

豚回虫の生存に及ぼす酸素圧の影響 (4)

豚回虫筋の cytochrome c peroxidase を含む電子伝達系について

林 栄 一 寺 田 護

静岡薬科大学薬理学教室

(昭和47年8月22日 受領)

緒 言

豚回虫(以下回虫)の生存についてはそのエネルギー代謝に O_2 は関与しないであろうとする説が従来から一般に容認されている (Bueding, 1963; Saz & Bueding, 1966; 大家, 1967; Saz, 1969)。しかしながら回虫は低酸素圧下 (pO_2 5%) とはいえ、 O_2 の存在する環境下に棲息しており (Long & Fenger, 1917; von Brand, 1952), O_2 親和性の強いヘモグロビン (von Brand, 1966; Lee & Smith, 1965) およびミトコンドリア (Kmetec *et al.*, 1962; 石川, 1971) を具備することが知られ、また低酸素圧下での O_2 利用とか O_2 debt の現象が観察されており (Laser, 1944), 回虫が O_2 を生理的代謝において利用するのではなからうかという推定を予測させるものがあつた。

著者らは回虫の解剖学的構造(体制)と生理的機能(生存様式)ならびにその生存環境条件の間の相互関係に十分に考慮を加えながら、回虫の好氣的代謝の生理的役割について再検討を加えてみた。前報までに回虫は低酸素圧下 (pO_2 2.5~5.0%) で最も長く生存するが、無 O_2 下ないし高酸素圧下 (pO_2 10~20%) でその生存が著明に短縮されること、また KCN ないし NaN_3 によりその作用は遅効的であるが回虫の生存は阻害され、しかも高酸素圧下 (pO_2 10~20%) での阻害作用は一層著明であることなどの知見が得られ、これらの知見から回虫は低酸素圧下で哺乳動物の好氣的代謝様式とは異なる hydroperoxidase を含む電子伝達機構で生理的に O_2 を利用するのではなからうかということを示唆すること

本研究の要旨は第29回日本寄生虫学会東日本大会および第39回日本寄生虫学総会で発表した。

ができた (林ら, 1968; 林・寺田, 1969; 林・寺田, 1970)。

今回は回虫の O_2 利用機構を実験的に明らかにするため、回虫筋ミトコンドリアの呼吸系について詳細に検討を加え、cytochrome (以下 cyt.) c peroxidase を含む電子伝達系の存在を認めることができたので報告する。

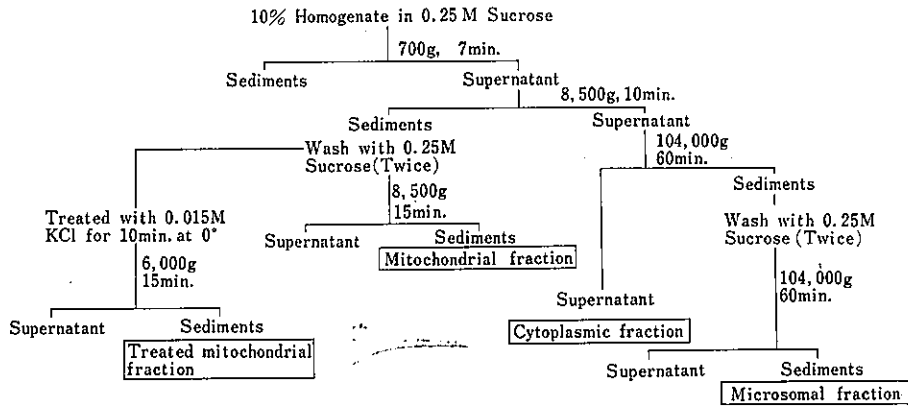
実験方法

1) 回虫筋の細胞分画

雌回虫を側線に沿つて切開、内臓を除去、剃刀で表皮を剝離した筋層を材料とした。筋肉は 0.25M sucrose 液で数回洗浄、水分を濾紙で吸取後秤量し缺で細切した。Potter-Elvehjem 型テフロンホモジナイザーに筋肉 1.0g 当り 9.0 ml の 0.25 M sucrose 液を加え、600~1000rpm で2分間磨砕した。かくして得られた 10% ホモジネート(細胞質分画の場合は 40% ホモジネート)を Schneider らの方法 (Schneider & Hogeboom, 1950) により遠沈を行ない分画した。Scheme 1 に示した操作順序でミトコンドリア分画 (8,500g 沈渣)、ミクロゾーム分画 (104,000g 沈渣上層) および細胞質分画 (104,000g 上清) を得た。低張処理ミトコンドリア分画は 1 回目洗浄後のミトコンドリア分画を $0^{\circ}C$ 、10 分間 0.015M KCl 溶液で処理することにより得た。以上のすべての操作は $0\sim 4^{\circ}C$ で行なつた。実験に当り各分画は 0.25M sucrose 液に懸濁したものをを用いた。

2) ヘム蛋白成分

上記の各分画に数分間通気した場合および $Na_2S_2O_4$ ないし succinate を添加した場合の絶対吸収スペクトルを自記分光光度計(日立, EPS-2u 型)でオパールグラス法(柴田, 1968)により測定した。



Scheme 1 The centrifugal fractionation of *Ascaris* muscle.

