

# トキソプラズマの2~3の脱水素酵素の電子顕微鏡的 細胞化学による証明

赤尾 信吉  
慶応義塾大学医学部寄生虫学教室

(昭和46年7月21日 受領)

## 序 論

著者は *Toxoplasma gondii* (以下 Tp.) における細胞内小器官の生理学的機能, およびその代謝過程を明らかにすることを目的として, 電顕的細胞化学手技を用い, ATP-ase Acp-ase, GOT, peroxidase 等の酵素局在を証明し報告した. 本報では, 乳酸脱水素酵素(LDH) さらに Tp. における TCA-cycle 上の脱水素酵素—リンゴ酸脱水素酵素(MDH), コハク酸脱水素酵素(SDH) について, 電顕細胞化学手技の応用により, これらの酵素の局在を明らかにすることを目的とした.

## 実験材料および方法

実験材料である Tp. 虫体は, 当教室でマウス腹腔に継代培養している強毒の RH 株である. マウスに接種後3日目の虫体を3匹のマウスから腹水と共に採り, 4°C に冷却した滅菌生理食塩水で, 2,000r.p.m. 15分間, 3回遠心洗滌を行なった. 集めた虫体を前固定することなく酵素反応液に浸した. 前固定を行わなかつた理由は次のごとくである.

脱水素酵素反応における前固定の問題を検討するために, 冷却無水アセトンおよび1~2%グルタルアルデヒドにて予備実験を行なったところ, これらの前固定操作はいずれも酵素反応を失活させることがわかつた. したがって, 本実験では前固定操作を行わないことにした. しかしながら, 前固定を行わない場合, 虫体の微細構造は破壊されることが認められたため, 酵素反応温度条件を低温とし, 30分間冷蔵庫中で行なうことにした.

各酵素反応液には Tetranitro blue-tetrazolium (TNBT) が加えられている. この TNBT は試料の酵素反応により還元されて Formazan を形成し, 電顕的に電子密度の高いものとして観察されるようになる.

### 酵素反応液の組成

LDH の証明には Barka-Anderson (1963) の方法によつた. 反応液の組成は次のごとくである.

#### 1) LDH 反応液の組成

0.1M DL-乳酸ナトリウム	0.1 ml
NAD (4~6 mg/ml)	0.1 ml
0.1M KCN	0.1 ml
0.05M MgCl <sub>2</sub>	0.1 ml
0.06M 磷酸緩衝液 (pH 7.4)	0.25ml
TNBT (4 mg/ml)	0.25ml
水	0.1ml

#### 2) MDH 反応液の組成

MDH の証明は Barka-Anderson (1963) の方法によつた. 反応液の組成は次のごとくである.

1.0M リンゴ酸ソーダ	0.1 ml
NAD (4~6 mg/ml)	0.1 ml
0.1M KCN	0.1 ml
0.05M MgCl <sub>2</sub>	0.1 ml
0.06M 磷酸緩衝液 (pH 7.4)	0.25ml
TNBT (4 mg/ml)	0.25ml
水	0.1 ml

#### 3) SDH 反応液の組成

SDH の証明は Nacklas *et al.* (1957) の方法によつた. 反応液の組成は次のごとくである.

0.1M コハク酸ソーダ (0.1M 磷酸緩衝液 pH 7.6に溶解)	1.5 ml
0.1M 磷酸緩衝液 pH 7.6	1.2 ml
蔗糖	0.25g
Phenazine methosulfate (PMS)	
TNBT (4 mg/ml)	0.25ml
水	0.1 ml

実験には PMS を含む反応液と添加しない反応液を準備して, それぞれについて実験を行なった.

