

## 蛔虫体腔液の酵素作用について (2)

平岡 義雄

岐阜大学医学部寄生虫学教室 (森下哲夫教授)

(1966年3月4日受領)

蛔虫には多数の酵素の存在が知られているが、なかでも Schopfer(1932)は蛔虫 protease を, Rogers(1940)は豚蛔虫の腸 amylase を, von Brand(1952), Fairbrain *et al.* (1957)は体腔液中の各酵素を, また小泉(1954)もそれらについて研究報告している。その他多数の研究者により蛔虫には amylase, invertase, maltase, pepsin, lipase などの酵素の存在が報告されている。一方 enzyme inhibitor としては, Weinland(1903), Hezog(1905) Marvin *et al.* (1963)により pepsin, trypsin, chymotrypsin inhibitor が報告されている。

著者(1964)は, さきに豚蛔虫 (*Ascaris lumbricoides suum*) の体腔液の amylase, esterase について報告したが, さらに豚蛔虫体腔液の酵素の性質および酵素作用について詳細な知見を得るため今回は, protease 作用と, amylase 作用およびその酵素学的な性質などについて検討したので報告する。

### amylase 作用

蛔虫体腔液中に amylase 作用を有する酵素が存在することは, すでに述べたが, 豚蛔虫の体腔液が, どの程度の amylase 作用を有するか, またその amylase の性質はどのようなものかを検討するため次の実験を行った。

体腔液採取法は前報と同様に行い, これを生理的食塩水で2倍に稀釈し粗酵素とした。

#### A. amylase 活性測定法

##### 1) Somogyi Nelson 法(1945)

基質として1.2%溶性澱粉ならびに5% saccharose を用い生成還元糖を測定した。

#### 試薬:

a) 銅試薬  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  71g, 酒石酸カリウムナトリウム 40g を約 700 ml の水にとかす。1N の NaOH 100 ml を加え, ついで攪拌しながら 8g の  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  を 80 ml の水にとかしたものを加えて加温

し, 最後に  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ (無水) 180g を加え全量を 1l とする。1~2日放置したのち, 上質の濾紙で濾過して褐色共栓瓶に保存する。

b) Nelson 試薬  $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$  50g を 900 ml の水にとかし, これに濃硫酸 42g を加えてよく混和し, さらに 6g の  $\text{Na}_2\text{NaAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  を 50 ml の水にとかして加える。24~48時間 37°C の incubator 中に放置後褐色共栓瓶中に保存する。

#### 操作法:

1.2%溶性澱粉溶液(または5% saccharose) 1ml, M/20 phosphate buffer 1ml および酵素液 1ml を加え 37°C で incubate する。そして沸騰浴中で5分間加熱して酵素反応を停止させる。この液 0.5ml を蒸留水 3ml と亜鉛液 0.25ml の混液中に入れ, それに水酸化バリウム液 0.25ml を加え, よく混和する。これを 2000 rpm で 2~3分遠心沈澱させる。この上澄 2ml をとり N/10 HCl あるいは N/10 NaOH で pH 7 に調整し全量を 10ml とする。この 2ml をとつて Folin Wu の検糖管に入れる。これに 2ml の銅試薬を加え, 十分に沸騰している水浴中で 10分間加熱後, 流水で 3~5分冷却し, これに Nelson 試薬 2ml を加えて攪拌する。さらに蒸留水を 25ml の刻線まで加えて 660  $\mu$ m で比色する。

#### 標準曲線:

精製 glucose の一定量を正確に秤取し, 精製水を用いて稀釈し glucose 量 10, 20, 30, 40 および 50  $\mu$ g/ml の稀釈液を作り上記操作法にしたがつて発色させ 660  $\mu$ m にて比色し, 標準曲線を作成した。これを Fig. 1 に示した。

#### 2) Fehling Lehmann Schoore 法(以下 FLS と略す) 操作法

pH 5 に調製した 1.2%溶性澱粉溶液\* 10ml を 100 ml の三角フラスコにとり, 37°C の恒温槽に入れ, 予熱する。これに稀釈酵素液 1ml を入れ, 30分間反応

