

豚回虫の生存に及ぼす酸素圧の影響(5)

豚回虫筋および卵巣ミトコンドリアに
おける呼吸基質の透過性

林 栄 一 中 西 一 之 寺 田 護

静岡薬科大学薬理学教室

(昭和48年10月5日 受領)

緒 言

哺乳動物の代謝調節においては、膜による compartmentation とか膜透過における機構が重要な要因のひとつであることが知られている(尾形ら, 1969). 著者らの豚回虫(以下回虫)筋ミトコンドリアについての先の実験から、哺乳動物同様に compartmentation が代謝調節に関与していることが推察された(林・寺田, 1973, 林ら, 1973a, b).

一方膜透過における機構に関しても、Chance らが回虫筋ミトコンドリアで認めたと同様に(Lee & Chance, 1968, Papa *et al.*, 1970), 著者らも回虫の筋および卵巣ミトコンドリアへ呼吸基質が透過するさい無機リン(phosphate, 以下 Pi) の関与を示唆する結果を得た(林・中西, 1973).

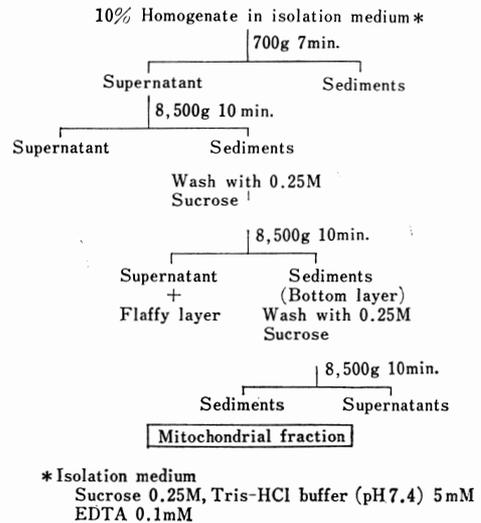
ところで回虫の筋と卵巣とはその機能が異なっており、両者のミトコンドリアの電子伝達系の機構にも著明な相違が認められている(林ら, 1973a). そこで今回は呼吸基質のミトコンドリアへの透過という観点から追究し、両者の電子伝達系の機構の相違の一端を明らかにしたので報告する。

実験方法

1) 筋ミトコンドリア分画法

屠場より入手した豚回虫(雌)を抗生物質(penicillin 10万単位/l, streptomycin 0.75mg/l)添加 Tyrode 液で一夜飼養後、冷 Tyrode 液(2~4°)に浸漬、筋束を分離した。

筋束は、0.25M sucrose 液で数回洗浄後、細切。つぎに Potter-Elvehjem 型ホモジナイザーに筋1g 当り 9 ml の分離用メデウム(sucrose 0.25M, Tris-HCl



Scheme 1 Preparation of *Ascaris* Muscle Mitochondria

buffer 5 mM pH 7.4, EDTA 0.1mM 含有) を加え、2~3分間磨砕した。この10%ホモジネートを、Schnieder & Hegeboom (1950) の方法に準拠して、0~4°下で遠沈分画した(Scheme 1)。この場合、8,500g, 10分で得た沈渣は比較的境界鮮明な2層からなり、上層は乳白色をした柔らかい層(fluffy layer)、下層は比較的硬い褐色の層であった。上層を除き、下層を0.25M sucrose 液で洗浄、再び8,500g, 10分の遠沈操作後、得た沈渣を0.25M sucrose 液に懸濁し、筋ミトコンドリア標品とした。

また、低張処理ミトコンドリア標品は、この下層を0.015M KCl 液で0°, 10分間処理したのち、0.25M sucrose 液に懸濁して得た。

凍結融解処理ミトコンドリア標品は、0.25M sucrose 液に懸濁したミトコンドリア標品を、ドライアイスアセトン溶液で凍結、室温で融解という操作(Lee & Chance, 1968)を4回繰り返すことによつて得た。

実験に用いた各標品は、実験ごとに調製した。

2) 卵巣ミトコンドリア分画法

1) の筋ミトコンドリア分画法を用いて、卵巣のミトコンドリア分画を得た。

3) O₂ uptake 測定法

ワールブルグ検圧計を用い、37°, 10分間の温度平衡後、空気を気相として O₂ uptake を測定した。

反応液は、sucrose 0.25M, Tris-HCl buffer 0.16M pH 7.4, MgCl₂ 3 mM, 基質 5 mM およびミトコンドリア標品 (5.1~6.7mg protein) を加え、全量2.0ml とした。

