ニジマス、カツオ、およびアワビの β -グルクロニダーゼの特性

永山文男・林 昌郎

(1968年8月31日受理)

Properties of β -Glucuronidase of Rainbow Trout, Skipjack, and Abalone

Fumio NAGAYAMA* and Masaro HAYASHI**

As reported previously⁴⁾, β -glucuronidase is distributed widely in the fish tissues such as liver and kidney. In this paper, the properties of β -glucuronidase prepared from the liver of rainbow trout, skipjack and abalone were compared with that of the bovine liver enzyme.

1. The optimum pH of the fish enzyme is 4.5 which is not much different from the value for the mammalian enzyme, while the abalone enzyme exhibits its maximum activity at pH 3.6 (Fig. 3).

2. There is no extreme difference among the K_m values of phenolphthalein- β -D-glucosiduronic acid and *p*-nitrophenyl- β -D-glucosiduronic acid for the enzymes from different sources (Table 2).

3. Arrhenius plot shows a downward bend at 30~40° (Fig. 6). The activation energy is 18,000~20,000 cal./mole below the transition temperature for all enzymes, but the values above that temperature vary with the enzymes from different sources (Table 3).

4. The thermostability of the enzyme seems to be independent of the body temperature of animals from which the enzyme was prepared (Fig. 7).

5. The fish enzyme is inhibited competitively by glucaro-1,4-lactone and noncompetitively by metal ions as seen with the mammalian enzyme (Figs. 9 and 11). The inhibition by metal ions is completely reversed by the addition of cysteine (Table 8). In general, there is no great difference among the K_i values of various inhibitors for the enzyme prepared from different sources (Tables 5 and 7).

6. The enzyme of rainbow trout is inhibited by DNA as well as by heparin (Table 9).

哺乳動物, ある種の軟体動物および微生物から得られた β -グルクロニダーゼの特性については, FISHMAN¹⁾あるいは LEVY²⁾の総説にみられるように詳細な知識が得られている。一方 β -グルクロニダーゼの生理的意義についての解釈は未だに確立されておらず, いろいろな推測がなされている^{1~3)}。

すでに著者ら⁴⁾が報告したように, β -グルクロニダーゼは魚類組織に広く分布し, 特に腎臓, 肝臓および脾臓に極めて高い活性がみられる。また, 淡水魚の肝臓の酵素が, 魚の海水適応に伴って増加し, 腎臓の酵素が同じ過程で減少することが観察された⁵⁾。このようなことから, 魚類における β -グルクロニダーゼのもつ意義を追究することは興味あることであるが, 魚類の酵素の特性に関しては全く知られていないので, ニジマス, カツオおよびアワビのグルクロニダーゼの特性を明らかにし, ウシの酵素の特性と比較した。

実 験

試料 ニジマス肝臓は長野県水産指導所 (明科), カツオ肝臓は東京水産大学沼津実習場, アワビ内臓

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

** 現在持田製薬株式会社研究所勤務 (Mochida Pharmaceutical Co., Ltd., Research Laboratory, Kamiya 1, Kita-ku, Tokyo)

は千葉県水産試験場(館山), ウシ肝臓は東京都芝浦屠場でそれぞれ採集し, 凍結保存した。

測定法 (1) フェノールフタレン・グルクロン酸を基質とする場合。原則として 5 mM 基質溶液 0.1 ml, 0.07 M 酢酸バッファー 0.4 ml に酵素液 0.5 ml を加え, 37° で 10 分反応させる。5% トリクロル酢酸 1 ml を加え反応を停止し, アルカリグリシン溶液 2.5 ml と蒸溜水 1.5 ml を加え pH 10.2~10.4 にする。540 m μ の吸光から遊離したフェノールフタレン量を求める。

(2) *p*-ニトロフェニール・グルクロン酸を基質とする場合。基質溶液 0.1 ml, 0.07 M 酢酸バッファー 0.4 ml に, 酵素液 0.5 ml を加え 37° で 10 分反応させる。0.125 M 炭酸ナトリウム溶液 4 ml を加え 400 m μ の吸光値を読み, 遊離した *p*-ニトロフェノール量を求める。

いずれの基質を用いても, 少なくとも 30 分までは反応量が反応時間と直線関係を示す (Fig. 1) ことから, 10 分間反応した時の測定値を反応の初速度として差支えないと判定した。

酵素精製法 肝臓 500 g を pH 4.5 の酢酸バッ

Fig. 1. Progress curves of trout β -glucuronidase at pH 4.5 and 37°.

