

ブタ肺虫ミトコンドリアの酸化リン酸化機構の検討

—ミトコンドリアの調製とその性能の解明—

小 澤 光 佐 藤 正

東北大学医学部薬品作用学教室

(1965年7月3日受領)

緒 言

寄生虫のエネルギー生成系についての研究は、もっぱら嫌気的な生活を営む蛔虫についての Chin *et al.* (1954), Rathbone(1955), Seidman *et al.* (1961), 大家ら(1961), 大保(1963)などの報告があげられるに過ぎず、他の寄生虫についての知見はほとんど見当らない。ブタ肺虫は蛔虫と異なりいちじるしく酸素呼吸の大きな寄生虫であることは、先に石関(1961)や著者ら(1964)が報告したが、この肺虫の酸化リン酸化の解明は嫌気的な蛔虫との対比の意味のみならず、酸化リン酸化についての知見はこれまでほとんど2~3の高等動物の組織に限られ、下等動物ではきわめて乏しい現状から、比較生化学的見地から興味深いものである。

一方、Chance *et al.* (1955)が酸化リン酸化の解明に酸素電極による方法を導入して以来、操作の容易なこの方法による酸化リン酸化の研究が数多く報告されている。そこで、今回著者らはブタ肺虫ミトコンドリアの酸化リン酸化の解明を酸素電極による方法で試み、特に呼吸調節能のあるミトコンドリアの調製を行なった。その結果、酵素処理により収量は少ないながらもそれを得ることができたので、さらにこのようにして得られたミトコンドリアの性能に若干の検討を加えた。また肺虫ミトコンドリアが高等動物のミトコンドリア同様 TCA サイクルの各メンバーを基質として、程度に差はありながらも、酸化リン酸化を行なうなどの2~3の性質を明らかにしたので、その結果について報告する。

実験材料および方法

1. 実験材料

ブタ肺虫は仙台市立中田屠場で入手し、屠殺直後の肺

虫の寄生したブタの肺から寄生部位を切除して実験室に持ち運び、臓器より採集した。雌個体のみを選び出し、十分に0.9% NaCl 液および調製液で洗滌後実験に供した。なお調製液は0.21 Mマンニトール、0.07 Mシュクローズ、0.1 mM EDTA を含む液に pH 調節の操作を簡便にするため予め1 mM トリス(ヒドロキシメチル)-アミノメタンを含有させた液である。

