

# ブタ肝臓マイクロゾームのDCPA分解酵素の精製と若干の性質

木村貴生・児玉 治・赤塚尹巳

## 緒 言

除草剤DCPA (3,4-ジクロロプロピオンアニリド) はイネ-ヒエ間の選択性除草剤として広く使用され、その選択性の発現はイネに特異的に存在するDCPA分解酵素であるアリアルシルアミダーゼ I によるDCPAの不活性化に起因することが知られている<sup>1)</sup>。一方、動物体内においてもアミダーゼ、エステラーゼの存在が報告されている。中でもとくに豚肝臓マイクロゾームの非特異的エステラーゼとして知られているカルボキシルエステラーゼについては、KrischやMainらのグループによって可溶性・精製され、その性質は詳細に研究されてきた<sup>2,3)</sup>。しかし、ほ乳動物においてはDCPA代謝の酵素レベルでの研究はなされていないのが現況である。

筆者らは豚肝臓マイクロゾーム画分にDCPA分解酵素活性を見だしトリトンX-100による可溶化後、バイオビーズSM-2によりトリトンX-100を除去し、ゲル濾過およびヒドロキシルアパタイトカラムクロマトグラフィーにより精製し、本酵素の若干の性質を明らかにした。

なお、本報告で対象とした酵素はカルボキシルエステラーゼ [EC.3.1.1.1] に属すると考えられる。

## 試料および方法

### 1. 試料

屠殺直後のブタ肝臓を使用した。なお、この試料はコアミ畜産より恵与された。

### 2. 試薬

バイオビーズSM-2はBIO-RAD Laboratories, セファデックス G-200はPharmacia Chemicals, ヒドロキシルアパタイトはBDH Chemicals Ltd.よりそれぞれ購入し実験に使用した。アルコールデヒドロゲナーゼはBoeinger Mannheim, カタラーゼ, ヘモグロビン, 卵アルブミンはSigma Chemical Companyよりそれぞれ購入した。なおチトクロムCは日研化学より恵与された。

### 3. ミクロゾームの調製

豚肝臓を細断し、冷却した1mMEDTAおよび0.25M ショ糖を含む0.01M ホウ酸緩衝液 (pH8.0) で十分洗浄し血液を除去した後、同緩衝液中でホモジネー

トした。この摩砕液をガーゼ濾過し、濾液を12,000xg, 20分間遠心分離し、その上澄みを105,000xg, 60分間遠心分離した。この105,000xg沈殿物を50mM ホウ酸緩衝液 (pH8.0) に懸濁してマイクロゾーム画分とした。

4. トリトンX-100によるDCPA分解酵素の可溶性  
マイクロゾームは50mM ホウ酸緩衝液 (pH8.0) で10mg/mlの濃度に調整し、一定量のトリトンX-100を添加し、4℃で約12時間攪拌した後、105,000xg, 60分間遠心し、その上澄みを分取した。

5. バイオビーズSM-2によるトリトンX-100の除去  
前処理としてバイオビーズSM-2は0.05%トリトンX-100溶液中で30分間攪拌後、ガラスフィルターで濾別し蒸留水で十分洗浄して使用した。トリトンX-100による可溶化上澄み液に対して、前処理したバイオビーズSM-2を20% (w/v) になるように加え、4℃で1時間以上攪拌し、ガラスフィルターで濾過し、濾液は微細粒子を除去するために、30,000xg, 30分間遠心分離した。

### 6. タンパク質の定量

Lowry法<sup>4)</sup> によって測定した。標準物質として牛血清アルブミンを使用した。

### 7. 酵素活性の測定法

#### a) DCPAを基質とする場合

酵素反応により遊離する3,4-ジクロロアニリンを児玉・赤塚の方法<sup>5)</sup> を一部改変して定量した。すなわち、DCPA基質緩衝液はDCPA8.7mgをエタノール1mlに溶解後、0.05Mホウ酸緩衝液 (pH8.0) を加え100mlとした。このDCPA基質緩衝液0.4mlに酵素液0.1mlを加えて、37℃一定時間反応させ、0.2N-HCl溶液0.5mlを加えて反応を停止した後、0.05% *p*-ジメチルシンナムアルデヒドのエタノール溶液2mlを加え、10分間放置後540nmにおける吸光度を測定し、3,4-ジクロロアニリンを定量した。1分間に1  $\mu$  moleの3,4-ジクロロアニリンを遊離する酵素量を1単位とした。