●, 5×10^{-4} M phenolphthalein- β -D-glucosiduronic acid;
○, 10^{-3} M *p*-nitrophenyl- β -D-glucosiduronic acid.

Table 1. Purification of liver β -glucuronidase.

Five hundred grams of the tissue was extracted with 800 ml of 0.07 M acetate buffer, pH 4.5. The extracts was brought to 0.6 saturation by addition of solid ammonium sulfate. The precipitate was extracted with 300 ml of acetate buffer, and the solution was brought to 0.55 saturation with saturated ammonium sulfate solution, pH 8.7. The precipitate was reextracted with buffer solution, and fractionation with ammonium sulfate was repeated. The fraction between 0.35 and 0.5 saturation was collected, dissolved in the buffer, and purified by gel filtration through a Sephadex G-50 column.

Purification step	Specific activity*			
	Rainbow trout liver	Skipjack liver	Abalone viscera	Bovine liver
Extraction	0.008	0.010	0.011	0.006
1st ppt.(0.6 sat.)	0.118	0.095	0.105	0.044
2nd ppt. (0.55 sat.)	0.464	0.194	0.233	0.158
3rd ppt. (0.35~0.5 sat.)	0.425	0.198	0.243	0.187
Gel filtration	1.890	1.840	1.670**	1.050***
Yield from 500 g	20 mg	16 mg	51 mg	19 mg
Recovery from extracts	7.6%	4.0%	8.6%	3.9%

* Micro moles of phenolphthalein liberated from phenolphthalein- β -D-glucosiduronic acid per minute per mg of protein at pH 4.5 and 37°.

** Assayed at pH 3.6.

*** Assayed at pH 5.0.

ファー 500 ml とホモジナイズし、37° で3時間自己消化させる。遠心分離し、沈澱をバッファー 300 ml で再抽出し、合した抽出液に固形硫酸を加え (0.6 飽和) 一夜冷蔵庫に静置する。沈澱を集め酢酸バッファーで抽出し、pH 8.7 の飽和硫酸溶液で 0.55 飽和にする。生じた沈澱を集め酢酸バッファーにとかす。この溶液に再び飽和硫酸液を加え、0.35~0.5 飽和沈澱区分を集め、25 ml の酢酸バッファーにとかす。酢酸バッファーで膨潤させた Sephadex G-50 のカラムで上記酵素液をゲルろ過し、 β -グルクロニダーゼ活性のある画分を集める。それぞれの肝臓から、Table 1 に示すように、約 150~240 倍に精製された酵素標品を得た。

でんぶんゲル電気泳動 ANSTISS⁶⁾ が血清の β -グルクロニダーゼの泳動を行なった方法に準じた。すなわち、pH 4.5 の 0.05 M 酢酸バッファーで調製したでんぶんゲルに試料をつけ、0.1 M の同じバッファーで、20 mA の定電流下 18 時間泳動させ、0.25 mM フェノールフタレン・グルクロン酸溶液に浸したろ紙を密着し 37° で 2~3 時間インキュベーターとした後、アルカリグリシン溶液 (pH 10.2) を噴霧する。

結果および考察

でんぶんゲル泳動 Fig. 2 に示すように、ニジマス、カツオおよびウシの肝臓から調製した酵素は、ゲル泳動で単一のスポットを与えたが、アワビの酵素は上記3種の酵素と同じ移動度をもつ主成分のほかに、移動度の大きいアイソザイムの存在を示した。このアイソザイムは量的には僅かであるが、以後の観察において多少の誤差をもたらすものと思われる。

Fig. 2. Starch gel electrophoresis of β -glucuronidase.

