

二三の寄生性アメーバ及び自由生活性アメーバ の蛋白質分解酵素について

金子 信

慶応義塾大学医学部寄生虫学教室 (主任 松林久吉教授)

(昭和30年12月21日 受領)

私は先に寄生性アメーバと自由生活性アメーバについて、澱粉分解酵素即ちアミラーゼに関する実験を行ひ、之が存在せる事を証明した。即ちこれによつてアメーバ類が Dobell 培地、田辺干葉培地等のアメーバ用培地中に添加されている米澱粉を直接利用し得ることを生化学的に立証し得たのである。併してアメーバ用培地は何れも、血清、鶏卵等を主成分として形成されて居り、蛋白質が欠くべからざる栄養源と成つて居る。よつてアメーバはアミラーゼと同様に恐らく多くの種類の蛋白質分解酵素を有し、蛋白質を分解し、諸種のアミノ酸等を生成し、自己の増殖発育に供して居ると考えられる。歯齶アメーバ、赤痢アメーバ、二核アメーバ、及自由生活性アメーバを使用し、種々の水素イオン濃度のもとに、蛋白質分解酵素の存在について検索を行った。

実験方法及び材料

ゲラチンをリンゲル液に種々なる濃度に溶解し、之に後に述べる如き試験液を加へて、ゲラチンの融解されるか否かを追求した。用いたゲラチンの濃度は、その溶液 0.7cc と、試験液 0.3cc を加へた場合に、ゲラチンが夫々 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8% に成る様に調製し更に N/10 HCl, 又は N/10 NaOH を用いて、水素イオン濃度を pH 1.8, 2, 3, 4, 5, 6, 6.5, 7, 7.8, 9 に調製した。之を滅菌小試験管に 0.7cc ずつ分注し、高圧滅菌し、之に下記の試験液 0.3cc を加へて、37°C の孵卵器に 24 時間静置した後、4°C の氷室に 30 分間置き室温に取出して検した。ゲラチンの完全に融解したるものを (+) とし、不完全溶解のものは (-) と判定した。融解したゲラチンの最高濃度を以て、その試験液の力価とした。

Makoto Kaneko: Investigations on the proteolytic activity of parasitic and free-living amoebae. (Department of Parasitology, School of Medicine, Keio University, Tokyo, Japan)

第一の実験では pH 6.5 の種々の濃度のゲラチン液を作り、之に下記試験液を重ねて、溶解するゲラチンの濃度を判定して見た。赤痢アメーバ及二核アメーバは、馬血清の熱凝固斜面にリンゲル液を液体部とせる培養基に継代培養した。歯齶アメーバは前記の固形部に、馬血清 1 リンゲル 8 の割合に混じたるものを液体部とせる培養基に継代培養した。両者共移植直前に少量の米粉を加へた。亦自由生活性アメーバは卵黄の浸出液に等量の蒸留水を加へ、加圧滅菌したるものを小シヤレーに採り、27°C で継代培養した。試験液は以上の四種のアメーバ株に就て、次の如き 5 種のものを調製使用した。

(a) 移植後 48 時間を経過したる培養基の底部の虫体を多数含む所を米粉と共に採り、随伴細菌の増殖及活動を抑止するために、之にペニシリン 2000 μ /ml 及びストレプトマイシン 4000 r/ml を加へたもの。

(b) 移植後 48 時間を経過したるものをリンゲル液にて数回遠心洗滌し、細菌体を可及的除き、アメーバ虫体のみを集め、之に抗生物質を加へたもの。

(c) 培養基の液体部を採り、3000 回転にて 15 分間遠心沈澱し、更にその上層液のみを集め、再度遠心沈澱し、虫体を完全に除き、細菌体も殆んど全てを除いた。この液中には、虫体がもしも培養中に酵素を体外に分泌するとすれば、それが含まれている筈である。この液に抗生物質を添加して用いた。

(d) 遠心洗滌にて集めたる虫体をドライアイスにて 6 回凍結融解して、完全に虫体を破壊したるもの。虫体内酵素があるとすればそれがこの液中に含まれている筈である。上記と同様の抗生物質を添加して用いた。

(e) (d) を更に濾過滅菌したるもの。

以上の 5 種類を使用し、亦対照としては、随伴細菌群だけを培養し、同様の操作を加へたものを使用した。又別にすべての試験液を 100°C に煮沸したるものについても検定した。

第 1 表 数種のアメーバ培養から得た各試験液のゲラチン融解能の比較

(pH 6.5)

