

## 豚回虫の生存に及ぼす酸素圧の影響 (9)

### 豚回虫卵巣ホモジネートによる O<sub>2</sub> uptake について

林 栄 一 寺 田 護 清 水 武

静岡薬科大学薬理学教室

(昭和51年7月19日 受領)

#### 緒 言

豚回虫 (以下回虫) 筋の O<sub>2</sub> uptake については多数の研究報告があり, 酸素圧依存性, KCN 不感受性, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 生成など幾つの特徴があげられている (Laser, 1944; Bueding and Charms, 1952; Bueding *et al.*, 1955; Rathbone, 1955; 大家, 1959; Kikuchi *et al.*, 1959; Katsume and Obo, 1962). 一方卵巣についてはホモジネートで O<sub>2</sub> uptake がみられることが報告されているのみである (Bueding and Charms, 1952).

そこで今回は筋および卵巣の呼吸系を比較する実験の一環として, O<sub>2</sub> uptake について検討を加えたところ両組織間で著しく異なる結果を得た.

#### 実験方法

##### (1) 筋および卵巣ホモジネートの調製

雌回虫の側線を切開, 卵巣および筋層を摘出, 筋束は 0.25 M sucrose 液で数回洗浄後細切, ついで Potter-Elvehjem 型テフロンホモジナイザーで筋 2 g 当り 8 ml のメヂウム (0.25M sucrose, 0.05M phosphate buffer, pH 7.6) を加え, 2~3 分間磨砕した.

卵巣も筋と同様にして 20%ホモジネートを調製した. これらの操作は 0~4 C 下で行い, ホモジネートは実験ごとに調製した.

##### (2) O<sub>2</sub> uptake の測定

Warburg 検圧法によつた. 主室の反応液は全量を 2.0 ml とし, 0.25 M sucrose, 50mM phosphate buffer (pH 7.6) および筋ないし卵巣ホモジネートを含む. 副室には 25% KOH 水溶液 0.2 ml を加えた. 37 C, 10 分間の温度平衡後, 毎分 105 回の振盪下で大気を気相として O<sub>2</sub> uptake を測定した.

なおこの実験において, malate ないし fumarate を

添加すると, 直後に O<sub>2</sub> uptake を凌ぐ急激な CO<sub>2</sub> output が生じた. malate 添加によるみかけの CO<sub>2</sub> output の比較に際しては, 添加時のマノメーターの読みとガス発生が最高に達した時点の読みとの差を用いて検討することとした.

#### 実験結果

(1) 筋および卵巣ホモジネートによる O<sub>2</sub> uptake  
内在基質による O<sub>2</sub> uptake を Table 1 に示した. 卵巣ホモジネートは筋の約 1/2 に相当する 151.7 μl O<sub>2</sub>/hr/g wet weight の活性を示した.

Table 1 Comparison of respiration rate in *Ascaris* muscle and ovary homogenates

Tissue	No. of experiments	Uptake of oxygen O <sub>2</sub> μl/hr/g wet wt.
Muscle	10	327.5±5.3
Ovary	5	151.7±2.7

#### Reaction system

Homogenate equivalent to 0.28 g of muscle or 0.33 g of ovary;  
Medium: Sucrose 0.25 M, Phosphate buffer (pH 7.6) 0.05 M;  
Total: 2.0 ml; Temp.: 37C

The results were presented as mean±S.E.

##### (2) 卵巣ホモジネートの O<sub>2</sub> uptake に及ぼす呼吸基質の影響

succinate (10mM) を添加すると, 当初より卵巣ホモジネートによる呼吸は促進され, 120 分後では内在基質の場合に比し約 75%高い値を示した. fumarate ないし malate (10mM) でも同様の傾向を示した. すなわち当初マノメーターにガス放出を示す変化が認められたが,

