

Trichomonas vaginalis の脱水素酵素に関する 生化学的研究

田 中 耕 誠

慶応義塾大学医学部寄生虫学教室

(昭和46年3月23日 受領)

緒 言

著者は前報(田中, 1970)に於いて *Trichomonas vaginalis* (以下 T.v. と略す) のエネルギー代謝の研究の発端として、いわゆる TCA-cycle 上の脱水素酵素 succinate dehydrogenase (SDH), malate dehydrogenase (MDH), isocitrate dehydrogenase (ICDH) の光顕的細胞化学所見について述べた。

その結果 MDH は高度の活性を認め得たが、SDH は弱い活性を示すのみであり、また ICDH の場合は明確な活性の存在を証明し得なかつた。従来、T.v. にはミトコンドリアが存在せず TCA-cycle 上の各酵素の中では MDH が例外的に強い活性を示すが、他は余り活性が高くないと言われている。著者は前報の継続として T.v. 虫体内に於けるエネルギー代謝を究明し、ひいては一般細胞のミトコンドリアに相当する部位およびその実際上の機能の探求を目的として、本報に於いては MDH, SDH, および LDH 活性を生化学的に追求し、これらの中最も強い活性を示した MDH について T.v. 虫体内局在あるいはその性質を明らかにせんとした。

実験材料および実験方法

実験 1. 完全虫体と破碎虫体による脱水素酵素反応
当教室で所謂浅見培地(Asami, 1952)で250代余り無菌的に継代培養せる T.v. 保存株を用い寒天を除いた浅見培地(三角コルベン法)で無菌的に48時間培養した運動活発な虫体を多数集獲して材料とした。培地の組成から寒天を除いた理由は、後に虫体を集獲するとき寒天があると濃厚に虫体を集められなくなるためである。運動活発な虫体を冷却下で遠沈集獲し、集めた虫体を滅菌生理食塩水にて3,000 rpm で10分間毎3回遠沈洗滌を行ない、次いで0.85% NaCl 加 $1/15$ M phosphate buffer

(P.B.S.) (pH 7.6) にて1回最終洗滌を行なつた。なおこの材料の一部をチオグリコレート培地に接種して無菌的であることを確めた。この虫体を前記の $1/15$ M P.B.S. (pH 7.6) で必要な細胞濃度 (4×10^7 /ml ~ 12×10^7 /ml) にうすめた虫体浮遊液を完全細胞の試料液とした。また破碎細胞の試料液としては、上記の所定濃度の虫体浮遊液を久保田製作所製音波発生装置(KMS-100)のソナー管に入れ、冷却下にて100 V, 100 mA で2分間破碎したものをを用いた。一方破碎方法を変えて同じ虫体浮遊液をガラスホモジナイザーを用いて冷却下にて2分間破碎し顕微鏡下でほぼ完全に破碎されていることを確めたのちこれをも試料液とした。

酵素反応は Thunberg 管法(赤堀, 1964)により反応系に水素受容体として triphenyl tetrazolium chloride (TTC) を用いる、いわゆる TTC 法によつた。すなわち脱水素酵素反応により TTC を還元し不溶性の triphenyl formazan (赤色) を形成せしめ分光光度計を用いて $485 m\mu$ で比色した。反応系の組成は下記の通りである。

主室	{	$1/50$ M 基質液 ($1/15$ M. P.B.S. pH 7.6)	1.0 ml
		TTC (0.1%)	0.5 ml
		NAD (0.25%) *	0.5 ml
副室	{	試料液	0.5 ml
		$1/15$ M Phosphate Buffer (pH 7.6)	1.0 ml

基質液には sodium malate, sodium succinate, sodium lactate を用いてそれぞれ MDH, SDH, LDH 活性を測定した。

Thunberg 管の主室, 副室にそれぞれ上記内容の反応液を入れ、水銀柱2~3mmで5分間吸引して空気を排除し、37°C に5分間保つて温度を平衡してのち、副室の内容を主室へ移して良く攪拌して37°C 恒温水槽で30

* SDH の場合には除いた。

分間 incubate した。その後 10% トリクロル醋酸を 2 ml 加えて反応停止と除蛋白を行ない、2,000 r.p.m. で 5 分間遠沈して上清を分離し、Hitachi-Perkin-Elmer 139 型分光光度計によつて比色した。対照には反応系の基質液の代りに $1/15$ M phosphate buffer を加えたものをつた。

