

Trichomonas foetus 及び *Trichomonas vaginalis* における 細胞分画物中の malate dehydrogenase 及び malic enzyme の活性の比較

土肥美代子 古谷 正人 伊藤 義博
岡 好万 尾崎 文雄

徳島大学医学部寄生虫学教室

(昭和51年2月16日 受領)

トリコモナスの糖質代謝は古くから多くの研究者の興味をひき, Wirtschafter *et al.* (1956), Lindblom (1961) 及び Wellerson and Kupferberg (1962) らにより Embden-Meyerhof pathway の過程が観察された。しかしそれに続くエネルギー産生過程である TCA cycle の存在様式については、いまだ多くの疑問点が残されている。例えばチトクローム系への電子伝達に關与する TCA cycle 上の酵素のうち, succinate dehydrogenase 活性 (尾崎・岡, 1963; 田中, 1970) 及び isocitrate dehydrogenase 活性 (田中, 1970) は極端に低く, malate dehydrogenase (MDH) の活性が著明に高い (Baernstein, 1961; 尾崎・岡, 1963; 田中, 1970; Bruggerolle and Metenier, 1973; Lindmark and Müller, 1973) ことが報告され, 本原虫の TCA cycle はほ乳動物のそれと異なつてゐると考えられる。更に MDH の顕著な活性はこの酵素がエネルギー産生過程で重要な役割を果たしている可能性を示唆しているが, その詳細はいまだ明らかでない。また本原虫の細胞構造上の特徴として, 一般動物細胞に存在するミトコンドリアは観察されておらず (Inoki *et al.*, 1959), 顕著な活性を示す MDH がいかなる小器官に局在するかは, 酵素的役割同様興味深い問題である。

本研究は MDH のエネルギー産生過程での役割と細胞内小器官での局在を追究する足掛かりとして, malic acid を基質とする2つの酵素すなわち MDH 及び malic acid, pyruvic acid 間で脱炭酸・酸化還元を行う malic enzyme (ME) を同時に取り上げ, 培養条件, 栄養要求及び終末代謝産物等の性状を異にする *Trichomonas foetus*, *Trichomonas vaginalis* 両原虫の homogenate から

得た遠心分画物における両酵素の活性を比較検討した。

実験材料及び方法

1. 原虫

T. foetus (乾株) 及び *T. vaginalis* (4 F株) はいずれも大阪大学微生物病研究所より分与を受け, 前者は F-bouillon 培地 (pH 7.0), 後者は SYS 培地 (pH 6.0) で継代培養したものを供試した。

2. 酵素溶液の調整

37°C 20時間培養の原虫を生理食塩水で3回遠心洗浄した後, 少量の 0.25 M sucrose 溶液に懸濁し, テフロンホモジナイザーで磨砕した。光学顕微鏡下で原虫の磨砕度を確認後, 0.25 M sucrose 溶液で20% w/v homogenate に調整し, 900×g 10分間遠心して未破碎の細胞を除き, その上清に対し 13,000×g 20分間遠心して沈渣 (large granule 画分; LG) を得, 更に引き続き上清に対して 144,000×g 90分間遠心して沈渣 (microsome 画分; M) と上清 (soluble protein 画分; SP) に分けた。沈渣の画分は 0.25 M sucrose 溶液に懸濁し酵素溶液とした。以上すべての操作は 4°C で行つた。

3. 酵素活性の測定法

MDH 活性の測定は Ochoa *et al.* (1948) の方法を変法して行つた。すなわち基質反応液 (0.25 M glycylglycine buffer 0.6 ml, 0.1 M sodium malate 0.2 ml, 3 mM NAD 0.2 ml, 蒸留水 0.3 ml) に適当に希釈した各酵素溶液 0.2 ml を加えて 37°C で反応させた後, ethylalcohol 1.5 ml 及び 10% sodium sulfate 0.1 ml を添加して反応を停止させ, 紫外部 340 m μ における吸光度を基に NADH 量を算定し, MDH 活性の指標とした。

更に oxaloacetic acid を基質とし補酵素 NADH を添加して、MDH に関する oxaloacetic acid 側からの逆反応も併せて測定した。

ME 活性の測定は上記基質反応液のうち 0.1 M sodium malate 及び 3 mM NAD をそれぞれ 0.1 M sodium pyruvate 並びに 3 mM NADH 又は NADPH に代えた以外前述と同様の操作で行い、NADH 又は NADPH の減量を活性の指標とした。

