

豚蛔虫 *Ascaris lumbricoides* var. *suis* の筋肉による Malic acid の酸化的脱炭酸, およびその他の TCA 回路中間代謝基質の酸化について

大 家 裕*

東京大学医学部薬理学教室 (指導 小林芳人教授)

(昭和 33 年 7 月 20 日受領)

緒 論

蛔虫 *Ascaris lumbricoides* は、小腸内部という酸素圧の低い環境に棲息しており、その代謝様式に関しては従来多大の関心が寄せられ、これらについての報告も少くなく、その大略は Fairbairn (1957) の優れた綜説によつて覗うことが出来る。また呼吸と密接な関係を有する炭水化物の好氣的代謝については、近年のものとして Laser (1944), Grembergen *et al.* (1949), Bueding *et al.* (1952, 1955, 1956 a, 1956 b), Rathbone (1955) 等があるが、何れも部分的な特に Succinoxidase system を中心とするものが多く、高等動物においては既に一般的通念となつている TCA 回路の存在についても、蛔虫においては未だ定説を得るに到つていない。

著者は、蛔虫筋が TCA 回路中間代謝基質を酸化する能力を有するか否かを知るために実験を進め、Fumaric acid, Malic acid を蛔虫筋に添加すると lag phase ともいふべき現象の見られることを認めた。Grembergen *et al.* (1949) も同様の事実を認めたが、彼等は Malic acid が蛔虫筋の酸素消費を抑制するものと考えた。また Sz *et al.* (1957) は蛔虫筋より特殊な Malic enzyme を分離し、その酵素学的性質を追求した。

著者は蛔虫筋による炭水化物の酸化系列において、Malic acid が有する特質および他の反応系との連繫を解明しようとして実験を進めた結果、Malic acid の酸化

HIROSHI OYA: The oxidative decarboxylation of *l*-malic acid and the oxidation of some other intermediates of tricarboxylic acid cycle by the muscle of *Ascaris lumbricoides* var. *suis*. (Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, University of Tokyo. Present address: Department of Pharmacology, School of Medicine, Juntendo University)

* 現在 順天堂大学医学部薬理学教室

に関し二三の興味ある事実を認めるとともに、蛔虫筋には、TCA 回路中間基質中、従来酸化されないとされてきたものについても、これを酸化する能力が存在する実験結果を得たので、それらをここに報告する。

実験方法

実験材料

実験に用いた豚蛔虫 (*Ascaris lumbricoides* var. *suis*) は東京芝浦屠場で入手した。豚の小腸から採り出された蛔虫は速やかに 37°C Locke-Ringer 液に移して実験室に運んだ。運ばれた虫体は 37°C Locke-Ringer 液で十分に洗滌した後、7~8 g のものを選び、0°C Locke 液中に投入し、虫体が充分冷却するのを待つて資料の調製に供した。

(1) 蛔虫筋束

上述の虫体を Baldwin (1947) の方法により、注意深く角皮より剥離し、子宮口以下の部分を切捨て、子宮口より頭端迄の部分を、更に側線に沿つて分離し、側線を除去した。このようにして得られた筋束は、一個につき約 100~150 mg の重量を有し、乾燥重量にすると正確に 5 分の 1 となる。

(2) 蛔虫筋ホモジネート

蛔虫筋を Laser (1944) の方法により全長に亘つて角皮より分離し、得られた筋束 30 g (約 15 隻の虫体に相当する) を総量 500 ml の氷冷した 1.15% KCl 液を用い、10 回に亘り充分洗滌した。かくすることにより最後の洗液からは殆んど体腔液の着色が消失し、たゞ僅かな螢光を發するのみとなる。得られた筋束は、水分を充分に吸い取り秤量した。これに等量の氷冷した 1.15% KCl 液を加え、鋼製ワーリーングブレンダーを用い、15,000 r.p.m. で 1 分間作動せしめた。容器の内部はシリコンをもつて被覆し全金属イオンの溶出を防止した。得られたホモジネートは、氷冷した 1.15% KCl 液を用い、所要の濃度まで稀釈し、KOH で必要な pH に規正した。

(3) 蛔虫筋無細胞抽出液 (遠沈上清)

(2) に記した方法によつて得られたホモジネートを低速遠沈 (500 × g, 15分間) し, その上清をとつた。

以上の (1), (2), (3) の操作の途中温度の上昇を極力避けるように注意を払つた。

又上述のいずれの場合においても, 筋束の洗滌を充分行うことは極めて大切であり, この操作により, 或程度蛔虫筋の自家呼吸は低下するが, 洗滌不十分の際には見ることが出来なかつたような基質添加の影響が pH 7.4 附近において観察せられた。

使用基質

Malic acid: Merck 社製 *l*-Malic acid をエーテルより再結晶して用いた。

Fumaric acid: 関東化学製品を用いた。

Pyruvic acid: 第一化学製品「標準試薬 Lithium Pyruvic acid」を用い, Na 塩は東京化成製品「Pyruvic acid」のエタノール溶液に飽和 NaOH を加えて得た。

α -Ketoglutaric acid: 野末源一 (1953) の記載した方法に基づき, コハク酸エチル, 修酸を原料として合成した。この際 2,4-Dinitrophenylhydrazine と反応せしめて Hydrzone とし其の融点を測定して同定を行つた。

Succinic acid: 武田化学 (現和光純薬) 製品「Succinic acid」を用い, 飽和 NaOH で中和, エタノール・H₂O 中で再結晶した。

Citric acid: Merck 社製品を用いた。

Lactic acid: 80% Lactic acid を稀釈し, 飽和 LiOH で中和, エタノール・H₂O 中で再結晶した。

以上の各基質は使用に際しては必要に応じ KOH をもつて pH 7.4 に規正した。

其他の試薬

Methylene blue は Merck 社製品を使用した。ATP は当教室の江橋博士のもつて作成した Na 塩を用いた。其の他のものはすべて市販の試薬特級品を用いた。

測定法

(1) 検圧法

ワールブルグ検圧装置を使用し, 恒温槽温度 38°C, 振盪回数毎分 130 回で行つた。

使用した容器は, 側室 1 個あるいは 2 個を有する普通型容器 (容器容量約 18 ml) を用い, 又特殊容器として照井氏のものだけを僅かに変形した第 5 図の如きものを用いた。容器の側室 (C) と主室とを遮断した際の容器容量は約 20 ml で, 連絡した際の容器容量は約 22 ml である。

炭酸ガス吸収用の 20% KOH は副室或は側室 (C) に入れた 1.5 × 2.0 cm の硬質濾紙に浸み込ませて用いた。

全実験を通じて気相は空気とし, 10 分間の温度平衡の後測定を開始した。

(2) 定量法

Pyruvic acid 及び **α -Ketoglutaric acid** の定量には Shimizu (1950) による Friedmann & Haugen (1943) の変法を用い, 他の keto 酸の存在をも考慮して Cavalini (1949) の方法を併用した。

Lactic acid の定量には Barker & Summerson (1941) の方法を, **Citric acid** の定量には細谷・倉富 (1955) の方法を夫々用いた。

その他測定法の詳細については各実験の項に記載した。

実験成績

〔I〕 Fumaric acid 及び Malic acid の酸化

(A) 蛔虫筋束による実験

Grembergen (1949) が観察したと同様の現象が蛔虫筋束についても見られるか否かを検討した。

実験に先立ち, 筋束の浮游液の検討を行つた。板東 (1951) は Magnus 法によつて筋束の運動を観察する際 Locke 氏液を用い, Baldwin *et al.* (1947, 1949) は同様の実験に “Baldwin 氏の working medium” を用いた。著者は筋束の生理的条件を考慮し, 上記二液および Krebs 氏 Ringer 液の三種に関し, 其の緩衝液を 0.05 M Tris 緩衝液 pH 7.4 で置換したものを用い, これらが筋束の自家呼吸に及ぼす影響を検討したが, 二者の間に殆んど差が認められなかつたので以後の実験には総て Krebs 氏 Ringer 液を使用した。Tris 緩衝液を使用した際は “KRT” と略記する。

実験に際しては実験群を 3 群に分ち, 第 1 群は対照系, 第 2 及び第 3 群は基質添加系とした。側室 1 個を有するワールブルグ容器を用い, 主室には各群とも 500 ~ 600 mg の筋束および KRT 2.5ml を加えた。側室には, 対照系では KRT 0.3ml, 基質添加系では 0.15M Fumarate (K 塩) 或は 0.15M Malate (K 塩) 0.3ml を加え, 副室には各群とも 20% KOH 0.2ml を加えた。

