

# ブタ肺虫ミトコンドリアの酸化的リン酸化機構の検討

—各種の阻害剤の影響ならびに顕微分光  
測定によるチトクロム系の検索—

小 澤 光 佐 藤 正

東北大学医学部薬品作用学教室

(1966 年 7 月 1 日 受領)

## 緒 言

寄生虫の特異的代謝の検索は比較生化学的観点からのみならず、駆虫薬の作用機序の解明や更に新しい駆虫薬創製のためにも重要である。小澤(1960)、小澤ら(1961, 1963, 1964)はブタ肺虫の代謝について一連の検索を進めて来たが、更に肺虫の好気性に注目し酸化的リン酸化機構の解明を試み、前報(1965)において肺虫ミトコンドリアが TCA サイクルのそれぞれのメンバーを基質として、その程度に差はありながらも酸化的リン酸化を示すことを明らかにした。今回はそれに引き続き酸化的リン酸化機構解明の一環として、各種の阻害剤の影響を見るとともに、チトクロム成分についても若干の検索を行ない、阻害剤に対する態度から肺虫ミトコンドリアにおいても高等動物類似の酸化的リン酸化機構の存在することが明らかとなつたが、チトクロム成分の検索からは電子伝達系因子にやや特異な点が存在することが推定されたのでその結果について報告する。

## 実験方法および材料

### 1. 実験材料

ブタ肺虫は仙台市立中田屠場で入手し、屠殺直後の肺虫寄生部位の臓器を実験室に持ち運び、臓器より虫体を採集した。雌個体のみを選別し、充分に 0.9% NaCl 液およびミトコンドリア調製液で洗滌の後実験に供した。なおミトコンドリア調製液は前報同様 0.21 M マンニトール、0.07 M シュクローズ、0.1 mM EDTA および 1 mM トリシュー(ヒドロキシメチル)ーアミノメタンを含む液である。

### 2. 実験方法

ミトコンドリアの調製は前報(1965)に従つたが、今

回は細菌プロテイナーゼによる酵素処理をやめ、機械的磨砕のみによる方法で調製した。

酸素消費は一部ワールブルグ検圧計をも併用したが、主に自記呼吸酸素測定装置 PO-100 型(柳本製作所)を用いて測定した。反応液の組成は 0.3 M mannitol, 10 mM KCl, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM K-phosphate buffer pH 7.2, 0.2 mM EDTA を含む液であり、Pi-free medium としては K-phosphate buffer の代りに 10 mM Tris-HCl buffer pH 7.2 を含む液を用いた。実験温度は 25°C とし、反応液中の溶存酸素量は前報同様 Chance *et al.*(1955)にならい 240 μM O<sub>2</sub> とした。

試薬は主に市販品を用い、遊離酸の場合は中和して使用した。ヘキシルグアニジンは当教室で合成されたものを、ADP Na 塩は Sigma 化学(純度 98%~96%)のを用い、Antimycin A は協和醸酵のものをエタノールに溶解して用いた。Carbonyl cyanide phenylhydrazone (CCP: 東神合成 KK)は K 塩として溶解後 HCl で中和して用いた。

ミトコンドリアのチトクロム成分の検索はライツ製直視顕微分光器によつたが、還元剤として少量の Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub> を添加した。

ミトコンドリアのタンパク量はウシ血清アルブミンを標準としてビュレット法によつたが、試料の混濁を除くためエーテル処理を行なう方法に従つた。

## 実験結果

### 1. 呼吸基質の選定

前報(1965)にあるように、肺虫ミトコンドリアは TCA サイクルの諸基質のうち特にコハク酸を基質としてその呼吸活性が大であるがその他の基質ではリンゴ酸や α-ケトグルタル酸でもせいぜいその 1/3 の呼吸活性

Table 1 Stimulating effect of pyruvate on malate oxidation in lung worm mitochondria

Concentration of substrates (mM)		Rate of respiration $\mu\text{M O}_2/\text{min.}$		Respiratory control ratio
pyruvate	malate	state 3	state 4	
0	4.0	17.6	6.0	2.9
0.2	4.0	20.3	5.9	3.4
2.0	4.0	28.0	6.3	4.4
8.0	4.0	25.1	6.0	4.2
10.0	4.0	26.0	5.2	5.0
0	succinate 4.0	50.0	15.0	3.3

The reaction system contained 0.3 M mannitol, 10 mM KCl, 10 mM K-phosphate buffer solution, pH 7.2, 2.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.2 mM EDTA and substrates as indicated above. Mitochondrial protein was 1.88 mg/ml, and the total volume was 2.5 ml. As a phosphate acceptor 254  $\mu\text{M}$  ADP or 203  $\mu\text{M}$  ADP was used at state 3 respiration. Temperature of the reaction was 25°C.