比活性は uptake O₂ μ l/hr/mg protein として求めた。

4) cyt. c 還元活性測定法

日立 EPS-2U 型自記分光光度計を用いて、オパールグラス法(柴田, 1968)により、550m μ の吸光度の変化から測定した。

反応は室温 (25°) で静置下おこなつた。反応液は、sucrose 0.25M, Tris-HCl buffer 20mM pH 7.4, EDTA 1 mM, bovine serum albumin 0.15%, cyt. c 0.13 μ moles, 基質10mM およびミトコンドリア標品 (2.2~5.8mg protein) を加え、全量3.5ml とした。

ただし、NADH (1.5mM) を基質とした場合の反応液は、sucrose 0.25M, K-phosphate buffer 0.05M pH 7.4, cyt. c 0.13 μ moles およびミトコンドリア標品 (0.8~1.7mg protein) を加えた。

比活性は m μ moles of cyt. c reduced/min/mg protein として求めた。

5) neo-tetrazolium blue (以下 Neo-TB) 還元活性測定法

4) と同様の方法により、530m μ の吸光度の変化から測定した。反応は室温 (25°) で静置下おこなつた。反応液は全量3.5ml とし、その中に sucrose 0.25M, Tris-HCl buffer 20mM pH 7.4, EDTA 1 mM, bovine serum albumin 0.15%, Neo-TB 0.1%, 0.2ml, 基質10mM (NADH のみ 1.5mM) およびミトコンドリア標品 (4.6~7.8mg protein) を含む。

比活性は Δ O.D. 530/min/mg protein として求めた。

6) malate-Neo-TB 還元活性に対する Pi および Arsenate (以下 As) の至適濃度測定法

反応液として sucrose 0.25M, Tris-HCl buffer 0.16 M pH 7.4, MgCl₂ 3 mM, Neo-TB 0.1%, 0.2ml, malate 5 mM, Pi (または As) および筋ミトコンドリア標品 (3.6~4.1mg protein) を加え、全量3.0ml とした。37°, 3分間インキュベーションしたのち、20% トリクロロ酢酸 1.0ml で反応を停止し、生成した formazan を4.0ml の酢酸エチルで抽出、530m μ の吸光度を測定した。

7) malic enzyme および malate dehydrogenase 活性測定法

4) と同様の方法により、NAD の還元速度を340m μ の吸光度の変化から測定した。

反応は室温 (25°) で静置下おこなつた。反応液は全量4.5ml とし sucrose 0.25M, Tris-HCl buffer 20mM pH 7.4, EDTA 1 mM, bovine serum albumin 0.15 %, MnCl₂ 2 mM, rotenone 0.07mM, NAD 0.7mM, malate 7.5mM および凍結融解処理ミトコンドリア標品 (0.9mg protein) を含む。

比活性は μ moles of NADH reduced/min/mg protein として求めた。

8) タンパク質の定量

Lowry *et al.* (1951) の方法でおこなつた。

9) 試薬

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.; 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

(A) 筋ミトコンドリアの O₂ uptake, cyt. c および Neo-TB 還元活性におよぼす各種呼吸基質の影響

TCA cycle 中間体および NADH が、筋ミトコンドリアの電子伝達系の基質となりうるか否かを O₂ uptake, cyt. c および Neo-TB 還元活性を指標として検討した。

その結果、succinate, malate, fumarate および NADH を基質とした場合、O₂ uptake, cyt. c および Neo-TB 還元活性が認められた。また、 α -ketoglutarate が基質の場合、O₂ uptake 活性のみが認められ、citrate および pyruvate が基質の場合、いずれの活性も認められなかった (Table 1)。

Table 1 Effects of various substrates on the electron transport system in *Ascaris* muscle mitochondria

Substrate	O ₂ uptake	Cyt. c reductase	Neo-TB reductase
Succinate	+	+	+
L-Malate	+	+	+
Fumarate	+	+	+
NADH*	+	+	+
α -Ketoglu	+	-	-
Citrate	-	-	-
Pyruvate	-	-	-

* Mitochondria with treatment was used.

したがって、succinate, malate, fumarate および NADH を基質として、筋および卵巣ミトコンドリア膜透過性について検討を加えた。

(B) succinate の筋および卵巣ミトコンドリア膜透過性

1) O₂ uptake 活性

succinate (5 mM) を基質とした場合、筋ミトコンドリアによる O₂ uptake の比活性は約 9.2 μ l/hr/mg protein であつた。

この活性は、Pi (6 mM) および As (10mM) で30分までは影響されなかつたが、60分ではそれぞれ約1.4

倍促進された (以下 Table 2 参照)。

2) cyt. c 還元活性

a) succinate (10mM) を用いた場合、筋ミトコンドリアによる cyt. c 還元の比活性は約 8.09 μ moles of cyt. c reduced/min/mg protein であつた。

