

## 鉛およびカドミウムによるコイ赤血球中5-アミノレ ブリン酸脱水酵素の活性阻害様式

中川, 浩一  
福岡県水産海洋技術センター豊前海研究所

中川, 久機  
九州大学農学部水産化学第一講座

麻生, 陽一  
蛋白質化学工学研究室

<https://doi.org/10.15017/23559>

---

出版情報：九州大学農学部学藝雑誌. 50 (1/2), pp.51-57, 1995-11. 九州大学農学部  
バージョン：  
権利関係：

## 鉛およびカドミウムによるコイ赤血球中 5-アミノレブリン酸脱水酵素の活性阻害様式

中川 浩一\*・中川 久機・麻生 陽一\*\*

九州大学農学部水産化学第一講座

(1995年7月20日受理)

### The Type of Inhibition of Erythrocyte 5-Aminolevulinic Acid Dehydratase Activity in the Blood of Carp *Cyprinus carpio* Caused by Lead and Cadmium

Koichi NAKAGAWA, Hisaki NAKAGAWA and Yoichi ASO

Laboratory of Fisheries Chemistry, Faculty of Agriculture,  
Kyushu University, Fukuoka 812-81

#### 緒 言

魚類血液中の5-アミノレブリン酸脱水酵素 (ALA-D, EC 4.2.1.24) は、その活性が鉛汚染魚で特異的に低下することから、水域の鉛汚染の指標として有用である (Hodson *et al.*, 1977; Johansson-Sjöbeck and Larsson, 1979; Schmitt *et al.*, 1984; Larsson *et al.*, 1985)。また、わが国の淡水域に広く生息するコイ *Cyprinus carpio* の血液中 ALA-D も水の鉛汚染の指標として有用なことが明らかにされた (Nakagawa *et al.*, 1995)。ヒトの血液中 ALA-D も鉛汚染の診断指標として用いられているが、鉛によるその阻害様式は非競争阻害であると報告されている (Granick *et al.*, 1973)。さらに、重金属であるカドミウムへの flounder *Pleuronectes flesus* の曝露は腎臓の ALA-D 活性の増大を伴うことが、報告されている (Johansson-Sjöbeck and Larsson, 1978)。本研究では、鉛およびカドミウムによるコイ血液の ALA-D 活性阻害様式を *in vitro* 試験およびこれら重金属汚染魚について検討するとともに、血液 ALA-D 活性が鉛汚染魚で特異的に低下する理由を明らかにした。また、この酵素の反応速度に対する反応液の pH および反応温度の影響を調べた。

\* 福岡県水産海洋技術センター豊前海研究所

\*\* 蛋白質化学工学研究室, Laboratory of Protein Chemistry and Engineering

本研究を行うにあたり、鉛およびカドミウム濃度測定のご指導を頂いた九州大学中央分析センターの渡辺美登里博士に厚くお礼申し上げる。

#### 材料及び方法

供試魚：供試したコイは熊本県の養魚場から購入した。既報 (Nakagawa *et al.*, 1995a) に従って供試魚を飼育水に馴致した。供試魚は体長 9~11cm、体重 20~28g であった。

ALA-D 活性測定：ALA-D 活性測定は塩化第二水銀を使用しない改良法で行った (Nakagawa *et al.*, 1995b)。ただし、酵素の活性測定は 37℃ で 30 分間とした。ALA-D 活性値、すなわち反応速度 (V) は Hodson *et al.* (1977) の換算式に従って、赤血球 (RBC) 1ml 当り 1 時間に生成するポルホビリノーゲン (PBG) 量、即ち nmol PBG/ml RBC/h で表した。なお、採血およびヘマトクリット (Hct) の測定は既報 (Nakagawa *et al.*, 1995a) に従って行った。

ALA-D 活性に対する反応液の pH の影響試験：0.1 M のリン酸緩衝液 (pH 5.0~8.0) および酢酸緩衝液 (pH 5.0~6.8) で調製した種々な pH の反応液で、ALA-D 活性を測定し、その活性に対する反応液の pH の影響を調べた。

