

# 犬鉤虫 (*Ancylostoma caninum*) における ヘモグロビン分解酵素の性状

大屋 幸子 野口市夫

神奈川県立衛生短期大学

(昭和52年7月25日 受領)

## 緒 言

ヘモグロビンに特異性を示す蛋白分解酵素は, Timms and Bueding (1959) がマンソン住血吸虫の中に初めてその存在を明らかにした. その後, この酵素の性状に関する詳細な研究 (Grant and Senft, 1971; Sauer and Senft, 1972) が報告され, さらにこれと同じ作用をもつ酵素が, 犬糸状虫, 日本住血吸虫, 肝吸虫 (佐藤ら, 1975) および肝蛭, 広東住血線虫 (青木・大家, 1977) にも存在することが日本寄生虫学会で発表されている.

ところで, 鉤虫がかなり多量の血液を消費することは, Wells (1931), 西 (1933) の *in vitro* 実験および Roche *et al.* (1957), Foy *et al.* (1958) の同位元素による研究から明らかになっている. しかし, それにもかかわらず, 栄養素としての赤血球成分の利用については, いろいろと見解が分れている. 一つぼう, Roche and Torres (1960) は特殊な装置 (薄いゴム製の膜を張った chamber) を用いて, 鉤虫に摂取された赤血球の約50%はその消化管を無傷のまま通過し, 約50%は消化管内で溶血することを明らかにした.

そこで, 犬鉤虫にもヘモグロビンを特異的に分解する酵素が存在するかどうかを検討したところ, その存在が認められたので, ここにこの酵素のいくつかの性質も合わせて報告する.

## 実験材料および方法

酵素溶液: 犬鉤虫 (感染後約30日目) 200隻に対して, 10ml の0.2M 酢酸緩衝液 (pH 4.3) を加え, ガラスホモジナイザーで充分破碎した後, 15,000 rpm で30分間冷却遠沈し, この上清を使用時2~3倍に稀釈して試料とした.

基質溶液: ヘモグロビン溶液は, 市販のイヌ結晶ヘモグロビン (2回再結晶, Miles 社) を少量の蒸留水に溶かし, 冷室内で, 冷水に対し約15時間透析した後, 0.2M 酢酸緩衝液 (pH 4.3) を加え, 15mg/ml の溶液にして使用した. ヘモグロビン溶液の濃度は, シアンメトヘモグロビン法 (Drabkin and Austin, 1935, 1936) により比色定量した.

また, ヒトヘモグロビン溶液は, Drabkin 法 (1949) に準じて作製した. ヒト赤血球を0.9% NaCl で3回洗浄し, これに等容の蒸留水と0.4容のトルエンを加えて振盪し, 冷室に1夜放置して溶血させた後, 15,000rpm, 30分間遠心分離し, 中層のヘモグロビン液を取り, 冷水に対して約15時間透析して得たものを, 上記同様の濃度にして用いた.

イヌグロビン溶液は, イヌヘモグロビン溶液に CO を通して, カルボニルヘモグロビン溶液とし, この溶液1容に対して HCl 1.5% を含む冷アセトン20容を加え, 生じた沈澱を遠沈して集め, 冷アセトンで洗浄した後, 0.2M 酢酸緩衝液 (pH 4.3) を加え, 15mg/ml の濃度にして用いた.

酸変性ヘモグロビン溶液は, 0.3N HCl で pH を1.8 に保持 (室温, 60分間) したイヌヘモグロビン溶液を, 0.2M 酢酸ソーダ溶液で pH 4.3 に調製し, 蒸留水を加えて15mg/ml の濃度にして用いた.

また, 基質溶液としては, イヌおよびヒト血清蛋白質, ウシアルブミン (第一化学社), カゼイン (Miles 社), ゼラチン (Merck 社), ヒストン (type II・from calf thymus, Merck 社) ならびに硫酸プロタミン (東京化成社) の5.0mg/ml 溶液 (0.2M 酢酸緩衝液) を使用した.

