

## 回虫筋ミトコンドリアにおける ATP 生成

林 久 子

順天堂大学医学部寄生虫学教室

(昭和48年2月21日 受領)

## 緒 論

消化管寄生虫であるブタ回虫の成虫には、きわめて特殊な炭水化物の代謝経路の存在が知られている。Saz and Vidrine (1959), Saz and Weil (1960, 1962) らは一連の詳細な研究の結果、虫体に摂取されたグルコースは解糖系によりピルビン酸に変化し、そのピルビン酸はさらにジカルボン酸経路を逆行し、コハク酸を経てプロピオン酸に変わり、最終的には  $\alpha$ -メチル酪酸、および  $\alpha$ -メチルバレリアン酸が生成され、飼養液中に排泄されると主張している。一方、高等動物、微生物におけるミトコンドリアの形態、機能、構成要素等に関する研究は近年めざましい進歩を遂げ、これに関するすぐれた総説も数多く報告されている (Kagawa, 1972) が、複雑な生活環境に棲息する寄生虫のミトコンドリアに関する研究は非常に立ち遅れている。その中で比較的研究の進んでいる回虫のミトコンドリアは、哺乳類のミトコンドリアとは形態学的に異り、クリステが少く、また、電子伝達系も哺乳類にみられるものとは著しく異っている。電子伝達系にあって重要な役割を占めると考えられているキノン体については、Sato and Ozawa (1969); Ozawa *et al.* (1969); Sato *et al.* (1972) の研究があり、哺乳類に広く存在するユビキノンは、回虫にはみとめられず、別種のキノン体であるロドキノンの存在することが証明されているが、その機能はいまだあきらかでない。

チトクローム系については Kikuchi *et al.* (1959); Kikuchi and Ban (1961); Chance and Parsons (1963); Lee and Chance (1968) らが b, c 型のチトクロームの存在をあきらかにした。さらに最近、Cheah and Chance (1970) はきわめて微量であるが  $a_3$  型のチトクロームの存在を分光学的に立証している。しかしながら、本虫において証明された諸チトクロームの具体的機能については、いまだ十分に解明されるにいたっていない。

一方、酸化的リン酸化反応に関して、高等動物では酸化的リン酸化反応に関与する諸構成要素が抽出され、さらにそれらの構成要素の役割が次第に明らかになりつつあるが、回虫筋ミトコンドリアにおけるリン酸化反応を、このレベルで解析した研究はいまだなされていない。回虫筋ミトコンドリアのリン酸化反応に関しては、基質として TCA cycle の中間基質を用いたときのリン酸化能を検討した多くの報告がある (Chin and Bueding, 1954; Rathbone, 1955; Seidman and Entner, 1961; 大家・林, 1961; 板東・林, 1963; Saz and Lescure, 1969; Saz, 1971)。これらの研究はとくにリンゴ酸・コハク酸を中心として進められてきた。また Seidman and Entner (1961) らは、リンゴ酸を顆粒分画と反応させることにより、好気・嫌気両条件下でその値に変化がないことをみとめ、このリン酸化反応の機作に関して大胆な仮説を示した。すなわち、リンゴ酸からピルビン酸への酸化的脱炭酸はフマル酸からコハク酸への還元と共軛し、一方では、フマリクリダクターゼと共軛して ATP が生成されるというのである。その後、Saz (1971) はこの仮説を支持する報告をしているが、上記仮説を立証するに十分な成績とはいえない。

そこで著者は、回虫筋ミトコンドリアによるリンゴ酸依存性リン酸化反応の機序を、各構成要素段階で明らかにする目的で実験を進めつつあるが、このリン酸化反応の性格に関し興味ある事実を見いだしたので報告する。

## 実験方法

## I 試料の調製方法

実験材料：ブタ回虫 (*Ascaris lumbricoides var. suis.*) は東京芝浦屠場において入手した。虫体を  $37^{\circ}\text{C}$  に保温した Locke-Ringer 液に入れ実験室に運び、同液で洗浄した後、正常な雌虫を選び試料の調製に供した。

“Mitochondrial fraction” の調製：Laser (1944)

の方法にしたがつて虫体より分離した筋束を秤量した後、鉄で細切し、0.21M マニトール、0.01M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4)、0.1mM EDTA 混液で体腔液が除去されるまで洗浄した。さらにルーズな Potter-Elvehjem 型のホモジナイザーを用い、20%ホモジェネートを調製した。同ホモジェネートを 600×g、7分間遠心分離し、沈渣を除去してその上清を 5000×g、15分間遠心分離した。沈渣に存在する虫体内のグリコーゲンよう物質が混入せぬように注意深く沈渣をとり、同マニトール混液で2回洗浄し、その沈渣を筋 10g/ml になるようにマニトール混液に浮遊した。

“Submitochondrial fraction”の調製：“Mitochondrial fraction”を10KC、15分間、富永超音波発生装置 TI-100B 型を用いて処理し、“Submitochondrial fraction”を得た。

硫安分画の調製：“Submitochondrial fraction”をさらに 105.000×g、60分間遠心分離して得られた上清を“Supernatant fraction”とし、沈渣を“Precipitate fraction”とした。“Supernatant fraction”を16時間 0.01M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) で透析してマニトール液を除去した。透析後の“Supernatant fraction”に、硫酸アンモニウムを40%飽和になるよう攪拌しながら添加し、遠心分離により沈渣を除去した。さらにその上清に硫酸アンモニウムを65%飽和になるまで同様にして加え、遠心分離により沈渣を集めた。沈渣を蛋白量 5mg/ml になるように 0.01M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) に溶解した後、同緩衝液によつて16時間透析し、“40~65% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> fraction”として用いた。