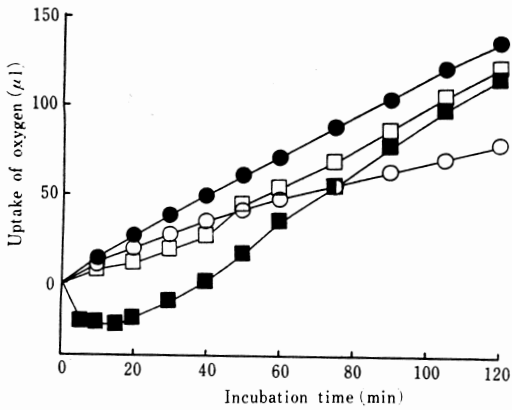


Fig. 1 The effects of various substrates on the apparent oxygen uptake in *Ascaris* ovary homogenate.

○—○ : None      ●—● : Succinate  
□—□ : Fumarate    ■—■ : Malate

Homogenates equivalent to 0.33 g of *Ascaris* ovary and 10 mM substrates were used.

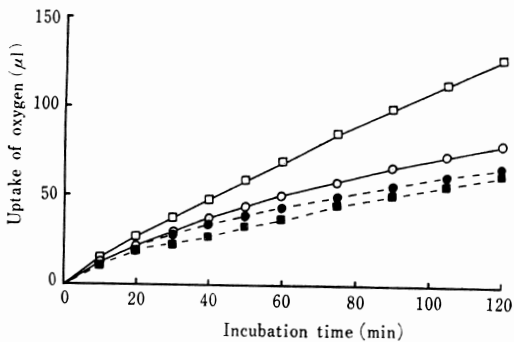


Fig. 2 The effect of  $\text{NaN}_3$  on oxygen uptake in the presence or absence of succinate in *Ascaris* ovary homogenate.

○—○ : None      ●—● :  $\text{NaN}_3$ (3mM)  
□—□ : Succinate (20mM)  
■—■ : Succinate (20mM) and  $\text{NaN}_3$  (3mM)

Homogenates equivalent to 0.33 g of *Ascaris* ovary were used.

120分後内在基質の場合に比し約50%の促進を示した (Fig. 1).

(3) 筋および卵巣ホモジネートの  $\text{O}_2$  uptake に及ぼす  $\text{NaN}_3$  ないし  $\text{NH}_2\text{OH}$  の影響

Fig. 2 に示した如く、 $\text{NaN}_3$  (3mM) により卵巣の  $\text{O}_2$  uptake は succinate (20mM) 添加の場合も内在

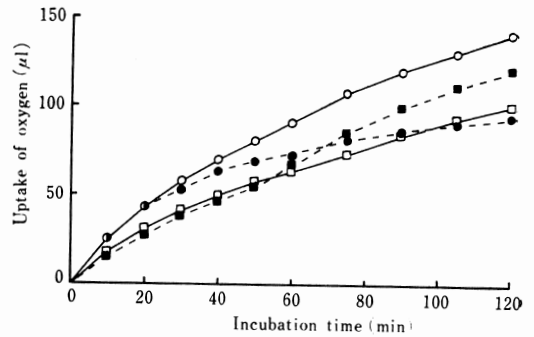


Fig. 3 The effect of  $\text{NaN}_3$  on oxygen uptake in the presence or absence of succinate in *Ascaris* muscle homogenate.

○—○ : None  
●—● :  $\text{NaN}_3$  (3mM)  
□—□ : Succinate (20mM)  
■—■ : Succinate (20mM) and  $\text{NaN}_3$  (3mM)

Reaction system was the same as in Table 1.

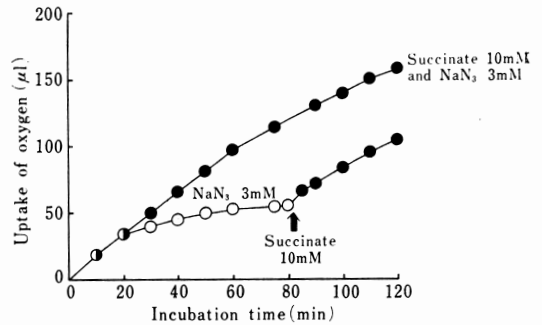


Fig. 4 The effect of succinate on the oxygen uptake inhibited by  $\text{NaN}_3$  in *Ascaris* muscle homogenate.