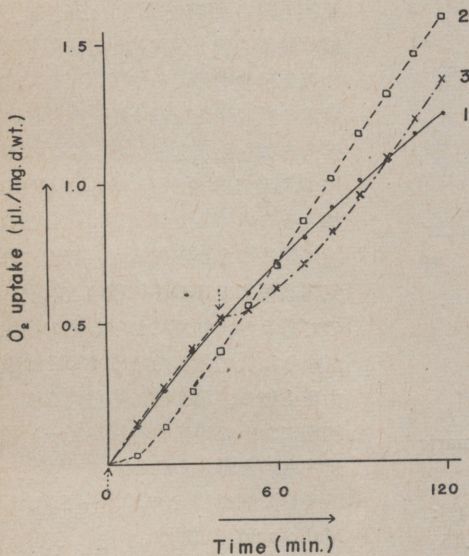
第 1, 第 2 群は測定開始直後に側室の内容を主室に添加し, 第 3 群は測定開始 40 分後に側室の内容を主室に添加した。

第 1 図には Fumaric acid を基質とした際の結果を示した。即ち, 測定開始と同時に基質を添加すると, 対照

に比し、初期において見かけ上の酸素消費抑制が認められ、後次第に回復して一時間後には対照より高値を示すに至つた。測定開始後40分に基質を添加した場合にもやはり同様の傾向が観察せられた。これらの結果は Malic acid を基質とした場合でも同様に、Grembergen のいわゆる“基質添加後初期に観察され次第に回復する抑制”とはかかる現象を指すものと思われる。

併し乍ら、Malic acid を基質とする適応酵素が蛔虫筋に存在しても、また反応初期に酸素消費量を上廻る気体放出があつても同様の現象は観察されるであろう。

この点を明らかにするために次の実験を行った。



第1図 蛔虫筋束の酸素消費量に対する Fumaric acid 添加の影響

1—筋束：500~600mg, KRT：2.5ml (以上主室), 20% KOH：0.2ml (副室)。2, 3—1+0.15 M Fumarate：0.3ml (側室)。1, 2は測定開始直後添加, 3は測定開始40分後添加, 気相：空気, 反応温度：38°C, 平衡時間10分。(ゴシック数字は曲線番号に対応以下各図に於て同じ)

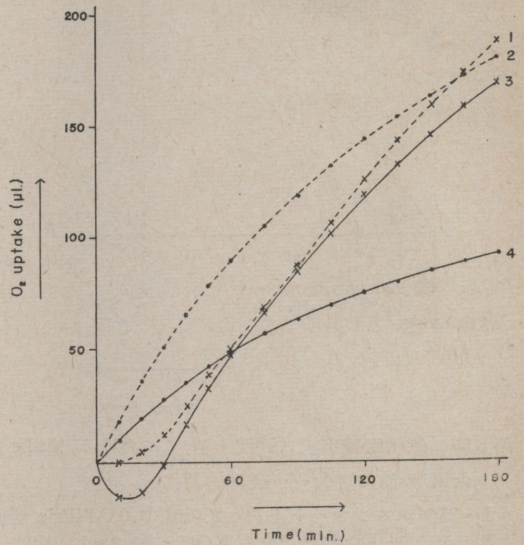
(B) 蛔虫筋無細胞抽出液 (遠沈上清) による Fumaric acid, Malic acid の酸化

実験に先立ち、蛔虫筋ホモジネートの調製には等張 NaCl 溶液 (0.9%) と等張 KCl 溶液 (1.15%) との何れを用いるのが適当であるかを検討したが、両者の間に殆んど差が認められなかつたので、以後の実験では総て1.15%KCl を用いてホモジネートを調製した。

実験 1. Malic acid 添加の影響

実験群を2群に分ち、第1群は対照系、第2群は基質添加系とした。各群は更に二分し、磷酸緩衝系および Tris 緩衝系とした。側室1個を有するワールブルグ容器を用い、主室には各群とも遠沈上清 2.0ml を入れ、これに更に磷酸緩衝系では 0.1M K-磷酸緩衝液 (pH 7.4) 0.5 ml, Tris 緩衝系では 0.05 M Tris 緩衝液 (pH 7.4) 0.5 ml を夫々添加した。側室には、第1群では 1.15%KCl 0.3ml, 第2群では0.15M Malate (K塩) 0.3 ml を加え、副室には20%KOH 0.2 ml を加えた。

実験の結果は第2図に示した。即ち対照系について見



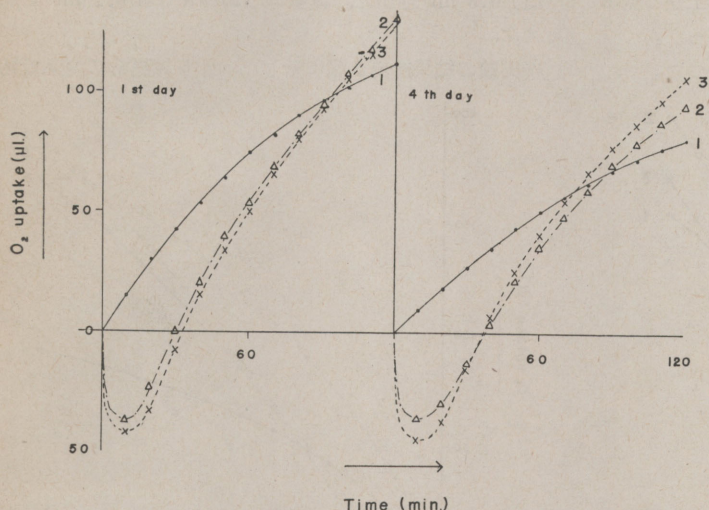
第2図 無細胞抽出液 (遠沈上清) における Malic acid の添加実験……緩衝液による差

1—25% ホモジネート上清：2.0ml, 0.1 M K-磷酸, 緩衝液：0.5ml (以上主室), 0.15M Malate：0.3ml (側室), 20%KOH：0.2ml (副室)。2—1—Malate, 3—1 の磷酸緩衝液の代りに 0.05 M Tris 緩衝液 (pH 7.4)：0.5 ml, 4—3—Malate, 全量：3.6ml, 気相：空気, 反応温度：38°C, 平衡時間：10分。

ると、磷酸緩衝液を用いた場合と Tris 緩衝液を用いた場合とでは、酸素消費量に相当の差が見られ、前者の方がかなり高値を示した。基質添加系では磷酸緩衝液を用いた場合、初期において呼吸の阻害とも或は適応とも見られるような結果が得られ、Tris 緩衝液の場合には初期において酸素吸収量は(一)値を示し、明らかにガス放出を思わせた。後二者の場合、酸素消費量はやがて対照値より高値となり、その状態は観察 300分後において

も変化しなかつた。

同様の現象は0.15M Fumarate (K塩)を用いて行つた実験でも観察され、更に遠沈上清を0°Cの水室中に数日間保存した場合においても著明な活性の低下は見られなかつた。第3図は第1日目の上清および保存4日目の上清による実験の結果を示すもので Tris 緩衝液を用いた。2は Malic acid, 3は Fumaric acid を基質とした場合である。



第3図 無細胞抽出液(遠沈上清)における Malic acid, Fumaric acid の添加実験……経日的変化

1—25%ホモジネート上清: 2.0ml, 0.05M Tris 緩衝液(pH 7.4): 0.5 ml (以上主室), 20% KOH: 0.2 ml (副室). 2—1+0.15 M Malate: 0.3ml (側室). 3—1+0.15M Fumarate: 0.3 ml (側室). 全量: 3.6 ml, 気相: 空気, 反応温度: 38°C, 平衡時間: 10分.

他方、これらの実験において、基質を添加した反応液中に Pyruvic acid, Lactic acid の著明な増加を認めた。Pyruvic acid であることの確認には次の方法を用いた。まず反応液を除蛋白後 2,4-Dinitrophenylhydrazine と反応せしめ Hydrazone とし、濾紙クロマトグラフィー(溶媒 *n*-Butanol-ethanol-ammonia)により展開し、明らかに Pyruvic acid と思われる二個の spot を認めた。これを溶出し更に水素気流中でパラジウムを用いて接触還元し、アミノ酸に誘導すると、いずれの spot よりも Alanine を得ることが出来た。

実験 2. KOH 除外の影響

Malic acid の添加により放出される気体が炭酸ガスである可能性が大であるので、之を確認するため次の実

験を行つた。

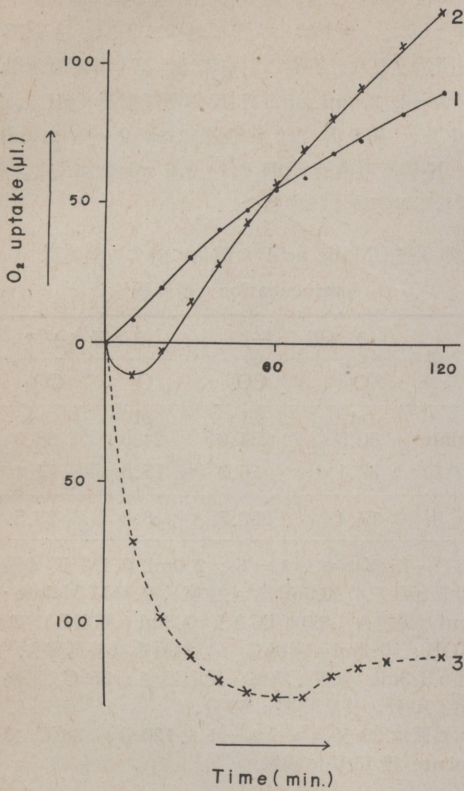
実験群を3群に分ち、第1群は対照系、第2群は基質添加系、第3群は基質添加、KOH 除外系とした。側室1個を有するワールブルグ容器を用い、主室には各群とも上清 2.0ml, 0.05M Tris 緩衝液(pH 7.4) 0.5 ml を加えた。側室には第1群では1.15% KCl 0.3ml, 第2群第3群では 0.15M Malate (K塩) 0.3 ml を加え、副室には第1・第2群では20% KOH 0.2 ml, 第3群では H₂O 0.2ml を加えた。