以上全ての操作は2~4°Cの低温で行った。

## II 活性値の測定方法

リン酸化能の測定：<sup>32</sup>Piを用い、有機リンへの放射能の取り込みによつてリン酸化能の測定を行つた。反応組成は、Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) 16 μmoles, MgCl<sub>2</sub> 4 μmoles, ADP 2 μmoles, リン酸カリ緩衝液 (pH 7.4, 2.5×10<sup>5</sup>cpm/μmoles) 4 μmoles, 基質 6 μmoles, 試料 0.2ml, 全量 0.6ml とし30°Cで30分間反応させ、25%トリクロロ酢酸、0.05Mリン酸カリ混液で反応を停止した。リン酸エステル化した有機リンの定量は Nielson and Lehninger (1955) の方法に準じておこなつた。すなわち、反応液中の未反応の無機リン酸をリンモリブデン酸塩に導き、イソブタノールで抽出除去した。有機リンに含まれる放射能は、東芝 EAG 31103C 型の

GM カウンターによつて測定した。

リン酸エステル化した有機リンの同定：試料の同定は Hurlbert et al (1954) の方法に準じておこなつた。すなわち、反応液としてリン酸化能の測定に用いたものの2倍量を用い、終濃度 0.2Nの過塩素酸で反応を停止した後、これを氷冷下で KOH を用いて中和し、生じた過塩素酸カリを遠心分離により除去して、カラムクロマトグラフィー用の試料とした。ついで、イオン交換樹脂 Dowex 1 (200~400mesh) HCOO 型カラムを用い、展開剤ギ酸系によつて有機リンを試料より分離し、これをさらに上記と同じカラムを用い、展開剤をギ酸アンモニウム系にかえて再クロマトし、ATP 分画を得た。同分画の放射能の測定は、シンチレーターとして naphthalenedioxane (Brays, 1960) 10ml を使用し、パッカード、Tri-carb 液体シンチレーションカウンター 2003 型を用いておこなつた。

ATPase 活性の測定：反応組成は ATP 5 μmoles, MgCl<sub>2</sub> 5 μmoles, Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.6) 10 μmoles, “Mitochondrial fraction” 0.3ml, 全量 1 ml とし、30°Cで30分間反応させ、1N HClO<sub>4</sub> 0.5ml を加えて反応を停止、除蛋白した後、ただちに ATP より遊離した無機リンを古川ら (1952) の Fiske-Subbarow 法の改良法によつて測定した。

蛋白量の測定：Lowry et al (1951) の方法に基づいて蛋白量を測定した。

## III 試薬

アデノシン三リン酸 (ATP)、ゲアノシン三リン酸 (GTP)、シチジン三リン酸 (CTP)、イノシン三リン酸 (ITP) はペーリンガーマンハイム山之内 K.K. の製品を、アデノシン二リン酸は Sigma Chemical Company の製品を用いた。

ニコチンアミド・アデニン・ジヌクレオチド (NAD)、フラビン・アデニン・ジヌクレオチド (FAD)、は Sigma Chemical Company の製品を用い、ニコチン・アデニンジヌクレオチドリドリン酸 (NADP) はペーリンガーマンハイム山之内 K.K. の製品を用いた。

α-ケトグルタル酸、イソクエン酸はペーリンガーマンハイム山之内 K.K. の製品を用い、コハク酸は小宗化学薬品 K.K. の製品を、リンゴ酸は和光純薬工業 K.K. の製品を用いた。

オリゴマイシン、ロテノン は Sigma Chemical Company の製品を、アンチマイシン・A は協和醸酵 K.K. の製品を用いた。アミタールは第一化学薬品 K.K., 2, 4-

ジニトロフェノール (DNP) は東京化成 K.K. の製品をそれぞれ用いた。

イオン交換樹脂 Dowex 1 は室町化学工業 K.K. の製品を使用した。

$^{32}\text{P}$ i は日本アイソトープ協会より入手した。

その他の試薬は特級の市販品を用いた。

Table 1 Effect of substrate on  $^{32}\text{P}$ i incorporation into organic phosphate by *Ascaris* mitochondria.

The reaction system contained  $16\mu\text{moles}$  of Tris-HCl buffer (pH 7.4),  $4\mu\text{moles}$  of  $\text{MgCl}_2$ ,  $2\mu\text{moles}$  of ATP,  $4\mu\text{moles}$  of K-Phosphate buffer (pH 7.4,  $2.5 \times 10^5$  cpm/ $\mu\text{moles}$ ),  $6\mu\text{moles}$  of substrate and 0.2ml of "Mitochondrial fraction" in final volume of 0.6ml. In some experiment 0.06 $\mu\text{mole}$  of cofactor was added as indicated

The reaction mixture was incubated for 30 minutes at 30°C

Addition	$^{32}\text{P}$ i incorporated ( $\mu\text{moles}/\text{mg protein}$ )
None	0.056
FAD	0.060
NAD	0.056
NADP	0.056
Malate	0.847
Succinate	0.619
Succinate plus FAD	0.418
$\alpha$ -Ketoglutarate plus NAD	0.173
Iso citrate plus NADP	0.104

Table 2 Requirements for  $^{32}\text{P}$ i incorporation into organic phosphate by *Ascaris* muscle mitochondria

Reaction system and reaction period were the same as described in Table 1.