この活性は、Pi (3 mM) および As (3 mM) でそれぞれ約 1.6, 1.3 倍促進された。

この Pi, As による促進効果は、凍結融解処理で筋ミトコンドリア膜を破壊することによって消失した。

b) 卵巣ミトコンドリアによる cyt. c 還元の比活性は、筋ミトコンドリアとほぼ同程度であつた。

この活性は、Pi (3 mM) および As (3 mM) で影響されなかつた。

3) Neo-TB 還元活性

a) succinate (10mM) を基質とした場合、筋ミトコンドリアによる Neo-TB 還元の比活性は 4O.D. 530 0.027/min/mg protein であつた。

この活性は、Pi (3 mM) および As (3 mM) でわずかに促進された。

b) 卵巣ミトコンドリアによる Neo-TB 還元の比活性は 4O.D. 530 0.018/min/mg protein であつた。

この活性は、Pi (3 mM) および As (3 mM) でそれぞれ約 30% 抑制された。

(C) NADH の筋ミトコンドリア膜透過性

Table 2 Effects of Pi and As on O₂ uptake, Cyt. c and Neo-TB reductase activities with succinate as substrate in *Ascaris* muscle and ovary mitochondria

		O ₂ uptake		Cyt. c reductase				Neo-TB reductase	
		S.A.*	% Change	without treatment	treatment		S.A.	% Change	
				S.A.	% Change	S.A.	% Change		
Muscle	Control	9.2	100	8.09	100	16.68	100	0.027	100
	Pi	12.8	139	12.64	156	15.48	93	0.030	111
	As	13.8	148	10.36	128	13.76	83	0.030	111
Ovary	Control			8.00	100			0.018	100
	Pi			8.00	100			0.013	72
	As			8.00	100			0.012	67

Additions

O₂ uptake: Succinate 5mM, Pi (Phosphate) 6mM, As (Arsenate) 10mM

Cyt. c reductase: Succinate 10mM, Pi 3mM, As 3mM

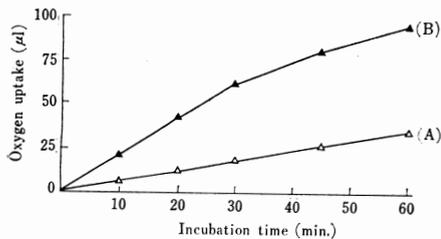
Neo-TB reductase: Succinate 10mM, Pi 3mM, As 3mM

* S.A.: Specific Activity

O₂ uptake: μ l/hr/mg protein

Cyt. c reductase: μ moles of cyt. c reduced/min/mg protein

Neo-TB reductase: 4O.D.₅₃₀/min/mg protein

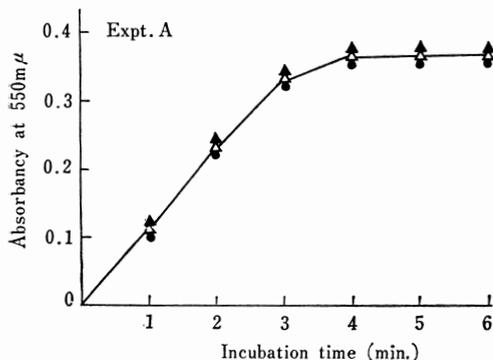


Expt. A (—△—)
 Reaction system
 Mitochondria without treatment 3.52 mg protein
 NADH 5mM
 Medium : Sucrose 0.25M; Tris-HCl buffer 0.16 M pH 7.4
 MgCl₂ 3 mM
 Total : 2.0ml; Temp. : 37°
 Expt. B (—▲—)
 Reaction system
 Mitochondria with treatment 3.12mg protein
 NADH 5mM
 Reaction medium as in Expt. A

Fig. 1 Comparison of oxygen uptake with NADH as substrate by *Ascaris* muscle mitochondria with or without treatment

1) O₂ uptake 活性

NADH (5 mM) を基質とした場合、筋ミトコンドリアによる O₂ uptake の比活性は、約 9.7 μl/hr/mg protein であった。



Expt. A
 Reaction system
 Mitochondria without treatment 1.68 mg protein; NADH 1.5 mM; Cyt. c 0.13 μmoles
 Medium : Sucrose 0.25M; K-phosphate buffer 0.05 M pH 7.4
 Total : 3.5 ml; Temp. : 25°

Expt. B
 Reaction system
 Mitochondria with treatment 0.84 mg protein; NADH 1.5mM; Cyt. c 0.13 μmoles
 Reaction medium as in Expt. A
 —△— : Control (NADH 1.5 mM) ---▲--- : Antimycin A 5 μg/ml
 ---●--- : Rotenone 0.05 mM

Fig. 2 Inhibitory Effects of Antimycin A and Rotenone on NADH-Cyt.c Reductase Activity of *Ascaris* Muscle Mitochondria with or without Treatment

この活性は、筋ミトコンドリアを低張処理することにより、約 3 倍増強された (Fig. 1).