実験 2. 破碎虫体の遠心分画中の MDH 活性

—その 1. NAD を助酵素とした場合—

実験 1 と同様に培養、遠沈集穫、洗滌した T.v. 虫体を $1/15$ M phosphate buffer (pH 7.6) 中に細胞濃度 $8 \times 10^7/\text{ml} \sim 12 \times 10^7/\text{ml}$ となるように調製し、実験 1 と同じ方法で音波破碎およびガラスホモジナイザー破碎を行ない、これをそれぞれの whole homogenate とした。この半量を久保田製作所製万能冷却遠沈機 (KR-6 P 型) で遠沈分画を行ない、900×g 沈査 (Sed I), 24000×g 沈査 (Sed II) および上清 (Sup) に分け、沈査は上清と等量になるように $1/15$ M. P.B.S. にて懸濁しそれぞれを試料液とした。なおこれらの操作は全て $2^\circ \sim 4^\circ \text{C}$ の冷却下で行なつた。

酵素活性の測定法は実験 1 の場合と同様に Thunberg 管法により反応系に基質として $1/50$ M sodium malate, 水素受容体に TTC を用いてそれぞれの試料を反応させ、485 $m\mu$ の波長で吸光度を測定した。対照のとり方も実験 1 と同様である。

なお、虫体の破碎方法を音波発生装置による破碎とガラスホモジナイザーによる破碎との二通りを行なつた理由は、破碎法により虫体の破碎の程度が異なり、各遠心分画の構成成分にも相違が生じ、その為それぞれの分画中の MDH 活性の現われ方が両者の間で異なるかも知れないと思われたからである。

—その 2. NADH を助酵素とした場合—

前記実験 1 と同様、培養、遠心集穫、洗滌した T.v. 虫体を最後に Tris-HCl (pH 7.6) 緩衝液に虫体数が約 $8 \times 10^7/\text{ml} \sim 12 \times 10^7/\text{ml}$ となるように懸濁し、直ちに冷却下に於いてガラスホモジナイザーを用いて約 2 分間ゆるやかに homogenize し、鏡検してほとんどの虫体が破碎されていることを確認した後、その一部をとり whole homogenate として冷却下に保存し、残りを同様に冷却下において、700×g, 4,000×g, 12,000×g, 24,000×g と遠心分画し、各沈査を上清と同量の Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.6) を用いて懸濁し、そのそれぞれを試料液とした。

MDH は malate と oxalacetate との間の反応を NAD

を助酵素として可逆的に触媒するが、ここでは oxalacetate を基質として oxalacetate→malate の方向の反応を行なわせそれに伴い NADH が NAD に変化する際に起こる 340 $m\mu$ の吸光度の変化を Hitachi-Perkin-Elmer 139 型の分光光度計で連続的に追跡し、反応開始後 30～45 秒間の吸光度の差をもつて MDH 活性とする方法をとつた (Ochoa, 1955)。なお、反応は試料液を除いた反応液を予め 37°C に約 10 分間 preincubate しておき、分光光度計の光路 1.0 cm の cell にうつしかえ、直ちに各分画の一定量を加えて開始した。反応液組成は下記の通りである (Ochoa, 1955)。

oxalacetate	1 mg/ml (Tris-HCl pH 7.6)	0.2 ml
NADH	2 mg/ml (Tris-HCl pH 8.5)	0.2 ml
Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.6)		1.0 ml
蒸溜水		2.5 ml
試料液		0.1 ml

また 280 $m\mu$ にて蛋白濃度を測定する際は、各分画中の構成成分による散乱の影響を出来る限り少なくする為、whole-homogenate を 20 倍に稀釈したものの 0.5 ml にさらに 3.6 ml の蒸溜水を加えて検体とし、その他のものは 0.1 ml をとり、それに 4.0 ml の蒸溜水を加えて検体とした。

実験 3. T.v. 破碎虫体の遠心分画中の NADH の酸化活性

前記の実験 2—2 の場合と全く同様に調製した各分画を酵素液とし、下記組成の反応液を用いた。測定方法は実験 2—2 と全く同様である。

NADH	1 mg/ml (Tris-HCl pH 8.5)	0.2 ml
Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.6)		1.2 ml
蒸溜水		2.2 ml
試料液		0.1 ml

実験成績

1. T.v. の完全虫体と破碎虫体の脱水素酵素活性

それぞれの図表 (表 1～表 7) の数字は脱水素酵素活性の強さを分光光度計の吸光度の読みそのままで見わたしたものである。いずれも 3 回の読みの平均値をとつた。