System	$^{32}\text{P}$ i incorporated ( $\mu\text{moles}/\text{mg protein}$ )	Ratio %
Complete	0.48	100
Minus malate	0.08	16
Minus ADP	0.04	8
Minus $\text{MgCl}_2$	0.24	50

### 実験成績

"Mitochondrial fraction" によるリン酸化反応に対する基質の影響—ATP と  $^{32}\text{P}$ i の存在下で、諸種基質を "Mitochondrial fraction" とともに好氣的条件下で反応させ、有機リンへの放射能の取り込みを検討した。表1にみられるように、リンゴ酸、コハク酸を基質として反応させたとき、有機リンへのとくに著明な放射能の取り込みがみとめられた。一方、 $\alpha$ -ケトグルタル酸、およびイソクエン酸を基質とした場合は、NAD および NADP のいずれの存在下においても有機リンへの放射能の取り込みはきわめて低い値しか得られなかつた。なお、マニトール混液の代りに、0.25M 蔗糖溶液を用いて調製した "Mitochondrial fraction" を用いても、リン酸化反応の活性値に変化はみとめられなかつた。

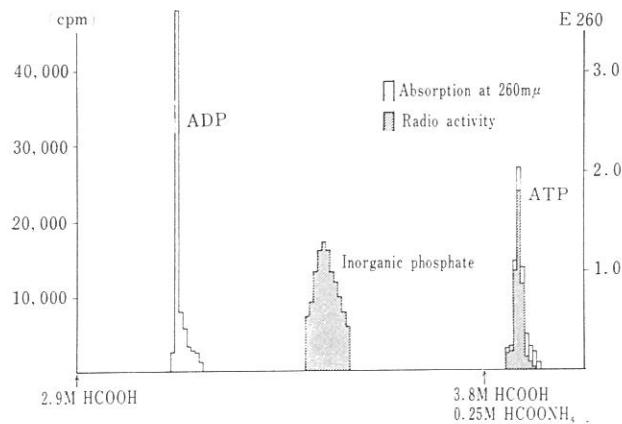


Fig. 1. Chromatography of the phosphorylated organic acids by the formic acid system. ATP and ADP of 0.5  $\mu\text{mole}$  each were added as carrier to the sample. The sample was eluted stepwise with formic acid. The optical density at 260  $\text{m}\mu$  and radio activity of the eluted fractions were plotted for each chromatographic fraction

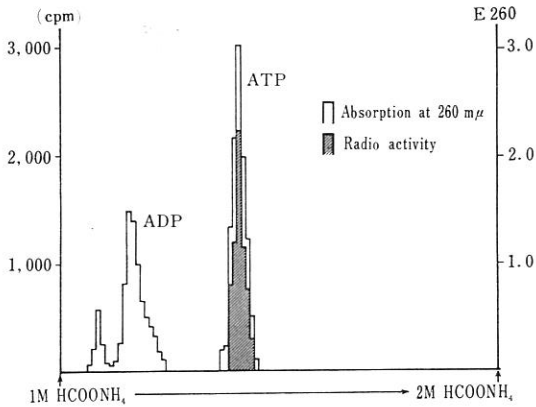


Fig. 2 Rechromatography on the ammonium formate system of ATP fraction from the formic acid chromatography of Fig. 1. ATP and ADP of  $0.5\mu\text{mole}$  each were added as carrier to the sample. The sample was eluted with the use of linear ammonium formate and formic acid gradient. The optical density at  $260\text{ m}\mu$  and radio activity of the eluted fractions were plotted for each chromatographic fraction.

また、リンゴ酸を基質としたとき、みられる有機リンへの放射能の取り込みには、 $^{32}\text{P}$ i の受容体として ADP cofactor として  $\text{Mg}^{2+}$  の存在が必要であった (表 2)。

リン酸エステル化された有機リンの同定——基質としてリンゴ酸を用い、“Mitochondrial fraction” とともに反応させて得られた放射性有機リンについては、イオン交換樹脂 Dowex 1 ギ酸型カラムを用いて前述の如く

ギ酸系で展開した結果、図 1 に示すように ATP の分画に放射能がみとめられた。さらにこの ATP 分画を同上カラムを用いてギ酸ナトリウム系で展開した結果、ATP の分画にのみ放射能がみだされた (図 2)。以上の結果から、回虫筋 “Mitochondrial fraction” によるリンゴ酸依存性リン酸化反応によって生成された有機リンは、ATP であることが確認された。

リンゴ酸依存性リン酸化反応に対する阻害剤の影響——表 3 に示したように、本リン酸化反応は、酸化的リン酸化反応における ATP 生成部位 Site I を特異的に阻害する阻害剤、ロテノン、アマタノールにより著しく阻害された。しかしながら、Site II を特異的に阻害する阻害剤、アンチマイシン A による阻害効果はきわめて低かった。脱共軛剤としてよく知られている 2,4-ジニトロフェノールによつては、著明な阻害効果がみとめられ、また、オリゴマイシンの添加によつても、本リン酸化反応は著しく阻害された。これらの結果は、好氣的条件での本リンゴ酸依存性リン酸化反応の特徴を示唆するものと考えられる。

“Mitochondrial fraction” における ATPase 活性の諸性質——ATPase 活性の特異性：無傷の “Mitochondrial fraction” では ATPase 活性は著しく低いが、 $\text{Mg}^{2+}$  の添加により著明な活性の上昇がみとめられた。しかしながら、 $4 \times 10^{-4}\text{M}$  2,4-ジニトロフェノールの存在下において、本 ATPase は pH 8.2 を至適 pH とし、僅かな活性の上昇がみとめられたが、この上昇は  $\text{Mg}^{2+}$  存在下における至適 pH 7.6 での活性の上昇に比し著しく低く、哺乳類ミトコンドリア ATPase の特徴の

Table 3 Effect of inhibitors on Phosphorylation by *Ascaris* mitochondria  
Reaction system and reaction period were the same as described in Table 1

Inhibitor	Concentration	$^{32}\text{P}$ i incorporated	Inhibition
		( $\mu\text{moles}/\text{mg protein}$ )	%
None		0.608	
Rotenone	$0.02\mu\text{g}/\text{ml}$	0.307	49.5
	$0.04\mu\text{g}/\text{ml}$	0.119	80.0
	$0.08\mu\text{g}/\text{ml}$	0.109	82.1
Amytal	$10^{-4}\text{M}$	0.321	47.2
	$10^{-3}\text{M}$	0.155	74.5
Oligomycin	$2\mu\text{g}/\text{ml}$	0.167	72.5
	$4\mu\text{g}/\text{ml}$	0.151	75.2
2,4-Dinitrophenol	$4 \times 10^{-4}\text{M}$	0.209	67.0
None		0.534	
Antimycin A	$3.3 \times 10^{-8}\text{M}$	0.486	9
	$3.3 \times 10^{-7}\text{M}$	0.447	16