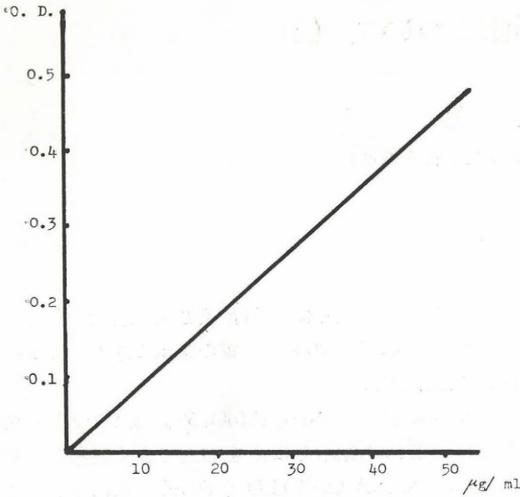


Fig. 1 Standard curve

させた後 Fehling 試薬のアルカリ液 2 ml を加え、直火で 2 分間煮沸し直ちに流水中で冷却し、30% 沃化カリウム液 2 ml, 25% 硫酸 2 ml を加え遊離した沃素を 0.05N チオ硫酸ナトリウム液で滴定する。別に酵素液と Fehling 試薬のアルカリ液を混合したものを、blank とした。

生成した還元糖を glucose 量として表わす方式は生成還元糖 mg = 1.62 × (blank 滴定値 - 試験滴定値) である。

B. 体腔液中の amylase 活性

蛔虫体腔液を前報と同様に透析したのち、上清と沈渣について Somogyi Nelson 法で amylase 活性を測定した結果を Table 1 に示すが、上清に活性が多く、この

Table 1 Liberated glucose µg per ml of body fluid using sacchrose as substrate (Somogyi-Nelson method)

Sample	glucose µg/ml
supernatant	4.8
supernatant	4.2
sediment	1.2
sediment	1.0

amylase は上清分画に移行するものと思われる。また FLS 法により生成した還元糖量を Table 2 に示すが、上清 1 ml 当り 3 mg 前後の還元糖 (glucose として) の生

\* 1.2 g の溶性澱粉 (Merck 製) を少量の水に懸濁し 50 ml の沸騰水中に徐々に加えたのち、5 分間煮沸し冷却後 pH 5 の buffer 25 ml および水を加えて 100 ml とする。

Table 2 Reducing sugar produced by body fluid using starch as substrate (F. L. S. method)

No.	glucose mg
1	3.56 mg/ml
2	3.24
3	2.92

成が測定された。なお、いずれも 30 分間の incubation である。

C. amylase の性質

1) amylase の至適 pH

pH 3.5 は lactate buffer, pH 4.0~5.5 は acetate buffer, pH 6.0~8.0 は phosphate buffer, pH 9.0~10.0 は borate buffer を用い、蛔虫体腔液中の amylase の至適 pH を溶性澱粉基質を用いて、Somogyi Nelson 法と FLS 法で測定したところ、Fig. 2, 3 に示すように pH 5 附近

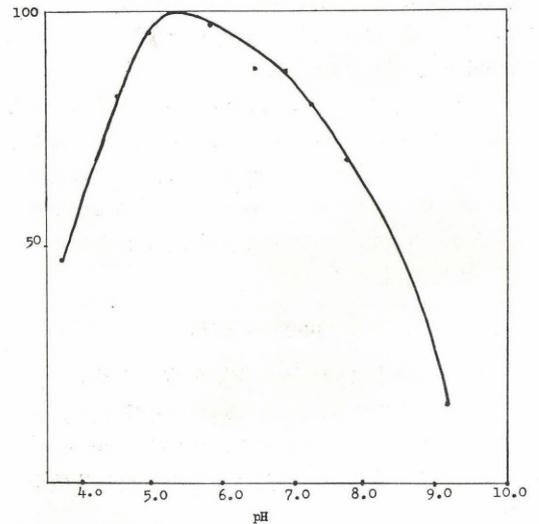


Fig. 2 The effect of pH using starch as substrate (Somogyi Nelson method)

に peak がみられ、その至適 pH は略 5.0 であった。またヨード澱粉反応により、他の α-amylase と至適 pH を比較すると Table 3 に示すごとく蛔虫 amylase は pH 5 附近に至適 pH を有し、これは *Bacillus*, *Rhizopus* および *Aspergillus* の α-amylase と同じ至適 pH を有することが判明した。

