

# *Trichomonas vaginalis* のリンゴ酸脱水素酵素- isoenzyme に関する研究

田 中 耕 誠

慶応義塾大学医学部寄生虫学教室

(昭和46年7月30日 受領)

## 緒 言

## 実験材料および実験方法

リンゴ酸脱水素酵素(以下 MDH と略す)は1910年に Batelli and Stern および Thumberg によりそれぞれ独立して発見されて Wolfe and Nieland によつてブタ心筋より純粋な非結晶性のものとしてとり出された。一方 MDH-isozyme については、1957年 Vesell and Bearn (1957, 1958) の報告以来 Tsao (1960), Sophianopoulos and Vestlung (1960), Lowenthal *et al.* (1961), Yokulis *et al.* (1962), Goldberg (1963), Kaplan (1963) 等により主として一般哺乳動物組織において研究が進められ種々の知見が得られている。

また Laufer (1961) はかいこの発生期に於ける MDH-isozyme の分離を試みているし、Moore and Vilee (1963) は胎生期のウニにおいて发育期にともなう MDH-isozyme の変化を追求している。しかし原虫における報告は未だ見当らない。

著者は前報(田中1970, 1971)まで *Trichomonas vaginalis* (以下 T.v. と略す) の TCA-cycle 上の脱水素酵素について種々検討を行ない、T.v. の呼吸代謝においてリンゴ酸脱水素酵素(MDH) は重要な役割を演じているであろうことを報告した。さらに T.v. における MDH 活性について細胞化学的ならびに電顕細胞化学的にその虫体内局在を究明し、同時に生化学的に遠心分画中における所在を検討したところ、本原虫の場合是一般細胞において Kaplan (1963) が提唱したものと異なる局在を示すことが推測される成績、およびミトコンドリアを有しないとされている(Inoki *et al.*, 1959) *Trichomonas* 虫体内においても哺乳動物の組織中におけると同様いくつかの isozyme の存在を思わせる成績が得られた。そこで今回は電気泳動法により T.v. 虫体内の MDH-isozyme について2~3の検索を行ない興味ある知見を得たので報告する。

1. 実験 I : セルローズアセテート電気泳動法による分析

当教室で所謂浅見培地(Asami, 1952)で無菌的に250代余り継代培養保存せる T.v. 株(SD 株, OS 株)を寒天を除いた浅見培地で48時間培養し、運動活発な虫体を材料とした。この材料の一部をチオグリコレート培地で培養すると共に鏡検により無菌状態を確認した。多数の虫体を冷却下にて遠沈集獲し、生理食塩水にて3,000 r.p.m. 10分間2回、 $\frac{1}{15}$ M 燐酸緩衝液(pH 7.6)にて同じく一回洗滌し、その沈澱部の1容に対して3容の冷却せる  $\frac{1}{15}$ M 燐酸緩衝液(pH 7.6)を加えて懸濁し、その後ドライアイスアセトンにて4~5回凍結融解を行ない顕微鏡下で虫体が完全に破碎されていることを確めてこの homogenate を試料とした。

泳動装置には Kohn (1958) の装置の小川 (1963, 1965) 改良型泳動装置(常光産業株式会社製セルローズアセテート膜電気泳動装置)を使用し、電気泳動学会の標準操作法(小川, 1966)に沿つて行なつた。緩衝液には0.07M ベロナール、ベロナールソーダ緩衝液(pH 8.6)(ベロナール0.83g, ベロナールソーダ6.38g, 蒸溜水500.0ml それに細菌の繁殖を防ぐ目的で0.1%の割合にチメチロサルを加えたもの)を用い、泳動膜には国産セルローズアセテート膜・セバラックス(Separax; 富士フィルム社)を用いた。術式通り泳動装置をセットしセバラックスを張つたのち、マイクロジェクターにて前記の試料を塗布し、電圧100V、膜幅1cmにつき5mA の定電流で約90分間泳動し、全線の泳動距離が3.5cm となるようにした。反応液としては Wilkinson (1965) の処方の変法により、0.5M Sodium malate 20ml, Nitrobluetetrazorium (NBT: Sigma) 5mg, NAD (Sigma) 50mg に0.06M 燐酸緩衝液(pH 7.6)を加

えて100ml としたものをを用いた。使用直前にこの溶液20 ml に対して phenazin methosulfate (PMS) を0.5mg の割合に溶解し、予めフラン器に入れて37°C に暖めておき、泳動を終了したセルローズアセテート膜を直ちにこの反応液の中に試料塗布面を上にして一端より静かに挿入し全部が液中に浸った状態で暗所に静置し、37°C で約30分間 incubate した。