ALA-D 活性に対する反応温度の影響試験：ALA-D 活性を反応温度 10~100℃ の範囲で測定し、その活

性に対する 反応温度の影響を調べた。

ALA-D 活性を50%阻害する鉛およびカドミウム濃度の算出試験：種々濃度の鉛およびカドミウムを含んだ基質アミノレブリン酸を除いた反応液中に、血液を30分間曝露した。その後基質を加え、ALA-D 活性を測定し、ALA-D 活性を50%阻害する鉛およびカドミウム濃度を算出した。試験した重金属の濃度は、0 (対照区)、0.01、0.1、1.0、10、100、1000および10,000  $\mu\text{M}$ であった。なお、鉛はリン酸緩衝液に難溶なために、鉛試験の反応液の緩衝液は0.1Mの酢酸緩衝液を用いた。

鉛およびカドミウムによる ALA-D 活性阻害様式の解析：In vitro での ALA-D 活性阻害様式の検討には、前述の ALA-D 活性50%阻害試験結果から、活性を約50%程度阻害する重金属濃度10  $\mu\text{M}$ を添加した血液を用いた。後述する鉛およびカドミウム汚染魚の血液 ALA-D 活性阻害様式の検討には、3週間それぞれの重金属に曝露したコイから採血した血液を用いた。なお、Fig. 1に示すように、未汚染コイ血液について酵素反応時間内での基質濃度の逆数 ( $1/S$ ) と反応速度の逆数 ( $1/V$ ) のグラフが一次式になることは前もって確認しておいた。その結果、Km 値が約0.75mMであったことから、反応液の基質の最終

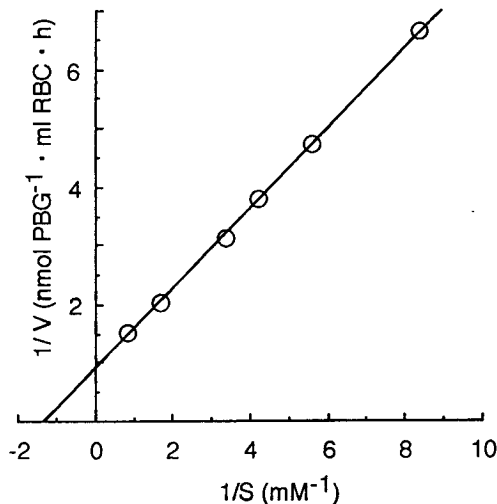


Fig. 1. The Lineweaver-Burk reciprocal plots of carp blood ALA-D activity ( $V$ ) and substrate concentration ( $S$ ). The activity was measured by using the blood of uncontaminated fish.

濃度が0.2, 0.42および0.83mMで ALA-D 活性測定を行った。阻害様式の解析は Lineweaver-Burk の逆数プロットによった。

鉛およびカドミウム汚染魚：既報 (Nakagawa *et al.*, 1995a) に従って、鉛およびカドミウム試験水にコイを曝露した。2週間の曝露試験後、血液 ALA-D 活性の測定を行うとともに、血液に存在する鉛およびカドミウムの血球および血漿成分中の濃度を調べた。3週間の曝露試験後、鉛およびカドミウム汚染コイの血液について、ALA-D 活性阻害様式を検討した。曝露試験濃度は、鉛で100ppb (0.48  $\mu\text{M}$ )、カドミウムで54.3ppb (0.48  $\mu\text{M}$ ) および100ppbであった。なお、鉛濃度100ppbに曝露したコイ血液の ALA-D 活性が低下することは、すでに報告されている (Nakagawa *et al.*, 1995a)。試験期間を通して水温は26~28°C、試験水の pH は7.4~8.0であった。

