

豚回虫の生存に及ぼす酸素圧の影響 (6)

豚回虫卵巣 cytochrome c の分離ならびにその性質について

林 栄 一 寺 田 護
中 西 一 之 清 水 武

静岡薬科大学薬理学教室

(昭和51年5月25日 受領)

緒 言

豚回虫(以下回虫)筋におけるチトクロム成分の存在, 生理的関与ならびに単離などに関しては, すでに多数の研究があり(Keilin, 1925; Keilin and Hartree, 1949; Kikuchi *et al.*, 1959; Kikuchi and Ban, 1961; Chance and Parsons, 1963; Lee and Chance, 1968; Cheah and Chance, 1970; Hill *et al.*, 1971; 林・寺田, 1973; Cheah, 1973), また卵の発生過程とチトクロム成分の変化についても興味深い知見が報告されている(Costello *et al.*, 1963; Oya *et al.*, 1963; Hayashi *et al.*, 1974). 一方卵巣のチトクロム成分に関しては, Keilin and Hartree(1949)および Bueding and Charms(1952)による報告があるが, 両者の結果は相反したものである。

著者らは, 筋ミトコンドリアの cytochrome (以下 cyt.) c peroxidase を含む好気的代謝系の生理的役割を明らかにするため, 同一個体中にありながら, その機能が全く異なる卵巣を比較対照にとりあげ(林ら, 1974), 今回はチトクロム成分について検討を加えた。

実験方法

(1) 卵巣からのミトコンドリアの分離調製およびミトコンドリアにおけるチトクロム成分の検索: 前報(林・寺田, 1973)と同様の方法で行った。

(2) 卵巣チトクロム成分の分離: 奥貫・山中(1970)に準拠して行なった。すなわち卵巣 190 g をハサミで細切, 5% NaCl 含有 0.1M リン酸緩衝液 (pH 7.0) の4倍容を分離液として2分間 Waring blender で磨砕, 磨砕液は1夜低温室で攪拌後, ガーゼで濾過, 濾液は 12,000×g 30分間の遠心を2回行い, 上清は脱塩水で透

析して生じた沈澱を 12,000×g 30分間の遠心で除去後 0.01M リン酸アンモニウム緩衝液 (pH 7.0) で平衡化した。

予め 0.01M リン酸アンモニウム緩衝液 (pH 7.0) で平衡化した Amberlite CG50 (type I) を約 2 cm に積層したグラスフィルター (直径 4.5 cm) に得られた抽出液を通過させ, チトクロム成分を吸着させた。樹脂層は 0.01M リン酸アンモニウム緩衝液で洗浄後, チトクロム成分の吸着した部分をスパーテルでかきとり, 0.01M リン酸アンモニウム緩衝液 (pH 7.0) に分散, 直径 1.0 cm の小カラムに移し, 同緩衝液で洗浄後 1M リン酸アンモニウム緩衝液 (pH 7.0) で溶出した。これらの操作は低温 (4°C) 下で行った。

ついで溶出液を 0.01M リン酸アンモニウム緩衝液 (pH 7.0) で平衡化, ferricyanide で酸化後, 予め同緩衝液で平衡化した Amberlite CG50 (type II, 1.5×60 cm) に吸着させた。0.01M リン酸アンモニウム緩衝液 (pH 7.0) で洗浄し, 過剰の ferricyanide を除去, ついで 0.04M リン酸アンモニウム緩衝液 (pH 7.0) の 30 ml/hr で展開した。さらに 0.1M 緩衝液 (pH 7.0) で展開後, 単一層のまま低下した成分を 1M 緩衝液 (pH 7.0) で溶出した。

(3) 等電点分画: (2) で分離した cyt. c 分画を脱塩水で透析後, 松尾・堀尾 (1967) の方法で, LKB Produkter 製 110 ml カラムを用い, carrier ampholite (pH 6~10) による等電点分画に供した。

