

豚蛔虫 *Ascaris lumbricoides suum* 各組織中の lipolytic enzymes (2)

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8月20日受領)

蛔虫体腔液中の lipolytic enzyme については, optimum pH 7.8 の lipoprotein lipase と pH 7.4 の脊椎動物の腓リパーゼ様の性状をもつ lipase との 2 種の lipase の存在することが, 森下ら(1964)及び榊原(1965)によって報告されている。著者は第 1 報で蛔虫筋層中に存在する lipolytic enzyme の酵素学的性状を追求し, このものが体腔液中の至適 pH 7.4 lipase に, pH 及び基質特異性の点で一致するが, inhibitor に対する態度はむしろ至適 pH 7.8 の lipoprotein lipase に近以していることを報告した。

脊椎動物では Hahn (1943) が heparin 注入による lipemia clearing activity を発見し, Anderson *et al.* (1950), Brown(1953) は heparin 静注後の血漿中に *in vitro* でこれを実証した。

Korn(1955)は lipemic clearing effect は lipoprotein lipase(L.P.L.) であるといい, Robinson *et al.*(1957)は L.P.L. と腓リパーゼに及ぼす抑制物質の作用の差違を研究し, Spitzer *et al.*(1956)は肝臓から抽出した heparinase が L.P.L. を破壊することを証明した。Korn (1957)によると *Favobacterium leparicum* がつくった heparinase が L.P.L. を不活性化するという。Nikkilä (1958)はリン酸カルシウムの吸着度やクエン酸での溶出度が heparin と L.P.L. とで近似していることを報告した。

Engelberg(1958)は heparin 静注後の血漿から heparin を吸着除去し, 活性を失なった血漿に heparin 添加をすと再び L.P.L. 活性が見出されたという。以上の様に heparin と L.P.L. との特異な関係に注目して, 著者は蛔虫の筋層から抽出した pH 7.4 lipase と lipoprotein lipase との関係について研究した。可及的 intact な状態で heparin を含む Krebs-Ringer 液中で筋層を incubate した結果, 筋層から pH 7.8 の lipoprotein

lipase が得られることを知り, このものの酵素学的特性について, 体腔液中の lipoprotein lipase と比較してここに報告する。

実験方法

蛔虫体から生殖器, 消化管を除去し, 残りの角皮をつけたまの筋層を生理的食塩水でよく洗う。1g 当り 1 ml の割に Krebs-Ringer 液を加え, 37°C で 30 分 pre-incubation を行ない, これを対照の粗酵素液とした。次に 1g 当り 1 ml の割に Krebs-Ringer 液を加え更に各量の heparin を添加し, 37°C で 30 分 pre-incubation を行なった場合の粗酵素液と比較した。

基質としては 0.25% ediol 及び同%の activated ediol を用いた。この方法は榊原(1965)の方法に準じた。酵素:基質:緩衝液 (Clark-Lubs buffer solution) は 1:1:1 の割合とした。

酵素活性の定量は森下ら(1965)の方法に従い解離した glycerol を測定した。

実験成績

対照粗酵素液の各種 pH 域の基質 triglyceride 及び activated triglyceride に対する活性をしらべたのが Fig. 1 である。これを見ると optimum pH は 7.4 で triglyceride に対しやや高い分解作用をすることがわかる。

次に対照粗酵素液を 1 昼夜透析しその沈渣を生食水で原液の濃度としたものについて, pH 域及び基質に対する活性の状況をしらべたのが Fig. 2 である。この場合 triglyceride に対する活性が一層明瞭になった。

次に heparin を 1 ml に対し 100 γ 添加した粗酵素液の各種 pH 域での基質に対する活性をしらべたのが Fig. 3 である。この場合 activated triglyceride に対して triglyceride より高い活性が見られ, 更に pH 7.8 で