1, bovine enzyme; 2, skipjack enzyme; 3, abalone enzyme; 4, trout enzyme.

The electrophoresis was carried out in 0.1 M acetate buffer, pH 4.5, for 18 hours under a constant current, 20 mA.

Fig. 3. Effect of pH on β -glucuronidase activity at 37°.

—, trout enzyme; ---, skipjack enzyme; ·····, abalone enzyme; - · - ·, bovine enzyme.

pH の影響 種々の pH における酵素反応を測定し Fig. 3 の結果を得た。ニジマスとカツオはいずれも pH 4.5, ウシは pH 5.0 にそれぞれ明瞭な活性のピークを示す。一般に哺乳動物の β -グルコニダーゼについて報告されている至適 pH は 4.5~5.2 の範囲にあり²⁾, ニジマスとカツオの酵素も陸上哺乳動物の酵素とほとんど同様の至適 pH を示すことは興味あることである。一方アワビの酵素では, pH 3.6 付近の明瞭な活性のピークのほかに, pH 4.5 付近に不明瞭ながら“肩”が認められる。この“肩”は電気泳動で認められた混在するアイソザイム作用を示すものと推定される。海産腹足類であるカサガイの β -グルコニダーゼの至適 pH は 3.8 といわれ⁷⁾, アワビから得た酵素標品の主成分と推定されるものの至適 pH とほぼ一致する値である。また陸産の腹足類であるカタツムリの消化管の酵素は至適 pH 4.4~4.8 と報告されており⁸⁾, これがアワビの酵素標品に混在するアイソザイムの至適 pH に類似するのではないかと思われるが, さらに検討する必要がある。

フェノールフタレン・グルクロン酸の K_m それぞれの酵素の至適 pH における基質濃度と反応速度との関係を見ると, ウシの酵素は, 3.3×10^{-4} M 以上の基質濃度で明らかな基質阻害を受けるが, ニジマス, カツオ, およびアワビの酵素はいずれも基質濃度を 10^{-3} M にしても阻害されない。Fig. 4 の LINEWEAVER-BURK の plot から K_m を求めると¹⁶⁾, Table 2 に示すように, いずれの酵素も至適 pH におけるフェノールフタレン・グルクロン酸の K_m は $1.43 \sim 2.86 \times 10^{-4}$ M で, マウス肝臓 (1.3×10^{-4} M)⁹⁾, コウソウ肝臓 (1.43×10^{-4} M)¹⁰⁾, ウシ動脈 (1.4×10^{-4} M)¹¹⁾ などの報告例とほぼ同じ値であり, 動物の種類による明瞭な

Fig. 4. LINEWEAVER-BURK plot of β -glucuronidase with phenolphthalein- β -D-glucosiduronic acid at optimum pH and 37°.

A, trout enzyme, pH 4.5; B, skipjack enzyme, pH 4.5; C, abalone enzyme, pH 3.6; D, bovine enzyme, pH 5.0.

Fig. 5. LINEWEAVER-BURK plot of β -glucuronidase with *p*-nitrophenyl- β -D-glucosiduronic acid at optimum pH and 37°.

A, trout enzyme; B, skipjack enzyme; C, abalone enzyme; D, bovine enzyme.

Table 2. Michaelis constants of phenolphthalein- β -D-glucosiduronic acid and *p*-nitrophenyl- β -D-glucosiduronic acid for β -glucuronidase from different sources at 37°.

Source of enzyme	pH	<i>K_m</i> , M	
		Phenolphthalein- β -D-glucosiduronic acid	<i>p</i> -Nitrophenyl- β -D-glucosiduronic acid***
Rainbow trout liver	4.5*	1.43×10^{-4}	3.33×10^{-4}
	6.8*	10^{-3}	
	7.0**	2.30×10^{-3}	
Skipjack liver	4.5**	1.43×10^{-4}	1.25×10^{-4}
	6.8*	4.16×10^{-4}	
	7.0**	5.00×10^{-3}	
Abalone viscera	3.6*	2.10×10^{-4}	1.11×10^{-4}
	6.8*	3.70×10^{-4}	
	7.0**	10^{-3}	
Bovine liver	5.0*	2.86×10^{-4}	2.50×10^{-4}
	6.8*	9.10×10^{-3}	
	7.0**	10^{-2}	

* 0.07 M acetate buffer.