Reaction system was the same as in Table 1.

基質のみの場合も阻害を受けた。しかし筋では内在基質のみの呼吸は約20分後から徐々に影響を受け、120分後には約30%の阻害を受けた。一方 succinate (20mM) を添加した場合では時間の経過とともに逆に  $\text{O}_2$  uptake の促進がみられた (Fig. 3).

筋の場合、内在基質による呼吸が  $\text{NaN}_3$  (3mM) で阻害された時点で succinate (10mM) を添加すると直ちに再び  $\text{O}_2$  uptake が生じた (Fig. 4).

$\text{NH}_2\text{OH}$  (4mM) でも  $\text{NaN}_3$  の場合と同様の結果が得られた。

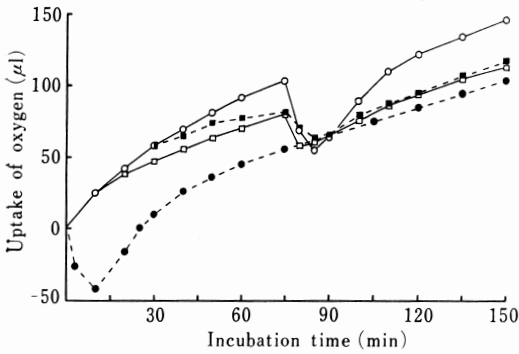


Fig. 5 The effects of  $\text{NaN}_3$  and  $\text{NaF}$  on the apparent  $\text{CO}_2$  output with malate in *Ascaris* muscle homogenate.

Malate (10mM) was added  
 ●---● : At 0 time  
 ○—○ : After preincubation for 75 min  
 ■---■ : After preincubation with  $\text{NaN}_3$  (3 mM) for 75 min  
 □—□ : After preincubation with  $\text{NaF}$  (10mM) for 75 min

Reaction system was the same as in Table 2.

(4) 筋ホモジネートに malate を添加した時に生ずるみかけの  $\text{CO}_2$  output に及ぼす  $\text{NaN}_3$  および  $\text{NaF}$  の影響

筋ホモジネートに malate (10 mM) を添加すると、実験開始時においても75分間のインキュベーション後もほとんど同程度のガス放出がみられた。しかし75分間  $\text{NaN}_3$  (3 mM) ないし  $\text{NaF}$  (10 mM) で処理後 malate を添加すると、みかけの  $\text{CO}_2$  output は著明に抑制された (Fig. 5)。

(5) malate 添加によるみかけの  $\text{CO}_2$  output に及ぼす  $\text{NaN}_3$  および  $\text{NaF}$  の阻害効果と NADH の関係

Table 2 に示した如く、malate 添加によるみかけの  $\text{CO}_2$  output は  $\text{NaN}_3$  (3 mM) で40分および75分間前処理した場合、それぞれ22%および62%阻害された。また  $\text{NaF}$  (10 mM) による前処理ではそれぞれ17% および56%の阻害であった。

$\text{NaF}$  (10 mM) 前処理ホモジネート (40分間) に NADH (5 mM) を添加してもガス放出はみられなかったが、malate (5 mM) と NADH (5 mM) を同時に添加すると、みかけの  $\text{CO}_2$  output は逆に38%も促進された。しかし  $\text{NaN}_3$  前処理では NADH による影響はみられなかった。

Table 2 Effects of  $\text{NaF}$ ,  $\text{NaN}_3$  and NADH on the apparent  $\text{CO}_2$  output with malate in *Ascaris* muscle homogenate