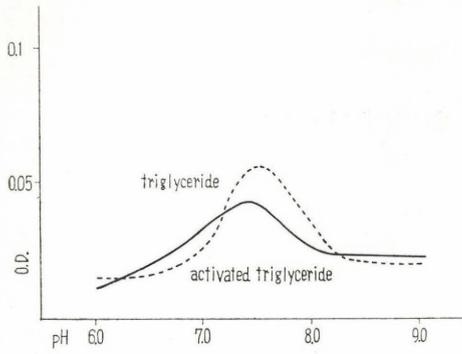


Fig. 1 Relation between pH and lipolytic activity of control crude enzyme

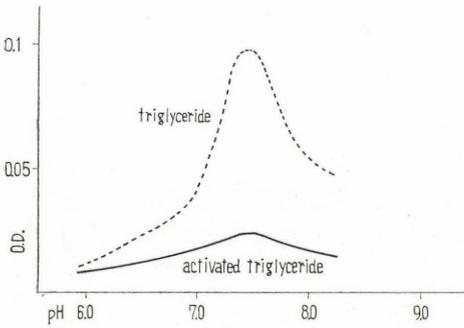


Fig. 2 Relation between pH and lipolytic activity of dialysed control crude enzyme

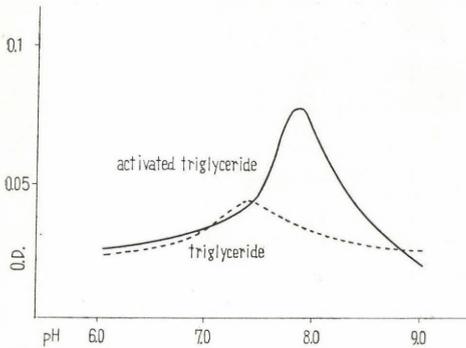


Fig. 3 Relation between pH and lipolytic activity of crude enzyme pre-incubated with 1/10 mg heparin

optimumであつた。一方 triglyceride に対する活性は pH 7.4 で optimum を示して、明らかに 2 種の基質に対する分解作用の特異性がみとめられる。

この heparin で pre-incubation された粗酵素液を 1 昼夜透析しその沈渣を生食水で原液の濃度としたものに

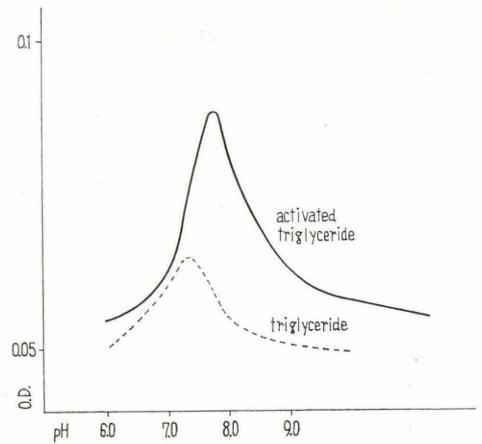


Fig. 4 Relation between pH and lipolytic activity of dialysed crude enzyme pre-incubated with 100 γ /ml heparin

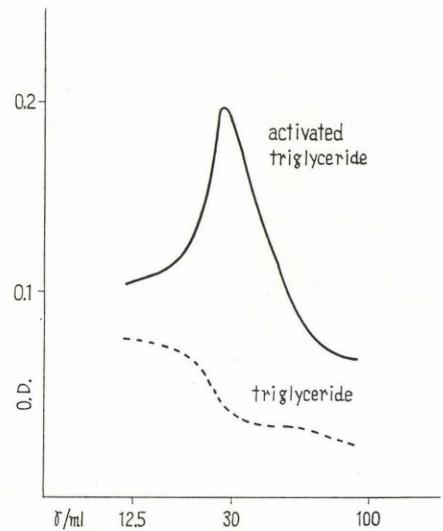


Fig. 5 Optimum concentration of added heparin to ascarid muscle and cuticle extract in the case of lipase \rightarrow lipoprotein lipase