血球および血漿成分中の鉛およびカドミウム濃度：鉛およびカドミウム汚染魚の血液について、血球および血漿成分中の鉛およびカドミウム濃度を調べた。血液から血球および血漿成分の分離は以下のように行った。血液を冷却遠沈 (2,000rpm, 5min) し、上澄液を血漿成分とした。沈殿物に0.9%食塩水を添加し、懸濁させた後再度冷却遠沈した。沈殿物の洗浄および遠沈処理は計3回行い、処理血液の3倍容量の0.9%食塩水で懸濁させた成分を血球成分とした。全血、血球成分の Hct 値を測定し、それぞれ Hct-1および Hct-2とした。全血、血球および血漿成分中の鉛およびカドミウム濃度の分析は既報 (Nakagawa *et al.*, 1995a) に従って行った。血球成分の鉛およびカドミウム濃度は100/Hct-2を乗じることで算出した。なお、血液の分離操作に伴う重金属の消失を確認するために、回収率を求めた。回収率は次式で表した。

$$\text{回収率 (\%)} = \left[ \frac{\text{血球成分の重金属濃度} \times \text{Hct-1}}{100 + \text{血漿成分の重金属濃度} \times (100 - \text{Hct-1})} \right] \times 100$$

## 結果および考察

### 1. ALA-D 活性に対する反応液の pH の影響

種々な pH の反応液における ALA-D 活性を Fig. 2に示す。リン酸緩衝液の場合、ALA-D 活性のグラフは pH 6.0に最大ピークを有する pH 5.5~6.5の広い範囲で高い活性を示した。ニジマス *Oncorhynchus mykiss* の血液 ALA-D 活性と反応液の pH との関係を示すグラフでも同様な観察が報告されている (Hodson *et al.*, 1977)。このピークが広いことは、

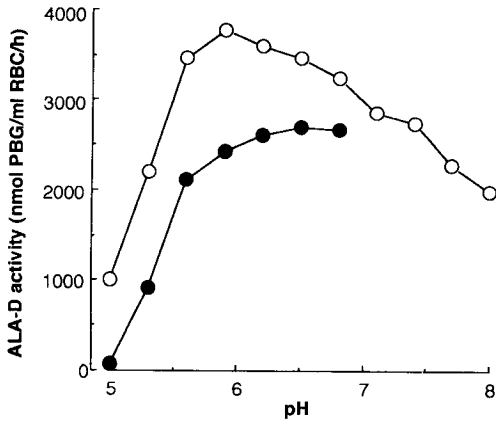


Fig. 2. Variations in carp blood ALA-D activity according to the pH of the reaction mixture. The activity was measured by using the blood of uncontaminated fish. O: 0.1 M phosphate buffer; ●: 0.1 M acetate buffer.

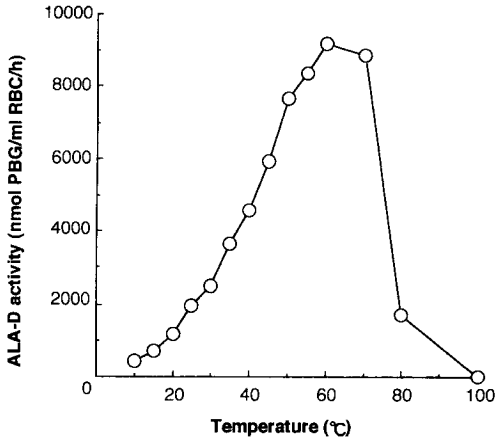


Fig. 3. Variations in carp blood ALA-D activity according to the reaction temperature. The activity was measured by using the blood of uncontaminated fish.

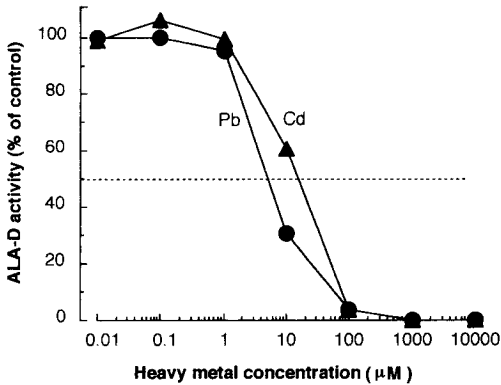


Fig. 4. The effects of Pb and Cd on carp blood ALA-D activity. ALA-D activities were measured in reaction mixtures containing different Pb and Cd concentrations.