(4) 酸化還元電位の測定: Feldman & Wainio (1960) に準拠して行なった。E_m 既知の色素, ferricyanide/ferrocyanide (E_{m7} = +0.425V) を比較対照として卵巣 cyt. c の E_o' (=E_{m7}) を求めた。すなわち色素による cyt. c の酸化還元スペクトルの変化を測定し,

midpoint ($\log \frac{[\text{Fe}^{3+}\text{cyt. c}]}{[\text{Fe}^{2+}\text{cyt. c}]}=0$) における E_h (E_{m7}) を得た。

反応系は 0.3M GTA buffer, pH 7.0 (0.1M 3,3-dimethylglutaric acid, 0.1M Tris- (hydroxymethyl) aminomethane, 0.1M 2-amino-2-methyl-1,3-propanediol) 0.5ml, 0.2M ferrocyanide 0.1ml, 卵巣 cyt. c 0.4ml で, 先ずこの状態における吸収スペクトル (500~600 μ) を測定した。ついで 10^{-2} M ferricyanide 0.005 ml 添加後, スペクトルを測定, この操作を 5 回行つた。さらに少量の ferricyanide 粉末で完全酸化 スペクトルをとり, 最後に $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 粉末添加により完全還元のスぺクトルを得た。反応は室温 (25C) で行つた。卵巣 cyt. c の $\epsilon_{mM}(\text{Red.}-\text{Ox. } 550)=19$ とし, それぞれの場合の E_h を次式から求めてプロットし, 直線から E_{m7} を求めた。

$$E_h = 0.425 + 0.06 \times \log \frac{[\text{Fe}^{3+}\text{cyt. c}]}{[\text{Fe}^{2+}\text{cyt. c}]}$$

(5) 試薬: Amberlite CG50, オルガノ K.K., carrier amphotite (pH 6~10), LKB.

実験結果

(1) 卵巣ミトコンドリアのチトクロム成分

Fig. 1 に示した如く, 卵巣ミトコンドリアは酸化型で 530, 620 μ 付近に吸収帯を示し, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ による還元で 530 および 560 μ に吸収帯を生じた。

(2) Amberlite CG50 による卵巣チトクロムの分離塩類溶液による抽出成分を, 0.01M リン酸アンモニウム緩衝液 (pH 7.0) の条件下で Amberlite CG50 (type II) のカラムに吸着させ, 0.04 M 緩衝液 (pH 7.0) で展開すると, 吸着帯はわずかに低下, ついで 0.1 M 緩衝液 (pH 7.0) での展開により吸着帯は単一層として緩徐に低下した。1 M 緩衝液 (pH 7.0) で溶出した卵巣チトクロム成分は cyt. c の吸収スペクトル (酸化型で 408 μ , 還元型で 550, 521 および 415 μ) を示した (Fig. 2)。同様に筋より抽出し, Amberlite CG50 (0.01M 緩衝液) に吸着した成分を, 同樹脂によるカラムクロマトグラフィーに供した。その結果 0.04M 緩衝液 (pH 7.0) による展開で吸着帯は 3 層に分離し, 上層に cyt. c (還元型で 550, 521 および 417 μ), 下層に b 型 cyt. (還元型で 560, 528 および 424 μ) および中間層に両者の混合成分が認められた。

