

ホタテガイ *Mizuhopecten yessoensis* 中腸腺リパーゼ活性の多試料分析 (短報)

宮園 章^{*1}, 岸村栄毅^{*2}

Multiple analysis of lipase activity in hepatopancreas of Japanese scallop *Mizuhopecten yessoensis* (Short Paper)

Akira MIYAZONO ^{*1} and Hideki KISHIMURA ^{*2}

キーワード：ホタテガイ, *Mizuhopecten yessoensis*, 中腸腺, リパーゼ活性, 多試料分析

はじめに

北海道におけるホタテガイの年間生産量40万トンのうち、約3割は垂下養殖により生産される。ホタテガイの垂下養殖現場では生産性を損なうへい死対策技術の開発が遅れており、養殖作業の良否は作業後しばらく養殖した時点でのへい死状況で判断されている。時化の影響も外的損傷の視覚的観察から原因が推察されているにすぎない^{1,2)}。青森県では貝の生理状態の生化学的な把握が試みられたが、低感度および煩雑な分析操作が実用化への障害となっている³⁾。一方、ホタテガイ中腸腺のトリグリセライド (TG) 含有量は1日程度の短期飢餓によって減少し時化を経験した稚貝のTG含有量が減少することから、これら稚貝のTG含有量の急変は短期間の摂餌不良によると解釈された^{4,5)}。ところが、籠入れ替え作業の経験が養殖後1~8日目までTG含有量が低下し、作業ストレスが中腸腺TG含有量低下に影響した可能性が指摘されている⁶⁾。しかし、ストレスがホタテガイ中腸腺のTG含有量低下をもたらすメカニズムは不明であり、これらの関係解明にはTG代謝に関わるリパーゼの働きに着目する必要がある。他方、ホタテガイ中腸腺は遊離脂肪酸含有量が高いため内在性リパーゼの関与が示唆され^{7,8)}、その後、*sn*-1,2(2,3)-位に特異的に働くリパーゼが存在することが定性的に確認された⁹⁾。このときのリパーゼ活性測定法は多量の基質および酵素試料を必要とするため、多試料のリパーゼ活性の分析が困難である。生態研究では個体毎の分析が基本となるため、簡便な一

括多試料分析法が望まれる。水産生物のリパーゼの活性測定には蛍光物質でラベルした分解基質を用いた蛍光分析法も用いられるが^{10,11)}、蛍光光度計による経時測定が必要なため多試料の分析が困難である。酵素活性の微量簡易分析法であるAPIZYMシステムは未知試料の多酵素の活性の特性を把握することには適するが定量性は不十分である¹²⁾。そこで、本研究ではホスホリパーゼA2の活性測定に用いられている微量分析法¹³⁾を改変し多試料のホタテガイ中腸腺のリパーゼ活性を一括定量分析する測定法を確立した。

材料と方法

リパーゼの性状を検討するための中腸腺アセトン粉末は2004年4月に噴火湾から採取し、-20℃で凍結保存したホタテガイ *Mizuhopecten yessoensis* を用いた。ブタ膵臓リパーゼはSigma-Aldrich社 (St. Louis, Missouri, USA) のType IIを用いた。試験に供したホタテ稚貝は2006年6月に噴火湾から採集した。稚貝の中腸腺のアセトン粉末は以下の様に作成した。すなわち、中腸腺を個別に10ml試験管にとり、-20℃に冷却した5倍量のアセトンをこれに加えヒスコロン処理してホモジネートとした。ホモジネートを遠心分離 (3,000rpm, 10分) した後、沈殿を回収した。同様の操作を2回繰り返した後、試験管の残渣を減圧処理してアセトンを除去し個体別のアセトン粉末を得た。減圧操作では、30℃の温水に浸したガラスデシケータ (上口・横口、中板径180mm) にアスピレータ

報文番号 A423 (2008年2月20日受理)

*1 北海道立中央水産試験場 (Hokkaido Central Fisheries Experiment Station, Hamanaka, Yoichi, Hokkaido 046-8555, Japan)

*2 北海道大学大学院水産科学研究院 (Research Faculty of Fisheries Sciences, Hokkaido University, Hakodate, Hokkaido 041-8611, Japan)