#### b) エチル *n*-ブチレート

を基質とする場合  
酵素反応によって生成するブチル酸を以下の方法により定量した。基質溶液は、クレゾールレッド6mgを蒸留水に溶解し100mlにした溶液65ml, 0.1Mホウ酸緩衝液 (pH8.0) 30ml, エチル *n*-ブチレート

0.3ml および蒸留水 100ml を混合し、0.1N - HCl で pH8.0 に調製した後、蒸留水で 300ml にし調製した。この基質溶液 3.0ml に酵素液 0.02ml を加え、25℃ で反応させ、自記分光光度計を用いて 578nm の吸光度の経時変化を測定し、1 分間に 1  $\mu$  mole のブチル酸を遊離する酵素量を 1 単位とした。

c) *p*-ニトロフェニル酢酸を基質とする場合

酵素反応によって生成する *p*-ニトロフェノールを以下の方法により定量した。0.1M ホウ酸緩衝液 (pH8.0) 3.0ml に酵素液 0.02ml および 0.05M *p*-ニトロフェニル酢酸のアセトン溶液 0.03ml を加えて、25℃ で反応させ、自記分光光度計を用いて 400nm の吸光度の経時変化を測定した。1 分間に 1  $\mu$  mole の *p*-ニトロフェノールを遊離する酵素量を 1 単位とした。

8. ディスク電気泳動

Davis の方法<sup>6)</sup> を一部改変して行った。7.5% アクリルアミドゲルおよび 0.1M トリス-ホウ酸緩衝液 (pH8.3) を泳動用緩衝液として使用し、濃縮用ゲルおよび試料用ゲルを省き、試料にショ糖を加えて、20% 溶液 (w/v) として分離用ゲルに添加し、4℃ でチューブ当り 3mA の定電流でチューブ 2 本を泳動した後、1 本のゲルはアミドブラック 10B で染色した。もう 1 本のゲルはカミソリを用いて 2.5mm の長さに切り、ゲル切片を試験管に入れ 0.05M ホウ酸緩衝液 (pH8.3) 0.5ml を加え、摩擦・攪拌し、一昼夜放置し、この抽出液の酵素活性を測定した。

9. 分子量の推定

a) ゲル濾過法

Andrews の方法<sup>7)</sup> に準じて酵素タンパク質の分子量を推定した。標準タンパク質としてアルコールデヒドロゲナーゼ (分子量: 150,000)、ヘモグロビン (分子量: 64,500)、チトクロム C (分子量: 13,000) を使用した。アルコールデヒドロゲナーゼ活性は Vallee の方法<sup>8)</sup> より測定し溶出位置を求め、ヘモグロビンとチトクロム C の溶出位置は 410nm の吸光度よりそれぞれの溶出位置を求めた。

b) SDS-PAGE 法

Shapiro の方法<sup>9)</sup> により行った。試料の SDS 処理は 10% 2-メルカプトエタノールおよび 10% SDS を予め調製し、それぞれ試料の 1/10 量を加え、一晚放置して行った。標準タンパク質としてカタラーゼ (サブユニット分子量: 60,000)、卵アルブミン (分子量: 45,000) およびチトクロム C (分子量: 13,000) を使用した。

実験結果

1. DCPA 分解酵素の細胞内局在性

Fig. 1 に豚肝臓の細胞内各画分における DCPA 分解活性の分布パターンを示した。この分布パターンから、DCPA 分解酵素活性がミクロゾームに局在していることを確認した。また、エチル *n*-ブチレート、*p*-ニトロフェニル酢酸を基質とした場合の分解活性の分布パターンも DCPA を基質とした場合の分解活性のそれとほぼ同様であった。