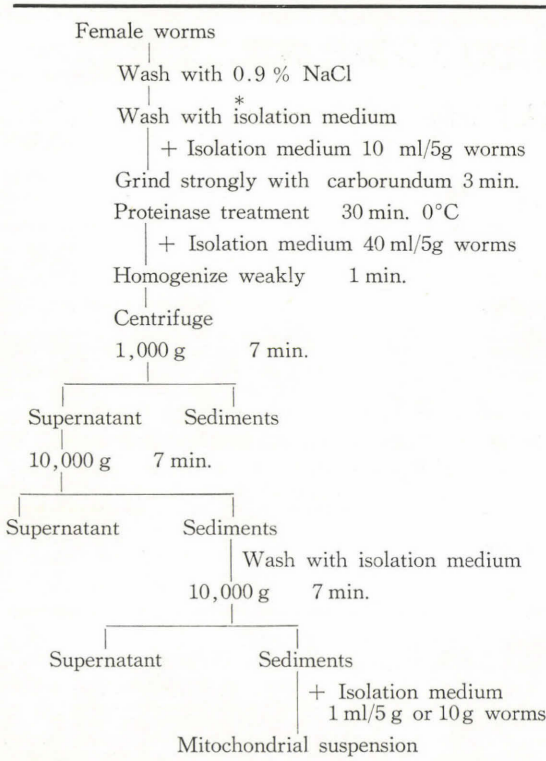
2. 実験方法

ブタ肺虫のミトコンドリアの調製は、Table 1 に示す過程で行ったが、これは主に萩原(1961)による高等動物の組織におけるミトコンドリアの調製法に準じたものである。虫体を鉢にて細切の後、予めよく冷した乳鉢中に入れ、生体重量10 g 当り20 ml の調製液を加え、さらに冷した少量の金剛砂とともに強く10分ごとに1分間づつ合計3分間磨砕を行った。その間細菌プロティナーゼ10,000 P.U.N. (1,000 P.U.N は結晶トリプシンの略1 mg の力価に相当)を加え、酵素による消化をも同時に行っている。なおプロティナーゼはアンプル封入の Nagarse を用いている。つぎに虫体重量の10倍量になるように調製液を加えたのち軽く1分間テフロンホモゲナイザーにかけ、Table 1 にみられるように、常法にしたがつて遠心分画を行った。最後に得られた沈渣に虫体10 g 当り1 ml の調製液を加えたものを試料としたが、この濃度の試料ではミトコンドリアタンパク質の量は約18 mg protein/ml となり、高等動物のラット肝からの収量に比較すれば約 $\frac{1}{10}$ の収量である。なお上記の操作はすべて0°C~4°Cの間の低温下で行なっている。

3. 酸化リン酸化の測定

酸素消費は柳本製作所の自記呼吸酸素測定装置 PO-100型を用いて測定した。P/O 比は Chance *et al.* (1955)の方法にしたがつて算定した。ADP Na 塩は

Table 1 Preparation of lung worm mitochondria



* Isolation medium contains 0.21 M mannitol, 0.07 M sucrose, 0.1 mM EDTA, and 1 mM Tris (hydroxymethyl) aminomethane.

Sigma 製 (純度 96 %) のものを用い、260 μm の吸光によりその濃度を決定したが、分子吸光係数は Bock *et al.* (1956) の値に基づいた。反応液の組成は、0.3Mマンニトール、10mM KCl、2.5mM MgCl_2 、10mM K-phosphate buffer pH 7.2 または 7.4、0.2mM EDTA を含む液を用い、実験温度は 25°C とした。反応液中の溶存酸素量は Chance *et al.* (1955) にならい常水に等しいものとして 240 $\mu\text{M O}_2$ とした。基質および阻害剤は市販品を用い、遊離酸の場合は KOH で中和して用いた。肺虫ミトコンドリアのタンパク質の量は、ウシ血清アルブミンを標準としビュレット法によつたが、試料の混濁による妨害を除くためにエーテル処理を行う方法にしたがった。

実験結果

1. 肺虫ミトコンドリアの調製

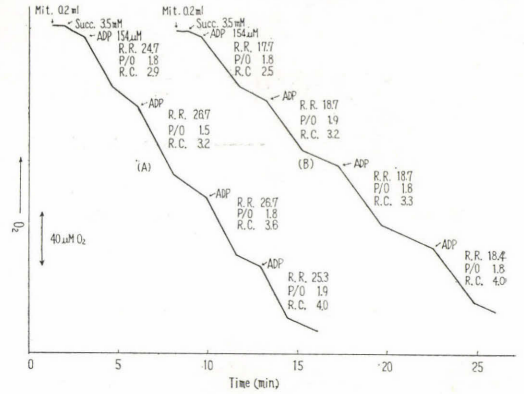


Fig. 1 Time course of respiration of lung worm mitochondria

(A) mitochondria obtained by proteinase treatment, (B) mitochondria obtained by mechanical treatment only.

The reaction system contained 0.3M mannitol, 10mM K-phosphate buffer solution, pH 7.4, 2.5mM MgCl_2 , 0.2mM EDTA and 3.5mM succinate as respiratory substrate. Mitochondria: 0.2 ml and total volume 2.5 ml. At arrows, 154 μM ADP was added successively. R.R.: rate of respiration ($\mu\text{M O}_2/\text{min.}$), temperature, 25°C.

