

## 豚回虫の生存に及ぼす酸素圧の影響 (7)

豚回虫卵巣ミトコンドリアの電子伝達活性ならびに  
リン酸化活性について

林 栄 一 中 西 一 之  
寺 田 護 清 水 武

静岡薬科大学薬理学教室

(昭和51年5月25日 受領)

### 緒 言

豚回虫(以下回虫)筋のリン酸化反応については、すでに幾つかの報告があり、好氣的(Chin and Bueding, 1954; 大家・林, 1961; 林, 1973)および嫌氣的(Seidman and Entner, 1961; Katsume and Obo, 1962; Saz, 1971)両条件下での活性が認められている。また Saz (1971), 林 (1973)らの研究によると, malate ないし fumarate を基質としたリン酸化活性は好氣的および嫌氣的いずれの条件下でも生じ, 恐らく NADH dehydrogenase 部の site I によることが推定されている。

一方卵巣のリン酸化反応については、未だ報告がない。そこで今回は、筋と卵巣の呼吸系の比較研究において、卵巣ミトコンドリアによるリン酸化活性について検討を加えた。

### 実験方法

(1) 回虫筋、卵巣およびラット肝よりのミトコンドリアの分離、ならびに卵巣ミトコンドリアにおける cytochrome (以下 cyt.) c および neotetrazolium blue(以下 Neo-TB)還元活性の測定: 前報(林・寺田, 1973)と同様の方法で行った。

(2) リン酸化反応測定法: 緒方(1957)に準拠して行なった。反応液組成としては、全量 2.0ml とし、その中に mannitol 0.225M, sucrose 0.075M, Tris-HCl buffer 10mM (pH 7.4), K-phosphate buffer 10mM (pH 7.4), glucose 28mM, KCl 10mM, MgCl<sub>2</sub> 8mM, EDTA 0.2mM, ADP 2.5mM, hexokinase 2mg, 基質 10mM (NADH のみ 3mM) およびミトコンドリア標本 (3.3~7.0mg protein) を含む。反応は5分間の温

度平衡後、基質を添加することにより開始し、好氣的条件下、37C, 30分間インキュベーションした後、32%トリクロル酢酸 0.7ml で反応を停止した。氷水中に30分間放置後、3,000rpm 10分間遠沈し、その上清について残存する無機リン量を Fiske-Subbarow (1925)の方法で定量した。

(3) タンパク質量の定量: Lowry *et al.* (1951)の方法で行った。

(4) 試薬: hexokinase, antimycin A および oligomycin, Sigma Chemical Co.: NADH, オリエンタル酵母 K.K.; rotenone, トモノ農薬 K.K.: その他は市販品特級を用いた。antimycin A, oligomycin および rotenone は50% ethanol 溶液とし、添加量を 50 $\mu$ l 以下として用いた。

### 実験結果

(1) 卵巣ミトコンドリアによる cyt. c 還元活性  
卵巣ミトコンドリアによる cyt. c 還元活性を Table 1 に示した。succinate が基質の場合 cyt. c (外因性, horse heart) 還元の場合 cyt. c の比活性は 9.0m $\mu$  moles of cyt. c reduced/min/mg protein であつた。この活性は KCN (3mM, neutralized) で促進されず, malonate (10mM) で著しく阻害された。また malate および fumarate が基質の場合、比活性はそれぞれ2.4および0.4であつた。fumarate による活性は malonate (10mM) で促進的、また malate による活性は rotenone (0.05mM) で阻害的影響を受けた。

(2) 卵巣ミトコンドリアによる Neo-TB 還元活性  
succinate および fumarate を基質とした場合、いずれも約 40.D.<sub>530</sub> 0.010/min/mg protein の Neo-TB 還

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

Addition	Activity
None	0
Succinate	9.0
Succinate+ 3 mM KCN	8.1
Succinate+10mM Malonate	0.2
Malate	2.4
Malate+10mM Malonate	2.6
Malate+0.05mM Rotenone	0.6
Fumarate	0.4
Fumarate+10mM Malonate	1.1

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

Reaction system: Mitochondria 2.1-9.8mg protein; Cytochrome c 0.13  $\mu$  moles; Substrate 10 mM;

Medium: Sucrose 0.25 M, Phosphate buffer (pH 7.4) 0.05 M; Total: 3.5 ml; Temp.: 25°

