

豚蛔虫 *Ascaris lumbricoides suum*

各組織中の lipolytic enzymes

松浦 聰 照

岐阜大学医学部寄生虫学教室 (森下哲夫教授)

(1966年1月4日受領)

蛔虫体腔中の酵素群については Von Brand. (1952), 小泉(1954)の報告がある, 森下ら(1963)は蛔虫体腔液中に溶真菌作用を有する酵素の存在することを発見した. このことに関連して岐阜大学寄生虫学教室においては古橋(1964), 平岡(1964)が蛔虫体腔液中の esterase, amylase 等について追求した. 森下ら(1964)は体腔液中の溶真菌作用を示す酵素が lipolytic enzyme であることを指摘し, さらに榊原(1965)はこのものが lipoprotein lipase であることを証明した. 同時に榊原は体腔液中に lipoprotein lipase と異なる lipolytic enzyme の存在することを報告した. 著者は蛔虫体組織中の lipoprotein lipase (以後 LPL と称する) 以外の lipase 特にその optimum pH が7.4である酵素についてその性質と各組織別の分布をしらべたのでここに報告する. 因みに蛔虫体腔液の LPL の optimum pH は7.8である.

実験方法

蛔虫体各組織の分離については生殖器, 消化器, 筋肉, 角質をそれぞれ別々に採取し1g 当り1ml の割で生理的食塩水を加えて homogenate し0-4°C で12,000 rpm は遠沈しその上清を粗酵素液とした.

体腔液の粗酵素液の作成は榊原(1965)の方法によつた. 基質としては0.25% ediol および同量の activated ediol を用いた. 酵素; 基質; 緩衝液 (M/15 Sørensen buffer) は1:1:1の割合とし37°C で incubate した.

酵素活性の定量は森下ら(1965)の方法にしたがい解離する glycerol により測定した.

実験成績

各組織別の lipolytic activity は Table 1 のようである. 筋肉中に特に高値を示した.

Table 1 Lipolytic activity of various organs

organ	lipolytic activity (O.D.)
ovary	0.015
muscle	0.067
digestive organ	0.008
cuticle	0.032
body fluid	0.043

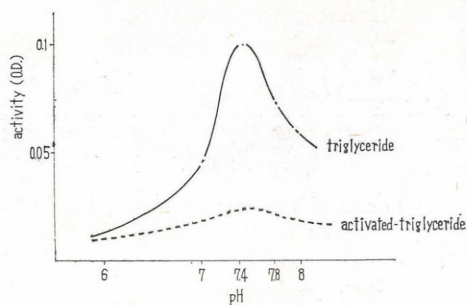


Fig. 1 Relation between pH and lipolytic activity

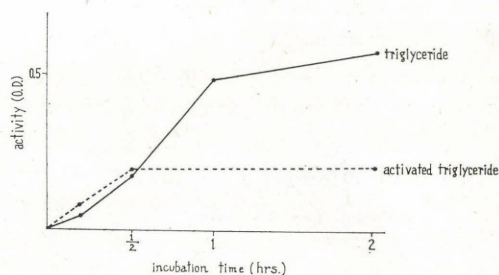


Fig. 2 Relation between incubation time and lipolytic activity

筋肉の抽出液の各 pH 域における triglycerid および activated-tiglyceride に対する活性をしらべたのが Fig 1 である. 筋肉中の酵素は optimum pH が7.4で triglyceride に対して特異的に作用することがわかる.

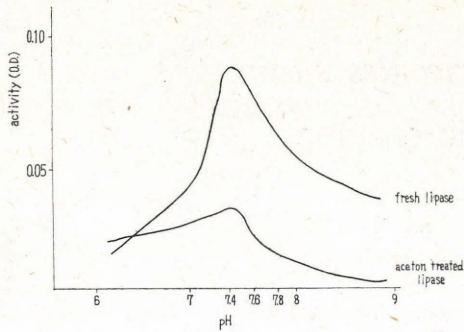


Fig. 3 Relation between pH and lipolytic activities of fresh and acetone treated muscle lipases