セルローズアセテート膜は試料の保持能力が弱いので動かすと酵素や反応生成物が流出するので反応中はきわめて静かに放置しておく必要があった。反応終了後10% 醋酸液に2~3分間浸して反応を停止せしめ、次いで水洗を行ない室温で自然乾燥をさせた。

## 2. 実験II：ディスク電気泳動法による分析

当教室で所請浅見培地に無菌的に30代から250代余り継代培養保存せる *T.v.* 虫体の11株 (SD 株, OS 株, NA 株, TA 株, TB 株, TC 株, TD 株, TE 株, TF 株, TG 株, TH 株) について実験Iの場合と同様に48時間培養の後、多数の虫体を冷却下において遠沈集穫、洗滌を行ない次いでドライアイスアセトンにて凍結融解し、0.06M 磷酸緩衝液 (pH 7.6) を用いて各株の whole homogenate を作成した。

これら11株の中、SD 株, OS 株, TC 株については虫体破碎液を前報 (田中, 1971) の場合と同様に冷却下で遠沈分画を行ない、900×g 沈査 (Sed I), 24,000×g 沈査 (Sed II) および上清に分けた。次いで上清部と等容になるように0.06M 磷酸緩衝液 (pH 7.6) を加えて懸濁させそれぞれを試料液とした。

泳動装置には中村 (1966) による萱垣医理工工業製のディスク電気泳動装置 (1069型) を用い pH 8.2, 濃度7.5%のゲルで泳動した。泳動方法は Ornstein および Davis によつて考案された系を中心とした永井 (1967 a, b) の方法によつて行なつた。

電極槽用の緩衝液にはトリス6.0g, グリシン28.8g に水を加えて1l としたもの (pH 8.3) を使用し、その上部緩衝液に100ml 当り0.5ml の0.001% BPB 水溶液を加えて泳動中の leading ion の位置の追跡をしやすくした。ガラス管一本当り2mA の定電流で泳動を行ない展開距離を約5cm とするようにした。泳動時間は90分~120分を要した。泳動終了後泳動槽よりガラス管をはずし冷水を満たした水槽中に移し、その中でガラス管よりゲルをとり出した。

酵素反応液には Schwert *et al.* (1952) の方法に準じて0.1M Sodium malate 1ml, P.M.S. (0.4mg/ml) 2ml, 1M Tris Buffer (pH 8.6) 2ml, NBT (1.6

mg/ml) 1ml, NAD (1.05mg/ml) 0.2ml, 蒸留水6.2ml を混合して用いた。

ガラス管よりとり出したゲルは0.7×10cm の小試験管中に予め温めておいた上記の酵素反応液中に浸し37°C 恒温室 (暗所) にて約30分間 incubate した。反応時間終了の後、ゲルを水洗して酵素反応液を洗い去り、7% 醋酸溶液を加えて反応を停止せしめ、この醋酸溶液に浸したまま暗所に保存した。なお対照としては前記の反応液より sodium malate を除いた溶液中で同様に incubate したものをとつた。

反応ゲルの濃度測定は富士理研 K.K. 製, FUJI-OX Densitometry (FADIV型) を用いスリット0.2×3mm で600m $\mu$  の干渉フィルターを使用して行なつた。

## 実験結果

1. セルローズアセテート電気泳動法による分析結果写真1に示すように SD 株, OS 株共に whole homogenate では3本の band が検出された。band の現

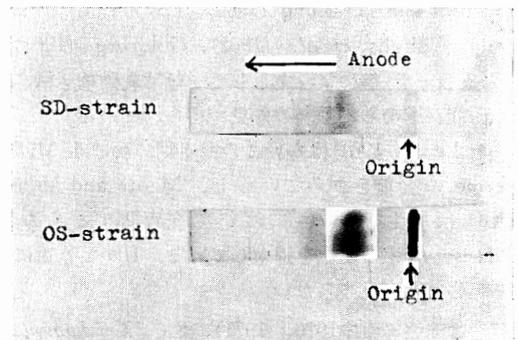


Fig. 1 MDH isoenzyme pattern of SD and Os-strain of *T. vaginalis* by acetate cellulere electrophoresis. Three bands stained diffusely are recognized.