対照としては, それぞれの反応液中より乳酸ソーダ,

リンゴ酸ソーダ、コハク酸ソーダを加えないものを用意し、同様に実験を行なった。

以上の酵素反応液中に先に用意しておいた虫体沈渣を加え、ピペットでよく攪拌後、冷蔵庫中で30分間反応させた。この間、反応を促進させるために浮遊虫体を数回ピペットで攪拌した。反応時間後に、試料を遠心操作して集め、冷却した(4°C)1%オスミウム酸で30分固定した。固定終了後、虫体の一部を採り光顕による観察を行なった。電顕用の試料でアルコール脱水後エポン樹脂包埋を行ない、Portor-blum型マイクロームにより超薄切片とし、日立電子顕微鏡HU-11Bで撮影観察した。直接倍率10,000~20,000倍とし、2~3倍に引伸した。

## 結 果

### 1. LDH 活性について

光顕的観察では、虫体細胞質内に不規則な黒い顆粒が1~2個認められた(Fig. 1)。これに対して、対照群にはこのような顆粒はまったく認められなかった。このことは、これら顆粒がLDH活性により形成された反応生成物(Formazan)であることを示している。しかしながら、これら酵素活性を示した顆粒がTp.のいかなる部位であるかは明らかでない。

この同一試料を電顕にて観察すると、ミトコンドリアに活性の存在することがわかった(Fig. 3)。活性反応を示したミトコンドリアの高倍率像を観察してみると、ミトコンドリア全体に強い活性が拡散状に認められる(Fig. 4)。その他のTp.構造物—microneme, polar ring, conoid, endoplasmic reticulum, 細胞膜等には活性は認められない(Fig. 5, 6)。

対照群には反応はまったくなく、本実験の反応が特異的であることを示した(Fig. 9)。

### 2. MDH 活性について

MDH活性は前述のLDH活性と光顕的観察、電顕観察ともに同じく観察された。光顕の場合には、LDH活性像よりやや弱い活性であった(Fig. 2)。電顕像ではLDH活性と同じくミトコンドリアに明らかな活性が認められた(Fig. 7, 8)。

これに対して、対照群ではまったくその反応を認めなかった。

### 3. SDH 活性について

SDH活性は実験を繰り返し行なったが、光顕観察、電顕観察ともに反応は認められなかった。PMSを添加した酵素反応液を用いても同様に活性反応は現われなかった。

## 考 察

著者はTp.における脱水素酵素(LDH, MDH, SDH)について、電顕細胞化学的方法により酵素局在を証明する実験を試みた。その結果、LDHとMDH活性がミトコンドリアに局在することが証明された。Tp.における脱水素酵素の実験報告はCapella and Kaufman(1964)等により細胞化学的方法でなされており、NADH diaphorase, NADPH diaphorase, LDH, MDH, SDH等の活性がTp.にあることを報告している。これによると、酵素活性を示した場所はJanus greenで染色されるミトコンドリア域に一致すると述べている。本実験における光顕的観察では、Tp.の細胞質内に明らかに酵素反応により生成されたと考えられる1~2個の反応生成物(Formazan)の塊が見られた。LDH, MDHの反応を光顕像で比較すると、LDH活性の方がMDHよりもやや強く観察され、SDH活性はまったく観察されず陰性であった。Tp.にSDHの存在することはCapella and Kaufman(1964)により報告されているが、本実験においては証明されなかった。このことは、SDHがTp.に存在するものとしても、その活性はLDH, MDHよりもきわめて弱いものと考えられる。その他に考えられる原因としては、作用反応温度が冷蔵庫中であるということがあげられる。

Tp.のミトコンドリアにおける酵素の局在は、前報においてAkao(1969, 1970a)がATP-ase, peroxidaseについて報告している。これら酵素の反応部位と、本報で証明した脱水素酵素の活性部位はミトコンドリアに一致している。しかし、ATP-aseはミトコンドリアのcristae内層に明らかな活性を示したが、LDH, MDH活性はミトコンドリア領域に観察され、局在部位の詳細は不明瞭であった。このように脱水素酵素の反応が拡散状に観察された原因としては、反応生成物であるFormazanが有機溶媒である電顕包埋剤に、その過程で少なからず溶出したために起きたものと考えられる。本実験での電顕包埋剤として、スチレン樹脂、エポン樹脂、アラルダイト等を用いてみたが、そのうちエポン樹脂が反応生成物防止の点で最も良好な結果を与えた。