3) succinate cyt. c reductase および NADH cyt. c reductase 活性の測定

cyt. c の還元を自記分光光度計 (日立, EPS-2u 型) で $550\text{ m}\mu$ の吸光度の変化から測定した。反応は室温 (25°) で行ない、反応液は全量を 3.5 ml とし、 0.25 M sucrose, 50 mM phosphate buffer (pH 7.4), $0.1\mu\text{ mole}$ cyt. c, $10\mu\text{ moles}$ succinate ないし $1\mu\text{ mole}$ NADH, 1 mM KCN (中和) およびミトコンドリアないし細胞質を含む。酵素活性は還元された cyt. c $\mu\text{ moles}/\text{min}/\text{mg}$ protein として求めた。cyt. c の $550\text{ m}\mu$ における millimolar extinction coefficient (\mathcal{E} reduced- \mathcal{E} oxidized) は 18.5 とした。

4) cyt. c peroxidase 活性の測定

3) の succinate cyt. c reductase 活性測定系から KCN を除いた反応系を用い、succinate を基質とした場合の cyt. c の還元にあらず H_2O_2 の作用から cyt. c peroxidase 活性の有無を検討した。 H_2O_2 ($205\mu\text{M}$) は cyt. c が十分に還元された時点ないし反応開始前に添加した (Yonetani & Ray, 1968)。

5) Neo-Tetrazolium blue reductase 活性の測定

cyt. b-c 間の antimycin A 感受性部位から電子を受けとる色素 (Slater, 1963), Neotetrazolium blue (以下 Neo-TB) の還元を自記分光光度計 (日立, EPS-2u 型) で $530\text{ m}\mu$ の吸光度の変化から測定した。反応は室温 (25°) で行ない、反応液は全量を 3.5 ml とし、 0.25 M sucrose, 50 mM phosphate buffer (pH 7.6), 0.1% Neo-TB 0.2 ml , 10 mM 基質 (NADH は 5 mM) およびミトコンドリアないし細胞質を含む。酵素活性は $40\text{ O.D.}_{530}/\text{min}/\text{mg}$ protein として求めた。

6) O_2 uptake の測定

Warburg 検圧法によつた。反応液は全量を 2.0 ml とし、 0.25 M sucrose, 50 mM phosphate buffer (pH 7.6), 10 mM succinate (5 mM NADH) およびミトコンドリアないし細胞質を含む。副室には 25% KOH 水溶液 0.2 ml を加えた。先ず 37° 10分間の温度平衡後、 $105\text{ rev}/\text{min}$ の振盪下で大気を気相として O_2 uptake を測定した。 O_2 uptake は吸収 $\text{O}_2\ \mu\text{l}/\text{hr}/\text{mg}$ protein として求めた。

7) タンパク質の定量

Lowry らの方法 (Lowry *et al.*, 1951) で定量した。

8) 試薬

使用したものは cyt. c (horse heart, type II) および antimycin A (Sigma chemical Co.), NADH (オリエンタル酵母 K.K.), Neo-TB (和光純薬 K.K.), rotenone (トモノ農薬 K.K.) で、その他の試薬は市販特級品を用いた。

antimycin A および rotenone はエタノール溶液として用いた。

実験結果

1) ヘム蛋白成分の検査

Fig. 1 に回虫筋の細胞質、ミクロゾームおよびミトコンドリア分画の酸化型および $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ による還元型の絶対吸収スペクトルを示した。細胞質の酸化型は 543 および $578\text{ m}\mu$ に、還元型は $556\text{ m}\mu$ に吸収極大を示し、ヘモグロビンの存在を示した。ミクロゾームの還元型は $527\text{ m}\mu$ および $557\text{ m}\mu$ に吸収極大を示し、b 型 cyt. の存在を示した。またミトコンドリアの還元型は

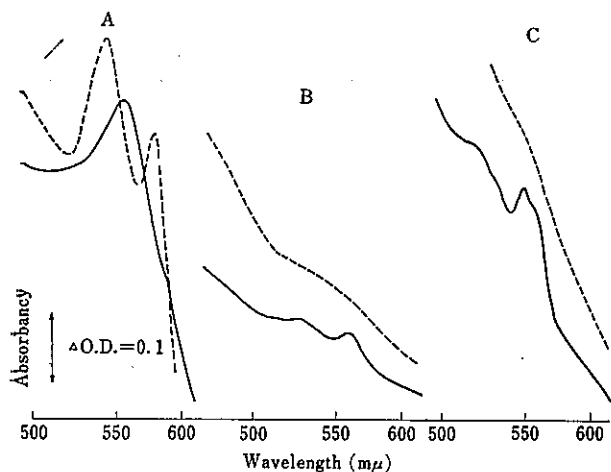


Fig. 1 Absorption spectra of the respiratory components of *Ascaris* muscle cytoplasmic (A), microsomal (B) and mitochondrial (C) fractions

—————: Reduced form (by $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$), - - - : Oxidized form
 The cytoplasmic fraction prepared from 40% homogenate contains 12.0 mg protein/ml. The microsomal and mitochondrial fractions contain 3.6 and 9.1 mg protein/ml, respectively.

520, 530, 550および557~8 μ に吸収帯のピークないし肩を示し、これは cyt. c および b 型 cyt. の存在を示すものである。ミトコンドリアの場合、succinate (10mM) を添加すると直ちに $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ の場合と同様の還元型スペクトルが得られた。

2) Succinate cyt. c reductase および NADH cyt. c reductase 活性

Table 1 に示したごとく、ミトコンドリアに succinate, fumarate ないし NADH を添加すると、cyt. c (exogenous) の還元が生じた。succinate を基質とした場合の cyt. c の還元は KCN (10^{-3}M) により促進され、ミトコンドリアに succinate cyt. c reductase とともに ferro cyt. c oxidase の存在を示した。succinate cyt. c reductase 活性は antimycin A (1.5r/ml) および malonate (succinate/malonate=1 ないし 10) のいずれによっても約 80~90% の阻害を受けた。一方 NADH を基質とした場合の cyt. c の還元は KCN (10^{-3}M) ないし H_2O_2 (205 μM) の影響を受けず、また NADH cyt. c reductase 活性は rotenone (10^{-4}M) および antimycin A (1.5r/ml) により影響を受けなかった (Table 1)。

次に細胞質では succinate ないし NADH を添加しても内在基質の場合と同程度の cyt. c の還元が認められ、内在基質による cyt. c の還元は malonate

(10mM) および antimycin A (1.5r/ml) の影響を受けなかった (Table 1)。

3) cyt. c peroxidase 活性

Cooperstein & Lazarow (1951) の方法で $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ で還元した cyt. c はミトコンドリアにより酸化されず、また H_2O_2 (205 μM) の添加によっても影響を受けなかった。これらの結果は哺乳動物の場合 (Lehninger, 1955; Slater, 1956) と同じく回虫筋でも還元型の cyt. c がミトコンドリア内へ透過できないことを示唆するものと思われる。