ついて pH 域及び基質に対する活性をしらべたのが Fig. 4 である。この場合もより判然と activated triglyceride に対する活性が増し、しかもその optimum pH は 7.8 にあつた。

次に pre-incubation の際に添加する heparin の濃度と lipoprotein lipase 活性の増大との関係をしらべたのが、Fig. 5 である。1 ml に対し 12.5, 30, 100 γ と夫々添加した場合、30 γ /ml の時に lipoprotein lipase の活

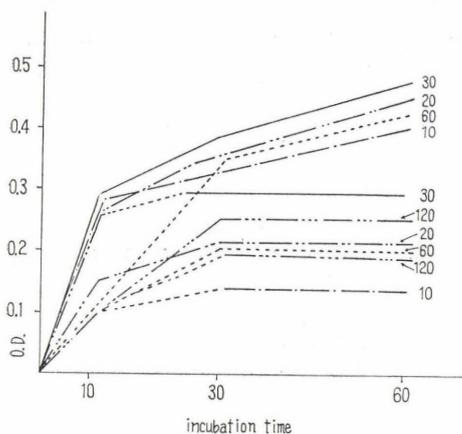


Fig. 6 Relation between incubation time and lipoprotein lipase activity.

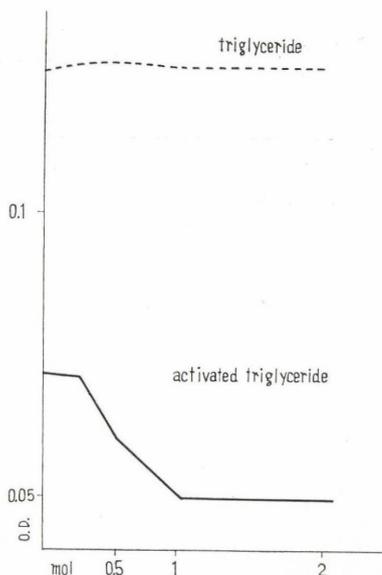


Fig. 7 Relation between lipolytic activity and NaCl conc. in the case of heparin treated crude enzyme.

性は最高値を示した。

更に反応時間と lipolytic activity との関係をしらべたのが、Fig. 6 である。lipoprotein lipase 活性が高くその最高値を示すのは 30 分後であった。

以上の様に heparin の pre-incubation によつて lipoprotein lipase の活性が著しく高くなることが証明出来た。このことを各種の activator 及び inhibitor によつて実証した。

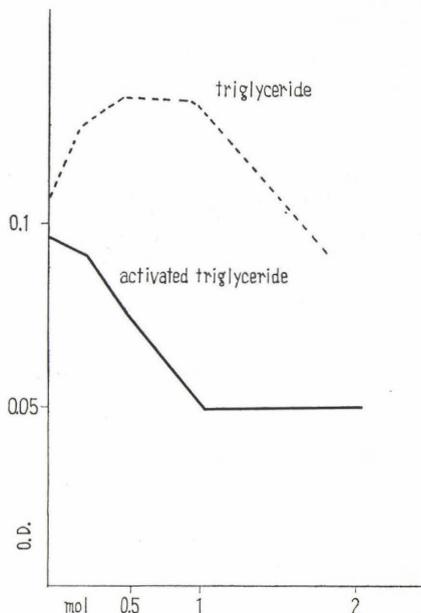


Fig. 8 Relation between lipolytic activity and NaCl conc. in the case of control crude enzyme.

