比色定量した。すなわち、pH 6.9 の 0.02 M リン酸バッファーに溶解した 1 % でん粉溶液 0.5 ml に、同じバッファーで希釈した酵素液 0.5 ml を加え、37° で 5 分～60 分反応させる。これに発色剤 (3,5-ジニトロサリチル酸 1 g, 2N NaOH 20 ml, ロッシェル塩 30 g を水で 100 ml にしたもの) 1 ml を加え、沸騰浴で 5 分間加熱する。沈でんがあればろ過して除き、540 m μ の吸光度を読む。酵素活性は、組織 1 g 当り 1 分間に生成するマルトースの μ mole で表わした。

α -グルコシダーゼの測定 0.01 M の *p*-ニトロフェニル- α -D-グルコシドを基質とするほかは、反応液の組成および測定法とも β -ガラクトシダーゼの測定法に準じた。

β -グルコシダーゼの測定 0.01 M の *p*-ニトロフェニル- β -D-グルコシドを基質とし、 β -ガラクトシダーゼの測定法に準じた。

上記 2 種の酵素の活性は、いずれも組織 1 g 当り 1 分間に基質から分解されて生ずる *p*-ニトロフェノールの μ mole で表わした。

β -ガラクトシダーゼの測定 HESTRIN ら⁵⁾の方法に従った。すなわち、pH 4.5 の 0.07 M 酢酸バッファー 3.5 ml, 0.01 M *o*-ニトロフェニル- β -D-ガラクトシド 0.5 ml, 蒸留水で希釈した酵素液 1 ml を混合し 37° で 5 分～60 分反応させ 5 % トリクロル酢酸で反応を停止、蛋白を除き、ろ液 4 ml に 0.5 N NaOH に溶解した 0.5 M Na₂CO₃ 1 ml を加える。420 m μ の吸光度から遊離した *o*-ニトロフェノールの量を求める。酵素活性は、組織 1 g 当り 1 分間に生成する *o*-ニトロフェノールの μ mole で表わした。

β -ガラクトシダーゼの組織化学的検出 6-ブromo-2-ナフチル- β -D-ガラクトシドを基質とするアゾ色素染色法⁶⁾によつた。すなわち、組織の小片を 1 % CaCl₂ を含む 4 % フォルマリンで固定 (0°, 一夜) 後、さらに 1 % アラビアゴムを含む 0.88 M しょ糖液に浸漬 (0°, 一夜) する。10～15 μ の厚さの凍結切片を作り、pH 4.5 の 25 mg % 6-ブromo-2-ナフチル- β -D-ガラクトシド溶液中に 37° で 2～4 時間インキュベートする。切片を 0.006 N NaOH に溶解した 120 mg % のジアゾブルー B 溶液に移し染色する。酵素活性のある部分は、青色ないし紫紅色を呈する。

結果および考察

アミラーゼの分布 Table 1 に示した測定結果のうち、腸について比較すると、フナと草魚のアミラーゼ活性が最も強く、テラピア、コイ、レン魚のグループがそれに次ぎ、ニジマス、ウナギ、ハマチのグループの活性はかなり弱い。ここで腸のアミラーゼ活性によつて大別される 3 つのグループに属する魚の食性を見ると、フナの食性は品種による差が大きいといわれており、本実験の試料について品種の検討をしていな

Table 1. Distribution of amylase in fish tissues*.

Species	Liver	Kidney	Spleen	Heart	Intestine	Stomach	Pyloric coeca
Carp	380	30	146	15	138		
Crucian carp	249	1	78	3	394		
Eel	31	2	5	2	5	2	
Grass carp	167	6	118	4	332		
Rainbow trout	8	3	4	1	30	2	63
Silver carp	72	4	62	5	124		
Tilapia	562	13	48	18	172	121	
Yellowtail	2	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	1

* The activity is expressed in μ moles of maltose liberated from starch per minute per g of the moist tissue at pH 6.9, 37°.

Table 2. Distribution of α -glucosidase in fish tissues*.

Species	Liver	Kidney	Spleen	Heart	Intestine	Stomach
Eel	0.037	0.072	0.051		0.116	0.029
Grass carp	0.349	0.100	0.185	0.134	0.762	

* The activity is expressed in μ moles of *p*-nitrophenol liberated from *p*-nitrophenyl- α -D-glucoside per minute per g of the moist tissue at pH 4.5, 37°.