実験結果は第4図に示すように、第1, 第2群では実験1における3, 4と同様の曲線を示す。第3群の成績は酸素消費と気体放出との見掛け上の差を示すものであつて、その結果は酸素の吸収量を遙に上廻る気体の放出があることを示している。この第3群に見られる現象が、副室に KOH を加えることにより第2群に見られる曲線に変わることから見ると、放出される気体は極めて KOH に吸収され易いものであるが、初期におけるその発生量が余りに大であるために KOH の吸収力を上廻り、第2群に見られる様に、初期において酸素消費量が(−)値を示すものと考えられる。

(C) 蛔虫筋 ホモジネートによる Malic acid の酸化

以上の実験により蛔虫筋束或は蛔虫筋ホモジネートに Fumaric acid, Malic acid を添加した際、著明な炭酸ガスの発生を伴うことが立証された。しかし遠沈上清を用いての実験2における第3群の傾向および pH 7.4における炭酸ガスの貯留量より考えて、反応初期における脱炭酸量は酸素消費量に比し相当大であり、且検圧計の振盪回数を毎分 150回位迄増加しても、第2群に見られる気体放出の型を全く消失せしめることは出来なかつた。したがつて通常の型式のワールブルグ容器を使用して正確な酸素消費量を測定することは適当でないと考え、以下の実験には照井氏の容器を变形した第5図のような容器を用い、酵素研究法 (Vol. 1, 555~556)記載の Dikens-Simer の第2法によつて酸素消費量、炭酸ガス放出量を求めた。

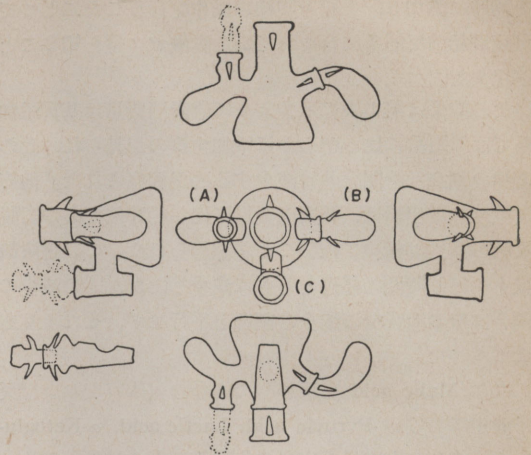
実験 1. Malic acid を添加した際のガス収支



第4図 無細胞抽出液(遠沈上清)における Malic acid の添加実験……KOH 添加有無の影響
 1—25% ホモジネート上清: 2.0ml, 0.05M Tris 緩衝液 (pH 7.4): 0.5ml (以上主室), 20% KOH: 0.2ml (側室) 2—1+0.15M Malate: 0.3ml (側室). 3—2において20% KOH を除去, 全量: 3.0ml, 気相: 空気, 反応温度: 38°C, 平衡時間: 10分.

Dickens-Simer の第2法によつては酸素消費量を連続して観察することは不可能であるため, 反応時間を15分, 30分, 60分に区切つて, ガス収支の時間的变化を観察した。

実験群を3群に分ち, 各群は更に, 基質添加系および対照系に分けた。容器の主室には, 各群とも20%ホモジネート 2.0ml, 0.1M K-磷酸緩衝液 (pH 7.4) 0.5 ml を加え, 側室 (A) には, 基質添加系では, 0.15M Malate (K塩) 0.3 ml, 対照系では1.15%KCl 0.3ml を加えた。各群とも側室 (B) には反応停止除蛋白用に60%三塩化醋酸 (以下TCAと略記す) 0.3ml を加え, 側室 (C) には20% KOH 0.2ml を加えた。



第5図 照氏井容器の変形型

測定に当つては, 測定開始前の温度平衡中に側室 (C) と主室とを短時間連絡し両室の気相が平衡に達したら直ちに連絡を遮断, 検圧計のコックを閉じ, 測定を開始する。測定開始後直ちに側室 (A) の内容を主室に添加する。

測定開始後第1群は15分, 第2群は30分, 第3群は60分を経過した後, 側室 (B) より TCA を主室に添加し, 反応を停止せしめるとともに液相中の炭酸ガスを放出せしめ, 放出が完全に行われた後, 側室 (C) を廻転し, 気相中の炭酸ガスを KOH に吸収せしめた。この際側室 (C) を廻転すると容器内圧に変化を生ずるため, 検圧計の液面に若干の変動の生ずることに留意して実験を行つた。

これに先立ち, 温度平衡終了後に, 基質添加系, 対照系と同一組成のものについて, 側室 (A), (B) の内容

第1表 Malic acid を添加した際のガス収支

基質	15min		30min		60min	
	O ₂	CO ₂	O ₂	CO ₂	O ₂	CO ₂
Malate	31.9	230.6	49.0	340.7	76.7	436.1
無添加	20.2	3.1	30.4	22.8	48.0	31.8
差引	11.7	227.5	18.6	317.9	28.7	404.3

反応系—20%ホモジネート: 2.0ml, 0.1M K-磷酸緩衝液 (pH 7.4): 0.5ml, (以上主室), 0.15M Malate: 0.3ml (側室A), 60%TCA: 0.3ml (側室B), 20%KOH: 0.2ml (側室C); 対照系は基質を除去, 全量: 3.3ml, 気相: 空気, 反応温度: 38°C, 平衡時間: 10分.

を同時に添加し、上記と同様の操作を行うことによつて測定開始前反応系に含まれていた炭酸ガス量を知ることが出来た。

その結果は第1表に示すように酸素消費量は基質添加系では対照系に比し明らかに増加するのが見られ、その増加の割合は時間と共に減少するのが観察された。他方炭酸ガス放出量は、酸素消費量に比し約20倍であつて脱炭酸の活性は極めて強いことが認められた。この脱炭酸量もやはり時間の経過とともに減少したが、その減少の割合は酸素消費量の減少の割合と平行せず、それよりも大であつた。

なお Malic acid を添加した場合の気体収支および反応液中における Pyruvic acid, Lactic acid, α -Ketoglutaric acid の生成量を定量すると第2表の結果となる。これらはすべて実験1と同様の反応系を用い、38°Cの恒温水槽中で60分間反応させたものについての測定値である。

第2表 ホモジネートに Malic acid を添加した際における反応生成物の生成量並びに気体収支

基 質	反 応 生 成 物				気 体 収 支	
	Pyruvate	Lactate	α -Ketoglutarate	計	CO ₂	O ₂
	μ M	μ M	μ M	μ M	μ M	μ M
Malate	12.67 (3.39)	3.78 (0.54)	0.87 (0.17)	17.32 (3.95)	19.22 (1.92)	3.33 (0.23)
無添加	-0.03 (0.05)	0 (0.22)	0.02 (0.04)	-0.01 (0.29)	1.34 (0.09)	2.06 (0.21)
差 引	12.70 (3.37)	3.78 (0.35)	0.84 (0.13)	17.32 (3.71)	17.88 (1.86)	1.27 (0.05)

反応時間60分の値を示す。他の条件は第1表と同じ。
() は標準偏差を示す。

即ち Malic acid を添加することにより反応生成物中の Pyruvic acid の量は最も多く、その量は放出された炭酸ガス量との間に甚だしい差を見ることが出来なかつた。

実験 2. Malic acid の酸化に対する前処置の影響

前実験において、時間の経過に従つて観察される酸素消費量および炭酸ガス放出量の減少の割合には、平行性が見られなかつたので、この点を明らかにするために本実験を行った。

25%ホモジネートを作成して、これを二分し、一方は38°Cの恒温水槽中で2時間振盪後、1.15%KClを以て15%ホモジネートに稀釈し前処置ホモジネートとした。他方はそのまま15%ホモジネートに稀釈し未処置ホモジネートとした。

実験群を2群に分ち、第1群を未処置群、第2群を前処置群とした。各群はそれぞれ更に二分し、基質添加系、対照系とした。容器の主室には、第1群では未処置ホモジネート 2.0ml, 0.1M K-磷酸緩衝液 (pH 7.4) 0.5 ml を、第2群では前処置ホモジネート 2.0ml, 0.1M K-磷酸緩衝液 (pH 7.4) 0.5 ml を加えた。側室に関しては実験1に準じた。

