

## 各発育段階におけるウェステルマン肺吸虫幼虫の蛋白水解活性

山上和夫 浜島房則

(昭和62年1月31日受領)

**Key words:** *Paragonimus westermani*, miracidium, redia, cercaria, metacercaria, proteolytic activity

肺吸虫の幼虫は各発育段階において固有の宿主に寄生する。各段階の幼虫が各々の宿主に侵入、あるいはそれらの宿主内において移行するためには、各々の幼虫における宿主の組織蛋白に対する水解活性の存在が示唆される (Hamajima *et al.*, 1985; Yamakami and Hamajima, 1987)。また宿主からの栄養摂取においても、虫体の蛋白水解活性は重要な役割を担っているものと考えられる。したがって、各発育段階における幼虫の蛋白水解活性を検索し、その生理機能を検討することは肺吸虫幼虫の宿主への感染の機構を明らかにし、本幼虫の宿主-寄生体関係を解明するために重要なことである。

ウェステルマン肺吸虫 *Paragonimus westermani* (3n) のメタセルカリアは長崎県対馬産のモクズガニ *Eriocheir japonicus* に寄生しているものを用いた。この被囊メタセルカリアを犬に経口感染させ、約6ヶ月後に肺の虫のう腫より摘出した成虫の子宮内卵をとり、これを常水中において27°Cにて約2週間培養してミランジウムを得た。次いで、ミランジウムを Hamajima *et al.* (1981) の方法によりカワニナ *Semisulcospira liberatina* において発育させ、レジア (第2代) およびセルカリアを鏡検下にて分別した。各々の幼虫体を水洗後、10 mM 酢酸緩衝液 (pH6.0) 中においてホモジネートを調製し、その超遠心 (105,000×g, 60 min) 上清を酵素活性測定のための試料として実験に供した。

酵素活性はアゾコール、酸変性ヘモグロビン、牛血清アルブミンおよびカゼインを基質として測定し、各々の試料における pH 特性を検討した。アゾコール水解活性の反応液は、酵素溶液 (25 μl)、アゾコール (1 mg/0.1 ml) およびユニバーサル緩衝液 (Britton and Robinson

type, pH2.6~10.0, 0.2 ml) からなり、これを 37°C にて6時間反応させた後、未反応基質を遠心 (2,000×g, 10 min) 除去し、その上清の 520 nm における吸光度を測定した。ヘモグロビン、アルブミンおよびカゼイン水解活性は酵素溶液 (25 μl)、基質 (0.5 mg/50 μl) および緩衝液 (0.2 ml) を 37°C にて1時間反応させ、12.5% トリクロロ酢酸 (50 μl) を加えて反応を停止し、その遠心 (2,000×g, 10 min) 上清の 280 nm における吸光度を測定した。また全ての反応系において還元剤として、システイン (5 mM) および2価の金属として、カルシウムあるいはマンガンイオン (各々、2 mM) の存在下における活性の影響をも調べた。一方、これらの条件下において試料の活性のレベルが著しく低い場合、その実験系を16時間とし、活性の有無を検討した。また全ての測定は対照群も含めて3回行ない、その平均値を求めた。蛋白質量は牛血清アルブミンを標準として、Lowry *et al.* (1951) の方法により測定した。

各発育段階における肺吸虫幼虫の蛋白水解活性の pH 特性を Fig. 1 に示した。ミランジウムの抽出液においてはシステインの存在により pH4.0 および pH8.0 を頂点とする二峰性を示すヘモグロビンおよびアゾコール水解活性が検出された。レジアでは還元剤の添加により酸性領域 (pH4.0) にアゾコールおよびヘモグロビン水解活性が認められた。さらにカルシウム依存性のアゾール水解活性が中性領域 (pH8.0) に見い出されたが、他の発育段階の試料にはこのような金属イオンによる活性発現は認められなかった。セルカリアにおいては、ヘモグロビン水解活性がシステインの添加によって中性領域 (pH8.0) に示されたが、アゾコールに対する水解の程度は本実験条件下においては低かった。被囊メタセルカリアでは還元剤によって活性化され、中性領域 (pH