その他の試薬：L-システイン, Sigma 社；TLCK (N<sup>α</sup>-tosyl-L-lysyl-chlormethanhydrochlorid), Merck 社；Sephrose 4B, Pharmacia 社. 上記以外の試薬は市販特級品を使用した。

酵素活性の測定：基質溶液1.0ml に0.5ml の酵素溶液を加え, 37°C で60分間反応させた後, 1.5ml の10% トリクロル酢酸を加えて反応を停止させた. この混液を10分間放置した後, 3,500 rpm で10分間遠沈し, 上清の280nm における吸光度を測定した. 但し, フェニールアラニン, チロシンおよびトリプトファンの阻害作用を調べる場合は, 反応停止後, 対照にもそれぞれのアミノ酸を同量加えた.

バッチ法によるアガロース-L-フェニールアラニンに対する吸着：アガロース-L-フェニールアラニンは Sepharose 4B を用いて, Cuatrecasas *et al.* (1968) の方法により調製した. この10ml に同量の0.2M 酢酸緩衝液 (pH 4.3) および7.0ml の犬鈎虫ホモジネートの上清 (酵素活性既知) を加えて, 酵素を吸着させた (ビーカー内で攪拌しながら, 0°C, 30分間). その後, これをブッフナーオートに移し, 30ml の0.2M 酢酸溶液 (pH 4.3) で洗い, 40ml の0.2M 酢酸溶液で溶出 (10回に分けて) した. これに0.2M 酢酸ソーダ溶液を直に加えて pH を4.3に調製し, 酵素活性を測定した.

分解生成物のペーパークロマトグラフィー：上記のアガロース-L-フェニールアラニン処理後の酵素溶液5ml に, 結晶イヌヘモグロビン30mg および適量のトルエンを加えて13時間反応させた. 反応後の溶液をアンモニア水で中和した後, 2倍量のアルコールを加えた. ついで生じた沈殿を遠沈した後, 上清を濃縮して2mlにした. この他に, 対照として, 基質ヘモグロビンのみの溶液および基質を加えない酵素溶液も, 反応液の場合と同様に操作した. これらの溶液の20 $\mu$ l ずつを濾紙 (ワットマン No. 1) にスポットし, 2,4,6-コリジン (水飽和液) を溶媒として3回展開させた. アミノ酸の検出は, 0.2%ニンヒドリン試薬を用いて行った.

ペプチダーゼ作用を調べるため, 上記の本酵素反応によって生じた分解生成物を含む液0.8ml に, 犬鈎虫ホモジネート (pH 7.5) 上清の冷アセトン沈殿処理後の酵素溶液 (pH 7.5) 1.2ml と, 0.01M MgCl<sub>2</sub> 0.2ml および適量のトルエンを加えて15時間反応させた. 以後, 上記同様の操作によって分析した.

## 成績

### 1) 基質特異性

Table 1 Hydrolysis of native hemoglobin and acid-denatured hemoglobin by hemoglobin protease

Expt.	Enzymic activity (4OD 280)		A/B
	A Acid-denatured hemoglobin	B Native hemoglobin	
1	0.258	0.288	0.90
2	0.165	0.163	1.01
3	0.282	0.286	0.99
4	0.261	0.254	1.03
			Mean: 0.98

本酵素はイヌ, ヒトの変性および未変性ヘモグロビンならびにイヌグロビンのいずれをも分解した. イヌヘモグロビンに対する分解速度は, 未変性のものと酸変性させたものとの間に, ほとんど差がみられなかった (Table 1). しかし本酵素には, イヌおよびヒト血清蛋白質, ウシアルブミン, カゼイン, ゼラチン, ヒストン, プロタミンに対する分解作用は全く認められなかった.

### 2) pH の影響

イヌヘモグロビン溶液を基質として, 0.2M 酢酸緩衝液を用い, 種々の pH における酵素活性を測定した. Fig. 1 に示したように, 本酵素の至適 pH は4.3~4.4 のところにみられ, 比較的鋭い pH 依存曲線を示した.