(ADVANTEC AS-25)を連結し, 最大60本の試験管を約2時間減圧することで一括処理した。アセトン粉末は試験管のまま酵素活性分析まで -20°C で保存した。粗リパーゼはアセトン粉末100mgに対してトリス-HCl緩衝液(pH7.5)1mlを加えて調製した。ホタテガイの場合には中腸腺湿重量の約25%がアセトンパウダー重量となる。オリーブオイル(終濃度71mg/ml)を分解基質として, トリス-HCl緩衝液(終濃度50mM)・デオキシコール酸(終濃度2.7mM)・塩化カルシウム(終濃度5.0mM)を含む乳化液120 μl に粗リパーゼ液20 μl を加え, 20°C ・16時間反応させた⁸⁾。反応はクロロホルム:メタノール(2:1, v/v)溶液を650 μl 加えることにより停止させ, クロロホルム層を回収後上記減圧処理により蒸発乾固した。これにエタノール:エーテル(3:1, v/v)溶液を100 μl 加え再溶解し, NEFA分析キット(ワコー純薬, NEFAC-TestWako: ACS-ACOD法)を用いて分解物の遊離脂肪酸量を定量した。NEFAの定量分析にはマイクロプレートを用いた多試料一括分析⁴⁾を採用した。10ml試験管を用いたリパーゼ活性測定では60サンプルが同時に分析できる。前記の方法で得られたホタテ中腸腺によるオリーブオイル分解物をヘキサン:エーテル:酢酸(80:20:1, v/v/v)を展開溶媒とする薄層クロマトグラフィーで展開し, リパーゼ活性の有無を確認した。ブタ膵臓リパーゼを対照として, ホタテガイ中腸腺のリパーゼ活性に対するpHおよび温度の影響を調べた。試験ではそれぞれ5回の繰り返し試験を行った。各系の試験に対して 90°C 2分間の加熱により失活させた酵素液を用いたブランク試験を行い, 生成された遊離脂肪酸量の差をとり, その最大値を100とした割合をリパーゼ相対活性として評価した。活性の単位(U)は1分間に1 μg の脂肪酸を遊離する活性を1Uと定義し, ブタ膵臓リパーゼの活性と比較した。凍結保存されたホタテ稚貝(2004年9月15日採取)と2令貝(2004年4月7日採取)について, それぞれ2個体の中腸腺リパーゼ活性を求めた。稚貝では摘出した中腸腺をそのまま分析に使用し, 2令貝では中腸腺の一部を分析に使用した。実験は5回の繰り返し試験とし, リパーゼ活性はpH7.5・ 20°C ・16時間で生成された中腸腺1mg当たりの遊離脂肪酸量として平均値 \pm 標準偏差で示した。

結果と考察

酵素反応後にクロロホルム層に回収されたものには, 基質であるTGの他, わずかなジグリセリド(DG)とともに明らかな遊離脂肪酸のスポットがみられた(Fig.1)。失活酵素液による反応では遊離脂肪酸・DGがほとんど認められず(Fig.1), 上記の分析法でホタテガイ中腸腺におけるリパーゼ活性を検出できることが明らかとなっ

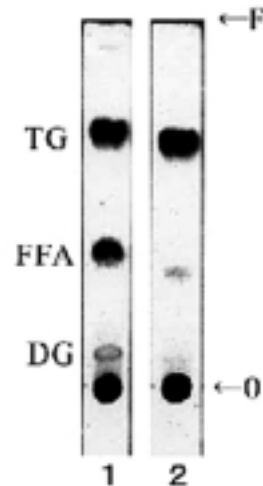


Fig.1 Thin-layer chromatograms of the reaction products after incubation of olive oil with crude enzyme solution (1) or denatured crude enzyme solution treated by 90°C , 2 min. (2). Abbreviations: TG, tri- glyceride; FFA, free fatty acid; DG, 1,2(2,3)- diglyceride; O, origin; F, front.