MDH 活性については表 1 に示すように完全虫体でも対照に対して 3 倍～10 倍と言う強い活性を示したが、破碎虫体では音波破碎で対照の 10 倍以上、ガラスホモジナイザー破碎では対照の 30 倍以上とさらに強い活性を示し

Table 1 Activity of malate dehydrogenase in whole cells and disrupted cells of *T. vaginalis*

A) Sonicated cells					
Experimental series		Whole cells		Sonicated cells	
		experimental	control	experimental	control
A	No. of cells $8 \times 10^7/\text{ml}$	0.225	0.075	0.685	0.062
B	No. of cells $12 \times 10^7/\text{ml}$	0.370	0.110	1.290	0.130

B) Glass homogenized cells					
Experimental series		Whole cells		Glass homogenized cells	
		experimental	control	experimental	control
A	No. of cells $8 \times 10^7/\text{ml}$	0.195	0.014	0.590	0.020
B	No. of cells $12 \times 10^7/\text{ml}$	0.490	0.046	1.875	0.057

Figures in the table indicate optical density at $485\text{m}\mu$ in TTC method.

Substrate: Sod. malate

Coenzyme: NAD

Table 2 Activity of succinate dehydrogenase in whole cells and disrupted cells of *T. vaginalis*

A) Sonicated cells					
Experimental series		Whole cells		Sonicated cells	
		experimental	control	experimental	control
A	No. of cells $4 \times 10^7/\text{ml}$	0.016	0.013	0.030	0.018
B	No. of cells $8 \times 10^7/\text{ml}$	0.029	0.017	0.040	0.025

B) Glass homogenized cells					
Experimental series		Whole cells		Glass homogenized cells	
		experimental	control	experimental	control
A	No. of cells $4 \times 10^7/\text{ml}$	0.013	0.006	0.016	0.007
B	No. of cells $12 \times 10^7/\text{ml}$	0.125	0.045	0.205	0.050

Figures in the table indicate optical density at $485\text{m}\mu$ in TTC method.

Substrate: Sod. succinate

た。

SDH 活性は表 2 に示すように完全虫体では対照の 1.2 ~ 2.0 倍程度で MDH 活性に較べればはるかに弱く、破碎虫体に於いては音波破碎、ガラスホモジナイザー破碎共に完全虫体に較べればいくぶん高い活性を示したもの

の、対照の 1.5 ~ 2.0 倍程度でその活性値は低かった。以上より *T.v.* 虫体内には SDH 活性はあることはあるが余り強くないことが分った。

LDH 活性は完全虫体では対照の 6 ~ 7 倍、破碎虫体に於いては対照の 12 ~ 14 倍と可成強い活性を示した(表

Table 3 Activity of lactate dehydrogenase in whole cells and glass homogenized cells of *T. vaginalis*

Experimental series	Whole cells		Glass homogenized cells	
	experimental	control	experimental	control
A No. of cells $8 \times 10^7/\text{ml}$	0.203	0.035	0.712	0.050
B No. of cells $12 \times 10^7/\text{ml}$	0.265	0.045	0.670	0.050

Figures in the table indicate optical density at $485\text{m}\mu$ in TTC method.

Substrate: Sod. lactate

Coenzyme: NAD

Table 4 Comparison of activities of MDH, SDH and LDH in glass homogenized *T. vaginalis*

Experimental series		MDH	SDH	LDH	Control
A No. of cells $8 \times 10^7/\text{ml}$	whole cells	0.490	0.016	0.063	0.006
	homogenized cells	1.875	0.013	0.277	0.007
B No. of cells $12 \times 10^7/\text{ml}$	whole cells	0.880	0.125	0.265	0.045
	homogenized cells	1.900	0.205	0.670	0.050

Figures in the table indicate optical density at $485\text{m}\mu$ in TTC method.

Table 5 MDH activity estimated by reaction from malate to oxalacetate in centrifugal fractions of disrupted *T. vaginalis*

A) Sonicated cells

Experimental series		Whole homogenate	900 × g sediment	24,000 × g sediment	Supernatant
A No. of cells $12 \times 10^7/\text{ml}$	experimental	0.760	0.095	0.005	0.630
	control	0.082	0.007	0.001	0.050
B No. of cells $12 \times 10^7/\text{ml}$	experimental	0.740	0.020	0.000	0.340
	control	0.135	0.005	0.000	0.010

B) Glass-homogenized cells

Experimental series		Whole homogenate	900 × g sediment	24,000 × g sediment	Supernatant
A No. of cells $8 \times 10^7/\text{ml}$	experimental	0.590	0.078	0.012	0.118
	control	0.035	0.005	0.005	0.033
B No. of cells $12 \times 10^7/\text{ml}$	experimental	0.790	0.132	0.015	0.167
	control	0.170	0.015	0.012	0.070

Figures in the table indicate optical density at $485\text{m}\mu$ in TTC method.