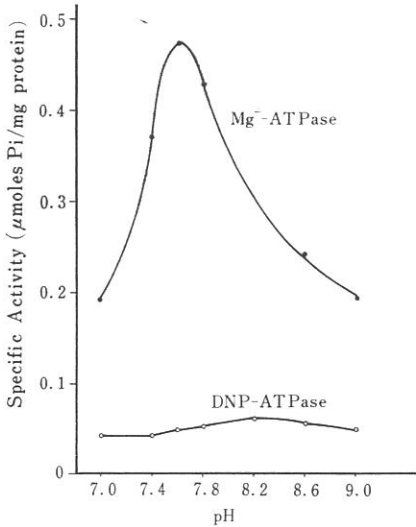


Fig. 3 Effect of pH on ATPase activity. Reaction system contained in a final volume of 1 ml, 5  $\mu$ moles of ATP, 5  $\mu$ moles of MgCl<sub>2</sub> or 0.4  $\mu$ mole of DNP, 10  $\mu$ moles of Tris-HCl buffer (pH 7.6), 0.3ml of mitochondrial fraction. Reaction mixtures were incubated for 30 minutes at 30°C. Enzyme activity was estimated as described in "Methods"

一つとされている2,4-ジニトロフェノールによる活性化と比較するときわだつた特徴を示した(図3)。10<sup>-5</sup>M, 10<sup>-6</sup>M 2,4-ジニトロフェノール存在下においても、4 × 10<sup>-4</sup>Mの場合と同じく活性の上昇はみとめられなかった。

ATPase 活性に対する2,4-ジニトロフェノールおよび金属イオンの効果: また図4に示すように、Mn<sup>2+</sup>はMg<sup>2+</sup>の場合と同じく本 ATPase 活性を著明に上昇させた。しかしながら、Mg<sup>2+</sup>あるいはMn<sup>2+</sup>の存在下で、2,4-ジニトロフェノールの添加によつて活性は低下した。Ca<sup>2+</sup>の存在により、単独では活性の上昇はきたさなかったが、2,4-ジニトロフェノールと共存することにより活性の上昇がみとめられた。以上金属イオンの回虫筋 mitochondrial fraction の ATPase に対する添加効果は、哺乳類ミトコンドリアにおける場合とほぼ類似した性質を示すが、Ca<sup>2+</sup>以外の金属イオンは2,4-ジニトロフェノールと共存した場合、2,4-ジニトロフェノール単独添加に比し、むしろ活性を低下させるという特徴を示した。

ATPase 活性に対するオリゴマイシンの効果: Mg<sup>2+</sup>存在下で活性化されたATPase 活性は、オリゴマイシンの添加により約30%阻害された。また回虫筋 "mito-

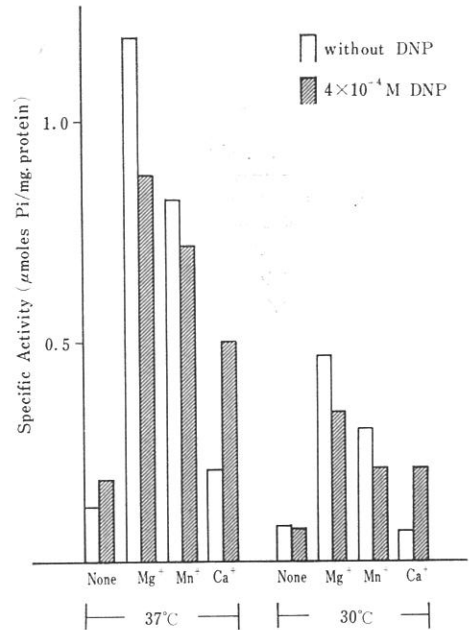


Fig. 4 Effect of metal ions on ATPase activity. Reaction system contained in a final volume of 1ml, 5  $\mu$ moles of ATP, 5  $\mu$ moles of MgCl<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub> or CaCl<sub>2</sub>, 10  $\mu$ moles of Tris-HCl buffer (pH 7.6), 0.3ml of "Mitochondrial fraction" and DNP indicated

chondrial fraction" の ATPase 自体の活性が低く、これに対する2,4-ジニトロフェノールの存在の影響もほとんどみとめられなかったことから、2,4-ジニトロフェノール存在下におけるオリゴマイシンの添加の影響をみとめることはできなかつた(表4)。

リンゴ酸依存性リン酸化反応および ATPase 活性に対する物理的処理の影響—Aging による影響: 回虫筋により得た無傷な "Mitochondrial fraction" を、30°C で1時間、2時間、3時間 Aging した後、それぞれの試料におけるリンゴ酸依存性リン酸化反応および ATPase 活性について検討した結果を図5に示した。リンゴ酸依存性リン酸化反応は Aging の時間経過とともに活性が低下したが、これに対し、ATPase 活性は aging の処理によつて影響されなかつた。本実験における対照として、同一条件下で調製したラット肝ミトコンドリアにおいて、リンゴ酸を基質としたリン酸化反応は時間の経過とともに急速な活性の低下をみた。2,4-ジニトロフェノール存在下における ATPase は、リン酸化反応と同様に、aging の時間の経過と共に急速な活性の

Table 4 Effect of oligomycin on ATPase activity of *Ascaris* muscle mitochondria  
Reaction system and reaction period were the same as described in Fig. 1