2) amylase の安定 pH

体腔液と各 pH 域の buffer を混合して 30 分間 37°C で放置したのち、基質と作用させた結果を Table 4 に

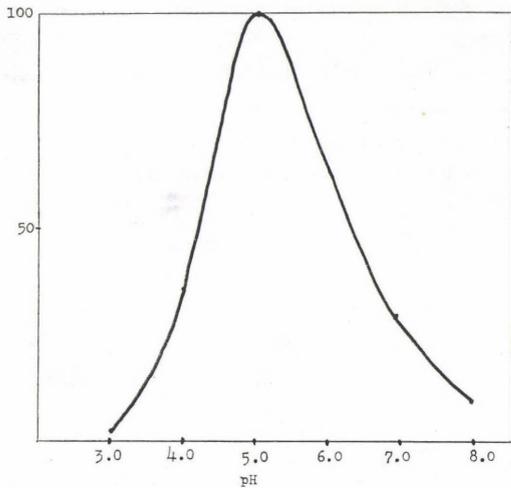


Fig. 3 The effect of pH using starch as substrate (FLS method)

Table 3 Optimum pH of amylase

Enzyme	Optimum pH
<i>Bacillus dextrinogenic</i>	4.5—6.0
" <i>saccharogenic</i>	4.8—5.2
<i>Rhizopus delemar</i>	3.5
" <i>niveus</i>	3.5
<i>Aspergillus niger</i>	4.9—5.2
" <i>oryzae</i>	4.9—5.2
<i>Endomycopsis</i>	5.4
<i>Oospora</i>	5.6
Malt	4.7—5.4
Pancreas (Human)	6.9
Pancreas (Pork)	6.9
Saliva (Human)	6.9
<i>Ascaris suum</i>	5.0

Table 4 Stability-pH of amylase

Enzyme	Stability-pH
<i>Bacillus dextrinogenic</i>	4.8—10.6
" <i>saccharogenic</i>	4.0—7.8
<i>Rhizopus delemar</i>	5.4—7.0
" <i>niveus</i>	5.5—7.0
<i>Aspergillus niger</i>	4.7—9.5
" <i>oryzae</i>	4.7—9.5
<i>Endomycopsis</i>	6.0—7.5
<i>Oospora</i>	6.0—10.3
Malt	4.9—9.1
Pancreas (Human)	4.0—11.0
Pancreas (Pork)	7.0—8.5
Saliva (Human)	4.5—11.0
<i>Ascaris suum</i>	4.5—9.5

示すが、pH 4.5~9.5の間で酵素活性は安定であつたが、それ以外の pH 域では活性は急激に減少した。したがつて豚蛔虫の体腔液 amylase の安定 pH はヒトの pancreas や唾液の amylase に類似した性状を示した。

### 3) amylase の至適温度

豚蛔虫の amylase の至適温度を求めめるため、20~60°C で incubate したのち FLS 法により生成還元糖を求めた結果を Fig. 4 に示すが 37°C 附近にその最適温度

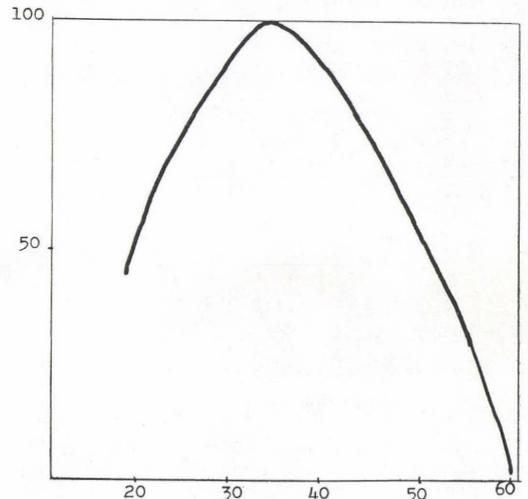


Fig. 4 Optimum temperature

を有することが判明した。

### 4) Cl<sup>-</sup>, Ca<sup>++</sup>による影響

体腔液を acetone dry powder とし、これを ion exchanger を用いて Cl<sup>-</sup>を除去した。この水溶液と、生理的食塩水に溶解したものとの両者について Cl<sup>-</sup>による影響