Substrate: Sod. malate

Coenzyme: NAD

3).

次に MDH, SDH, LDH を同一材料により同時に反応させそれぞれの活性を比較した結果, 表 4 に示すように完全虫体, 破碎虫体共に MDH 活性が最も強く, 次

いで LDH 活性であり, SDH 活性はこの両者に較べてはるかに低かった。

なお基質を加えない対照群に於いても, ある程度の吸光度の変化を示したが, これは虫体自身の保有する

Table 6 MDH activity estimated by reaction from oxalacetate to malate in centrifugal fractions of glass homogenized *T. vaginalis*

	Whole homogenate	700 × g sed.	4,000 × g sed.	12,000 × g sed.	24,000 × g sed.	Sup.
MDH*	0.320	0.012	0.019	0.022	0.023	0.001
Protein**	0.500	0.339	0.239	0.135	0.164	0.270
MDH/Protein	0.640	0.035	0.080	0.163	0.140	0.004

* Figures indicate difference of 340m μ absorbance at 30 and 45 seconds after the initiation of reaction.

** Protein was measured at 280 m μ , and expressed by the absorbance.

Substrate: oxalacetate

Coenzyme: NADH

Table 7 Oxidation of NADH in centrifugal fractions of glass-homogenized *T. vaginalis*

	Whole homogenate	700 × g sed.	4,000 × g sed.	12,000 × g sed.	24,000 × g sed.	Sup.
Activity	0.028	0.002	0.007	0.001	0.001	0.028

Figures in the table indicate difference of 340 m μ absorbance at 30 and 45 seconds after the initiation of reaction.

endogenous substrate によるものと考えられる。またこの対照に於ける吸光度の値は完全虫体と破碎虫体との間に全く差は認めなかった。

2. 遠心分画中の MDH 活性

—その 1. NAD を助酵素とした場合—

表 5 に示すように遠心分画中に於ける MDH 活性の所在は音波破碎、ガラスホモジナイザー破碎共に上清にのみ強く認められ、900 × g 沈査、24,000 × g 沈査には全く認められなかつたかあつても痕跡程度であつた。

—その 2. NADH を助酵素とした場合—

結果は表 6 にその大要が示されている。表より直ちに判るごとく、前記の malate を基質とした場合は 24,000 × g 上清分画に大部分の活性が見られたが、oxalacetate を基質として行なつた本実験の場合、12,000 × g 沈査、24,000 × g 沈査に大部分の活性が認められている。また各分画の MDH 活性と蛋白量をとともにそれぞれの吸光度の比較から推定した比活性から見てもやはり 12,000 × g 沈査、24,000 × g 沈査に大部分の MDH 活性が集中していることが分る。

3. 各遠心分画の NADH の酸化活性

結果は表 7 に示す通りである。表より判るように NADH を Coenzyme とする MDH 活性の測定の場合と全く同じ条件で破碎、分画したものを酵素液として使用した訳であるが、12,000 × g 沈査、24,000 × g 沈査にはほとんど活性が見られず大部分の活性は 24,000 × g 上

清部分に現われている。

総括ならびに考按

従来 *Trichomonas vaginalis* の代謝機構に関する生化学的研究は Suzuoki and Ninomiya (1952) 以来数多く行なわれて来ている。またこれまでの研究では T.v. は嫌氣的発育性状を有し mitochondria を有しないとされている (Inoki *et al.*, 1959; Inoki *et al.*, 1961)。

しかしながらその後、Seama (1953), Wirtschafter (1956), Asami (1956), Read (1957), 河原 (1959), Kunitake *et al.* (1962), Wellerson and Kupferberg (1962), Schama and Borne (1963) 等により T.v. に於ける TCA 回路、Cytochrome 系などのいわゆるエネルギー代謝に関する研究が行なわれるようになり特に Baernstein (1961), 岡・尾崎 (1963 a, b) により、一般高等動物では mitochondria に存在する malate dehydrogenase 活性が mitochondria を有しないとされている T.v. に於いても非常に高いことが報告されている。また Hirtschaft and Mazia (1950) は原虫細胞の酵素活性分布は他の動物組織と可成異なることをアメーバを用いて最初に報告している。

著者は T.v. のエネルギー代謝の研究をすべく、mitochondria を有しないとされている *Trichomonas* に於いてその機能を有している部位はどこなのか、MDH その他の脱水素酵素の存在する所はどこなのか、