2) cyt. c 還元活性

a) 無処理筋ミトコンドリア

NADH (1.5mM) を基質とした場合、筋ミトコンドリアによる cyt. c 還元 の比活性は約 14.2 μmoles of cyt. c reduced/min/mg protein であった。

この cyt. c 還元活性は、antimycin A (5 γ/ml) および rotenone (0.05mM) で影響されなかった (Fig. 2 Expt. A).

b) 凍結融解処理筋ミトコンドリア

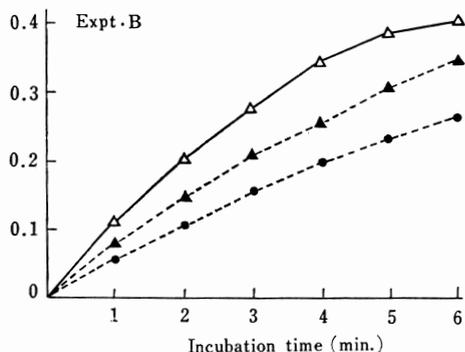
NADH (1.5mM) による cyt. c 還元 の比活性は約 25.9 μmoles of cyt. c reduced/min/mg protein であった。

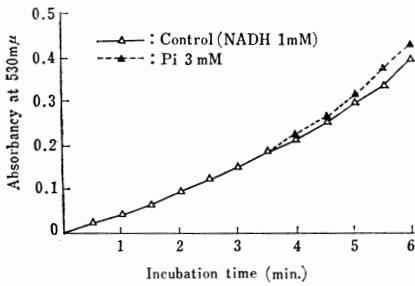
この cyt. c 還元活性は antimycin A (5 γ/ml) および rotenone (0.05mM) でそれぞれ約 30, 54% 阻害された (Fig. 2 Expt. B).

3) Neo-TB 還元活性

NADH (1 mM) を基質とした場合、筋ミトコンドリアによる Neo-TB 還元活性は認められなかった。

しかし、凍結融解処理された場合、Neo-TB 還元が





Reaction system
Treated mitochondria 5.5 mg protein; Neo-TB 0.1%
0.2ml; NADH 1mM
Medium; Sucrose 0.25 M; Tris-HCl buffer 20mM pH7.4
EDTA 1mM; Bovine serum albumin 0.15%
Total : 3.5ml; Temp. : 25°

Fig. 3 Effect of Pi on NADH-Neo-TB Reductase Activity in *Ascaris* Muscle Mitochondria with Treatment

認められ、その比活性は $\Delta O.D._{530} 0.007/\text{min}/\text{mg}$ protein であった。

この Neo-TB 還元活性は、Pi (3 mM) で影響されなかった (Fig. 3)。

(D) malate の筋および卵巣ミトコンドリア膜透過性

1) malate の筋ミトコンドリア膜透過性におよぼす Pi, As 濃度の影響

筋ミトコンドリアを用いて malate-Neo-TB 還元活性

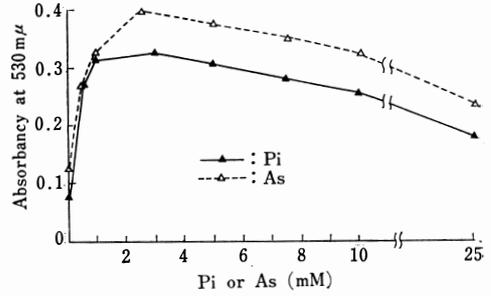


Fig. 4 Activation by Phosphate or Arsenate of Malate-Neo-TB Reductase Activity in *Ascaris* Muscle Mitochondria

に対する Pi および As の至適濃度を測定した。

malate-Neo-TB 還元活性は、Pi (あるいは As) を含まないメヂウム中では、非常に低かった。

この活性は、Pi および As で著明に促進され、その至適濃度はいずれも 2~3 mM であった (Fig. 4)。

2) O₂ uptake 活性

malate (5 mM) を基質とした場合、筋ミトコンドリアによる見かけの O₂ uptake の比活性は約 2.9 $\mu\text{l}/\text{hr}/\text{mg}$ protein であった。

この活性は、Pi (6 mM) および As (10 mM) で 3~4 倍促進された (以下 Table 3 参照)。

3) cyt. c 還元活性

Table 3 Effects of Pi and As on O₂ uptake, Cyt. c and Neo-TB reductase activities with malate as substrate in *Ascaris* muscle and ovary mitochondria

		O ₂ uptake		Cyt. c reductase		Neo-TB reductase	
		S.A.*	% Stimu.**	S.A.	% Stimu.	S.A.	% Stimu.
Muscle	Control	2.9	100	0.81	100	0.009	100
	Pi	8.7	300	2.03	251	0.029	322
	As	10.5	362	2.03	251	0.026	289
Ovary	Control			0.74	100	0.005	100
	Pi			1.88	254	0.010	200
	As			2.37	320	0.008	160