Preincubation with	Addition	$\text{CO}_2$ output ( $\mu\text{l}$ )	Change (%)
None	10 mM Malate at 75 min	48	100
10 mM $\text{NaF}$	10 mM Malate at 75 min	21	44
3 mM $\text{NaN}_3$	10 mM Malate at 75 min	18	38
None	5 mM Malate at 40 min	24	100
10 mM $\text{NaF}$	5 mM Malate at 40 min	20	83
10 mM $\text{NaF}$	5 mM NADH at 40 min	0	0
10 mM $\text{NaF}$	5 mM Malate+5mM NADH at 40 min	33	138
None	5 mM Malate at 40 min	23	100
3 mM $\text{NaN}_3$	5 mM Malate at 40 min	18	78
3 mM $\text{NaN}_3$	5 mM Malate+5mM NADH at 40 min	16	70

Reaction system

Homogenate equivalent to 0.28 g of *Ascaris* muscle; Medium: Sucrose 0.25 M, Phosphate buffer (pH 7.6) 0.05 M; Total: 2.0 ml; Temp.: 37C

考 察

卵巣ホモジネートは、好気下、筋の約 1/2 量の  $\text{O}_2$  uptake を示すが (Table 1), 卵巣には cytochrome (以下 cyt.) oxidase 活性が認められず (Bueding and Charms, 1952; 林ら, 1976 a),  $\text{NaN}_3$  による  $\text{O}_2$  uptake の阻害作用は遅効的であった (Fig. 2)。したがってこの  $\text{O}_2$  uptake も筋と同様フラビン酵素にもとづいて生ずるものと考えられ、ここで生じた  $\text{H}_2\text{O}_2$  は catalase 活性により分解されるのであろう (林ら, 1976 a)。

卵巣ホモジネートの  $\text{O}_2$  uptake の特徴としては、succinate などの呼吸基質および  $\text{NaN}_3$  による影響が筋の場合と著しく相違していた。

先ず筋の  $\text{O}_2$  uptake と呼吸基質との関係では、従来、succinate はミトコンドリア (顆粒分画) で呼吸基質となるが、ホモジネートで逆に呼吸を抑制すること (Laser, 1944; Rathbone, 1955; Bueding and Charms,

1952; Katsume and Obo, 1962), また malate ないし fumarate をホモジネートに添加した時, malic enzyme による脱炭酸反応で  $\text{CO}_2$  output が著明に生じ, 呼吸を抑制すること (大家, 1959) などが報告されている. 著者らの筋についての実験結果も従来の結果と同様であった. しかし卵巣では筋と著しく異なる結果が得られた. すなわち, 卵巣ホモジネートでは malate ないし fumarate の添加で当初  $\text{CO}_2$  output がみられ, 時間の経過とともに呼吸の促進がみられた. しかし succinate では初めから呼吸促進効果がみられた (Fig. 1).

この筋および卵巣における呼吸基質による影響の差異は筋ミトコンドリアでは, succinate からの電子は一部が  $\text{O}_2$  に渡され,  $\text{H}_2\text{O}_2$  を生成. 他の一部は cyt. c に渡され, 生じた還元型 cyt. c は  $\text{H}_2\text{O}_2$  を基質とし cyt. c peroxidase 活性により再酸化される. すなわち succinate からの電子は2方向性を取り, しかも共役して全体として開いた系を形成する (林・寺田, 1973). しかし catalase を添加して共役系と別に  $\text{H}_2\text{O}_2$  の処理をこころみると, succinate による  $\text{O}_2$  uptake の促進がみられる (Laser, 1944; Bueding and Charms, 1952). これに対し, 卵巣ミトコンドリアでは succinate からの電子は  $\text{O}_2$  および cyt. c に渡されるが, cyt. c peroxidase 活性は認められず, 生じた  $\text{H}_2\text{O}_2$  は catalase 活性で分解される (林ら, 1976 ab). すなわち卵巣では還元型 cyt. c の再酸化酵素活性が認められないので, 一方向にのみ開いた系が考えられ, しかもその末端酸化酵素としての catalase は  $\text{H}_2\text{O}_2$  を十分に処理しうる. 恐らくこのような電子伝達系における差異が筋および卵巣に対する呼吸基質の影響の相違をもたらすものと思われる.