各酵素溶液中の両酵素の活性は 1 mg タンパク当たり の比活性で比較した。

4. 試薬

基質及び補酵素として L-malic acid monosodium salt (半井化学), sodium pyruvate (和光純薬), oxaloacetic acid (片山化学), β -nicotinamide adenine dinucleotide (NAD), β -nicotinamide adenine dinucleotide reduced form (NADH) 及び β -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced form (NADPH) (Sigma Chemical Co.) を使用した。

実験結果

1. 至適 pH 及び反応時間の検討

各遠心分画物の酵素活性を測定するに当たり pH 5.0~11.0にわたって MDH 及び ME の至適 pH を求めた。緩衝液は pH 5.0~9.0には glycylglycine buffer を、pH 7.0~11.0 には $H_3BO_4 \cdot KCl-NaOH$ buffer を用い、酵素溶液には *T. foetus* 及び *T. vaginalis* の homogenate を用いた。結果は Fig. 1 に示すように MDH は *T. foetus*, *T. vaginalis* 共に pH 9.0 で最大の活性値を示した。一方 ME に関しては *T. foetus* ではどの pH においても ME 活性は認められず、*T. vaginalis* でのみ pH 7.5 で最大の活性値が認められた。

上記の至適 pH における反応時間の検討は、反応温度を 37°C に規定して経時的に活性値の変動を測定して行った。その結果 MDH 活性は反応時間 0~25 分では直線的に増大したが、30~90 分の上昇は緩やかであった。一方 ME は 0~50 分で顕著な上昇を示したが、以後 90 分までは定常に近い状態となった。

以上の結果から、両原虫の遠心分画物における MDH 及び ME 活性の測定に用いる基質反応液は pH 9.0 (MDH) 及び 7.5 (ME) の glycylglycine で緩衝し、反応時間は 20 分とした。

2. *T. foetus* 遠心分画物の酵素活性

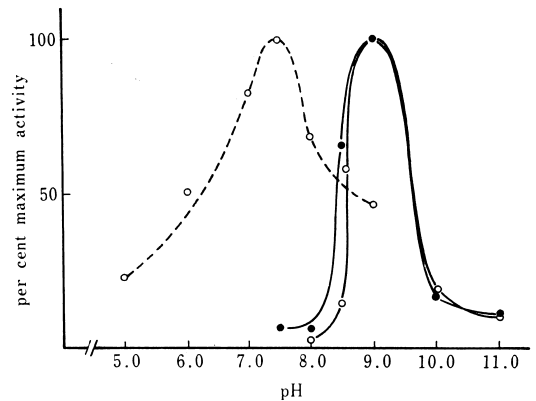


Fig. 1 Effects of pH on malate dehydrogenase and malic enzyme activities in homogenized *Trichomonas foetus* and *Trichomonas vaginalis*.

- : malate dehydrogenase activity in homogenized *T. foetus*
- : malate dehydrogenase activity in homogenized *T. vaginalis*
- : malic enzyme activity in homogenized *T. vaginalis*

各遠心分画物の MDH 活性を測定した結果、酵素活性は LG 画分には顕著であったが、SP 及び M 画分ではほとんど認められなかった (Table 1 の A)。更に LG 画分での oxaloacetic acid から malic acid への逆反応を調べた結果、比活性は対照系 0.019 mM/mg protein/min, 実験系 0.210 mM/mg protein/min であり、MDH の存在を認めた。

ME の測定結果は Table 1 の B), C) に示すとおりであった。すなわち LG, M 両画分共に pyruvic acid を基質とした測定では ME の酵素活性を認めなかった。一方 SP 画分においては実験系及び対照系共に同程度の反応値を認め、pyruvic acid に対する特異的反応は確認できなかった (Table 1—B)。更に NADPH を補酵素として ME の検討を行ったが、どの画分にも NADPH の酸化は認められなかった (Table 1—C)。

以上の結果から *T. foetus* では MDH が LG 画分に確認されたが、ME はどの画分にも認められなかった。

3. *T. vaginalis* 遠心分画物の酵素活性

T. vaginalis においても *T. foetus* 同様 LG 画分にはのみ malic acid, NAD の反応系で高い酵素活性を認め MDH の存在が示唆された (Table 2 の A)。更

Table 1 Comparative specific activities of malate dehydrogenase and malic enzyme in centrifugal cell fractions of homogenized *Trichomonas foetus*