1) 酵素処理と無処理の比較

ブタ肺虫のように、きわめて組織の固い虫体よりのミトコンドリアの分離を行うためには機械的磨砕のみでは不十分と考え、細菌プロテイナーゼ処理を行った。すでに酵素処理によるミトコンドリアの調製は、Hatefi *et al.* (1961) の心筋や、小林ら (1962) の HeLa 細胞についての Nagarse を用いた報告や、Ohnishi *et al.* (1964) の酵母についてカタツムリ消化酵素を用いた報告が知られている。Fig. 1 はブタ肺虫の機械的磨砕のみによる分離と、さらに細菌プロテイナーゼによる組織分解をも併用した場合に得られたミトコンドリアの、コハク酸を基質としての酸化的リン酸化の経過を示したものである。すなわち同日採集虫体を 2 群に分け、一方は機械的磨砕のみで (B 群)、他方はさらに酵素処理を併用して得たミトコンドリア (A 群) である。両者ともコハク酸添加と同時に酸素消費が認められるが、ADP 添加によりリン酸化に伴う急激な呼吸 (State 3 と称す) がみられ、ADP が消費すると再びもとのゆるい呼吸 (State 4 と称

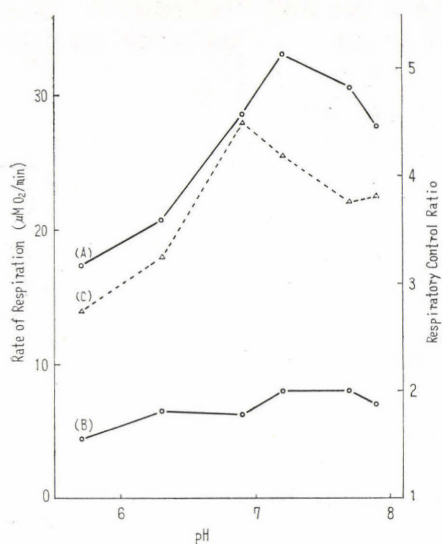


Fig. 2 Effect of pH on the respiration of lung worm mitochondria

The reaction system was the same as Fig. 1. The pH was adjusted with 10 mM K-phosphate buffer solution and measured by glass-electrode. 3.5 mM succinate as substrate; mitochondria, 0.92 mg protein/ml reaction med., (A) respiration in the presence of ADP (148 μM), (B) respiration wherein ADP was expended, (C) respiratory control ratio. Each value above was obtained at the 2nd cycle of ADP addition.

す)にもどる。この間の添加 ADP 量と酸素消費量の比、すなわち ADP/O 比を P/O 比とし、また ADP 添加時の急激な呼吸率と ADP 消費後のゆるい呼吸率の比を呼吸調節率(R.C.)として表わす。(A)、(B)両群を比較すると、P/O 比、R.C. 値にはさして著しい相異は認められないが、呼吸率(R.R.)はA群の方より約40%も高く、酵素処理により、活性ミトコンドリアの収量が高くなる事が知られる。

2) 調製液の pH

従来、調製液の pH についての検討は KOH や Na-HCO₃ の添加の他に Tris 緩衝液を用いた報告があるが、今回は簡便のため、予め 1 mM Tris を含有させた液(約 pH 8.9)で調製を行った。この程度のもものでは Table 1 に示す過程で処理を行えば組織磨碎時の pH 低下は約 pH 6.8 となり、大体好適な条件に保つことができる。

Table 2 Effect of serum albumin on mitochondrial respiration

		Rate of respiration μM O ₂ /min.		Respiratory P/O control ratio	
		State 3	State 4	State 3	State 4
(A)	control	24.9	9.6	2.6	1.9
	0.05 % S.A.	32.0	5.6	5.7	2.1
(B)	control	25.3	5.6	4.5	2.1
	0.05 % S.A.	26.7	5.3	5.0	1.9

The reaction system was the same as Fig. 1. (A) Mitochondria isolated with isolation medium containing 0.1 mM Tris(hydroxymethyl)aminomethane, (B) Mitochondria isolated with isolation medium containing 1 mM Tris. S.A.: bovine serum albumin(fraction V). 184 μM ADP was added. The values above were obtained at 3rd cycle of ADP addition.

Table 3 Oxidative phosphorylation in lung worm mitochondria with various substrates

Substrate (3.5 mM)	Rate of respiration μmolO ₂ /mg prot. /min.		Respiratory P/O control ratio	
	State 3	State 4	State 3	State 4
succinate	35.1	8.8	4.0	1.9
malate	13.6	3.6	3.8	2.7
α-KG	13.3	3.6	3.7	2.8
pyruvate-malate	9.9	4.0	2.5	2.3
citrate	6.1	2.5	2.4	3.0
glutamate	5.5	2.8	2.0	2.8

The reaction system was the same as Fig. 1 except pH 7.2 was adopted. Mitochondria, 0.73 mg protein/ml reaction med. with succinate as substrate; 1.46 mg protein/ml reaction med. with other substrates. 169 μM ADP was added. The values above were obtained at 3rd cycle of ADP addition.