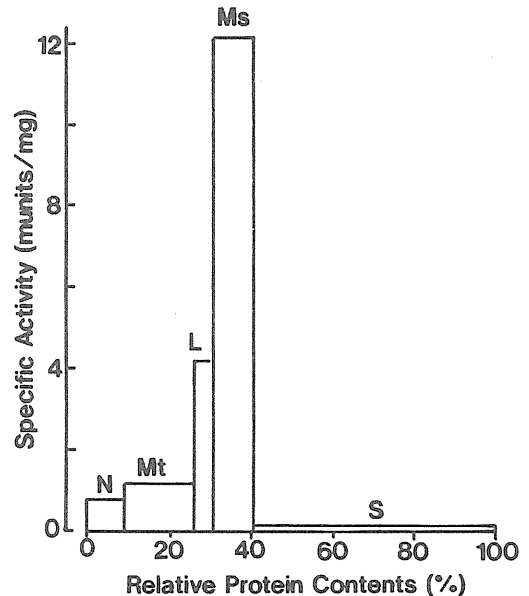


Fig. 1 Subcellular Distribution of DCPA Hydrolyzing Enzyme Activity in Pig Liver.

N, Mt, L, Ms, and S represent nuclear, mitochondrial, lysosomal, microsomal and soluble fractions, respectively.

2. トリトン X-100 による DCPA 分解酵素の可溶化

DCPA 分解酵素がミクロゾームに局在していることから、トリトン X-100 による可溶化の条件を検討した。Fig. 2 に示したように、DCPA 分解酵素活性はトリトン X-100 の濃度が 0.1% 以上ではほぼ 100% 可溶化した。しかし、高濃度のトリトン X-100 によりミクロゾームを処理すると著しい活性の減少が認められた。そこで、トリトン X-100 による可溶化後バイオビーズ SM-2 によるトリトン X-100 の除去を試みた。1.0% トリトン X-100 溶液にバイオビーズ SM-2 を加えると、トリトン X-100 の濃度を 0.001% まで下げることができた。トリトン X-100 による可溶化後、バイオビーズ SM-2 処理によるトリ

トンX-100の除去により、バイオビーズSM-2未処理の可溶性画分のDCPA分解活性に比べ、約150%活性が増加しトリトンX-100による阻害の影響を除くことができた。

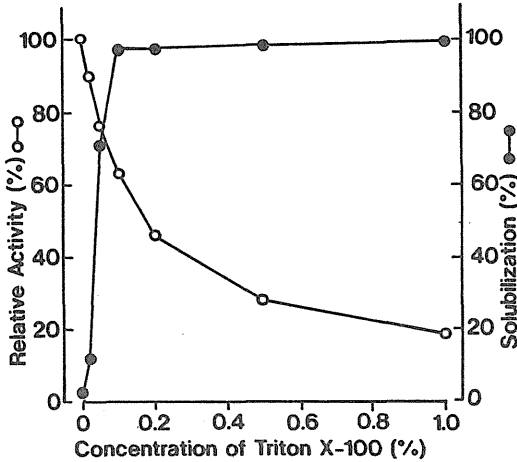


Fig. 2 Solubilization and Inactivation of DCPA Hydrolyzing Enzyme Activity by Triton X-100.

The enzyme activity of Triton X-100-treated microsomal fraction and solubilized fraction were measured.

### 3. DCPA 分解酵素の精製

前述した可溶化の条件にもとずいて、豚肝臓マイクロゾームからDCPA, エチル*n*-ブチレート, *p*-ニトロフェニル酢酸を同時に分解する酵素の精製法を検討した。最初に0.05Mホウ酸緩衝液 (pH8.0) に懸濁したマイクロゾーム溶液 (10mg/ml) に、トリトンX-100を0.1%になるように加え、4℃に約12時間攪拌した後、105,000xg, 60分間遠心分離した。得られた可溶性画分にバイオビーズSM-2を20% (w/v) になるように加え、4℃で12時間攪拌後、ガラスフィルターで濾過し、濾液を30,000xg, 30分間遠心分離した。この上澄みを限外濾過 (メンブラン:UM-10) により濃縮し、0.05Mホウ酸緩衝液 (pH8.0) で平衡化したセファデックスG-200によるゲル濾過を行った。その活性画分を0.02Mリン酸緩衝液 (pH6.8) で平衡化したヒドロキシルアパタイトカラムに吸着させ同緩衝液でカラムを洗浄後、0.1Mの同緩衝液の連続濃度勾配により溶出を行った。次に活性画分を限外濾過により濃縮しセファデックスG-200による再クロマトグラフィーを行い、活性画分を限外濾過により濃縮後、ヒドロキシルアパタイトカラムによる再クロマトグラフィーを行い、そのクロ