		培養底部	生活虫体 (遠心洗滌)	遠心上澄液 (培養基液体部)	虫体凍結融解	左記を濾過
歯 齲 アメーバ	実 験	6.5 %	6 %	6 %	5.5 %	4.5 %
	対 照	4.5 %	4 %	4.5 %	3 %	3 %
赤 痢 アメーバ	実 験	6 %	5.5 %	5 %	4.5 %	3.5 %
	対 照	4 %	4 %	4.5 %	3 %	2.5 %
二 核 アメーバ	実 験	5 %	5 %	5 %	4 %	3.5 %
	対 照	4.5 %	4 %	4 %	3 %	2.5 %
自由生活性 アメーバ	実 験	3.5 %	3.5 %	3 %	3 %	2.5 %
	対 照	3 %	3 %	2.5 %	2.5 %	2 %

(%はゲラチン濃度を示す)

第 2 の実験では pH 及びゲラチン濃度の相違を種々にし、試験液としては遠心洗滌虫体のみを使用して実験を行った。亦第 1 第 2 の実験を通じて、各アメーバは 1 cc 中に 50 万を算するものを使用した。各実験共、20 回反覆して行い、20 回共融解しているゲラチン最高濃度をその実験における融解能として表示又は図示した。

実験成績

第 1 の実験にてアメーバを接種した各試験管に於ては 24 時間目迄はアメーバは生存して居り之を培地に移植し得たが、48 時間を経過したものでは生存虫体は認められなかつた。表 1 に示すが如く歯齲アメーバはゲラチン融解度が比較的高く、之に次で赤痢アメーバ、二核アメーバ、自由生活性アメーバの順であつた。試験液別に見ると培地底部より取つた材料をそのまま用いた場合が最高の値を示し、凍結融解物の濾過液で最低値を示し、その他の材料では両者の中間値を示した。又これ等の値は対照の細菌のみを同一培地で培養して作つた試験液が示した値よりも稍大であつた。而して此の差は遠心上澄液の様に細菌体又は、その代謝物がアメーバのそれ等との割合に於て多量に含まれていると考えられる場合には比較的軽度であり、アメーバの虫体又はその代謝物が充分に含まれている材料では比較的に高度である様に思はれる。

第 2 の実験に於ては前記の実験成績で培地底部材料が最も強力であつたので、この同じ材料を用いて pH の値を色々変化して、酵素の活性度を検討した。図 1 に示すが如く歯齲アメーバではゲラチン液化能力は pH より上昇を示し、6.5 で最高値を示して居り、図 2, 3, 4, に示すが如く、この傾向は他の 3 種のアメーバに於ても共通して認められた。寄生性の 3 種ではゲラチン液化の最高

濃度は 5 ~ 6 % で、歯齲アメーバ、赤痢アメーバ、二核アメーバの順であり、いずれも随伴細菌群での対照のそれが 4.0 % であつたのに比して明らかに差が認められた。

自由生活性アメーバでは最高値が 3.5 % であり、その随伴細菌群の値は 3.0 % で著しく差があるとは云ひ難い結果であつた。又図にはかけなかつたが、試験液を煮沸して行つた対照例は全く陰性の成績であつた。

考 按

歯齲アメーバ、赤痢アメーバ、二核アメーバ及び自由生活性アメーバに就てゲラチン融解能を検討した。この種の実験で最も困難な点は之等アメーバを細菌から純粹に分離することが出来ないと言う点にある。併しこの随伴細菌群をアメーバを混ぜずに取出すことは容易であるので、この細菌群だけを用いて同じ実験を行い、アメーバ細菌混合材料で行つた実験と比較することにより、アメーバの作用を推定することは出来る。表 1 の成績からみて、何れの場合にもアメーバ細菌混合材料の方が細菌だけの場合よりも高濃度のゲラチンを融解していることから、アメーバも蛋白質分解酵素をもつことは明らかである。併し自由生活性アメーバに限つて対照(細菌だけ)との差が僅かであつて、蛋白質分解酵素をもつにしてもその作用は甚だ弱いもの様である。ここに用いた自由生活性アメーバは *Naegleria* に属するものであり、殆んど痕跡とも云う可き極めて少量の栄養物中でも生活増殖し得るものであり、従つてこのアメーバの必要とする栄養素の量は僅少で間に合うものであろう。従つて酵素活動も他の 3 種の寄生性アメーバに比して遙に弱いものであろう。このことは同じアメーバ種で検討したアミラーゼに就ても云い得ることである。(前報参照) 寄生アメーバ 3 種の間で蛋白質分解酵素の活動性を比