Additions

O₂ uptake : Malate 5 mM, Pi (Phosphate) 6 mM, As (Arsenate) 10mM

Cyt. c reductase : Malate 10mM, Pi 3mM, As 3mM

Neo-TB reductase : Malate 10mM, Pi 3mM, As 3mM

* S.A. : Specific Activity

O₂ uptake : $\mu\text{l}/\text{hr}/\text{mg}$ protein

Cyt. c reductase : $\text{m}\mu\text{moles}$ of cyt. c reduced/min/mg protein

Neo-TB reductase : $\Delta O.D._{530}/\text{min}/\text{mg}$ protein

**Stimu. : Stimulation

Table 4 Effects of Pi and As on O₂ uptake, Cyt. c and Neo-TB reductase activities with fumarate as substrate in *Ascaris* muscle and ovary mitochondria

		O ₂ uptake			Cyt. c reductase			Neo-TB reductase		
		S.A.*	%	Stimu.**	S.A.	%	Stimu.	S.A.	%	Stimu.
Muscle	Control	3.2		100	0.41		100	0.008		100
	Pi	11.1		347	1.35		329	0.021		263
	As	12.2		381	1.13		275	0.021		263
Ovary	Control				0.97		100	0.005		100
	Pi				1.46		151	0.009		180
	As				2.02		208	0.009		180

Additions

O₂ uptake: Fumarate 5 mM, Pi (Phosphate) 6mM, As (Arsenate) 10mM

Cyt. c reductase: Fumarate 10mM, Pi 3mM, As 3mM

Neo-TB reductase: Fumarate 10mM, Pi 3mM, As 3mM

* S.A.: Specific activity

O₂ uptake: $\mu\text{l/hr/mg protein}$

Cyt. c reductase: $\text{m}\mu\text{moles of cyt. c reduced/min/mg protein}$

Neo-TB reductase: $\Delta\text{O.D.}_{530}/\text{min/mg protein}$

**Stimu.: Stimulation

a) malate (10mM) を基質とした場合、筋ミトコンドリアによる cyt. c 還元活性は、約0.81 $\mu\text{ moles of cyt. c reduced/min/mg protein}$ であった。

この cyt. c 還元活性は、Pi (3 mM) および As (3 mM) で約2.5倍促進された。

b) 卵巣ミトコンドリアによる cyt. c 還元活性は、筋ミトコンドリアとほぼ同程度であった。

この活性は、Pi (3 mM) で約2.5倍、As (3 mM) でも約3倍促進された。

4) Neo-TB 還元活性

a) malate (10mM) を基質とした場合、筋ミトコンドリアによる Neo-TB 還元活性は約 $\Delta\text{O.D.}_{530}$ 0.009/min/mg protein であった。

この活性は、Pi (3 mM) および As (3 mM) で約3倍促進された。

b) 卵巣ミトコンドリアによる Neo-TB 還元活性は、筋ミトコンドリアの約 $1/2$ であった。

この活性は、Pi (3 mM) および As (3 mM) でそれぞれ約2, 1.6倍促進された。

(E) fumarate の筋および卵巣ミトコンドリア膜透過性

1) O₂ uptake 活性

fumarate (5 mM) を基質とした場合、筋ミトコンドリアによる見かけの O₂ uptake の比活性は約3.2 $\mu\text{l/hr/mg protein}$ であった。

この活性は、Pi (6 mM) および As (10mM) でそれぞれ約3.5, 3.8倍促進された (以下 Table 4 参照)。

2) cyt. c 還元活性

a) fumarate (10mM) を基質とした場合、筋ミトコンドリアによる cyt. c 還元活性は約0.41 $\mu\text{ moles of cyt. c reduced/min/mg protein}$ であった。

この cyt. c 還元活性は、Pi (3 mM) および As (3 mM) でそれぞれ約3.3, 2.8倍促進された。

b) 卵巣ミトコンドリアによる cyt. c 還元活性は、筋ミトコンドリアの約2倍高かった。

この活性は、Pi (3 mM) および As (3 mM) でそれぞれ約1.5, 2.0倍促進された。

3) Neo-TB 還元活性

a) fumarate (10mM) を基質とした場合、筋ミトコンドリアによる Neo-TB 還元活性は $\Delta\text{O.D.}_{530}$ 0.008/min/mg protein であった。