そこで succinate を基質とし、酸化型の cyt. c がミトコンドリア内で十分に還元された時点で 205 μM の H_2O_2 を添加すると急速な cyt. c の再酸化が直ちに生じた。ここで 10^{-3}M の KCN (中和) ないし 10^{-2}M $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ を添加すると再び cyt. c の還元が生じた (Fig. 2)。

これと同様の結果は回虫筋ホモジネート (筋 0.1g 相当) を酵素標本とした実験においても認められた。一方 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ で還元した cyt. c に 205 μM の H_2O_2 のみを作用させた場合には cyt. c の酸化は生じなかった。

またミトコンドリアに 205 μM H_2O_2 を予め作用させると、succinate を基質とした場合の cyt. c の還元は著明に抑制された。そしてこの H_2O_2 による抑制作用は 10^{-4}M KCN によりわずかに減少し、 $10^{-3}\sim 10^{-2}\text{M}$ KCN で消失した。同様の結果は 10^{-4} ないし 10^{-2}M

Table 1 The effects of some inhibitors on the cytochrome c reduction in *Ascaris* muscle mitochondria and cytoplasm

Fraction	Addition	Activity
Mitochondria	None	0
	Succinate	7.5
	Succinate+ 10^{-3} M KCN	11.6
	Succinate+ 10^{-3} M KCN+Ethanol 50% 50 μ l	11.4
	Succinate+ 10^{-3} M KCN+1 μ mole Malonate	1.9
	Succinate+ 10^{-3} M KCN+10 μ moles Malonate	1.2
	Succinate+ 10^{-3} M KCN+1.5 r/ml Antimycin A	1.1
	Fumarate	1.6
	NADH	18.0
	NADH+205 μ M H_2O_2	18.0
	NADH+ 10^{-3} M KCN	18.9
	NADH+ 10^{-3} M KCN+Ethanol 50% 50 μ l	15.8
	NADH+ 10^{-3} M KCN+1.5 r/ml Antimycin A	15.0
	NADH+ 10^{-3} M KCN+ 10^{-4} M Rotenone	15.8
	Cytoplasm	None
Succinate		3.2
NADH		3.5
10 μ moles Malonate		3.2
1.5 r/ml Antimycin A		3.1

Activity: $M\mu$ moles cytochrome c reduced/min/mg protein

Reaction system

Mitochondria 1.2~2.4mg protein or cytoplasm 6.0mg protein; Cytochrome c 0.1 μ mole; Succinate or fumarate 10 μ moles, NADH 1 μ mole; Medium: Sucrose 0.25 M, phosphate buffer (pH 7.4) 0.05 M; Total: 3.5ml; Temp.: 25°

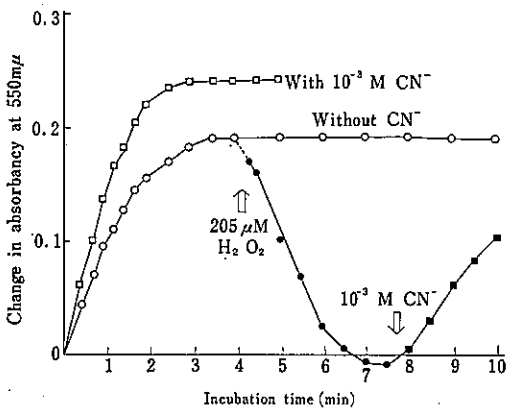


Fig. 2 The effects of cyanide and H_2O_2 on the amount of cytochrome c reduced by succinate in *Ascaris* muscle mitochondrial system

Reaction system

Mitochondria 2.4mg protein; Cytochrome c 0.1 μ mole; Succinate 10 μ moles
Medium: Sucrose 0.25M, phosphate buffer (pH 7.4) 0.05M; Total: 3.5ml; Temp.: 25°

NaN_3 によつても認められた (Fig. 3).

4) Neo-TB reductase 活性

ミトコンドリアに succinate, fumarate ないし malate を添加した場合には, いずれも同程度の活性の Neo-TB の還元が認められた. しかし, NADH, pyruvate ないし citrate では認められなかつた. 低張処理を施したミトコンドリアでは NADH によつても Neo-TB の還元が認められた (Table 2).

また細胞質に succinate および NADH を添加しても Neo-TB の還元は認められなかつた (Table 2).

ミトコンドリアに succinate を添加した場合の Neo-TB の還元は malonate (succinate/malonate=1) で約64%の阻害を受けたが amytal (2.5mM)ないし rotenone (0.05mM) ではほとんど影響を受けなかつた (Table 2). 一方 fumarate を基質にした場合の Neo-TB の還元は amytal (2.5mM) により約50%, rotenone (0.05mM) により約96%の阻害を受けた. また malonate (10mM) では Neo-TB の還元がわずかに増大する傾向がみられた (Table 2).

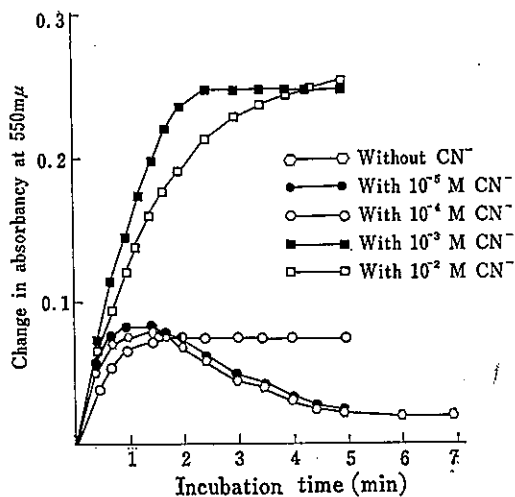


Fig. 3 The effects of H_2O_2 and cyanide on the amount of cytochrome c reduced by succinate in *Ascaris* muscle mitochondrial system