ALA-D 活性測定の時 pH のわずかな変化でも測定値に余り影響しないことを示している。酢酸緩衝液の場合、pH 5.8~6.8の範囲で高い活性を示した。ALA-D 活性と反応液の pH との関係を示すグラフが、リン酸緩衝液と酢酸緩衝液とで少し異なる原因は不明である。

## 2. ALA-D 活性に対する反応温度の影響

反応温度による ALA-D 活性の変化を Fig. 3 に示

す。その活性は60°Cまで温度上昇とともに急激に増大したが、70°C以上の温度では急激に活性が低下した。この酵素が熱に安定な酵素であることを示すとともに、活性測定の時温度の変化に注意が必要であることを示している。

## 3. 血液 ALA-D 活性を50%阻害する鉛およびカドミウム濃度

種々な濃度の鉛およびカドミウムによる ALA-D 活性阻害を Fig. 4 に示す。その活性値は対照区の活性を100%とした場合の相対値で示してある。鉛およびカドミウム濃度の上昇とともに活性は低下した。ALA-D 活性50%阻害濃度は、鉛で5 μM、カドミウムで20 μMであった。

## 4. 鉛およびカドミウムによる ALA-D 活性阻害様式

鉛およびカドミウムの ALA-D 活性50%阻害濃度近辺の10 μM で血液 ALA-D 活性阻害様式を検討した時 (in vitro)、基質濃度の逆数 (1/S) および反応速度の逆数 (1/V) を Lineweaver-Burk の逆数プロットに従ってプロットしたグラフを Fig. 5 に示す。鉛およびカドミウム添加区ともに ALA-D の Km 値を変化させず、Vmax を変化させたことから、鉛およびカドミウムによる ALA-D 活性阻害様式は非競争的阻害であると考えられる。一方、鉛およびカドミウムに汚染したコイ血液の ALA-D 活性阻害様式を検討した時の Lineweaver-Burk の逆数プロットのグ

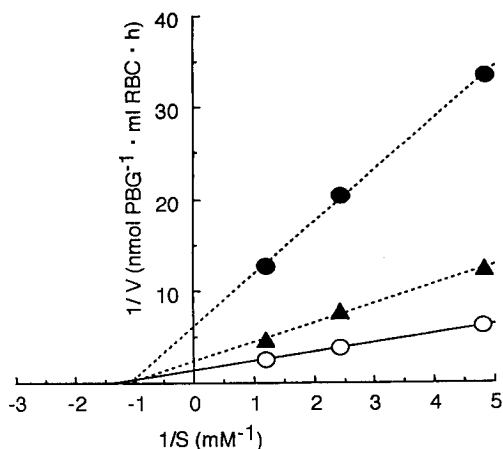


Fig. 5. Reciprocal plots of carp blood ALA-D activity ( $V$ ) and substrate concentrations ( $S$ ) according to the addition of Pb or Cd to the reaction mixture. ○: not addition; ●: addition of Pb ( $10 \mu\text{M}$ ); ▲: addition of Cd ( $10 \mu\text{M}$ ).

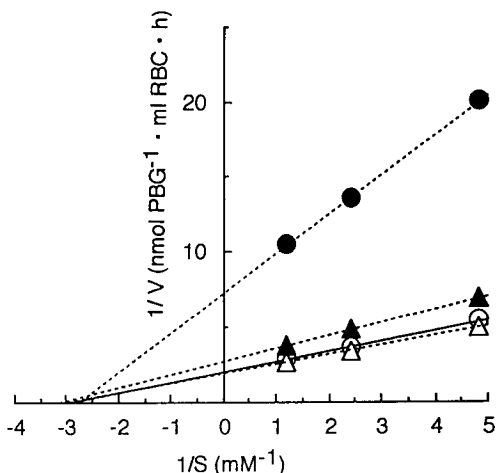


Fig. 6. Reciprocal plots of ALA-D activity ( $V$ ) in Pb- and Cd-contaminated carp blood and substrate concentrations ( $S$ ). The fish were exposed for three weeks to water Pb at a level of 100ppb, and to water Cd at levels of 54.3 and 100ppb, respectively. ○: uncontaminated fish; ●: Pb-contaminated fish; ▲: Cd-contaminated (100ppb) fish; △: Cd-contaminated (54.3ppb) fish.