またそれらの酵素の生理的な機能を探求する為にその発端として第一報(田中, 1970)に於いては SDH, MDH, ICDH, LDH について光学顕微鏡レベルでの細胞化学的研究を行ない, その結果として MDH が極めて高い活性を有し, LDH がやや高度の活性, SDH が低い活性を有し, ICDH はほとんど活性のないことを証明した。

本報に於いては第一報の所見を生化学的に裏付け, さらに研究をすすめて音波破碎, ガラスホモジナイザー破碎などの方法によって T.v. 虫体の homogenate を作成し, それらの各種脱水素酵素活性を生化学的に測定し, 中でも最も強い活性を示した MDH については, T.v. の homogenate を遠心分画しそれぞれの MDH 活性を測定することによって MDH の細胞内局在を探索した。

得られた結果は前述の通りであるが, 完全虫体を用いた時よりも, 破碎虫体を用いた時の方が SDH, MDH, LDH 共に数倍強い活性を示した。完全細胞と無細胞液とが酵素活性に於いてしばしば相違することは Yudkin (1937), 岡 (1957) が細菌に於いて, 河原 (1957) が原虫に於いて報告している。この場合細胞の破碎により一連の系統下にある酵素が拡散稀釈されることは考慮すべきであるが (Young, 1929), 完全細胞で見なかつた活性が無細胞液で賦活される場合は少なくとも細胞表面構造特に細胞膜や細胞内小構造物の limiting membrane の影響を重視しなければならないと言われている (Oginisky, 1954)。これらのことから合わせ考えるに本実験で得られた結果は, これら脱水素酵素の T.v. 虫体内存在を確実にするとともに, これらの酵素が T.v. 虫体内に於いても, 一般好氣的細胞では大部分 mitochondria の外膜に存在すると言われているように何らかの plasma membrane 以外の limiting membrane によつてその活性の発現が規制されている可能性をも暗示するものと言えよう。また同一の homogenate を酵素液として比活性を調べた場合 MDH, LDH SDH の順に活性が低くなっているのは前報に於いて述べた光顕的細胞化学所見と一致している。

本報に於いて述べる実験に於いて最も強く著者の興味をひいたのは表5, 表6, 表7に示された事実より考えられる以下に述べる事柄である。これらは音波破碎またはガラスホモジナイザー破碎による T.v. homogenate をいろいろな遠心分画に分け, 各分画中の MDH 活性および NADH 酸化活性を比較した一連の実験である。な

おこの際 MDH を選んで実験を行なつたのは本酵素が T.v. のエネルギー代謝に特に重要な役割を演じていると思われたからであるが, 表5, 表6から判るように malate→oxalacetate の方向の反応を触媒する酵素とその逆反応にあずかるものが異なる分画中に現われている。表5は音波による T.v. 破碎液を遠心分画したものを酵素液として malate→oxalacetate の方向の反応をおこさせたものであるが, 一般好氣性細胞に於いては音波にて細胞を破壊すると mitochondria 外膜にゆるく結合して存在する T.C.A. 回路系の酵素, 特に MDH はほとんど可溶性分画に移行すると言われている (Green, 1965)。しかしながらこのことは必ずしも本来上清分画に MDH が存在しないと言うことを意味するものではない。

前述したように malate→oxalacetate, oxalacetate→malate の二方向の反応を行なう酵素がいずれも異なる分画にその活性が見られることは, 一般高等動物において mitochondria 分画と可溶性分画に MDH-isozyme が発見されたのと同様, T.v. 虫体中での MDH-isozyme の存在を暗示する。なお, T.v. には同じく malate を基質として酸化的脱炭酸を行なう malic enzyme も存在することが高等動物と同様 T.v. 虫体でも証明されているが, これは NADP を coenzyme とするもので, NAD 依存性のものではないとされている (Wellerson, 1962)。したがって著者が malate→oxalacetate の反応を見るのに用いた TTC 法の系にはほとんど影響を与えていないものと思われる。一方 oxalacetate→malate の方向の反応を測定した系は NADH を Coenzyme として含んでいる。従つてこの NADH が他の NADH 利用系に利用されている可能性が十分考えられる。事実, Baernstein (1961) は NADH の酸化酵素の活性が T.v. 虫体では可成高いことを見ている。しかしながら T.v. が嫌氣的生物である以上 NADH より Cytochrome に電子伝達が行なわれると言う一般高等動物に於ける mitochondria のような可能性, すなわち NADH dehydrogenase の存在は余り考えられず, NADH の酸化活性—NAD の再生系なのかも知れないが—がその大部分を占めているものと考えられる。