	Fraction	Specific activity	
		Experimental	Control
A) Malate dehydrogenase incubated with sodium malate and NAD at pH 9.0	Large granule fraction	0.475	0.003
	Microsomal fraction	0.080	0.005
	Soluble protein fraction	0.013	0
B) Malic enzyme incubated with sodium pyruvate and NADH at pH 7.5	Large granule fraction	0.035	0.045
	Microsomal fraction	0.115	0.115
	Soluble protein fraction	0.595	0.713
C) Malic enzyme incubated with sodium pyruvate and NADPH at pH 7.5	Large granule fraction	0	0
	Microsomal fraction	0.079	0.073
	Soluble protein fraction	0.161	0.179

control : substrate absent

unit of enzyme activity: mM NADH or NADPH/mg protein/min

Table 2 Comparative specific activities of malate dehydrogenase and malic enzyme in centrifugal cell fractions of homogenized *Trichomonas vaginalis*

	Fraction	Specific activity	
		Experimental	Control
A) Malate dehydrogenase incubated with sodium malate and NAD at pH 9.0	Large granule fraction	0.595	0.007
	Microsomal fraction	0.093	0.011
	Soluble protein fraction	0.073	0.005
B) Malic enzyme incubated with sodium pyruvate and NADH at pH 7.5	Large granule fraction	0.154	0.011
	Microsomal fraction	0.379	0
	Soluble protein fraction	2.683	0
C) Malic enzyme incubated with sodium pyruvate and NADPH at pH 7.5	Large granule fraction	0.017	0.052
	Microsomal fraction	0.156	0.190
	Soluble protein fraction	0.177	0.221

control : substrate absent

unit of enzyme activity: mM NADH or NADPH/mg protein/min

に oxaloacetic acid から malic acid への逆反応系でも活性値 0.245 mM/mg protein/min を得、対照系 0.009 mM/mg protein/min と比較して顕著な活性を確認した。

ME の検討結果は Table 2 の B), C) に示したが, *T. vaginalis* の ME 活性は *T. foetus* と異なり, 対照系と比較して SP 画分のみ明らかな NADH の酸化反応を認め, この画分における ME の存在が示唆

された。この測定法では pyruvic acid から lactic acid に働く lactate dehydrogenase (LDH) も測定し得るので, lactic acid を基質として NADH の酸化を測定し, 逆反応の検討を試みた。その結果実験系は 0.002 mM/mg protein/min, 対照系は 0.019 mM/mg protein/min であり, この画分で認められた NADH の酸化は LDH ではなく ME に因るものと考えた。

以上から *T. vaginalis* には MDH と ME の両酵素

が存在し、MDH は *T. foetus* 同様 LG 画分に、NADH を補酵素とした ME は SP 画分に存在することを知った。

総括並びに考察

トリコモナスはべん毛を有し活発に運動する原虫でありながら、その細胞にはエネルギー発生装置と考えられるミトコンドリア構造を有せず (Inoki *et al.*, 1959)、エネルギー産生過程における基質の酸化と電子伝達系についての詳細も不明である。しかしこの過程の酵素活性を測定した研究者はひとしく MDH の顕著な活性を認めており (Baernstein, 1961; 尾崎・岡, 1963; 田中, 1970; Brugerolle and Metenier, 1973; Lindmark and Müller, 1973)、本酵素がエネルギー獲得に重要な役割を果たすと考えた。一方 MDH は通常ミトコンドリアに局在する酵素であることから、本酵素の細胞内局在の追求は原虫の細胞構造と機能を関係づける端緒になると考える。

本研究はこれらを終局の目的として行い、まず *T. vaginalis* 及び *T. foetus* の homogenate について測定条件特に至適 pH 及び反応時間を求めた。この段階で MDH 及び ME の至適 pH に差異を認め、*T. foetus* 及び *T. vaginalis* の MDH の至適 pH は 9.0 であつたが、*T. vaginalis* の ME は 7.5 を示した。また *T. foetus* には ME を認めず、両原虫間に大きな相違が認められた。この違いは栄養要求、終末代謝産物、培養条件等原虫間の性状の差異に関係していると考えられる。