つぎに  $\text{O}_2$  uptake と KCN ないし  $\text{NaN}_3$  との関係では, 筋ホモジネートの内在基質のみによる  $\text{O}_2$  uptake は KCN で徐々に阻害を受け, ミトコンドリア (顆粒分画) での succinate 添加による  $\text{O}_2$  uptake は逆に促進されることが報告されている (Kikuchi *et al.*, 1959; Katsume and Obo, 1962). 著者らも筋に  $\text{NaN}_3$  ないし  $\text{NH}_2\text{OH}$  を添加した場合, 同様の結果を得た. しかし succinate を添加したホモジネートでは  $\text{NaN}_3$  で逆に  $\text{O}_2$  uptake の促進が認められた (Fig. 3). また予め  $\text{NaN}_3$  で内在基質のみによる呼吸を抑制した筋ホモジネートに succinate を添加すると直ちに  $\text{O}_2$  uptake が生じた (Fig. 4). これらの結果は,  $\text{O}_2$  uptake に関するフラビン酵素が KCN ないし  $\text{NaN}_3$  に不感受性である

こと, また KCN などの作用で蓄積する  $\text{H}_2\text{O}_2$  に対しても安定であることを示している.

では内在基質のみによる呼吸が  $\text{NaN}_3$  などで徐々に阻害されるのは何故であろうか. これは蓄積された  $\text{H}_2\text{O}_2$  で succinate などを生成する酵素系が阻害され, 呼吸基質が枯渇するためと考えられる.

この推定を実証するため, malate 添加時のみかけの  $\text{CO}_2$  output 量について検討した. 筋の  $\text{CO}_2$  output は  $\text{NaN}_3$  ないし NaF で予め処理されている標本では阻害され, しかも  $\text{NaN}_3$  と異なり, NaF による阻害は NADH の添加で消失した (Fig. 5, Table 2). NaF 作用下では解糖系の enolase が阻害され, malic enzyme 自体が阻害を受けたのでないから, NADH 添加で  $\text{CO}_2$  output は逆に増加, しかし  $\text{NaN}_3$  作用下では  $\text{H}_2\text{O}_2$  により malic enzyme が直接阻害されているため NADH の影響は生じないものと考えられる.

また Fig. 3 で示した succinate 添加筋ホモジネートに  $\text{NaN}_3$  を加えた時の  $\text{O}_2$  uptake 促進効果もおそらく上記の現象に関連して生ずるものであろう. すなわち succinate からの  $\text{O}_2$  uptake は  $\text{NaN}_3$  とか  $\text{H}_2\text{O}_2$  の作用を受けないが, malic enzyme を介する  $\text{CO}_2$  output (succinate  $\rightarrow$  fumarate  $\rightarrow$  malate  $\rightarrow$  pyruvate, Oya *et al.*, 1965; 林ら, 1976 b) は  $\text{NaN}_3$  作用下で徐々に阻害されるため, 見かけ上  $\text{O}_2$  uptake の促進が生ずるものと解される.

一方卵巣ホモジネートでは, 内在基質による呼吸および succinate 添加呼吸のいずれも  $\text{NaN}_3$  で阻害を受けた (Fig. 2). これは  $\text{NaN}_3$  ないし KCN の作用で catalase 活性が阻害され (林ら, 1976 a), 生じた  $\text{H}_2\text{O}_2$  によりフラビン酵素とか呼吸基質生成系などが阻害を受ける結果と考えられる.

結局, 筋および卵巣ホモジネートの  $\text{O}_2$  uptake に対する  $\text{NaN}_3$  の影響を検討して, 両組織の  $\text{H}_2\text{O}_2$  生成酵素に著しい差異のあることが認められた. すなわち筋では  $\text{NaN}_3$  により cyt. c peroxidase 活性が阻害され, 蓄積した  $\text{H}_2\text{O}_2$  が malic enzyme, 解糖系酵素などを阻害し, 呼吸基質の枯渇を招き呼吸を抑制すること, しかしフラビン酵素は  $\text{H}_2\text{O}_2$  に対し安定で, succinate の添加で  $\text{O}_2$  uptake を示すこと, 一方卵巣では  $\text{NaN}_3$  で catalase 活性が阻害され, 蓄積した  $\text{H}_2\text{O}_2$  によりフラビン酵素および解糖系酵素などがともに毒作用を受けることが示唆された. 筋の  $\text{H}_2\text{O}_2$  生成酵素が  $\text{H}_2\text{O}_2$  自体に対し安定性を示す結果は,  $\text{H}_2\text{O}_2$  が cyt. c peroxidase