第3表 Malic acid の酸化に対する前処置 (preincubation) の影響

基 質	前処置 (-)		前処置 (+)*	
	O ₂	CO ₂	O ₂	CO ₂
Malate	μ l 50.5	μ l 284.0	μ l 24.6	μ l 38.9
無添加	37.1	26.3	15.8	15.4
差 引	13.4	257.7	8.8	23.5

反応系—15%ホモジネート：2.0ml, 0.1M K-磷酸緩衝液 (pH 7.4):0.5ml (以上主室), 0.15M Malate: 0.3ml (側室A), 60%TCA: 0.3ml (側室B), 20%KOH: 0.2ml (側室C); 対照系は基質除去。全量: 3.3ml, 気相: 空気, 反応温度: 38°C, 平衡時間: 10分, 反応時間: 60分。

* 前処置は20%ホモジネートを120分、38°Cでincubate後15%に稀釈。

以上の実験の結果は第3表に示すように前処置群では酸素消費量、炭酸ガス放出量とも減少を来したが、その減少の割合は酸素消費量が約1/2であるのに対し炭酸ガス放出量は約1/10であつた。

以上の事実は、Malic acid による酸素消費の抑制はやがて回復すると云う Grembergen (1949) の報告および、第1, 第2, 第3, 第4図において基質添加系の酸素消費量がやがて対照系のそれより高値を示すという現象の背後にある事実を説明するものと思われる。

実験 3. ホモジネートの Malic acid 酸化に対する亜硫酸の影響

実験群を2群に分ち、第1群は対照系、第2群を基質添加系とした。各群はそれぞれ更に二分し、亜硫酸添加系及び無添加系とした。容器は照井氏の変形型を用い、主室には各群とも20%ホモジネート 2.0ml, 0.1M K-磷酸緩衝液 (pH 7.4) 0.5 ml を加え、亜硫酸添加系では、更に0.1M亜硫酸 (pH 7.4に規正) 0.1 ml を加えた。側室に関しては実験1, 実験2と同様であつた。

第4表は、反応時間60分間の結果を示した。

実験 4. ホモジネートの Malic acid 酸化に対する

第 4 表 Malic acid の酸化に対する亜硫酸の影響

基 質	添 加 物			反 応 生 成 物				気 体 収 支	
				Pyruvate	Lactate	α -Keto glutarate	計	CO ₂	O ₂
				μ M	μ M	μ M	μ M	μ M	μ M
Malate	無 添 加 亜 砒 酸	無 添 加	8.82	3.39	0.67	12.88	16.22	3.41	
			7.06	2.28	0.86	10.20	23.44	9.21	
無 添 加	無 添 加 亜 砒 酸	無 添 加	14.89	2.11	0.82	17.83	20.33	9.68	
			-0.04	-0.22	-0.02	-0.28	1.25	1.81	
差 引	無 添 加 亜 砒 酸	無 添 加	-0.16	-0.08	0.01	-0.23	1.61	1.98	
			-0.08	-0.15	0.02	-0.21	1.33	2.17	
差 引	無 添 加 亜 砒 酸	無 添 加	8.86	3.61	0.69	13.16	14.96	1.60	
			7.22	2.36	0.85	10.43	21.83	7.23	
差 引	無 添 加 亜 砒 酸	無 添 加	14.97	2.27	0.80	18.04	19.00	7.51	
			15.15	4.19	0.93	20.27	20.67	1.30	
差 引	無 添 加 亜 砒 酸	無 添 加	18.33	2.78	0.83	21.94	22.52	0.98	
			18.39	3.21	0.86	22.46	23.42	3.81	

亜硫酸添加系は、0.1M 亜硫酸 0.1ml (主室) を加える。全量：3.4ml。其他の条件は第 1 表と同じ。

第 5 表 Malic acid の酸化に対する亜硫酸及び Methylene blue の影響

基 質	添 加 物			反 応 生 成 物				気 体 収 支	
				Pyruvate	Lactate	α -Keto glutarate	計	CO ₂	O ₂
				μ M	μ M	μ M	μ M	μ M	μ M
Malate	無 添 加 M. B. M. B. + 亜硫酸	無 添 加	8.82	3.39	0.67	12.88	16.22	3.41	
			7.06	2.28	0.86	10.20	23.44	9.21	
			14.89	2.11	0.82	17.83	20.33	9.68	
無 添 加	無 添 加 M. B. M. B. + 亜硫酸	無 添 加	-0.04	-0.22	-0.02	-0.28	1.25	1.81	
			-0.16	-0.08	0.01	-0.23	1.61	1.98	
			-0.08	-0.15	0.02	-0.21	1.33	2.17	
差 引	無 添 加 M. B. M. B. + 亜硫酸	無 添 加	8.86	3.61	0.69	13.16	14.96	1.60	
			7.22	2.36	0.85	10.43	21.83	7.23	
			14.97	2.27	0.80	18.04	19.00	7.51	

M.B. 添加系は 1.2×10^{-4} M M.B. : 0.1 ml (主室), 亜硫酸添加系は 0.1M 亜硫酸 : 0.2 ml (主室) を加える。全量：3.6 ml。其他の条件は第 1 表と同じ。

Methylene blue および亜硫酸の影響

実験群を 2 群に分ち第 1 群は対照系, 第 2 群は基質添加系とした。各群はそれぞれ更に 3 群に分ち, Methylene blue (M.B.) 添加系, M.B. および亜硫酸添加系, および無添加系とした。容器の主室には各群とも 20% ホモジネート 2.0ml, 0.1M K-磷酸緩衝液 (pH 7.4) 0.5 ml を加え, M.B. 添加系は更に 1.2×10^{-4} M B. 0.1ml を加え, M.B. および亜硫酸添加系は 1.2×10^{-4} M M.B. 0.1 ml, 0.1M 亜硫酸 0.2ml を加えた。各側室に関しては, 実験 1, 実験 2, 実験 3 と同様である。

反応時間 60 分の結果は第 5 表に示すように, M.B. の添加により炭酸ガス放出量, 酸素消費量ともに著明に増大したが, Pyruvic acid, Lactic acid は減少した。更に亜硫酸を添加すると M.B. 単独の場合に比し, 炭酸ガス放出量は稍減少したが Pyruvic acid の量は著しく増加し

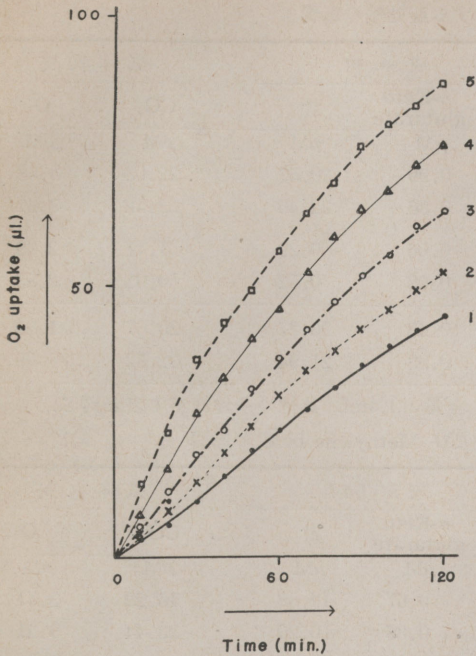
Lactic acid は減少した。又, Malic acid 添加, 無添加何れの場合においても酸素消費量が増加しているのが見られる。

〔II〕その他の TCA 回路中間代謝物質および二三関連代謝物質の酸化

(A) Pyruvic acid の酸化

実験 1. Cofactor 添加の影響

実験群を 5 群に分ち副室 2 個を有するワールブルグ容器を用い第 1 群, 第 2 群の主室には 20% ホモジネート 2.0 ml, 0.1M K-磷酸緩衝液 (pH 7.4) 0.8 ml を, 第 3 群の主室には更に 0.1% Thiamine pyrophosphate (TPP) 0.1ml を, 第 4 群の主室には更に 0.03 M MgCl₂ を, 第 5 群の主室には更に 0.03M MnCl₂ を加えた。第 1 の側室には第 1 群は 1.15% KCl 0.3 ml を加え, 他の群では 0.2M Pyruvate (Li 塩) 0.3 ml を加



第6図 ホモジネートによる Pyruvic acid の酸化及び cofactor 添加の影響

1—20% ホモジネート : 2.0ml, 0.1M K-リン酸緩衝液 (pH 7.4) : 0.8ml (以上主室), 20% KOH : 0.2ml (副室), 60% TCA : 0.4 ml (側室). 2—1 + 0.2 M Pyruvate : 0.3 ml (側室). 3—2 + 0.1% TPP : 0.1 ml (主室). 4—3 + 0.03 M MgCl₂ : 0.1 ml (主室). 5—4 + 0.03 M MnCl₂ : 0.1 ml (主室). 全量 : 4.0ml, 気相 : 空気, 反応温度 : 38°C, 平衡時間 : 10分.