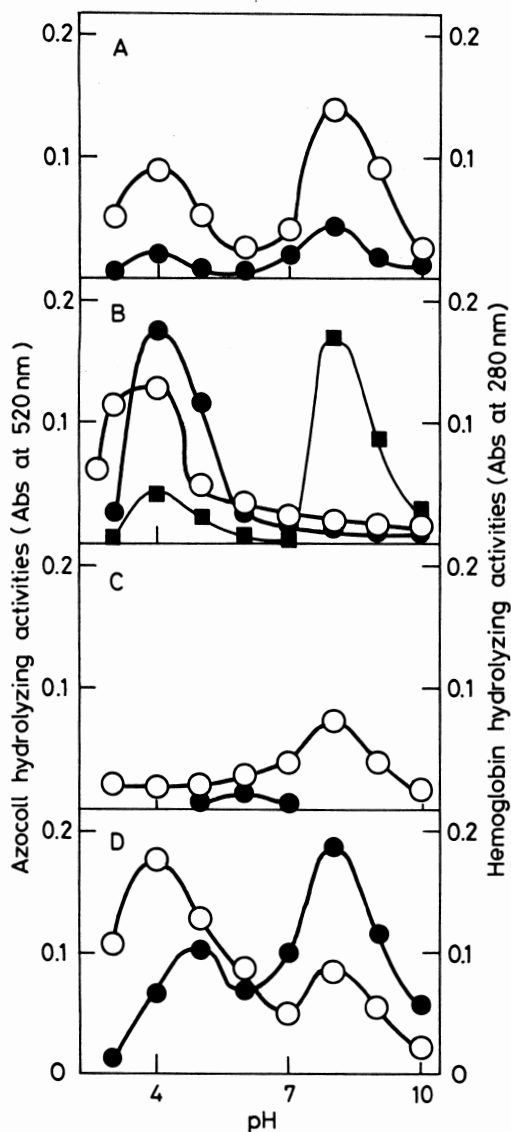


Fig. 1 pH-Profiles on the proteolytic activities of the larval *Paragonimus* in various developmental stages. Determinations of the activities were performed by adding the extracts to the mixture of substrates and universal buffer (pH 2.6-10.0). A: miracidia, 217  $\mu$ g protein/assay tube; B: rediae, 392  $\mu$ g protein; C: cercariae, 46.1  $\mu$ g protein; D: metacercariae, 3.59  $\mu$ g protein; ●: azocoll hydrolyzing activities in the presence of 5 mM cysteine; ○: activities on hemoglobin in the presence of cysteine (5 mM); ■: calcium dependent (2 mM) activities on azocoll.

8.0) に至適 pH を示すアゾコール水解活性および酸性領域 (pH4.0) に至適 pH をもつヘモグロビン水解活性が認められた, これらの活性はメタセルカリアの neutral thiol protease および acidic thiol protease に由来するものであり, また低レベルの酸性 (pH5.0) アゾコール水解活性および中性 (pH8.0) ヘモグロビン水解活性はこれらの thiol protease の広範な基質特異性を示しているものである (Yamakami and Hamajima, 1987). また各発育段階の幼虫の中では, これらの基質に対する蛋白質質量あたりの比活性はメタセルカリアが最も高い値を示した. ここに記した各幼虫のシステイン依存性水解活性は還元剤の非存在下ではいずれも検出されなかったか, あるいはわずかに認められた程度であった. 一方, アルブミン水解活性は本実験条件下では検出されなかったが, 中性カゼイン水解活性はシステインの添加によりメタセルカリアのみに認められた.