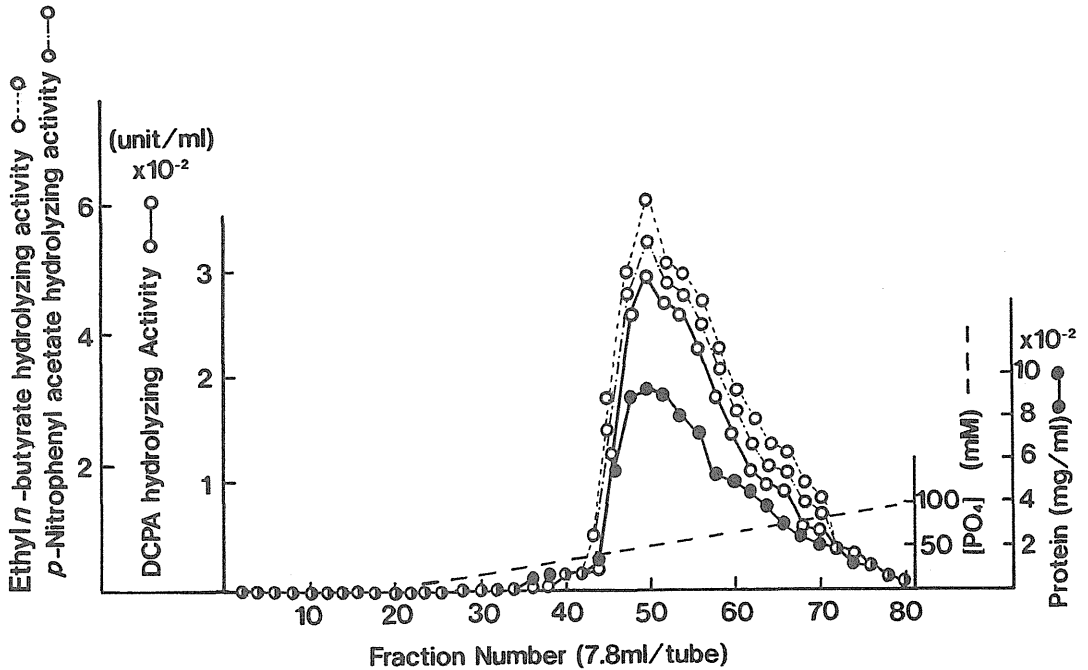


Fig. 3 Hydroxylapatite Column Chromatography (II) of DCPA Hydrolyzing Enzyme of the Active Fraction from Sephadex G-200 Gel Filtration (II).

The sample was applied on a column (1.5 x 26cm) equilibrated with 2mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 - \text{KH}_2\text{PO}_4$  buffer (pH6.8) and elution was performed with a linear gradient of 2 - 100mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 - \text{KH}_2\text{PO}_4$  buffer (pH6.8).

Table 1. Purification of DCPA Hydrolyzing Enzyme from Pig Liver

| Step                     | Protein (mg) | Activity (units) | Specific activity (munits/mg) | Yield (%) |
|--------------------------|--------------|------------------|-------------------------------|-----------|
| Liver homogenate         | 13512.2      | 20.2             | 1.5                           | 100       |
| Microsome                | 990.0        | 9.7              | 9.8                           | 48        |
| Solubilized fraction     | 323.2        | 10.6             | 32.9                          | 53        |
| Bio-Beads SM-2 treatment | 281.3        | 15.1             | 53.5                          | 75        |
| Sephadex G-200 (I)       | 94.1         | 9.7              | 100.0                         | 47        |
| Hydroxylapatite (I)      | 40.3         | 5.7              | 142.5                         | 28        |
| Sephadex G-200 (II)      | 28.7         | 8.5              | 297.6                         | 42        |
| Hydroxylapatite (II)     | 18.5         | 5.7              | 307.5                         | 28        |