Addition	None		Mg <sup>+</sup>		2,4-Dinitrophenol	
	Specific activity ( $\mu$ moles/mg protein)	Inhibition %	Specific activity ( $\mu$ moles/mg protein)	Inhibition %	Specific activity ( $\mu$ moles/mg protein)	Inhibition %
None	0.093		0.427		0.072	
Oligomycin						
10 <sup>-6</sup> M	0.089	2	0.342	20	0.069	5
5 $\times$ 10 <sup>-6</sup> M	0.090	2	0.291	32	0.073	-1
10 <sup>-5</sup> M	0.091	2	0.277	35	0.076	-4

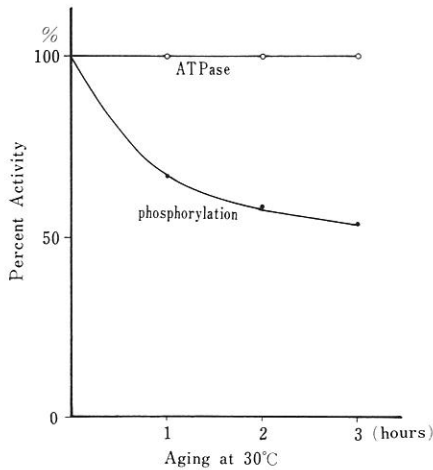


Fig. 5 Effect of aging on phosphorylation activity and Mg stimulated ATPase activity in *Ascaris* muscle mitochondria. Phosphorylation activity and ATPase activity were assayed in the same systems as described in Table 1 and Fig. 3 respectively

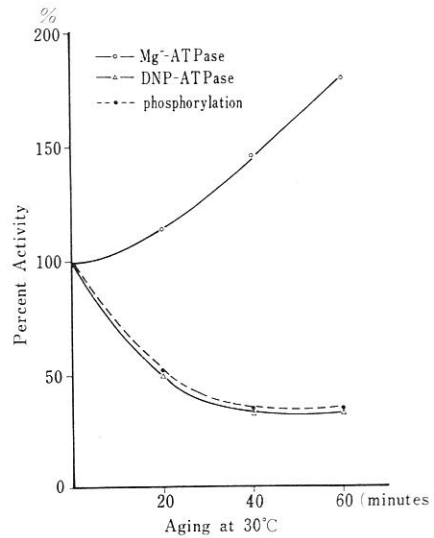


Fig. 6 Effect of aging on phosphorylation activity and Mg stimulated ATPase activity in rat liver mitochondria. Phosphorylation activity and ATPase activity were assayed in the same systems as described in Table 1 and Fig. 3 respectively

低下をきたしたが、Mg<sup>+</sup>存在下における ATPase は逆に活性が上昇した (図6)。

低張処理および超音波処理によるリンゴ酸依存性リン酸化反応および Mg-ATPase に対する影響：“Mitochondrial fraction”の分散媒マニトール混液を、蒸溜水と置換して低張処理を行った“Mitochondrial fraction”，および既述(実験方法)の方法にもとづいて得た超音波処理した“Mitochondrial fraction”におけるリンゴ酸依存性リン酸化反応においては、処理により著しい活性の低下がみとめられた。これに対し、それぞれの分画における Mg-ATPase 活性では、予期に反し、これら処理により僅かな活性の上昇しかみとめられなかった(表5)。

リンゴ酸依存性リン酸化反応および ATPase 活性の“Submitochondrial fraction”内分布——“Submitochondrial fraction”を 105,000 $\times$ g, 60分間、遠心分離によつて得られた“Precipitate fraction”および“Supernatant fraction”におけるリンゴ酸依存性リン酸化反応と、ATPase 活性の分布を表6に示した。“Submitochondrial fraction”におけるリンゴ酸依存性リン酸化反応の、Total activity の約2/3の活性が“Supernatant fraction”に存在した。ATPase 活性は“Supernatant fraction”にはほとんどみとめられず、“Precipitate fraction”にのみみとめられた。さ

Table 5 Effect of physical treatments of *Ascaris* mitochondria on phosphorylation and ATPase activities

Reaction system and reaction period were the same as described in Table 1

Treatment	$^{32}\text{P}$ i incorporation	ATPase
	( $\mu\text{moles/mg protein}$ )	( $\mu\text{moles/mg protein}$ )
None	0.616	0.234
Sonic vibration*	0.156	0.276
Hypotonic treatment**	0.308	0.295

\* Mitochondria was sonicated at 10KC for 15 minutes.

\*\* Mitochondria was suspended in distilled water.

Table 6 Phosphorylation and ATPase activities in *Ascaris* muscle mitochondrial preparations  
Reaction system and reaction period were the same as described in Table 1, except that submitochondrial, supernatant or precipitate fraction was substituted for mitochondrial fraction

Preparation	Phosphorylation activity		ATPase activity	
	Total activity	Specific activity	Total activity	Specific activity
	( $\mu\text{moles/g muscle}$ )	( $\mu\text{moles/mg protein}$ )	( $\mu\text{moles/g muscle}$ )	( $\mu\text{moles/mg protein}$ )
Submitochondrial fraction	0.164	0.156	0.518	0.495
Supernatant fraction	0.083	0.164	nil	nil
Precipitate fraction	0.042	0.110	1.320	2.636

\* Supernatant and Precipitate fractions are obtained the same as that described for "Method".