a) NaCl 添加による影響

heparin 処理粗酵素液に 0.5 ~ 1 mol NaCl を加えると著しい lipoprotein lipase 活性に対する inhibit が見られ、lipase 活性には変化がない。このことが Fig. 7 に示されている。これに反して対照粗酵素液に対しては Fig. 8 に示される様に、1 ~ 2 mol NaCl の添加で lipase 活性の inhibit が見られた。

b) NaF 添加による影響

heparin 処理粗酵素液に対しては Fig. 9 の様に、1/32

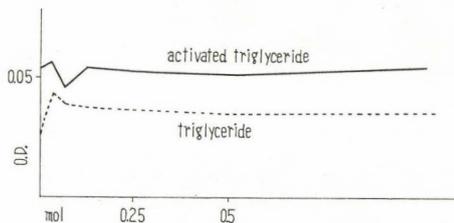


Fig. 9 Relation between lipolytic activity and NaF conc. in the case of heparin treated crude enzyme.

mol で軽度に activate され、対照の場合は Fig. 10 の様に 1/32 mol で軽度に inhibit される。

c) cholate 添加による影響

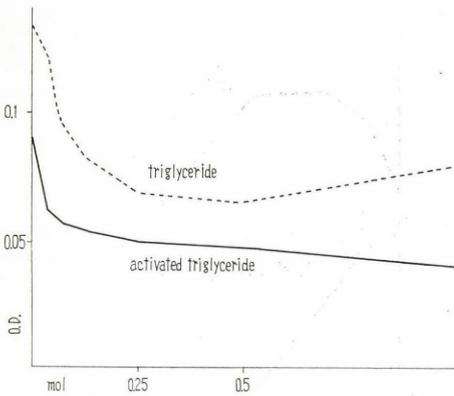


Fig. 10 Relation between lipolytic activity and NaF conc. in the case of control crude enzyme.

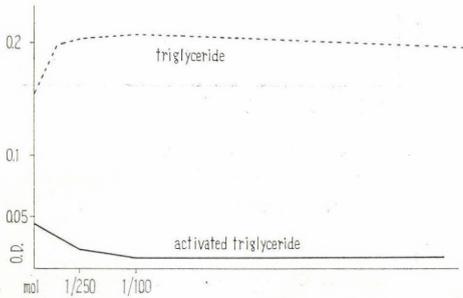


Fig. 11 Relation between lipolytic activity and cholate conc. in the case of heparin treated crude enzyme.

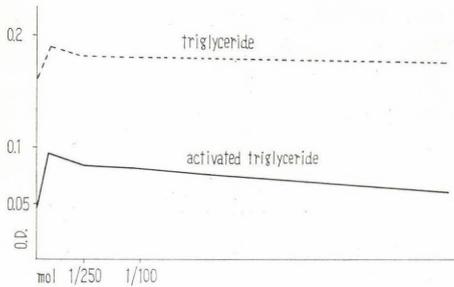


Fig. 12 Relation between lipolytic activity and cholate conc. in the case of control crude enzyme.

heparin 処理粗酵素液は Fig. 11 の様に、1/100 mol で軽度の inhibit が見られ、対照粗酵素液では Fig. 12 の様に 1/100 mol で軽度の activate が見られる。

d) taurocholate 添加による影響

heparin 処理粗酵素液では Fig. 13 の様に 1/100 mol

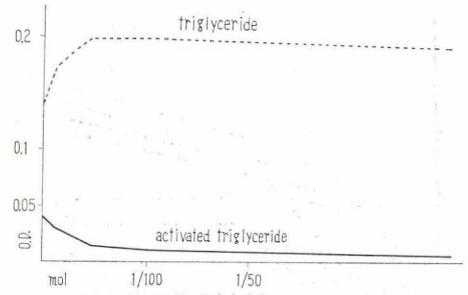


Fig. 13 Relation between lipolytic activity and sodium taurocholate conc. in the case of heparin treated crude enzyme.

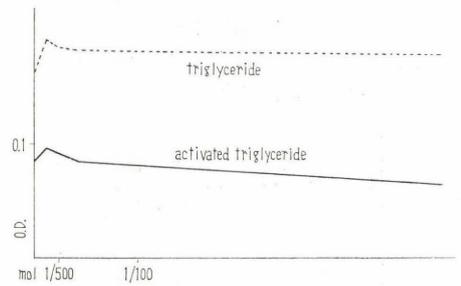


Fig. 14 Relation between lipolytic activity and sodium taurocholate conc. in the case of control crude enzyme.