Table 5 Effect of chlor ion

Enzyme	Cl <sup>-</sup> Activation
<i>Bacillus dextrinogenic</i>	+
" <i>saccharogenic</i>	-
<i>Rhizopus delemar</i>	-
" <i>niveus</i>	-
<i>Aspergillus niger</i>	-
" <i>oryzae</i>	-
<i>Endomycopsis</i>	-
<i>Oospora</i>	-
Malt	-
Pancreas (Human)	++
Pancreas (Pork)	++
Saliva (Human)	++
<i>Ascaris suum</i>	+

を検討した。この結果を Table 5 に示したが、体腔液の amylase は Cl<sup>-</sup> によつて幾分活性化された。次に体腔液を EDTA 処理すると活性が完全に消失することから、この amylase に対して Ca<sup>++</sup> は Table 6 に示す如く保護

Table 6 Calcium protection of amylase

Enzyme	Ca <sup>++</sup> Protection
<i>Bacillus dextrinogenic</i>	++
" <i>saccharogenic</i>	-
<i>Rhizopus delemar</i>	-
" <i>niveus</i>	-
<i>Aspergillus niger</i>	++
" <i>oryzae</i>	++
<i>Endomycopsis</i>	+
<i>Oospora</i>	++
Malt	++
Pancreas	++
Saliva	++
<i>Ascaris suum</i>	++

作用を示すものと思われる。Rogers らは豚蛔虫の amylase の炭酸水素ナトリウムによる activation を報告しているが本酵素の場合は至適 pH より判断して炭酸水素ナトリウムの activation は考えられない。

5) 分解生成物および分解限度よりみた amylase の性質

体腔液の amylase による分解生成物を paper chromatography により、他の  $\alpha$ -amylase,  $\beta$ -amylase および glucoamylase と比較した。この結果を Fig. 5, 6 に示し

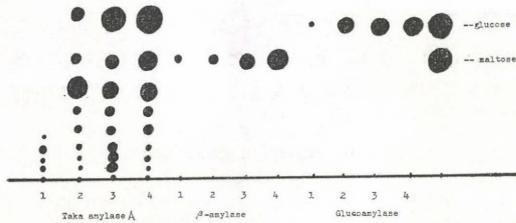


Fig. 5 Paper chromatography of amylase

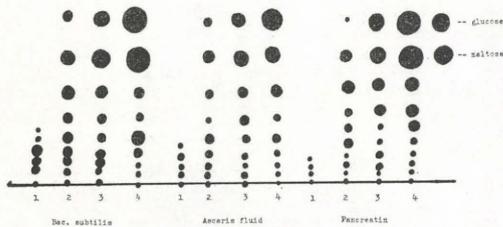


Fig. 6 Paper chromatography of  $\alpha$ -amylase

た。各々左から1番目がヨード反応青色となる点、2番目が紫色となる点、3番目が褐色、4番目が無色となる点である。Fig. 5, 6 の右端は対称として転開させた glucose と maltose の spot である。 $\beta$ -amylase は最初から maltose の生成がみられるが、glucoamylase は glucose のみ生成する。 $\alpha$ -amylase は初めの青色の点では、maltose は、みられないが、その後次第に maltose と glucose が生成する。体腔液の amylase は、ヨード反応青色の点では maltose, glucose は認められず、 $\alpha$ -amylase である *B. subtilis* や、Pancreatine と同じように澱粉分子を at random に切断するように思われる。また paper chromatography の結果は、これらの  $\alpha$ -amylase とほとんど同作用を示すものと判断される。

次に体腔液 amylase による主な分解生成物を、この paper chromatography ならびに FLS 法と Tauber Kl-einer 法(以後 T.K. 法と略す)との比較から判断すると Table 7 に示すような dextrin と maltose であり、ヒト

Table 7 Hydrolysis product by each enzymes

Enzyme	Product
<i>Bacillus dextrinogenic</i>	dextrin, maltose
" <i>saccharogenic</i>	glucose, maltose
<i>Rhizopus delemar</i>	maltose
" <i>niveus</i>	maltose
<i>Aspergillus niger</i>	maltose
" <i>oryzae</i>	maltose
<i>Endomycopsis</i>	glucose, maltose
<i>Oospora</i>	dextrin, maltose
Malt	dextrin, maltose
Pancreas (Human)	dextrin, maltose
Pancreas (Pork)	dextrin, maltose
Saliva (Human)	dextrin, maltose
<i>Ascaris suum</i>	dextrin, maltose

