

犬鉤虫 (*Ancylostoma caninum*) アミラーゼの 性状について

大屋 幸子 野口 市夫

神奈川県立衛生短期大学医動物学・生化学

(昭和51年7月14日 受領)

寄生線虫類のアミラーゼに関しては, Enigk (1938), 一井ら (1959), Nimmo-Smith and Keeling (1960) 等の研究があるが, 一方, 平岡 (1964, 1966) は, 回虫体腔液のアミラーゼは α 型で, かつその至適 pH が 5.0 付近であるという興味ある結果を報告している. また谷口 (1967) は, 回虫筋層やアニサキス幼虫抽出液中にも至適 pH 4~5 のアミラーゼが存在すること, およびこれらの線虫類には, 6 種のアミラーゼアイソザイムがみられることなどを報告している.

著者らは, このようなアミラーゼパターンが, 犬鉤虫成虫にもみられるかどうかについて検討したところ, 回虫やアニサキス幼虫の場合と極めて類似した結果が得られたのでここに報告する.

実験材料および方法

犬鉤虫: 鉤虫感染犬の糞便を瓦培養 (30 C, 7 日間) して得られた感染幼虫 1,000~1,500 虫を幼犬に経口投与し, 30 日後に開腹して成虫を採集した. これを蒸留水で数回洗浄した後, 雌雄別に 200 虫ずつ deep freezer (-20 C) に保存した. なお一部は乾燥重量測定用として真空デシケーターに入れ, 3 週間後に重量測定を行った.

酵素溶液: 上記の凍結保存犬鉤虫 200 虫に 10ml の 0.02 M クエン酸緩衝液 (クエン酸-Na₂HPO₄, pH 5.0) を加え, ガラスホモジナイザーで破碎した後, 10,000 rpm で 10 分間冷却遠沈した. その上清 3 容に対し冷アセトン (-20 C) 7 容を加え, 生じた沈澱を遠沈して集めた後, この沈澱を 10ml の 0.02 M クエン酸緩衝液 (pH 5.0) に溶かした. 使用時, これを 2 倍希釈して酵素溶液とした.

酵素活性の測定: アミラーゼ活性の測定は, 不破法 (1954) の変法によって実施した. すなわち, 0.2% アミロース溶液 2.0ml に 0.04 M NaCl を含む 0.1 M クエン

酸緩衝液 (pH 5.0) 1.0ml と酵素溶液 1.0ml とを加え, 30 C で 30 分間反応させた後, 10ml の 0.5 N 酢酸を加えて反応を停止させた. この混液 1.0ml を N/3,000 ヨウ素液 10ml 中に入れ, 690 nm における呈色液の吸光度を日立 101 分光光度計で測定した. なお至適 pH 測定の際はクエン酸緩衝液の他に 0.4 N 酢酸緩衝液も用いた.

ディスク電気泳動: ポリアクリルアミドゲルを支持体とする Davis (1964) の方法に従い, 富士理研ディスク電気泳動装置を用いて 0~4 C の室内で行った. 20% のショ糖を含む酵素試料をカラムに注ぎ, 通電はゲル当り 2 mA の定電流で 3 時間行なった. 泳動終了後, ゲルを 1% 可溶性デンプンおよび 1% NaCl を含む 0.1 M クエン酸緩衝液 (pH 5.0 または pH 7.0) 中に入れ, 37 C で 60 分間 incubate した. 反応後ゲルを 5% 酢酸溶液に 5 分間浸漬し, 次いで N/3,000 ヨウ素液中で発色させた. 酵素活性の存在する部分は, 濃青色の背景中に透明ないし淡黄色の band として検出された.