マトグラムをFig. 3に示した。DCPA分解活性, *p*-ニトロフェニル酢酸分解活性, エチル*n*-ブチレート分解活性のいずれの溶出パターンも一致した。Table 1に精製の結果をまとめて示した。比活性は約200倍増加し収率は28%であった。精製したDCPA分解酵素のディスク電気泳動の結果をFig. 4に示した。本酵素タンパク質はディスク電気泳動的に単一バンドを示した。DCPA, エチル*n*-ブチレート, *p*-ニトロフェニル酢酸のいずれの分解活性もタンパク質バンドと一致した。

4. 分子量の推定

分子量既知の標準タンパク質とともにセファデックスG-200によるゲル濾過法で分子量の測定を行った結果をFig. 5に示した。本酵素の分子量はFig. 5に示したように、カタラーゼの近傍に溶出したことから、約20万と推定された。

Fig. 6に示したように、本酵素のSDS-PAGEバンドはカタラーゼのサブユニットとほぼ同一の移動度を示したことから、本酵素サブユニットの分子量は約6万と推定された。

5. 至適pH

酵素活性に及ぼすpHの影響を調べた結果をFig. 7にまとめた。活性発現の最適pHは8.0付近であった。

6. 各種試薬の影響

酵素活性に及ぼす各種試薬の影響を、37℃, 10分間プレインキュベートした後の残存活性により調べ、その結果をTable. 2に示した、本酵素はDFPによって顕著な阻害が認められたが他の試薬による顕著な阻害は認められなかった。

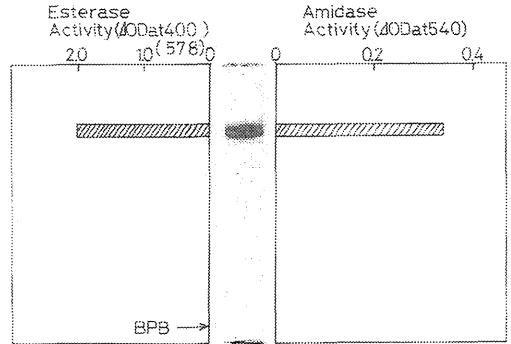


Fig. 4 Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Purified DCPA Hydrolyzing Enzyme and Measurement of Activity in Eluates from Gel Segments.

Electrophoresis was conducted at 3 mA per tube (5 x 70 mm) at 4°C. Enzyme activities against ethyl *n*-butylate, *p*-nitrophenylacetate and DCPA were measured after electrophoresis.

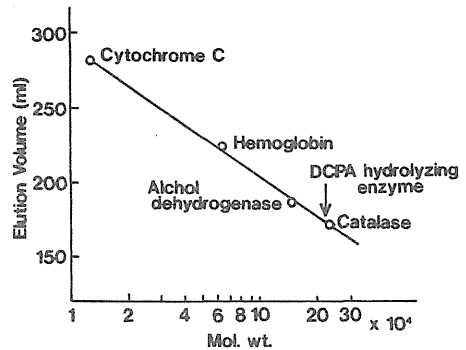


Fig. 5 Estimation of Molecular Weight of DCPA Hydrolyzing Enzyme by Gel Filtration on Sephadex G-200.

The enzyme and standard protein solutions were applied to the column (2.2 x 80 cm) equilibrated with 0.05M borate buffer (pH 8.0) and elution was performed with the same buffer.

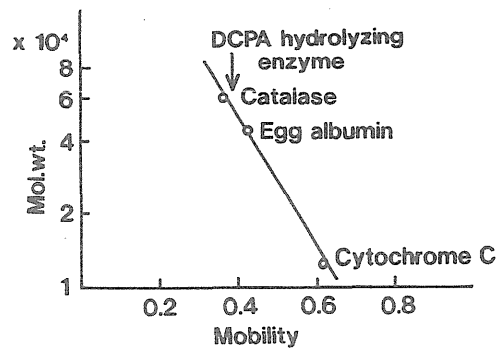


Fig. 6 Estimation of the Subunit Molecular Weight of DCPA Hydrolyzing Enzyme by SDS-PAGE.