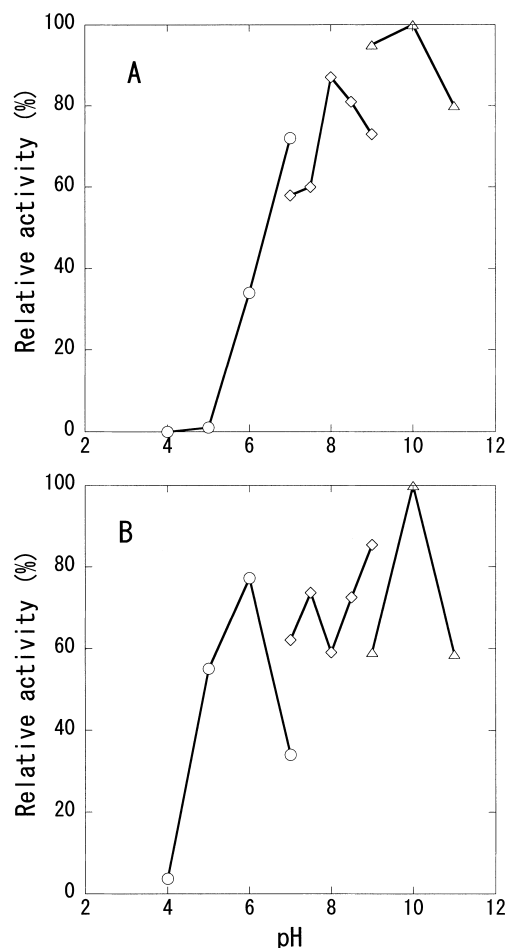


Fig.2 Effects of pH on the lipase activity of porcine pancreas (A) and scallop hepatopancreas (B). The reactions were determined in 50 mM buffer solutions, open circles; acetic acid-sodium acetate (pH4.0-7.0), open squares; Tris-HCl (pH7.0-9.0), open triangles; glycine-NaOH (pH9.0-11.0) at 20°C for 16 hours.

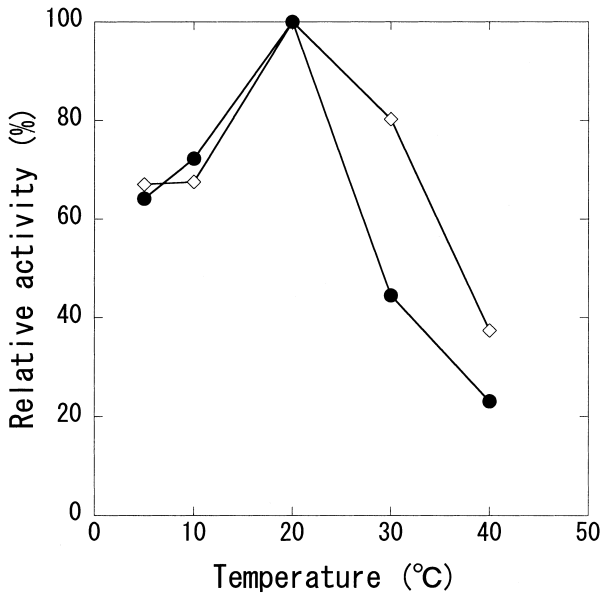


Fig.3 Effects of temperature on the lipase activity of porcine pancreas determined in 50 mM Tris-HCl (pH8.0) buffer (open squares), and scallop hepatopancreas determined in 50 mM Tris-HCl (pH7.5) buffer (closed circles) at 20 °C for 16 hours.

Table1 Lipase activity of crude enzyme solution from scallop hepatopancreas. Juvenile A and B were collected from Funka Bay at 15/ September/ 2004. 2 year Scallop A and B were collected from Funka Bay at 7/April/ 2004. Results were indicated average ± standard deviation from five repeated tests. Lipase activities were indicated as NEFA concentration per hepatopancreas produced after the reaction (pH 7.5, 20°C, 16 hour).

	LA	SL (mm)	SPW (g)	HPW (g)
J-A	169±22.1	16.9	0.257	0.0226
J-B	148±16.6	16.6	0.249	0.0240
2-A	116±17.6	100.5	72.3	8.10
2-B	118±15.9	100.5	72.3	7.17

J: Juvenile, 2: 2 year scallop, LA: Lipase activities (μ g NEFA/mg HP/16h), SL: Shell length, SPW: Soft part weight, HPW: Hepatopancreas weight.