ペーパークロマトグラフィー: 本酵素によるアミロースの分解生成物は次のようにして調べた. 320 単位のアミラーゼを含む 4 ml の反応液 (0.5% アミロース, 0.009 M NaCl, 0.02 M クエン酸緩衝液・pH 5.0) を 37 C で incubate し, 0, 0.5, 1, 4, 7 時間後に 0.5~0.8 ml ずつ取出し, 煮沸によって反応を停止させた. これらの試料をワットマン No. 1 濾紙に 20 μ l ずつスポットし, n-ブタノール・酢酸・水 (4:1:2) の展開溶媒で 2 回上昇させた. 分解によって生じた糖の検出はベンチジン試薬 (ベンチジン 0.5 g, 氷酢酸 10 ml, エタノール 80 ml, 40% w/v トリクロル酢酸 10ml) を用いて行なった.

イヌ糖のアミラーゼによるアミロースの分解生成物の分折は, 緩衝液の pH を 7.0 に代えた以外は, 酵素溶液の作製, 反応の条件など, 犬鉤虫による場合と同様に行なった.

Table 1 Amylase activity of *A. caninum*

	Number of worms	Dry weight (mg)	Amylase activity	Amylase activity per mg	Amylase activity per worm
Male	200	19.00	343.5±2.6	18.08	1.72
Female	200	28.46	489.8±4.4	17.21	2.45

Amylase activity unit, $(DB \frac{30^\circ}{mg} \frac{30'}{A})$.

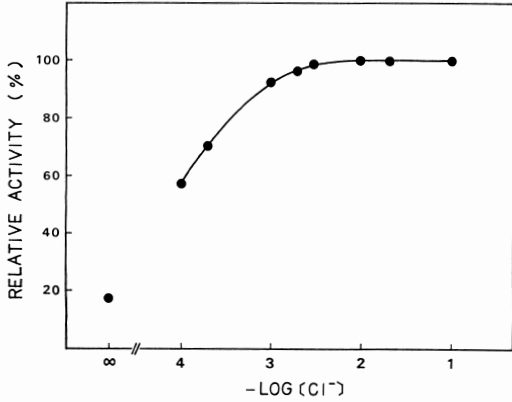


Fig. 1 Effect of Cl⁻ ion on *A. caninum* amylase activity.

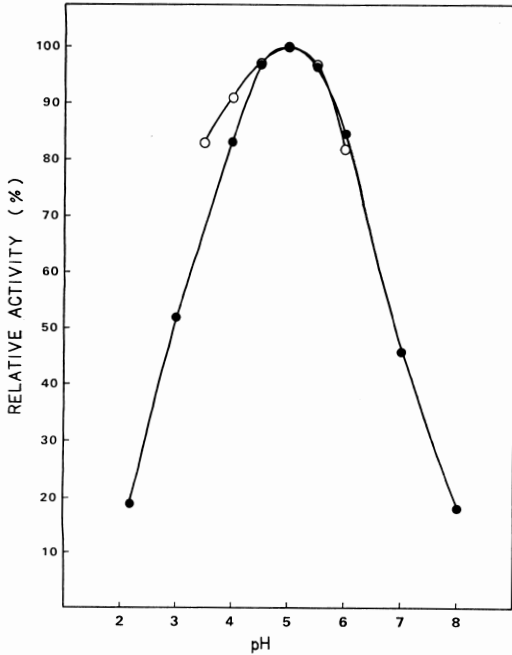


Fig. 2 Effect of pH on *A. caninum* amylase activity.

—●—, 0.025M citric acid-Na₂HPO₄ buffer;
—○—, 0.1 N acetic acid-sodium acetate buffer.

