魚類におけるジアミンオキシダーゼ様酵素について

松 宮 政 弘・大 竹 茂 夫

(1981 年 6 月 12 日受理)

The Investigation of Diamine Oxidase-like Enzymes
in the Various Organs of Fishes

Masahiro MATSUMIYA* and Shigeo OTAKE*

We studied the activities of diamine oxidase-like enzyme (s) in the liver, stomach, pyloric caeca, and intestine of six species of marine fishes. In the intestines of these fishes, the highest activities were detected. The enzyme activities were also measured in three other organs of *Scombridae* fish and of *Clupeidae* sardines.

Extract from the liver of mackerel was fractionated by DEAE-cellulose column chromatography, three active fractions were obtained. The diamine oxidase-like enzyme activities were found in all these fractions, with optimal pH values at 7.0, 7.0, and 6.4. The enzymes showed high activities on histamine and agmatine, but were inhibited by semicarbazide and aminoguanidine, which is a special inhibitor of the diamine oxidase. Thus, the enzymes from the liver of mackerel may belong to the diamine oxidase group.

ジアミンオキシダーゼ (E. C. 1. 4. 3. 6) (以下 DAO と略す) は主としてモノアミン、ジアミンの酸化的脱アミノ反応を触媒する酵素であるが、ヒスタミンもこの酵素によって脱アミノされる。哺乳動物の腎臓、小腸、肝臓、肺などに多く存在し、植物、細菌などにも存在することが知られている。

魚類における DAO に関する知見は少なく、若干の魚種にその存在が認められたという段階である。すなわち、ウナギにおいて腸のみに DAO 活性が認められ、¹⁾ 数種の硬骨魚の腸にも存在することが報告されている。²⁾ また、コイおよびニジマスの脳に本酵素活性が認められ、³⁾ 両棲類、鳥類および哺乳類と共にタラ血液にヘパリン投与で本酵素活性が増大することが観察された。⁴⁾ さらにヤツメウナギの肝臓にモノおよびジアミン類に作用する酵素が認められている。⁵⁾

福井ら⁶⁾ はサバ、アジ、メジナ、カレイおよびコイの肝臓ホモジネートについてヒスタミン生成酵素とヒスタミン変換酵素作用を比較し、サバ肝臓ではヒスタミン変換活性を示す画分が3画分存在するのに対し、他の魚種では2画分にすぎないことなどから、サバ肝臓にヒスタミンナーゼ活性が存在するのではないかと推定した。そこで我々は、これを明らかにするため、数種の魚類について DAO 様酵素活性を測定し、また、サバの肝臓における本酵素活性が DAO であるかどうかを検討した。

実験材料および方法

材料: マサバ *Scomber japonicus* は神奈川県葉山沖において、1980 年 5 月に釣った魚体 (平均体重 213 g) と、同年 9 月に釣った魚体 (平均体重 216 g) および 1981 年 3 月に釣った魚体 (平均体重 258 g) を使用した。クロマグロ *Thunnus thynnus* (3.1 kg)、カツオ *Katsuwonus pelamis* (1.03 kg)、マイワシ *Sardinops melanosticta* (平均体重 87 g) は築地中央卸売市場よりごく新鮮な魚体入手して使用した。スズキ *Lateolabrax japonicus* (3.2 kg)、ブリ *Seriola quinqueradiata* (2.5 kg) は同市場より活魚入手して使用した。

粗酵素の調製: それぞれ、魚体から肝臓、胃、幽門垂、腸を摘出し、肝臓については十分に脱血し、また、胃、幽門垂、腸については可能な限り臓器を切り開いて内外壁を冷蒸留水にて洗浄し、5 倍量の 0.2 M リン酸塩緩衝液 (pH 7.2) を加えて、ポッター型ホモジナイザーでホモジナイズした。部位により、得られたホモジネートがゲル化してしまう現象がみられたため、600×g で 10 分間遠心分離した後塩析操作を行った。すなわち、この上澄液に固体硫酸を加えて 0.2 飽和にして 1 時間放置した後、9000×g で 15 分間遠心分離した。この上澄液にさらに固体硫酸を加えて 0.7 飽和とし一晩放置し、遠心分離して上澄液を捨て、得られた沈殿を少量の 0.2 M

* 日本大学農獣医学部 (College of Agriculture and Veterinary Medicine, Nihon, University, 34-1, Shimourma-3, Setagaya, Tokyo 154).