を示すに過ぎない。また NADH を基質としてはほとんど酸素消費が認められない。一方、ピルビン酸の酸化に際してリンゴ酸添加が促進効果をもたらすことから、NAD-linked substrate の代表として、逆にリンゴ酸に少量のピルビン酸添加を考えそのためのピルビン酸の至適濃度の決定を行なった。その結果 Table 1 に見られるように 4 mM リンゴ酸に対しピルビン酸 2 mM 添加でその呼吸促進効果は飽和となり、ADP 存在下の呼吸 (state 3 呼吸) で約 60% の呼吸増加が認められた。そこで以下の実験では、4 mM コハク酸と NAD-linked substrate の代表として 4 mM リンゴ酸+2 mM ピルビン酸の 2 種類を呼吸基質として用いている。

## 2. 阻害剤の影響

Lehninger(1964) は酸化的リン酸化の阻害剤をその作用様式から電子伝達系阻害剤、脱共役剤、リン酸化系阻害剤の 3 種に分類している。萩原ら (1962) は酸素電極法で、この 3 種の阻害剤がそれぞれ示す特徴的な阻害型式を明らかにしている。そこで肺虫ミトコンドリアについて上記の基準に従い、代表的な阻害剤による影響を検討した。

### (1) 電子伝達系阻害剤の影響

(i) KCN (HCl 中和) は Fig. 1 に見られるように  $2 \times 10^{-4}\text{M}$  の濃度で、コハク酸、リンゴ酸(+ピルビン酸)の両基質においてともに、ADP 無添加の呼吸 (state 4 呼吸) をほとんど完全に阻害する。state 3 呼吸にも同様な阻害を示しその作用は電子伝達系阻害にあることは明らかである。なお、ワールブルグ検圧計でも同様な結果を得ている。

(ii) Antimycin A は 0.2  $\gamma/\text{ml}$  の濃度で Fig. 2 に見

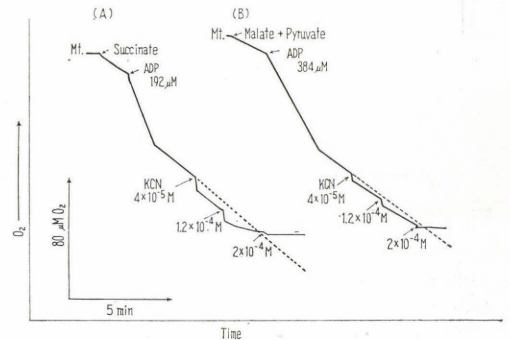


Fig. 1 Polarographic traces showing the effects of KCN

(A): the reaction system contained 0.3 M mannitol, 10 mM KCl, 10 mM K-phosphate buffer solution, pH 7.2, 2.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.2 mM EDTA and 4 mM succinate as a respiratory substrate. 0.2 ml mitochondrial suspension was added and the total volume was 2.5 ml.

(B): the reaction system was the same as A, except 4 mM malate and 2 mM pyruvate as respiratory substrates, and 0.3 ml mitochondrial suspension were used. Temperature of the reaction was 25°C. When KCN was absent, traces are shown by broken lines.

られるようにリンゴ酸(+ピルビン酸)を基質としての state 4 呼吸はほとんど完全に阻害するが、コハク酸を基質としてはその阻害は 70~80% で一部 Antimycin A 不感受性の呼吸を残すと思われる。これは Antimycin A を 4  $\gamma/\text{ml}$  に増加しても同様である。state 3 呼吸は両基質ともほとんど完全な阻害が認められる。

(iii) Amytal (Na 塩) は 3.2 mM の濃度で Fig. 3 に

Table 2 Summary of the inhibition of mitochondrial respiration by various inhibitors of the electron transport system

Substrate	Respiration	Inhibition (%)		
		Amytal 3.2 mM	Antimycin A 0.2 $\gamma$ /ml	KCN 0.4 mM
succinate	state 4	0	76	>90
	state 3	35	90	>90
malate + pyruvate	state 4	70	>90	>90
	state 3	89	>90	>90