た。本法で分析したブタ膵臓リパーゼのpHおよび反応温度に対する特性(Fig.2,3)はブタ膵臓リパーゼ(パンクレアチンF, 天野製薬)とほぼ同様の性状であった。このことは本法がリパーゼの定量分析法として妥当であることを示す。ホタテガイ中腸腺粗リパーゼはpH6-10の間で活性が高かった(Fig.2)。緩衝液の種類で相対活性は上下変動があったものの、pH10.0に極大値が認められた。pH6.0においてもピークが認められ、今回使用した粗リパーゼには異なる性質を持つリパーゼが含まれていた可能性がある。ホタテガイ中腸腺粗リパーゼとブタ膵臓リパーゼ活性に及ぼす温度の影響はほぼ同じパターンであ

り、20°Cのときに最大活性を示した(Fig.3)。20°Cより高温でのホタテガイ中腸腺粗リパーゼ活性の低下はブタリパーゼに比べて顕著であった。ホタテガイ中腸腺粗リパーゼの比活性は0.062U/mg (pH10.0, 20°C, 反応時間24時間)であり、同時に測定したブタ膵臓リパーゼの比活性181U/mg (pH8.5, 20°C, 反応時間24時間)の約1/2900と極めて低かった。中腸腺粗リパーゼの活性は同一個体における繰り返し試験の結果は安定していた (Table 1)。2年貝に比べて稚貝のリパーゼ活性が高かったのは、季節の違いによる餌条件、年齢の違いによる生理条件の影響が考えられる。他方、中腸腺内の幹晶体のリパーゼ活性は中腸腺組織に比べて1.7-3.0倍高いため¹⁴⁾、その影響も考えられる。本法では中腸腺の秤量からアセトンパウダー保存までを同一試験管により行い、分析に使用する粗酵素液量も20 μ lと微量であることから殻長10mmサイズのホタテガイ稚貝でも個体別の分析ができた。この定量法はホタテガイだけでなく、様々な海産生物の生態研究におけるリパーゼ活性測定に応用できる。

文 献

- 1) 小坂善信：ホタテガイの稚貝へい死。青森県水産増殖センターだより。84, 2-3 (1999)
- 2) 小坂善信：ホタテガイの異常へい死。青森県水産総合研究センター増養殖研究所だより。98, 2-3 (2003)
- 3) 青森県：先端技術等地域実用化研究促進事業 ホタテガイ健康評価と養殖技術の改善に関する研究 (平成11年度から13年度報告書), 青森県, 2002, 70p.
- 4) 宮園 章：ホタテ稚貝の短期飢餓に対するトリグリセライド含有量の変化。北水試研報。69, 145-149 (2005)
- 5) 宮園 章, 奥村裕弥, 吉村圭三, 菊池 肇, 遠藤 圭, 長間馨一：時化が垂下養殖ホタテガイ稚貝のトリグリセライド含有量に及ぼす影響。北水試研報。70, 105-111 (2006)
- 6) 宮園 章, 奥村裕弥, 長間馨一, 佐々木恒光：養殖作業ストレスによるホタテガイ *Mizuhopecten yessoensis* 稚貝のトリグリセライド含有量変化の可能性 (短報) 北水試研報。73, 61-63 (2008)
- 7) 林賢治, 山田実：貝類の脂質 V. ホタテガイの組成脂肪酸について。北大水産彙報。26, 182-191 (1975)
- 8) Takagi, T., K. Hayashi and Y. Itabashi: Toxic effect of free unsaturated fatty acids in the mouse assay of diarrhetic shellfish toxin by intraperitoneal injection. *Bulletin of the Japanese Society of*

- Scientific Fisheries*, 50, 1413-1418 (1984)
- 9) Itabashi, Y. and T. Ota: Lipase activity in scallop hepatopancreas. *Fisheries Science*. 60, 347 (1994)
 - 10) Smoot, J. C. and R. H. Findlay: Digestive enzyme and gut surfactant activity of detritivorous gizzard shad (*Dorosoma cepedianum*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 57, 1113-1119 (2000)
 - 11) Christian, A. D., B. N. Smith, D. J. Berg, J. C. Smoot and R. H. Findlay: Tropic position and potential food sources of 2 species of unionid bivalves (Mollusca: Unionidae) in 2 small Ohio streams. *J. N. Am. Benthol. Soc.*, 23, 101-103 (2004)
 - 12) Mitsuhashi Jun: Comparison of zymograms of some insect cell lines by means of APIZYM system. *Appl. Ent. Zool.*, 25, 535-537 (1990)
 - 13) 岸村栄毅, 林賢治: ニチリンヒトテ幽門盲のうホスホリパーゼA 2様酵素の生成と性質. 日水誌, 64., 264-269 (1998)
 - 14) Hameed, P. S.: Lipase activity in the crystalline style of some bivalve molluscs. *Current Science*. 56, 432-433 (1987)