Reaction system

Mitochondria 2.4mg protein; Cytochrome c 0.1 μ mole; Succinate 10 μ moles;

H_2O_2 205 μ M

Medium: Sucrose 0.25M, phosphate buffer (pH 7.4) 0.05M; Total:

3.5ml; Temp.: 25°

Table 2 The effects of some inhibitors on the neo-tetrazolium-blue reduction in *Ascaris* muscle mitochondria and cytoplasm

Fraction	Addition	Activity
Mitochondria	None	0
	Succinate	0.033
	Succinate+Ethanol	0.032
	Succinate+10mM Malonate	0.012
	Succinate+2.5mM Amytal	0.035
	Succinate+0.05mM Rotenone	0.029
	Fumarate	0.033
	Fumarate+10mM Malonate	0.038
	Fumarate+2.5mM Amytal	0.016
	Fumarate+0.05mM Rotenone	0.001
	Malate	0.033
	Pyruvate	0
	Citrate	0
	NADH	0
0.015M KCl treated mitochondria	NADH	0.013
	NADH+2.5mM Amytal	0.001
Cytoplasm	None	0
	Succinate	0
	NADH	0

Activity: $\Delta O.D._{550}/\text{min}/\text{mg}$ protein

Reaction system

Mitochondria 5.5mg protein or cytoplasm 6.0mg protein; 0.1% Neo-TB 0.2ml;

Substrate 10mM (NADH 5mM); Medium: Sucrose 0.25M, phosphate buffer (pH 7.6) 0.05 M; Total: 3.5ml; Temp.: 25°

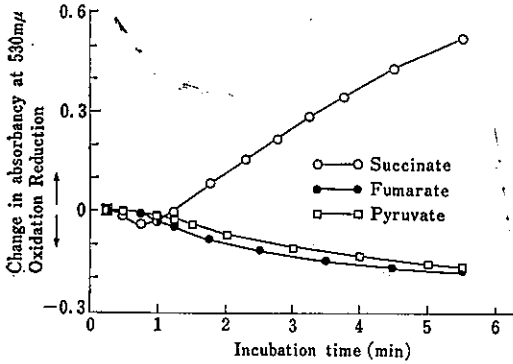


Fig. 4 Effects of some substrates on the reduction and oxidation state of Neo-TB in rat liver mitochondrial system

Reaction system

Mitochondria 7.1 mg protein; 0.1% Neo-TB 0.2ml; Substrate 10mM

Medium: Sucrose 0.25M, phosphate buffer (pH 7.6) 0.05M; Total: 3.5ml; Temp.: 25°

低張処理ミトコンドリアの NADH を基質とした場合の Neo-TB の還元は amytal (2.5mM) により著明に阻害された (Table 2).

一方哺乳動物のラット肝臓ミトコンドリアでは fu-

marate を基質とした場合 Neo-TB は還元されず逆に酸化された (Fig. 4). このことは cyt. c を電子受容体とした場合にも認められた.

5) succinate および NADH を基質とした場合の O₂ uptake

回虫筋のミトコンドリアおよび細胞質に succinate ないし NADH を添加した場合の O₂ uptake を Table 3 に示した. ミトコンドリアに succinate を添加した場合の O₂ uptake は 10mM malonate (succinate/malonnate=1) で約70%の阻害を受けたが, amytal (2.5 mM) ないし rotenone (0.05mM) ではほとんど影響を受けなかった.

一方 NADH を添加した場合の O₂ uptake は amytal (2.5mM), rotenone (0.05mM) および malonate (10mM) により, それぞれ約52, 93 および87%の阻害を受けた.

これらの結果から回虫筋ミトコンドリアによる O₂ uptake は succinate および NADH のいずれの基質の場合も, 共通に succinate dehydrogenase 部を介して行なわれていることが示唆された.

また細胞質に活性は非常に低いが内在基質による O₂ uptake が認められた. この活性は amytal (2.5mM) とか malonate (10mM) により影響されなかつた. こ

Table 3 The effects of some inhibitors on the oxygen uptake in *Ascaris* muscle mitochondria and cytoplasm

Fraction	Addition	Activity
Mitochondria	None	0
	Succinate	20.4
	Succinate+10mM Malonate	7.4
	Succinate+2.5mM Amytal	23.0
	Succinate+0.05mM Rotenone	18.5
	NADH	15.4
	NADH+10mM Malonate	2.1
	NADH+2.5mM Amytal	7.4
	NADH+0.05mM Rotenone	1.1
	Cytoplasm	None
Succinate		0.8
NADH		1.1
NADH+10mM Malonate		1.2
NADH+2.5mM Amytal		1.1

Activity: Oxygen uptake in $\mu\text{l/hr/mg}$ protein

Reaction system

Mitochondria 4.7~5.0mg protein or cytoplasm 18.0mg protein; Succinate 10mM or NADH 5mM; Medium: Sucrose 0.25M, phosphate buffer (pH 7.6) 0.05M; Total: 2.0ml; Temp.: 37°

の結果は細胞質とミトコンドリアの O_2 uptake が異なる酵素によつて行なわれることを示唆するものかもしれない。

考 察

回虫筋の電子伝達系に関しては、従来チトクローム成分の関与をめぐる相対立した2つの説が提出されている。

回虫筋におけるb型 cyt., cyt. c および cyt. oxidase の存在ないしそれらの末端酸化系における関与が, Keilin & Hartree (1949), Chance & Parson (1963), Cheah & Chance (1970), Kikuchi *et al.* (1959), Kikuchi & Ban (1961) および Hill *et al.* (1970) により報告されている。しかし回虫筋における O_2 uptake は KCN (Laser, 1944; Bueding & Charms, 1952) および antimycin A (Bueding *et al.*, 1954) に不感受性であり、かつ基質の酸化により H_2O でなく H_2O_2 が生成されること (Laser, 1944; Rathbone, 1955; Bueding & Charms, 1952; Cheah & Chance, 1970), O_2 uptake が酸素圧に依存すること (Laser, 1944; Rathbone, 1955), また cyt. oxidase 活性から O_2 uptake 量を量的に説明しえないこと (Kmetec & Bueding, 1960) などから、少なくとも哺乳動物と全く同様のチトクローム系が関与していることは考えがたい。一方チトクローム成分が関与することについて否定的な見解もあり、Bueding ら (Bueding, 1963; Saz & Bueding, 1966; Saz, 1969) は回虫筋の電子伝達系としてフラビン酵素系の関与を提唱している。また成回虫筋に見出された cyt. 成分は cyt. oxidase を含む系で好氣的代謝を営む仔虫時代の酵素の痕跡ではないかとする者もある (菊地, 1963; Hill *et al.*, 1970)。