従つて oxalacetate→malate の反応系の中の NADH →NAD の変化による 340 m μ の absorbance の減少は oxalacetate→malate の変化に伴う NADH の酸化によるものと, 上述の NADH の酸化系による NADH→NAD の変化によるものの二つが考えられる。表7に示

したものは malate を除いた他は oxalacetate→malate の酵素活性を測定する場合と同一の反応液組成で T.v. homogenate の NADH 酸化の速度を測定したものである。材料作成も表 6 の場合と全く同じ方法で行なわれている。従つて NADH→NAD の変化による 340 m μ の吸光度の減少、すなわち見かけ上の MDH 活性が大部分 NADH の酸化によるものであるとすれば NADH の酸化活性は当然 12,000 \times g 沈査, 24,000 \times g 沈査に大部分出て来るはずである。ところが NADH の酸化活性は 24,000 \times g 上清分画に最も多く現われている。この実験事実より、著者が oxalacetate を基質として行つた MDH 活性の実験には NADH 酸化系の影響は極めて少ないものと言うことが出来る。

以上の実験事実より、24,000 \times g で沈澱する顆粒性分画には主として oxalacetate→malate の方向の反応を触媒する MDH が、24,000 \times g 上清分画には malate→oxalacetate の方向の反応を触媒する MDH が存在することが言えよう。しかしながら著者の行なつた分画方法は最高で 24,000 \times g、60 分であるので一般に肝細胞などで行なわれている microsome fraction が未だ上清分画に残っていることになる。従つて malate→oxalacetate の反応を行なう MDH が 24,000 \times g、60 分でも沈澱しない小構造物に存在する可能性も考える場合、厳密な意味での可溶性分画中にこの MDH が存在することは言えないかも知れないが、これを本原虫体内の MDH-isozyme と考えることは無理ではない。少なくとも従来 の電顕像に見られる膜性構造物はこの上清には含まれていないとしてよい。

岡ら (1966) は T.v. と近縁種の *T. foetus* をテフロンホモジナイザーで磨砕したものの遠心分画について、malate を基質とした MDH 活性の局在を検討し、13,000 \times g 沈査にこれを見出したとしている。しかし石英砂磨砕の場合は 144,000 \times g 上清部に MDH 活性を見出しており、著者の成績との不一致の部分は磨砕方法によるものと考えられる。

MDH-isozyme については、この数年種々の材料について種々の方法を用いて解析が行なわれて来た。Sophianopoulos and Vestlung (1960) は MDH について mitochondria 分画と可溶性分画に別々の isozyme が存在することを初めて報告した。また Kaplan (1963) によれば高等動物においては可溶性分画の MDH は電気泳動的に一個の pattern しか示さないが、mitochondria 分画の MDH は電気泳動で 4 個の pattern が現われ

ると述べている。また Kaplan and Ciotti (1961) は mitochondria 分画の MDH と可溶性分画の MDH それぞれについて基質に malate, oxalacetate を用いて Kinetics の研究を行い mitochondria 分画に存在する MDH は malate→oxalacetate の反応を行ない、可溶性分画の MDH は oxalacetate→malate の反応を行なうと結論づけている。従つて著者の本論文で述べた結果とは全く反対のことを示していることになる。また Kaplan (1963) はこの事実を mitochondria 膜に於ける malate と oxalacetate の transport に関連させて mitochondria での TCA-cycle の作動を説明している。

また Lardy *et al.* (1966) は MDH isozyme の作用を GOT isozyme との関連から Kaplan と同様に mitochondria 膜に於ける malate と oxalacetate の transport の差異によつて説明している。

著者の実験結果から T.v. 体内に於ける NAD, NADH 間の変換を MDH と関連させて考察すると次のようになる。すなわち 24,000 \times g 上清部分に於いては脱水素酵素反応、主として malate→oxalacetate の方向の反応によつて生じた NADH はそのまま NADH の酸化によつて NAD となつた上で再利用されるか、あるいは 12,000 \times g、24,000 \times g 沈査部分の顆粒性部分にとり込まれ oxalacetate→malate の反応によつて NAD となり、この NAD がまた 24,000 \times g の上清分画に入つて malate→oxalacetate の脱水素酵素反応に関与しているのではないかと思われる。

以上述べた 12,000 \times g、24,000 \times g 顆粒性分画には實際上 T.v. のどのような organella が集つているかは現在の所不明であり MDH の存在部位とともに形態的研究をまたねばならない。