遠心分画物を粗酵素とした場合、大半の MDH は *T. vaginalis* 及び *T. foetus* の LG 画分に検出され、本酵素がこの画分に含まれる microbody (伊藤, 1968) に局在する可能性が示唆された。更に分画操作に phosphate buffer (岡・尾崎, 1963) 若しくは ethylenediaminetetraacetic acid を含む緩衝液 (Brugerolle and Metenier, 1973) を溶媒とした場合、可溶性画分に活性が検出されることから、MDH は LG 画分に回収される構造物 (例えば microbody) に金属塩を介してルースに結合している可能性が考えられる。

ME と MDH を判別するため pyruvic acid から malic acid への反応系で NADH の減量を測定し、更に同基質で酵素活性が予測される LDH の存在を補足実験で否定した結果、*T. vaginalis* の SP 画分に ME の存在を認めた。この成績は *T. foetus* との大きな差異であり、更に NAD に依存したこと (Table 2

の B, C)) は NADP 依存 ME の検出報告 (Weller-son and Kupferberg, 1962) と比較して本株原虫の特徴であるかも知れない。なお Lindmark and Müller (1974) は *T. foetus* で NADP 依存の ME を検出したが、我々の実験では *T. foetus* についての ME は確認できなかつた。この点を各種測定条件により検討しているが、原虫の培養方法及び株に因る差とも考えられる。従来 ME は、1) NAD に依存し oxaloacetic acid を加えて脱炭酸するもの (酵素番号: 1.1.1.38)、2) NAD に依存し oxaloacetic acid を加えても脱炭酸しないもの (酵素番号: 1.1.1.39) 及び 3) NADP に依存し oxaloacetic acid 添加で脱炭酸する酵素 (酵素番号: 1.1.1.40) の 3 つが挙げられており、1) はバクテリアに見られる型と言われている (Dixon and Webb, 1964)。

本実験の *T. vaginalis* の SP 画分で認めた ME はバクテリアに多く見られる型であり、この原虫が典型的なミトコンドリアを持たないことと考え合わせて興味ある問題である。なお Table 1 及び 2 において control にかんりの酵素活性を認めたこと、特に M 及び SP 画分に高かつたことは酵素液中に NAD 及び NADP 依存の他の酵素と基質が含まれていたためと考えられる。

今回 *T. vaginalis* 及び *T. foetus* についてその MDH が LG 画分に局在することを認めたので、更に電子顕微鏡的組織化学等によりその検出を進めている。

結 論

トリコモナスの TCA cycle に関与する酵素中 malate dehydrogenase (MDH) 活性が特に顕著であると言われているが、そのエネルギー獲得過程での詳細な役割は未解明である。我々はトリコモナスにおけるエネルギー代謝を解明する端緒として、malic acid を基質とする MDH 及び malic enzyme (ME) を取り上げ、*Trichomonas foetus* 及び *Trichomonas vaginalis* の細胞 homogenate 並びに遠心分画物における両酵素の活性と各画分への分布を比較検討した。

原虫 homogenate は 0.25 M sucrose 溶液を溶媒として遠心分画し、13,000 × g 沈渣 (large granule)、144,000 × g 沈渣 (microsome) 及び 144,000 × g 上清 (soluble protein) の 3 画分に分け、各画分における MDH と ME の活性を比較検討した。

MDE 活性は *T. foetus* 及び *T. vaginalis* の large granule 画分に認められ、その比活性値はそれぞれ 0.475 mM/mg protein/min 及び 0.595 mM/mg protein/min

であり、他の画分ではこん跡程度にすぎなかつた。また本酵素は pH 9.0 で最も高い活性値を示した。

ME は *T. vaginalis* の soluble protein 画分へのみ活性 (比活性値 2.685 mM/mg protein/min) を認め、*T. foetus* の各画分には検出しなかつた。また本酵素は NAD へのみ依存し、至適 pH は 7.5 であつた。