Table 2 The effects of some inhibitors on Neo-TB reduction in *Ascaris* ovary mitochondria

Addition	Activity
None	0
Succinate	0.009
Succinate+10 mM Malonate	0.005
Succinate+0.05 mM Rotenone	0.010
Fumarate	0.011
Fumarate+10 mM Malonate	0.018
Fumarate+0.05 mM Rotenone	0.000
Fumarate+2.5 mM Amytal	0.005

Activity: O.D.<sub>530</sub>/min/mg protein

Reaction system

Mitochondria 7.6 mg protein; 0.1% Neo-TB 0.2 ml; Succinate or Fumarate 10 mM;

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

元活性を示した (Table 2). succinate による活性は malonate (10mM) で約45%の阻害を受けたが, rotenone (0.05mM) で影響を受けなかった. fumarate による活性は rotenone (0.05 mM) ないし amytal (2.5 mM) によりそれぞれ100および55%の阻害を受け, malonate (10mM) では逆に60%の促進がみられた.

Table 3 Effects of various substrates on Pi incorporation by *Ascaris* muscle and ovary mitochondria

Substrate	Concentration (mM)	Pi incorporation ( $\mu$ moles/30 min/mg protein)	
		Muscle	Ovary
1-Malate	10	1.659	1.299
Fumarate	10	1.642	1.214
Pyruvate	10	0.261	
Glutamate	10	0.095	0.092
Citrate	10	0.071	0.060
$\alpha$ -Ketoglutarate	10	0.113	0.171
NADH	3	0	
Succinate	10	0.587	0.351
Succinate + Rotenone	10 0.005	0.297	
Succinate + Rotenone	10 0.05	0.264	
Succinate + Rotenone	10 0.2	0.282	

The reaction system contained 0.225 M Mannitol, 0.075 M Sucrose, 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), 10 mM K-Phosphate buffer (pH 7.4), 28 mM Glucose, 10 mM KCl, 8 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM EDTA, 2.5 mM ADP, 2mg Hexokinase, 10 mM Substrate (3 mM NADH), Mitochondria (3.3-7.0 mg protein). Total volume was 2.0 ml. The reaction was carried out at 37° for 30 min.

### (3) 筋ミトコンドリアにおけるリン酸化反応

Table 3に示した如く, 基質が malate (10mM) ないし fumarate (10mM) の場合, リン酸化反応が最も顕著に認められた (約1.65 $\mu$  moles/30min/mg protein). また succinate (10mM) の場合には活性は malate の約1/3であり, rotenone の0.005~0.2mM のいずれによつても約50%の阻害を受けた.

pyruvate, citrate,  $\alpha$ -ketoglutarate および glutamate (いずれも 10mM) 並びに NADH (3mM) の場合, リン酸化反応はわずかであった.

### (4) 卵巣ミトコンドリアにおけるリン酸化反応

Table 3に示した如く, malate ないし fumarate (10mM) が基質の場合, リン酸化活性は最も高かつた (約 1.25 $\mu$  moles/ 30min/mg protein). succinate (10 mM) の場合, malate の約1/3.5であり, glutamate, citrate および  $\alpha$ -ketoglutarate (いずれも 10mM) ではほとんど認められなかった.

Table 4 Effects of various substrates on Pi incorporation by rat liver mitochondria

Substrate	Concentration (mM)	Pi incorporation ( $\mu$ moles/30 min/mg protein)
1-Malate	10	0.874
Glutamate	10	1.765
1-Malate + Glutamate	1 9	2.375
1-Malate + Pyruvate	6 4	1.442
Succinate	10	1.175
Succinate + Rotenone	10 0.2	1.194

Reaction system and reaction period were the same as described in Table 3.

(5) ラット肝ミトコンドリアにおけるリン酸化反応  
ラット肝では回虫とほぼ同程度のリン酸化反応がみられたが、基質の種類に差異が認められた (Table 4). すなわち malate+glutamate (1+9 mM) で最も高い活性が認められ (約  $2.38\mu$  moles/30min/mg protein), succinate (10mM) では回虫筋の約2倍の活性がみられた. この活性は高濃度 (0.2mM) rotenone でも阻害されなかった.