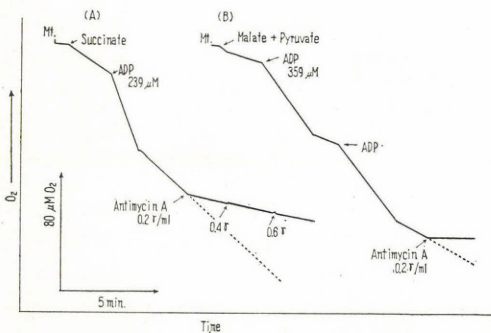


Fig. 2 Polarographic traces showing the effects of Antimycin A

The reaction system was the same as shown in Fig. 1. (A): 4 mM succinate as a respiratory substrate, and 239  $\mu$ M ADP as a phosphate acceptor. (B): 4 mM malate and 2 mM pyruvate as respiratory substrates, and 359  $\mu$ M ADP as a phosphate acceptor. When Antimycin A was absent, traces are shown by broken lines.

見られるようにリンゴ酸 (+ピルビン酸) を基質としては state 3, state 4 呼吸ともに阻害を示すが, コハク酸を基質としては state 4 呼吸の阻害はなく, わずかに state 3 呼吸の阻害が認められるに過ぎない。

以上 3 種の阻害剤の阻害効果は Table 2 にまとめられるが, これからコハク酸を基質としての一部 Antimycin A 不感受性な点を除けば, 高等動物ミトコンドリアに大体類似する電子伝達系が働いているものと考えられる。

### (2) 脱共役剤の影響

脱共役剤として 2,4-DNP および carbonyl cyanid phenylhydrazone (CCP) の 2 種を用いたが, コハク酸, リンゴ酸 (+ピルビン酸) の両基質において state 4 呼吸の解放を示し, これらが肺虫ミトコンドリアにおいても脱共役作用を示すことがわかった。Fig. 4 に見られるように 2,4-DNP はその濃度とともに呼吸解放の程度は

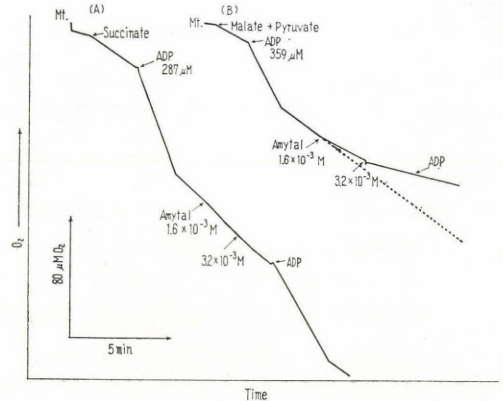


Fig. 3 Polarographic traces showing the effects of Amytal

The reaction system was the same as shown in Fig. 1. (A): 4 mM succinate as a respiratory substrate, and 287  $\mu$ M ADP as a phosphate acceptor. (B): 4 mM malate and 2 mM pyruvate as respiratory substrates, and 359  $\mu$ M ADP as a phosphate acceptor. When Amytal was absent, traces are shown by broken line.

増加するが, その至適濃度は約  $4 \times 10^{-6}$  M であり, それ以上の濃度ではかえって呼吸解放の程度は減少する。またその解放の程度は state 3 呼吸よりやや大である。CCP では至適濃度は  $4 \times 10^{-6}$  M で DNP より 10 倍ぐらい作用が強い。また 2,4-DNP の作用は Fig. 5 に見られるように Pi の存否に関わらない。

### (3) リン酸化系阻害剤の影響

ヘキシルゲアニジンは  $10^{-4}$  M order の濃度で Fig. 6 に見られるように, 両基質ともに state 4 呼吸に影響なく state 3 呼吸のみを特異的に阻害する。その阻害効果はリンゴ酸 (+ピルビン酸) を基質とした場合がコハク酸を基質とした場合より大であり, 前者では 50% 阻害濃度 ( $I_{50}$ ) は  $5 \times 10^{-4}$  M であり, 後者では  $9 \times 10^{-4}$  M である。また, この阻害効果は 2,4-DNP で解放される。

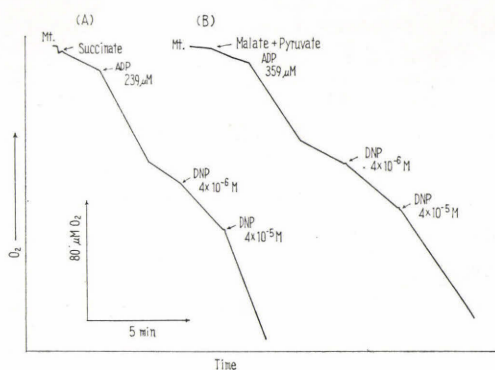


Fig. 4 Polarographic traces showing the effects of 2,4-DNP.