ところで著者らは先に回虫が生理的に少量の O_2 をヘム蛋白酵素系を介して利用していることを現象的に明らかにしたので、 O_2 との関係において回虫筋の電子伝達系について再検討を加えた。

先ず回虫筋を細胞分画し、各分画のヘム蛋白成分を検索したところ、細胞質分画にはヘモグロビン、ミクロゾーム分画にはb型 cyt. そしてミトコンドリア分画には succinate で還元される cyt. c およびb型 cyt. の存在が認められた (Fig. 1)。

ついでミトコンドリアについて、その電子伝達の機構を明らかにするために、外因性の cyt. c, Neo-TB および O_2 を電子受容体とし、各種呼吸阻害薬を利用して検

討を加えた。そして回虫筋ミトコンドリアにも哺乳動物の場合と同様に succinate oxidase 系と2種類の NADH oxidase 系の存在を示唆する結果を得た。

先ず回虫筋ミトコンドリアに内在する cyt. c およびb型 cyt. は succinate の添加により還元された。また succinate cyt. c reductase ないし succinate Neo-TB reductase 活性は、哺乳動物の場合と同様に、amytal ないし rotenone により影響されず、malonate および antimycin A により阻害された。これらの結果は succinate cyt. c reductase 系に succinate dehydrogenase (FP_2), b型 cyt. および cyt. c が含有されていることを示唆している (Table 1 および 2, Yamashita & Racker, 1969)。また回虫の succinate cyt. c reductase 系に rhodoquinone が関与することが最近佐藤らにより明らかにされた (Sato & Ozawa, 1969; 佐藤ら, 1971)。

次に NADH oxidase 系で NADH cyt. c reductase 活性は antimycin A および rotenone のいずれにも不感受性であり、また H_2O_2 ないし KCN にも影響されなかつた (Table 1)。また NADH Neo-TB reductase 活性はミトコンドリアを低張処理した場合にはじめて認められ、この活性は amytal により阻害された (Table 2)。これらのことから哺乳動物と同じく回虫筋でも NADH はミトコンドリア膜を透過できないこと (Rester *et al.*, 1957)、したがって cyt. c を電子受容体とした実験で測定した NADH cyt. c reductase 活性は、哺乳動物のミトコンドリア外膜表面にある antimycin A とか amytal に不感受性の系に相当するものと考えられること、しかし哺乳動物の内膜に相当する部位にはこれらの阻害薬に感受性の NADH cyt. c reductase 系の存在することが推定された (Vernon *et al.*, 1952; Devlin & Lehninger, 1956)。この amytal とか antimycin A に不感受性の NADH cyt. c reductase に関連して、回虫筋の細胞質にもこの系に近似した特徴を有する電子伝達活性が認められた。しかしこの活性は、哺乳動物の場合と同様ミトコンドリアからよりもむしろミクロゾームに由来するものかもしれない (Sato *et al.*, 1965)。

次に回虫筋ミトコンドリアには fumarate ないし malate を基質とする cyt. c ないし Neo-TB 還元が認められた。fumarate を基質とする活性は回虫筋ミトコンドリアに特異的な活性と考えられるが、これらの活性は amytal および rotenone により阻害された (Table

1および2, Fig. 4). これらの結果から回虫筋ミトコンドリアでは、すでに知られているごとく, malic enzyme による malate の脱炭酸反応で NAD の還元が生じ(Saz & Bueding, 1966; 大家, 1967; Saz, 1969), ついで NADH がミトコンドリア内膜性の NADH oxidase 系を介して cyt. c ないし Neo-TB を還元することが推察される (Scheme 2).

回虫筋の電子伝達系の O_2 uptake にあずかる酵素の存在部位は, succinate および NADH を基質とした場合の呼吸阻害薬の作用性から, succinate dehydrogenase 部にあるらしいことが推察される (Table 3). この結果は同時に, Bueding らがすでに NADH fumarate reductase 系として提唱しているごとく, 回虫筋では NADH からの電子は succinate dehydrogenase を経る経路にも伝達されることを示唆している. しかし succinate dehydrogenase 自体は直接 O_2 を電子受容体としないこと (Szent-Györgyi, 1924), また従来から知られているように回虫筋の O_2 uptake は KCN で阻害されにくいことから, succinate dehydrogenase 近傍のフラビン酵素 (flavin containing oxidase) が O_2 の活性化に関与しているものと推定される.

次に succinate を基質とした場合の cyt. c の還元が KCN で促進され, ferro cyt. c の再酸化に関与する酵素の存在が推察された (Table 1). Kikuchi *et al.* (1959) および Cheah & Chance (1970) は回虫筋における ferro cyt. c の再酸化にあずかる酵素として cyt. oxidase の存在を報告しているが, Cheah & Chance (1970) 自身によつても指摘されているように, 回虫筋による呼吸現象を哺乳動物の場合と全く同様に考えることは若干無理のように思われる. 回虫の呼吸では H_2O_2 が生成されることが明らかにされており, また回虫筋には組織化学的に peroxidase 活性が認められており (田村, 1962), しかも著者らの実験で回虫の末端酸化酵素は hydroperoxidase であることが指摘されていることから (林ら, 1968; 林・寺田, 1969; 林・寺田, 1970), もう1つの可能性として cyt. c peroxidase が示唆された. そこで succinate を基質として cyt. c の還元に対する H_2O_2 の作用を検討し, 回虫筋ミトコンドリアに H_2O_2 の存在により ferrocyt. c を再酸化する cyt. c peroxidase 活性の存在を示唆する結果を得た (Fig. 2 および3). 林・中西 (1972) は最近, 同様の系で malonate を用いて succinate cyt. c reductase 活性を抑制することにより, さらに明確にこの活性を認めることに

成功している.