われ方は両株の間で一致せずいくぶん相異なるように見えた。それぞれの株について何回となく実験を繰り返したが band の現われ方は同一株については毎回同じであつた。

しかし本法により出現した band は必ずしも明瞭なものではなく拡散した状態を示した。これは支持体であるセルローズアセテート膜は試料の保持量が少なく、その保持能力も弱いために酵素や染色物が流出するためであろうと考えられた。

## 2. ディスク電気泳動法による分析結果

ディスク電気泳動法は実験Iで行なつたセルローズア

セテート電気泳動法よりもはるかに分離能が秀れていることが分り明瞭な band を得ることが出来た。実験 I の結果から株により band の現われ方に相異があることも推測されたので、株数を増やし11株の試料について実験を行なつたところ株により最大8本、最小4本の band が検出された。これらについて分析を行なつた結果各株における MDH-isozyme パターンは総計8本の band より成る基本パターンの変形として把握することが出来た。出現した band に対し Wieland and Pfeleider (1957) や Wlikinson (1965) の方法に従い易動度の大きいものより I から VIII迄の一連番号をつけ Band I ~ Band VIIIとし、それぞれを MD<sub>1</sub>, MD<sub>2</sub>, … MD<sub>8</sub> と命名した。ただし本実験においては各株における対応する band の酵素の異同についての検討は特に行なわなかつた。

11株についての band の出現の仕方はつぎの五つのタイプに分けられた。すなわち SD 株, TG 株, TH 株の homogenate に現われたタイプで Band I, II, III, IV, V, VIの6本の band が認められた SD 型 (写真2), OS 株, NA 株に現われた Band II, IV, V, VIの4本の band が認められたタイプ (OS 型) (写真3), TC 株, TE 株に現われた Band II, IV, V, VI, VII, VIIIの6本が現われる TC 型 (写真4) および TF 株, TA 株, TD 株に現われたタイプで, OS 型同様に Band II, IV, V, VIの4本が認められるが, OS 型 (写真3) では MD<sub>2</sub> が最も活性が強く MD<sub>4</sub>, MD<sub>5</sub>, MD<sub>6</sub>

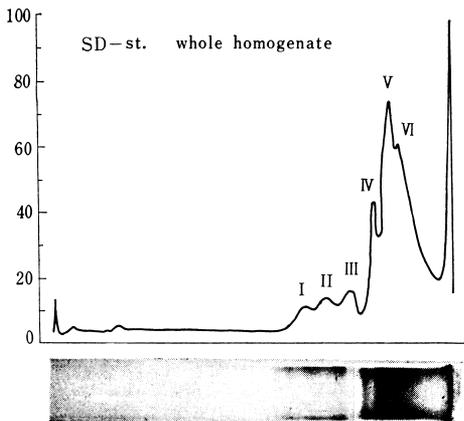


Fig. 2 Disc electrophoretic demonstration of MDH in whole homogenate of SD type *T. vaginalis*. Isoenzymes was separated in six bands, MD 1, 2, 3, 4, 5 and 6.

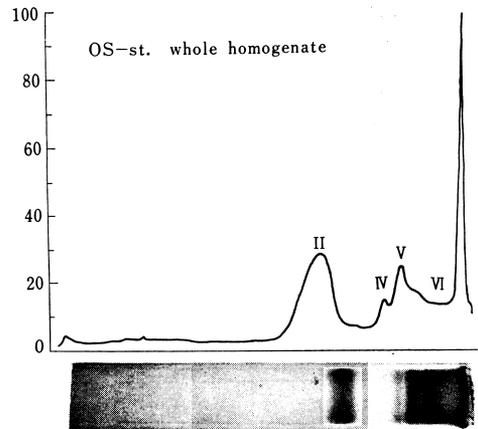


Fig. 3 MDH isoenzyme pattern of OS type *T. vaginalis*. Four bands are demonstrated; MD 2, 4, 5 and 6.

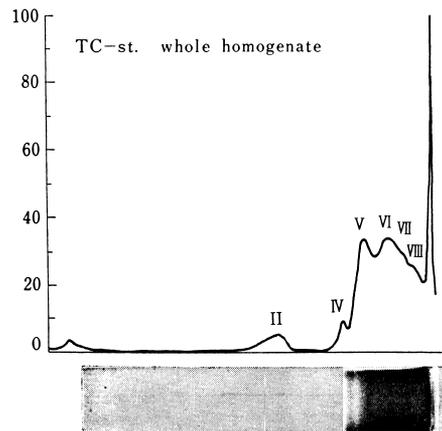


Fig. 4 MDH isoenzyme pattern of TC type *T. vaginalis*. Six bands are demonstrated; MD 2, 4, 5, 6, 7 and 8.