図1 歯齦アメーバの各種 pH に於けるゲラチン融解能

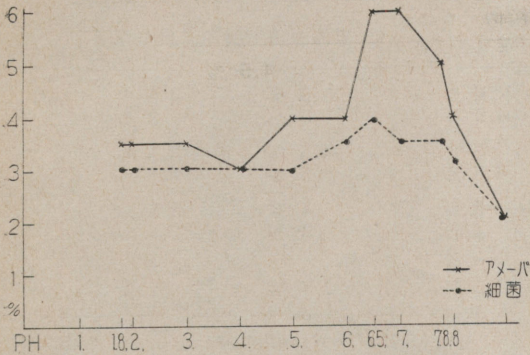


図2 赤痢アメーバの各種 pH に於けるゲラチン融解能

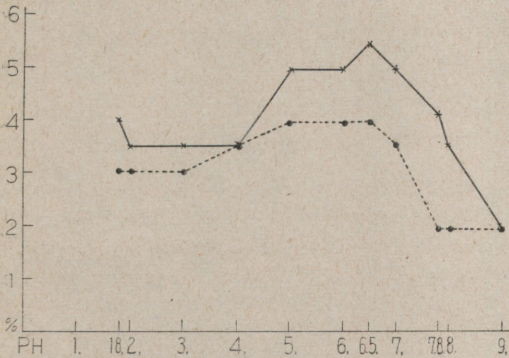


図3 二核アメーバの各種 pH に於けるゲラチン融解能

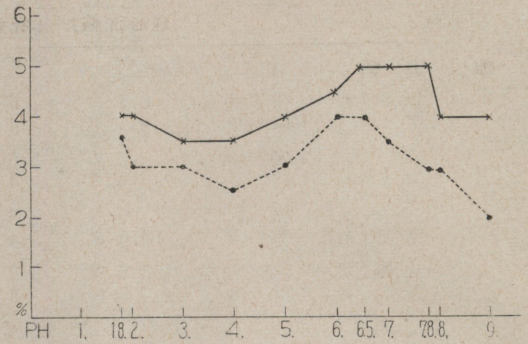
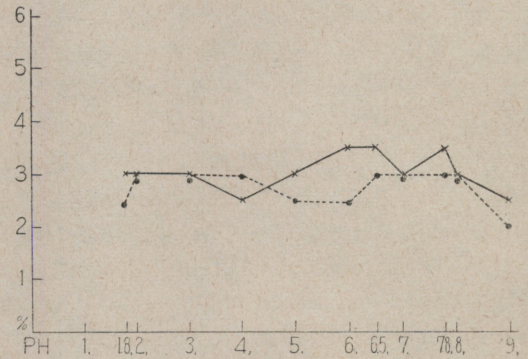


図4 自由生活性アメーバの各種 pH に於けるゲラチン融解能



較して見ると歯齦アメーバが最も強く、次で赤痢アメーバで、二核アメーバは最下位である様に見える。この点も之等アメーバの寄生部位に於ける生活態度と照し合わせて一応理由のあることの様に思はれる。即ち歯齦アメーバは歯根盲嚢内にあつて、歯槽膿漏のために滲出して来る白血球を絶えず多量に摂取し、消化しており、従つて蛋白質分解酵素の活潑なる活動を必要とするものと思はれる。赤痢アメーバは屢々宿主組織内に侵入して、組織を融かすと考へられているのであつて、蛋白質分解酵素の活潑な活動を必要とするものと思はれる。之に対して二核アメーバは大腸の腸腔内に生活するものであつて、前2者に較べれば蛋白質分解酵素の活動が多少劣つていても不思議はない様に思はれる。なお、この蛋白質分解酵素の活動性の強弱は夫々のアメーバの培養の難易とも関係がある様に思はれる。即ち歯齦アメーバは他の2者に較べて継代培養を得ることが困難であり、殊に血清を含まない培地には殆んど増殖し得ない。之に対して

赤痢アメーバ、二核アメーバは、Balamuth 培地の如き蛋白質を殆んど含まないものにも良く増殖する。之等の点にも蛋白質を必要とする程度の相違が現われている様に思はれる。

蛋白質分解酵素が主としてアメーバ体内で作用するものか、或は体外に分泌されて作用するものかアメーバの生理にとって重要な問題である。寄生局所に於ける生活態度から見て、歯齦アメーバは多数の白血球を体内に取り入れているのであるから、蛋白質分解酵素も当然細胞体内で作用するものであろうし、二核アメーバは流動性の腸腔内容中に生活しているのであつて、酵素を体外に分泌すると云ふことは甚々しく不合理の様に思はれる。唯赤痢アメーバは組織内に寄生し、何等かの酵素を分泌し、周囲の組織を被壊することが云われている。之等の点を検討する目的で今回の実験では培養虫体を遠心沈澱によつてよく洗滌し培養液及び随伴細菌を可及的少くした材料で、一方では生活虫体のまま、一方ではそれを凍