えた。第2の側室には各群とも60% TCA 0.4 ml を加え、1.15% KCl で全量を 4.0 ml とした。

測定の結果は第6図に示した。蛔虫筋による Pyruvic acid の酸化に関しては、Rathbone (1955) は Sucrose を用いて作成した蛔虫筋の particulate fraction が Pyruvic acid を酸化しないことを報告した。これに対し Bueding *et al.* (1954) は酸化的磷酸化の実験において、同じく Sucrose を用いて作成した particulate fraction を用い、Pyruvic acid が酸素を消費することを報告し、前者と相反する結果を得た。

本実験においてはホモジネートを用いたが、Pyruvic acid が強力ではないが明らかに酸素消費を高めることが認められた。この酸素消費は、Mg⁺⁺, Mn⁺⁺, TPP により賦活された。

実験2 Pyruvic acid 酸化の際の気体収支

実験群を2群に分ち第1群を対照系、第2群を基質添加系とした。容器は照井氏の変形型を用い、主室には両群とも25%ホモジネート 2.0ml, 0.1M K-リン酸緩液(pH 7.4) 0.8ml, 0.03 M MgCl₂ 0.1ml, 0.03M MnCl₂ 0.1ml, TPP 0.1ml を加えた。側室(A)には第1群では1.15%KCl 0.3ml, 第2群では0.2M Pyruvate-(Li 塩) 0.3ml を加え、各群とも側室(B)には60%TCA 0.4ml, 側室(C)には20%KOH 0.2ml を加えた。

第6表 Pyruvic acid 酸化におけるガス収支

基 質	O ₂	CO ₂
	μl	μl
Pyruvate	135.6	203.6
無 添 加	82.3	76.0
差 引	53.3	127.6

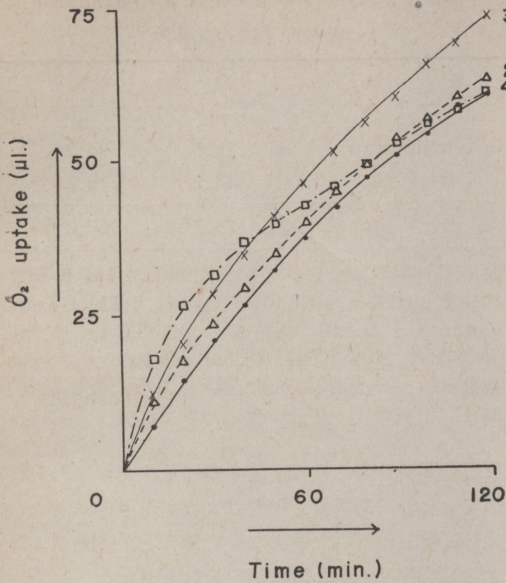
反応系—25% ホモジネート : 2.0ml, 0.1M K-リン酸緩衝液 (pH 7.4) : 0.8ml, 0.03M MnCl₂ : 0.1ml, 0.03M MgCl₂ : 0.1ml, 0.1% TPP : 0.1ml (以上主室), 0.2M Pyruvate : 0.3ml (側室A), 60% TCA : 0.4ml (側室B), 20% KOH : 0.2ml (側室C); 対照系は基質除去。全量 : 4.0ml, 気相 : 空気, 反応温度 : 38°C, 平衡時間 : 10分, 反応時間60分。

反応時間60分の実験の結果は第6表に示すように Pyruvic acid の添加により明らかに酸素消費量、炭酸ガス放出量ともに増加している。

(B) Acetic acid の酸化

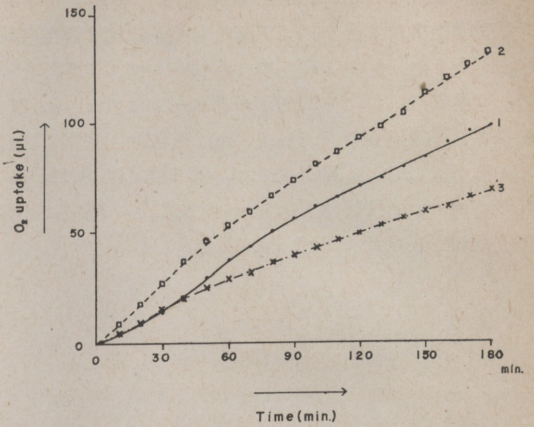
実験群を4群に分ち、側室1個を有するワールブルグ容器を用いた。主室には第1群より第3群迄は25%ホモジネート 2.0ml, 0.1M K-リン酸緩液 (pH 7.4) 0.5 ml を加え、第4群には更に0.15M Na-ATP 0.1ml を加えた。側室には、第1群では1.15% KCl 0.3ml, 第2, 第4群では0.15M Acetate (Na塩)第3群では0.15M Pyruvate (Li 塩) を加えた。副室には各群とも20% KOH 0.2ml を加えた。

実験結果は第7図に示すように Acetic acid を添加した第2群は初期において一時酸素消費量の増加が見られたが、それ以後は対照と殆んど変らなかつた。第4群では初期において対照に比しかなり高い酸素消費量の増加が見られたが、以後酸素消費量は次第に減少し、約30分後には対照よりも低い値を示した。第3群は、比較のために行つた Pyruvic acid の添加実験で、10分を超える頃



第7図 ホモジネートによる Acetic acid の酸化及び ATP 添加の影響

1—25%ホモジネート：2.0 ml, 0.1M K-磷酸緩衝液 (pH 7.4)：0.5ml (以上主室), 20% KOH：0.2ml (副室). 2—1+0.15M Acetate：0.3ml (側室). 3—1+0.15M Pyruvate：0.3ml (側室). 4—2+0.15M Na-ATP：0.1ml (主室). 気相：空気, 反応温度：38°C, 平衡時間：10分.



第8図 ホモジネートによる Citric acid の酸化

1—25%ホモジネート：2.5ml, 0.1M K-磷酸緩衝液 (pH 7.4)：0.8ml (以上主室), 20% KOH：0.2 ml (副室). 2—1+0.025 M Citrate：0.4 ml (側室). 3—1+0.1M Citrate：0.4ml (側室). 全量：4.0ml, 気相：空気, 反応温度：38°C, 平衡時間：10分.

加系とした。容器は照井氏の変形型を用い、主室には両群とも25%ホモジネート 2.5ml, 0.1M K-磷酸緩衝液 (pH 7.4) 0.8 ml を加え、側室 (A) には第1群では 1.15% KCl 0.4ml, 第2群では 0.025M Citrate(K塩) 0.4ml を加えた。両群とも側室 (B) には60% TCA 0.4ml を、側室(C)には20% KOH 0.2 ml を加えた。

第7表 ホモジネートによる Citric acid 酸化の際の気体収支

基 質	O ₂ μl	CO ₂ μl
Citrate	96.5	68.8
無添加	72.9	43.9
差 引	23.6	24.9

反応系—25%ホモジネート：2.5ml, 0.1M K-磷酸緩衝液 (pH 7.4)：0.8ml (以上主室), 0.025 M Citrate：0.4ml (側室A), 60% TCA：0.4ml (側室B), 20% KOH：0.2ml (側室C); 対照系は基質除去. 全量：4.3 ml, 気相：空気, 反応温度：38°C, 平衡時間：10分, 反応時間：60分.

第7表は反応時間60分間の実験結果であるが、基質の添加により酸素消費量、炭酸ガス放出量ともに増加しているのが見られる。

(D) α-Ketoglutaric acid の酸化

これは第2群と同程度の酸素消費量を示したが、第2群の如き時間の経過に伴って生ずる酸素消費量の低下は見られなかった。

(C) Citric acid の酸化

実験 1. Citric acid の酸化に対する基質濃度の影響

実験群を3群に分ち、側室1個を有するワールブルグ容器を用い、各群とも主室には25%ホモジネート 2.5ml, 0.1M K-磷酸緩衝液 (pH 7.4) 0.8 ml を加え、側室には第1群では 1.15% KCl 0.4 ml, 第2群では 0.025 M Citrate (K塩) 0.4ml, 第3群では 0.1M Citrate (K塩) 0.4 ml を加えた。副室には各群とも 20% KOH を加えた。

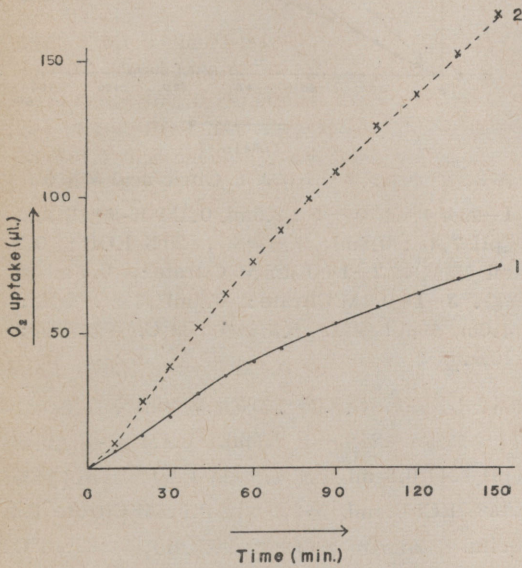
実験結果は第8図に示すように第2群は第1群に比し明らかに高い酸素消費量を示しているが、第3群は初期においては第1群と大差なく、30分を超える頃より酸素消費量における抑制が見られた。

実験 2. Citric acid 酸化の際の気体収支

実験群を2群に分ち第1群を対照系、第2群を基質添

実験 1. α -Ketoglutaric acid 添加の影響

実験群を2群に分ち、第1群を対照系、第2群を基質添加系とした。側室1個を有するワールブルグ容器を用い、主室には両群とも20%ホモジネート 2.0ml, 0.1M K-磷酸緩衝液 (pH 7.4) 0.5ml を加え、側室には、第1群では 1.15% KCl 0.3ml, 第2群では 0.1M α -Ketoglutarate (Na 塩) 0.3 ml を加えた。副室には両群とも20% KOH 0.2ml を加えた。



第9図 ホモジネートによる α -Ketoglutaric acid の酸化

1—20% ホモジネート : 2.0ml, 0.1M K-磷酸緩衝液 (pH 7.4) : 0.5ml (以上主室), 20% KOH : 0.2ml (副室), 2—1+0.1M α -Ketoglutarate : 0.3ml (側室) 全量 : 3.0ml, 気相 : 空気, 反応温度 : 38°C, 平衡時間 : 10分.