アルブミンは損傷したミトコンドリアの活性を回復するのに有効であることを Cooper *et al.* (1960) や小林ら (1962) が報告しているが、特に調製時の pH の影響を、アルブミンによるミトコンドリアの活性回復から検索を試みたのが Table 2 に示す結果である。反応液中で予め 0.05 % 血清アルブミン処理を行った後に呼吸を測定している。A 群の 0.1 mM Tris を含有した調製液 (ca. pH 7.4) による調製時の pH 低下の大きいミトコンドリア

アにおいてはアルブミンの効果はいちじるしく、特に呼吸調節率(R.C.)の上昇が大きい。一方1 mM Tris を含み(ca. pH 8.9)調製時の pH 低下は好適な条件近く(pH 6.8)に保たれる場合は、B群にみられるように、A群に比してアルブミンの効果はあまり認められずアルブミン無添加で比較的高い R.C. が得られる。なお、後述のように ADP 添加の度ごとに R.C. の上昇してゆく傾向は、アルブミン添加の際にもその程度はやや低い共通して存在する。

2. ブタ肺虫ミトコンドリアの性能

1) ADP 添加と呼吸率の増加

高等動物のミトコンドリアの性能といちじるしく相異なる点として、ADP による呼吸をくり返すごとに呼吸調節率の増加してゆく現象があげられる。Fig. 1 においてみられるように、例えばA群において最初の ADP 添加時の R.C. が 2.9 であり、順次 ADP 添加の回数とともにそれが上昇し、第 4 回目には 4.0 とその増加はいちじるしい。この上昇は ADP 添加時の呼吸すなわち State 3 の呼吸率の増加よりも、むしろ ADP 消費後のゆるい呼吸すなわち State 4 の呼吸率が順次減少することに基づくものである。一方、この R.C. の変動と P/O 比の間には何ら明らかな関係は認められない。コハク酸以外の基質においても、リンゴ酸や α -ケトグルタル酸についても同様な経過が認められた。

2) 呼吸活性と pH

コハク酸を基質として、pH 5.7~pH 7.9 の範囲について、pH と呼吸調節率の関係を調べた結果が Fig. 2 に示される。緩衝液は 10 mM K-phosphate buffer 液を用い、pH の測定はガラス電極によった。ADP 添加時の呼吸は pH 7.2 で極大を示すが、呼吸調節率はむしろ pH 6.9 で極大となる。pH 5.5 付近ではミトコンドリアの凝集が観察された。結局、中性附近が最適な測定条件と考えられるが、この pH の変化に基づく呼吸活性の変動とは関係なく P/O 比は約 1.8~2.1 の範囲の値を示した。なお、Fig. 2 の値は ADP 添加第 2 回目の測定結果を採用したものである。

3) 基質の種類と酸化的リン酸化

TCA サイクルの代表的な基質およびその他の 2~3 の基質について検討を行ったが、Table 3 のように、その程度に差はありながらも、コハク酸、リンゴ酸、 α -ケトグルタル酸、ピルビン酸、クエン酸、グルタミン酸を基質として酸化的リン酸化を行いうることが判った。 β -オキシ酪酸を基質としてはほとんど呼吸が認められず、

またピルビン酸を基質とする場合には少量のリンゴ酸を sparker として用いたが、明らかにこの微量の添加により呼吸の増大が認められた。

4) 阻害剤の影響

酸化的リン酸化の代表的な阻害剤として、2,4-DNP, Antimycin A, KCN についてコハク酸を基質としてその影響を調べた。Antimycin A 0.6 μ /ml や 10^{-3} M KCN はほとんど完全に ADP 添加時の急激な呼吸や ADP 消費時のゆるい呼吸ともに阻害が認められた。一方、2,4-DNP 10^{-4} M により、逆に急激な呼吸の解放が ADP 存否の状態にかかわらず観察された。