回虫筋では末端酸化酵素として cyt. c peroxidase が関与すると推定すると, 哺乳動物では cyt. oxidase が ferrocyt. c の酸化と O_2 の活性化を同時に行なうのに対し, 回虫筋ではこれらの機能を cyt. c peroxidase と flavin containing oxidase とが別々に行なうことが考えられ, 両者の末端酸化系にはかなりの相違のあることが了解できる. したがつて Bueding らが回虫筋の電子伝達系において, チトクローム成分の関与を否定し, その根拠とした諸知見も, cyt. 成分の関与を否定するものというよりもむしろ, この cyt. c peroxidase を含む系に特徴的な現象とみなすことができるかもしれない.

また cyt. c peroxidase は cyt. oxidase と異なり, 極めて低酸素圧下 (pO_2 1/500) でも生合成され (Sels & Cocriamont, 1968), 高酸素圧下では逆に生合成が阻害される (Lenhoff & Kaplan, 1956) などの知見も, 回虫のような低酸素圧下で好氣的代謝を行なっている生物にとり極めて好都合な酵素であることを示唆するものかもしれない.

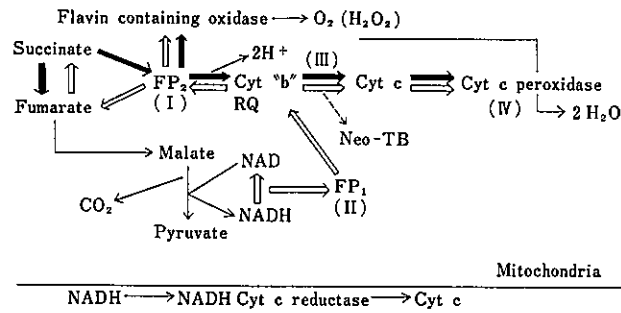
cyt. c peroxidase 活性は酵母とか *Pseudomonas fluorescens* などにその存在が知られているが (Lenhoff & Kaplan, 1956), 多細胞動物についての知見は初めてと思われる.

なお回虫筋ミトコンドリアは低酸素圧下の *in vitro* の実験では O_2 uptake を示さない (Rathbone, 1955), しかし intact の回虫ないし頭部標本では生理的低酸素圧下 (pO_2 5%) でも大気下の場合の約 $1/2$ もの O_2 uptake を示す (Laser, 1944). したがつて低酸素圧下でミトコンドリアが生理的に O_2 を利用するのは細胞質中に存在する O_2 親和性の強いヘモグロビンが関与するためと考えられる (林・寺田, 1969; 林・寺田, 1970).

以上の実験結果にもとづいて, 回虫筋の電子伝達系を Scheme 2 のごとく推定したが, 哺乳動物のチトクローム系とも, Bueding により提唱されているフラビン酵素系とも多少趣きを異にするように思われる.

すなわち succinate oxidase 系では succinate からの電子は一部が cyt. c に渡され, これを還元し, 他の一部が succinate dehydrogenase 部の flavin containing oxidase を介して O_2 に渡され, H_2O_2 を生ずる. そしてこの H_2O_2 と $2H^+$ を基質として, cyt. c peroxidase が ferrocyt. c を再酸化するという可能性が考えられる.

一方 NADH oxidase 系では NADH からの電子の



Scheme 2 Scheme for a possible electron transport system in *Ascaris* muscle mitochondria

Cyt: Cytochrome, RQ: Rholoquinone, FP_1 : NADH dehydrogenase, FP_2 : Succinate dehydrogenase; The following inhibitors are sensitive at the site of I: Malonate, II: Amytal or Rotenone III: Antimycin A, IV: KCN, NaN_3

一部は succinate oxidase 系の場合と同じく cyt. c および flavin containing oxidase を介して O_2 に渡され、他の一部はすでに Bueding らにより提唱されているように、NADH fumarate reductase 系を介して嫌氣的に fumarate に渡される可能性が大きい。この系と代似した NADH fumarate reductase 系は完全好氣的な *Mycobacterium phlei* の NADH oxidase 系にも認められており (Bogin *et al.*, 1969), 回虫の場合もこの系は必ずしも嫌氣下でのみ作働するのではなく、低酸素圧下での生理的代謝に組み込まれているのかもしれない。いずれにせよ低酸素下に棲息しており、しかもミトコンドリア系のリン酸化は主に NADH dehydrogenase 部において行なわれるという (Seidman & Entner, 1961; 林・中西, 1972) 回虫では、NADH からの電子を嫌氣的にも処理する経路の存在は特に重要な生理的意義をもつものと考えられる。

結 論

回虫筋ミトコンドリアの電子伝達系の機構について検討し、次のごとき結果を得た。

1. 回虫筋ミトコンドリアに基質 (succinate) で還元される cyt. c および b 型 cyt. の存在を認めた。
2. 回虫筋ミトコンドリアに認められた電子伝達活性とそれらに対する各種呼吸阻害薬の作用性は以下のごとくである。
 - 1) cyt. c peroxidase 活性は KCN ないし NaN_3 で阻害され、基質 H_2O_2 により促進された。
 - 2) succinate cyt. c reductase および succinate Neo-TB reductase 活性は malonate で阻害され、am-

ytal ないし rotenone では阻害されなかつた。succinate cyt. c reductase 活性は antimycin A によつても阻害された。

3) NADH を基質とした場合の cyt. c の還元は amytal, rotenone, antimycin A, KCN および H_2O_2 のいずれにも影響されなかつた。

4) NADH Neo-TB reductase 活性は無処理のミトコンドリアでは認められず、低張 KCl 溶液で処理したミトコンドリアでのみ認められ、amytal で阻害された。