リン酸塩緩衝液 (pH 7.2) に溶解し, 2 l の 0.01 M リン酸塩緩衝液 (pH 7.2) に対して 4 回透析し, 硫酸を除去した。さらに 4000×g で 10 分間遠心分離し, 透析中に生じた不溶物を除去した。これらの操作はすべて 4°C 以下で行った。得られた溶液を粗酵素溶液とし, 酵素活性測定に用い, サバ肝臓においては DEAE-セルロースカラムによる分画に用いた。

酵素活性測定方法: 基質としてヒスタミンを使用し, 鈴木ら⁷⁾の DAO 活性の測定方法に基いて測定し, これをジアミノオキシダーゼ様酵素活性とした。まず, 酵素反応により過酸化水素が生じる。

この過酸化水素を *o*-ジアニジシン-ペルオキシダーゼ法にて発色させる。

反応は 0.2 M リン酸塩緩衝液 (pH 7.2) 2.6 ml に, セイヨウワサビペルオキシダーゼ溶液 0.1 ml (4 μg), *o*-ジアニジシンメタノール溶液 0.1 ml (500 μg) および粗酵素溶液 0.5 ml を加えてよく混和し, 37°C で 10 分間保った後, 基質であるヒスタミン溶液 0.2 ml (2 μmol) を加えて手早く混和し, 37°C で 30 分間反応させた。6 N の塩酸 0.2 ml の添加により反応を停止させ, 波長 400 nm の吸光度を島津分光光度計 UV-200 にて測定した。酵素活性は過酸化水素溶液を用いて同様に発色させた吸光度を基にして, 反応により生成された過酸化水素量に換算して表わした。

蛋白質定量方法: 島津分光光度計 UV-200 で波長 280 nm における吸光度を測定し, また粗酵素の比活性を求める場合の蛋白質の定量は改良ビュレット法⁸⁾によった。

DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィー: 鈴木ら⁹⁾の方法に従って, 0.01 M リン酸塩緩衝液 (pH 7.2) にあらかじめ平衡させた DEAE-セルロースを φ30mm×300 mm のカラム管に充填し, サバ肝臓の粗酵素溶液を吸着させ, 0.01 M リン酸塩緩衝液 (pH 7.2), 次いで同じ緩衝液に塩化ナトリウムを 0.07 M, 1 M になるように含有させた緩衝液によって段階的に溶出を行い, 溶出液は 20 ml ずつ分取した。

試薬: DEAE-セルロースは Brown 社 (U.S.A.) 製, セイヨウワサビペルオキシダーゼは Sigma Chemical 社 (U.S.A.) 製, また基質のヒスタミン塩酸塩その他の試薬は和光純薬, 東京化成および岩井化学の製品を使用した。

結 果

ジアミノオキシダーゼ様酵素活性の分布: 肝臓, 胃, 幽門垂, 腸の 4 部位について測定した結果を Table 1 に示す。

Table 1 よりいづれの魚種にも共通に腸に高い活性が認められ, またブリにおいては本酵素活性は腸のみに認められた。ただしスズギでは腸よりも幽門垂に極端に高い活性が認められた。また肝臓, 胃および幽門垂に活性が認められた魚種はサバ, カツオ, マグロおよびイワシで, 赤身魚でもブリにはこれらの器官には活性が認められなかった。サバでは 5 月に入手した魚体に比べ, 9 月に入手した魚体では幽門垂の活性にほとんど変動が見られないのに対して, 胃における活性が消失し, 逆に肝臓の活性が高まった。しかしながら, 腸における活性が測定部位中で一番高い傾向には変化はない。なお, サバにおいては筋肉についても本酵素活性を測定したが, 活性は存在しなかった。