考 察

蛔虫の顆粒画分での酸化的リン酸化については、Chin *et al.* (1954), Rathbone (1955), 大家ら (1961) の報告があるが、蛔虫筋においては基質以外に体腔液の存在が必要であつたり、酸化的リン酸化があつてもきわめて微弱であることなどを特長としている。かかる特長は蛔虫筋の嫌氣的呼吸に結びついた特異な面とも考えられるが、一方、蛔虫筋のように比較的固い組織よりの生理活性のよいミトコンドリアの調製の困難さによることも考えられる。そこで著者らは特に測定法上の要求もあり、まづ収量よくしかも生理活性の高いミトコンドリアを肺虫より得ることをもくろみ、その生理的 intactness の指標として呼吸調節率(R.C.)に基づいて調製法に検討を加えた。その結果、Fig. 1, Table 2 の結果に示すように、高等動物のミトコンドリアについての萩原の調製法に準じた細菌プロティナーゼを用いる Table 1 に示す過程で、以上の点が幾分とも満足させ得ることを知った。細菌プロティナーゼは高等動物の心筋や HeLa 細胞からのミトコンドリアの分離に従来用いられているが、肺虫のように寄生々活を営み、特異な組織を構成していると考えられるものに対してもそれが適用し得ることが判った点は興味深いものがある。しかしそれがプロティナーゼ本来の消化作用によるものか、あるいはアルブミンにみられるようなタンパク質の性質に由来する効果かについては現在のところ明確に判断しにくい。

pH とその呼吸活性は、Fig. 2 にみられるように、コハク酸を基質として肺虫ミトコンドリアは中性附近に最適条件を有することが観察された。このような傾向は、ピルビン酸を基質とした場合に高等動物よりのミトコンドリアにおいてもすでに Aldridge (1957) により報告されている。pH の変化にともなう呼吸率や呼吸調節能の

変動にかかわらず P/O 比は大体 1.8~2.1 の範囲の値が得られたことは、アルブミンの響影を受けやすい調製条件の比較的悪いミトコンドリアにおいてすら P/O 比が比較的の高いことなど、今回の実験において P/O 比が一般に理論値に近いかまたはやや高い傾向とあいつて、測定上の制約、例えば空気中から溶け込む O_2 の影響が特に呼吸率の小さい場合が大となることなどによるものかも知れない。

つぎに、この肺虫ミトコンドリアの大きな特長として ADP による呼吸をくり返すごとに呼吸調節率が上昇していく現象があげられる。このような現象は高等動物よりのミトコンドリアではみられず、わずかに HeLa 細胞について知られるのみである。HeLa 細胞においては小林ら(1962)は、これを培養細胞の一つの特性として報告しているが、寄生虫として特異な環境下に生息するブタ肺虫のような動物においてもこのような現象がみられる点は興味深いものがある。しかし HeLa 細胞の場合と異なり、肺虫ミトコンドリアにおいてはコハク酸呼吸に対する lag がなく、R.C. の上昇は P/O 比の上昇とも平行していない。またその R.C. の上昇は State 3 における呼吸の上昇よりも State 4 の呼吸が低下していくことに帰因している点も相異なる。調製時のミトコンドリアの損傷が高エネルギー化合物の生成過程に修復されることが、次第に呼吸調節率のよい性質となつてあらわれることも考えられるが、0.05%アルブミン処理においてもこのような傾向が保持されていることから必ずしもこれが原因とも考えられない。この点はさらに今後の検討を必要とする。

各種基質についての結果では、程度に差はあるが TCA サイクルの各メンバーが基質となり得ること、しかも理論値に大体相当する P/O 比の傾向がみられた。また、ピルビン酸を基質としては少量のリンゴ酸の添加がその呼吸率を増加することが観察されたことから、先に小澤(1950)の報告にあるように、肺虫においては TCA サイクルが主要な代謝経路として存在しており、しかもこれにつながる電子伝達系がエネルギー生成系として重要な位置を占めていることが示唆される。このことは阻害剤に対する態度にもみられ、KCN, Antimycin A はこのミトコンドリアの State 3, State 4 の状態の呼吸をほとんど完全に阻害し、電子伝達系の阻害を示し、2,4-DNP が呼吸を解放することからリン酸化系の高エネルギー中間物の水解を行うことが考えられる。これは小澤ら(1963)の報告のように、肺虫ミトコンドリアは高等動物