** 0.1 M phosphate buffer.

*** This substrate was used in this investigation only, and all other data presented in this paper were obtained with phenolphthalein- β -D-glucosiduronic acid.

差は認められない。また、生理的条件に近い pH 6.8 における *K_m* は、いずれの酵素についても大きな値となり $0.37 \sim 1 \times 10^{-3}$ M であった。以上の観察で用いた酢酸バッファの代りに pH 7.0 のリン酸バッファを用いると *K_m* はさらに大きくなり $10^{-3} \sim 10^{-2}$ M という値が得られた。カタツムリの β -グルコニダーゼがリン酸バッファで阻害を受けることが知られているが¹²⁾、本実験の結果から、リン酸バッファが β -グルコニダーゼに対して基質との親和性を低下させる作用をもつことが明らかである。

p*-ニトロフェニール・グルクロン酸の *K_m この基質に対してはいずれの酵素でも 10^{-3} M までの範囲で全く基質阻害が認められない。至適 pH における *K_m* を Fig. 5 の plot から求め Table 2 の右欄に示すように $1.11 \sim 3.33 \times 10^{-4}$ M の値を得た。これはラットおよびウシの肝臓グルコニダーゼについて報告されている値 (1.2×10^{-4} M)^{13,14)} とほぼ近い値であり、動物の種類による顕著な差を認め難い。またフェノールフタレン・グルクロン酸の *K_m* ともあまり相違しない。

活性化エネルギー 反応の絶対温度の逆数に対して各酵素の至適 pH における反応の初速度の対数をとった ARRHENIUS plot を Fig. 6 に示す。いずれの酵素についても、30~40° の間で相関線の曲折が認められる。この plot から活性化エネルギー¹⁶⁾を求めると、曲折する点 (transition temperature) より低い温度ではいずれの酵素も 18,000 cal./mole~20,000 cal./mole で、ウシの脾臓酵素について報告されている値¹⁵⁾とはほぼ一致する。transition temperature より高い温度では活性化エネルギーが小さくなり、特にカツオとニジマスの酵素でその変化が著しい (Table 3)。

このように相関線が曲折する理由についてはいくつかの推論がなされている¹⁶⁾が、酵素蛋白の構造、活性中心の性質、酵素と基質の複合体の性質、反応段階の数や種類などの因子が複雑に組み合わせられて起こるものであり単純な解釈はできない。

著者らは当初、transition temperature が動物の体温あるいは環境温度と関係があるのではないかと想像したが、ウシの 37.5° に対しカツオの 36°、冷水性魚であるニジマスでも 31° という値で、さらにアワビでは 40° という高温に transition が観察された。このことから、動物の生理的温度と transition

temperature との間に直接の関係は認められない。

なお各酵素の Q_{10} を求めると Table 4 の値を得た。いずれも $20^{\circ}\sim 30^{\circ}$ の Q_{10} が最も大きく $3.0\sim 3.4$ となる。

熱による失活 酵素溶液を 55° に加熱しその活性を変化をみると Fig. 7 の左の図のようになる。ニジマスとウシの酵素活性は 10 分で、それぞれ元の活性の 30%, 40% となるが、カツオとアワビの酵素は 2 時間加熱してもその失活は 10% 以下である。加熱温度を 65° にすると、Fig. 7 の右の図にみられるように、カツオの酵素活性は 10 分で元の 50% に減少するが、アワビの酵素活性は 1 時間後も元の活性の 30% を保っている。

