

豚回虫の生存に及ぼす酸素圧の影響 (8)

豚回虫筋および卵巣ミトコンドリアにおける hydroperoxidase
活性の相違について

林 栄 一 寺 田 護
中 西 一 之 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)の筋ミトコンドリアにおける末端酸化酵素については、従来、フラビン酵素(flavin oxidase)とするもの(Bueding, 1963; Saz and Bueding, 1966; Saz, 1969)と cytochrome (以下 cyt.) oxidase とするもの(Kikuchi *et al.*, 1959; Cheah and Chance, 1970)とがあつた。著者らは、回虫の生存と酸素分圧との関係についての一連の研究から、筋ミトコンドリアの場合、その末端酸化酵素としてフラビン酵素(flavin containing oxidase)および cyt. c peroxidase の関与を示唆した(林・寺田, 1973)。

ついで筋ミトコンドリアの cyt. c peroxidase を含む好氣的代謝系の生理的役割を知る目的で、卵巣の呼吸系との比較を行い、卵巣から cyt. c を分離(林ら, 1976a), しかも succinate などを基質とする cyt. c 還元活性を認めた(林ら, 1976b)。今回は卵巣ミトコンドリアにおける末端酸化酵素について検討し、更に筋および卵巣の hydroperoxidase 活性の相違についても検討を加えた。

実験方法

(1) 豚回虫筋、卵巣およびラット肝からのミトコンドリアの調製：前報と同様の方法で行つた(林・寺田, 1973)。

(2) cyt. c peroxidase 活性の測定：外因性 cyt. c (horse heart) がミトコンドリア内で十分に還元された時点で H_2O_2 を作用させる方法(林・寺田, 1973)によつたが、今回は H_2O_2 を作用させる直前に malonate を添加し、succinate cyt. c reductase 活性を抑制して

cyt. c peroxidase 活性をより明確にする方法をとつた。

(3) catalase 活性の測定：Herbert(1955)の方法で行つた。

(4) タンパク質量の定量：Lowry *et al.* (1951)の方法で行つた。

実験結果

(1) cyt. c peroxidase 活性

Fig. 1 に示した如く、筋では succinate を基質としミトコンドリア内で外因性 cyt. c が十分に還元された時点で malonate (10mM) を添加しても cyt. c の再酸化はほとんど生ぜず、malonate と共に H_2O_2 (400 μ M) を添加したとき、直ちに cyt. c の再酸化が生じた。しかし H_2O_2 添加の直前に KCN (3mM, neutralized) を作用させた場合には cyt. c の再酸化は生じなかつた。

一方卵巣ミトコンドリアでは、Fig. 2 に示した如く、cyt. c が十分に還元された時点で malonate (10mM) を添加しても、また malonate と H_2O_2 (400 μ M) を同時に添加しても、cyt. c の再酸化は生じなかつた。それに対し、ラット肝では cyt. c が十分に還元された時点で malonate (10mM) を添加すると直ちに cyt. c の再酸化が生じ、ついで KCN (3mM, neutralized) を添加すると、再び succinate cyt. c reductase 活性により cyt. c の還元が生じた (Fig. 3)。

(2) catalase 活性

Table 1 に回虫の各組織ホモジネートの catalase 活性を示した。卵巣には哺乳動物の肝とか血液の約 $1/15$ に相当する高い活性が認められ、未発生卵および消化管にもかなりの活性がみられた。しかし筋および体腔液の活性は極めて微弱であつた。

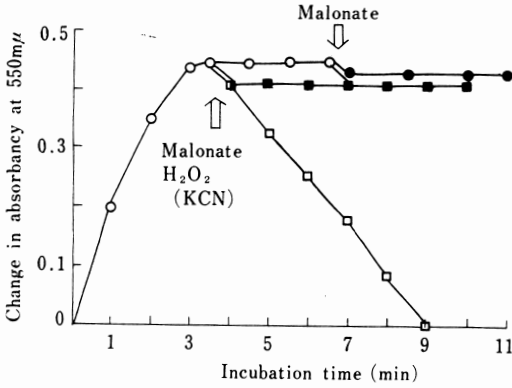


Fig. 1 The effects of H₂O₂ and cyanide on reduction of cytochrome c by succinate in *Ascaris* muscle mitochondrial system.