(6) 筋ミトコンドリアの malate を基質とした場合のリン酸化反応に及ぼす各種阻害剤の影響

malate (10mM) によるリン酸化反応は malonate (10~40mM), rotenone (0.005mM) および antimycin A (3.5~8.8 $\mu$ g/ml) で著明に, また KCN (1mM, neutralized) ではわずかに阻害された. ついで 2,4-dinitrophenol (0.01~1mM), dicoumarol (0.01~1mM) および pentachlorophenol (0.001~0.1mM) 並びに oligomycin (0.75~4.5 $\mu$ g/ml) によっても著明で, 且つ濃度依存的な阻害を受けた (Table 5).

(7) 卵巣ミトコンドリアの malate を基質とした場合のリン酸化反応に及ぼす各種阻害剤の影響

Table 6 に示した如く, malate (10mM) によるリン酸化反応は rotenone (0.05mM) では著明に, KCN (1mM, neutralized) では極くわずかの阻害がみられた. malonate (10~40mM) および antimycin A (3.5~8.8 $\mu$ g/ml) による阻害は筋の場合に比し軽微であった.

## 考 察

卵巣ミトコンドリアの場合, その電子伝達活性ならび

Table 5 Effects of various inhibitors on Pi incorporation with malate as substrate by *Ascaris* muscle mitochondria

Inhibitor	Concentration (mM)	Pi incorporation ( $\mu$ moles/30min/mg protein)	Inhibition rate (%)
None		1.659	
Malonate	10	0.680	59
	20	0.630	62
	40	0.282	83
Rotenone	0.005	0	100
	3.5 $\mu$ g/ml	0.813	51
	5.3 $\mu$ g/ml	0.664	60
Antimycin A	8.8 $\mu$ g/ml	0.415	75
	KCN (neutralized) 1	1.460	12
	0.01	1.327	20
2,4-dinitrophenol	0.1	0.332	80
	1	0	100
	0.01	0.664	60
Dicoumarol	0.1	0.217	87
	1	0.083	95
	0.001	1.360	18
Pentachlorophenol	0.01	0.232	86
	0.1	0.050	97
	0.75 $\mu$ g/ml	0.382	77
Oligomycin	1.5 $\mu$ g/ml	0.217	87
	4.5 $\mu$ g/ml	0.149	91

Reaction system and reaction period were the same as described in Table 3.

にリン酸化活性については未だほとんど知見がない. 今回は卵巣ミトコンドリアのリン酸化反応について検討するに当たり, 先ずリン酸化反応に関与すると考えられる2, 3の電子伝達活性について検討を加えた.

著者らは, 先に卵巣から cyt. c を分離したが (林ら, 1976b), そのミトコンドリアは succinate, fumarate ないし malate を基質として外因性 cyt. c (horse heart) を還元した (Table 1). 同様にミトコンドリア内膜系の活性を示すものとして Neo-TB 還元活性も認められた (Table 2). これらの活性に対する呼吸阻害剤の作用を筋の場合 (林・寺田, 1973) と比較したところ,

**Abstract**

THE INFLUENCE OF OXYGEN PRESSURE ON THE SURVIVAL TIME OF  
*ASCARIS LUMBRICOIDES SUUM* (7) ELECTRON TRANSFER AND  
PHOSPHORYLATION ACTIVITIES IN *ASCARIS*  
OVARY MITOCHONDRIA

EIICHI HAYASHI, KAZUYUKI NAKANISHI, MAMORU TERADA

AND

TAKESHI SHIMIZU

(*Department of Pharmacology, Shizuoka College of Pharmaceutical  
Sciences, Shizuoka, Japan*)

1. Activities reducing cytochrome c exogenously added or neotetrazolium blue with malate, fumarate or succinate were detected in *Ascaris* ovary mitochondria. In contrast to muscle mitochondria, the reduction of cytochrome c with succinate was not stimulated by KCN and the reduction of cytochrome c or neotetrazolium blue with fumarate was stimulated by malonate.

2. Under an aerobic condition an activity of phosphorylation with malate, fumarate or succinate was detected both in *Ascaris* muscle and ovary mitochondria.

3. In muscle mitochondria, the malate dependent phosphorylation was inhibited significantly by malonate, antimycin A and rotenone, and slightly by KCN. This activity was also inhibited markedly by 2,4-dinitrophenol, pentachlorophenol, dicoumarol and oligomycin. The succinate dependent activity was inhibited by 50% with rotenone.

4. In ovary mitochondria, the malate dependent activity was completely inhibited by rotenone, and slightly by malonate, antimycin A and KCN.