タラの酵素は、温血動物の酵素と余り変わらない耐熱性をもつ¹⁷⁾といわれるが、本実験の結果では、むしろカツオやアワビのような水産動物の酵素が、ウシの酵素よりも耐熱性において優れているといえることができる。実際に、マグロ類では体の中心部の温度が、環境水の温度より 10° 以上も高い 32.4° に達することが観察されており¹⁸⁾、水産動物の個々の酵素は、通常その動物にとって lethal temperature と考えられるような $30^{\circ}\sim 40^{\circ}$ 程度の温度により何ら決定的な影響を受けるものでないと考えられる。

グルカロラクトンとグルクロン酸による阻害

ニジマスの肝臓 β -グルクロニダーゼに対するグルカロラクトンとグルクロン酸の影響をみると、Fig. 8 に示すようなものである。すなわち、ニジマスの酵素は 5×10^{-6} M のグルカロラクトンおよび 10^{-1} M グルクロン酸により完全に阻害される（グルクロノラクトンは 5×10^{-2} M でも全く阻害作用がない）。Fig. 9 にあげた例にもみられるように、LINEWEAVER-BURK の plot に対するこれら化合物の影響をみると、いずれの酵素に関しても拮抗型の阻害を示している。この plot から Table 5 に示すような酵素-阻害剤複合体の見掛けの解離定数 K_i が求められる¹⁶⁾。グルカロラクトンの K_i は $3.38\sim 5.19\times 10^{-7}$ M で、マウス肝臓の β -グルクロニダーゼについて報告されている値⁹⁾ (5.4×10^{-7} M) とほぼ一致し、動物種間の差は認められない。このことから水産動物の β -グルクロニダーゼも、哺乳動物の酵素と同様に¹⁻³⁾、グルカロラク

Fig. 6. ARRHENIUS plot of β -glucuronidase at optimum pH.

A, trout enzyme; B, skipjack enzyme; C, abalone enzyme; D, bovine enzyme.

Table 3. Activation energy of β -glucuronidase.

Source of enzyme	pH	Range of temperature, $^{\circ}\text{C}$	Activation energy, cal./mole
Rainbow trout liver	4.5	10~31	18,400
		31~45	4,350
Skipjack liver	4.5	10~36	19,300
		36~50	2,740
Abalone viscera	3.6	10~40	18,500
		40~50	11,500
Bovine liver	5.0	10~37.5	20,200
		37.5~50	8,200

Table 4. Q_{10} of β -glucuronidase.

Temperature °C	Rainbow trout liver (pH 4.5)	Skipjack liver (pH 4.5)	Abalone viscera (pH 3.6)	Bovine liver (pH 5.0)
10~20	2.5	3.0	2.6	3.0
15~25	2.5	3.0	2.6	3.2
20~30	3.0	3.1	3.0	3.4
25~35	2.0	2.7	2.7	3.1
30~40	1.3	2.0	2.5	2.5
35~45	1.3	1.4	2.1	1.8
40~50	1.6	1.2	1.8	1.5

Fig. 7. Inactivation of β -glucuronidase by heat.

The activities of the enzyme pre-incubated at 55° or 65° were measured at 37°.

A, trout enzyme; B, skipjack enzyme; C, abalone enzyme; D, bovine enzyme.

Fig. 8. Inhibitory effects of glucaro-1,4-lactone and glucuronic acid on the liver β -glucuronidase of rainbow trout at pH 4.5 and 37°.

GL, glucaro-1,4-lactone; GA, glucuronic acid.

トンにより特異的な拮抗阻害を受けることが明らかである。一方、グルクロン酸の K_i はグルカロラク トンの K_i よりも 10^4 ほど大きい水産動物の酵素 についての値がウシの酵素についての値よりかなり 小さい。換言するならば、水産動物の酵素は、哺乳 動物の酵素よりややグルクロン酸による阻害を受け 易いように思われるが、各酵素の測定時の pH が異 なるので、さらに検討する必要がある。

金属イオンによる阻害 Table 6 に示すように ニジマスの酵素は、 Hg^{2+} , Ag^+ , Cu^{2+} によつて著 しく阻害されるが、 Pb^{2+} , Zn^{2+} では余り影響され ない。阻害作用の強い3種のイオンの濃度と阻害度

Fig. 9. Effects of glucaro-1,4-lactone and glucuronic acid on the LINEWEAVER-BURK plot of liver β -glucuronidase of rainbow trout at pH 4.5 and 37°.