(3) 等電点分画

卵巣より塩類溶液で抽出し, Amberlite CG50 カラムクロマトグラフィーで得た cyt. c 分画を等電点分画に

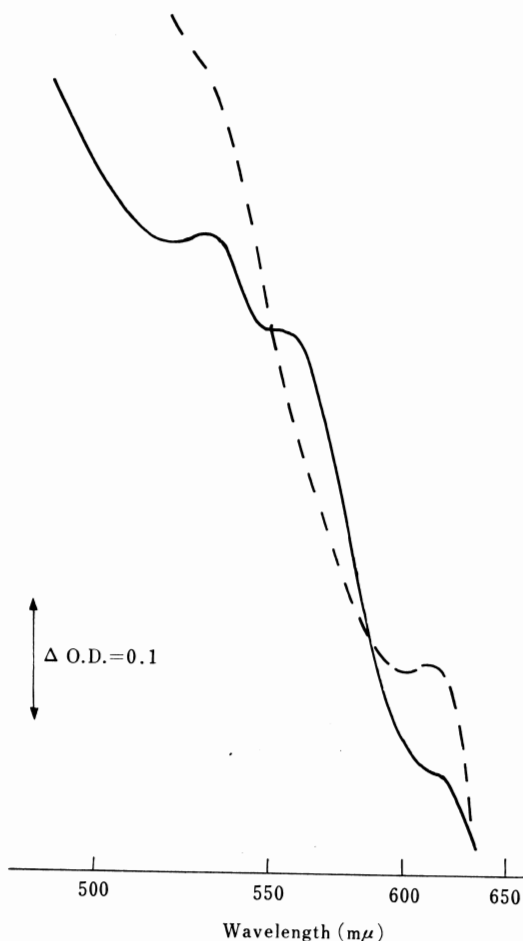


Fig. 1 Absorption spectrum of the respiratory components of *Ascaris* ovary mitochondria.

—: Reduced form (by $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$)

---: Oxidized form

The mitochondrial fraction contains 16.4mg protein/ml.

供したところ, pH 10.0 に桃色の単一層を示し, その他のヘムタンパク成分は認められなかつた (Fig. 3)。同様に筋より塩類溶液で抽出し, Amberlite CG50 (0.01 M 緩衝液) に吸着した成分を等電点分画に供した。Fig. 4 に示した如く, pH 6.1~6.7 に淡黄褐色層および pH 9.4~10.1 に幅広い赤色層が認められ, 赤色層は cyt. c (550 μ) および b 型 cyt. (560 μ) の混合成分であつた。

(4) 酸化還元電位

ferricyanide/ferrocyanide ($E_{m7}=+0.425\text{V}$) を比較対照として卵巣 cyt. c の酸化還元電位を求めたところ,

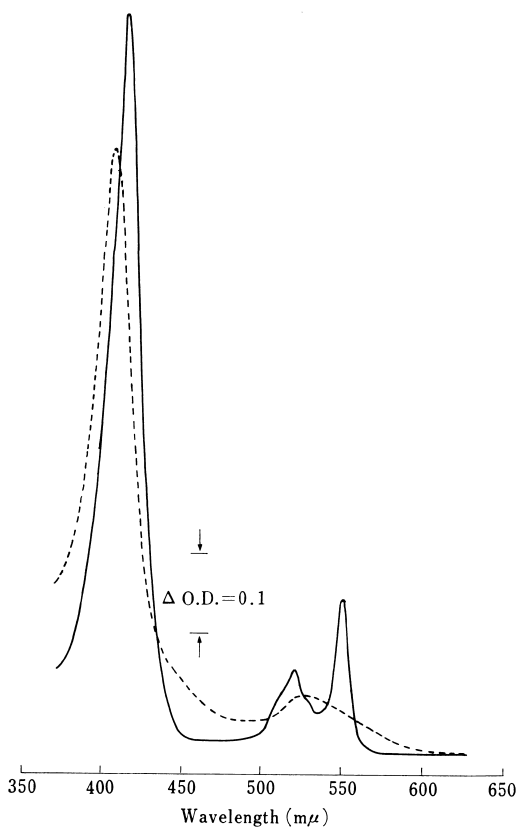


Fig. 2 Absorption spectrum of *Ascaris* ovary cytochrome c_{550} .

Reduced form (—) showed the absorption spectrum at 415, 521 and 550 $m\mu$, and oxidized form (---) showed at 408 and 530 $m\mu$.