実験結果は第9図に示すように、基質の添加により、極めて著明な酸素消費量の増加を示したが、これは Rathbone (1955) の報告と一致する。

実験 2. α -Ketoglutaric acid 酸化の際の気体収支

実験群を2群に分ち、第1群を対照系、第2群を基質添加系とした。容器は照井氏の変形型を用い、主室には両群とも、20%ホモジネート 2.0ml, 0.1M K-磷酸緩衝液 (pH 7.4) 0.5 ml を加え、側室 (A) には第1群では 1.15% KCl 0.3ml, 第2群では 0.1% α -Ketoglutarate (Na 塩) 0.3ml を加えた。両群とも側室 (B) には 60% TCA 0.3ml, 側室 (C) には 20% KOH 0.2 ml を加えた。

第8表 ホモジネートによる α -Ketoglutaric acid 酸化の際の気体収支

基 質	O ₂ μl	CO ₂ μl
α -Ketoglutarate	71.8	94.2
無 添 加	43.1	30.3
差 引	28.7	63.9

反応系—20%ホモジネート : 2.0ml, 0.1M K-磷酸緩衝液 (pH 7.4) : 0.5ml (以上主室), 0.1M α -Ketoglutarate : 0.3ml (側室A), 60% TCA : 0.3ml (側室B), 20% KOH, 0.2ml (側室C); 対照系は基質除去。全量 : 3.3ml, 気相 : 空気, 反応温度 : 38°C, 平衡時間 : 10分, 反応時間 : 60分.

反応時間60分間の結果は第8表に示すように、基質の添加により酸素消費量、炭酸ガス放出量ともに増加したが、対照値を差引いた値について見ると、炭酸ガス放出量は酸素消費量の略2倍の値を示した。

(E) Succinic acid の酸化

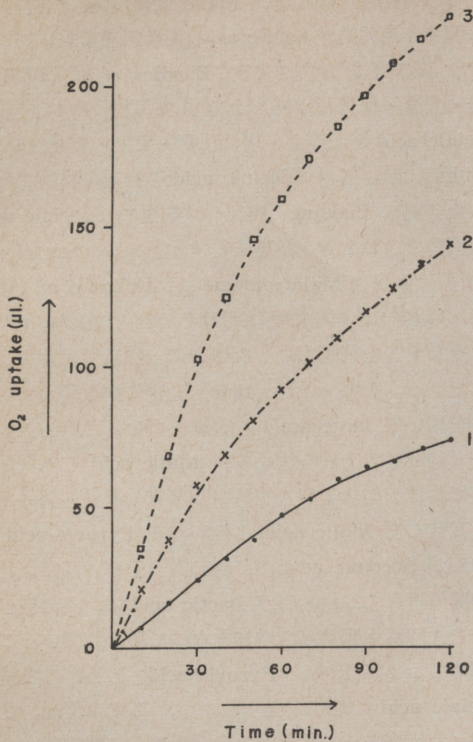
実験 1. Succinic acid の酸化およびそれに対する Methylene blue の影響

実験群を3群に分ち、第1群を対照系、第2群を基質添加系、第3群を基質および Methylene blue (M.B.) 添加系とした。側室1個を有するワールブルグ容器を用い。主室には各群とも20%ホモジネート 2.0ml, 0.1M K-磷酸緩衝液 (pH 7.4) 0.5ml を加え、第3群では更に 1.2×10^{-4} M M.B. 0.1ml を加えた。側室には第1群では 1.15% KCl 0.3ml を、第2第3群では 0.1M Succinate (Na 塩) 0.3ml を加え、副室には各群とも KOH 0.2ml を加え、1.15%KCl で全量を 3.1ml とした。

第10図はその結果を示すものであるが、Succinic acid の添加により、酸素消費量は明らかに増加を示し、M.B. の添加により更に著明な酸素消費量の増加が認められた。

実験 2. Succinic acid 酸化の際の気体収支およびこれに対する Malonic acid の影響

実験群を2群に分ち、第1群を対照系、第2群を基質添加系とした。各群はそれぞれ更に Malonic acid 添加系および無添加系に分つた。容器は照井氏の変形型を用い、主室には各群とも25%ホモジネート 2.0ml, 0.1M K-磷酸緩衝液 (pH 7.4) 0.5ml, 0.03M MnCl₂ 0.1 ml を加え、Malonic acid 添加系では、更に 0.2M



第10図 ホモジネートによる Succinic acid の酸化及び Methylene blue 添加の影響

1—20%ホモジネート：2.0ml, 0.1M K-磷酸緩衝液 (pH 7.4)：0.5ml (以上主室), 20% KOH：0.2 ml (副室). 2—1+0.1M Succinate：0.3ml (側室). 3—2+1.2×10⁻⁴M M.B.：0.1ml (主室). 全量：3.1 ml, 気相：空気, 反応温度：38°C, 平衡時間：10分.

Malonate (K塩) 0.2ml を加えた。側室 (A) には第 1 群では 1.15% KCl 0.2ml, 第 2 群では 0.2M Succinate (Na塩) 0.2ml を加え, 各群とも側室 (B) には 60% TCA を, 側室 (C) には 20% KOH 0.2ml を加えた。

第 9 表に反応時間 60 分間の結果を示したが, Succinic acid の添加により, 明らかに酸素消費量の増加が見られた。又 Malonic acid の添加により, 対照系, 基質添加系ともに, 酸素消費量の減少が見られたが, 対照値を差引いた値においては Malonic acid 添加の影響は殆んど見られなかつた。

(F) Lactic acid の酸化

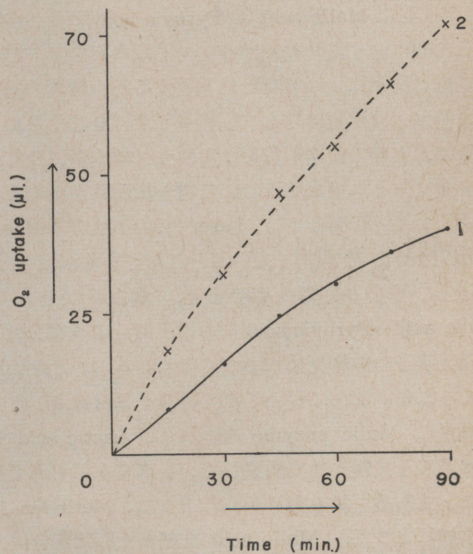
実験群を 2 群に分ち, 第 1 群を対照系, 第 2 群を基質添加系とした。側室 1 個を有するワールブルグ容器を用

第 9 表 ホモジネートによる Succinic acid の酸化に対する Malonic acid の影響

基 質	Malonate(-)		Malonate(+)		差 引	
	O ₂	CO ₂	O ₂	CO ₂	O ₂	CO ₂
	μl	μl	μl	μl	μl	μl
Succinate	118.6	122.8	72.8	83.2	-45.8	-39.6
無 添 加	60.6	47.9	11.6	3.3	-49.0	-44.6
差 引	58.0	74.9	61.2	79.9		

反応系—25% ホモジネート：2.0ml, 0.1M K-磷酸緩衝液 (pH 7.4)：0.5ml, 0.03M MnCl₂：0.1ml (以上主室), 0.2M Succinate：0.2ml (側室 A), 60% TCA：0.3ml (側室 B), 20% KOH：0.2ml (側室 C); 対照系は基質除去; Malonic acid 添加系は 0.2M Malonate：0.2ml (主室) を添加. 全量：3.5ml, 気相：空気, 反応温度：38°C, 平衡時間：10 分, 反応時間：60分.