### 3) Michaelis 定数

本酵素の反応速度を, 0.25~4.0mg/ml のイヌヘモグ

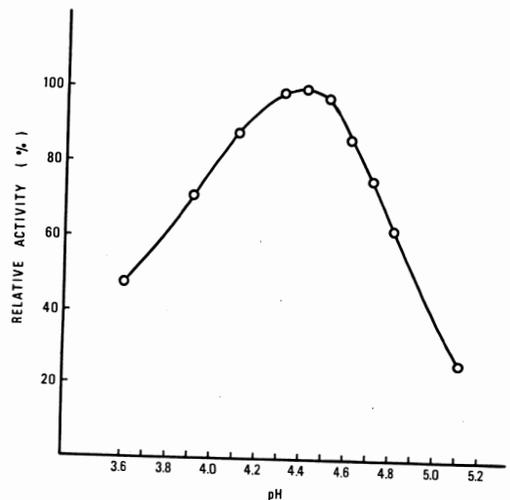


Fig. 1 Effect of pH on hemoglobin protease activity of *A. caninum*.

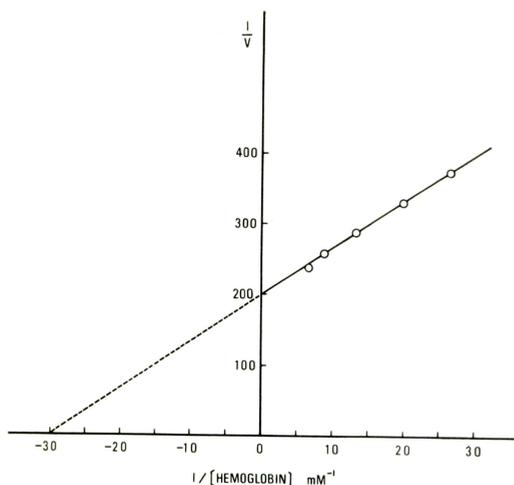


Fig. 2 Lineweaver-Burk plot of the enzymic reaction kinetics.

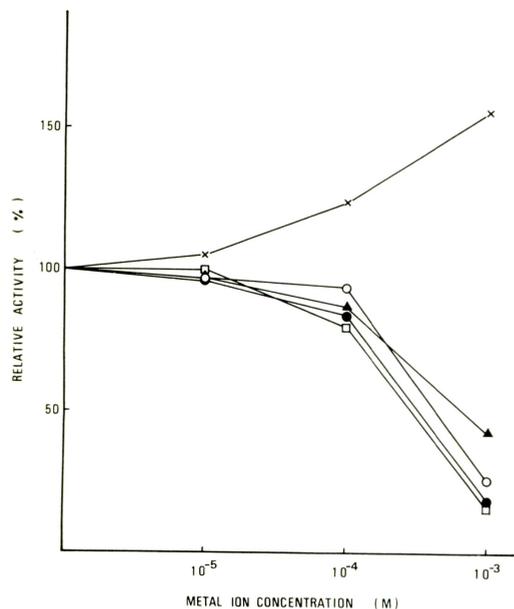


Fig. 3 Effect of metal ions on hemoglobin protease activity of *A. caninum*.

- ,  $\text{CuSO}_4$ ; —▲—,  $\text{ZnSO}_4$ ;  
—○—,  $\text{HgCl}_2$ ; —□—,  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ ;  
—×—,  $\text{FeSO}_4$ .

ロビン濃度において、酵素反応開始後15分間に生じる吸光度の変化から測定した。Fig. 2に示すように、Lineweaver-Burk plot をとり、外挿して  $K_m$  値  $0.033 \text{ mM}$  を得た。

#### 4) 金属イオンの影響

$\text{KCl}$ ,  $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{ZnSO}_4$ ,  $\text{HgCl}_2$ ,  $\text{FeSO}_4$ ,

Table 2 Effect of metal ions on the enzymic activity

	Concentration	Activity	%Inhibition
None	—	100%	
$\text{KCl}$	$1 \times 10^{-3} \text{ M}$	100	0
$\text{MgCl}_2$	"	93	7
$\text{CaCl}_2$	"	100	0
$\text{Pb-acetate}$	"	95	5
$\text{CuSO}_4$	"	19	81
$\text{ZnSO}_4$	"	43	57
$\text{HgCl}_2$	"	26	74
$\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$	"	16	84
$\text{FeSO}_4$	"	157	-57
$\text{EDTA-2Na}$	$1 \times 10^{-2}$	142	-42