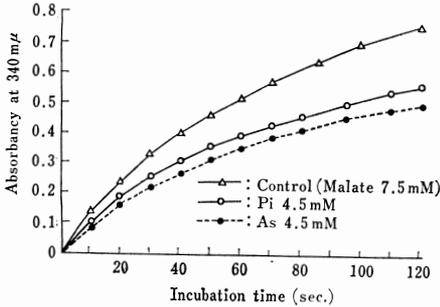
この活性は、Pi (3 mM) および As (3 mM) でそれぞれ約2.6倍促進された。

b) 卵巣ミトコンドリアによる Neo-TB 還元活性は、 $\Delta\text{O.D.}_{530}$ 0.005/min/mg protein であった。

この活性は、Pi (3 mM) および As (3 mM) でそれぞれ約1.8倍促進された。

(F) malic enzyme および malate dehydrogenase 活性に対する Pi および As の影響

malate を基質とした場合の340 $\mu\text{m}\mu$ の吸光度の増加を



Reaction system
 Treated mitochondria 0.9 mg protein; Malate 7.5 mM
 NAD 0.7 mM
 Medium: Sucrose 0.25M; Tris-HCl buffer 20 mM pH 7.4
 Bovine serum albumin 0.15%; EDTA 1 mM
 MnCl₂ 2 mM; Rotenone 0.07 mM
 Total: 4.5 ml; Temp.: 25°

Fig. 5 Effects of Pi and As on malic enzyme and malate dehydrogenase activities in *Ascaris* muscle mitochondria with treatment

指標として、筋ミトコンドリアの malic enzyme および malate dehydrogenase 活性に対する Pi および As の影響を検討した。

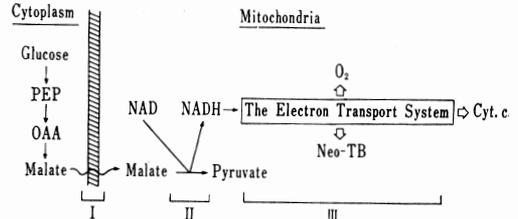
malate (7.5mM) を基質とした場合、凍結融解処理ミトコンドリアによる NADH 還元 の比活性は約 0.84 μmoles of NADH reduced/min/mg protein であつた。

この活性は、Pi (4.5mM) および As (4.5mM) で約 40% 阻害された (Fig. 5)。

考 察

哺乳動物ミトコンドリア膜をイオンが透過するさい、種々の担体 (carrier) の存在が明らかにされており (Chappell & Haarhoff, 1966, 畠瀬・小田, 1969), 呼吸基質の透過にさいしては, dicarboxylic acids, tricarboxylic acids, 2-oxoglutaric acid の 3 種の carrier の存在が指摘されている (Quagliariello *et al.* 1971). このような carrier は単に透過に関してばかりでなく, その代謝調節にも重要な役割を果していると考えられている (尾形ら, 1969).

著者らは、先に回虫の筋と卵巣ではその電子伝達系の機構および酸化リン酸化などにおいて著しい差異が認められることを明らかにしてきた (林ら, 1973a, 林・中西, 1973). そこでもし回虫の場合も、哺乳動物におけると同様に膜透過における機構が代謝調節にも関与しているなら、筋と卵巣における呼吸基質の膜透過にもおのずから差異が認められるのではないかと考え、本研究



Scheme 2 A possible site of Pi stimulation on malate metabolism in *Ascaris*

- I : Acceleration in malate transporting system of membrane
- II : Activation of malic enzyme and malate dehydrogenase
- III : Stimulation in the electron transfer activities

を行なつた。

先人の報告と同じく (Kikuchi *et al.*, 1959, Seidman & Entner, 1961 など), 本実験でも筋ミトコンドリアでは succinate, malate, fumarate および NADH が呼吸基質となりうることが認められた (Table 1). そこで O₂ uptake, cyt. c 還元活性および Neo-TB 還元活性を指標として、これらの呼吸基質の筋および卵巣のミトコンドリア膜透過性について検討を加えた。

malate および fumarate を基質とした場合、筋ミトコンドリアによる O₂ uptake, cyt. c および Neo-TB 還元活性は、Pi および As で著明に促進された (Table 3, 4). この促進効果の機序としては、①ミトコンドリア内への膜透過の促進、② malic enzyme および malate dehydrogenase および③ NADH からの電子伝達系の活性化の 3 点が考えられる (Scheme 2).

malate および fumarate は筋ミトコンドリアで fumarase (Saz & Lescure, 1969), malic enzyme (Saz & Hubbard, 1957) あるいは malate dehydrogenase (Zee & Zinkham, 1968) を介して pyruvate または oxaloacetate に代謝される際、NADH を生じ電子伝達系の基質となることが知られている。しかし筋ミトコンドリアの malic enzyme および malate dehydrogenase 活性は Pi および As で抑制され (Fig. 5), また NADH Neo-TB 還元活性は Pi で影響されなかつた (Fig. 3). したがつて Pi および As は②ないし③に関与するのではなく、①における malate および fumarate の膜透過を促進するものと考えられる。

malate および fumarate の場合にくらべ、succinate を基質とした場合、O₂ uptake および Neo-TB 還元活性はかなり強く、Pi および As の影響がほとんどみら

