

コイ筋組織のアセチルコリンエステラーゼに関する研究

環境システム工学課程 環境生物化学研究室 齋藤恵子
指導教官 山田良平 解良芳夫 高橋祥司

1. 背景と目的

アセチルコリンエステラーゼ (AChE) は、神経伝達物質であるアセチルコリンを加水分解することにより、シナプスにおける神経刺激伝達を終結させるセリン加水分解酵素であり、この酵素は有機リン酸エステル類によって不可逆的に阻害される。有機リン系化合物による魚類の脳や筋組織での AChE 比活性の減少は、有機リン系化合物曝露に対するバイオマーカーになると考えられ、様々な魚類で AChE 酵素活性が調べられている。しかし、現在の評価方法では g tissue あたりの酵素活性により比活性を求めているため、個体の大きさにより比活性が変わる。そこで、当研究室では、全国の河川に生息するコイの AChE を用いて、個体差に影響されずに、有機リン系化合物の神経毒性に対する新規評価法の開発を目指している。そのため、本研究ではまだ明らかにされていない成育段階による個体差で、AChE の酵素量や存在様式がどのように変化するか調べることにした。

2. コイ組織 Homogenate の AChE および Butyrylcholinesterase (BtChE) の活性測定に及ぼす iso-OMPA 添加の影響

活性測定には、Acetylthiocoline、Butyrylthiocoline を基質に用いるが、Acetylthiocoline を基質として活性測定を行った場合、全 cholinesterase 活性 (AChE、BtChE) を測定することになる。そこで、AChE 活性のみを求めるために、BtChE を特異的に阻害する iso-OMPA (Tetra isopropylphosphoramidate) を添加することにした。しかし、iso-OMPA は高濃度で AChE を阻害する可能性がある。そこで、BtChE だけを阻害する濃度を肝臓、腎臓、脳、筋組織を用いて検討した。

Fig.1 より、肝臓、腎臓、脳において、100 μ M の iso-OMPA では約 90% の阻害が見られた。またこの濃度での精製 AChE 活性の阻害は 6% 程度だった。