Electrophoresis was conducted at 3 mA per tube (5 x 70 mm).

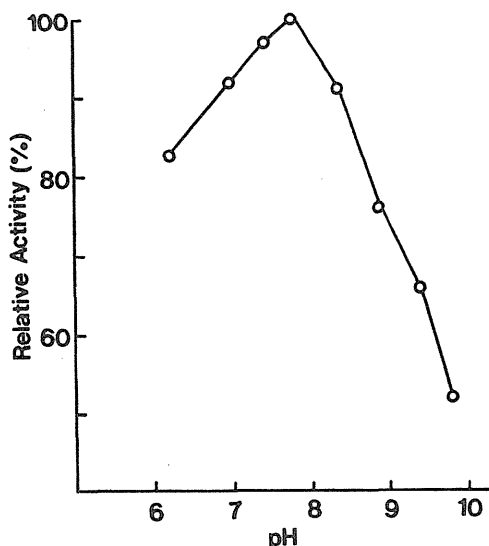


Fig. 7 Effect of pH on the Activity of DCPA Hydrolyzing Enzyme.

7. 各種農薬の影響

DCPA分解活性に対する各種農薬の影響を、未処理酵素活性を100としてTable 3に示した。本酵素は、カーバメート殺虫剤セビン、有機リン殺虫剤スミオキソン、有機リン殺菌剤IBPにより顕著な阻害が認められた。

8. 基質特異性

精製過程ではすべてDCPA、エチル*n*-ブチレート、*p*-ニトロフェニル酢酸を基質として用いたが、その他のDCPA類緑化合物の農薬について、本酵素による分解活性を調べ、その結果をTable 4に示した。酸アミド系除草剤のCMMP (solan) を16%分解したが、カーバメイト系除草剤のCl-IPC, MCC (swep) 等のN-C結合の分解はきわめて微弱であった。また、殺虫剤マラチオン、パプチオン、テトラメスリン、殺菌剤イソプロチオランのカルボキシルエステルも本酵素により加水分解されることが認められた。

9. 精製酵素および市販カルボキシルエステラーゼとのディスク電気泳動パターンとの比較

本酵素は、DCPA、エチル*n*-ブチレート、*p*-ニトロフェニル酢酸のいずれをも分解することから、エステラーゼ、アミダーゼ両活性を共に有する酵素で、その他の酵素的諸性質もKrischらが報告したカルボキシルエステラーゼ<sup>2)</sup>ときわめて類似した酵素である。

すでに、豚肝臓マイクロゾームからKrischの方法<sup>10)</sup>にしたがって精製されたカルボキシルエステラーゼがSigma社より市販されている。そこで、本酵素と市販

Table 2. Effect of Various Reagents on Activity of DCPA Hydrolyzing Enzyme

| Reagents                                   | Remaining activity(%) |
|--|-----------------------|
| None (control)                             | 100                   |
| Ethylene diamine tetraacetate (EDTA)       | 101                   |
| L-Cysteine                                 | 101                   |
| <i>p</i> -Chloromercuribenzoic acid (PCMB) | 103                   |
| <i>N</i> -Ethylmaleimide (NEM)             | 99                    |
| Diisopropylphosphorfluoridate (DFP)        | 0                     |
| Phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF)      | 96                    |
| SKF 525-A                                  | 67                    |

Mixture of DCPA hydrolyzing enzyme and indicated reagents were preincubated for 10 min at 37°C. Final concentration of each reagent was 0.1 mM.

Table 3. Effect of Various Pesticides on Activity of DCPA Hydrolyzing Enzyme

| Pesticides      | Remaining activity(%) |
|-----------------|-----------------------|
| None (control)  | 100                   |
| DCMU            | 98                    |
| Sevin           | 0                     |
| Azodrin         | 95                    |
| Nissol          | 20                    |
| Isoprothiolane  | 60                    |
| Tetramethrin    | 64                    |
| Sumioxon        | 0                     |
| Malthion        | 92                    |
| Papthion        | 64                    |
| IBP (Kitazin P) | 0                     |

Mixture of DCPA hydrolyzing enzyme and indicated pesticides were preincubated for 10 min at 37°C. Final concentration of each pesticide was 0.1 mM.