GL, 2×10^{-7} M glucaro-1,4-lactone; GA, 2×10^{-8} M glucuronic acid.

Table 5. Inhibitor constants of glucaro-1,4-lactone and glucuronic acid for β -glucuronidase from different sources.

Source of enzyme	pH	K_i , M	
		Glucaro-1,4-lactone	Glucuronic acid
Rainbow trout liver	4.5	3.38×10^{-7}	2.00×10^{-8}
Skipjack liver	4.5	4.94×10^{-7}	2.01×10^{-8}
Ahalone viscera	3.6	5.19×10^{-7}	9.48×10^{-4}
Bovine liver	5.0	4.14×10^{-7}	9.75×10^{-8}

Table 6. Effects of metal ions on liver β -glucuronidase of rainbow trout at pH 4.5 and 37°.

Metal ion	Compound tested	Final concentration, M	Enzyme activity, %
Hg ²⁺	Hg(CH ₃ COO) ₂	10 ⁻⁵	41.5
Ag ⁺	AgNO ₃	1.5×10^{-4}	45.0
Cu ²⁺	CuSO ₄	3.5×10^{-3}	50.0
Pb ²⁺	Pb(CH ₃ COO) ₂	2×10^{-4}	98.8
		2×10^{-3}	96.5
		10 ⁻²	91.3
		2×10^{-3}	96.5
Zn ²⁺	ZnSO ₄	10 ⁻²	88.7
None	—	—	100

Fig. 10. Inhibitory effects of metal ions on the liver β -glucuronidase of rainbow trout at pH 4.5 and 37°.

Hg, Hg(CH₃COO)₂; Ag, AgNO₃; Cu, CuSO₄.

Fig. 11. Effects of metal ions on the LINEWEAVER-BURK plot of liver β -glucuronidase of rainbow trout at pH 4.5 and 37°.

Hg, 8.13×10^{-8} M Hg (CH₃COO)₂; Ag, 1.06×10^{-4} M AgNO₃; Cu, 2×10^{-3} M CuSO₄.

Table 7. Inhibition constants of metal ions for β -glucuronidase from different sources.

Source of enzyme	pH	K_i , M		
		Hg ²⁺	Ag ⁺	Cu ²⁺
Rainbow trout liver	4.5	7.07×10^{-6}	1.55×10^{-4}	10^{-2}
Skipjack liver	4.5	8.41×10^{-6}	1.48×10^{-4}	0.94×10^{-2}
Abalone viscera	3.6	2.07×10^{-6}	5.65×10^{-5}	—*
Bovine liver	5.0	3.56×10^{-6}	3.14×10^{-4}	1.07×10^{-2}

* No inhibition was demonstrated with 2×10^{-3} M CuSO₄.

Table 8. Effects of cysteine and EDTA on the liver β -glucuronidase of rainbow trout inhibited by metal ions.

Cysteine or EDTA was added to the enzyme solution which had been mixed with a metal ion, and the enzyme activity was assayed at pH 4.5 and 37°.

Compound added	Final concentration, M	Enzyme activity, %		
		None	Hg ²⁺ *	Ag ⁺ **
None	—	100	44	20
Cysteine	2×10^{-4}	100	97	99
	2×10^{-3}	100	96	100
EDTA	2×10^{-5}	100	44	
	4×10^{-4}	100	43	21
	4×10^{-3}	100		21

* 10^{-5} M Hg(CH₃COO)₂. ** 4×10^{-4} M AgNO₃.