The reaction system was the same as shown in Fig. 1. (A): 4 mM succinate as a respiratory substrate and 239  $\mu\text{M}$  ADP as a phosphate acceptor. (B): 4 mM malate and 2 mM pyruvate as respiratory substrates, and 359  $\mu\text{M}$  ADP as a phosphate acceptor.

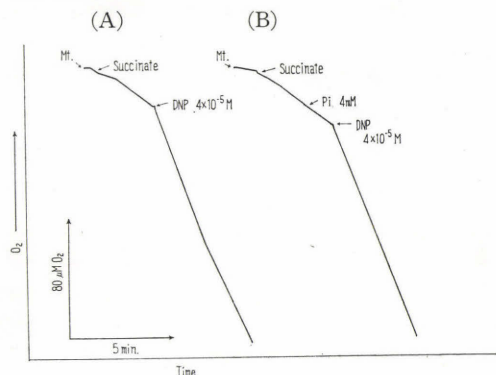


Fig. 5 Polarographic traces showing the effects of 2,4-DNP in the presence and absence of phosphate

(A): the reaction system contained 0.3 M mannitol, 10 mM KCl, 10 mM Tris-HCl buffer solution, pH 7.2, 2.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.2 mM EDTA, and 4 mM succinate as a respiratory substrate. Mitochondrial suspension 0.2 ml and total volume 2.5 ml.

(B): 4 mM K-phosphate buffer solution, pH 7.2, was used as a source of phosphate.

### 3. チトクロム成分の検索

肺虫ミトコンドリアの電子伝達系因子について検索するため、チトクロム系について高等動物の場合と比較を試みた。試料の混濁のため、比較的簡便な直視型顕微分光器を用いたが、対照としてラット肝ミトコンドリアを

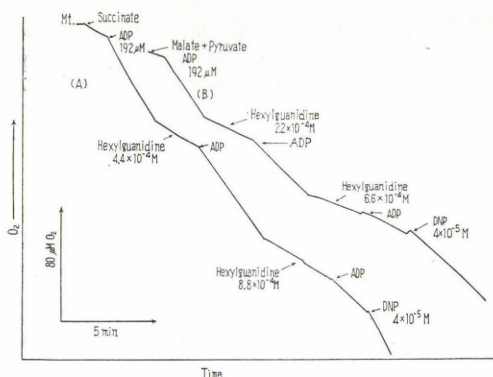


Fig. 6 Polarographic traces showing the effects of hexylguanidine.

The reaction system was the same as shown in Fig. 1. (A): 4 mM succinate as a respiratory substrate, and 192  $\mu\text{M}$  ADP as a phosphate acceptor. (B): 4 mM malate and 2 mM pyruvate as respiratory substrates, and 192  $\mu\text{M}$  ADP as a phosphate acceptor.

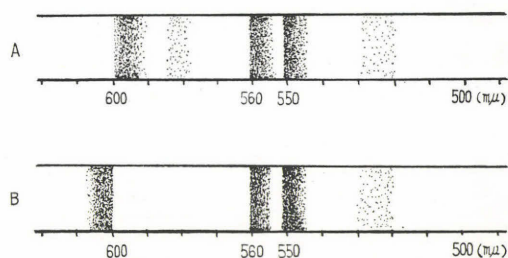


Fig. 7 Microspectroscopic observation of mitochondria

(A): lung worm mitochondria, (B): rat liver mitochondria. Small amount of  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  was added to the mitochondrial suspension. Determinations were carried out at room temperature.