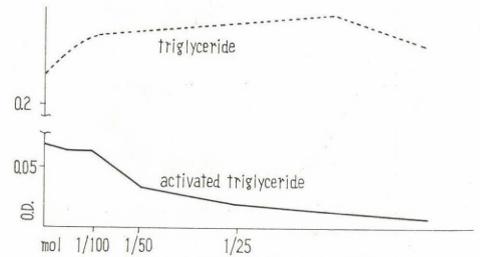


Fig. 15 Relation between lipolytic activity and sodium pyrophosphate conc. in the case of heparin treated crude enzyme.

で inhibit が見られる。対照粗酵素液では Fig. 14 の様に 1/100 mol で activate される。

e) pyrophosphate 添加による影響

heparin 処理粗酵素液では Fig. 15 に示す様に 0.005 ~ 0.01 mol で軽度の activate が見られる。対照粗酵素液では Fig. 16 の様に 0.02 ~ 0.1 mol で inhibit される。

f) protamin 添加による影響

heparin 処理粗酵素液では Fig. 17 の様に 100/125 ~

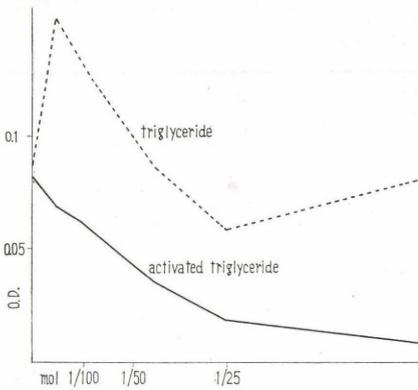


Fig. 16 Relation between lipolytic activity and sodium pyrophosphate conc. in the case of control crude enzyme.

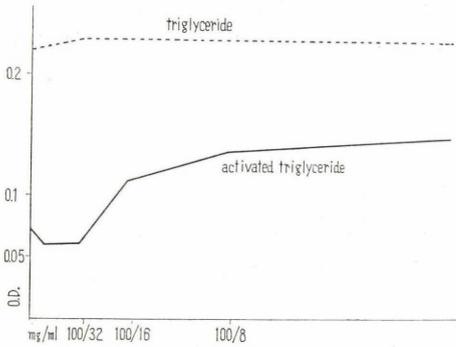


Fig. 17 Relation between lipolytic activity and protamin conc. in the case of heparin treated crude enzyme.

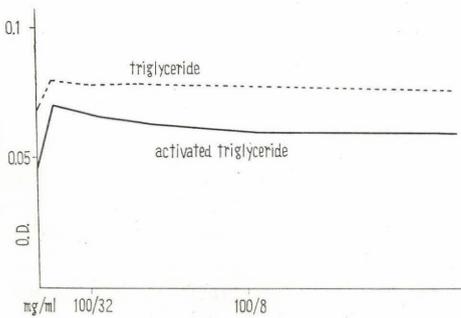


Fig. 18 Relation between lipolytic activity and protamin conc. in the case of control crude enzyme.

100/32 mg/ml の添加で強く inhibit される。対照粗酵素液では Fig. 18 の様に変化がない。

g) CaCl_2 添加による影響

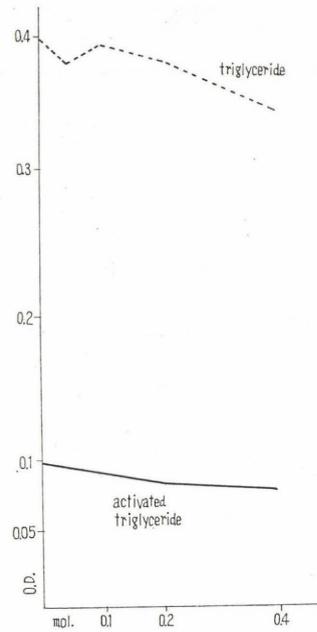


Fig. 19 Relation between lipolytic activity and CaCl_2 conc. in the case of heparin treated crude enzyme.