の関係は Fig. 10 のようなもので、いままでに魚以外の動物あるいは微生物の酵素について報告されていると同様に²⁾ Hg²⁺ の阻害作用が最も大きい。これら金属イオンが LINEWEAVER-BURK の plot に対して与える影響は、Fig. 11 の例からも明らかに、非拮抗型の阻害を示している。これから求められるそれぞれの酵素に対する K_i は Table 7 に示すようなものである。アワビの酵素で 2×10^{-3} M の Cu²⁺ で全く阻害が認められなかつた。このことはカサガイ⁷⁾ の酵素についても報告されているが、軟体類の体内にはヘモシアニンなどの Cu 化合物が含まれていることと関係があるのではないかと考えられる。

Hg²⁺ および Ag⁺ によるカサガイの酵素の阻害はシステニンにより回復される⁷⁾ と報告されているが、ニジマスの酵素も同様の傾向を示した。(Table 8)。一方 EDTA には、全く回復効果がなかつた。

高分子化合物の影響 アルブミンは β -グルクロニダーゼに対する安定作用²⁾、DNA は賦活作用¹⁾

Table 9. Effects of albumin, DNA, and heparin on the liver β -glucuronidase of rainbow trout at pH 4.5 and 37°.

Compound added	Final concentration, %	Enzyme activity, %
None	—	100
Albumin*	0.0004	102
	0.004	103
	0.04	102
DNA**	0.0004	54
	0.004	54
	0.04	51
Heparin***	0.0004	61
	0.004	58
	0.04	55

* Bovine serum albumin purchased from Sigma Chemical Co.

** Prepared from the milt of skipjack, purity 99%.

*** Purchased from Sigma Chemical Co.

をもつと考えられている。ニジマスの酵素についての実験では、アルブミンの酵素安定効果が僅かに認められる一方、DNA の著しい阻害効果が観察された (Table 9)。すなわち、通常、 β -グルクロニダーゼの測定時に賦活剤として加えられる DNA の濃度 (0.028%)¹⁹⁾ より遙かに低い濃度 (0.0004%) でも 50% 近い阻害がみられ、0.04% の高濃度の場合の阻害度と余り差がない。SMITH ら²¹⁾ はウシの肝臓の β -グルクロニダーゼに対する DNA の阻害作用は pH 4.2 以下の酸性側であられ、アルカリ側では逆に賦活作用を示す報告をしている。しかし、本実験は pH 4.5 で行なつたものであり、観察された阻害作用が、ニジマス (あるいは魚類) の酵素とウシの酵素との間の特性の違いによるか否かについては明らかでないので、さらに検討を要する。

ヘパリンはウシ²⁰⁾ およびラット¹⁰⁾ の β -グルクロニダーゼを阻害し、その最高度は 50% と報告されているが、ニジマスの酵素も同様な阻害を受けることが認められた。

これら高分子化合物の阻害作用については、さきに報告した胆汁や血清中にみられる非透析性阻害物質²²⁾ の性質とあわせ、あらためて検討したい。

その他 ニジマスの酵素に対するモノヨード酢酸の阻害作用はかなり弱く、その阻害度は 2×10^{-4} M で 0%, 2×10^{-3} M で 8%, 10^{-2} M で 14% であつた。この値は Pb^{2+} や Zn^{2+} についてみられた値 (Table 6) とほぼ同じである。

また、ニジマスの酵素は、細菌の酵素について報告されているようなクロロホルムによる賦活作用²³⁾ を受けない。

要 約

ニジマス、カツオおよびアワビの肝臓から β -グルクロニダーゼを抽出精製し、それらの特性をウシの肝臓酵素の特性と比較した。

1. ウシの酵素の至適 pH 5.0 に対し、ニジマスとカツオの酵素は pH 4.5、アワビの酵素は pH 3.6 で最も強い活性を示す。

2. フェノールフタレン・グルクロン酸と *p*-ニトロフェニール・グルクロン酸の *K_m* はいずれも $1 \sim 3 \times 10^{-4}$ M であり、特に動物による明瞭な差がない。

3. ARRHENIUS plot は $30 \sim 40^\circ$ の間で折れ曲る curve を示し、いずれの酵素も、その温度以下での活性化エネルギーは約 20,000 cal./mole であるが、それより高い温度では活性化エネルギーが小さい。