Table 7 Malate dependent phosphorylation in supernatant fraction  
Reaction system and reaction period were the same as described in Table 1 except ammonium sulfate fraction was substituted for mitochondrial fraction

Fraction	Total protein	Total activity	Specific activity
	(mg/g muscle)	( $\mu\text{moles/g muscle}$ )	( $\mu\text{moles/mg protein}$ )
Supernatant	0.506	0.083	0.164
Dialysate	0.506	0.062	0.122
0~40% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.266	nil	nil
40~65% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.070	0.069	0.985
65~80% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.040	nil	nil

Table 8 Requirments for phosphorylation by 40~65%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  fraction

Reaction system and reaction period were the same as described in Table 7

System	$^{32}\text{P}$ i incorporated	Ratio
	( $\mu\text{moles/mg protein}$ )	
Complete	0.812	100
Minus malate	0.166	20
Minus ADP	0.058	7
Minus $\text{MgCl}_2$	0.206	25

らに、この "Supernatant fraction" を透析後硫酸塩折した結果、"40~65%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  fraction" にリンゴ酸依存性リン酸化反応の活性がみとめられた (表7)。この "40~65%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  fraction" におけるリンゴ酸依存性リン酸化反応の進行に、ADP と  $\text{Mg}^{2+}$  の存在が必要であり (表8)、生成された有機リンは、前述のイオン交換樹脂 Dowex 1 を用いて分析した結果、ATP であることがあきらかとなった。

"40~65%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  fraction" によるリン酸化反応に対する阻害剤の影響——表9に示すように、本分画

Table 9 Effect of inhibitor on phosphorylation by 40~65% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> fraction  
Reaction system and reaction period were the same as described in Table 7

Inhibitor	Concentration	<sup>32</sup> Pi incorporated	Inhibition
		( $\mu$ moles/mg protein)	%
None		0.985	0
Rotenone	0.04 $\mu$ g/ml	0.966	1.9
Oligomycin	4 $\mu$ g/ml	1.463	
2,4-Dinitrophenol	4 $\times 10^{-4}$ M	0.843	14.4

によるリンゴ酸依存性リン酸化反応では、ロテノンの添加による阻害効果はほとんどみとめられなかつた。2,4-ジニトロフェノールの添加は僅かな阻害をもたらしたが、オリゴマイシンの添加によつて活性はむしろ促進された。一方この分画のしめす ATPase 活性についても検討をおこなつたが、本分画に ATPase 活性をみとめることはできなかつた。

### 考 察

本実験において、回虫筋より得られた無傷の“Mitochondrial fraction”は、リンゴ酸およびコハク酸の存在下で高いリン酸化反応の活性を示し(表1)、また、“Submitochondrial fraction”の10万 $\times$ g上清より得られた“40~65%(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> fraction”もリンゴ酸依存性リン酸化反応の活性を有すること(表7)があきらかとされた。

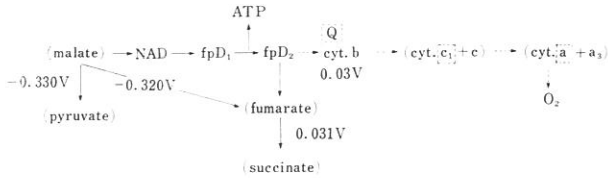
無傷の“Mitochondrial fraction”によるリンゴ酸依存性リン酸化反応はロテノン、アマタールによつて阻害され(表3)、本リン酸化反応には電子伝達系が関与していることが強く示唆された。しかしながら、Site IIの特異的阻害剤であるアンチマイシン・Aの本リン酸化反応に対する阻害効果はきわめて低い(表3)。また、本虫のチトクローム系については、Kikuchi *et al* (1959), Kikuchi and Ban (1961), Chance and Parsons (1963), Lee and Chance (1968)らはチトクローム b, c の存在をみとめながらも、a群の検出に成功しなかつた。その後 Cheah and Chance (1970)は、リンゴ酸、コハク酸および $\alpha$ -グリセロリン酸によつて還元されるb, c, a型の各チトクロームを低温スペクトラムによつて検出はしたが、これら諸チトクロームの存在する割合が哺乳類のそれと著しく異つていることをみとめた。したがつて、本虫のチトクローム系が本来のチトクローム系の機能を果しているとは考え難い。哺乳類ミトコンドリアにおいては、Site II, Site III は Site

Iとともにチトクローム系での ATP 生成部位とされているが、上述の事実から考えて、回虫筋ミトコンドリアにおいて Site II, Site III における ATP 生成が存在するとは考えることは困難である。したがつて、本虫の無傷なミトコンドリアにおける ATP 生成部位は呼吸鎖 Site I におけるものと推定される。

一方、本リン酸化反応が2,4-ジニトロフェノールおよびオリゴマイシンによつて阻害されたこと(表3)は、本リン酸化反応にエネルギー転移反応、すなわち、ATPase が関与していることを示している。一般にミトコンドリア ATPase はミトコンドリアの基本粒子の頭部に局在することが知られており、本虫のミトコンドリアも基本粒子の存在することが Chance and Parsons (1963)によつて電顕的にあきらかにされている。しかしながら、この基本粒子と ATPase の関係は、回虫においてははまだあきらかにされていない。また、回虫“Mitochondrial fraction”の ATPase がオリゴマイシンによつて阻害されたこと(表4)は、本 ATPase がリン酸化反応に関与していることを示唆している。しかしながら、本 ATPase は一般のミトコンドリア ATPase と異り、2,4-ジニトロフェノールによつて活性化されないという特徴をもつており、“Mitochondrial fraction”に対する物理的損傷により、リン酸化反応活性は著しく低下を来たすにもかかわらず、本 ATPase 活性は影響を受けないことから、回虫筋の“Mitochondrial fraction”の ATPase は膜から遊離し難い性質を有していることも考えられ、回虫のミトコンドリアの Site I における ATP 生成が哺乳類のそれと全く同一機構によるものとは考え難い。

筆者が好氣的条件下で得た成績は、Saz (1971)が嫌氣的条件下でリン酸化反応に対する阻害剤の影響を検討した成績と一致している。これらを総合すると、回虫筋ミトコンドリアにおける ATP 生成機構は次のように推定されよう。