文 献

- 1) Baernstein, H. D. (1961) : Malic dehydrogenase in *Trichomonas vaginalis*. J. Parasit., 47, 279-284.
- 2) Brugerolle, G. and Metenier, G. (1973) : Localisation intracellulaire et caracterisation de deux type de malate deshydrogenase chez *Trichomonas vaginalis* Donné, 1836. J. Protozool., 20, 320-327.
- 3) Dixon, M. and Webb, E. C. (1962) : Enzymes, Longmans, Green and Co. Ltd. 江上不二夫・田宮信雄・八木達彦・千谷晃一・水島昭二・別府輝彦・矢追義人 (共訳) (1970) : 酵素, 白水社, 東京, p. 645.
- 4) Inoki, S., Nakanishi, K. and Nakabayashi, T. (1959) : Observations on *Trichomonas vaginalis* by electron microscopy. Biken's J., 2, 21-24.
- 5) 伊藤義博 (1968) : 遠心分画法による *Trichomonas foetus* 細胞構造物の分離と化学的性状. 寄生虫誌, 17, 494-508.
- 6) Lindblom, G. P. (1961) : Carbohydrate metabolism of trichomonads: growth, respiration and enzyme activity in four species. J. Protozool., 8, 139-150.
- 7) Lindmark, D. G. and Müller, M. (1973) : Hydrogenosome, a cytoplasmic organelle of the anaerobic flagellate *Trichomonas foetus*, and its role in pyruvic metabolism. J. Biol. Chem., 248, 7724-7728.
- 8) Lindmark, D. G. and Müller, M. (1974) : Biochemical cytology of trichomonad flagellates. II. Subcellular distribution of oxidoreductase and hydrolases in *Monocercomonas* sp. J. Protozool., 21, 374-378.
- 9) Ochoa, S., Mehler, A. H. and Kornberg, A. (1948) : Biosynthesis of dicarboxylic acids by carbon dioxide fixation I. Isolation and properties of an enzyme from pigeon liver catalyzing the reversible oxidative decarboxylation of *l*-malic acid. J. Biol. Chem., 174, 979-1000.
- 10) 岡好万・尾崎文雄 (1963) : 原虫細胞の生理機能に関する研究 IV. *Trichomonas* 無細胞液の超遠心分画物の酵素活性. 医学と生物学, 66, 199-201.
- 11) 尾崎文雄・岡好万 (1963) : 原虫細胞の生理機能に関する研究 I. *Trichomonas foetus* 完全細胞による脱水素酵素反応. 医学と生物学, 66, 67-70.
- 12) 田中耕誠 (1970) : トリコモナスの 2~3 の脱水素酵素に関する生化学的研究. 寄生虫誌, 19, 603-609.
- 13) Wellerson, R., Jr. and Kupferberg, A. B. (1962) : On glycolysis in *Trichomonas vaginalis*. J. Protozool., 9, 418-424.
- 14) Wirtschafter, S., Saltman, P. and Jahn, T. L. (1956) : The metabolism of *Trichomonas vaginalis*: The oxidative pathway. J. Protozool., 3, 86-88.

Abstract

COMPARATIVE ACTIVITIES OF MALATE DEHYDROGENASE AND MALIC
ENZYME IN THE CENTRIFUGAL CELL FRACTIONS OF *TRICHOMONAS*
FOETUS AND *TRICHOMONAS VAGINALIS*

MIYOKO DOI, MASATO FURUYA, YOSHIHIRO ITO,
YOSHIKAZU OKA AND HUMIO OSAKI
(*Department of Parasitology, School of Medicine,*
University of Tokushima, Tokushima)

In *Trichomonas* species, the activity of malate dehydrogenase (MDH) is generally regarded as higher than that of other enzymes of the TCA cycle, however, little is known about its detailed role in the energy-production process being taken place in the protozoa.

In the present study, both activity and distribution of MDH and malic enzyme (ME) that act upon malic acid, in cell homogenate and subcellular fractions of *Trichomonas foetus* and *Trichomonas vaginalis* were examined in an attempt to give a clue to the elucidation of the energy metabolism in trichomonads.

The cell homogenate after being suspended in 0.25 M sucrose solution was fractionated into large granule (13,000 × g sediment), microsomal (144,000 × g sediment) and soluble protein (144,000 × g supernatant) fractions by differential centrifugation and activities of MDH and ME in the fractions were examined.

The MDH activity in the large granule fraction in *T. foetus* and *T. vaginalis* was 0.475 and 0.595 mM/mg protein/min respectively, while that in other fractions was only a trace in both species. The optimum pH for the action was 9.0.

The ME activity in the soluble fraction in *T. vaginalis* was 2.685 mM/mg protein/min and this enzyme was found to be NAD-dependent its optimum pH for the action being 7.5.

No ME activities were observed in other fractions in both species.