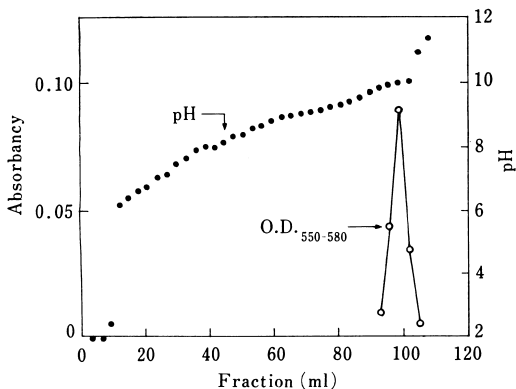


Fig. 3 Isoelectric fractionation of *Ascaris* ovary cytochrome c.

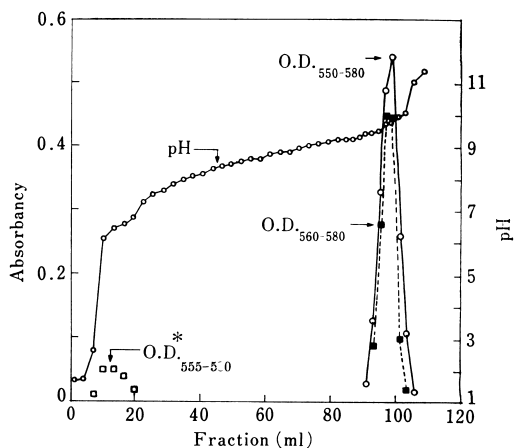


Fig. 4 Isoelectric fractionation of *Ascaris* Muscle cytochrome components.

Cytochromes extracted with 0.1M phosphate buffer, pH 7.0, containing 5% NaCl and adsorbed on Amberlite CG50 equilibrated with 0.01M ammonium phosphate buffer, pH 7.0, were applied to this experiment.

* This component showed the spectrum at 540 and 580 $m\mu$ in oxidized form and at 530 and 555 $m\mu$ in reduced form.

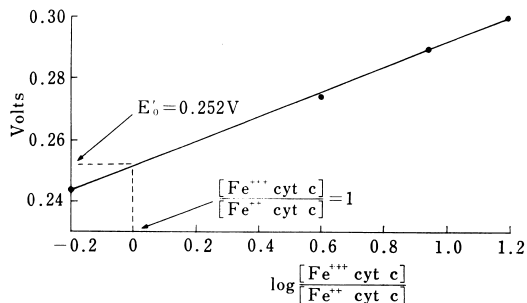


Fig. 5 Potentiometric data obtained in the determination of E_0' for *Ascaris* ovary cytochrome c.

Study was carried out at 25C at pH 7.0 in the presence of the ferricyanide-ferrocyanide couple.

$E_{m7} = +0.252V$ であつた (Fig. 5). しかし (2) において筋より得た cyt. c 分画は, ferrocyanide で還元されず, この方法では酸化還元電位を求めることができなかった。

考 察

回虫チトクロム成分の単離・性質については, 筋での cyt. c (Hill *et al.*, 1971) および cyt. b (Cheah, 1973)

に関する報告がある。しかし卵巣については何らの知見も存在しないので、今回、卵巣チトクロム成分に検討を加えた。

卵巣ミトコンドリアの吸収スペクトルには b 型 cyt. の存在が認められたが (Fig. 1), 塩類溶液による抽出とか Amberlite CG50 での吸着操作では cyt. c のみが得られた (Fig. 2). b 型 cyt. が塩類溶液で抽出されない結果は、哺乳動物の場合と同じであつた (奥貫・山中, 1970). しかし筋では上と同一操作で cyt. c および b 型 cyt. が得られ、卵巣と筋とでは b 型 cyt. について差異がみられた。