DEAE-セルロースカラムクロマトグラム: 1980 年 5 月に入手した魚体の結果を Fig. 1 に示し, 1981 年 3 月に入手した魚体の結果を Fig. 2 に示す。両魚体とも, 0.01 M リン酸塩緩衝液画分 (I), 0.07 M NaCl 含有画分

Table 1. The distribution of activities of diamine oxidase-like enzyme in the organs of a few fishes

Fish		Enzyme activity (nmol/mg · min)			
		Liver	Stomach	Pyloric caeca	Intestine
<i>Scomber japonicus</i>	May	42.1	76.5	68.9	880.1
	Sept.	94.7	0	69.4	244.4
<i>Thunnus thynnus</i>		54.5	22.5	23.9	124.4
<i>Katsuwonus pelamis</i>		201.9	24.6	136.8	185.6
<i>Sardinops melanosticta</i>		44.5	378.8	58.4	394.6
<i>Lateolabrax japonicus</i>		0	18.7	354.9	45.9
<i>Seriola quinqueradiata</i>		0	0	0	48.1

* セイヨウワサビペルオキシダーゼ

Fig. 1. DEAE-cellulose column chromatography of liver homogenate of *Scomber japonicus* caught in May.

○—○: O.D. at 280 nm ●—●: Enzyme activity

Fig. 2. DEAE-cellulose column chromatography of liver homogenate of *Scomber japonicus* caught in March.

○—○: O.D. at 280 nm ●—●: Enzyme activity

(II) および 1M NaCl 含有画分 (III) のいずれの画分にも本酵素活性が認められ、画分 III にもっとも高い活性 (5月に入手した魚体では全活性回収率の 63.0%, 3月に入手した魚体では全活性回収率の 49.6%) がみられた。各画分の最大活性の測定されたフラクションについて

て比活性を求めた結果をそれぞれ Table 2, Table 3 に示す。

pH の影響: 5月に入手した魚体の DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーより得られた画分 I, II, III の本酵素活性におよぼす pH の影響を調べた結果を Fig.

Fig. 3. Effect of pH on the activity of diamine oxidase-like enzymes in liver of *Scomber japonicus* caught in May.

Table 2. Specific activity of diamine oxidase-like enzymes prepared from liver of *Scomber japonicus* caught in May by means of DEAE-cellulose column chromatography

Fraction Number	Enzyme activity (nmol/ml)	Protein (mg/ml)	Specific activity (nmol/mg·min)
15	21.5	1.04	20.7
35	34.9	3.21	10.9
59	93.8	4.85	19.3

Table 3. Specific activity of diamine oxidase-like enzymes prepared from liver of *Scomber japonicus* caught in March by means of DEAE-cellulose column chromatography

Fraction Number	Enzyme activity (nmol/ml)	Protein (mg/ml)	Specific activity (nmol/mg·min)
12	64.6	4.59	14.1
45	152.8	12.98	11.8
82	208.8	22.53	9.3

3 に示す。なお、セイヨウワサビエルオキシダーゼの至適 pH は 6~7¹⁰⁾ であり、pH 5.8~8.0 の測定条件はセイヨウワサビエルオキシダーゼが作用するのに無理のない pH の範囲である。

画分 I, II はいずれも至適 pH が 7.0 付近にあり、画分 III は 6.4 付近に認められた。

基質特異性: 基質としてヒスタミン、アグマチンおよびモノアミンであるチラミン、エチルアミン、ベンジルアミンをそれぞれ反応系に 2 μ mol 存在するように添加し、3 月に入手した魚体の DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーより得られた画分 I, II, III の酵素を用いて測定した結果を Table 4 に示す。ヒスタミンに対する活性を 100 とし、相対活性で表した。

いずれの画分もヒスタミンとアグマチンに対して強く

Table 4. Substrate specificities for diamine oxidase-like enzymes in liver of *Scomber japonicus* caught in March