Table 3 Effect of reducing agents, SH reagents and specific trypsin inhibitor on the enzymic activity

	Concentration	Activity	%Inhibition
None	—	100%	
L-cysteine	$1 \times 10^{-2} \text{ M}$	177	-77
Ascorbic acid	"	100	0
Iodoacetic acid	$1 \times 10^{-5}$	64	36
	$1 \times 10^{-4}$	20	80
Bromoacetic acid	$1 \times 10^{-5}$	84	16
	$1 \times 10^{-4}$	36	64
TLCK	$1 \times 10^{-5}$	60	40
	$5 \times 10^{-5}$	38	62
	$1 \times 10^{-4}$	27	73

$\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$  および  $\text{Pb-acetate}$  を、酵素反応液にそれぞれ  $1 \times 10^{-3} \text{ M}$  の濃度で加えた。その結果、 $\text{ZnSO}_4$ ,  $\text{HgCl}_2$ ,  $\text{CuSO}_4$  は、それぞれ 57%, 74%, 81% 酵素活性を阻害した。しかし  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$  は 84% の活性阻害を示したが、 $\text{FeSO}_4$  は逆に 57% 活性を促進した。これは  $\text{Fe}^{2+}$  の還元作用によるものではないかと思われる (Fig. 3)。また  $\text{KCl}$ ,  $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{Pb-acetate}$  は、酵素活性に影響を及ぼさなかった。しかし  $\text{EDTA-2Na}$  は、 $1 \times 10^{-2} \text{ M}$  濃度において 42% 活性を促進した (Table 2)。

#### 5) 還元剤, SH 試薬の影響

還元剤として用いた L-システインは、 $1 \times 10^{-2} \text{ M}$  濃度で 77% 酵素活性を促進したが、同濃度のアスコルビン酸は活性に影響を及ぼさなかった。また SH 酵素の阻害剤として用いたヨード酢酸、ブロム酢酸は、 $1 \times 10^{-5} \text{ M}$  濃度ではそれぞれ 36%, 16%, また  $1 \times 10^{-4} \text{ M}$  濃度ではそれぞれ 80%, 64% 活性を阻害した (Table 3)。

Table 4 Effect of free amino acids on the enzymic activity

	Concentration	Activity
None	—	100%
Phenylalanine	$5 \times 10^{-3}M$	102
Tyrosine	"	100
Tryptophan	"	100
Arginine	"	104
Lysine	"	104
Histidine	"	103
Leucine	"	98
Proline	"	100

Table 5 Recovery percentages of the enzyme adsorbed by agarose-L-phenylalanine

	Enzymic activity ( $\Delta$ OD280)	Recovery (%)
Supernatant of homogenate	10.295	100
Agarose-L-phenylalanine :		
Washing buffer	0.699	7
Elution buffer	8.100	79

## 6) TLCK の影響

トリプシンの特異的阻害剤である TLCK の本酵素活性への影響を調べたところ、 $1 \times 10^{-5}M$  濃度では40%、 $1 \times 10^{-4}M$  濃度では73%の阻害がみられた (Table 3)。

## 7) 遊離アミノ酸の影響

種々のアミノ酸の影響をみるために、フェニールアラニン、チロシン、トリプトファン、アルギニン、リジン、ヒスチジン、ロイシン、プロリンを酵素反応液に  $5 \times 10^{-3}M$  の濃度で加えた。その結果、いずれのアミノ酸も本酵素活性に影響を及ぼさなかつた (Table 4)。

## 8) アガロース-L-フェニールアラニンに対する吸着性

本酵素の活性はフェニールアラニンによつて阻害されなかつたが、マンソン住血吸虫の酵素ではアガロース-L-フェニールアラニンへの吸着性が報告 (Sauer and Senft, 1972) されているので、本酵素のそれへの吸着性を調べた。その結果、Table 5 に示すように、本酵素はアガロース-L-フェニールアラニンに79% (ホモジネート上清中の活性に対する活性%) 吸着された。これに比べて、溶出前の洗浄液中の活性は7%であつた。したがつて、本酵素はフェニールアラニンに強い親和性をもつものと思われる。