また哺乳動物の cyt. c は 0.1M リン酸緩衝液の条件で Amberlite CG50 に吸着されるのに、筋の場合、塩濃度を 0.01M に低下させると cyt. c と b 型 cyt. が吸着された。しかもこの吸着は極めて弱く、0.02 ないし 0.04M 緩衝液による展開で、吸着帯は低下し、しかも 3 層 (cyt. c, cyt. c + b 型 cyt. および b 型 cyt. 層) に分離するのが認められた。一方卵巣の場合、0.01M 緩衝液で極めて強固に吸着し、0.04M 緩衝液による展開では吸着帯の低下はほとんどみられず、0.1M 緩衝液においても吸着帯の分離は認められなかつた。この点においても筋と卵巣の性質に相違がみられた。

この b 型 cyt. についての差異に関連して、哺乳動物ミトコンドリアには、内外膜系で 3 ~ 4 種もの cyt. b protein の存在が知られており (C.A. Yu *et al.*, 1975) 回虫筋でも 2 種類の b 型 cyt. が報告されている (Kikuchi and Ban, 1961). したがって今回の差異も b 型 cyt. の複雑さを示すものと思われる。

つぎに、今回著者らがはじめて分離した cyt. c は吸収スペクトル (酸化型, 408m μ ; 還元型, 550, 521 および 415m μ), 等電点 (pH 10.0), 酸化還元電位 $E_0' = +0.252V$ のいずれについても哺乳動物に近似していた。しかし同様にして筋より分離した cyt. c は吸収スペクトルおよび等電点分画において、卵巣と多少異なるところがあり、また ferrocyanide で還元されず、ferricyanide/ferrocyanide を対照とする方法では酸化還元電位を測定できなかつた。

つぎに卵巣ミトコンドリアには 620m μ 付近に吸収帯がみられ、このスペクトルは $Na_2S_2O_4$ に対し抵抗性を示した (Fig. 1). これらの結果はウマ catalase の知見に近似しており (Keilin and Hartree, 1951; 菊地, 1963), しかも卵巣ミトコンドリアには筋の場合と異なり高い catalase 活性がみられている (林ら, 1971). し

たがって、この吸収帯は恐らく catalase のものと思われる。

結 論

回虫卵巣から、塩類溶液による抽出および Amberlite CG50 に対する吸着操作により、cyt. c を分離した。その吸収スペクトルは酸化型で 408m μ , 還元型で 550, 521 および 415m μ であつた。また等電点は pH 10.0, 酸化還元電位は $E_0' = +0.252V$ であつた。

文 献

- 1) Bueding, E. and Charms, B. (1952): Cytochrome c, cytochrome oxidase and succinoxidase activities of helminths. *J. Biol. Chem.*, 196, 615-627.
- 2) Chance, B. and Parsons, D. F. (1963): Cytochrome function in relation to inner membrane structure of mitochondria., *Science*, 142, 1178-1180.
- 3) Cheah, K. S. and Chance, B. (1970): The oxidase system of *Ascaris*-muscle mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta*, 223, 55-60.
- 4) Cheah, K. S. (1973): Purification and properties of *Ascaris* cytochrome b_{560} . *J. Biol. Chem.*, 248, 4101-4105.
- 5) Costello, L. C., Oya, H. and Smith, W. (1963): The comparative biochemistry of developing *Ascaris* eggs. (1) Substrate oxidation and the cytochrome system in embryonated and unembryonated eggs. *Arch. Biochem. Biophys.*, 103, 345-351.
- 6) Feldman, D. and Wainio, W. W. (1960): Isolation, purification, and some properties of mammalian cytochrome b. *J. Biol. Chem.*, 235, 3635-3639.
- 7) 林 栄一・寺田 護 (1971): 豚回虫の生存に及ぼす酸素圧の影響, 豚回虫筋のセミ嫌氣的呼吸系の生理的機能について. *寄生虫誌*, 20, 276.
- 8) 林 栄一・寺田 護 (1973): 豚回虫の生存に及ぼす酸素圧の影響 (4) 豚回虫筋の cytochrome c peroxidase を含む電子伝達系について. *寄生虫誌*, 22, 1-12.
- 9) Hayashi, H., Sato, N., Oya, H. and Hagi-hara, B. (1974): Cytochrome composition in developing *Ascaris* eggs and adult muscle. *Dynamics of energy-transducing membranes*. Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam, p. 29-38.
- 10) 林 栄一・中西一之・寺田 護 (1974): 豚回虫の生存に及ぼす酸素圧の影響 (5) 豚回虫筋および卵巣ミトコンドリアにおける呼吸基質の透過性. *寄生虫誌*, 23, 85-94.