のそれに類似したきわめて発達した電子伝達系をなしているものと考えられる。ブタ肺虫に特異的なリン酸化系の存在については、蛔虫について報告されているように、体腔液の添加の問題やコハク酸による阻害、2,4-DNP の濃度によるリン酸化の態度の相異などは認められず、さらに各種の阻害剤に対する態度を検索していない現状では不明である。

以上に得られた知見より、蛔虫で Seidman *et al.* (1961)、大保(1963)の報告にあるような嫌気的なエネルギー生成系という特異な面とは対照的に、肺虫にとつてはよく発達した電子伝達系に連なるリン酸化反応が主要なエネルギー生成系をなしているものと推測して差し支えないものと考えられる。

総 括

1) ブタ肺虫よりのミトコンドリアの調製について 2~3 の検討を加えた結果、1 mM トリス-(ヒドロキシメチル)-アミノメタンを含有する萩原の調製液を用い、機械的磨砕とともに細菌プロティナーゼ処理を併用することにより比較的の高い呼吸調節を示すミトコンドリアが得られることが判つた。

2) このようにして得られた肺虫ミトコンドリアは次のような性能を有することが判明した。

i) 肺虫ミトコンドリアの呼吸活性および呼吸調節能は、コハク酸を基質として、その最適 pH を中性附近に有する。

ii) 呼吸基質として、コハク酸、リンゴ酸、 α -ケトグルタル酸、ピルビン酸、クエン酸、グルタミン酸を用いて酸化的リン酸化を示すが、コハク酸を基質とした場合にその呼吸活性は最大である。

iii) 高等動物のミトコンドリアと異なり、ADP による呼吸をくり返すことにより呼吸調節率は漸次増加し、この増加は P/O 比とは平行せず、主に State 4 における呼吸の減少に帰因する。

iv) 10^{-3} M KCN, 0.67/ml Antimycin A は肺虫ミトコンドリアの State 3, State 4 の呼吸をともにほとんど完全に阻害し、また、 10^{-4} M 2,4-DNP は呼吸の解放を行う。