- : Malonate (10mM)
- : Malonate (10mM) and H₂O₂ (400μM)
- : Malonate (10mM), KCN (3mM) and H₂O₂ (400μM)

Reaction system

Mitochondria 3.0mg protein; Cyt. c 0.15 μmoles; Succinate 10mM
 Medium: Sucrose 0.25M, K-phosphate buffer (pH 7.4), 0.05 M; Total: 3.5ml; Temp.: 25C

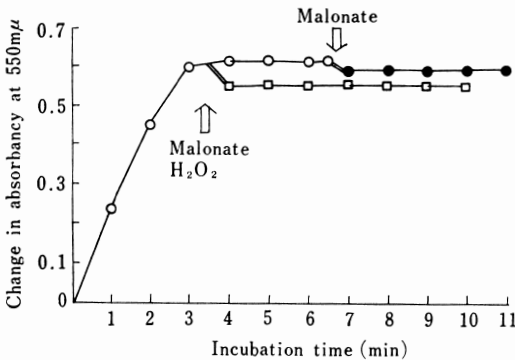


Fig. 2 The effect of H₂O₂ on reduction of cytochrome c by succinate in *Ascaris* ovary mitochondrial system.

- : Malonate (10mM)
- : Malonate (10mM) and H₂O₂ (400μM)

Reaction system

Mitochondria 6.6mg protein; Cyt. c 0.15 μmoles; Succinate 10mM
 Medium: Sucrose 0.25M, K-phosphate buffer (pH 7.4) 0.05M; Total: 3.5ml; Temp.: 25C

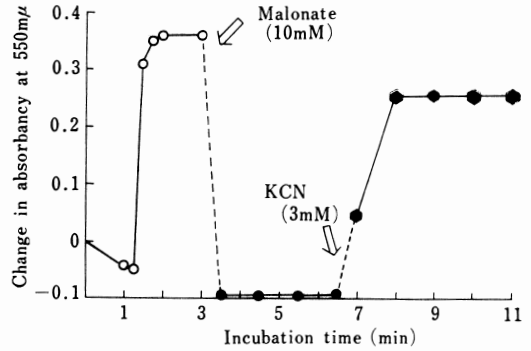


Fig. 3 The effects of malonate and cyanide on reduction of cytochrome c by succinate in rat liver mitochondrial system.

Reaction system

Mitochondria 4.2mg protein; Cyt. c 0.11 μmole; Succinate 10mM
 Medium: Sucrose 0.25M, K-phosphate buffer (pH 7.4) 0.05M; Total: 3.5ml; Temp.: 25C

Table 1 Comparison of catalase activity in *Ascaris* and mammalian tissue homogenates

Tissue	Catalase activity (Kcat/g tissue)	Tissue	Catalase activity (Kcat/g tissue)
<i>Ascaris</i>		Mammalia	
Ovary	184.7±6.8	Rat liver	2139±400
Intestine	77.5±8.8	Rabbit blood	2627±360
Unembryonated egg	88.0±3.8		
Muscle	3.7±0.4		
Perienergetic fluid	Nil		

Kcat: k₁(the first order reaction rate constant) × 10³

The values are presented as mean ± S.E. for five experiments.

Table 2 Catalase activity in *Ascaris* muscle and ovary mitochondria

Mitochondria of	Catalase Activity
Muscle	1.39±0.14 (4)*
Ovary	11.53±0.31 (6)

Activity: μmoles H₂O₂ decomposed/min/mg protein.

Results are given as mean ± S. E.

*: Number of experiments

卵巣ミトコンドリアの活性も筋の活性より約10倍も強かった (Table 2).

考 察

回虫筋ミトコンドリアでは succinate を基質とした場合の cyt. c の還元活性は KCN で促進され、還元型 cyt. c の再酸化酵素の存在が予測され、この酵素として cyt. c peroxidase 活性の存在を推定した (林・寺田, 1973). 今回の実験においては malonate が succinate cyt. c reductase 活性を抑制した系を用いることにより、この再酸化酵素活性を一層明確にすることができた (Fig. 1).

また卵巣にも哺乳動物のものと近似した cyt. c が認められ (林ら, 1976a), succinate cyt. c reductase 活性もみられた (林ら, 1976b). しかしこの場合, succinate による cyt. c の還元は KCN で促進されず、筋と異なっていた. そこで筋の場合と同様に cyt. c peroxidase 活性を検討した. malonate を単独で、また H_2O_2 と同時に作用させた場合のいずれも、還元型 cyt. c の再酸化は生じなかつた (Fig. 2). 一方ラット肝では malonate の単独添加で還元型 cyt. c の再酸化が生じ、ついで KCN 添加で再び succinate cyt. c reductase 活性による cyt. c の還元が生じた (Fig. 3). このことからラット肝では強い cyt. oxidase 活性の存在がうかがわれた. したがって、これらの結果からみる限りでは、卵巣には還元型 cyt. c の再酸化酵素は、回虫筋型 (cyt. c peroxidase) および哺乳動物型 (cyt. oxidase) のいずれも認められなかつた.