ラフを Fig. 6 に示す。鉛汚染魚では未汚染魚に比べて、ALA-D の  $K_m$  値は同じであるが、 $V_{max}$  が変化することから前述の *in vitro* での ALA-D 活性阻害様式と同様に非競争的阻害であると考えられる。カドミウム汚染魚と未汚染魚とは同様な ALA-D 活性値を示すことから、カドミウムによる ALA-D 活性阻害は起こらなかった。鉛によるヒト血液 ALA-D の活性阻害様式は非競争的阻害と報告されている (Granick *et al.*, 1973)。以上の結果から、鉛は基質とは別の場所に結合し、ALA-D の活性部位を修飾することなく、この酵素に結合し活性阻害を起こすと考えられる。なお、Figs. 1 および 5 に示した  $K_m$  値と Fig. 6 に示した  $K_m$  値との間に、若干値のずれがあるが、これは添加基質の測定誤差で、阻害様式自体に変化はないと判断した。

#### 5. 鉛およびカドミウム汚染コイの血球および血漿成分中の鉛およびカドミウム濃度

鉛およびカドミウムに 2 週間曝露させたコイ血液の血球および血漿成分中の重金属濃度を Table 1 に示す。対照魚の血液中カドミウム濃度が希薄なためにその回収率が 61.4% と低い以外は、回収率は 97.4~115.6% なので、血液の血球および血漿成分への分離操作に伴う測定誤差は無視された。鉛汚染魚では対照魚に比べ血球成分中の鉛濃度が著しく高濃度であるのに対して、血漿成分中の濃度はほぼ変わらなかった。すなわち、血液中に取り込まれた鉛は血球成分中に特異的に濃縮された。一方、対照魚に比べてカドミウム汚染魚の血球および血漿成分中のカドミウム濃度はともに増大したが、鉛汚染魚の血球成分中の鉛濃度のようにその濃度が著しく上昇することはなかった。なお、鉛汚染魚の血漿成分中の鉛濃度が対照魚のそれよりも低いのは、低濃度のために起こった測定誤差と考えられた。

#### 6. 鉛およびカドミウム汚染コイ血液の ALA-D 活性

鉛およびカドミウムに 2 週間曝露されたコイ血液の ALA-D 活性を Table 2 に示す。鉛汚染魚の ALA-D 活性は対照魚の活性の 43.5% へと低下した。一方、カドミウム濃度の 54.3 および 100ppb への曝露魚では、ALA-D 活性の低下は観察されなかった。

Fig. 4 に示した鉛およびカドミウムによる ALA-D 活性 50% 阻害濃度の試験結果および Fig. 5 に示した *in vitro* での鉛およびカドミウムによる活性阻害様式の検討結果から、血液 ALA-D 活性阻害は血液に鉛およびカドミウムを添加すると起こるので、活性阻害は鉛によって起こる特異的な反応ではない。しか

**Table 1.** Pb and Cd levels in the blood corpuscles and blood plasma of Pb- and Cd-contaminated carp.

	Pb and Cd levels (ppb) in carp blood				
	Exposure concentration (ppb)				
	Pb		Cd		
	0	100	0	54.3	100
Total blood	24.6	1658.5	0.7	18.1	29.8
Blood corpuscles	86.0	6225.8	1.1	26.0	48.0
Blood plasma	3.6	1.6	0.2	19.3	23.2
Recovery (%)	101.7	101.5	61.4	115.6	97.4

The fish were exposed for two weeks to water Pb at a level of 100ppb, to water Cd at levels of 54.3 and 100ppb, and to control water (0ppb), respectively.

**Table 2.** ALA-D activity in the blood of Pb- and Cd-contaminated carp.

	Exposure concentration (ppb)		
	Pb	Cd	
	100	54.3	100
ALA-D activity (% of control fish)	43.5	98.2	106

The fish were exposed for two weeks to water Pb at a level of 100ppb, to water Cd at levels of 54.3 and 100ppb, and to control water (0 ppb), respectively.