よりも強い活性を示すのに対し、このタイプでは写真5に示すように MD<sub>4</sub>, MD<sub>5</sub>, MD<sub>6</sub> の方が強い活性を示し、MD<sub>2</sub> はきわめて弱い活性を示す点で OS 型とは明らかに区別されるタイプ (TF 型) (写真5) および TB 株に現われた Band I, II, III, IV, V, VI, VII, VIIIの8本の band が認められた TB 型 (写真6) の五つのタイプに分けられた。

このように *T.v.* 虫体の homogenate における MDH-isozyme は株によつて相異することが分り11株中 MD<sub>2</sub>, MD<sub>4</sub>, MD<sub>5</sub>, MD<sub>6</sub> は全部の株に現われたが MD<sub>1</sub>, MD<sub>3</sub>, MD<sub>7</sub>, MD<sub>8</sub> は保有する株と、しない株とがあつた。また各々の株について繰返し泳動を行ない incubate した

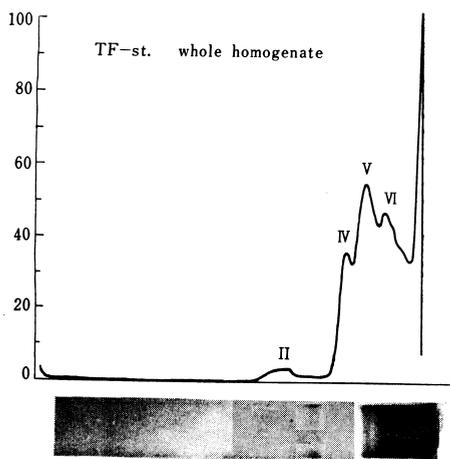


Fig. 5 MDH isoenzyme pattern of TF type *T. vaginalis*. Four bands are demonstrated; MD 2, 4, 5 and 6. Note the difference from that of OS type.

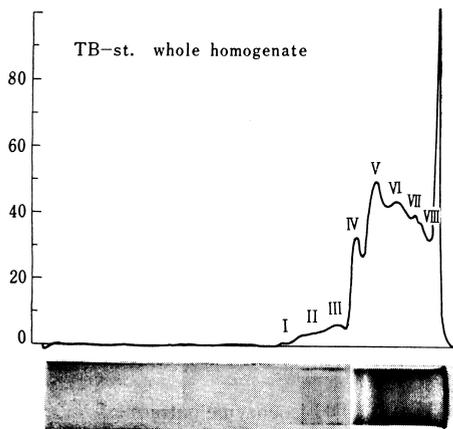


Fig. 6 MDH isoenzyme pattern of TB type *T. vaginalis*. Eight bands are demonstrated.

が各回とも band の現われ方は同一であつた。さらにまた11種の株の試料を予め作成し凍結保存をしておき同時に泳動ならびに incubate を行なつて見た結果も上記の五つのパターンは明瞭に区別された。

次に SD 型, OS 型, TC 型の代表3株の homogenate について遠心分画中の MDH-isozyme の所在を追求した結果が写真7, 8, 9に示す通りである。写真で明確なように3株ともに24,000×g 上清にはその虫体の whole homogenate に現われた全部の band が明瞭に現われたが, 900×g, 24,000×g の沈査には共に一部の band しか現われず活性も弱かつた。すなわち SD

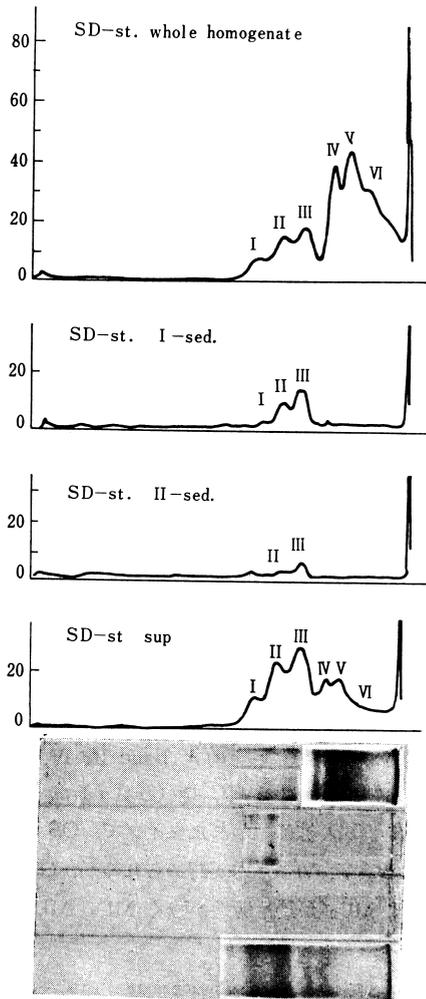


Fig. 7 Localization of MDH isoenzymes in centrifugal fractions (SD type *T. vaginalis*).