- 11) Hill, G. C., Perkiwski, C. A. and Mathewson, N. W. (1971) : Purification and properties of cytochrome c from *Ascaris lumbricoides*. Biochim. Biophys. Acta, 236, 242-245.
- 12) Keilin, D. (1925) : On cytochrome, a respiratory pigment, common to animals, yeast, and higher plants. Proc. Roy. Soc. B., 98, 312-339.
- 13) Keilin, D. and Hartree, E. F. (1949) : Effect of low temperature on the absorption spectra of hemoproteins; with observations on the absorption spectrum of oxygen. Nature, 164, 254-259.
- 14) Keilin, D. and Hartree, E. F. (1951) : Purification of horseradish peroxidase and comparison of its properties with those of catalase and methaemoglobin. Biochem. J., 49, 88-104.
- 15) Kikuchi, G., Ramirez, J. and Barron, E. S. G. (1959) : Electron transport system in *Ascaris lumbricoides*. Biochim. Biophys. Acta, 36, 335-342.
- 16) Kikuchi, G. and Ban, S. (1961) : Cytochromes in the particulate preparation of the *Ascaris lumbricoides* muscle. Biochim. Biophys. Acta, 51, 387-389.
- 17) 菊地吾郎(1963) : ヘム蛋白の生理作用. 蛋白質核酸酵素, 8(11), 3-10.
- 18) Lee, In-Young and Chance, B. (1968) : Activation of malate-linked reduction of NAD and flavoproteins in *Ascaris* muscle mitochondria by phosphate. Biochem. Biophys. Res. Commun., 32, 547-553.
- 19) 松尾雄志・堀尾武一(1967) : 蛋白質の電気泳動的等電点分画法. 蛋白質核酸酵素, 12, 737-748.
- 20) 奥貫一男・山中健生(1970) : チトクロム c, チトクロム, 朝倉書店, 東京, p. 144-193.
- 21) Oya, H., Costello, L. C. and Smith, W. N. (1963) : The comparative biochemistry of developing *Ascaris* eggs. (2) Changes in cytochrome c oxidase activity during embryonation. J. Cell. and Comp. Physiol., 62, 287-294.
- 22) Yu, C. A., Yu, L. and King, T. E. (1975) : The presence of multiple cytochrome b. proteins in succinate-cytochrome c reductase. Biochem. Biophys. Res. Commun., 66, 1194-1200.

Abstract

THE INFLUENCE OF OXYGEN PRESSURE ON THE SURVIVAL TIME OF *ASCARIS LUMBRICOIDES SUUM* (6) ISOLATION AND PROPERTIES OF *ASCARIS* OVARY CYTOCHROME C

EIICHI HAYASHI, MAMORU TERADA, KAZUYUKI NAKANISHI

AND

TAKESHI SHIMIZU

(Department of Pharmacology, Shizuoka College of Pharmaceutical
Sciences, Shizuoka, Japan)

Cytochrome c was separated from *Ascaris* ovary by the extraction with 0.1 M phosphate buffer, pH 7.0, containing 5% NaCl and adsorption to Amberlite CG 50 equilibrated with 0.01 M ammonium phosphate buffer, pH 7.0. The cytochrome showed absorption peaks at 408 m μ in the oxidized form and 550, 521 and 415 m μ in the reduced form. In isoelectric fractionation, the cytochrome showed a pink band at pH 10.0. Determination of the oxidation reduction potential of the isolated cytochrome c indicated the value of +0.252 V, with the use of a ferricyanide—ferrocyanide system at pH 7.0.