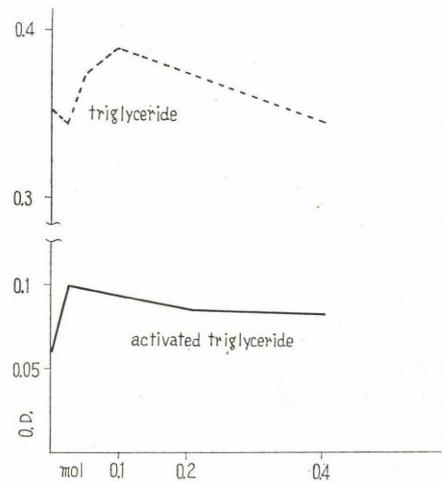


Fig. 20 Relation between lipolytic activity and CaCl_2 conc. in the case of control crude enzyme.

heparin 処理粗酵素液では Fig. 19 の様に軽度の inhibit が見られる。対照粗酵素液では Fig. 20 の様に 0.025 ~ 0.5 mol で activate される。

以上の様な inhibitor 及び activator に対する態度は 蛔虫筋層を intact な形で heparin 処理することによつ

Tabl 1. Effects of activators and inhibitors upon lipoprotein lipase activity in both extracts with heparin and without heparin

Inhibitors & activators	Inhibition or activation of the activity in	
	Extract with heparin (mol)*	Extract without heparin (mol)*
NaCl	Strongly inhibited (0.5-1.0)	Strongly inhibited (1.0-2.0)
NaF	Slightly activated (1/32)	Slightly activated (1/32)
Cholate	Slightly inhibited (1/100)	Slightly activated (1/100)
Taurocholate	Slightly inhibited (1/100)	Slightly activated (1/100)
Pyrophosphate	Slightly activated (5/1000-1/100)	Moderately inhibited (2/100-1/10)
Protamin sulfate	Strongly inhibited (0.80-3.12)	No effect (1.5-25.0)**
CaCl ₂	Slightly inhibited (0.05-0.40)	Moderately activated (2.5/100-5/10)

* Concentration of inhibitors and activators in molarity at which inhibition or activation was observed. ** mg per ml.

て、粗酵素液での実験ではあるが、蛔虫体腔液中に見られる様な至適 pH 7.8 の lipoprotein lipase の活性が著しく高められると考えられる。

結 語

Robinson *et al.* (1957) は脊椎動物で lipoprotein lipase 及び腓 lipase に及ぼす inhibitor の差違の研究を行ない、Korn (1957) は *Favobacterium leparicum* の生産する heparinase が lipoprotein lipase を不活性化することを実証した。Nikkilä (1958) はリン酸カルシウム gel の吸着度及びクエン酸の溶出度から heparin と lipoprotein lipase との密接な関係について研究した。Engelberg (1958) は heparin 静注後の血漿から heparin を吸着、除去しその活性を失なった血漿に heparin を添加すると再び lipoprotein lipase 活性を得ることを報告した。榊原 (1965) は蛔虫体腔液中に至適 pH 7.8 を示す lipoprotein lipase を発見し、しかも脊椎動物のその至適 pH は 8.5 とされている。著者 (1966) は蛔虫筋層中の lipase が至適 pH 7.4 であることを証明した。その際蛔虫体腔液中の至適 pH 7.4 の lipase と基質特異性では一致するが、inhibitors に対する態度が pH 7.8 の lipoprotein lipase に近似することを指摘した。