用いた。Fig. 7 に見られるようにラット肝ミトコンドリアでは、c型、b型、a型チトクロムに相当する550  $\mu\text{m}$ 、560  $\mu\text{m}$  近傍および600~610  $\mu\text{m}$  の濃い3本の吸収帯や530  $\mu\text{m}$  附近のうすい吸収帯が観察されたが、肺虫ミトコンドリアにおいては上と同様な550  $\mu\text{m}$ 、560  $\mu\text{m}$  近傍の吸収帯の他に590~600  $\mu\text{m}$  附近の新たな吸収帯が観察されたが、aに基づくと考えられる600~610  $\mu\text{m}$  にかけての典型的な吸収帯は観察されなかった。

### 考察

実験に先立ち基質の選定を行ない、コハク酸の他に NAD-linked substrate としてリンゴ酸+ピルビン酸が

有効なことを明らかにした。先に小澤ら(1963)は肺虫の電子伝達系の検索に NADH を用いているが、今回のミトコンドリアでは NADH を基質としては呼吸活性が低く用いることが出来なかつた。Lehninger (1951), (1964)や Kobayashi et al(1966)は intact なミトコンドリアにおいては NADH の酸化にともなうリン酸化が認められないことを報告しているが、肺虫ミトコンドリアの上記の結果も、むしろその intactness を示すものと考えてよからう。

電子伝達系阻害剤として KCN, Antimycin A, Amytal の3種を用いたが、Amytal の阻害は NAD-linked substrate に特異的であつたが、コハク酸基質でも state 3 呼吸の阻害は一部あつた。Chance et al(1963)は Amytal が NADH<sub>2</sub> オキシダーゼ系のフラボプロテインに阻害を有することや、高濃度でリン酸化系阻害をも有することを明らかにしているが、肺虫における結果もこの機作で説明出来る。コハク酸を基質として Antimycin A 阻害に一部不感受な呼吸が残り、先の小澤ら(1963)の結果と一致した。阻害の完全な NAD-linked substrate の方が用いたミトコンドリア量の多いことから、これが内在呼吸に基づくとは考えられず、一部特殊な電子伝達の可能性はある。しかし、state 3 呼吸ではその阻害は顕著である。Antimycin A の作用部位は Estabrook(1958)の報告のように、チトクロム b-c、間にあると一般に認められており、肺虫ミトコンドリアにおいてもリン酸化に共役した電子伝達は同様なチトクロム系を通して行われるものと考えてさしつかえあるまい。KCN による阻害は両基質ともにほとんど完全であり、その作用はチトクロムオキシダーゼ阻害に基づくと考えられる。

CCP は Heytler et al (1962)により 2,4-DNP の約 10 倍強力な脱共役剤として報告されているが、肺虫ミトコンドリアでも同様な効果が見られた。2,4-DNP の作用が Pi の存否に関わらぬことは、高等動物ミトコンドリアについて考えられているように、その作用部位が Pi をとり込む前段階の未知の高エネルギー中間体にあるとする考え方で説明される。

Lardy et al(1958)による導入以来、Oligomycin は優れたリン酸化系阻害剤として広く用いられている。一方、グアニジン化合物も Oligomycin と同様な阻害効果を有することが Hollunger (1955)の報告以来、さらに Chappell(1963), Pressman(1963), Chance et al(1963)の詳細な検討で明らかになり、しかもグアニジン化合物は阻害部位に site 特異性をもつ点やや Oligomycin と

異なることが知られた。Chance et al (1963), Haas(1964)によればアルキルグアニジンの阻害部位はリン酸化の site 1, 特に NADH-fp site であるという。そこで、Oligomycin が入手困難なことから、ヘキシルグアニジンを用いてリン酸化系への影響を調べた。実験結果に見られるようにリン酸化系への阻害は明らかであり、NAD-linked substrate の方が I<sub>50</sub> 値の低いことから site 1 に優位に作用することがわかる。しかし、Guillory et al(1965)の高等動物を用いた結果に比べると、その site 1 への特異性は高等動物ミトコンドリアにおけるより低い。

ブタ肺虫のチトクロム系については村越ら (1965), (1966)の報告があり、チトクロム b, c の存在は確認しているが a は確認出来なかつたとしている。しかし、肺虫ホモジネートで弱いながらチトクロム c オキシダーゼ活性を認めている。前述のような肺虫ミトコンドリアの阻害剤に対する態度から、高等動物類似の電子伝達系ならびにリン酸化系が主として働くことが予想されたので、測定に用いた肺虫ミトコンドリアについて直接チトクロム成分の検索を試みた。Shappirio et al (1957)は顕微分光器により昆虫組織のチトクロム成分の同定を行っているが、顕微分光器は濁りのある試料にも適用出来る長所を有する。対照として用いたラット肝ミトコンドリアではチトクロム a, b, c による典型的な吸収帯が観察されたが、肺虫ミトコンドリアでは b, c による吸収帯が明らかであるが a に相当する吸収帯が観察されず村越ら(1965), (1966)の結果と一致する。しかし、やや低波長にづれた新しい吸収帯が観察された。KCN による阻害やチトクロム c オキシダーゼ活性の存在から、この新しい吸収帯を示すものが末端酸化に重要な役割を果すことも推測されるが、この点は更に詳細な検討を要する。