## 9) 分解生成物のペーパークロマトグラフィー

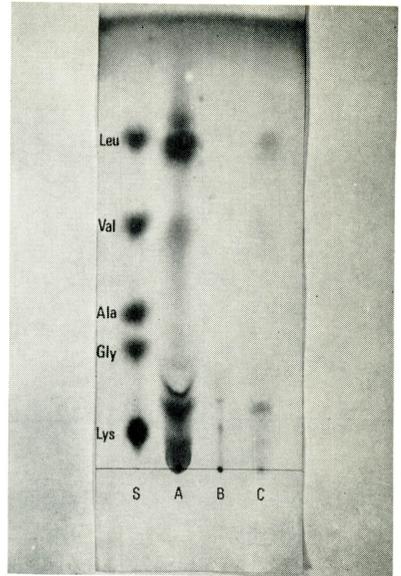


Fig. 4 Chromatographic analysis of the products by hemoglobin protease of *A. caninum*. A, Hydrolytic products; B, Substrate solution (hemoglobin); C, Enzyme solution; S, Amino acids.

上記の吸着・溶出後に回収された酵素によるイヌヘモグロビンの分解生成物を、ペーパークロマトグラフィーによつて表わしたのが Fig. 4 である。分解生成物として、ペプチドとロイシンおよび少量の数種のアミノ酸が検出された。この遊離アミノ酸は、ヘモグロビンプロテアーゼ作用による分解生成物ペプチドにペプチターゼが作用して生じたものではないかと考え、次の実験を行った。

上記の本酵素による分解生成物を基質として、犬鉤虫ホモジネート上清の冷アセトン沈殿処理後の酵素を、pH 7.5で作用させた。その結果、Fig. 5 にみられるように、原点付近のペプチドが減少し、遊離アミノ酸の量が増加した。

## 考 察

犬鉤虫にも、他の寄生虫 (マンソン住血吸虫: Timms and Bueding, 1959. 犬糸状虫, 日本住血吸虫, 肝吸虫: 佐藤ら, 1975. 肝蛭, 広東住血線虫: 青木・大家, 1977) と同様に、ヘモグロビンのみを特異的に分解する酵素が存在することが明らかになった。

本酵素のイヌヘモグロビン分解による Michaelis 定数 (Km) は、 $0.033mM$  であつた。この値は、マンソン住血吸虫酵素のグロビン分解による Km 値  $0.137mM$

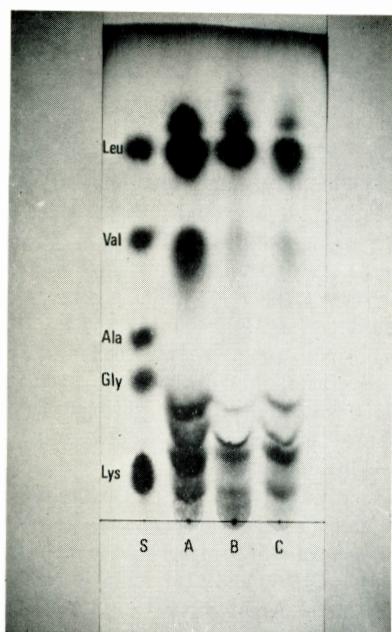


Fig. 5 Chromatographic analysis of the products by peptidase of *A. caninum*. A, Twice hydrolytic products; B, Substrate solution (the products by hemoglobin protease); C, Enzyme solution (*A. caninum* homogenate, pH 7.5); S, Amino acids.