- I-Sed. Sediment of 900×g centrifugation
- II-Sed. Sediment of 24,000×g centrifugation
- Sup. Supernatant of 24,000×g centrifugation

株では上清には MD<sub>1</sub>, MD<sub>2</sub>, MD<sub>3</sub>, MD<sub>4</sub>, MD<sub>5</sub>, MD<sub>6</sub> の whole homogenate と同様の6本の band が認められたが, Sed Iには MD<sub>1</sub>, MD<sub>2</sub>, MD<sub>3</sub> のみが弱い活性を示し, Sed IIには MD<sub>2</sub>, MD<sub>3</sub> のみが極く弱い痕跡程度に認められるのみで共に MD<sub>4</sub>, MD<sub>5</sub>, MD<sub>6</sub> は全く認められなかつた(写真7)。また OS 株では上清には MD<sub>1</sub>, MD<sub>4</sub>, MD<sub>5</sub>, MD<sub>6</sub> と whole homogenate と同様の band が明瞭に認められたが, Sed Iには MD<sub>1</sub> の

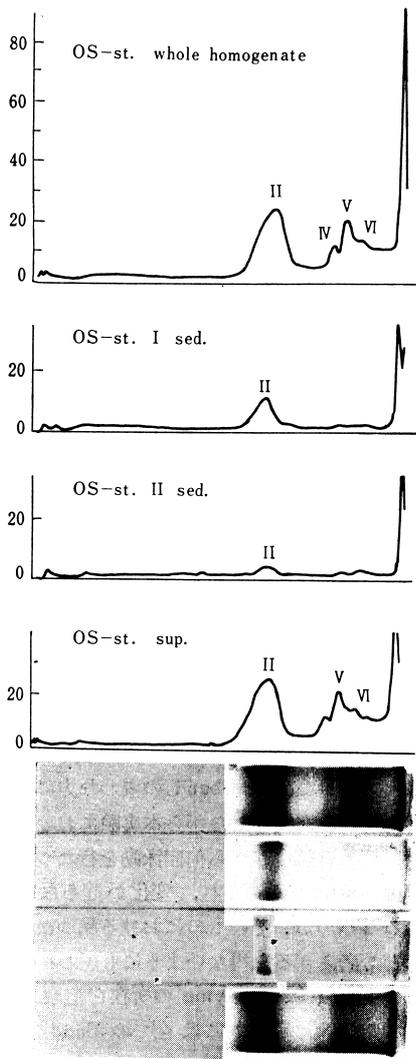


Fig. 8 Localization of MDH isoenzymes in centrifugal fractions (OS type *T. vaginalis*).

みが弱い活性で現われ、Sed IIには MD<sub>1</sub> が痕跡程度に認められるのみであった (写真8)。TC 株でも上清には whole homogenate の場合と同様の6本の band が全部明瞭に現われたが Sed I, Sed IIには MD<sub>2</sub> が弱い活性を示し、MD<sub>5</sub>, MD<sub>6</sub> が痕跡程度に認められるのみであった (写真9)。

#### 総括ならびに考按

MDH-isozyme は1957年 Vesel land Bearn によつて人血清中よりでんぷんブロック電気泳動法で三本の Band

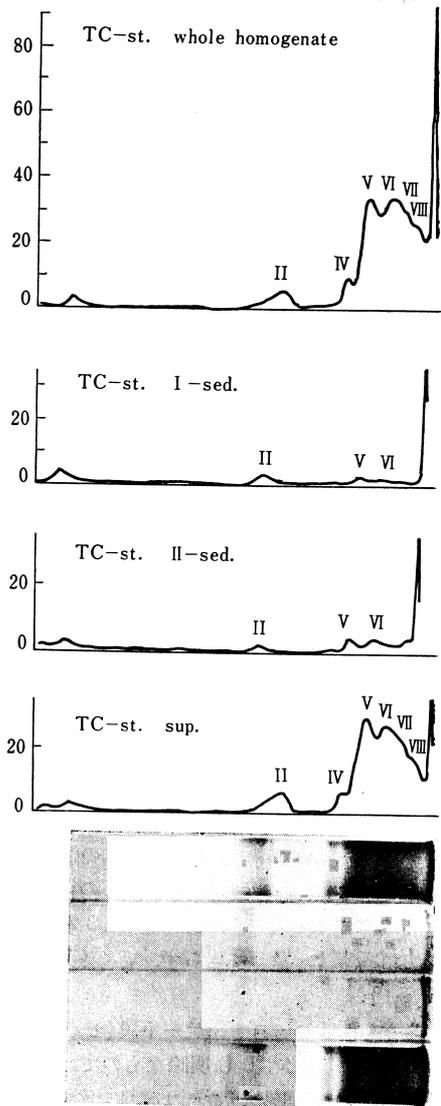


Fig. 9 Localization of MDH isoenzymes in centrifugal fraction (TC type *T. vaginalis*).