## 総括

ブタ肺虫ミトコンドリアの酸化的リン酸化に及ぼす各種阻害剤の影響を調べるとともに、ミトコンドリアの顕微分光測定を行ない下記の諸結果が得られた。

1)  $4 \times 10^{-4}$  MKCN はコハク酸酸化および NAD-linked substrate (リンゴ酸+ピリビン酸)の酸化をとともにほとんど完全に阻害する。

2) 0.2  $\gamma$ /ml Antimycin A は NAD-linked substrate の酸化をほとんど完全に阻害するが、コハク酸酸化の阻害は 4  $\gamma$ /ml でも完全でなく、その電子伝達は一部

Antimycin A 不感受な部分をもつ。

3) 3.2 mM Amytal は NAD-linked substrate の酸化は阻害するが、コハク酸の酸化は state 3 呼吸においてのみ若干の阻害を示す。

4)  $4 \times 10^{-5}$  M 2,4-DNP,  $4 \times 10^{-6}$  M CCP は state 4 呼吸の解放を行ない脱共役作用を示すが、この作用は Pi の存否に関わらない。

5) ヘキシルグアニジンには state 4 呼吸には影響なく state 3 呼吸のみを阻害するが、その 50% 阻害濃度は NAD-linked substrate で  $5 \times 10^{-4}$  M, コハク酸を基質としては  $9 \times 10^{-4}$  M であり、主としてリン酸化の site 1 阻害を示す。

6) 肺虫ミトコンドリアの顕微分光測定によりチトクロム b, c の存在が確認されたが a は確認されなかつた。一方、590~600 m $\mu$  に吸収帯を示す未知の因子の存在が認められた。

稿を終えるに当たり、虫体採集に御便宜を戴いた仙台市立中田屠場の職員の方々ならびに、ヘキシルグアニジンを合成して戴いた当教室の岩月和彦氏に感謝の意を表します。

本論文要旨は第 35 回日本寄生虫学会総会 (昭和 41 年新潟) において発表した。

## 文 献

- Chance, B. & Williams, G. R. (1955) : Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. *J. Biol. Chem.*, 217, 383-451.
- Chance, B. & Hollunger, G. (1963) : Inhibition of electron and energy transfer in mitochondria I. Effects of Amytal, thiopental, rotenone, progesterone, and methyleneglycol. *J. Biol. Chem.*, 238, 418-431.
- Chance, B. & Hollunger, G. (1963) : Inhibition of electron and energy transfer in mitochondria II. The site and mechanism of guanidine action. *J. Biol. Chem.*, 238, 432-438.
- Chappell, J. B. (1963) : The effect of alkylguanidines on mitochondrial metabolism. *J. Biol. Chem.*, 238, 410-417.
- Colowick, S. P. & Kaplan, N. O. (1957) : *Methods in Enzymology*, Vol. III. 450-451. Academic Press Inc., New York.
- Estabrook R. W. (1958) : The spectral and enzymatic characterization of cytochrome c<sub>1</sub> of liver mitochondria. *J. Biol. Chem.*, 230, 735-750.
- Guillory, R. J. & Slater, E. C. (1965) : The action of substituted guanidines on mitochondrial respiration and on the ADP-ATP exchange reaction. *Biochim. Biophys. Acta*, 105, 221-232.
- Haas, D. W. (1964) : Phosphorylation coupled to the oxidation of NADH by fumerate in digitonin fragments of beef-heart mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta*, 92, 433-439.
- 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, 17, 58-66.
- Heytler, P. G. & Prichard, W. W. (1962) : A new class of uncoupling agents carbonyl cyanide phenylhydrazones. *Biochem. Biophys. Research Commun.*, 7(4), 272-275.
- Kobayashi, S., Hagihara, B., Masuzumi, M. & Okunuki, K. (1966) : Preparation and properties of mitochondria from mammalian cells cultured in vitro. *Biochim. Biophys. Acta*, 113, 421-437.
- Lardy, H. A., Johnson, D. & McMurray, W. C. (1958) : Antibiotics as tools for metabolic studies. I. A survey on toxic antibiotics in respiratory, phosphorylative and glycolytic systems. *Archives of Biochem. Biophys.*, 78, 587-597.
- Lehninger, A. L. (1951) : Phosphorylation coupled to oxidation of dehydrodiphosphopyridine nucleotide. *J. Biol. Chem.*, 190, 345-359.
- Lehninger, A. L. (1964) : The mitochondrial molecular basis of structure and function. W. A. Benjamin, Inc., New York & Amsterdam.
- 村越善衛・新村宗敏 (1965) : 豚肺虫の物質代謝 (3) 肺虫の呼吸系に関する研究 (II) チトクロムについて. *寄生虫誌*, 14(4), 349.
- 村越善衛・新村宗敏 (1966) : 寄生虫の代謝 (IV) 肺虫の糖質代謝およびチトクロム a. 第 35 回日本寄生虫学会総会 (新潟), 要旨.
- 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.
- 小澤光・村越善衛・新村宗敏 (1961) : ブタ肺虫 (*Metastrongylus elongatus*) の物質代謝に関する研究 (1), 含窒素化合物の代謝経路について. *薬学雑誌*, 81(12) : 1774-1782.
- 小澤光・福島英明 (1963) : 肺虫駆虫薬 Copper DL-methionine の作用機序, ブタ肺虫の電子伝達系の解明とそれに及ぼす Cu<sup>#</sup> の影響. *寄生虫誌*, 12(2), 136-141.
- 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, ブタ肺虫雌雄の呼吸ならびに N 代謝の比較とそれによぼす Cu<sup>#</sup> の影響. *寄生虫誌*, 13(5), 397-402.
- 小澤光・佐藤正 (1965) : ブタ肺虫ミトコンドリア