Substrate	Relative activity (%)		
	I	II	III
Histamine	100	100	100
Agmatine	176	180	238
Tyramine	47	91	25
Ethylamine	76	332	0
Benzylamine	11	0	0

Table 5. Effect of inhibitors on the activity of diamine oxidase-like enzymes in liver of *Scomber japonicus* caught in May

Inhibitor	Inhibition (%)		
	I	II	III
Aminoguanidine	100	100	100
Semicarbazide	100	100	100

反応し、特にアグマチンに対する反応が強かった。

阻害剤の影響: DAO はヒドラジド類、カルボニル試薬により阻害されることがわかっている。5 月に入手した魚体の DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーより得られた画分 I, II, III の酵素を用いて、阻害剤であるアミノグアニジン、セミカルバジドを最終濃度 3×10^{-5} M 存在するようにして測定した結果を Table 5 に示す。いずれの画分も阻害剤により 100% 阻害された。また、3 月に入手した魚体の DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーより得られた画分 I, II, III の酵素を用いて、DAO の阻害剤であるイソニコチン酸ヒドラジド、ヒドロキシルアミン、アミノグアニジン、セミカルバジド、およびモノアミンオキシダーゼの阻害剤である EDTA、アジ化ナトリウム、ヨード酢酸、N-エチルマレイミドを最終濃度 3×10^{-5} M 存在するようにして測定した結果を Table 6 に示す。いずれの画分も DAO

Table 6. Effect of inhibitors on the activity of diamine oxidase-like enzymes in liver of *Scomber japonicus* caught in March

Inhibiter	Inhibition (%)		
	I	II	III
None	0	0	0
Isonicotinic acid hydrazide	97	91	79
Hydroxylamine	95	100	100
Aminoguanidine	100	98	100
Semicarbazide	100	93	100
EDTA	13	4	7
Sodium azide	33	54	14
Iodoacetic acid	0	39	29
N-Ethylmaleimide	31	54	48

阻害剤により強く阻害された。

なお、鈴木ら⁷⁾はセイヨウサバビエルオキシダーゼが DAO 阻害剤により阻害され、見かけ上の阻害がおきる場合もあることを考え、阻害剤のセイヨウサバビエルオキシダーゼに対する阻害を検討した結果、見かけ上の阻害はおきていないことを確認している。

考 察

ジアミンオキシダーゼ (E. C. 1.4.3.6) の至適 pH はブタ腎臓の酵素で 6.8 であるといわれ、¹¹⁾ 本酵素はジアミン類に含まれるヒスタミン、アグマチンを分解し、⁹⁾ またアミノグアニジン、セミカルバジド、イソニコチン酸ヒドラジドおよびヒドロキシルアミンにより強く阻害される。¹²⁾

サバ肝臓ホモジネートについてのジアミンオキシダーゼ様酵素の至適 pH は、Fig. 1 に示された I および II 画分の粗酵素では Fig. 3 に示すようにいずれも 7 である。ただ、画分 III では 6.4 に至適 pH があり、いく分低い傾向を示している。本酵素は Table 4 に示したようにヒスタミン、アグマチンに対して強く反応している。また、Table 5 に示すように 5 月に入手したサバではアミノグアニジン、セミカルバジドにより完全に阻害され、Table 6 に示すように 3 月に入手したサバではイソニコチン酸ヒドラジド、ヒドロキシルアミン、アミノグアニジンおよびセミカルバジドにより強く阻害されている。

以上の事実より、サバ肝臓ホモジネートの 0.01 M リン酸塩緩衝液、0.07 M および 1 M NaCl 含有 0.01 M リン酸塩緩衝液により溶出される各蛋白質画分中にそれぞれ認められた画分 I、II および III は、ジアミンオキシダーゼによる活性であると判断される。なお、サバ以外の魚類についての DAO 様活性も H₂O₂ の発生に基づいて測定して活性があらわれていることより考えると、お