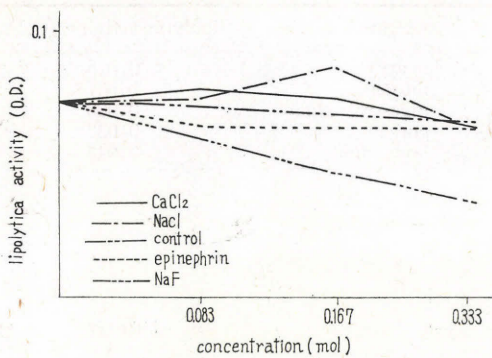


Fig. 4 Effects of various inhibitors and activators

———— CaCl₂ ———— NaCl
 - - - - - control - - - - - NaF
 ······ epinephrin

次に筋肉中の酵素について反応時間と活性との関係をしらべたのが Fig 2 である。triglyceride に対しては 1 時間後にほぼ maximum に達する。しかし activated triglyceride に対しては 30 分後に maximum となる。さきのべたように活性の強さは前者は後者より格段に高いのであるから、推理の範囲ではあるが少なくとも 2 種の lipolytic enzyme の存在が考えられる。

蛔虫体から筋肉を採取直後に作った酵素液と哺乳動物の pancreas lipase の acetone 処理粗分画法にしたがって作製した筋肉の酵素液との活性の差をしらべたのが Fig. 3 である optimum pH は両者とも 7.4 であるが新鮮なものが圧倒的に活性が高い。

次に酵素に対する各種 activator および inhibitor の影響をしらべたのが Fig. 4 である。0.167 mol CaCl₂ 液で activate され、0.167 mol NaCl 液では軽度 activate される。0.167 mol NaF 液では軽度 inhibit さ

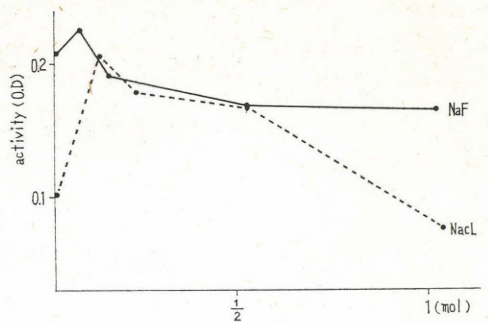


Fig. 5 Effects of inhibitors (NaF, NaCl)

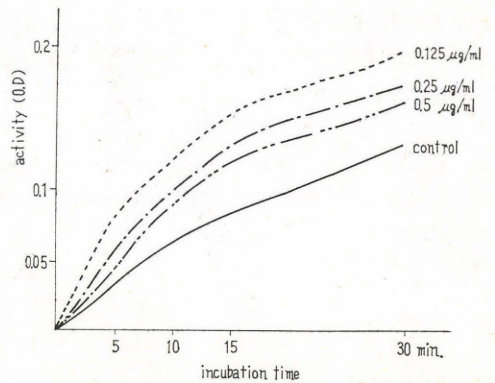


Fig. 6 Effects of 0.125 $\mu\text{g/ml}$ -0.5 $\mu\text{g/ml}$ epinephrine against ascarid muscle lipase

れ、0.167 mol の epinephrine ではほとんど影響されない。

1 および 0.5 mol の NaF 液では軽度 inhibit されることを示したのが Fig. 5 である。蛔虫体腔液の pH 7.4 lipase は榊原(1965)によるとこの濃度の NaF で 85% inhibit される。この点で筋肉中の lipase は体腔液の lipase と異なることがわかった。次に 1 および 0.5 mol の NaCl 液では強く inhibit された。体腔液の pH 7.4 lipase は榊原(1965)によるとこの濃度で全く影響されないことと異った結果を得た。

epinephrine に対してはさきに述べたように高濃度の場合には僅かに inhibit される。Fig. 6 は epinephrine の濃度を 0.125-0.5 $\mu\text{g/ml}$ にして反応系に入れ反応時間と活性との関係をしらべたものである。この程度の濃度では epinephrine による activation がみられる。このことは, Rizack (1961) の哺乳動物の脂肪組織中の epinephrine-sensitive-lipase と似た態度を示した。