Table 8 Limit of hydrolysis of amylase

Enzyme	Limit of hydrolysis
<i>Bacillus dextrinogenic</i>	35%
" <i>saccharogenic</i>	70%
<i>Rhizopus delemar</i>	48%
" <i>niveus</i>	48%
<i>Aspergillus niger</i>	48%
" <i>oryzae</i>	48%
<i>Endomycopsis</i>	50%, 97%
<i>Oospora</i>	37%
Malt	38%
Pancreas (Human)	45%
Pancreas (Pork)	45%
Saliva (Human)	45%
<i>Ascaris suum</i>	50%

の pancreatin や唾液 amylase などの  $\alpha$ -amylase と類似していることが推察される。一方この amylase による加水分解の限度を調べると、Table 8 に示すように澱粉に対しては約 50% の分解を示すに止まり、他の  $\alpha$ -amylase とほぼ同じ結果が得られた。加水分解率とヨード澱粉反応との関係は、Fig. 7 に示したが、この結果から

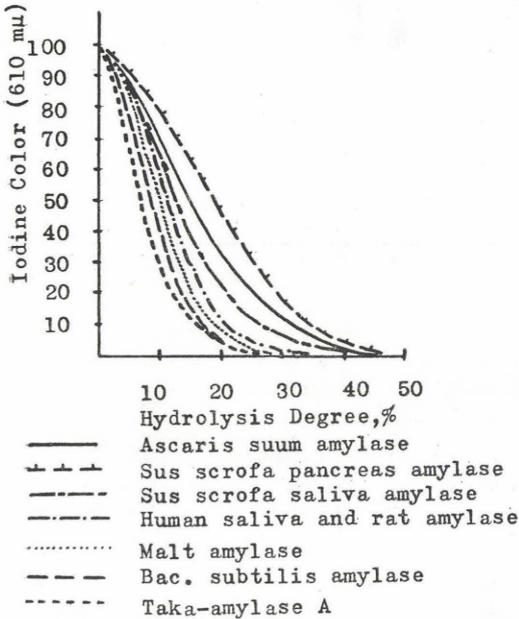


Fig. 7 Relation between iodine color and hydrolysis degree

も蛔虫体腔液の amylase は pancreas や saliva の  $\alpha$ -amylase と同様な性質を示すことが判明した。

6) 澱粉による吸着

$\alpha$ -amylase は澱粉により吸着されるといわれるので、著者は蛔虫体腔液の amylase について、澱粉による吸着実験を行った。すなわち、酵素液に生澱粉を約 30% となるように加え、30 分間攪拌したのち、濾過してその澱粉の活性を測定した。この結果は Table 9 に示すように、体腔液 amylase は、他の  $\alpha$ -amylase と同じく澱粉は吸着された。一方  $\beta$ -amylase や glucoamylase は、吸着されないといわれているので、この amylase は  $\alpha$ -amylase と思われる。

7) 体腔液 amylase 中の glucoamylase 活性

体腔液 amylase の分解生成物として、先に述べたように glucose が認められたので glucoamylase の存在を疑い次の実験を行った。

Table 9 Starch adsorption of amylase

Enzyme	Starch adsorption
<i>Bacillus dextrinogenic</i>	++
" <i>saccharogenic</i>	-
<i>Rhizopus delemar</i>	+
" <i>niveus</i>	+
<i>Aspergillus niger</i>	+
" <i>oryzae</i>	+
<i>Endomycopsis</i>	+
<i>Oospora</i>	+
Malt	+
Pancreas (Human)	+
Pancreas (Pork)	+
Saliva (Human)	+
<i>Ascaris suum</i>	+

