魚類赤血球の中性 β -*N*-アセチルグルコサミニダーゼの性質とその応用^{*1}上 野 隆 二^{*2}

三重大生物資源学部

β -*N*-アセチルグルコサミニダーゼ (NAG) は広く動物組織に分布し、 β -*N*-アセチルグルコサミニド結合を有する糖脂質、ムコ多糖、糖タンパク等の分解に関与する酵素である。NAG の多様性について多くの報告があるが、酸性 NAG であるヘキササミニダーゼ A および B と中性 NAG であるヘキササミニダーゼ C とはこれらの欠損が先天性異常代謝病の一つである GM₂ ガングリオシドースに関連することから、その相関性について非常に注目されている。

著者は魚類血液中に上記 3 種の NAG が高い活性 (1 つは中性 NAG, 残り 2 つは酸性 NAG) で存在することを見出し (表 1),¹⁻³⁾ 魚類血液が NAG isoenzymes の生物学的機能や遺伝的相関性の研究のための酵素源として有用であることを指摘した。ここでは、中性 NAG を中心に酵素の精製, 性質, 血液中での局在性, 魚種間での分布等を述べると共に、中性 NAG 活性測定を利用した凍結・解凍魚と非凍結魚との鑑別法への応用についてもふれる。

コイ赤血球中性 NAG

コイ赤血球から中性 NAG の精製を行い、電気泳動的に均質な酵素標品を得た。本酵素の至適 pH は 6.5 であった。DTT, 2-ME によって強く活性化された。*N*-アセチルグルコサミンや酢酸塩によって阻害されなかった。本酵素は *N*-アセチルグルコサミニド誘導体のみ特異的に分解し、ヒト、ウシ、ラットの脳に存在するヘキササミニダーゼ C に相当する酵素と推定した。また、本酵素は狭い基質特異性と緩和な反応条件から複合糖質の構造研究の上で有用であった。⁴⁻⁶⁾

コイ白血球酸性 NAG

コイ白血球から 2 種の酸性 NAG (1 型および 2 型) の精製を行い、電気泳動的に均質な酵素標品を得た。両酵素は 5.0 に至適 pH, 0.2 mM の Km, 116,000 の分子量をもち、*N*-アセチルガラクトサミン、*N*-アセチルグルコサミンおよび酢酸塩によって阻害された。しかしな

が、両酵素は熱安定性、電気泳動による移動度において差異が認められた。それらの結果から、1 型および 2 型は、それぞれヒト組織のヘキササミニダーゼ A および B と推定された。さらに、1 型はノイラニミダーゼ処理によって 2 型から変換されることから 2 型の前駆体と推論した。⁷⁾

魚血液中の NAG の細胞内局在性および分布

血液中には、少なくとも 3 つの異なった NAG が存在した。すなわち、中性 NAG と 2 種の酸性 NAG であった。血液をパーコールによって、血漿、白血球、赤血球画分に分け、各画分中の NAG 活性を測定した。中性 NAG は赤血球中に、酸性 NAG は白血球中にそれぞれ存在した。中性 NAG は潜在活性を示し、赤血球膜の破壊によって初めて活性が発現したが、酸性 NAG は潜在活性を示さず白血球膜と結合した酵素と推定された。両酵素は試験したすべての魚類にわたって分布していたが、中性 NAG はは乳類の血球中では見いだされなかった。ELISA 法により 2 種の酸性 NAG は免疫学的に同一であったが、中性 NAG では完全な同一性 (酸性 NAG に対して 40-60% の response level) が認められなかった。⁸⁾

赤血球中性 NAG 活性測定による
凍結・解凍魚と非凍結魚との鑑別法

血球における中性 NAG の局在性および性質を利用して、上記鑑別法の開発を試みた。その結果、鮮魚または冷蔵魚の場合、凍結魚の血液に比べて非常に強い活性を示した。本方法は市販の淡水魚、海産魚に適用でき、20 分以内で終了した。本方法をさらに簡単にするため、鑑別試験紙による方法を開発した。すなわち、あらかじめ基質を染み込ませた濾紙に、血液を染み込ませ、室温で 10 分間放置後、アルカリ液を一滴加え、UV 下で蛍光の有無を観察した。その結果、本方法は前者よりも簡単に判別できた (表 2)。⁷⁻¹⁰⁾

^{*1} Neutral β -*N*-acetylglucosaminidase from carp blood cells and its application.