に分離されて以来多くの研究者が種々の動物、植物および微生物中に不均一な形として存在することを示した。Yoklis (1962) は寒天ゲル電気泳動法により死後8時間の剖検組織について MDH-isozyme の分離を行ない4つの分画を認めたにすぎなかったが、Lowenthal *et al.* (1961) は寒天ゲル電気泳動法により人および羊の脳の MDH-isozyme の分離を行ない哺乳動物の組織中には少なくとも6つの MDH-isozyme があることを認め、陰

極より3番目の分画に最大の活性があり全体の $\frac{2}{3}$ を超えると報告した。

Laufer (1661) はでんぶんゲル電気泳動法により昆虫において MDH-isozyme のパターンはその発生期の間に変化が起ることを発見し、また休眠中のかいこのさなぎの血液には2つの MDH-isozyme が含まれているが、成長した虫では3つあるいはそれ以上含んでおり、また真海鞘属の幼虫でも成長の時期により MDH-isozyme の数に増減の変化が起ると報告している。

Moore (1963) はディスク電気泳動法によりウニの胎児は3本の MDH-isozyme の band を示すが、一方受精しなかつた卵は五つの band を示したと報告している。

本実験では最初にセルローズアセテート膜電気泳動法により2株の T.v. 虫体の homogenate における MDH-isozyme の分離を試みた。セルローズアセテート膜電気泳動法は1957年 Kohn によつて初めて紹介されたもので、寒天ゲルやでんぶんゲル電気泳動法に較べて術式および分離能の点でも種々の利点があるとされ臨床検査で広く利用されるようになった。1959年 Wieland はこの方法を初めて isozyme の研究に応用している。我が国でも斎藤ら (1964, 1965) が初めて LDH-isozyme の分離に応用している。本実験においてセルローズアセテート膜電気泳動法による分析の結果は、SD 株、OS 株共に T.v. の homogenate の中には3本の band が認められて少なくとも三つ以上の isozyme の存在を思わされた。またこれら2株に認められた3本の band の現われ方は両者で一致して居らず、いくぶん相異を示した (写真1)。

しかしながらセルローズアセテート膜(セパラックス)に現われた Band は必ずしも明瞭なものではなく幅の広い拡散した状態を示した。これは試料を塗布する際の技術上の問題と、支持体であるセルローズアセテート膜の性質上、試料の保持能力が弱いために酵素や染色物が流出することによるものと考えられた。特に染色物質すなわち MDH 活性の反応生成物である formazan は或程度水溶性のため、膜全体あるいは反応溶液中に拡散するくらいがあつた。これらを防ぐために色々の方法を工夫した。その中で Barnett (1964) の方法に従い水素受容体に MTT を使用しシャーレによる重層法を採用して incubate して見たが余り好ましい結果は得られなかつた。結局ピーカーにセパラックスが沈むに十分な量の反応液を滴たしておきその中に泳動のセパラックスを重ねないように各1枚ずつ沈めて動かさないように暗所

に静置して incubate する方法が最も良かった。

このようにセルローズアセテート膜電気泳動法による isozyme の分離には色々問題があつたので、最近になつて確立され、従来の電気泳動法に較べて多くの利点を有し分離能も秀れていると言われていたディスク電気泳動法を用いて分析を試みた。

本実験でディスク電気泳動法により分析の結果、T.v. には少なくとも8種類の MDH-isozyme が存在することが分つた。しかも株によつて isozyme pattern が異なり11株について分析の結果5つのタイプに分けられた。MD<sub>1</sub> より MD<sub>8</sub>迄の全部の band を保有する株は11株中1株のみであつた (写真6)。8種の isozyme の中 MD<sub>2</sub>, MD<sub>4</sub>, MD<sub>5</sub>, MD<sub>6</sub> の4本の band は全ての株に恒常的に現われたが MD<sub>1</sub>, MD<sub>3</sub>, MD<sub>7</sub>, MD<sub>8</sub> は保有する株としない株があつた。前者は虫体内に常に存在し、活性の変動も少ないいわゆる constitutive enzyme であり、後者は条件により変動し代謝調節にあずかる regulatory enzyme (弓狩, 1965) と言えるのかも知れない。

このように T.v. 虫体における isozyme pattern の現われ方が株によつて異なる理由は不明であるが、Laufer (1961) や Moore (1963) らはその生物の発生や発育の時期により MDH-isozyme band の現われ方に変化が起ると報告している。しかしながら本実験においては同一の株を継代培養を続けながら何回泳動を行なつても同一の isozyme pattern が得られ、変化が起らないことからしてもむしろ T.v. そのものにおける異つた系 (line) の存在なども考えざるを得ないにも思われる。