5) fumarate ないし malate を基質とした場合の cyt. c ないし Neo-TB の還元は amytal ないし rotenone で阻害され、malonate では阻害されなかつた。

6) succinate を基質とした場合の O_2 uptake は malonate で阻害されたが、amytal ないし rotenone では影響されなかつた。

7) NADH を基質とした場合の O_2 uptake は amytal, rotenone および malonate のいずれによつても阻害された。

これらの知見にもとづいて、哺乳動物のチトクローム系とも Bueding により提唱されているフラビン酵素系とも若干機構を異にする電子伝達系を推定することができた。

参 考 文 献

- 1) Bogin, E., Higashi, T. and Brodie, A. F. (1969): Exogenous NADH oxidation and particulate fumarate reductase in *Mycobacterium phlei*. Arch. Biochem. Biophys., 129, 211-220.
- 2) Von Brand, T. (1952): Chemical Physiology

- of Endoparasitic Animals. Academic Press, New York, 339.
- 3) Von Brand, T. (1966) : Biochemistry of Parasites. Academic Press, New York and London, 238.
 - 4) Bueding, E. and Charms, B. (1952) : Cytochrome c, cytochrome oxidase and succinoxidase activities of helminths. J. Biol. Chem., 196, 615-627.
 - 5) Bueding, E., Entner, N. and Farber, E. (1955) : Dissociation of the succinoxidase systems of *Ascaris lumbricoides* and of rat kidney. Biochim. Biophys. Acta, 18, 305-306.
 - 6) Bueding, E. (1963) : Electron transport and fermentations in *Ascaris lumbricoides*. Control Mechanisms in Respiration and Fermentation. The Rondon Press Company, New York, 167-177.
 - 7) Chance, B. and Parsons, D. F. (1963) : Cytochrome function in relation to inner membrane structure of mitochondria. Science, 142, 1178-1180.
 - 8) Cheah, K. S. and Chance, B. (1970) : The oxidase system of *Ascaris*-muscle mitochondria. Biochim. Biophys. Acta, 223, 55-60.
 - 9) Chin, C. and Bueding, E. (1954) : Occurrence of oxidative phosphorylations in the muscle of *Ascaris lumbricoides*. Biochim. Biophys. Acta, 13, 331-337.
 - 10) Cooperstein, S. J. and Lazarow, A. (1951) : A microspectrophotometric method for the determination of cytochrome oxidase. J. Biol. Chem., 189, 665-670.
 - 11) Devlin, T. M. and Lehninger, A. L. (1956) : Oxidative phosphorylation by an enzyme complex from extracts of mitochondria. II. The span β -hydroxy butyrate to cytochrome c. J. Biol. Chem., 219, 507-518.
 - 12) 林栄一・寺田護・高村省三(1968) : 豚回虫の生存に及ぼす酸素圧の影響(1). 寄生虫誌, 17, 424-428.
 - 13) 林栄一・寺田護(1969) : 豚回虫の生存に及ぼす酸素圧の影響(2). 寄生虫誌, 18, 508-514.
 - 14) 林栄一・寺田護(1970) : 豚回虫の生存に及ぼす酸素圧の影響(3), 豚回虫の体色および体腔液色ならびにヘモグロビンに及ぼす酸素圧の影響. 寄生虫誌, 19, 265-277.
 - 15) 林栄一・寺田護(1971) : 豚回虫の生存に及ぼす酸素圧の影響(6). 寄生虫誌, 20, 276.
 - 16) 林栄一・中西一之 : 第32回日本寄生虫学会東日本大会発表.
 - 17) Hill, G. C., Perkiwski, C. A. and Mathewson, N. W. (1971) : Purification and properties of cytochrome c from *Ascaris lumbricoides*. Biochim. Biophys. Acta, 236, 242-245.
 - 18) 石川道雄(1971) : 豚回虫食道壁の組織化学的ならびに電子顕微鏡的研究. 寄生虫誌, 20, 275.
 - 19) Keilin, D. and Hartree, E. F. (1949) : Effect of low temperature on the absorption spectra of hemoproteins; with observations on the absorption spectrum of oxygen. Nature, 164, 254-259.
 - 20) Kikuchi, G., Ramirez, J. and Barron, E. S. G. (1959) : Electron transport system in *Ascaris lumbricoides*. Biochim. Biophys. Acta, 36, 335-342.
 - 21) Kikuchi, G. and Ban, S. (1961) : Cytochromes in the particulate preparation of the *Ascaris lumbricoides* muscle. Biochim. Biophys. Acta, 51, 387-389.
 - 22) 菊地吾郎(1963) : $\text{h}\mu$ 蛋白の生理作用. 蛋白質核酸酵素, 8(11), 3-10.
 - 23) Kmetec, E. and Bueding, E. (1961) : Succinic and reduced diphosphopyridine nucleotide oxidase systems of *Ascaris* muscle. J. Biol. Chem., 236, 584-591.
 - 24) Kmetec, E. Miller, J. H. and Swartzwelder, J. C. (1962) : Isolation and structure of mitochondria from *Ascaris lumbricoides* muscle. Exper. Parasit., 12, 184-191.
 - 25) Laser, H. (1944) : Oxidative metabolism of *Ascaris suis*. Biochem. J., 38, 333-338.
 - 26) Lee, D. L. and Smith, M. H. (1965) : Hemoglobins of parasitic animals. Exptl. Parasitol., 16, 392-424.
 - 27) Lehninger, A. L. (1955) : Harvey Lectures, 49, 176.
 - 28) Lenhoff, H. M. and Kaplan, N. O. (1956) : A cytochrome peroxidase from *Pseudomonas fluorescens*. J. Biol. Chem., 220, 967-982.
 - 29) Long, J. H. and Fenger, F. (1917) : On the normal reaction of the intestinal tract. J. Amer. Chem. Soc., 39, 1278-1286.
 - 30) Lowry, O. H. Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951) : Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193, 265-275.
 - 31) 大家裕(1967) : 回虫の代謝系糖質代謝を中心とする現在の問題点. 医学のあゆみ, 61, 292-301.
 - 32) Rathbone, L. (1955) : Oxidative metabolism in *Ascaris lumbricoides* from the pig. Biochem. J., 61, 574-579.
 - 33) Lester, R. L., Ziegler, D. M. and Green, D. E. (1957) : Studies on the mechanism of oxidative phosphorylation. Biochim. Biophys. Acta, 24, 155-160.
 - 34) Sato, M. and Ozawa, H. (1969) : Occurrence of ubiquinone and rhodoquinone in parasitic