そらくジアミンオキシダーゼであろうと推定されよう。

高橋ら*はサバ、ウナギ、ニギマス、ブリ、ムツおよびマコガレイの肝臓について DAO 様酵素活性を測定したがサバ以外には DAO 様酵素活性は観察されなかった。しかしながら HOLSTEIN²⁾ はウナギ *Anguilla anguilla*、ニギス科の一種 *Argentina silus*、*Brosmius brosme*、ソコダラ科の一種 *Coryphaenoides rupestris*、カレイ科の一種 *Pleuronectes cynoglossus*、マダラ *Gadus morhua* およびタラ科の一種 *Gadus poutassou* の腸には DAO が存在していることを報告し、これは腸内細菌によって生産されるであろうアミン類を下毒するためのものであらうと推定している。

本研究の結果と高橋らおよび HOLSTEIN の結果を併せ考えると、魚類には腸のみに DAO を有する魚種と、腸には無論のこと、肝臓に DAO を有するものとがあるように推定される。しかし、本研究による実験の範囲内で推定すると、肝臓に DAO 活性の認められる魚類においては、胃および幽門垂にもその存在が認められている。

哺乳動物¹³⁾では肝臓および腎臓に DAO の存在するのは、ヒト、ウマ、ウシ、ヒツジ、ブタ、グイニアピッグ、ラットで、さらに腸にも DAO を有するものとしてはグイニアピッグおよびラットで、鳥類(ハト)ではさらに脾臓、筋肉および肺に存在しているといわれている。

ヒスタミン¹⁴⁾は、1. 胃液酸分泌作用、2. 心臓の拍動数と収縮力の増加作用、3. 血圧降下作用、4. 気管支筋収縮作用のように著しく異なる生理作用において重要な役割をはたしている。したがって、現段階ではいずれの生理作用にどの魚種が対応するか推定することは不可能である。今後の研究に待たねばならない。

なお、試料魚種中の本酵素活性の測定は河野淳君が実施した。

文 献

- 1) B. HOLSTEIN: *Comp. Biochem. Physiol.*, **38A**, 435-441 (1971).
- 2) B. HOLSTEIN: *Comp. Biochem. Physiol.*, **50B**, 291-297 (1975).
- 3) W. P. BURKARD, K. F. GEY, and A. PLETSCHER: *Helv. Physiol. Pharmacol. Acta*, **19**, 61-62 (1961).
- 4) R. HANSSON and H. THYSELL: *Acta Physiol. Scand.*, **74**, 533-542 (1968).
- 5) H. BLASCHKO, M. C. BORDLE, and S. J. STRICH: *J. Physiol.*, **204**, 104-105 (1969).
- 6) 福井公一・大竹茂夫: 日大農獣医学研報, **36**, 151-155 (1979).
- 7) 鈴木 剛・奥山典夫: 生 化 学, **39**, 399-404 (1967).
- 8) 斉藤恒行・内山 均・梅本 滋・河端俊治: 水

* 高橋一樹・大竹茂夫: 昭和 53 年度日本水産学会春季大会講演要旨集, p. 182.

- 産生物化学食品学実験書, 第 1 版, 恒星社厚生閣, 東京, 1974, pp. 204-208.
- 9) 鈴木 剛, 奥山典夫: 生 化 学, **40**, 206-213 (1968).
- 10) A. C. MAEHLY: *Methods in Enzymology* (ed. S. P. COLOWICK and N. O. KAPLAN), Vol. 1, Academic Press, New York, 1955, p. 801.
- 11) R. KAPPELLER-ADLER and H. MACFARLANE: *Biochim. Biophys. Acta*, **67**, 542-565 (1963).
- 12) W. G. BARDSLEY, M. J. C. CRABBE, and I. V. SCOTT: *Biochem. J.*, **139**, 168-181 (1974).
- 13) E. A. ZELLER, H. BIRKHAÜSER, H. MISLIN, and M. WENK: *Helv. Chim. Acta*, **22**, 1381-1395 (1939).
- 14) S. C. VERMA and J. H. MCNEILL: *Can. J. Pharm. Sci.*, **13**, 1-3 (1978).