しながら, Fig. 6 および Table 2 に示すように, 血液 ALA-D 活性阻害が鉛汚染魚に起こり, カドミウム汚染魚で起こらないことは, 次のように説明される. コイの鰓から取り込まれた鉛は, Table 1 に示すように, 血液の血球成分中に特異的に蓄積するのに対して, カドミウムは血液の血球および血漿成分中に存在するが, 鉛に見られたように血球成分中に高濃度に蓄積されることはない. 血液 ALA-D は赤血球に存在する酵素であるので, 血球成分中に特異的に高濃度蓄積される鉛が赤血球 ALA-D の重金属結合部位と特異的に結合する. 即ち, 血球成分中に存在する鉛の量が ALA-D 活性阻害の程度を決定する. このことが, コイ血液 ALA-D 活性阻害が鉛汚染魚で特異的に起こる理由である.

## 要 約

コイ *Cyprinus carpio* 血液中の5-アミノレブリン酸脱水酵素 (ALA-D) は, 鉛 (Pb) 汚染魚で特異的にその活性が低下することから, 水域の鉛汚染の指標として有用である. 本研究では, コイ血液 ALA-D について, Pb およびカドミウム (Cd) による活性阻害様式を検討するとともに, Pb 汚染魚で特異的にその活性が低下する理由を, さらに, この酵素の反応速度に対する pH および反応温度の影響を調べ, 以下の結果を得た.

1. 反応液の pH に対する ALA-D 活性のグラフは, リン酸緩衝液の場合 pH 6.0 に最大ピークを有する pH 5.5~6.5 の広い範囲で高い活性を示した. また, 酢酸緩衝液の場合 pH 5.8~6.8 の範囲で高い活性を示した.

2. ALA-D 活性は, 反応温度 60℃ まで温度上昇とともに急激に増大したが, 70℃ 以上の温度では急激に低下した.

3. In vitro 試験で血液 ALA-D 活性を 50% 阻害する Pb および Cd 濃度は, Pb で 5  $\mu$  M, Cd で 20  $\mu$  M 程度であった.

4. In vitro 試験では Pb および Cd によって, Pb 汚染魚では未汚染魚に比べて, 基質濃度の増加は血液 ALA-D の酵素反応の Km 値を変化させず, Vmax を変化させたことから, ALA-D 活性阻害様式は非競争的阻害であると考えられる. Cd 汚染魚と未汚染魚とは同様な ALA-D 活性値を示すので, Cd による活性阻害は起こらなかった.

5. Pb 汚染魚では血球成分中に著しく高濃度の Pb が存在したが、血漿成分中の濃度は未汚染魚とはほぼ変わらなかった。一方、Cd 汚染魚の血球および血漿成分中の Cd 濃度は未汚染魚に比べて増大したが、血球成分中の Pb 濃度のように著しく高濃度にはならなかった。

6. 血液 ALA-D 活性阻害は、Pb 汚染魚で観察されるが、Cd 汚染魚では観察されない。この理由は以下のように説明される。鰓から取り込まれた Pb は血液の血球成分中に高濃度に蓄積するが、Cd は Pb のように血球成分中に特異的に蓄積されることはない。血液 ALA-D は赤血球に存在する酵素なので、血球成分中に高濃度に蓄積された Pb と ALA-D が結合する。即ち、血球成分中に蓄積された Pb の量が ALA-D 活性阻害の程度を決定する。