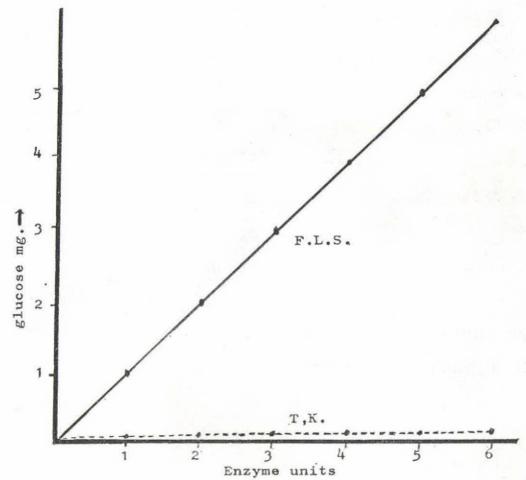


Fig. 8 Calibration curve

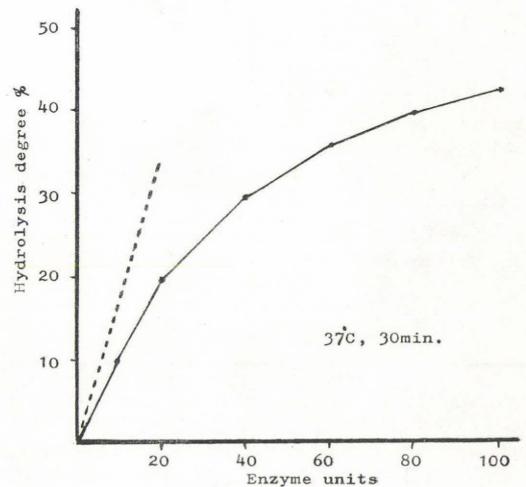


Fig. 9 Hydrolysis degree of body fluid amylase

0.5% 溶性澱粉溶液, pH 5.0 の M/20 acetate buffer, および酵素液を 37°C で 30 分間作用させたのち, F.L.S 法と T.K. 法により測定した. この結果は Fig. 8 に示すように, T.K. 法では活性が認められず, 分解生成物は glucose のみでないことが判明した. したがって *glucoamylase* の存在は否定されるものと思われる.

8) 酵素単位と澱粉分解率の関係

F.L.S. 法により, 酵素単位と澱粉率との関係を求めた. この結果は Fig. 9 に示したが,  $\beta$ -amylase と異なる分解曲線が得られた. なお点線は  $\beta$ -amylase による分解曲線を示す.

protease 作用

蛔虫腸が protease 活性を示すことは, すでに Carpenter ら (1957) や一井ら (1959) により報告されている. またこの protease は, 至適 pH は 5.0~6.0 にあり, catepsin 系の protease であろうと述べているが, 体腔液の protease 活性については記載が見られない. そこで著者は体腔液の protease 活性の測定を次のように試みてみた.

測定法:

1) Formol 法 1% casein と McIlvaine buffer の混液 5 ml に体腔液 (3 倍稀釈) 1.0 ml を加え, 37°C にて 2, 6, 24 時間作用させ, その 1 ml を中性ホルマリン 0.5 ml 中に加え, M/100 NaOH で紅色を呈するまで測定する.

2) Folin 法

1% casein と McIlvaine buffer の混液 5 ml に希釈体腔液 1.0 ml を加え, 37°C にて 2, 4, 6 時間作用させた後, 0.4 M トリクロール酢酸 4.0 ml を加え濾過する. 濾液 1 ml に 0.4 M 炭酸ナトリウム 8 ml, Folin 試薬 1 ml を加え, 20 分間 37°C で発色させ冷却後 660m $\mu$  で比色定量する.

A. 体腔液中の protease 活性

この結果は Table 10, 11 に示すように, いずれの測定法でも protease 活性は見られなかつた.

Table 10 Protease activity of body fluid by Folin Ciocalteau method

	pH of substrate					
	3.2		5.5		7.5	
	Blank	Reaction	Blank	Reaction	Blank	Reaction
2 hrs	0.115	0.118	0.110	0.112	0.110	0.108
4 hrs	0.111	0.115	0.110	0.115	0.100	0.102
6 hrs	0.120	0.120	0.120	0.125	0.110	0.105

Table 11 Protease activity of body fluid by Formol method

	pH of substrate					
	3.2		5.5		7.5	
	Blank	Reaction	Blank	Reaction	Blank	Reaction
2 hrs	19.45	19.45	9.12	9.15	2.58	2.58
6 hrs	21.0	20.5	9.40	9.45	2.80	2.75
24hrs	21.20	21.25	10.00	9.90	3.35	3.20

blank の値が高く, 体腔液中には多量の peptide が存在するものと思われるので, 体腔液中の peptide と T.C.A. 濃度との関係を, Folin 法により測定した. この結果を Table 12 に示すが, 多量の peptide が存在し,

Table 12 Determination of peptide in body fluid

TCA mol	Peptide absorbance
0.2	0.420
0.4	0.335
0.6	0.212
0.8	0.160
1.2	0.085

T.C.A. 濃度が高くなるにしたがい凝固沈澱することが判明した.