いが、概括的にそれぞれ、草食性 (的)、雑食性 (的)、および肉食性 (的) である。このことから、腸のアミラーゼ活性は魚の食性とかかなり密接な関連性を有するものと推論できる。また、北御門ら⁷⁾ がニジマス消化管のアミラーゼ活性がコイやアユより弱いウナギより強く、肉食性魚と雑食性魚の中間に位すると述べているように、本実験の結果でも、肉食性グループの中ではニジマスだけが比較的明瞭なアミラーゼ活性を示している。

肝臓および脾臓も顕著なアミラーゼ活性を有するが、肉食性グループの活性は、腸の場合と同様に、他のグループの魚にくらべてかなり弱い。一方草食性グループと雑食性グループの間には肝または肝脾臓アミラーゼ活性に関して明瞭な差が認められない。

ニジマスについて各臓器のアミラーゼ活性をくらべると、その強さは幽門垂>腸>肝臓>脾臓>胃>腎臓>心臓の順で、北御門ら⁷⁾ のニジマスについての観察結果および McGEACHIN ら⁸⁾ の bluegill, black bass についての観察結果と一致する。またフナ、草魚、レン魚でもほぼ同様な傾向が認められる。一方コイでは肝脾臓、テラピア、ウナギ、ハマチでは肝臓が最も強いアミラーゼ活性を示す。

α -グルコシダーゼの分布 この酵素は、アミラーゼの作用ででん粉から生ずるマルトースのような α -D-グルコシドを分解するものであるから、食性との間にアミラーゼと同様な相関性があることが予想される。そこで、肉食性のウナギと、草食性の草魚について活性を測定して Table 2 の結果を得た。

いずれの器官でもアミラーゼ活性についてみられたと同様に、草魚がウナギより遙かに強い酵素活性を示す。しかしウナギの腸の酵素活性をみると、アミラーゼの場合は草魚の 1/60 以下であるのにくらべ、 α -グルコシダーゼの活性はかなり強く、草魚の 1/7 程度の値を示している。これは、でん粉分解能の低いウナギでも、マルトースのような α -D-グルコシドはある程度分解できるということを意味するように思われるが、なお検討する必要がある。

β -グルコシダーゼの分布 北御門ら⁷⁾ はサリシンを基質として測定を試み、ニジマスに β -グルコシダーゼ活性の存在が不明であると述べているが、合成基質を用いた本実験の結果 Table 3 に示すように、あ

Table 3. Distribution of β -glucosidase in fish tissues*.

Species	Liver	Kidney	Spleen	Heart	Intestine	Stomach	Pyloric coeca
Carp	0.008	0.009	0.007	0.005	0.013		
Crucian carp	0.025	0.056	0.052	0.035	0.049		
Eel	0.064	0.078	0.020	0.033	0.111	0.034	
Grass carp	0.039	0.039	0.071	0.028	0.021		
Rainbow trout	0.021	0.018	0.012	0.007	0.009		
Silver carp	0.028	0.011	0.022	0.011	0.108		
Tilapia	0.030	0.007	0.004	0.007	0.041	0.012	
Yellowtail	0.038	0.076	0.054	0.074	0.035	0.029	0.033

* The activity is expressed in μ moles of *p*-nitrophenol liberated from *p*-nitrophenyl- β -D-glucoside per minute per g of the moist tissue at pH 4.5, 37°.

らゆる魚種に広く分布することが明らかである。

腸の酵素活性を比較すると、ウナギとレン魚が他の魚種よりも高い値を示し、食性との酵素の活性との間の関連性は全く認められない。ウナギはさらに肝臓と腎臓にも強い β -グルコシダーゼ活性を有し、またハマチでも心臓、腎臓、脾臓、肝臓などの酵素活性が強い。肉食性のウナギやハマチの臓器が比較的強い β -グルコシダーゼ活性をもっている理由は明らかでないが、これらの魚で種々の配糖体の代謝が活発に行な

Table 4. Distribution of β -galactosidase in fish tissue*.

Species	Liver	Kidney	Spleen	Heart	Intestine	Stomach	Pyloric coeca
Carp	0.168	0.879	0.380	0.113	0.146		
Crucian carp	0.457	1.52	1.06	0.207	0.647		
Eel	0.110	0.821	0.302	0.134	0.369	0.198	
Grass carp	1.05	1.54	0.622	0.118	1.15		
Rainbow trout	0.246	1.24	0.622	0.066	0.288	0.013	
Silver carp	1.12	1.34	1.38	0.141	1.88		
Tilapia	0.677	0.749	0.294	1.10	1.11	0.369	
Yellowtail	0.728	1.05	0.564	0.158	0.413	0.112	0.279

* The activity is expressed in μ moles of *o*-nitrophenol liberated from *o*-nitrophenyl- β -D-galactoside per minute per g of the moist tissue at pH 4.5, 37°.