次に高濃度の ATP による影響をみたのが Fig. 7 で

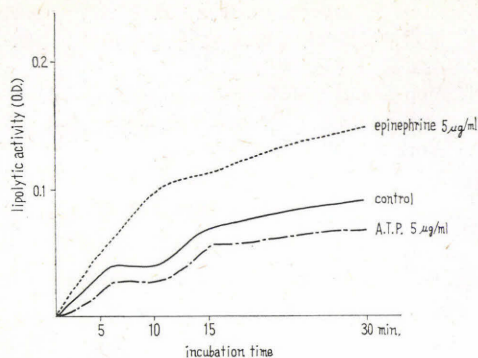


Fig. 7 Effects of various concentrations epinephrine and ATP against microsome (f) fraction of ascarid muscle.

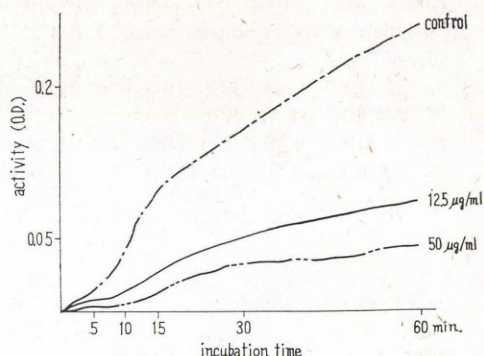


Fig. 9 Effects of ATP against ascarid muscle lipase

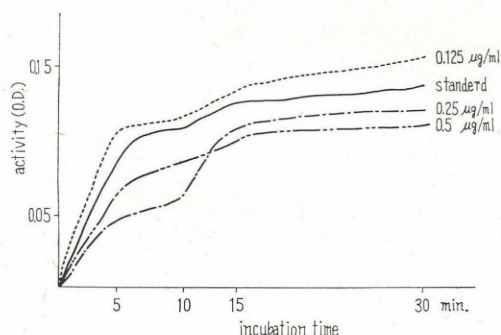


Fig. 8 Effects of ATP against ascarid muscle lipase

ある。この場合はいずれも著明な inhibit を受けた。しかしこれに反し Fig. 8 に示すように 0.125–0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度の ATP 添加では Rizack (1961) の報告と同様に 0.125 $\mu\text{g}/\text{ml}$ では activate され、それ以外の濃度域では, inhibit を受けた。

このことをさらに確かめるため、山田 (1965) の豚膵臓中の epinephrine-sensitive-lipase の場合と同様に cell-fractionation を行い microsome (F) に相当する分画を粗酵素液とし、5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の epinephrine および 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の ATP 添加を行い incubation time と酵素活性の関係をしらべたのが Fig. 9 である。この結果は epinephrine 添加で activate され、ATP 添加では inhibit された。

結 論

蛔虫体各組織中の lipolytic enzyme の分布をしらべた結果、筋肉中に最も高い活性を見出したので、このものの酵素的性状を追求し次のような結果を得た。

- 1) 本酵素の optimum pH は 7.4 であり triglyceride に対して特に高い活性を示した。
- 2) incubation time と酵素活性との関係は triglyceride 基質では 60 分で maximum に達するが, activated triglyceride では 30 分であった。この事は本粗分画中に少なくとも 2 種の lipolytic enzyme の存在を想定させる。
- 3) 本酵素は acetone 処理でその活性を減ずる。
- 4) 本酵素は低濃度の NaCl, CaCl_2 で activate され epinephrine, NaF では僅かに inhibit された。しかし高濃度の NaF でも著明な inhibit はみられなかつた。同様高濃度の NaCl では著明な inhibit がみられ、体腔液中の 7.4 lipase と異つた態度を示した。
- 5) 低濃度 epinephrine 添加では activate された。
- 6) ATP 添加では高濃度で inhibit され、低濃度では activate された。この事は Rizack (1961) が哺乳動物の脂肪組織に見出した epinephrine-sensitive lipase と一致した性状を示した。