以上のように肺吸虫幼虫の蛋白水解活性はレジアに含まれるカルシウム依存性の活性を除き, 還元剤依存性の共通点を示すが, 各発育段階において固有の特性を示している. 一方, 各発育段階のマンソン住血吸虫幼虫においては, 虫卵およびミランジウムに発育並びに宿主組織への侵入に関与する acidic thiol protease (Asch and Dresden, 1979), セルカリアの哺乳類宿主への侵入に関与する keratin 水解活性 (Tzeng *et al.*, 1983) および組織内移行に関与する elastolytic proteinase (Mc Kerrow *et al.*, 1985), シストゾミューラに宿主内移行並びに栄養摂取に関与する serine proteinase および metallo proteinase (Keene *et al.*, 1983) の存在が報告されている. 本実験における肺吸虫幼虫では, Fig. 1 に示した蛋白水解活性は虫体の栄養摂取に関与していると考えられるが, さらにミランジウムにおいては貝類宿主への侵入, レジアにとっては貝の組織内における移行, セルカリアにおいては甲殻類宿主への侵入およびその組織内における移行, メタセルカリアにおいては哺乳類宿主への侵入およびその組織内での移行に関与しているものと推察される. これらの水解活性の諸性質を明らかにすることによって, 本幼虫の各々の固有宿主への感染の適合性および各宿主内における宿主-寄生体関係を明らかにし得るものと期待される.

## 文 献

- 1) Asch, H.L. and Dresden, M.N. (1979): Acidic thiol proteinase activity of *Schistosoma mansoni* egg extracts. J. Parasitol.

- 65, 543-549.
- 2) Hamajima, F., Fukuda, K. and Yamakami, K. (1981) : Experimental infection of *Semisulcospira libertina* with *Paragonimus westermani* (triploid type). Jpn. J. Parasitol. 30, 493-496.
  - 3) Hamajima, F., Yamakami, K. and Fujino, T. (1985) : Localization of a thiol protease in metacercarial lung fluke. Jpn. J. Parasitol. 34, 507-508.
  - 4) Keene, W. E., Jeong, K. H., McKerrow, J. H. and Werb, Z. (1983) : Degradation of extracellular matrix by larvae of *Schistosoma mansoni*. Lab. Invest. 49, 201-207.
  - 5) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951) : Protein measurement with Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265-275.
  - 6) McKerrow, J. H., Pino-Heiss, S., Lindquist, R. and Werb, Z. (1985) : Purification and characterization of an elastolytic proteinase secreted by cercariae of *Schistosoma mansoni*. J. Biol. Chem. 260, 3703-3707.
  - 7) Tzeng, S., McKerrow, J. H., Fukuyama, K., Jeong, K. and Epstein, W. L. (1983) : Degradation of purified skin keratin by a proteinase secreted from *Schistosoma mansoni* cercariae. J. Parasitol. 65, 992-994.
  - 8) Yamakami, K. and Hamajima, F. (1987) : Purification and properties of a neutral thiol protease from larval trematode parasite *Paragonimus westermani* metacercariae. Comp. Biochem. Physiol. in press.

Abstract

PROTEOLYTIC ACTIVITIES IN DIFFERENT LARVAL STAGES OF  
*PARAGONIMUS WESTERMANI*

KAZUO YAMAKAMI AND FUSANORI HAMAJIMA

(Department of Parasitology, National Defense Medical College, Tokorozawa 359, Japan)

Proteolytic activities were detected in extracts of miracidia, rediae, cercariae and metacercariae of *P. westermani* (3n) by using several proteins as substrates. The activities in miracidia showed two pH optima of neutral and acidic pH ranges on azocoll and hemoglobin. The activity of rediae on hemoglobin was observed only under the acidic conditions whereas activities on azocoll showed two pH optima of 4.0 and 8.0. The proteolysis of hemoglobin by cercariae was shown in the neutral pH range, while the activities on azocoll were of low level. The proteolytic activities of metacercariae also showed two pH optima as observed in miracidia. However, specificities to the both substrates in each stage apparently differed in the neutral pH range. Studies with several additives such as reducing agents and metal ions revealed that proteolytic activities in these developmental stages on larvae were apparently of thiol proteases since they were activated by cysteine. While, the neutral proteolysis in rediae on azocoll was activated by calcium ion, and therefore it was considered as metallo protease activities. These findings show the different contents of proteolytic systems in the larval *Paragonimus* at the four stages of life cycle.