貝類のリゾチーム分布 II

宮内浩二, 松宮政弘, 望月 篤

(2001年7月12日受付, 2001年12月3日受理)

日本大学生物資源科学部

Lysozyme activity in shellfishes II

KOUJI MIYAUCHI,* MASAHIRO MATSUMIYA
AND ATSUSHI MOCHIZUKICollege of Bioresource Sciences, Nihon University, Fujisawa,
Kanagawa 252-8510, Japan

キーワード: リゾチーム, 貝類, 分布, 溶菌酵素, 酵素

リゾチーム (EC 3.2.1.17) は溶菌酵素として生物界に広く分布していることが知られている。^{1,2)} Jolles and Jolles の総説³⁾によると, 無脊椎動物では本酵素は主に生体防御に関与しているものと考えられている。貝類リゾチームに関してはこれまでに, 数種における分布および性質⁴⁻⁸⁾について報告されているにすぎない。

McHenery ら⁴⁾は貝類リゾチームの役割は腸内細菌相の制御に関与するとし, 生体防御は二次的なものであると示唆している。一方, 高橋ら⁷⁾はマガキにリゾチーム活性を認め, リゾチームが殺菌素の重要成分のひとつである可能性を示唆している。また, 貝類リゾチームの性質はヨーロッパイガイ,^{5,6)} ホタテガイ廃棄物,⁹⁾ マシジミ,⁸⁾ サザエ,¹⁰⁾ アサリ¹¹⁾ およびヤマトシジミ¹²⁾ について精製酵素を用いて検討されている。これらの報告によると, 貝類リゾチームは, ニワトリ卵白リゾチームをはじめとする脊椎動物リゾチームと性質が異なること, さらに種ごとに分子性状が異なることが強く示唆されている。しかしながら, 貝類リゾチームに関する基礎的知見は未だ少ない。そこで本研究では, 貝類リゾチームの体内における生理的機能および酵素特性を明確にするための一歩として, 貝類3綱 (Loricata, Gastropoda, Pelecypoda) 8目 (Neoloricata, Archaeogastropoda, Neotaenioglossa, Neogastropoda, Stylommatophoda, Mytiloida, Pteriomorphia, Veneroida) の中で, これまでに報告例のない19科36種についてリゾチーム活性の分布を検討した。

実験に供した貝類の採取時期, 場所および殻を除いたむき身全体の平均湿重量を Table 1 に示した。試料は採取または購入後, -20°C で凍結し, 適宜実験に供した。また, ニワトリ卵白リゾチーム (HEWL) および *Micrococcus lysodeikticus* の乾燥菌体はいずれも Sigma

Chemical 製を用いた。

試料の調製として, 大型の貝類は1個体を, また, 小型の貝類についてはむき身総重量が5-10 g となるよう数個体を集め, それに対し5倍容量の10 mM リン酸緩衝液 (pH 6.2) を加え, ウルトラタラックス T25・ホモジナイザー (Janke and Kunkel 製) を用いて20,000 rpm で2分間ホモジナイズした。これを10,000 × g で20分間遠心分離し, 得られた上澄液を粗酵素液とした。なお, 酵素活性の測定は前報¹²⁾と同様に行った。すなわち, *M. lysodeikticus* の乾燥菌体を基質とし, HEWL (Sigma Chemical, L-6876) を標準リゾチームとして使用し, 10 mM リン酸緩衝液 (pH 6.2) 中で37°C, 10分間反応させ, 基質の分解により生じた吸光度の減少値を予め作成した HEWL の検量線に当てはめ, 相当する HEWL 量 (μg) に換算し, むき身1 g 当たりの活性値 (μg/g) として表した。なお, 結果については上記酵素活性の測定操作を各貝ごとに3度行い, その平均値および標準偏差を算出し Table 1 に示した。また, 活性が認められない貝類については, 使用する粗酵素液を通常の10倍量に増加して, 再度活性測定を試みた。