Table 4. Action of DCPA Hydrolyzing Enzyme on Some Pesticides

| Substrate    | Relative activity(%) |
|--------------|----------------------|
| DCPA         | 100                  |
| CMMP (solan) | 16                   |
| Cl-IPC       | 3                    |
| MCC (swep)   | 1                    |

Substrate specificity was measured as described in the methods (7-a). Each substrate concentration was 0.1 mM. Relative activity was calculated with activity against DCPA taken as 100.

カルボキシルエステラーゼとのディスク電気泳動パターンを比較を行い、その結果をFig. 8に示した。市販カルボキシルエステラーゼはKrischらが報告したように単一バンドを示さず4本のバンドが認められたが、本酵素は単一バンドを示し、また市販カルボキシルエステラーゼのいずれのバンドとも一致しなかった。

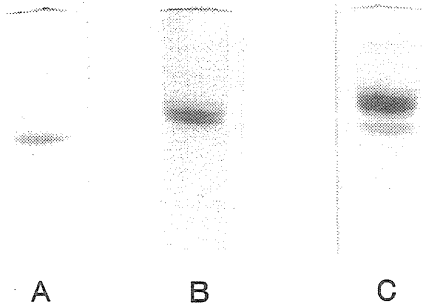


Fig. 8 Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Purified DCPA Hydrolyzing Enzyme and Carboxylesterase Obtained from Sigma.

Gel concentration was 7.5% and electrophoresis was conducted at 3 mA per tube. A: purified DCPA hydrolyzing enzyme, B: carboxylesterase obtained from Sigma, C: mixture of A and B.

## 考 察

多くの研究者によって、豚肝臓のマイクロゾームからカルボキシルエステラーゼが分離・精製され、アミド、エステル化合物に広い基質特異性を示すことが報告されている。しかし、豚肝臓マイクロゾームにおいて、芳香族アミド、脂肪族エステル、芳香族エステルがすべて同一の酵素によって加水分離をうけるのかどうかについては不明であった。本実験において、可溶化・精製の全過程にわたり、DCPA、エチル *n*-ブチレート、*p*-ニトロフェニル酢酸に対して同じ挙動を示し、ディスク電気泳動においても単一バンドにすべての分解活性が認められたことから、豚肝臓マイクロゾームにおいて、芳香族アミド、脂肪族エステル、芳香族エステルを加水分離する酵素は唯一つであると考えられる。本酵素はアミド結合、エステル結合を含む有機合成剤に作用し、これらの結合を開裂することが明らかとなり、本酵素が生体異物の解毒代謝に重要な役割を果たしていることが示唆された。本実験において分離・精製されたDCPA分解酵素の至適pH、基質特異性、各種試薬の影響などの結果は報告されているカルボキシルエステラー

ゼの結果とはほぼ一致しており、したがって本酵素とカルボキシルエステラーゼとは酵素化学的性質においてきわめて類似した酵素であると考えられる。しかしながら、さきにKrischら<sup>2)</sup>はカルボキシルエステラーゼの分子多様性について、サブユニットは基質特異性の異なるA、B2種類からなり、カルボキシルエステラーゼはこの2種類のサブユニットが、AAA、AAB、ABB、BBBの4種類の会合状態を形成して、ディスク電気泳動的にもカルボキシルエステラーゼが4本のタンパク質バンドを示し、それぞれのバンドも活性を示すことを報告している。しかし本酵素の場合にはディスク電気泳動においても単一バンドを示し、活性もこのバンド以外には見いだされず、分子多様性を示唆する結果は得られなかった。本酵素とKrischの方法によって精製された市販のカルボキシルエステラーゼ (Sigma社製) とを同じ条件下でディスク電気泳動による移動度を比較してみると、カルボキシルエステラーゼはKrischらの報告<sup>2)</sup>通り4本のバンドが見いだされたのに対して、本酵素は単一バンドであった。このように、分子多様性の点において、従来の報告と異なる結果が生じたのは、可溶化法の違いを反映していると考えられる。すなわち従来の精製過程では可溶化に熱処理や有機溶媒処理などを行ったのに対し、本法ではトリトンX-100による可溶化と可溶化後の迅速なトリトンX-100の除去というきわめて穏やかな可溶化の手法を用いた。このような精製過程の違いがサブユニットの会合状態の変化を引き起こしたと考えられる。したがって本酵素とカルボキシルエステラーゼの違いはサブユニットの会合状態の違いであると考えられる。しかし生体内において本酵素がどのような構造をとっているかは不明であり今後の検討すべき課題であろう。