れなかつた。しかし, cyt. c 還元活性は Pi あるいは As で約1.5倍に促進された。この Pi および As による促進効果は, 筋ミトコンドリア膜が破壊された場合, 消失した (Table 2)。これらの結果は, succinate の筋ミトコンドリア膜透過性は malate および fumarate よりすぐれており, 且つ Pi および As に対しての依存性が少ないなどの相違を示した。したがって筋ミトコンドリア膜では succinate はとくに Pi などの activator の介在なくして透過する機構と malate などと類似の機構の両者により透過するのかもしれない。

また卵巣ミトコンドリアでも malate および fumarate を基質とした場合, cyt. c および Neo-TB 還元活性は Pi および As で著明に促進された。しかし succinate を基質とした場合, Pi および As で cyt. c 還元活性は影響をうけず, Neo-TB 還元活性は抑制された。したがって, 卵巣ミトコンドリアでは succinate は Pi などの activator を必要とせず透過することを示している。

ところで著者らは先に TCA cycle 中間代謝基質のリン酸化反応との関係について検討した。そして malate および fumarate は筋および卵巣ミトコンドリアのいずれでもリン酸化基質として重要であること, しかし succinate は筋ではリン酸化基質の供給源として重要であるが, 卵巣では単なる糖質代謝の最終産物にすぎないことを示唆する結果を得た (林・中西, 1973)。このように succinate は, 筋および卵巣ミトコンドリアにおいて生理的に異なる役割を演じているものと考えられ, その役割の相違が succinate の両者における透過性の相違となつてあらわれたのかもしれない。

つぎに NADH の筋ミトコンドリア膜透過性について検討した。その結果, 無処理のミトコンドリアの場合にくらべ, 低張処理をうけたミトコンドリアでの O₂ uptake は約3倍に増強され (Fig. 1), NADH Neo-TB 還元活性も凍結融解処理をうけてはじめて認められた (Fig. 3)。また NADH cyt. c 還元活性はミトコンドリアに凍結融解処理をほどこすことによりその比活性は約2倍に増強され, しかも rotenone および antimycin A に対する感受性も認められるようになった (Fig. 2)。これらの結果は, NADH が哺乳動物の場合 (Lehninger, 1951, Kobayashi *et al.*, 1966) と同様に筋ミトコンドリア膜を透過できないことを明確に示すとともに, 回虫筋ミトコンドリアにも antimycin A ないし rotenone に不感受性および感受性の2種類の NADH cyt. c

reductase 活性の存在を示すものである。

結局, 回虫細胞においても, 哺乳動物の場合と同様, 膜による compartmentation および膜透過における機構がその代謝調節の要因のひとつになっている可能性が示唆された。ついでこれらの呼吸基質の膜透過性は筋および卵巣における電子伝達系の機構ないし両者における基質の生理的役割を反映していることなどを認めることができた。

結 論

1) malate および fumarate の筋ミトコンドリア膜透過性は, Pi および As で著明に促進された。

2) succinate の筋ミトコンドリア膜透過性も Pi および As で促進された。この場合, malate および fumarate にくらべ Pi および As に対する依存性は少なかつた。

3) 卵巣ミトコンドリアにおいては, malate および fumarate の透過は筋ミトコンドリアと同様 Pi および As で著明に促進されたが, succinate の透過は影響をうけなかつた。

4) NADH は筋ミトコンドリア膜を透過しえなかつた。

本研究の要旨は第42回日本寄生虫学会大会で発表した。

文 献

- 1) Chappell, J. B. & Haarhoff, K. N. (1966) : Biochemistry of Mitochondria (ed. by Slater, E. C., Kaniuga, Z. and Wojtczak, L.), Academic Press, New York, p. 75.
- 2) 畠瀬 修・小田琢三 (1969) : 能動輸送 (井上章・品川嘉也編), 南江堂, 東京, p. 251.
- 3) 林 栄一・寺田 護 (1973) : 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, 寄生虫誌, 22, 1-12.
- 4) 林 栄一・寺田 護・中西一之 (1973a) : 豚回虫の生存に及ぼす酸素圧の影響 (6) 豚回虫筋および卵巣ミトコンドリアの電子伝達系の比較検討, 寄生虫誌, 投稿中.
- 5) 林 栄一・中西一之 (1973) : 豚回虫の生存に及ぼす酸素圧の影響 (7) 豚回虫筋ミトコンドリアの電子伝達系とリン酸化反応について, 寄生虫誌, 22, 付 p. 24.
- 6) 林 栄一・寺田 護・中西一之・国友 勝 (1973b) : 豚回虫の生存に及ぼす酸素圧の影響 (9) 豚回虫筋における pyruvate の動態について