回虫筋の無傷なミトコンドリアのリンゴ酸依存性リン酸化反応においては、熱力学的考察から、リンゴ酸は、リンゴ酸脱水素酵素によりオキサロ酢酸に変化するのではなく、Seidman and Entner (1961) によつて想定されているように、エネルギー準位の高い  $\text{malate}^{2-} + \text{H}^+ = \text{Pyruvate} + \text{CO}_2 + \text{H}_2$  系（マリックエンザイム）によつて変化するものと考えられる。この際、リンゴ酸より放出された  $\text{H}^+$  は NAD に伝達され、さらにフラボプロテインを介し、最終的には、 $\text{Cyt. b; } 2\text{Fe}^{2+} + 2\text{H}^+ = 2\text{Fe}^{3+} + \text{H}_2$  反応系とほぼ等しい酸化還元電位をもつ  $\text{succinate}^{2-} = \text{fumarate}^{2-} + \text{H}_2$  反応系のフマル酸に伝達され、コハク酸が生成されると考えられる。上述の反応経路に関与すると考えられるフラボプロテインについては、すでに Lee and Chance (1968) が、回虫筋ミトコンドリアにリンゴ酸によつて還元される 2 種類のフラボプロテインが存在することをあきらかにしており、また、同時にリンゴ酸によるこれらフラボプロテインの還元に対するロテノン、脱共扼剤の効果から、これらフラボプロテインがエネルギー生成反応に関与している可能性を示唆している。また Papa (1970) はリンゴ酸からのフマル酸、コハク酸およびピルビン酸の生成に関して、ロテノンの添加がコハク酸の生成を阻害することを示している。これらの報告は本リン酸化反応に対するロテノンの効果と一致し、上記想定を支持するものと考えられる。

一方、“40~65%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  fraction” によるリンゴ酸依存性リン酸化反応は、Site I の電子伝達系の複合体である Complex I、およびエネルギー転移反応を触媒する  $\text{F}_1$  (ATPase) の混在に起因する可能性が考えられるが、試料調製方法からみて、この分画に Complex I が存在する可能性はほとんどなく、ロテノンによる本分画のリン酸化反応の阻害がみとめられなかつたことから、Complex I が存在することは考え難い。また、本分画において ATPase 活性がみとめられなかつたことから上述の可能性はほとんど有り得ないと考えられる。また、本リン酸化反応が単なる ATP-Pi 交換反応の誤認である可能性も考えられるが、Fischer *et al*

(1971) が ATP-Pi および ADP-Pi 交換反応が、脱共扼剤およびオリゴマイシンによつて阻害されると報告しているにもかかわらず、本リン酸化反応は 2,4-ジニトロフェノールによる阻害効果がきわめて低く、オリゴマイシンによつても阻害されなかつたことから、これが ATP-Pi 交換反応である可能性は考えられない。したがつて、本リン酸化反応が、無傷なミトコンドリアにおける、呼吸鎖 Site I でのリン酸化反応とは全く別の機構による反応であることはあきらかである。

以上、回虫筋ミトコンドリアには、全く別の機構による 2 種類のリンゴ酸依存性リン酸化反応が存在するが、とくに“40~65%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  fraction” にみとめられたリン酸化反応は、一般にミトコンドリアに存在するリン酸化反応とは全く別の新しい型のものであり、そのエネルギー生成反応としての意義はまことに興味深い。

### むすび

回虫筋から調製された“Mitochondrial fraction”において、リンゴ酸存在下で高いリン酸化反応の活性がみとめられた。また、“Submitochondrial fraction”の 10 万×g の“Supernatant fraction”から得られた“40~65%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  fraction”にも、リンゴ酸存在下においてリン酸化反応の活性がみとめられた。

これら両分画において、リン酸エステル化された有機リンはいずれも ATP であることを確認した。

前者におけるリン酸化反応は無傷なミトコンドリアにおいてのみみとめられた。本リン酸化反応には電子伝達系およびエネルギー転移反応が関与し、ATP は Site I で生成されると考えられる。

後者におけるリン酸化反応には電子伝達系および ATPase が関与しておらず、したがつて、前者におけるリン酸化反応とは全く別の機構によるものと考えられる。

稿を終るに臨み、終始御指導・御校閲を賜つた大家裕教授に、また種々御助言を賜つた本学薬理学教室・板東丈夫教授；本学生化学教室・関根隆光教授；東京理科大学・上野芳夫教授に深甚の謝意を表し、併せて種々御協力下さつた、本学寄生虫学教室の方々へ感謝の意を表します。