結融解法により虫体を破壊した後に夫々ゲラチンに作用せしめた(第1表)。その結果は寄生性3種のアメーバ共、虫体破壊材料の方が稍低い活性度を示したと云うだけで著明な差はなく、又赤痢アメーバと他の2種のアメーバとの間にも上記の点を立証するに足るだけの差は見られなかった。之は併し当然なことであつて、生活虫体を作用させたとは云つても、ゲラチン溶液内にそれを24時間もおく時にはアメーバの大部分は死亡し、体内に存する酵素は体外に遊離して作用することが考えられるからである。培養した液を遠心沈澱してアメーバを除いた上澄液が酵素作用を示しているが、この場合にも、その酵素がアメーバから分泌されたかと直ちに考へる可きではない。即ち培養中にアメーバは増殖する一方、多数が死亡して体内の酵素が遊離することが考えられるからである。要するに今回の試験では酵素がアメーバ体外に分泌されるか否かは確め得なかつた。

この酵素が何に属するかと云う事は水素イオン濃度によつて推測すると、 $\text{pH}6.5$ より $\text{pH}7.8$ の濃度に於て良好なる融解を示していることから、これは高等動物即ち脊椎動物の蛋白分解酵素と植物性のものとの中間に位する性質を有する酵素のように思はれる。即ち中性もしくは弱酸性にて作用するカテプシン型酵素或は植物界に於るパペイン型の酵素が之等アメーバ類には主として存在するのではあるまいか。またこれらの水素イオン濃度は本アメーバの生存増殖に至適 pH である事も意味のあることである。又之等下級動物が、高等動物と異つてその主たる酵素としてカテプシン様酵素をもつと云うことは興味のあることである。

結 論

1) 齒齦アメーバ、赤痢アメーバ及び二核アメーバは何れもゲラチンを融解する酵素を有することを確認した。

2) その酵素の活性度は齒齦アメーバに於て最も強く、二核アメーバに於て最も弱いように見受けられた。比較のために検した自由生活性アメーバではゲラチン融解酵素は上記寄生性アメーバ3種に比べて、その活性度は甚しく弱いものであつた。

3) 之等の活性度の強弱は之等アメーバの生活環境及

び摂取する栄養物と密接な関係にあるらしい事及び之等アメーバの継代培養の難易とも関係があるらしい事を考察に於て記述した。

4) 之等アメーバ類に見られる蛋白質分解酵素は主としてカテプシン型酵素であると思われる。

御指導をたまわつた松林教授に厚く御礼申し上げます。

参 考 文 献

- 1) Nord, F. F. and Werkman, C. H., ed.: Advance in Enzymology, Vol. 1~2, Interscience Publishe E. D. S. Inc., New York, 1942. —2) 市原硬 (1948): 蛋白質及アミノ酸の生化学, 南条, 東京. —3) Stiphanson, M. 田中正三訳 (1955): 細菌の代謝, 丸善, 東京. —4) 重浦靖治 (1938): 蛔虫の酵素に関する研究, 慶応医学, 18(8) 939~950 —5) 重浦靖治 (1939): 二三線虫類の酵素の研究, 慶応医学, 19(9) 1057~1062. —6) 田所哲太郎 (1933): 続酵素化学, 丸善東京.

Summary

Proteolytic activities of *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba gingivalis*, *Dientamoeba fragilis* and *Naegleria* sp. were examined by their ability to dissolve gelatine of various concentrations. The strength of the activity of each species of amoebae was determined by the highest percentage of gelatine dissolved. The activity of associated bacterial flora was also examined in the control experiments.

Proteolytic activity was recognized in the three parasitic species of amoebae, and was highest in *E. gingivalis*, somewhat lower in *E. histolytica* and lowest in *Dientamoeba fragilis*. It was hardly recognizable in the free-living species. It seems to be natural that *E. gingivalis* and *E. histolytica* demonstrate high proteolytic activity, as these two species of amoebae feed much protein in their parasitic life. The proteolytic activity was most prominently demonstrated in the medium of $\text{pH} 6.5-7.8$. Therefore, the enzymes working in this proteolysis seem to belong to the katepsin type.