36種の貝類についてリゾチーム活性を測定したところ, 27種に活性が認められた。特に Loricata 綱, Neoloricata 目, Chitonidae 科のヒザラガイ (*Liolophura japonica*) では2,110 μg/g, Gastropoda 綱, Archaeogastropoda 目においては, Patellidae 科のマツバガイ (*Cellana nigrolineata*) で1,290 μg/g, Acmaeidae 科のコガモガイ (*Collisella heroldi*) で1,040 μg/g, Trochidae 科のコシダカガンガラ (*Omphalius rusticum*) で1,600 μg/g, Littorinidae 科のアラレタマキビ (*Nodilittorina granulata*) で2,110 μg/g とこれら5種類の貝類では, これまでに報告例のない1,000 μg/g を超える強いリゾチーム活性を示した。これはリゾチーム含有量が高いことで知られているニワトリ卵白 (約3,000 μg/g) に準ずる値であった。これらの著しく高いリゾチーム活性は, リゾチーム活性を示す酵素タンパク質の含有量が多いことに起因するか, あるいは高い比活性を示すリゾチームを含有しているかのいずれかであると考えられる。著者ら¹²⁾は先に, ヤマトシジミ中に HEWL より256倍高い比活性を示すリゾチームが存在することを認めた。このことより, これらの貝類にも著しく高い比活性を有するリゾチームの存在が示唆される。一方, 本研究では9種の貝においてリゾチーム活性が検出されなかった。無脊椎動物においてリゾチームは生体防御に関

* Tel : 81-466-84-3683. Fax : 81-466-84-3683. Email : miyauchi@brs.nihon-u.ac.jp

Table 1. Activity of lysozymes in various shellfishes

Family	Species	Body* Wt. (g)	Lysozyme activity ($\mu\text{g/g}$ of tissues)	Sampling time	Sampling place
Chitonidae	<i>Liolophura iaponica</i>	2.3	2,110 $\pm$ 30	Sep., 2000	Kanagawa
Patelidae	<i>Cellana dorsuosa</i>	1.5	549 $\pm$ 23	Jun., 1997	"
	<i>Cellana nigrolineata</i>	1.6	1,290 $\pm$ 30	"	"
Acmaeidae	<i>Patelloida saccharina</i>	1.0	486 $\pm$ 21	"	"
	<i>Collisella heroldi</i>	0.8	1,040 $\pm$ 20	Aug., 1997	Chiba
	<i>Notoacmea concinna</i>	0.5	306 $\pm$ 15	Sep., 1996	Kanagawa
Trochidae	<i>Monodonta labio</i>	0.4	608 $\pm$ 23	Jun., 1997	"
	<i>Chlorostoma lischkei</i>	0.5	840 $\pm$ 13	"	"
	<i>Omphalius rusticum</i>	0.4	1,600 $\pm$ 70	Jul., 1997	"
	<i>Omphalius pfeifferi</i>	1.8	629 $\pm$ 20	Aug., 1996	Shizuoka
	<i>Chorostoma xanthostigama</i>	0.5	318 $\pm$ 13	Jul., 1998	Kanagawa
	<i>Diloma suavis</i>	0.3	ND	Aug., 1998	"
	<i>Trochus sacellum</i>	0.9	982 $\pm$ 23	Aug., 1996	Shizuoka
Neritidae	<i>Thliossyra albicilla</i>	0.3	782 $\pm$ 17	"	"
Littorinidae	<i>Littorina brevicula</i>	0.2	621 $\pm$ 16	Sep., 1996	Kanagawa
	<i>Nodilittorina granularis</i>	0.3	2,110 $\pm$ 100	Aug., 2000	Tokyo**
Potamididae	<i>Batillaria multiformis</i>	0.5	176 $\pm$ 8	Jul., 1998	Kanagawa
Naticidae	<i>Neverita didyma</i>	3.4	52.2 $\pm$ 6.1	Aug., 2000	Tokyo**
Muricidae	<i>Thais clavigera</i>	1.7	583 $\pm$ 48	Jul., 1997	Kanagawa
Buccinidae	<i>Pisania ferrea</i>	1.4	197 $\pm$ 21	"	"
	<i>Buccinum schantaricum</i>	16.8	ND	Oct., 1997	Tokyo**
	<i>Babyronia iaponica</i>	3.5	250 $\pm$ 17	Sep., 1997	"
	<i>Neptunea arthritica</i>	14.8	134 $\pm$ 25	Oct., 1997	"
	<i>Hindsia magnifica</i>	13.2	198 $\pm$ 10	"	"
Siphonariidae	<i>Siphonaria acmaeoides</i>	0.7	328 $\pm$ 12	Aug., 1997	Kanagawa
	<i>Siphonaria subatra</i>	0.3	ND	Sep., 2000	"
Mytilidae	<i>Septifer virgatus</i>	2.3	133 $\pm$ 17	Jul., 1998	"
Ostreidae	<i>Saxostrea mordax</i>	2.9	264 $\pm$ 33	Sep., 2000	"
Pectinidae	<i>Amusium iaponicum</i>	8.9	ND	"	"
Carditidae	<i>Cardita leana</i>	1.3	ND	Jul., 1997	"
Veneridae	<i>Saxidomus purpuratus</i>	60.6	320 $\pm$ 31	Sep., 2000	Shizuoka
Mactridae	<i>Tresus keenae</i>	133	ND	Aug., 2000	Tokyo**
Tellinidae	<i>Peronidia zyonoensis</i>	12.5	ND	Sep., 1997	"
Solenidae	<i>Sinonovacula constricta</i>	11.6	456 $\pm$ 44	Sep., 1997	"
	<i>Solen strictus</i>	6.3	ND	Aug., 2000	"
	<i>Siliqua alta</i>	11.7	ND	"	"