ところで卵巣ホモジネートには、好気下、比活性で筋の約 $\frac{1}{2}$ の O_2 uptake が認められ、しかも筋と同様 H_2O_2 の生成が推定されている (林・寺田, 1971). H_2O_2 は筋では cyt. c peroxidase の生理的基質と推定しているが、卵巣での役割はなんであろうか.

ここで他の hydroperoxidase として、卵巣と筋の catalase 活性を比較したところ、卵巣ではかなり高く、筋では極めて微弱であつた (Tables 1, 2). この結果から、卵巣の H_2O_2 は catalase 活性で速やかに分解され、特別な生理的意義を示すものとは考えられない.

結局、筋および卵巣では hydroperoxidase 活性、すなわち H_2O_2 の利用ないし処理機構に差異のあることが明らかとなつた.

両組織間には、この他に、ヘモグロビンの存在の有無 (Keilin and Hartree, 1949), 呼吸基質のミトコンドリ

アへの膜透過性の差異 (林ら, 1974), 塩類溶液による b 型 cyt. 溶出の有無 (林ら, 1976a) など幾つかの相違が認められた. これらの諸知見も両組織における H_2O_2 利用ないし処理機構の相違を反映しているのかもしれない.

結 論

(1) 卵巣ミトコンドリアには cyt. oxidase も cyt. c peroxidase 活性も認められなかつた.

(2) 卵巣ホモジネートおよびミトコンドリアに強い catalase 活性が認められた. 筋での活性は極く微弱であつた.

本研究の要旨は第40回日本寄生虫学会大会 (1971) で発表した.

文 献

- 1) Bueding, E. (1963): Electron transport and fermentation in *Ascaris lumbricoides*. Control Mechanisms in Respiration and Fermentation. Rondon Press Company, New York, p. 167-177.
- 2) Cheah, K. S. and Chance, B. (1970): The oxidase system of *Ascaris*-muscle mitochondria. Biochim. Biophys. Acta, 223, 55-60.
- 3) 林 栄一・寺田 護(1971): 豚回虫の生存に及ぼす酸素圧の影響 豚回虫筋のセミ嫌氣的呼吸系の生理的機能について. 寄生虫誌, 20, 276.
- 4) 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.
- 5) 林 栄一・中西一之・寺田 護(1974): 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. 寄生虫誌, 23, 85-94.
- 6) 林 栄一・寺田 護・中西一之・清水 武(1976 a): 豚回虫の生存に及ぼす酸素圧の影響 (6) 豚回虫卵巣 cytochrome c の分離およびその性質について. 寄生虫誌, 25, 194-198.
- 7) 林 栄一・中西一之・寺田 護・清水武 (1976 b): 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. 寄生虫誌, 25, 199-204.
- 8) Herbert, D. (1955): Catalase from bacteria. Methods in Enzymology, Vol. II, p. 784-787.
- 9) 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.
- 10) Kikuchi, G., Ramirez, J. and Barron, E. S. G. (1959) : Electron transport system in *Ascaris lumbricoides*. *Biochim. Biophys. Acta*, 36, 335-342.
- 11) Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951) : Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275.
- 12) Saz, H. J. and Bueding, E. (1966) : Relationship between anthelmintic effects and biochemical and physiological mechanisms. *Pharmacol. Rev.*, 18, 871-894.
- 13) Saz, H. J. (1969) : Carbohydrate and energy metabolism of Nematodes and Acanthocephala. *Chemical Zoology*, Vol. III, Academic Press, New York and London, p. 329-360.

Abstract

THE INFLUENCE OF OXYGEN PRESSURE ON THE SURVIVAL TIME OF
ASCARIS LUMBRICOIDES SUUM (8) COMPARATIVE STUDIES
ON HYDROPEROXIDASE ACTIVITIES IN
ASCARIS MUSCLE AND OVARY MITOCHONDRIA

EIICHI HAYASHI, MAMORU TERADA, KAZUYUKI NAKANISHI
AND TAKESHI SHIMIZU

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

1. In ovary mitochondria, both cytochrome c peroxidase shown in muscle mitochondria and cytochrome oxidase activities were not detected.
2. Compared with the very low activity in muscle, a high activity of catalase was shown in ovary homogenate and mitochondria.