4. 酵素の耐熱性は動物の体温と全く関係がなく、カツオとアワビの酵素がむしろウシの酵素より耐熱性が高い。

5. グルカラクトンは水産動物の β -グルクロニダーゼに対しても拮抗型の特異的阻害剤である。また Hg^{2+} と Ag^+ も強い阻害剤であるが、アワビの酵素は他の酵素と異なり Cu^{2+} によつて阻害されない。 Hg^{2+} と Ag^+ による阻害はシステインの添加により完全に回復する。

6. DNA はヘパリンと同様にニジマスの β -グルクロニダーゼを阻害する。

終りに、ニジマスの肝臓入手に便宜を与えられた長野県水産指導所小宮山所長、アワビの提供をいただいた千葉県水産試験場高柳技師に感謝の意を表する。なお本研究の一部は、昭和 42 年度文部省科学研究費によつた。

文 献

- 1) W. H. FISHMAN: in "Advances in Enzymology" (F. F. NORD, ed.), Vol. 16, 361~409, Interscience Publishers, New York, 1955.
- 2) G. A. LEVY and J. CONCHIE: in "Glucuronic Acid" (G. J. DUTTON, ed.) 301~364, Academic Press, New York, 1966.
- 3) W. H. FISHMAN: in "Methods of Biochemical Analysis" (D. GLICK, ed.) Vol. 15, 77~145,

Interscience Publishers, New York, 1967.

- 4) 永山文男・斎藤佑尚・林 昌郎: 本誌, **33**, 1132~1138 (1967).
- 5) 永山文男・山田泰蔵・田内 大: 本誌, **34**, 950~954 (1968).
- 6) C. L. ANSTISS: The 7th International Congress of Biochemistry, Tokyo, 1967, Abstracts, **V**, 1948.
- 7) G. A. LEVY, A. T. HAY, and C. A. MARSH: *Biochem. J.*, **65**, 203~208 (1957).
- 8) P. JARRIGE and R. HENRY: *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **34**, 872~885 (1952).
- 9) G. A. LEVY: *Biochem. J.*, **52**, 464~472 (1952).
- 10) P. G. WALKER and G. A. LEVY: *ibid.*, **54**, 56~65 (1953).
- 11) E. BUDDECKE and O. HOEFLE: *Hoppe-Seyler's Zeit. Physiol. Chem.*, **347**, 173~191 (1966).
- 12) R. I. COX: *Biochem. J.*, **71**, 763~768 (1959).
- 13) W. H. FISHMAN, S. S. GOLDMAN, and S. GREEN: *J. Histochem. Cytochem.*, **12**, 239~251 (1964).
- 14) W. H. FISHMAN, Y. NAKAJIMA, C. ANSTISS, and S. GREEN: *ibid.*, **12**, 298~305 (1964).
- 15) G. T. MILLS, J. PAUL, and E. E. B. SMITH: *Biochem. J.*, **53**, 232~253 (1953).
- 16) M. DIXON and E. C. WEBB: *Enzymes*, 2nd Edition, 950 pp. Longmans, London, 1966.
- 17) G. SIEBERT, A. SCHMITT, R. V. MALORTIE, and E. ADLOFF: *Experimentia*, **16**, 491~492 (1960).
- 18) F. G. CAREY and J. M. TEAL: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **56**, 1464~1469 (1966).
- 19) W. H. FISHMAN and P. BERNFELD: in "Methods in Enzymology" (S. COLWICK and N. O. KAPLAN, ed.) Vol. 1, 262~269, Academic Press, New York, 1955.
- 20) B. BECKER and J. S. FRIEDENWALD: *Arch. Biochem. Biophys.*, **22**, 101~107 (1949).
- 21) E. E. B. SMITH and G. T. MILLS: *Biochem. J.*, **54**, 164~171 (1953).
- 22) 永山文男・林 昌郎・坂本勝男: 本誌, **33**, 1139~1142 (1967).
- 23) ANON.: Sigma Chemical Co., Urgent Bulletin (Bacterial β -Glucuronidase), 1966.