一井ら (1959) は蛔虫体腔液の protease 活性を報告しているが, 著者は, これに反し, 測定不能であつた. この原因については, 第 1 に Marvin, Reodes や小泉らが報告している trypsin inhibitor, chymotrypsin inhibitor が存在すること. 第 2 に多量の peptide が存在するため採取後の体腔液が反応途中において, proptase がこれらに抱合され沈澱すること. 第 3 に蛔虫体腔液の protease は基質特異性を有し, casein などには作用しにくいこと, また protease 活性が小さく, 分解生成物に比べ体腔液中の peptide が前に述べたように極めて多く, Formol 法および Folin 法による測定を困難にしているなどの点が考えられる. 第 2 の理由として述べたことは, 測定時反応液中にかなりの沈澱が見られることから想像される. また第 3 の理由としては, Flury *et al.* (1912) が述べているが, 蛔虫体腔液の polypeptide 分解酵素は卵白アルブミンにはよく作用するが, フィブリンに対しては作用が緩慢であることなどからも一応想像される.

いずれにしても体腔液中の protease 測定には inhibitor や, 多量の peptide と protease の分離などの処理が必要のように思われる.

## 結 語

1) 蛔虫体腔液(主としてその上清)中には澱粉分解酵素が存在する。

2) この amylase は他の動物性  $\alpha$ -amylase と性質がほとんど同一であり, したがって  $\alpha$ -amylase と思われる。その至適 pH は, 脊椎動物性  $\alpha$ -amylase が pH 7.0 附近にあるのに対し, この amylase は 5.0 附近であり, 安定 pH は 4.5~9.5 であった。また  $\text{Cl}^-$  により活性化され,  $\text{Ca}^{++}$  によつて保護作用を受ける。

3) protease 活性は Formol 法, Folin 法のいずれによつても測定されなかつたが, この原因については trypsin inhibitor, chymotrypsin inhibitor などの原因が考えられる。

## 参 考 文 献

- 1) 赤堀四郎(1955): 酵素研究法, 朝倉書店, Vol. 1 159.
- 2) von Brand, T. (1952): Chemical physiology of endoparasitic animals. Academic Press, New York, 135-137.
- 3) Carpenter, M.F.P. (1952): Cited from the Review of Fairbrain, D. "The Biochemistry of Ascaris." Exptl. Parasitol. 6, 461-544.
- 4) 平岡義雄(1964): 蛔虫体腔液の酵素作用について (1), 寄生虫誌, 13(2), 143-148.
- 5) 一井昭五・杉浦健一・松本克彦(1959): 蛔虫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(1), 19-21.
- 6) 小泉 丹(1954): 蛔虫毒の研究. 岩波書店, 210-214.
- 7) Rhodes, M. B. (1963): Trypsin and Chymotrypsin inhibitor from Ascaris suum. Exptl. Parasitol. 13, 266-272.
- 8) Rogers, W. P. (1940): Digestion in Parasitic Nematodes. The Digestion of Carbohydrates. J. Helminthol., 18, 143-154.
- 9) 関根隆光ら(1958): 光電比色法, 各論 2, 南江堂, 27-36.

## Abstract

## ON THE ENZYMATIC ACTIVITIES IN ASCARIS BODY FLUID II.

YOSHIO HIRAOKA

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

The previous report in which the author (1964) demonstrated amylolytic action in ascaris body fluid, dealt with no details on its enzymological natures. The present work is an extension of the previous one in an attempt to elucidate them. The results obtained were as follows:

1) In ascaris body fluid especially in its supernatant amylolytic action similar to that of alpha-amylase found in vertebrates was demonstrated. The pH optima of ascaris amylase was around 5.0 while that in vertebrates was around 7.0. The action remained stable when incubated in media with pH ranging from 4.5 to 9.5 at 37°C. It was activated by  $\text{Cl}^-$  and protected by  $\text{Ca}^{++}$ .

2) No proteolytic activity was detected in ascaris body fluid by means of either Formol or Folin methods. It is presumably due to the presence of trypsin and chymotrypsin inhibitors in the fluid.