*: Body weight is shown as whole wet weight, which was removed from the shell.

**: The samples were purchased at fish stores or collected in coastal seas in each prefecture.

ND: not detectable using 10 volumes of enzyme extracts.

与しているものと考えられており、³⁾ 多数の貝においてリゾチームの存在が報告されているが、⁴⁻⁸⁾ リゾチーム活性を持たない貝についてはこれまでのところ報告例がない。Tokutake *et al.*¹³⁾ はアサリで、また、Miura *et al.*¹⁴⁾ はイガイでリゾチーム活性の周年変動を観察したが、活性値に変動は見られるものの、活性の消失する季節は認められなかった。これらのことより、季節変動により活性が消失したとは考えにくく、リゾチーム活性を欠く貝の存在は、貝類の生体防御機構研究のうえからも興味深い知見と考えられる。現在、リゾチームの部位別

分布を測定することにより、部位ごとの貝類リゾチームの生理的機能の解明、さらに精製酵素を用いて酵素特性についても詳細な検討を進めている。

文 献

- 1) Fleming A. On a remarkable bacteriolytic element found in tissues and sections. *Proc. Roy. Soc.* 1922; **93**: 306-317.
- 2) Jolles P. Lysozymes: A chapter of molecular biology. *Angew. Chem.* 1969; **8**: 227-239.
- 3) Jolles P, Jolles J. What's new in lysozyme research? Always a model system, today as yesterday. *Mol. Cell.*

- Biochem.* 1984; **63**: 165-189.
- 4) McHenery JG, Birkbeck TH, Allen JA. The occurrence of lysozyme in marine bivalves. *Comp. Biochem. Physiol.* 1978; **63B**: 25-28.
 - 5) McHenery JG, Birkbeck TH. Lysozyme of the mussel *Mytilus edulis* (L.). *Mar. Biol. Lett.* 1979; **1**: 111-119.
 - 6) McHenery JG, Birkbeck TH. Characterization of the lysozyme of *Mytilus edulis* (L.). *Comp. Biochem. Physiol.* 1982; **70B**: 583-589.
 - 7) 高橋計介, 森 勝義, 野村 正. 海産二枚貝におけるリゾチームの存在と特性. 日水誌 1986; **52**: 863-868.
 - 8) 望月 篤, 松宮政弘. 貝類のリゾチーム分布. 日水誌 1983; **49**: 131-135.
 - 9) Myrnes B, Johansen A. Recovery of lysozyme from scallop waste. *Prepar. Biochem.* 1994; **24**: 69-80.
 - 10) 望月 篤, 松宮政弘. サザエリゾチームの性質. 日大農獣報 1994; **51**: 169-173.
 - 11) Ito Y, Yoshikawa A, Hotani T, Fukuda S, Sugimura K, Imoto T. Amino acid sequences of lysozymes newly purified from invertebrates imply wide distribution of a novel class in the lysozyme family. *Eur. J. Biochem.* 1999; **259**: 456-461.
 - 12) 宮内浩二, 松宮政弘, 望月 篤. ヤマトシジミ・リゾチームの精製と性質. 日水誌 2000; **66**: 275-281.
 - 13) Tokutake K, Mochizuki A, Matsumiya M. Seasonal variation of lysozyme activity in short-necked clam. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1992; **58**: 1103-1106.
 - 14) Miura K, Matsumiya M, Mochizuki A. Seasonal variation in lysozyme activity in the mussel *Mytilus edulis*. *Fish. Sci.* 1994; **60**: 441-443.