(Sauer and Senft, 1972) よりは少く、日本住血吸虫酵素のヒトヘモグロビン分解による Km 値 0.040mM (青木・大家, 1976) にほぼ近い値であった。

また至適 pH の点から比較すると、本酵素 (ホモジネート上清) のイヌヘモグロビンに対する活性の至適 pH が 4.3~4.4 であつたのに比べて、 Manson 住血吸虫のホモジネート上清では 3.9 (Timms and Bueding, 1959), 同じく Manson 住血吸虫の Sephadex G-200 部分精製酵素では 3.8~4.5 (Sauer and Senft, 1972), また日本住血吸虫の超遠心上清分画酵素では 3.5 (青木・大家, 1976) であつたと報告されている。したがつて、本酵素の至適 pH は Manson 住血吸虫や日本住血吸虫のそれとおおむね同じ範囲に入るものとみなされる。

本酵素の活性は、種々の金属イオンによつて阻害されるが、 $Fe^{2+}$  では促進され、 $Fe^{3+}$  では阻害されるという興味深い現象がみられた。これは、本酵素が還元剤である L-システインによつて促進されたことと合わせて考えると、 $Fe^{2+}$  の促進作用は、恐らく  $Fe^{2+}$  の還元性によるものであらうと思われる。本酵素活性はまた SH 試薬のヨード酢酸およびブロム酢酸 ( $1 \times 10^{-5}M$ ) によ

つて、それぞれ 36%、13% 阻害されたが、 Manson 住血吸虫酵素では、それぞれ 92%、86% の阻害が報じられている (Zussman and Bauman, 1971)。これらの結果から、本酵素はその活性中心にシステイン残基をもつものと思われる。

本酵素はまた、特異的トリプシン阻害剤である TLCK の  $1 \times 10^{-5}M$ 、 $5 \times 10^{-5}M$  濃度によつて、それぞれ 42%、62% 阻害された。同濃度における Manson 住血吸虫酵素の阻害率は、それぞれ 46%、100% であつた (Zussman and Bauman, 1971)。この TLCK は、トリプシンのヒスチジン残基に結合して特異的に活性を阻害するものである。したがつて本酵素は、活性中心として上記のシステイン残基の他に、ヒスチジン残基の存在が考えられる。しかし TLCK は SH 化合物と反応する性質もあるので、このことは今後検討を要する問題である。

Sauer and Senft (1972) は、Manson 住血吸虫酵素がフェニールアラニンによつて competitive な阻害を受け、またアガロース-L-フェニールアラニンによつて吸着されると述べている。しかし本酵素の場合は、上記酵素と相違してフェニールアラニンによつて阻害されなかつたにもかかわらず、アガロース-L-フェニールアラニンによつて強く吸着された。

さらに、アガロース-L-フェニールアラニン吸着・溶出後の本酵素によるイヌヘモグロビンの分解生成物として、ペプチド以外に数種のアミノ酸が検出された。いつぱう、Manson 住血吸虫では、アガロース-L-フェニールアラニン吸着・溶出後の酵素によるグロビンの分解生成物として、オリゴペプチドとロイシンおよび極微量のチロシン、フェニールアラニンの存在が認められている (Sauer and Senft, 1972)。この遊離アミノ酸について、彼らは、ヘモグロビン分解酵素とは別の作用によつて生じたものではないかと述べている。著者らも、これは本酵素による分解生成物ペプチドが、さらにペプチダーゼによつて、遊離のアミノ酸に分解されたのではないかと推定した。そこで、本酵素による分解生成物に、犬鉤虫ホモジネート (アセトン処理したもの) を pH 7.5 でさらに作用させたところ、ペプチドの減少と共に遊離アミノ酸量のかなりの増加が認められた。

本酵素の性状を総合的に検討すると、本酵素が、フェニールアラニンによつて阻害されなかつたことを除いては、Manson 住血吸虫酵素の性状とおおよそ類似した結果であつたとみなされる。

寄生虫の幾種類かに、ヘモグロビン (またはグロビン)

のみを特異的に分解する酵素が存在することは、血液を栄養源とする場合にきわめて合目的であり、またこれらの酵素の性状に高い類似性がみられる点は非常に興味深いものがある。