## 文 献

- Granick, J. L., S. Sassa, S. Granick, R.D. Levere and A. Kappas 1973 Studies in lead poisoning II. Correlation between the ratio of activated to inactivated  $\delta$ -aminolevulinic acid dehydratase of whole blood and the blood lead level. *Biochem. Med.*, 8: 149-159
- Hodson, P. V., B. R. Blunt, D. J. Spry and K. Austen 1977 Evaluation of erythrocyte  $\delta$ -aminolevulinic acid dehydratase activity as a short term indicator in fish of a harmful exposure to lead. *J. Fish. Res. Bd. Can.*, 34: 501-508
- Johansson-Sjöbeck, M. L. and Å. Larsson 1978 The effect of cadmium on the hematology and on the activity of  $\delta$ -aminolevulinic acid dehydratase (ALA-D) in blood and hematopoietic tissues of the flounder, *Pleuronectes flesus* L. *Environ. Res.*, 17: 191-204
- Johansson-Sjöbeck, M. L. and Å. Larsson 1979 Effects of inorganic lead on delta-aminolevulinic acid dehydratase activity and hematological variables in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 8: 419-431
- Larsson, Å., C. Haux and M.-L. Sjöbeck 1985 Fish physiology and metal pollution: Results and experiences from laboratory and field studies. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 9: 250-281
- Nakagawa, H., K. Nakagawa and T. Sato 1995a Evaluation of erythrocyte 5-aminolevulinic acid dehydratase activity in the blood of carp *Cyprinus carpio* as an indicator in fish with water lead pollution. *Fish. Sci.*, 61: 91-95
- Nakagawa, H., T. Sato and H. Kubo 1995b Method not requiring mercuric chloride for the determination of activity of 5-aminolevulinic acid dehydratase in blood of carp *Cyprinus carpio*. *Fish. Sci.*, 61: 97-99
- Schmitt, C. J., F. J. Dwyer and S. E. Finger 1984 Bioavailability of Pb and Zn from mine tailings as indicated by erythrocyte  $\delta$ -aminolevulinic acid dehydratase (ALA-D) activity in suckers (Pisces: Catostomidae). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 41: 1030-1040

## Summary

5-Aminolevulinic acid dehydratase (ALA-D) in blood of carp *Cyprinus carpio* can be used as an indicator of water lead (Pb) pollution, because ALA-D activity is inhibited by lead contamination. The present study was performed in order to examine the type of inhibition of ALA-D activity in carp blood caused by Pb and cadmium (Cd), in order to explain the reason why the blood ALA-D activity of Pb-contaminated carp is particularly depressed, and in order to ascertain the effects of the pH of the reaction mixture and the reaction temperature on the ALA-D-catalyzed reaction of carp blood.

The results were summarized as follows.

1) In the case of 0.1M phosphate buffer, a graph of the pH of the reaction mixture versus ALA-D activity showed a broad peak between 5.5 and 6.4 with the maximum activity at pH 6.0.

2) At temperatures of up to 60°C, ALA-D activity increased rapidly with elevating reaction temperatures, however, this activity decreased sharply at temperatures greater than 70°C.

3) Under in vitro ALA-D-catalyzed reaction in reaction mixture containing Pb and Cd, whilst comparing the blood ALA-D of Pb-contaminated fish with that of control fish, increasing substrate concentrations were not found to alter the Km value and shifted the Vmax (maximum velocity). Therefore, it was concluded that the type of inhibition of blood ALA-D activity caused by Pb and Cd is non competitive inhibition. Since the activity values of Cd-contaminated fish were similar to those of the control fish, the exposure of carp to water Cd did not inhibit blood ALA-D activity.

4) Pb of remarkably high levels was accumulated in the blood corpuscles of Pb-contaminated fish. However, the Pb level of the blood plasma was similar to that of the control fish. On the other hand, in comparison with that of the control fish, Cd levels both in the corpuscles and in the plasma of Cd-contaminated fish did increase, however unlike the Pb levels in the blood corpuscles, they did not increase remarkably.

5) An inhibition of blood ALA-D activity was observed in the Pb-contaminated carp, but was not observed in the Cd-contaminated carp. The reason for this can be explained by the following. Pb taken up through the gills became accumulated at a remarkably high level within the blood corpuscles. However, unlike Pb, the Cd taken up did not become accumulated at high levels within the corpuscles. Blood ALA-D is an enzyme which is present in erythrocytes, and erythrocyte ALA-D combines with Pb within the blood corpuscles. The inhibitory degrees of blood ALA-D activity caused by Pb, depend upon the amounts of Pb which become accumulated within the blood corpuscles.