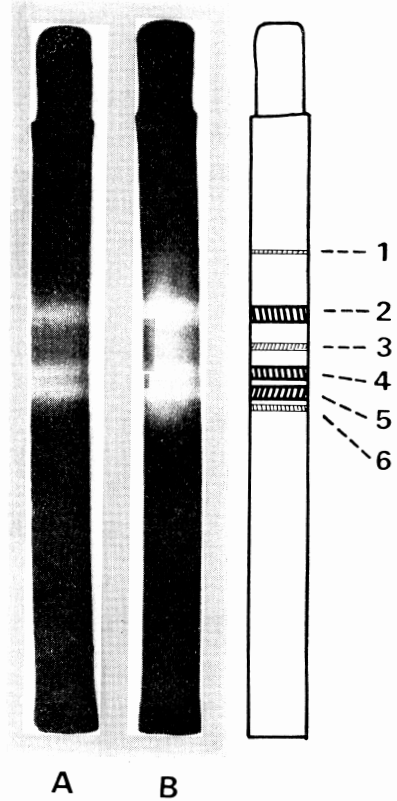


Fig. 3 Polyacrylamide gel disc electrophoresis of *A. caninum* amylase. Total amylase activity, 14 units. A, pH 5.0 (the reaction mixture); B, pH 7.0 (the reaction mixture).

また、両酵素液中のマルターゼ活性を調べるためのペーパークロマトグラフィーは、160単位のアミラーゼ(犬鉤虫またはイヌ脛)を含む2 mlの反応液(0.5%マルトース, 0.02M クエン酸緩衝液・pH 5.0または pH 7.0)を37Cで4時間 incubate し、以後の操作は上記のアミラーゼによる分解生成物の場合と同様に行つた。

結 果

- 1) 虫体のアミラーゼ活性

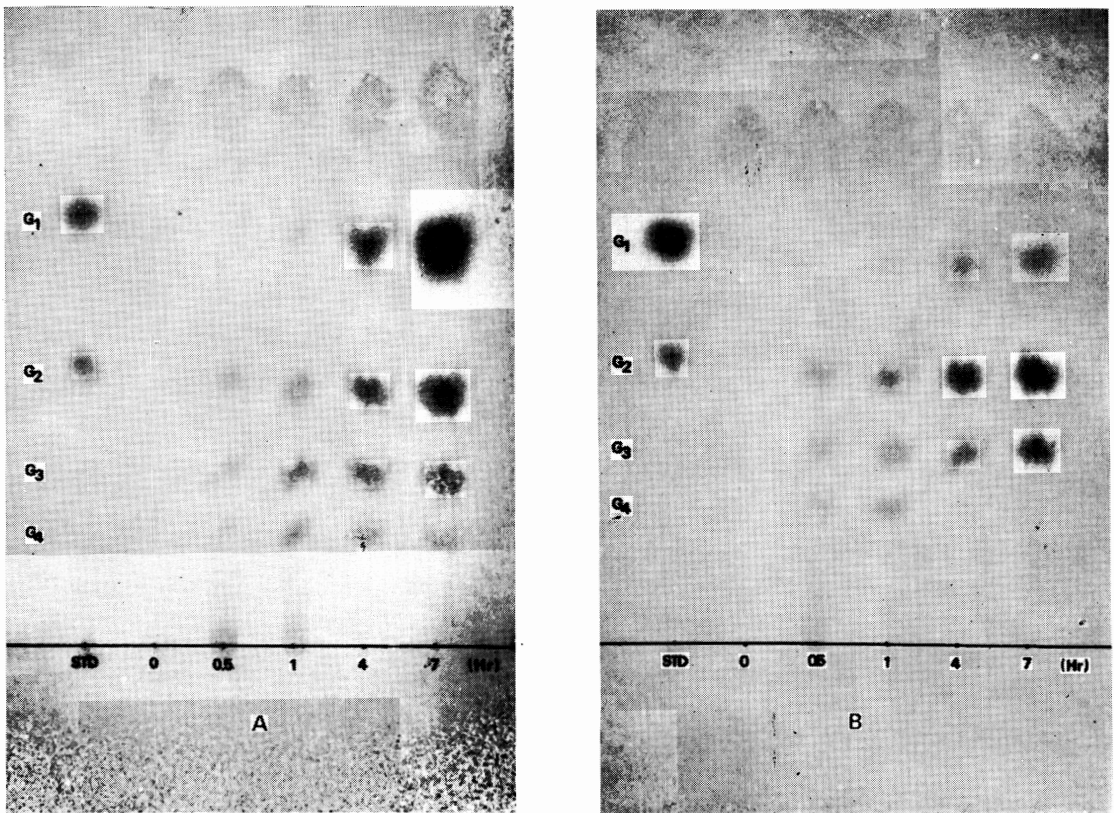


Fig. 4 Time sequence chromatographic analysis of the products by *A. caninum* amylase (A) and dog pancreatic amylase (B). G₁, glucose; G₂, maltose; G₃, maltotriose; G₄, maltotetraose.