さらに T.v. に於ける TCA-cycle の存在が確定されていない現在 (浅見, 1967) MDH が實際上 T.v. のエネルギー産生の上でいかなる機能を果しているかも依然として不明であり、高等動物と異つた isozyme 分布様式を持つであろうと言う意味からも T.v. の研究上大変興味ある問題である。そこで著者は T.v. の MDH-isozyme の分布ならびに電子顕微鏡的細胞化学的 pursuit も行なつたのでその結果については続報で報告する。

結 語

Trichomonas vaginalis の Dehydrogenase 活性について生化学的に pursuit を行なつた結果以下のようなことが分つた。

1. T.v. の完全虫体ならびに破碎液中に高度の malate dehydrogenase 活性, 中等度の lactate dehydrogenase 活性, 低い succinate dehydrogenase 活性を認めた.

2. 破碎虫体に於ける活性の方が, 完全虫体に於ける活性に較べて数倍強かつた.

3. 同一材料を用いて同時に測定した実験では MDH 活性が最も高く, 次いで LDH, SDH の順であつた.

4. T.v. homogenate の遠心分画中に於ける MDH 活性の所在を追求し, malate, oxalacetate を基質としてそれぞれ malate→oxalacetate, oxalacetate→malate の二方向の反応を調べた結果, 前者は $24,000 \times g$ の上清に後者は $12,000 \times g$ 沈査, $24,000 \times g$ 沈査に大部分の活性が集中していた. また NADH の酸化活性は $24,000 \times g$ の上清に最も強かつた.

稿を終るに当り, 御指導御校閲を賜つた恩師松林久吉教授並びに浅見敬三助教授に深甚の謝意を表し, あわせて御協力下さいました竹内助手初め本学寄生虫学教室の方々に感謝の意を表します.(本論文の要旨は第37回日本寄生虫学会総会並びに第28回日本寄生虫学会東日本支部大会で発表した.)

文 献

- 1) 赤堀二郎編(1964): 酵素研究法 I, II, III, IV 巻, 第9版, 朝倉書店, 東京.
- 2) Asami, K. (1952): Bacteria free cultivation of *Trichomonas vaginalis*. Kitasato Arch. of Exp. Med., 25, 149-156.
- 3) Asami, K. (1956): Physiological studies on *Trichomonas vaginalis*. Keio J. Med., 5, 169-190.
- 4) 浅見敬三(1967): わが国に於ける寄生虫の問題点: トリコモナス類—生理・生化学および構造機能との関連から—。医学のあゆみ, 61, 302-304.
- 5) Baernstein, H. D. (1961): Malic dehydrogenase in *Trichomonas vaginalis*. J. Parasit. 47, 279-284.
- 6) Green, D. E. (1965): An introduction to membrane biochemistry. Israel J. Med. Sci., 1, 1187-1200.
- 7) Hirtschaft, H. and Mazia, D. (1950): The nucleus-dependence of P^{32} uptake by the cell. Science, 112, 279-299.
- 8) Inoki, S., Ohno, M., Kondo, K., and Sakamoto, H. (1959): Observation of *Trichomonas vaginalis* by electron microscopy. Biken J., 2, 21-25.
- 9) Inoki, S., Ohno, M., Kondo, K., and Sakamoto, H. (1961): Electron microscopic observation on the "costa" as one of the organelles in *Trichomonas foetus*. Biken J., 4, 63-65.
- 10) Kaplan, N. O. and Ciotti, M. M. (1961): Evolution and differentiation of dehydrogenases. Ann. N. Y. Acad. Sci., 94, 701-722.
- 11) Kaplan, N. O. (1963): Symposium on multiple forms of enzymes and control mechanism. Bact. Rev., 27, 155-169.
- 12) 河原勉(1959): トリコモナスのカタラーゼ活性と培養条件についての比較研究. 阪大医誌, 11, 3643-3650.
- 13) Kunitake, G., Stitt, C. and Sallman, P. (1962): Terminal respiration in *Trichomonas vaginalis*. J. Protozool., 9, 371-373.
- 14) Lardy, H. A., Walter, P. and Pallkau, V. (1966): Paths of carbon in gluconeogenesis and hipogenesis. J. Biol. Chem., 241, 2523-2532.
- 15) Ochoa, S. (1955): Method in enzymology. Vol. I, Academic Press Inc., New York, p. 735.
- 16) Oginsky, E. L. and Umbreit, W. W. (1954): An introduction to bacterial physiology. Freeman, San Francisco, p. 30.
- 17) 岡好万(1957): 結核菌物質代謝に関する研究. 第2編: 毒力株, 弱毒株の生菌並びに無細胞液による脱水素酵素反応の比較検討. 岡山医誌, 69, 1239-1245.
- 18) 岡好万・尾崎文雄(1963a): 原虫細胞の生理機能に関する研究III・*Trichomonas* の無細胞液と残査の終末呼吸, 医学と生物学, 66, 127-130.
- 19) 岡好万・尾崎文雄(1963b): 原虫細胞の生理機能に関する研究IV, *Trichomonas* 無細胞液の超遠心分画の酵素活性. 医学と生物学, 66, 199-201.
- 20) 岡好万・伊藤義博・尾崎文雄(1966): 原虫細胞の免疫原性の解折16: *Trichomonas foetus* の intracellular component の電子顕微鏡観察. 医学と生物学, 72, 325-329.
- 21) Read, C. P. (1957): Comparative studies on the physiology of trichomonad protozoa. J. Parasitology, 43, 385-394.
- 22) Scharma, N. N. and Bourn, G. H. (1963): Studies on the histochemical distribution of oxidative enzyme in *Trichomonas vaginalis*. J. of Histo. and Cytochem., 11, 628-634.
- 23) Seama, G. R. (1953): Inhibition of succinic dehydrogenase of phosphoro analog of succinic acid. Exp. Parasit., 2, 366-373.
- 24) Sophianopoulos, A. J. and Vestlung, C. S. (1960): Nature of the two forms of malic dehydrogenase from rat liver. Biochem.