LDH, MDHの酵素反応は、ミトコンドリア以外の細胞内小器官には認められず、細胞質中にも本実験では証明されなかった。細胞質中のこれら酵素は存在したとしても、その活性はきわめて弱いものと考えられる。

Tp.における脱水素酵素以外の酸化還元酵素として、peroxidaseの局在を前報(Akao, 1970a)で報告したが、

この酵素活性はミトコンドリアにのみ陽性反応を示した。Tp. のミトコンドリアに酸化還元酵素が強い活性を有していることは、このような細胞寄生原虫におけるエネルギー代謝の機構を考える上で重要なことであろう。

一般組織細胞における LDH の局在については多くの報告があるが、Paigan and Wenner (1962) は生化学的手技で LDH がミクロゾーム分画にあることを報告している。さらに、Fahimi and Karnovsky (1966) は電顕細胞化学手技により、その活性がミトコンドリアにあることを報告しているが、本実験で、Tp. における LDH 活性がミトコンドリアに強く観察されたことは、後者の所見と相似したものといえる。

Tp. 細胞質内には、一般に dense body と呼ばれる数個の好オスミウム酸性の顆粒がある。この dense body の酵素活性は不明であったが、Akao (1970 c) はこれに acid phosphatase 活性を証明し、Hanson and Sourander (1969) 等の報告した lysosome と代謝上深い関係のあることを指摘している。しかし、本実験では Dense body に脱水素酵素活性が認められなかった。Tp. と同じ原虫のうちの鞭毛虫類において、田中 (1971) が *Trichomonas vaginalis* の脱水素酵素を証明しているが、この場合、脱水素酵素は虫体細胞質中にかなり強い活性を示している。*T. vaginalis* にはミトコンドリアはなく、Tp. とよく似た dense body が十数個存在している。しかし、この dense body 上にも脱水素酵素活性は認められていない。

Fulton and Spooner (1957, 1961) 等は、マウス腹水より純粋分離した Tp. 虫体を試料として、ペーパークロマトグラフィーおよびワールブルグ装置を用いて、Tp. の酸素摂取率、ならびに CO<sub>2</sub> 産生能と glucose 利用能を報告した。彼等の報告によると、分画成分中ミトコンドリア層と上清層にヘキソキナーゼ活性のあることを認めている。さらに、Tp. はヘキソキナーゼの存在下で Embden-Meyerhof-Parnas 代謝系路によりそのエネルギー源を得ているものと報告している。本実験の結果、ミトコンドリアに脱水素酵素が証明されたことは、解糖系につづき TCA cycle に移る Tp. のエネルギー代謝系路をさらに強く想定する根拠となる。

一方、本実験においては Tp. の細胞質に観察されなかった脱水素酵素については、試料からの酵素溶出が主に考えられる。Fahimi and Karnovsky (1966) は、ホルムアルデヒド固定が完全になされていない試料の場合には、酵素の溶出する可能性があることを述べている。さらに Barka and Anderson (1963) は、TNBT

による反応生成物が diformazan でなく monoformazan の場合には、電顕包埋材料に用いる有機溶媒に溶出することを述べている。このような原因で誤った結果を得ないために、本実験では 1~2% グルタルアルデヒドによる前固定を試みたが、この場合、酵素反応を観察しえなかつた。このことは、アルデヒドにより脱水素酵素の失活が起るものと考えられる。故に、本実験では酵素失活を防ぎ、虫体微細構造を保つことを目的として、低温(冷蔵庫中)で酵素反応を行った結果、良い成績を得ることができた。しかしながら、包埋時に一部酵素溶出があり、ミトコンドリアにおける活性をその構成単位膜と一致した像として得られなかつた。