## 要 旨

1. 豚肝臓マイクロゾーム画分より除草剤DCPAの酸アミド結合を加水分解するDCPA分解酵素をトリトンX-100による可溶化後、トリトンX-100をバイオビーズSM-2に吸着させ取り除き、セファデックスG-200によるゲル濾過、ヒドロキシルアパタイトカラムクロマトグラフィーにより精製した。精製酵素はディスク電気泳動的に均一であり、比活性は約200倍増加し、収率は28%であった。
2. DCPA分解酵素の分子量はゲル濾過法により求めた結果、約200,000でありサブユニットの分子量は約60,000であることから、本酵素は多量体を形成していると考えられる。

3. 本酵素の至適pHは8.0付近でDFP, セビン, スミオキソン, IBPにより著しい阻害を受けた。本酵素は芳香族アミドであるDCPAばかりでなく脂肪族エステルであるエチル*n*-ブチレート, 芳香族エステルである*p*-ニトロフェニル酢酸を加水分解し, アミダーゼ活性およびエステラーゼ活性を示し, 本酵素はカルボキシルエステラーゼ [EC.3.1.1.1] に属すると考えられる。

#### 引用文献

- 1) 赤塚尹巳：農業科学, 1, 55 (1973)
- 2) W. Junge and K. Krisch : *Eur. J. Biochem.*, 43, 379 (1974)
- 3) S. K. Miller, A. R. Main and R. S. Rush : *J. Biol. Chem.*, 255, 7161 (1980)
- 4) O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall : *J. Biol. Chem.*, 193, 265 (1951)
- 5) 児玉治, 赤塚尹巳：茨城大学農学部学術報告, 22, 49 (1974)
- 6) B. J. Vavis : *Ann. New York Acad. Sci.*, 121, 406 (1946)
- 7) P. Andrews : *Biochem. J.*, 91, 222 (1963)
- 8) B. L. Vallee and F. L. Hoch : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 41, 327 (1955)
- 9) A. L. Shapiro : *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 26, 517 (1967)
- 10) K. Krisch : *Biochem. Z.*, 337, 531 (1963)

## Summary

### **Purification and some properties of DCPA hydrolyzing enzyme in microsomal fraction of pig liver.**

TAKAO KIMURA, OSAMU KODAMA, TADAMI AKATSUKA

DCPA hydrolyzing enzyme was solubilized by Triton X-100 from the microsomal fraction prepared from pig liver. After removal of Triton X-100 from solubilized fraction by Bio-Beads SM-2 treatment, solubilized DCPA hydrolyzing enzyme was purified by Sephadex G-200 gel filtration and column chromatography on hydroxylapatite. The final preparation was homogenous in polyacrylamide gel electrophoresis at pH 8.3 and purified approximately 200-fold in a 28 % yield. The molecular weight of the enzyme was estimated to be approximately 200,000 by gel filtration and the weight of the subunit enzyme was determined to be 60,000 by SDS-PAGE. These results suggested that the enzyme may be homooligomeric enzyme. The enzyme was inhibited by DFP. Among the pesticides tested, carbamate pesticides such as Sevin and organophosphorus pesticides such as Sumioxon and IBP completely inhibited the enzyme activities. The enzyme hydrolyzed not only DCPA but also ethyl *n*-butyrate and *p*-nitrophenyl acetate. Therefore, this enzyme may belong to carboxylesterase [EC.3.1.1.1].