遠心分画中における isozyme の所在を追求した実験の結果では24,000×g 上清には全ての Band が認められたが、900×g 沈査および24,000×g 沈査には少数の isozyme band のみが弱い活性として現われたにすぎない (写真7, 8, 9)。このことは前報 (田中, 1971) で報告した生化学的所見と合わせ考えるに前回と T.v. 虫体の破碎方法は異なり、ある程度顆粒性分画に見られる MDH が24,000×g 上清分画に移行しているかも知れぬが、少なくとも沈査に現われた少数の isozyme の弱い活性については主として Oxalacetate→Malate の方向の反応を触媒するものであらうと考えられよう。

ディスク電気泳動法の実験結果とセルローズアセテート膜電気泳動法による結果とを比較するに、前者の方がはるかに分離能が秀れており明瞭な band が得られたが、ディスク電気泳動法による Band I~IIIをAゾーン、Band IV~VIIIをBゾーンの2群に分けた場合、SD

株においてはセルローズアセテート膜電気泳動法では Aゾーンが2本に Bゾーンが1本のバンドにしか分離されずしかも不明瞭な band しか得られなかつたものが、ディスク電気泳動法では Aゾーン、Bゾーン共にそれぞれ3本ずつ合計6本の明瞭な band が得られた(写真1, 2)。また OS 株の場合はセルローズアセテート膜電気泳動法では Aゾーンは1本、Bゾーン2本でやや不明瞭な3本の band にしか分離されなかつたのがディスク電気泳動法では Aゾーン1本、Bゾーンは3本で合計4本の明瞭な band が得られた(写真1, 3)。しかしこれらはそれぞれ対応しており、この両実験の結果は一致していると考えることが出来る。

### 結 語

*Trichomonas vaginalis* の MDH-isozyme について電気泳動法によって分析を行なつた結果次のようなことが分つた。

1. セルローズアセテート膜電気泳動法では T.v. homogenate 中に3本の MDH-isozyme band が得られた。

2. ディスク電気泳動法により分析したところ T.v. には少なくとも8種類の MDH-isozyme が存在することが分り、易動度の大きい方より順に MD<sub>1</sub>, MD<sub>2</sub>, …… MD<sub>8</sub> と命名した。

3. T.v. 虫体の MDH-isozyme のパターンは株により異り総計8本の band より成る基本パターンの変形として観察され、5つのタイプに分けられた。

4. T.v. homogenate における MDH-isozyme の遠心分画中の存在については全ての band が24,000×g 上清に強く現われ、少数が900×g 沈査、24,000×g 沈査に弱い反応として現われた。

稿を終るに当たり、これら一連の研究に対し御指導御援助を賜りました恩師齒科学教室中村保夫教授並びに寄生虫学教室松林久吉名誉教授に深甚の謝意を表し、終始御指導御校閲を賜つた浅見敬三助教授に深甚の謝意を表し、あわせて御協力下さいました竹内助手初め本学寄生虫学教室の方々に感謝の意を表します。尚デンシトメーターの使用に当り御便宜をお計り頂きました順天堂大学医学部寄生虫学教室に感謝の意を表します。

(本論文の要旨は第29回日本寄生虫学会東日本支部大会並びに第39回日本寄生虫学会総会で発表した。)