稿を終えるに当り、虫体採集に御便宜を戴いた仙台市立中田屠場阿部克己技師をはじめ職員の方々に感謝の意を表します。

本論文要旨は、第 34 回日本寄生虫学会総会(昭和 40 年、東京)において発表した。

文 献

- 1) Aldridge, W. N. (1957) : Liver and brain mitochondria. *Biochem. J.* 67, 423-431.
- 2) Bock, R. M., Ling, N. S., Morell, S. A. and Lipton, S. H. (1956) : Ultraviolet absorption spectra of adenosin 5'-triphosphate and related 5'-ribonucleotides. *Arch. Biochim. Biophys.*, 62, 253-264.
- 3) Chance, B. and Williams, G. R. (1955) : Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. *J. Biol. Chem.*, 217, 383-451.
- 4) Chance, B. and Williams, G. R. (1956) : The respiratory chain and oxidative phosphorylation. *Adv. in Enzymology*, 17, 65-134.
- 5) Chin, C. H. and Bueding, E. (1954) : Occurrence of oxidative phosphorylation in the muscle of *Ascaris lumbricoides*. *Biochim. Biophys. Acta*, 13, 331-337.
- 6) Colowick, S. P. and Kaplan, N. O. (1957) : *Methods in Enzymology*, Vol. III. 450-451. Academic Press Inc., New York.
- 7) 萩原文二 (1961) : ミトコンドリアの呼吸調節. 酵素化学シンポジウム, 第15集, 312-321.
- 8) Hagihara, B. (1961) : Technique for the application of polarography to mitochondrial respiration. *Biochim. Biophys. Acta*, 46, 134-142.
- 9) 萩原文二・Conelly, J. L.・四釜慶治・押野礼子・奥貫一男 (1962) : 抗生物質のミトコンドリア呼吸系に対する作用. 酵素化学シンポジウム, 第17集, 58-66.
- 10) Hatefi, Y., Jurtschuk, P. and Havik, A. G. (1961) : Studies on the electron transport system. XXXII Respiratory control in beef heart mitochondria. *Arch. Biochim. Biophys.*, 94, 148-155.
- 11) Helinsk, D. R. and Cooper, C. C. (1960) : Studies on the action of bovine serum albumin on aged rat liver mitochondria. *J. Biol. Chem.*, 235, 3573-3579.
- 12) 石関忠一 (1962) : 豚肺虫駆虫薬 DL-Copper methionine に関する研究, 特に豚肺虫の呼吸におよぼす銅化合物の影響. *日獣医誌*, 23(6), 341-346.
- 13) 小林茂保・萩原文二・増住正明・奥貫一男 (1962) : HeLa 細胞からのミトコンドリアの調製と性質. 酵素化学シンポジウム, 第17集, 67-75.
- 14) 大例不二夫 (1963) : 蛔虫筋の代謝, *生化学*. 35, 687-701.
- 15) Ohnishi, T. and Hagihara, B. (1964) : Preparation of yeast mitochondria by an enzymatic procedure. *J. Biochem.*, 56, 484-486.
- 16) 大家裕・林久子 (1961) : 蛔虫筋におけるリンゴ酸の代謝一顆粒分画による 燐酸化反応 (I). *寄生虫誌*, 10, 453.
- 17) 小澤光 (1960) : 豚肺虫駆虫薬の研究, DL-メチオニン銅の創製とその作用機序. *日本大学創立70周年記念論文集*. 4, 585-603.
- 18) 小澤光・福島英明 (1963) : 肺虫駆虫薬 Copper DL-methionine の作用機序, プタ肺虫の電子伝達系の解明とそれに及ぼす Cu^{2+} の影響. *寄生虫誌*, 12(2), 136-141.
- 19) 小澤光・佐藤正・早坂弘子 (1964) : 豚肺虫駆虫薬 Copper DL-methionine の作用機序, プタ肺虫雌雄の呼吸ならびにN代謝の比較とそれにおよぼす Cu^{2+} の影響, *寄生虫誌*, 13, 397-402.
- 20) Rathbone, L. (1955) : Oxidative metabolism in *Ascaris lumbricoides* from pig. *Biochem. J.*, 61, 574-579.
- 21) Seidman, I. and Entner, N. (1961) : Oxidative enzymes and their roles in phosphorylation in sarcosomes of adult *Ascaris lumbricoides*. *J. Biol. Chem.*, 236, 915-919.

STUDIES ON THE OXIDATIVE PHOSPHORYLATION IN MITOCHONDRIA
FROM SWINE LUNG WORMS, *METASTRONGYLUS ELONGATUS*
— ON THE PREPARATION OF MITOCHONDRIA AND
CHARACTERISTICS OF THEM —

HIKARU OZAWA & MASASHI SATO

(*Department of Chemical Pharmacology, Tohoku University
School of Medicine, Sendai, Japan*)

1) Several experiments on the preparative procedure of mitochondria from swine lung worms have been carried out. The enzymatic treatment with a bacterial proteinase gave favourable mitochondria, which showed respiratory control property.

2) The following conclusions were obtained by the studies with these mitochondria.

(1) These mitochondria showed the maximal respiratory activity at about pH 7.0 with succinate as substrate.

(2) Succinate, malate, α -ketoglutarate, pyruvate, citrate, and glutamate were useful as substrate for the oxidative phosphorylation. Above all, they showed the maximal respiratory activity with succinate as substrate.

(3) Comparing with mitochondria from higher animals, the repetition of the respiration of lung worm mitochondria with ADP raised their respiratory control ratio progressively. However, this increase of the ratio did not always parallel with P/O ratio, but it resulted mainly from the decrease of the respiration wherein ADP was expended.

(4) Both 10^{-3} M KCN and 0.6 μ /ml antimycin A inhibited almost completely the respiration of lung worm mitochondria at State 3 as well as at State 4, and uncoupling was observed by 10^{-4} M 2,4-DNP.