- Nematodes, *Metastrongylus elongatus* and *Ascaris lumbricoides* var *suis*. J. Biochem., 65, 861-867.
- 35) 佐藤正, 山田耕二, 小沢光(1971): ロドキノンによるアセトン処理回虫コハク酸化酵素の活性回復, 生化学, 43, 647.
- 36) Sato, R., Omura, T. and Nishibayashi, H. (1965): Oxidases and Related Redox Systems, John. Wiley and Sons, 861.
- 37) Saz, H. J. and Hubbard, J. A. (1957): The oxidative decarboxylation of malate by *Ascaris lumbricoides*, J. Biol. Chem., 225, 921-932.
- 38) Saz, H. J. and Beuding, E. (1966): Relationship between anthelmintic effects and biochemical and physiological mechanisms. Pharmacological review, 18, 871-894.
- 39) Saz, H. J. (1969): Carbohydrate and energy metabolism of Nematodes and Acanthocephala. Chemical Zoology, Vol. III, Academic Press, New York and London, 329-360.
- 40) 柴田和雄(1968): 吸収および散乱スペクトルの測定とその原理. 蛋白質核酸酵素, 13, 344-369.
- 41) Schneider, W. C. and Hogeboom, G. H. (1950): Intracellular distribution of enzymes V. Further studies on the distribution of cytochrome c in rat liver homogenate. J. Biol. Chem., 183, 123-128.
- 42) Seidman, I. and Entner, N. (1961): Oxidative enzymes and their role in phosphorylation in sarcosomes of adult *Ascaris lumbricoides*. J. Biol. Chem., 236, 915-919.
- 43) Sels, A. A. and Cocriamont, C. (1968): Induced conversion of a protein precursor into cytochrome c peroxidase during adaptation of yeast to oxygen. Biochem. Biophys. Res. Commus. 32, 192-198.
- 44) Slater, E. C. (1956): Proc. 3rd. Intern. Congr. Biochem., Brussels, Academic Press, New York, 264.
- 45) Slater, T. F. (1963): Studies on a succinate-neo-tetrazolium reductase system of rat liver. (II) Points of coupling with the respiratory chain. Biochim. Biophys. Acta, 77, 383-393.
- 46) Szent-Grörgyi, A. V. (1924): Über den Mechanismus der Succin-und Paraphenylendiamin-oxidation. Ein Beitrag Zur Theorie der Zellatmung. Biochem. Z., 150, 195-210.
- 47) 田村三郎(1962): カイニン酸, およびその類似物質の駆虫作用に関する研究, 薬学雑誌, 82, 1604-1615.
- 48) Vernon, L. P., Mahler, H. R. and Sarkar, N. K. (1952): Studies on diphosphopyridine nucleotide-cytochrome c reductase. III Kinetic studies. J. Biol. Chem, 199, 599-606.
- 49) Yamashita, S. and Racker, E. (1969): Resolution and reconstitution of the mitochondrial electron transport system. (II) Reconstitution of succinoxidase from individual components. J. Biol. Chem., 244, 1220-1227.
- 50) Yonetani, T. and Ray, G. S. (1968): Studies on cytochrome c peroxidase (1) Purification and some properties. J. Biol. Chem., 240, 4503-4508.

Abstract

THE INFLUENCE OF OXYGEN PRESSURE ON THE SURVIVAL TIME OF *ASCARIS LUMBRICOIDES SUUM* (4) ON THE ELECTRON TRANSPORT SYSTEM CONTAINING CYTOCHROME C PEROXIDASE IN *ASCARIS* MUSCLE

EIICHI HAYASHI AND MAMORU TERADA

(Department of Pharmacology, Shizuoka College of Pharmaceutical Science, Shizuoka, Japan)

Conflicting results have been reported as to the participation of oxygen and the cytochrome components in the metabolism of *Ascaris lumbricoides suum*.

We have previously reported that the worms uptake a small amount of oxygen physiologically through a system containing hydroperoxidase.

In this report the cytochrome system in *Ascaris* muscle mitochondria was studied in more details to compare with that of mammals and to see the relation with the flavoprotein system by Bueding. The following results were obtained.

1. On an addition of succinate or $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ to the *Ascaris* muscle mitochondria, the absorption peaks of a cytochrome of the b type (557~558 $m\mu$) and cytochrome c (550 $m\mu$) were revealed.

2. The electron transfer activities demonstrated in the *Ascaris* muscle mitochondria were summarized as follows.

1) Cytochrome c peroxidase was inhibited by KCN or NaN_3 and stimulated by the substrate, H_2O_2 .

2) Succinate cytochrome c reductase and Neo-TB reductase were inhibited by malonated and not by amytal or rotenone. Succinate cytochrome c reductase was also inhibited by antimycin A.

3) The reduction of cytochrome c with NADH as substrate was insensitive to amytal, antimycin A, KCN and H_2O_2 .

4) NADH Neo-TB reductase was detected only in the mitochondria treated with hypotonic 0.015 M KCl solution and inhibited by amytal.

5) Fumarate or malate cytochrome c reductase and Neo-TB reductase were inhibited by amytal or rotenone and not by malonate.

6) Oxygen uptake with succinate as substrate was inhibited by malonate and not by amytal or rotenone.

7) Oxygen uptake with NADH as substrated was inhibited not only by amytal or rotenone, but also by malonate.

On the basis of these findings, a scheme of possible electron transport system, which is partially different from mammalian system as well as the flavoprotein system shown by Bueding, was proposed.