### 結 語

ヘモグロビンを特異的に分解する酵素は、マンスン住血吸虫 (Timms and Bueding, 1959) 初め、これまでに、犬糸状虫、日本住血吸虫、肝吸虫 (佐藤ら, 1975) および肝蛭、広東住血線虫 (青木・大家, 1977) に存在することが明らかにされている。著者らは、宿主の腸粘膜に咬着して吸血を行う犬鉤虫においても、この酵素の存在を認め、そのホモジネート上清中の酵素の性状を検討し、次のような結果を得た。

本酵素は、ヘモグロビン (またはグロビン) のみを特異的に分解し、他の蛋白質 (血清蛋白質、ウシアルブミン、カゼイン、ゼラチン、ヒストン、プロタミン) は分解されなかつた。そして、未変性ヘモグロビンと酸変性ヘモグロビンとを用いた場合は、分解速度の差はほとんどみられなかつた。

本酵素の至適 pH は 4.3~4.4、ヘモグロビンに対する  $K_m$  は 0.033mM であつた。

本酵素の活性は種々の金属イオンのうち、 $1 \times 10^{-3}M$  の  $ZnSO_4$ ,  $CuSO_4$ ,  $HgCl_2$ ,  $Fe_2(SO_4)_3$  によつて阻害され、 $FeSO_4$  ( $1 \times 10^{-3}M$ ) および  $EDTA-2Na$  ( $1 \times 10^{-2}M$ ) では促進されたが、 $1 \times 10^{-3}M$  の  $KCl$ ,  $MgCl_2$ ,  $CaCl_2$ ,  $Pb$ -acetate によつては影響されなかつた。

本酵素活性は、還元剤の L-システイン ( $1 \times 10^{-2}M$ ) によつて促進され、SH 試薬のヨード酢酸およびブロム酢酸 ( $1 \times 10^{-5}M$ ) によつて阻害された。

本酵素活性は特異的トリプシン阻害剤の TLCK ( $1 \times 10^{-5}M$ ) によつて阻害された。

本酵素活性は、フェニールアラニン、チロシン、トリプトファン、アルギニン、リジン、ヒスチジン、ロイシンおよびプロリンによつて阻害されなかつた。

また、犬鉤虫ホモジネート上清中の本酵素は、アガロース-L-フェニールアラニンによつて吸着され、溶出後の活性の回収率は 79% であつた。

上記回収酵素によるイヌヘモグロビンの分解生成物として、ペプチドとロイシンおよび少量の数種のアミノ酸がペーパークロマトグラフィーにより検出された。

さらにペーパークロマトグラフィーにより犬鉤虫ホモジネート中には、本酵素によるヘモグロビン分解生成物ペプチドを分解するペプチダーゼ作用が認められた。

(本論文の要旨は、第45回日本寄生虫学会総会(1976)において報告した。)

### 文 献

- 1) 青木 孝・大家 裕 (1976) : 日本住血吸虫の hemoglobin specific proteolytic enzyme. 寄生虫誌, 25, 第45回日本寄生虫学会大会特集, 63.
- 2) 青木 孝・大家 裕 (1977) : 肝蛭, 広東住血線虫およびマンスン住血吸虫の特異的ヘモグロビン分解酵素—ヘモグロビン・ゲルによる電気泳動および酵素学的解析—. 寄生虫誌, 26, 第46回日本寄生虫学会大会特集, 68.
- 3) Cuatrecasas, P., Wilcheck, M. and Anfinsen, C. (1968) : Selective enzyme purification by affinity chromatography. Proc. Nat. Acad. Sci., 61, 636-643.
- 4) Drabkin, D. L. (1949) : A simplified technique for a large scale crystallization of human oxyhemoglobin. Isomorphous transformations of hemoglobin and myoglobin in the crystalline state. Arch. Biochem., 21, 224-232.
- 5) Drabkin, D. L. and Austin, J. H. (1935-36) : Spectrophotometric studies. II. Preparations from washed blood cells. Nitric oxide hemoglobin and sulfhemoglobin. J. Biol. Chem., 112, 51-65.
- 6) Foy, H., Kondi, A. and Austin, W. M. (1958) : Hookworms as a cause of tropical iron deficiency anaemia. Radioactive studies. East African Med. J., 35, 607-615.
- 7) Grant, C. T. and Senft, A. W. (1971) : Schistosome proteolytic enzyme. Comp. Biochem. Physiol., 38B, 663-678.
- 8) 西 雅憲 (1933) : 鉤虫症 Ancylostomiasis に見る貧血の成因に関する実験的研究. 第1報鉤虫類 Ancylostomidae の吸血状態について、特に犬鉤虫 *Ancylostoma caninum* についての実験的観察. 台湾医会誌, 32, 677-691.
- 9) Roche, M., Pérez-Giménez, M. E., Layrisse, M. and Di Prisco, E. (1957) : Study of urinary and fecal excretion of radioactive chromium  $Cr^{51}$  in man. Its use in the measurement of intestinal blood loss associated with hookworm infection. J. Clin. Invest., 36, 1183-1192.
- 10) Roche, M. and Torres, C. M. (1960) : A method for *in vitro* study of hookworm activity. Exp. Parasit., 9, 250-256.
- 11) 佐藤久美子・高橋順治・沢田利貞 (1975) : *Dirofilaria immitis*, *Schistosoma Japonicum*, *Clonorchis sinensis* の globinolytic enzyme についての研究. 寄生虫誌, 25, 第35回日本寄生虫学会東日本支部大会記事, 9.