- Biophys. Acta, 45, 400-402.
- 25) Suzuki, Z. and Ninomiya, H. (1952) : The metabolism of *Trichomonas vaginalis*, with comparative aspects of trichomonad. J. Biochem. (Jap.), 39, 321-331.
- 26) 田中耕誠 (1970) : *Trichomonas vaginalis* の 2 ~ 3 の脱水素酵素に関する細胞化学的研究. 寄生虫誌, 19, 603-609.
- 27) Wellerson, R., Jr. and Kupferberg, A. B. (1962) : On glycolysis in *Trichomonas vaginalis*. J. Protozool., 9, 418-424.
- 28) Wirschafter, S. K., Saltman, P. and Jahn, T. L. (1956) : The metabolism of *Trichomonas vaginalis*: The oxidative pathway. J. Protozool., 3, 86-88.
- 29) Young, E. G. (1929) : Endocellular enzymes of *Bacillus Coli communis*. Biochem. J., 23, 831-839.
- 30) Yudkin, J. (1937) : Cell structure and enzymic activity. Biochem. J., 31, 1065-1068.

Abstract

BIOCHEMICAL STUDIES ON DEHYDROGENASES IN *TRICHOMONAS VAGINALIS*

KOHSEI TANAKA

(Department of Parasitology, Keio University School of Medicine, Shinjuku-ku, Tokyo)

Biochemical studies were carried out to elucidate the localization of the activity of dehydrogenases such as malate dehydrogenase (MDH), succinate dehydrogenase (SDH) and lactate dehydrogenase (LDH), as well as NADH oxidizing activity in *Trichomonas vaginalis*. By Thunberg method containing the substrates solution, triphenyl tetrazolium chloride as a hydrogen acceptor, NAD and whole or homogenized cells in the reaction system, the activities of the dehydrogenases were determined to be very high in MDH, mild in LDH, and very low in SDH. The activities of these dehydrogenases were found in both whole cells and homogenized cells, being higher in the latter than in the former.

In case of MDH reaction from malate to oxalacetate measured by Thunberg method, most of the activity was found in the supernatant of 24,000×g centrifugation of homogenized cells, whereas negligible activity was found in the sediment. The reverse reaction of MDH was measured spectrophotometrically at the wave length of 340 m μ in the reaction system composed of Tris-HCl buffer, NADH, and oxalacetate as a substrate (Ochoa, 1955). Most of the activity was recognized in the sediments of 700×g, 4,000×g, 12,000×g, and 24,000×g, and it was negligible in the supernatant of 24,000×g centrifugation.

NADH oxidizing activity was measured by the same method as that for the reverse reaction of MDH excepting oxalacetate. The activity was recognized in 24,000×g supernatant.

These results suggest that MDH activity reacting from malate to oxalacetate exists in the cytoplasm as a soluble enzyme and the activity of the reverse reaction in the membranous structures of the cells. The pattern of localization of these two types of MDH activity in *T. vaginalis* is contrary to that in general aerobic cells as advocated by Kaplan.