Fig. 1. Localization of β -galactosidase in the digestive tracts of silver carp (A), grass (B), tilapia (C), and rainbow trout (D).

The tissue section was incubated with 25 mg% 6-bromo-2-naphthyl- β -D-galactoside solution, pH 4.5, for 2~4 hours at 37°. The section was washed and stained with 120 mg% Diazo Blue B solution in 0.006 N NaOH. The epithelia show intense reaction.

Fig. 2. Localization of β -galactosidase in the kidney of eel (E) and grass carp (F), and in the liver of carp (G) and tilapia (H).

The enzyme activities are found in the interstitial tissue as well as in the tubules of kidney. In the liver, the enzyme reaction distributes along the sinusoid.

われることが推定される。

β -ガラクトシダーゼの分布 魚類におけるこの酵素の分布については研究例がほとんどないが、Table 4に示すように、すべての魚に広く分布することが明らかである。腸の酵素活性を比較するとレン魚>草魚>テラピア>フナ>ハマチ>ウナギ>ニジマス>コイの順であり、コイを除く草食または雑食性の魚が、肉食性のものよりやや強い酵素活性を示している。しかし、レン魚とテラピア以外の魚では腎臓の酵素活性が臓器中で最も強く、また肝臓、脾臓などにも著しい活性がみられる。このような傾向は、 β -グルクロニダーゼ³⁾についても認められたことである。したがって β -ガラクトシダーゼは、消化管内での食物の消化のほかに、 β -グルクロニダーゼや前述の β -グルコシダーゼなどとともに、腎臓、肝臓あるいは脾臓などにおいて、各種配糖体の代謝に重要な役割を演ずるものと思われる。

β -ガラクトシダーゼの組織内分布をみると、腸と腎臓については β -グルクロニダーゼ³⁾ の場合と極めて類似している。すなわち、腸では Fig. 1, A~D に示すように粘膜上皮に強い活性が認められる。腎臓では Fig. 2, E, F のように尿細管を形成する細胞の細胞質中に著しい活性があり、また間質中にも酵素活性を示す顆粒の散在が認められる。一方、肝臓では Fig. 2, G, H のように、 β -ガラクトシダーゼ活性が放射網状に分布しており、sinusoid に沿っていることが明らかである。

要 約

1. 腸のアミラーゼ活性は明らかに魚の食性と関連し、草食性の魚が最も強く、雑食性魚がこれに次ぎ、肉食性の魚の活性は極めて弱い。
2. α -グルコシダーゼの活性も草食性の方が強いが、肉食性の魚の腸もかなりの活性をもつ。

3. β -グルコシダーゼは広く魚の組織中に分布するが食性と活性との間に相関性が認められない。
4. 腸の β -ガラクトシダーゼ活性はコイを除き草食性または雑食性の魚で強く、肉食性のものでは弱い。またいずれの魚でも、腎臓、肝臓、脾臓などに強い β -ガラクトシダーゼ活性がある。

終りに、試料魚の入手にご協力頂いた埼玉水試土屋、大渡両技師、神奈川水試井上技師、東水大魚類学講座藤田氏の各位に感謝の意を表する。

文 献

- 1) 能勢健嗣: 本誌, **28**, 1033~1042 (1962).
- 2) 橋本芳郎・岡市友利: 水産研究叢書, **9-1**, 68 pp., 日本水産資源保護協会 1965.
- 3) 永山文男・斎藤佑尚・林 昌郎: 本誌, **33**, 1132~1138 (1967).
- 4) P. BERNFELD: in "Methods in Enzymology" (S. COLWICK and N. O. KAPLAN, ed.) Vol. 1, 149~158, Academic Press, New York, 1955.
- 5) S. HESTRIN, D. S. FEINGOLD, and M. SCHRAMM: *ibid.*, 231~257.
- 6) M. S. BURSTONE: Enzyme Histochemistry, 621 pp., Academic Press, New York, 1962.
- 7) 北御門 学・立野新光: 本誌, **26**, 679~684 (1960).
- 8) R. L. MCGEACHIN and J. W. DEBNAM, Jr.: *Proceedings of Soc. Exp. Biol. Med.*, **103**, 814~815 (1960).