文 献

- 1) 古橋貞二郎 (1964) : 蛔虫体腔液の各種真菌, 放線菌及び細菌に対する Lipolytic action について。寄生虫誌, 13 (6), 523–534.
- 2) 平岡義雄 (1964) : 蛔虫体腔液の酵素作用について。寄生虫誌, 13 (2), 143–148.
- 3) 小泉丹 (1954) : 蛔虫毒の研究。岩波書店, 210–214.
- 4) 森下哲夫 (1963) : 蛔虫体腔液の抗白癩分割の抗 aspergillus 力について。寄生虫誌, 12 (5), 400–404.
- 5) 森下哲夫 (1964) : 豚膵臓抽出液の抗真菌作用について豚蛔虫体腔液のそれとの関連性。寄生虫誌, 13 (3), 256–265.
- 6) 森下哲夫 (1965) : 蛔虫体腔液の lipolytic activity について。寄生虫誌, 14 (1), 98–104.

- 7) Rizack, M.A. (1961) : an epinephrine-sensitive lipolytic activity in adipose tissue. J. B. C., 236 (3), 657-622.
- 8) 榑原弘 (1965) : 蛔虫体腔液中の溶真菌酵素の研究. 寄生虫誌, 14(1), 47-67.
- 9) 榑原弘 (1965) : 蛔虫体腔液中の溶真菌酵素の研究. 寄生虫誌, 14(5), 465-489.
- 10) 山田稲好 (1965) : 膵臓抽出液及び膵液の溶真菌酵素の研究 (1) 蛔虫体腔液のそれとの比較. 寄生虫誌, 14(1), 37-46.
- 11) Von Brand. (1952) : Chemical physiology of endoparasitic animals. Academic press, New York, 40-57.

Abstract

ON LIPOLYTIC ENZYME IN THE TISSUES OF *ASCARIS LUMBRICOIDES SUUM*

AKITERU MATSUURA

(Department of Parasitology, School of Medicine, Gifu University, Gifu)

Despite the large amount of information about enzymes in ascaris body fluid reviewed by von Brand (1952) and Koizumi (1954) the occurrence of enzymes responsible for anti-mycotic activity in the body fluid had never been recognized until the work of Morisita *et al.* (1963) was reported. Later the enzyme was considered to be a lipolytic one by Morisita *et al.* (1964) and further to be a lipoprotein lipase by Sakakibara (1965), suggesting possible occurrence of another lipolytic enzyme differing from lipolytic lipase in the fluid. In the present study a further effort to elucidate distribution of this lipolytic enzyme in the whole ascaris body (cuticle, reproductive organs, muscle, digestive tract, and body fluid) and its enzymatic characters.

Extraction of the enzyme was made in the following manner: Each tissue was homogenated with saline (ml per gm wet weight). The homogenate was centrifuged at 12,000 rpm (14000 g) for 30 minutes at 0-4°C. The supernatant was used in subsequent assay. The enzyme preparation from body fluid was made according to Sakakibara's method (1965). The reaction mixture contains 1 ml 0.25 % activated or non-activated ediol as substrate, 1 ml $\frac{1}{15}$ mol Sorensen's phosphate buffer solution, and 1 ml of enzyme preparation. The enzymatic activity was expressed by the amount of glycerol produced per gm of wet weight or per milliliter of body fluid. The mixture was incubated for 0.5-1 hours at 37°C.

The highest lipolytic activity was observed in the muscle extract as shown in Table 1 and the results obtained from the extract were as follows:

The highest activity was shown at pH 7.4 and it was high when triglyceride was used as substrate. The production of glycerol reached the maximum at 60 minutes after incubation by the use of triglyceride while at 30 minutes by that of activated triglyceride. The difference of time required to reach the maximum may be suggestive of the presence of two kinds of lipolytic enzymes in the preparation used.

Aceton-treatment of the preparation resulted in the decrease of enzymatic activity. The activity was activated by the addition of NaCl and CaCl₂ at very low concentration while it was slightly inhibited by that of epinephrine and NaF. At higher concentrations of NaCl marked inhibition was shown but not at those of NaF. In this point the lipase prepared from ascaris body fluid differs from the enzyme in question.

The action was activated by the addition of epinephrine at low concentration. Addition of ATP to the mixture resulted in an inhibition of the activity at high concentrations but in an activation at lower ones. The enzyme preparation thus examined showed a similarity to lipase in mammalian tissues reported by Rizack (1962) in the effects of these reagents.