アの酸化的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. 寄生虫誌, 14(6), 513-519.

- 22) Pressman, B. C. (1963) : The effects of guanidine and alkylguanidines on the energy transfer reactions of mitochondria. *J. Biol. Chem.*,

238, 401-409.

- 23) Shappiro, D. G. & Williams, C. M. (1957) : The cytochrome system of the cecropia silkworm I. Spectroscopic studies of individual tissues. *Proc. Roy. Soc. (L) B.*, 147, 218-232.

## Abstract

### STUDIES ON THE OXIDATIVE PHOSPHORYLATION IN MITOCHONDRIA FROM SWINE LUNG WORMS, *METASTRONGYLUS ELONGATUS* —EFFECTS OF INHIBITORS AND THE DETERMINATION OF CYTOCHROMES IN MITOCHONDRIA BY THE SPECTROSCOPIC METHOD—

HIKARU OZAWA & MASASHI SATO

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

1. Effects of inhibitors on the oxidative phosphorylation of lung worm mitochondria were studied, and the following results were obtained.

i) When malate and pyruvate were used as substrates,  $4 \times 10^{-4}$  M KCN, 0.2  $\gamma$ /ml Antimycin A, and 3.2 mM Amytal inhibited the mitochondrial respiration at state 4 as well as at state 3, suggesting that they effected the electron transport chains respectively. With succinate as a substrate, on the other hand, Amytal did not inhibit the mitochondrial respiration at state 4, and moreover, the inhibition by 4  $\gamma$ /ml Antimycin A was not complete, suggesting that the electron was partially transported through some Antimycin A insensitive routes.

ii)  $4 \times 10^{-5}$  M 2,4-DNP, and  $4 \times 10^{-6}$  M CCP released the mitochondrial respiration at state 4, and uncoupled the phosphorylation. Their actions did not depend upon the presence of phosphate.

iii) Hexylguanidine inhibited the mitochondrial respiration at state 3, but not at state 4.  $I_{50}$  value was  $5 \times 10^{-4}$  M with malate and pyruvate as substrates, and  $9 \times 10^{-4}$  M with succinate as a substrate, suggesting its effect on site 1. of phosphorylation.

2. Spectroscopic method of lung worm mitochondria led to the following results.

Absorption bands at about 550  $m\mu$  of cytochrome c and at about 560  $m\mu$  of cytochrome b were observed, but that at about 605  $m\mu$  of cytochrome a was not. However, in the place of the absorption band of cytochrome a, a new band was observed at a rather much shorter wave length, 590-600  $m\mu$ .