い, 主室には両群とも 20%ホモジネート 2.0ml, 0.1M K-磷酸緩衝液 (pH 7.4) を加え, 側室には第 1 群では 1.15% KCl, 第 2 群では 0.1M Lactate (Li塩) 0.3ml を加えた。副室には両群とも 20% KOH を加えた。



第 11 図 ホモジネートによる Lactic acid の酸化

1—20%ホモジネート：2.0ml, 0.1M K-磷酸緩衝液 (pH 7.4)：0.5ml (以上主室), 20%KOH：0.2ml (副室). 2—1+0.1M Lactate：0.3ml (側室). 全量：3.0ml, 気相：空気, 反応温度：38°C, 平衡時間：10分.

測定の結果は第11図に示すように、基質の添加により明らかに酸素消費量の増加が見られた。

考 察

蛔虫筋束を用い Malic acid を基質として酸素消費量を測定した際 Grembergen (1949) の指摘したような一過性の抑制と見られる現象が観察された(第1図)。併しながら、この現象は第2, 第3, 第4図および第3表の結果から明らかなように、反応初期における炭酸ガス放出量が、酸素消費量に比し圧倒的に多量で KOH の炭酸ガス吸収力を超えるために見られる現象である。Malic acid の添加により酸素消費量の増加が認められることは、Rathbone(1955) が particulate fraction を用いて行つた実験結果と一致し、また多量の炭酸ガス放出を認めたことは、Saz *et al.* (1957) が蛔虫筋に活性の強い Malic enzyme の存在することを報告しているのと一致するものである。

この大量に放出された炭酸ガスの中、大部分のものが Malic acid の Pyruvic acid への変化に伴つて生じたものであることは、第3表における炭酸ガス放出量と反応液中の Pyruvic acid 量から充分考えられることである。併しながら、Malic acid が Pyruvic acid に変化するにはその間に必ず酸化過程が存在せねばならない。この過程が総て酸素によつて行われるとすると、酸素の消費量は炭酸ガス放出量に対し $1/2$ 当量でなければならぬ。しかるに、実際の酸素消費量は炭酸ガス放出量に比し極めて少量である。蛔虫筋において電子伝達系が極めて活性に乏しいことに関しては、Laser (1944) はじめ Bueding *et al.* (1954) の報告しているところであるが、このことと上の事実とを考え併せると、蛔虫筋においては Malic acid → Pyruvic acid における酸化の大部分は、他の還元系との共軛反応によつて行われるのではないかと考えられる。これについての可能性は Saz *et al.* (1957) が蛔虫の Malic enzyme の性質を、Lactic acid 脱水素酵素系と共軛させて観察している事実からも考えられることである。第5表に示したように、Methylen blue の添加によつて、Malic acid を基質とした場合炭酸ガス放出量が増加しているが、酸素消費量の増加の割合は更に大であり、Lactic acid 量は却つて減少していることも上に述べた可能性を強調するものであろう。

第2表において、Malic acid を基質とした場合反応液中の Pyruvic acid 量が Lactic acid 量に比して大であることは、Lactic acid が Pyruvic acid を経ずに変

化し得る可能性を除くと、Malic acid の酸化的脱炭酸と共軛する還元系が Lactic acid 脱水素酵素系以外にも存在することを考えさせる。Bueding *et al.* (1956)、上野・大家・板東 (1958) は蛔虫の体腔液中に多量の Succinic acid を証明し、また上野・大家・板東 (1958) は蛔虫筋においても Succinic acid の含量の高いことを確めた。更に Bueding (1955) は蛔虫の Succinic acid 脱水素酵素は DPN を補酵素とするといひ、Saz *et al.* (1957) は蛔虫の Malic enzyme は、Ochoa *et al.* (1948 a, b) の報告した高等動物におけるそれとは異り、TPN よりも DPN を補酵素とした場合に一層活性が強いと報告している。大家・上野 (1958) は別に蛔虫筋ホモジネートを用いて large scale の実験を行い、上野・大家・板東 (1958) の方法を用いて、Malic acid を基質とした際における他の TCA 回路中間基質の消長を調べた結果、変化した Malic acid の約30%が Pyruvic acid の約20%が Succinic acid の、約30%が TCA 回路以外の脂酸関係物質の、約8%が Lactic acid の、その他が他の TCA 回路中間基質の増加となつて現われていることを認めている。即ち、Pyruvic acid とともに多量の Succinic acid の増加が見られたが、この事實は、さきに述べた諸報告と考えあわせるとまことに興味深い。

Pyruvic acid 量が他に比し著明に大であることおよび Lactic acid の量が幾分増加していることから、蛔虫筋においては Pyruvic acid は Lactic acid に若干変化する以外には他の酵素反応の基質になり得ないか、或は Pyruvic acid を更に変化せしめる酵素系が存在しても Malic acid 脱炭酸系に比し遙に活性に乏しいことが考えられる。併しながら、第5表の結果は前者を否定し、後者については二つの可能性を示している。即ち、一つは Pyruvic acid 酸化の可能性であり、他は酸化以外の過程で変化せしめられる可能性である。Malic acid を基質として Methylen blue を添加すると、添加しない場合に比し、Pyruvic acid の生成量は減少すること、および更に亜硫酸を加えることにより炭酸ガスの放出量は幾分減少するにも拘らず、Pyruvic acid 量は2倍以上に増加することおよび其の際の Lactic acid 量には殆んど差のないこと(第5表)から、Pyruvic acid は蛔虫筋により Lactic acid 以外の物質に変化せしめられることが考えらる。尚この際に、Lactic acid 量および酸素消費量について見ると、何れの場合にも大差が見られない。しかも Pyruvic acid 量に大差が見られることより見て、蛔虫筋には、酸素消費を必要とせず、Lactic acid

に変化する以外の経路で、しかも亜硫酸に阻害されるような、Pyruvic acid を処理する酵素系が存在する可能性を一概に否定することが出来ないであろう。Pyruvic acid の酸化については第 6 図、第 6 表の示す通りである。

Acetic acid をホモジネートに添加した際の成績 (第 7 図) において、Acetate 単独添加の系と Pyruvate を添加した系との両者を比較したとき、最初の間は略同じ酸素消費量の増加を示し乍ら、前者においてはこれが維持されず、後者においては維持されている。これは前者においては、ATP の不足を来し、Acetyl-Co A の生成が見られなくなるに反し、後者はその酸化により ATP を生成するためであるのかも知れない。また ATP を添加した系で、一時著明な酸素消費を見乍ら、これが維持されぬのは、加えた ATP がホモジネート中の ATPase により分解されるためであるかも知れない。

Citric acid の酸化に関しては Rathbone (1955) は particulate fraction に終末濃度 0.01M の Citric acid を加えた際、酸素消費が見られなかつたことを報じている。Citric acid の終末濃度 0.0025M では酸素消費量の増加が見られ、終末濃度 0.01M では明らかな阻害が見られた (第 8 図)。Evans *et al.* (1945), Ochoa *et al.* (1948 a) は Citric acid が他の還元系と共働して α -Ketoglutaric acid になる際炭酸ガスを放出することを報告している。併し乍ら第 8 図に見られる阻害は、Malic acid の酸化の際に見られたような、炭酸ガス放出による見掛け上の抑制とはその趣を異にしている。

蛔虫筋による Succinic acid の酸化に関しては Laser (1944), Buedieg *et al.* (1952, 1954), Rathbone (1955), Grembergen *et al.* (1949) の報告があるが、彼等は muscle pulp を透析しなければ Succinic acid の酸化は見られないという点において一致している。著者は透析による cofactor の消失を顧慮し、よく洗滌した筋よりホモジネートを作り、pH 7.4 において Succinic acid の酸化を観察することが出来た。又、松山 (1957) は蛔虫筋による Succinic acid の酸化は Malonic acid によつて阻害されないと報じている。著者の実験によると (第 9 表)、自家呼吸においても、Succinic acid 添加の場合においても、Malonic acid の添加により、酸素消費は阻害されておりその阻害の程度は両者ともに略等しい。自家呼吸を差引いた値についてみると Malonic acid の阻害は見られず、その点においては松山 (1957) の見解と一致する。併し乍ら、蛔虫の自家呼吸の基質の中で

Succinic acid が大部分を占めていると仮定すると、Succinic acid を多量に加えた場合には拮抗的阻害剤である Malonic acid はそれ以上著明な変化は与えないことが考えられる。このことを、蛔虫体が多量の Succinic acid を含むこと、および充分洗滌しない筋より作成したホモジネートでは、Succinic acid を添加しても酸化されぬということと考え合せると、Malonic acid に対する蛔虫筋の態度は極めて興味ある問題であろう。

Rathbone *et al.* (1954) は解糖系の解析に際し、加えた Pyruvic acid が定量的に Lactic acid になることを報じている。又上野・板東 (1957) は蛔虫飼養液中、体腔液中および筋肉中に Lactic acid の含量の少いことを報告している。著者の実験では、蛔虫筋ホモジネートに Lactic acid を添加すると酸素消費が高まることが認められたが、このことは蛔虫筋が酸素の存在において Lactic acid を更に変化する能力を有することを示すものである (第 11 図)。