本実験において強い MDH 活性がミトコンドリアに存在するということは、TP. のエネルギー代謝における酵素の役割を考える上で興味深いものといえよう。

本研究は昭和46年度慶応義塾大学学事振興資金の援助により行なわれたものである。

稿を終るにあたり、御指導御校閲を賜わった恩師松林久吉教授、ならびに浅見敬三助教授に深甚の謝意を表します。

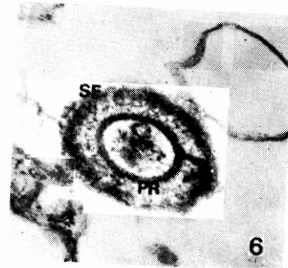
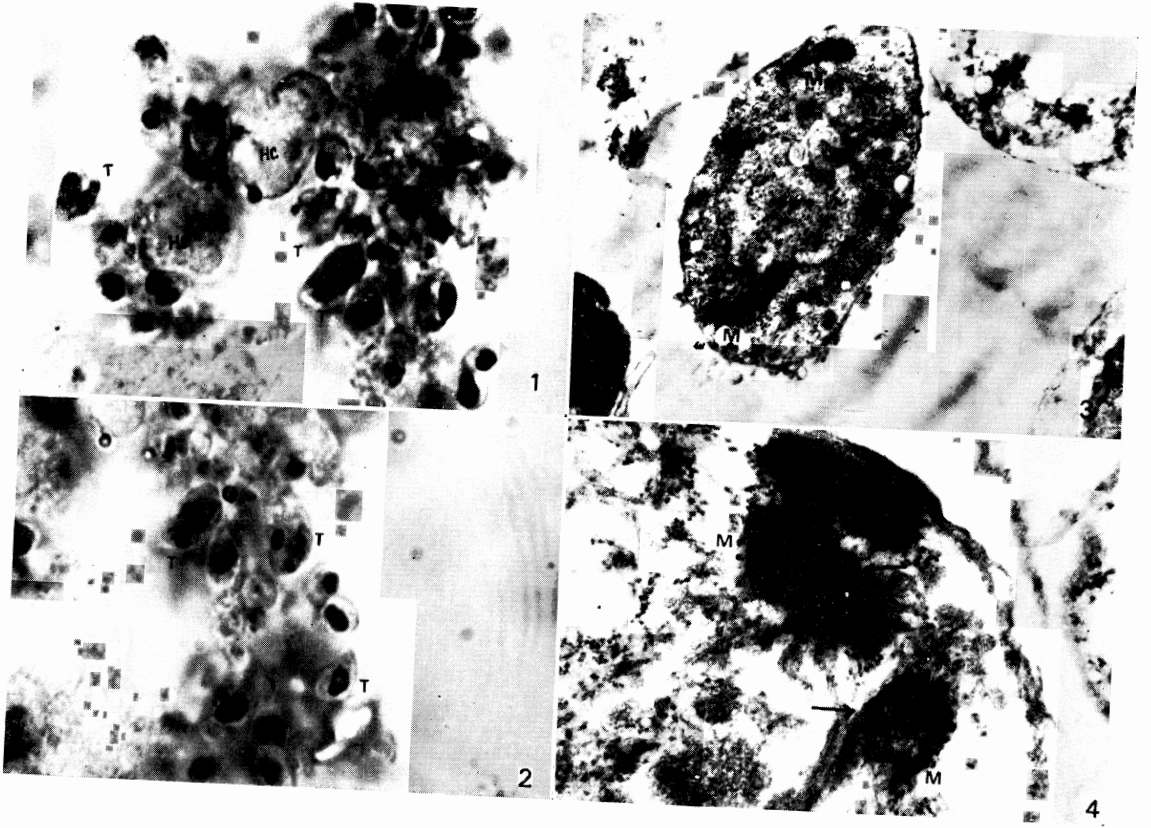
## References