^{*2} Ryuji Ueno (Faculty of Bioresources, Mie University, Tsu, Mie 514, Japan).

表1 種々の β -N-アセチルグルコサミニダーゼの性質の比較

Enzyme	Opt. pH	Heat stability at 50°C	Inhibitor	Substrate specificity
Hex A ^{*1}	4.5-5.0	Unstable	Acetate GlcNAc GalNAc	4MU-GlcNAc : 4MU-GalNAc 8.6 : 1
Hex B ^{*1}	4.5-5.0	Stable	Acetate GlcNAc GalNAc	4MU-GlcNAc : 4MU-GalNAc 8.6 : 1
Hex C ^{*2}	6.0-7.0	Unstable	GlcNAc	4MU-GlcNAc
Carp Neutral NAG ^{*3}	6.5	Unstable	GlcNAc	4MU-GlcNAc : 4MU-GalNAc 76 : 1
Acidic NAG ^{*3}	4.5	Stable	Acetate GlcNAc GalNAc	4MU-GlcNAc : 4MU-GalNAc 1.9 : 1

*¹ Robinson *et al.* (1967).*² Braidman (1981).*³ Partially purified.

表2 試験紙を用いた生鮮魚と凍結解凍魚との鑑別結果

Temperature (°C)	Storage periods (day)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Carp								
4	— ^{*1}	—	—	—	—	+ ^{*2}	+	+
-1	—	—	—	—	—	—	—	—
-20	+	+	+	+	+	+	+	+
-40	+	+	+	+	+	+	+	+
Red sea bream								
4	—	—	—	+	+	+	+	+
-20	+	+	+	+	+	+	+	+

*¹ The minus sign means no fluorescence.*² The plus sign means the degree of the fluorescence.+, >0.2-0.3 mU/ml of the neutral β -N-acetylglucosaminidase activity; #, >1.1 mU/ml.

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、共同研究者であった米国カンサス大学医学部の袁 崇生博士、中村学園女子短期大学の吉岡慶子博士および九州大学名誉教授の故北御門 学博士に衷心から謝意を表す。

文 献

- 1) 上野隆二・森下達雄・高橋 喬: コイ筋肉組織の β -N-ア

セチルグルコサミニダーゼ. 三重大水研報, 209-216 (1979).

- 2) R. Ueno and Y. Horiguchi: Distribution of β -N-acetylglucosaminidase in tissues of several fish species. *Bull. Fac. Fish. Mie Univ.*, **11**, 51-56 (1984).
- 3) R. Ueno, Y. Horiguchi, T. Morishita, and T. Takahashi: Partial purification of β -N-acetylglucosaminidase in carp red muscle and their general property. *Bull. Fac. Fish. Mie Univ.*, **11**, 43-50 (1984).
- 4) R. Ueno, C. Yuan, and Y. Horiguchi: Purification of β -N-acetylglucosaminidase from carp blood. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **53**, 1009-1016 (1987).
- 5) R. Ueno and C.-S. Yuan: Purification and properties of neutral β -N-acetylglucosaminidase from carp blood. *Biochim. Biophys. Acta*, **1074**, 79-84 (1991).
- 6) C.-S. Yuan, K. Yamaguchi, M. Kitamikado, and R. Ueno: Oligosaccharidase activity of a neutral β -N-acetylglucosaminidase from carp blood. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **57**, 325-328 (1991).
- 7) R. Ueno, X. Yu, and C. Yuan: Purification and characterization of two acidic β -N-acetylglucosaminidase isozymes from carp blood. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **55**, 1407-1413 (1990).
- 8) R. Ueno, C. Yuan, and Y. Horiguchi: Study of the distribution of β -N-acetylglucosaminidase in fish blood. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **54**, 95-101 (1988).
- 9) C. Yuan, K. Yoshioka, R. Ueno, and M. Kitamikado: Differentiation of frozen-thawed fish from fresh fish by determination of neutral β -N-acetylglucosaminidase in the blood. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **54**, 2143-2148 (1988).
- 10) M. Kitamikado, C. Yuan, K. Yoshioka, and R. Ueno: A routine method and test paper for differentiation between frozen-thawed and fresh fish. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **54**, 2149-2151 (1988).