- 12) Sauer, M. C. V. and Senft, A. W. (1972) : Properties of a proteolytic enzyme from *Schistosoma mansoni*. *Comp. Biochem Physiol.*, 42B, 205-220.
- 13) Timms, A. R. and Bueding, E. (1959) : Studies of a proteolytic enzyme from *Schistosoma mansoni*. *Brit. J. Pharma.*, 14, 68-73.
- 14) Wells, H. S. (1931) : Observation on the blood sucking activities of the hookworm *Ancylostoma caninum*. *J. Parasit.*, 17, 167-182.
- 15) Zussman, R. A. and Bauman, P. M. (1971) : *Schistosoma* hemoglobin protease; Search for inhibitors. *J. Parasit.*, 57, 233-234.

## Abstract

### SOME PROPERTIES OF HEMOGLOBIN PROTEASE FROM *ANCYLOSTOMA CANINUM*

YUKIKO OYA AND ICHIO NOGUCHI

(*Kanagawa Prefectural College of Hygiene, Japan*)

Hemoglobin protease, the presence of which had been reported in *S. mansoni*, *D. immitis*, *S. japonicum*, *C. sinensis*, *F. hepatica* and *A. cantonensis*, was found in *A. caninum*, and some of its properties were investigated. The results were as follows :

The enzyme hydrolyzed hemoglobin without significant difference of hydrolyzing velocity between native and acid-denatured hemoglobins. On the other hand, the enzyme did not hydrolyze other proteins such as serum protein, bovine albumin, casein, gelatin, histone and protamine.

The optimum pH for the enzyme activity was 4.3-4.4 and its  $K_m$  for hemoglobin was 0.033 mM.

The enzyme activity was inhibited by  $Cu^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$  or  $Fe^{3+}$  but was stimulated by  $Fe^{2+}$ . Furthermore, its activity was stimulated by cysteine and inhibited by iodoacetic acid or bromoacetic acid, showing specific properties as thiol enzyme, but it was also inhibited by TLCK (specific trypsin inhibitor).

Any of amino acids such as phenylalanine, tyrosine, tryptophane, arginine, lysine, histidine, leucine and proline, did not affect the enzyme activity even at the concentration of  $5 \times 10^{-3}$  M.

The enzyme in the supernatant of *A. caninum* homogenate was adsorbed by agarose-L-phenylalanine at pH 4.3 and 79% of the whole enzymic activity were recovered after the elution by 0.2 M sodium acetate.

Some oligopeptides, leucine and other free amino acids were found by paper chromatography as hydrolyzed products of hemoglobin by the enzyme treated with agarose-L-phenylalanine.

The activity of peptidase, which further hydrolyzes the above peptides at pH 7.5, was found in homogenate of *A. caninum*.