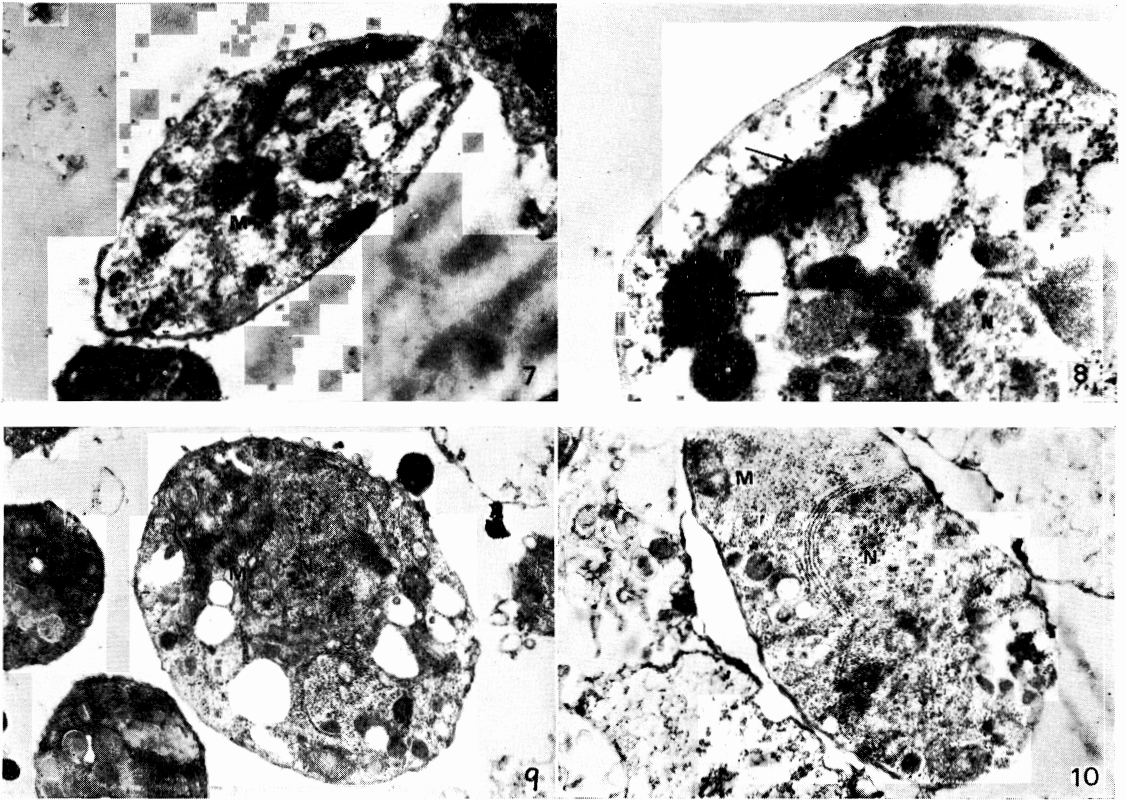
- 1) Akao, S. (1969) : Ultramicroscopic studies of the localization of adenosine triphosphatase activity and H<sup>3</sup>-glucose transport in *Toxoplasma gondii*. Jap. J. Parasit., 18, 488-497.
- 2) Akao, S. (1970 a) : Studies on the localization of peroxidase activity in *Toxoplasma gondii*. Exp. Parasit., 29, 250-254.
- 3) Akao, S. (1970 b) : Localization of glutamic oxalacetic transaminase in *Toxoplasma gondii*. Exp. Parasit., 29, 26-29.
- 4) Akao, S. (1970 c) : The lysosome in protozoa. The Cell, 3, 28-29. (in Japanese)
- 5) Barka, T. and Anderson, P. J., (1963) : Histochemistry; theory, practice and bibliography. Hober Medical Division. Harper and Row Publishers. New York.
- 6) Capella, J. A. and Kaufman, H. E. (1964) : Enzyme histochemistry of *Toxoplasma gondii*. Am. J. Trop. Med. and Hyg., 13, 664-666.
- 7) Fahimi, H. D. and Karnovsky, M. J. (1966) : Cytochemical localization of two glycolytic dehydrogenase in white skeletal muscle. J. Cell Bio., 29, 113-128.
- 8) Fulton, J. D. and Spooner, D. F. (1957) : The preliminary observation of metabolism of *Toxoplasma gondii*. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. & Hyg., 51, 123-124.