犬鉤虫成虫のアミラーゼ活性を pH 5.0 および 0.01M NaCl 濃度の条件下で測定した。Table 1 にみられるように、犬鉤虫 1 虫当りの活性 ($DB_{mg A}^{30^{\circ}30'}$) は、雄では 1.72 単位、雌では 2.45 単位で、雌雄の間に大きな差がみられたが、乾燥重量 1 mg 当りの活性は雌雄の間にほとんど差がみられなかった。

2) Cl⁻イオンの影響

本酵素の活性は NaCl 濃度に依存し、NaCl を加えない場合は、NaCl 濃度 $10^{-2}M$ の場合の 18% の活性しかみられなかった (Fig. 1)。この結果は、本酵素の活性化に Cl⁻イオンが必要であることを示している。

3) pH の影響

Fig. 2 にみられるように、クエン酸緩衝液を用い、種々の pH におけるアミラーゼ活性を測定した結果、本酵素の至適 pH は 5.0 のところにみられた。さらに酢酸緩衝液を用いた場合も至適 pH は 5.0 であった。

4) アミラーゼアイソザイム

泳動後のゲルを pH 5.0 で反応させた場合、5 本の amyolytic band がみられた (大屋・野口, 1976) が、pH 7.0 で反応させると、Fig. 3 にみられるように、band 6 が新たに検出された。このことから、band 6 のアミラーゼの至適 pH は 5 より高いところにあると思われる。

5) 分解生成物

犬鉤虫アミラーゼの type を決定するために、本酵素によるアミロースの分解生成物の経時的変化を、ペーパークロマトグラフィーによって調べた。Fig. 4 A にみられるように、反応の初期には、比較的高分子のオリゴサッカライドの量が多く、反応が進むにつれて低分子のものが多くなっている。このことから本酵素は α -アミラーゼであると思われる。比較のために、 α 型であるイヌ豚のアミラーゼの分解様式を同様に示したのが Fig. 4 B である。両者を比較すると、犬鉤虫アミラーゼの場合に glucose の生成量が多くみられる。Fig. 5 にみら



Fig. 5 Chromatographic analysis of the products by maltase in *A. caninum* enzyme solution (H) and dog pancreatic enzyme solution (P). G₁, glucose; G₂, maltose.

れるように、これは、犬鉤虫の中に含まれているかなり強いマルターゼが影響しているものと考えられる。

考 察

犬鉤虫には強いアミラーゼ活性がみられた。この酵素が Cl⁻イオンによって活性化され、またその至適 pH が 5.0 であることは、回虫体腔液のアミラーゼ (平岡, 1964, 1966) と一致している。さらにアニサキス幼虫全虫体抽出液にも、至適 pH が酸性のアミラーゼがみられる (谷口, 1967)。線虫類アミラーゼのなかに、こ

のような至適 pH の酸性のものがあることは、一般に哺乳動物のアミラーゼの至適 pH が 7.0 付近であり、高等植物、微生物由来のアミラーゼのそれが酸性であることを考慮すると、興味深いことである。

本酵素はディスク電気泳動法により、6本の amyolytic band に分離された。谷口 (1967) は、寒天電気泳動法によって、回虫体腔液やアニサキス幼虫全虫体抽出液に 6 種のアミラーゼアイソザイムがみられたと報告している。