又 Malic acid が蛔虫筋ホモジネートによつて変化を受ける際 Oxalacetic acid が生成するか否かについては Rathbone (1955) は KCN が蛔虫の呼吸を増強することを認め、これは CN^- がケト固定を行つて脱水素酵素系に対する Oxalacetic acid の阻害を抑制するために見られる現象であると考えた。大家・上野 (1958) は Malic acid を添加した際、M.B., KCN を添加すると、脱炭酸が増大するのを認めた。この際 M.B. 単独の場合に比し、M.B., KCN の両者を併用するとその増大は更に大となつた。併し乍ら、反応生成物中から Oxalacetic acid を検出することには成功しなかつたので、Oxalacetic acid を生成する系が存在するか否かについては、未だ確言する段階に至っていない。

以上の如く蛔虫筋において従来酸化の基質とならないと考えられていた TCA 回路の諸種の基質も、よく洗滌した筋より作成したホモジネートにおいては酸化の基質となり得ることが確認された。しかしながら、これらの酸化は他の高等動物において見られる酸化に比し活性が低いことから考えて、いわゆる TCA 回路が、他の高等動物において有するような生理的意義を、蛔虫筋においても有しているか否かについては、なお詳細な研究を必要とするであろう。

総 括

1) 十分に洗滌した蛔虫筋の筋束・ホモジネート・無細胞抽出液(遠沈上清)は、Malic acid を基質として強力な酸化的脱炭酸を行うことを認めた。

2) ホモジネートを用いると、Malic acid は酸化的脱炭酸を受けて Pyruvic acid を生成した。その際における酸素消費量は生成する Pyruvic acid の量に比して遙に少く、大部分の酸化は他の還元系との共転により、酸素を消費することなしに行われることが考えられた。

3) 反応液中に Lactic acid の増加が見られた。このことから見て、共転する還元系の一部として Pyruvic acid-Lactic acid 脱水素酵素系を除外することは出来ない。

4) Pyruvic acid, Acetic acid, α -Ketoglutaric acid, Succinic acid および Lactic acid はホモジネートの酸素消費を高めることを認めた。以上の事実により、TCA回路の諸酵素が蛔虫筋においても存在することが十分に考えられるが、それらの各酵素の活性は一般に低かつたことより考えると、蛔虫においてはTCA回路が高等動物に占めるような生理的意義を有するか否か直ちに結論することは困難であると考えられる。

稿を終るに際し、御懇篤なる御指導ならびに御校閲を賜つた小林芳人教授に深く感謝の意を表し、また終始御鞭撻下さつた順天堂大学医学部薬理学教室板東丈夫教授、種々御助言を戴いた東大薬理学教室江橋節郎博士、順天堂大学生化学教室関根隆光教授、および試料の精製、並びに定量その他に関し多大な御助力を戴いた上野芳夫学兄に衷心より感謝を捧げる。

文 献

- 1) Barker, S. B., & Sumerson, W. H. (1941) : The colorimetric determination of lactic acid in biological material. *J. Biol. Chem.*, 138, 535-554.
- 2) Baldwin, E., & Moyle, V. (1947) : An isolated nervemuscle preparation from *Ascaris lumbricoides*. *J. Exptl. Biol.*, 23, 277-291.
- 3) Baldwin, E., & Moyle, V. (1949) : A contribution to the physiology and pharmacology of *Ascaris lumbricoides* from the pig. *Brit. J. Pharmacol.*, 4, 145-152.
- 4) 板東丈夫 (1951) : 諸種駆虫薬の作用機序についての実験的研究. *東京医学会雑誌*, 59, 39-53.
- 5) Bueding, E. (1953) : Formation of tiglic and n-valeric acids by bacteria-free *Ascaris lumbricoides*. *J. Biol. Chem.*, 202, 505-512.
- 6) Bueding, E., & Charms, B. (1952) : Cytochrome c, cytochrome oxidase and succinoxidase activities of helminths. *J. Biol. Chem.*, 196, 617-627.
- 7) Bueding, E., Entner, N., & Farber, E. (1955) : Dissociation of the succinoxidase systems of *Ascaris lumbricoides* and of rat liver. *Biochim. et Biophys. Acta*, 18, 305-306.
- 8) Bueding, E., & Farrow, G. W. (1956 a) : Identification of succinic acid as a constituent of the perientric fluid of *Ascaris lumbricoides*. *Exptl. Parasitol.*, 5, 345-349.
- 9) Cavallini, B., Frontali, N. & Tosche, G. (1949) : Determination of keto-acids by partition chromatography on filter-paper. *Nature*, 163, 568-569.
- 10) Evans, E. A. JR, Moulder, J. W. & Vennesland, B. (1945) : A study of enzymatic reactions catalyzed by pigeon liver extracts. *J. Biol. Chem.*, 160, 305-325.
- 11) Fairbairn, D. (1957) : The biochemistry of *Ascaris*. *Exptl. Parasitol.*, 6, 491-554.
- 12) Farber, E., & Bueding, E. (1956b) : Histochemical localization of specific oxidative enzymes. 5. The dissociation of succinic dehydrogenase with phenazine metosulfate and tetrazolium salts. *J. Histochem. Cytochem.*, 4, 357-362.
- 13) Friedmann, T. E., & Haugen, G. E. (1943) : Pyruvic acid II. The determination of keto acids in blood and urine. *J. Biol. Chem.*, 147, 415-442.
- 14) Van Grembergen, G., van Demme, R., & Bercruysse, R. (1949) : Le métabolisme respiratoire du nématode, *Ascaris lumbricoides*. *Enzymologia*, 13, 325-342.
- 15) 倉富一興・細谷憲政 (1955) : クエン酸定量法について. *生化学*, 25, 72-74
- 16) Laser, H. (1944) : The oxidative metabolism of *Ascaris suis*. *Biochem. J.*, 38, 333-338.
- 17) Moyle, V., & Baldwin, E. (1952) : Volatile fatty acids of *Ascaris lumbricoides* from the pig.
- 18) 松山閑 (1957) : 豚蛔虫コハク酸脱水素酵素に関する研究. *生化学*, 28, 834-835.
- 19) 野末源一 (1953) : α -ケトグルタル酸の製法. *標準生化学実験法*, 567-568 (光文堂発行).
- 20) Ochoa, S., Mehler, H., Kornberg, A., & Grisolia, S. (1948a) : The enzymatic mechanism of oxidation reduction between malate or isocitrate and pyruvate. *J. Biol. Chem.*, 174, 961-977.
- 21) Ochoa, S., Mehler, H., & Kornberg, A. (1948b) : Biosynthesis of dicarboxylic acid by carbon dioxide fixation. *J. Biol. Chem.*, 174, 979-1000.
- 22) 大家裕・上野芳夫 (1958) : 未発表.
- 23) Passay, R. F., & Fairbairn, D. (1955) : The respiration of *Ascaris lumbricoides* eggs. *Can. J. Biochem. Physiol.*, 33, 1033-1046.
- 24) Rathbone, L. (1955) : Oxidative metabolism in *Ascaris lumbricoides* from

the pig. *Biochem J.*, 61, 574-579. —25) Rathbone, L., & Rees, K. R. (1954): Glycolysis in *Ascaris lumbricoides* from the pig. *Biochem. et Biophys. Acta*, 15, 126-133. —26) Saz, H. J., & Hubbard, J. A. (1957): The oxidative decarboxylation of malate by *Ascaris lumbricoides*. *J. Biol. Chem.*, 225, 921-923. —27) Shimizu, T. (1950): The determination of α -ketoglutaric acid in blood and urine. *J. Biochem.*, 37, 421-433. —28) 上野芳夫・板東丈夫 (1957): 蛔虫の飼養液・体腔液中における脂酸・アンモニア及びアミノ酸の定性及び定量的研究. *寄生虫誌*, 6, 98. —29) 上野芳夫・大家裕・板東丈夫 (1958): Column chromatography による有機酸の分離定量 第18回日本薬理学会関東部会 (1958, 6, 22) 発表.

Summary

- 1) A marked decarboxylation was observed when muscle strips, muscle homogenate or muscle extract of *Ascaris lumbricoides* var. *suis* was incubated with malic acid in the presence of air.
- 2) A large amount of pyruvic acid was formed from malic acid by using muscle homogenate as

well as muscle extract concurrently with the decarboxylation. In these cases, the increase in the rate of oxygen uptake was much smaller than expected from the amount of produced pyruvic acid. This fact may suggest that most parts of oxidation of malic acid are performed by coupling with other reduction systems.

- 3) The addition of malic acid caused also the accumulation of relatively small but significant amount of lactic acid. Consequently, it is impossible to exclude the lactic dehydrogenase system from reduction systems concerning the oxidation of malic acid.

- 4) Pyruvic acid, acetic acid, citric acid and α -ketoglutaric acid also increased significantly the rate of oxygen consumption. Hence, there is no doubt as to the presence of enzymes referring to the tricarboxylic acid cycle. Considering the low activity of each substrate in stimulating oxygen uptake, however, it is difficult to consider that the tricarboxylic acid cycle plays an important role in *Ascaris* as in the case of vertebrate.