- て、第33回日本寄生虫学会東日本大会にて発表.
- 7) Kikuchi, G., Ramirez, J. and Barron, E. S. G. (1959) : Electron transport system in *Ascaris lumbricoides*. *Biochim. Biophys. Acta*, 36, 335-342.
 - 8) Kobayashi, S., Hagihara, B., Masuzumi, M. and Okunuki, K. (1966) : Preparation and properties of mitochondria from mammalian cells cultured in vitro. *Biochim. Biophys. Acta*, 113, 421-437.
 - 9) Lee, I. T. & Chance, B. (1968) : Activation of malate linked reductions of NAD and flavoproteins in *Ascaris* muscle mitochondria by phosphate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 32, 547-553.
 - 10) Lehninger, A. L. (1951) : Phosphorylation coupled to oxidation of dehydrodiphosphopyridine nucleotide. *J. Biol. Chem.*, 190, 345-359.
 - 11) 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.
 - 12) 尾形悦郎・鈴木秀郎・吉利 和 (1969) : 細胞の代謝調節と膜, ミトコンドリア膜による考察, 医学のあゆみ, 69, 97-101, 69, 145-151.
 - 13) Papa, S., Cheah, K. S., Rasmussen, H. N., Lee, I. T. and Chance, B. (1970) : Mechanism of malate utilization in *Ascaris* muscle mitochondria. *Eur. J. Biochem.*, 12, 540-543.
 - 14) Quagliariello, E., Papa, S., Lofrumento, N. E., Meijer, A. J. and Tager, J. M. (1971) : *Membrane Bound Enzymes* (ed. by Porcellati, G. & di Jeso, F.), Plenum Press, New York-London, p. 35.
 - 15) Saz, H. J. & Hubbard, J. A. (1957) : The oxidative decarboxylation of malate by *Ascaris lumbricoides*. *J. Biol. Chem.*, 225, 921-933.
 - 16) Saz, H. J. & Lescure, O. L. (1969) : The functions of phosphoenolpyruvate carboxykinase and malic enzyme in the anaerobic formation of succinate by *Ascaris lumbricoides*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 30, 49-60.
 - 17) Schneider, W. C. & 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.
 - 18) Seidman, I. & Entner, N. (1961) : Oxidative enzymes and their role in phosphorylation in sarcosomes of adult *Ascaris lumbricoides*. *J. Biol. Chem.*, 236, 915-919.
 - 19) 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.
 - 20) Zee, D. S. & Zinkham, Wm. H. (1968) : Malate dehydrogenase in *Ascaris suum*. Characterization ontogeny and genetic control. *Arch. Biochem. Biophys.*, 126, 574-584.

Abstract

THE INFLUENCE OF OXYGEN PRESSURE ON THE SURVIVAL TIME OF
ASCARIS LUMBRICOIDES SUUM (5)
ON THE TRANSPORT OF RESPIRATORY SUBSTRATES IN *ASCARIS*
MUSCLE AND OVARY MITOCHONDRIA

EIICHI HAYASHI, KAZUYUKI NAKANISHI AND MAMORU TERADA
(*Department of Pharmacology, Shizuoka College of Pharmaceutical
Science, Shizuoka, Japan*)

The effects of phosphate or arsenate on the electron transfer activities in *Ascaris* muscle and ovary mitochondria were investigated in this report. The results obtained are summarized as follows.

1) In *Ascaris* muscle mitochondria the reduction of cyt. c or Neo-TB and oxygen uptake with malate or fumarate as substrate were markedly activated by phosphate or arsenate.

In case of succinate phosphate or arsenate also activated these electron transfer activities. These effects, however, were not detected in the muscle mitochondria disrupted by freezing and thawing.

2) In ovary mitochondria, the activation in electron transfer activities by phosphate or arsenate was detected with malate or fumarate, but not with succinate as substrate.

3) Malic enzyme and malate dehydrogenase in *Ascaris* muscle mitochondria were not activated with phosphate and arsenate.

4) NADH Neo-TB reductase activity was detected only in the muscle mitochondria disrupted by freezing and thawing. The reduction of cyt. c with NADH as substrate was also inhibited by antimycin A or rotenone only in the disrupted mitochondria.

On the basis of these results, we may be able to draw the following conclusions.

1) The transport of malate, fumarate or succinate into *Ascaris* muscle mitochondria are facilitated with phosphate and arsenate.

2) In ovary only the transport of malate or fumarate into mitochondria are facilitated with phosphate and arsenate.

3) NADH cannot penetrate mitochondrial membrane in *Ascaris* as well as in mammals.

Finally it is suggested that the difference in the electron transport system in *Ascaris* muscle and ovary mitochondria may reflect in these findings as to the transport of respiratory substrates.