このことから粗酵素の状態ではあるが、筋層を intact な状態で heparin を含む Krebs-Ringer 液中で pre-incubation することによって lipoprotein lipase の活性の著しく高められることを実証した。

- 1) heparin 処理によって粗酵素液は activated triglyceride に対しより高く活性を示す様になった。
- 2) 添加 heparin の至適濃度は 30 γ /ml である。
- 3) heparin が Krebs-Ringer 液での pre-incubation の時間は 37°C 下で 30 分後が、最も高い lipoprotein

lipase 活性値を示した。

- 4) heparin 処理と処理しない筋層酵素液の各種 activator 及び inhibitor に対する態度は第 1 表の様である。

以上の様な点から heparin 処理によつて蛔虫筋層中の至適 pH 7.8 の lipoprotein lipase が著しく活性を高められることを知つた。

参 考 文 献

- 1) Anderson, N. C. & Fawcett, B. (1950) : An antichylomicronemic substance produced by heparin injection. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 74, 768.
- 2) Korn, E. D. (1955) : Clearing factor, a heparin-activated lipoprotein lipase. J. B. C., 215, 15.
- 3) Korn, E. D. (1959) : The assay of lipoprotein lipase *in vitro* and *in vivo*. Method of Biochemical Analysis, 7, 145.
- 4) 松浦聡照 (1966) : 豚蛔虫各組織中の lipolytic enzymes (1). 寄生虫誌, 15(2), 105.
- 5) 森下哲夫, 他 (1965) : 蛔虫体腔液の lipolytic activity について. 寄生虫誌, 14(1), 98.
- 6) Nikkila, B. A. (1958) : Partial purification of clearing factor of post human plasma. Biochimica et Biophysica Acta, 27, 612.
- 7) 榊原弘 (1965) : 蛔虫体腔液中の溶真菌酵素の研究 (1). 寄生虫誌, 14(1), 47.
- 8) 榊原弘 (1965) : 蛔虫体腔液中の溶真菌酵素の研究 (2). 寄生虫誌, 14(5), 465.
- 9) Spitzer, J. A. & Spitzer, J. J. (1956) : Effect of liver on lipolysis by normal and post heparin sera in the rat. Am. J. Physiol., 185, 18.

AbstractON LIPOLYTIC ENZYMES IN TISSUES OF *ASCARIS LUMBRICOIDES* SUUM II.

AKITERU MATSUURA

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

In the perienteric fluid of *Ascaris* the occurrence of both lipoprotein lipase with a optimal pH of 7.8 and lipase with that of 7.4, closely resembling pancreas lipase of vertebrates, was reported by Morisita *et al.* (1965) and Sakakibara (1965). In the previous paper (Matsuura, 1966) some enzymatic natures of lipolytic enzymes occurring in *Ascaris* muscle were elucidated: it was similar in optimal pH and substrate specificity to lipase of vertebrates but in reactivity with inhibitors tested to lipoprotein lipase. As indicated by many workers such as Anderson (1950), Brown (1953), Spitzer (1956), Korn (1957), and Nikkilä (1958), the relation between heparin and lipoprotein lipase is of characteristic. The present work was made in an attempt to clear enzymatic natures of lipase in *Ascaris* muscle basing on the findings above-mentioned.

The highest activity of lipoprotein lipase was observed at pH 7.8 in the crude extract which was prepared by pre-incubating *Ascaris* muscle layer with cuticle in Krebs-Ringer solution containing heparin 30 gammas per ml for 30 minutes at 37°C after throughly washing with saline.

The effects of activators and inhibitors as NaCl, NaF, cholate, taurocholate, pyrophosphate, protamin, and CaCl₂ upon enzyme activities were comparatively investigated in both heparin-containing and non-heparin-containing extracts. The results obtained were summarized in Table I.

From the results obtained it may be assumed that increase in activity of lipoprotein lipase by the addition of heparin may occurs only in living *Ascaris* muscle.