### 文 献

- 1) Asami, K. (1952) : Bacteria free cultivation of *Trichomonas vaginalis*. Kitasato Arch. of Exp. Med., 25, 149-156.
- 2) 浅見敬三 (1952) : 膣トリコモナスの細菌を伴わない培養. 臨床婦人科産科, 6, 36-37.
- 3) Barnett, H. (1964) : The staining of lactic dehydrogenase isoenzymes after electrophoretic separation on cellulose acetate. J. Clin. Path., 17, 567-570.
- 4) Davis, B. J. (1964) : Disc electrophoresis. Ann. N. Y. Acad. Sci., 121, 404-427.
- 5) Goldberg, E. (1963) : Lactic and Malic dehydrogenases in Human Spermatozoa. Science, 139, 602-603.
- 6) Inoki, S., Nakabayashi, T. and Nakanishi, T. (1959) : Observation on *Trichomonas vaginalis* by electron microscopy. Biken J., 2, 21-25.
- 7) Kaplan, N. O. (1963) : Symposium on Multiple forms of enzymes and control mechanisms. I. Multiple forms of enzymes. Bact. Rev., 27, 155-169.
- 8) Kohn, J. (1958) : A micro-electrophoretic method. Nature, London, 181, 839-840.
- 9) Laufer, H. (1961) : Formes of enzymes in insect development. Ann. N. Y. Acad. Sci., 94, 825-835.
- 10) Lowenthal, A., Van Sande, M., Karcher, D. (1961) : Heterogeneity of lactic and malic dehydrogenase in serum, cerebrospinal fluid, and brain extracts in man and sheep. Ann. N. Y. Acad. Sci., 94, 988-995.
- 11) Moore, R. O. and Vिलlee, C. A. (1963) : Malic dehydrogenase; multiple forms in separated blastmer of sea urchin embryos. Science, 142, 389-390.
- 12) 永井裕 (1967 a) : 生物学領域の物理化学的実験法55, ディスク電気泳動法, 1. 蛋白質・核酸・酵素, 11, 744-749.
- 13) 永井裕 (1967 b) : 生物学領域の物理化学的実験法56, ディスク電気泳動法, 2. 蛋白質・核酸・酵素, 11, 818-823.
- 14) 中村正二郎 (1966) : ディスク電気泳動法. 臨床病理, 増刊特集第11号, 72-83.
- 15) 小川恕人 (1963) : セルローズアセテート膜に適した電気泳動分析装置. 医学と生物学, 67, 251-255.
- 16) 小川恕人 (1965) : セルローズアセテート電気泳動ならびに免疫電気泳動法. 代謝, 2, 514-532.
- 17) 小川恕人 (1966) : セルローズアセテート膜電気泳動法 (電気泳動学会の標準操作に沿つた). 臨床病理, 特集11号, 46-63.

- 18) Ornstein, L. (1964) : Disc electrophoresis. Ann. N. Y. Acad. Sci., 121, 321-349.
- 19) Raymond, S. and Weintraub, L. (1959) : Acrylamide gel as a supporting medium for zone electrophoresis. Science, 130, 711.
- 20) 斉藤正行・鈴木恵美子・山火有子(1964) : セルローズアセテート膜による臓器 LDH-isozyme 検出. 医学と生物学, 69, 20-23.
- 21) 斉藤正行・鈴木恵美子・山火有子(1965) : セルローズアセテート膜及びセルロゲルのアイソザイム分離への応用. 臨床病理, 13, 27-33.
- 22) Schwert, G. W., Miller, D. B. S. and Take-naka, Y. (1962) : Preparation of crystallin lactic dehydrogenase from beef heart. J. Biol. Chem., 237, 2131-2134.
- 23) Sophianopoulos, A. J. and Vestlung, C. S. (1960) : Nature of the two forms of malic dehydrogenase from rat liver. Biochem. Biophys. Acta., 45, 400-402.
- 24) 田中耕誠(1970) : *Trichomonas vaginalis* の2~3の脱水素酵素に関する細胞化学的研究. 寄生虫誌, 19, 603-609.
- 25) 田中耕誠(1971) : *Trichomonas vaginalis* の脱水素酵素に関する生化学的研究. 寄生虫誌, 20, 148-156.
- 26) Tsao, M. U. (1960) : Heterogeneity of tissue dehydrogenases. Arch. Biochem., 90, 234-238.

## Abstract

### STUDIES ON ISOENZYMES OF MALATE DEHYDROGENASE IN *TRICHOMONAS VAGINALIS*

KOHSEI TANAKA

(Department of Parasitology, Keio University School of Medicine  
Shinjuku-ku, Tokyo)

Demonstration of isoenzymes of malate dehydrogenase (MDH) in whole homogenate of *Trichomonas vaginalis* was carried out using acetate cellulose and disc-electrophoretic techniques. In acetate cellulose electrophoresis using Separax as a supporting medium, staining of the isoenzymes separated was performed by method of Wilkinson (1965). MDH was separated in three bands which were stained rather diffusely. In disc electrophoresis, separation and staining of the isoenzymes were performed according to the method by Nagai (1967 a, b). The number of MDH isoenzymes separated by this technique was 8 in total showing different combinations by strain. These isoenzymes were each designated MD-1 to -8 in accordance with their morbidity. Among eleven strains of the organism used in the present studies, the isoenzyme pattern was differentiated in five types.

MD-2, MD-4, MD-5 and MD-6 appeared consistently in all of the strains examined, while MD-1, MD-3, MD-7 or MD-8 was demonstrated in some strains.

In centrifugal fractionation of the homogenate, it was revealed that all of the isoenzymes were included mainly in 24,000×g supernatant, suggesting probable localization of the enzymes in the soluble fraction of the trichomonad cells.