なお、回虫体における各器官のアミラーゼの至適 pH は、体腔液、筋層、全虫体では 5.0 であるが、消化管では 7.0 であるとの報告 (谷口, 1967) があり、さらに、アニサキス幼虫全虫体抽出液のアミラーゼ活性が pH 4.0 と pH 7.0 の 2 点にピークを有するとの報告 (谷口, 1967) がある。後者はアニサキス幼虫にも至適 pH が、4.0 付近のアミラーゼと 7.0 付近のアミラーゼが存在することを示すものと思われる。今回の電気泳動の結果が示すように、犬鉤虫にも至適 pH が 5.0 のアミラーゼとそれ以外のアミラーゼとが混在していると推定される。しかし、このことを確定するには、犬鉤虫の場合、回虫のように各器官に分けて酵素抽出を行うことは困難であるため、組織化学的な方法を検討している。

結 語

犬鉤虫アミラーゼの性状について検討し、次のような結果が得られた。

犬鉤虫の乾燥重量 1 mg 当りのアミラーゼ活性値 (DB 30°30') は、雄では 18.08 単位、雌では 17.21 単位であった。

本酵素は α-type で、その活性化には Cl⁻イオンを必要とした。

本酵素活性の至適 pH は、全虫体抽出液では 5.0 のところにみられた。

本酵素には、ディスク電気泳動法によって、6 種のアミラーゼアイソザイムが認められた。

犬鉤虫成虫ホモジネート液中には、かなり強いマルターゼ活性がみられた。

(本論文の要旨は、第 35 回日本寄生虫学会東日本大会 (1975) において発表した。)

文 献

- 1) Davis, B. J. (1964) : Disc electrophoresis-II. Method and application to human serum

- proteins. Ann. N. Y. Acad. Sci., 121, 404-427.
- 2) Enigk, K. (1938) : Ein Beitrag zur Physiologie und zum Wirt-Parasit-Verhältnis von *Graphidium strigosum* (Trichostrongylidae, Nematoda). Z. Parasit., 10, 386-414.
 - 3) Fuwa, H. (1954) : A new method for micro-determination of amylase activity by the use of amylose as the substrate. J. Biochem., 41, 583-603.
 - 4) 平岡義雄 (1964) : 回虫体腔液の酵素作用について(1). 寄生虫誌, 13, 143-148.
 - 5) 平岡義雄 (1966) : 回虫体腔液の酵素作用について(2). 寄生虫誌, 15, 201-207.
 - 6) 一井昭五・松本克彦・杉浦健一 (1959) : 回虫の体外飼育時における代謝像の変動(2) 消化酵素について. 寄生虫誌, 8, 19-21.
 - 7) Nimmo-Smith, R. H. and Keeling, J. E. D. (1960) : Some hydrolytic enzymes of the parasitic nematode *Trichuris muris*. Exp. Parasit., 10, 337-355.
 - 8) 大屋幸子・野口市夫 (1976) : アミラーゼアイソザイム—犬の血清, 臓器および犬鉤虫について. 神奈川県衛短大紀要, 8, 39-41.
 - 9) 谷口正明 (1967) : *Anisakis* の研究(2) amylase-isozyme. 寄生虫誌, 16, 114-118.

Abstract

ON SOME PROPERTIES OF *ANCYLOSTOMA CANINUM* AMYLASE

YUKIKO OYA AND ICHIO NOGUCHI

(Department of Medical Zoology and Biochemistry, Kanagawa Prefectural College of Hygiene, Japan)

Amylase, which has optimum pH at 4.0 to 5.0, has been reported by Hiraoka (1964) and Taniguchi (1967) in *Ascaris lumbricoides suum* and *Anisakis* larva, respectively. The present authors investigated on some properties of the amylase of *Ancylostoma caninum*. The results were as follows :

- 1) *A. caninum* amylase activity ($DB_{\text{mg A}}^{30^{\circ}30'}$) per mg (dry weight) was 18.08 units in the males and 17.21 units in the females.
- 2) The amylase was α -type and was activated by Cl⁻ion and its optimum pH was 5.0.
- 3) Six isozymes of the amylase were observed by disc electrophoresis in polyacrylamide gel.
- 4) Maltase activity was found in the *A. caninum* enzyme solution.