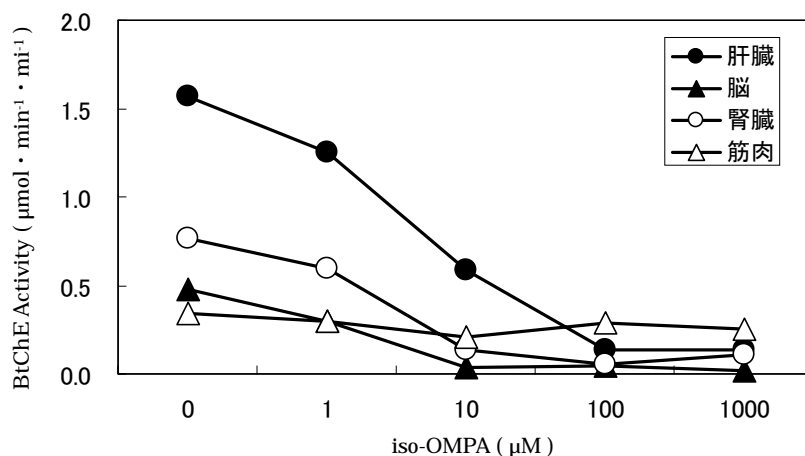


Fig.1 コイ各組織における BtChE 活性に及ぼす iso-OMPA の影響

3. コイ筋組織での AChE および BtChE 活性測定条件の検討

ここでは 100 μ M の iso-OMPA で、実際に個体差でどのような AChE、BtChE 活性の変化が現れるか違いを見ることにした。個体差を比較する為に、実験で用いるコイは 30g、70g、200g、1000g の 4 個体を使用した。また、可溶化を行う Buffer は LS (遊離型)、LS/D (GPI アンカー型)、HS (コラーゲンテイル型)、HS/D (3つの型を一度に可溶化) を用いた。その結果、Acetylthiocholine を基質として AChE 活性を iso-OMPA 有無の場合で測定したところ、両者の組織 1g あたりに対する活性に大きな変化は見られなかった。一方、Butyrylthiocholine を基質として、BtChE 活性を iso-OMPA 有無の場合で測定すると、組織 1g あたりに対する活性は、iso-OMPA を添加しなかった場合と比較し低くなった。しかし、活性は約 50%残った。この残存活性は Butyrylthiocholine に対する AChE 活性と考えられ、BChE の活性を測定する際の AChE の影響は大きい。よって、以降の BtChE 活性測定には iso-OMPA を用い、BtChE の活性値は iso-OMPA を無添加時の活性値から、iso-OMPA を添加した時の活性値を差し引いた値を用いることにした。

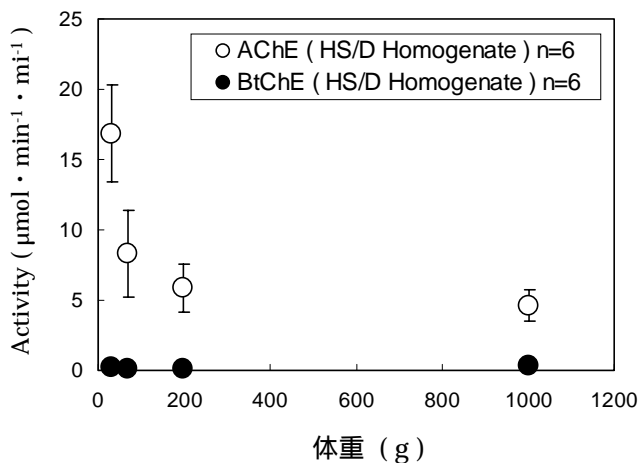


Fig.2 コイ筋組織における AChE と BtChE 活性に及ぼす大きさの違い

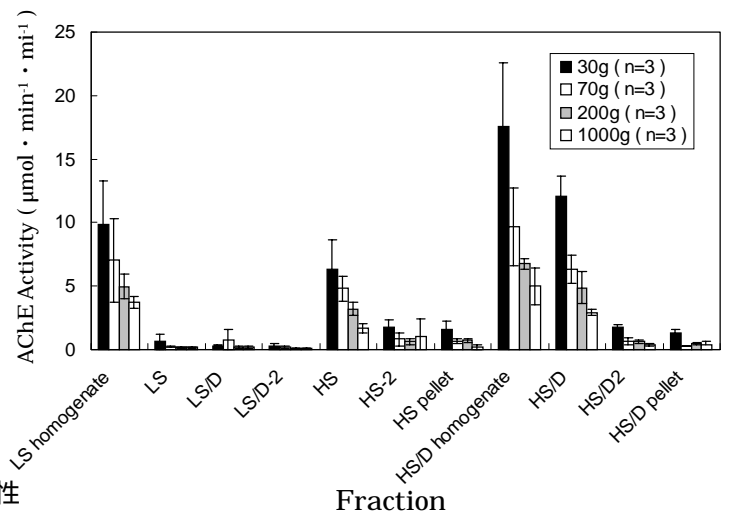


Fig.3 AChE の存在様式に及ぼす大きさの違い

4. 各個体における筋組織中の AChE および BtChE 活性の比較

当研究室が目指している新規評価方法に影響する要因として、酵素の特性や個体差でのコイ AChE の存在様式がある。そこで、コイの体重の変化による筋組織中の AChE 活性、またその存在様式について検討した。

Fig.2 より、AChE 活性は個体が大きくなるにつれて減少したのに対し、BtChE 活性は筋組織ではかなり低く、個体差による変化は見られなかった。

Fig.3 より、可溶化された AChE の存在様式のうち、個体差に関係なく活性のほとんどが Buffer HS であり、筋組織中の AChE の存在様式はコラーゲンテイル型であることが示された。また Buffer HS/D では、ほとんどの活性を回収できた。よって、新規評価方法では、Buffer HS/D を使用することで簡単に測定できると考えられる。