- 9) Fulton, J. D. and Spooner, D. F. (1960) : Metabolic studies on *Toxoplasma gondii*. Exp. Parasit., 9, 293-301.
- 10) Hanson, H-A. and Sourander, P. (1968) : Ultrastructural demonstration of lysosomes in *Toxoplasma gondii*. Acta Patho. Microbio. of Scandinavia, 74, 431-444.
- 11) Paigan, K. and Wenner, C. E. (1962) : The intracellular location of the glycolytic dehydrogenase in liver and hepatoma. Arch. of Biochem. and Biophys., 97, 213-216.
- 12) Nachlas, M. M., Tsow, K. G., De Souza, E., Cheng, C. S. and Seligman, A. M. (1957) : Cytochemical demonstration of succinic dehydrogenase by the use of a new p-nitrophenyl substituted ditetrazole. J. Histo. and Cytochem., 5, 420-436.
- 13) Tanaka K., Ohashi, O. and Asami, K. (1968) : Ultramicrochemical studies on the dehydrogenase of *Trichomonas vaginalis*. Jap. J. Parasit., 18, 411-412. (in Japanese)

#### 写 真 説 明

- 写真 1 LDH 基質液に30分間反応させたトキソプラスマ。黒い部分が酵素反応により形成された Formazan である。 T : Toxoplasma H. C. : Host cell (2,500倍)
- 写真 2 MDH 基質液に30分間反応させたトキソプラスマ。黒い部分が酵素反応により形成された Formazan である。 T : Toxoplasma (2,500倍)
- 写真 3 LDH 基質液に30分間反応させたトキソプラスマの電顕像。電子密度の濃い部分が Formazan で、ミトコンドリア上に観察される。 M : Mitochondria (10,000倍)
- 写真 4 LDH 基質液に30分間反応させたトキソプラスマの高倍率電顕像。ミトコンドリアの模構造上に Formazan が観察される。 M : Mitochondria (20,000倍)
- 写真 5 LDH 基質液に30分間反応させたトキソプラスマ。micronemes (MN) および conoid (c) には酵素活性は観察されない。 DB : dense body (10,000倍)
- 写真 6 LDH 基質液に30分間反応させたトキソプラスマ。 polar ring (PR) および submembranous fibril (SF) には酵素活性は観察されない。(20,000倍)





### 写 真 説 明

写真 7 MDH 基質液に30分間反応させたトキソプラズマの電顕像。ミトコンドリアに酵素活性がある。  
M : mitochondria (10,000倍)

写真 8 MDH 基質液に30分間反応させたトキソプラズマの高倍率電顕像。ミトコンドリア構成膜上に Formazan の沈着が観察される。 M : mitochondria, N : nucleus.

写真 9, 10 対照実験群の電顕像。写真 9 は LDH 基質液より乳酸ソーダを除いたものに反応せしめた。写真 10 は MDH 基質液より、リンゴ酸ソーダを除いたものに反応せしめたものである。両者ともミトコンドリアや他の構造物に全く反応を認めない。 M : mitochondria, N : nucleus. (10,000倍)

**Abstract**LOCALIZATION OF LACTATE, MALATE AND SUCCINATE DEHYDROGENASES  
IN *TOXOPLASMA GONDII*

SHINKICHI AKAO

*(Department of Parasitology, School of Medicine Keio University  
Shinjuku, Tokyo, Japan)*

The present author has carried out ultramicroscopic studies on the localization of enzyme activities such as ATP-ase, peroxidase and glutamic oxalacetic transaminase in *Toxoplasma gondii* (Akao, 1969, 1970 a, b). The original intention of these studies was to elucidate the physiological functions of particular organella of the organism. The present experiments were carried out to clarify the respiratory system of *Toxoplasma* by elucidating the localization of some respiratory or glycolytic enzymes such as malate dehydrogenase (MDH), Succinate dehydrogenase (SDH) and lactic dehydrogenase (LDH).

LDH and MDH activities were demonstrated only in the mitochondria of *Toxoplasma* cells. No positive reactions were observed at any other sites of the cell including cell membranes. SDH was not demonstrated at any site.

Taking consideration of these results, the presence of dehydrogenases such as MDH in mitochondria of *Toxoplasma* cell suggest that the important physiological roles of these enzymes in the energy production pass way of this organisms.