### 文 献

- 1) 板東丈夫・林 久子 (1963)：回虫筋による TCA cycle member の利用と燐酸化反応。寄

- 生虫誌, 12, 300.
- 2) Brays, G. A. (1960) : A simple efficient liquid scintillator for counting aqueous solutions in a liquid scintillation counter. *Anal. Biochem.*, 1, 279-285.
  - 3) Chance, B. and Parsons, D. F. (1963) : Cytochrome function in relation to inner membrane structure of mitochondria. *Science*, 142, 1176-1180.
  - 4) Cheah, K. S. and Chance, B. (1970) : The oxidase systems of *Ascaris* muscle mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta*, 223, 55-60.
  - 5) Chin, C. and Bueding, E. (1954) : Occurrence of oxidative phosphorylation in the muscle of *Ascaris lumbricoides*. *Biochim. Biophys. Acta*, 13, 331-337.
  - 6) Fisher, R. J., Chen, J. C., Sani, B. P., Kappay, S. S. and Sanadi, D. R. (1971) : A soluble mitochondrial ATP synthetase complex catalyzing ATP-phosphate and ATP-ADP exchange. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 68, 2181-2184.
  - 7) 古川美採・種田雅子・中村康吉・春日誠次・吉川春寿(1952) : 比色法による燐酸定量についての検討. *生化学*, 24, 76-82.
  - 8) Hurlbert, R. B., Schmitz, H., Brumm, A. F. and Potter V. R. (1954) : Nucleotide metabolism. II. Chromatographic separation of acid-soluble nucleotides. *J. Biol. Chem.*, 209, 23-54.
  - 9) Kagawa, Y. (1972) : Reconstitution of oxidative phosphorylation. *Biochim. Biophys. Acta*, 265, 297-338.
  - 10) Kikuchi, G. and Ban, S. (1961) : Cytochromes in the particulate preparation of the *Ascaris lumbricoides* muscle. *Biochim. Biophys. Acta*, 51, 387-389.
  - 11) Kikuchi, G., Ramirez, J. and Barron, E. G. S. (1959) : Electron transport system in *Ascaris lumbricoides*. *Biochim. Biophys. Acta*, 36, 335-342.
  - 12) Laser, H. (1944) : The oxidative metabolism of *Ascaris suis*. *Biochem. J.*, 38, 333-338.
  - 13) Lee, Y. and Chance, B. (1968) : Activation of malate linked reductions of NAD and flavoproteins in *Ascaris* muscle mitochondria by phosphate. *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, 32, 547-553.
  - 14) 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.
  - 15) Nielson, S. O. and Lehninger, A. L. (1955) : Phosphorylation coupled to the oxidative of ferrocytochrome c. *J. Biol. Chem.*, 215, 555-570.
  - 16) 大家 裕・林 久子(1961) : 回虫筋におけるリンゴ酸の代謝 (1) 顆粒分画による燐酸化反応. *寄生虫誌*, 10, 25.
  - 17) Ozawa, H., Sato, M., Natori, S. and Ogawa, H. (1969) : Occurrence of Rhoquinone-9 in the muscle of *Ascaris lumbricoides var. suis*. *Experientia*, 25, 484-485.
  - 18) Papa, S., Cheah, K. S., Rasmussen, H. N., Lee, Y. and Chance, B. (1970) : Mechanism of malate utilization in *Ascaris* muscle mitochondria. *Eur. J. Biochem.*, 12, 540-543.
  - 19) Rathbone, L., (1955) : Oxidative metabolism in *Ascaris lumbricoides* from the pig. *Biochem. J.*, 61, 574-579.
  - 20) Sato, M. and Ozawa, H. (1969) : Occurrence of ubiquinone and rhoquinone in parasitic nematodes, *Metastrongylus elongatus* and *Ascaris lumbricoides var. suis*. *J. Biochem.*, 65, 861-867.
  - 21) Sato, M., Yamada, K. and Ozawa, H. (1972) ; Rhoquinone specificity in the reaction of succinoxidase activity of acetone-extract *Ascaris* mitochondria. *Biochem. Biophys., Res. Commun.*, 46, 578-582.
  - 22) Saz, H. J. (1971) ; Anaerobic phosphorylation in *Ascaris* mitochondria and the effects of anthelmintics. *Comp. Biochem. Physiol.*, 390, 627-637.
  - 23) Saz, H. J. and Lescure, O. L. (1969) ; The function of phosphoenolpyruvate carboxylase and malic enzyme in the anaerobic formation of succinate by *Ascaris lumbricoides*.
  - 24) Saz, H. J. and Vidrine, A. (1959) ; The mechanism of formation of succinate and propionate by *Ascaris lumbricoides* muscle. *J. Biol. Chem.*, 234, 2001-2005.
  - 25) Saz, H. J. and Weil, A. (1960) ; The mechanism of the formation of  $\alpha$ -methylbutyrate from carbohydrate by *Ascaris lumbricoides* muscle. *J. Biol. Chem.*, 235, 914-918.
  - 26) Saz, H. J. and Weil, A. (1962) ; Pathway of formation of  $\alpha$ -methylvalerate by *Ascaris lumbricoides*. *J. Biol. Chem.*, 237, 2053-2056.
  - 27) 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.

**Abstract**ATP FORMATION BY MITOCHONDRIA FROM *ASCARIS*  
*LUMBRICOIDES* VAR. *SUIS*

HISAKO HAYASHI

*(Department of Parasitology, School of Medicine,  
Juntendo University, Tokyo)*

Intact mitochondria preparation isolated from the muscle of *Ascaris lumbricoides* showed a high phosphorylation activity in the presence of malate or succinate. Furthermore, malate-enhanced phosphorylation activity of 40 to 65% saturated ammonium sulfate fraction obtained from centrifuged supernatant of sonicated mitochondrial fraction.

Organic phosphate which was phosphorylated in the presence of malate by both preparations mentioned above was confirmed to be ATP.

Malate dependent phosphorylation activity in the mitochondria preparation was inhibited markedly by the addition of rotenone or amytal, suggesting the dissociation of electron transfer chain at site 1. Antimycin A failed to show a noticeable inhibition on this phosphorylation and some decrease of phosphorylation activity was observed by the addition of 2,4-dinitrophenol [DNP], well known uncoupler of oxidative phosphorylation. Oligomycin, an inhibitor of energy transfer reaction, arrested also this phosphorylation. These results could be taken as the evidence that malate dependent phosphorylation in intact *Ascaris* mitochondria was associated with both electron transport and energy transfer reactions, and ATP generation in this case occurred at site 1 of the respiratory chain. However, the mitochondria of *Ascaris* was distinct from that of mammals in the characteristics of ATPase activity. ATPase activity in *Ascaris* mitochondria was not accelerated in the presence of DNP which is known to stimulate ATPase activity in mammalian mitochondria.

On the other hand, malate dependent phosphorylation in 40 to 65% saturated ammonium sulfate fraction was not inhibited by the addition of rotenone or oligomycin, while a slight inhibition was obtained by the addition of DNP. In addition, the hydrolysis of ATP by this fraction proceeded at a relatively low rate. These results suggest that the phosphorylation in this fraction was associated with neither electron transport nor energytransfer reaction.

From the results obtained in the present studies, it could be concluded reasonably that malate dependent phosphorylation in *Ascaris* mitochondria is accomplished in two different mechanisms.