の生理的基質であることからすれば極めて合目的であるといえよう。

### 結 論

(1) 好気下, 卵巣ホモジネートは筋の約  $1/2$  量の  $O_2$  uptake を示した. また筋ホモジネートに malate ないし fumarate を添加した際に認められたみかけの  $CO_2$  output も卵巣に認められた.

(2) succinate, fumarate および malate の添加により, 卵巣の呼吸は促進的影響を受けた.

(3) 卵巣ホモジネートの場合,  $NaN_3$  は内在基質による呼吸を徐々に阻害し, succinate 添加時の  $O_2$  uptake をさらに著しく阻害した.

(4) 筋ホモジネートでは  $NaN_3$  は内在基質による呼吸に遅効的な阻害を示し, succinate 添加時には逆に促進効果を示した. また内在基質による呼吸が  $NaN_3$  で阻害された時点で succinate を添加すると, 直ちに再び  $O_2$  uptake が生じた.

(5) 筋ホモジネートに malate を添加した時に生ずるみかけの  $CO_2$  output は予め標本を  $NaN_3$  ないし NaF で処理した場合阻害された. NaF 前処理の場合は, NADH と malate を同時に添加すると  $CO_2$  output は逆に促進された.

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. and Charms, B. (1952) : Cytochrome c, cytochrome oxidase and succinoxidase activities of helminths. J. Biol. Chem., 196, 615-627.
- 2) Bueding, E., Entner, N. and Farber, E.

(1955) : Dissociation of the succinoxidase systems of *Ascaris lumbricoides* and of rat kidney. Biochim. Biophys. Acta, 18, 305-306.

- 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・清水武 (1976 a) : 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, 寄生虫誌, 25, 324-327.
- 5) 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.
- 6) Katsume, T. and Obo, F. (1962) : Biochemical studies of *Ascaris lumbricoides*. Acta Medica Univ. Kagoshima, 4, 56-79.
- 7) Kikuchi, G., Ramirez, J. and Barron, E. S. G. (1959) : Electron transport system in *Ascaris lumbricoides*. Biochim. Biophys. Acta, 36, 335-342.
- 8) Laser, H. (1944) : Oxidative metabolism of *Ascaris suis*. Biochem. J., 38, 333-338.
- 9) 大家 裕 (1959) : *Ascaris lumbricoides var. suis* の筋肉による malic acid の酸化的脱炭酸およびその他の TCA cycle 中間代謝基質の酸化について, 寄生虫誌, 8, 29-43.
- 10) Oya, H., Kikuchi, G., Bando, T. and Hayashi, H. (1965) : Muscle tricarboxylic acid cycle in *Ascaris lumbricoides var. suis*. Ex. Parasit, 17, 229-240.
- 11) Rathbone, L. (1955) : Oxidative metabolism in *Ascaris lumbricoides* from pig. Biochem. J., 61, 574-579.

**Abstract**

THE INFLUENCE OF OXYGEN PRESSURE ON THE SURVIVAL TIME  
OF *ASCARIS LUMBRICOIDES SUUM* (9) ON OXYGEN  
UPTAKE IN *ASCARIS* OVARY HOMOGENATE

EIICHI HAYASHI, MAMORU TERADA AND TAKESHI SHIMIZU

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

1. Under aerobic condition, ovary homogenate showed oxygen uptake equivalent to a half of that in muscle homogenate. Apparent CO<sub>2</sub> output shown by the addition of malate or fumarate to muscle homogenate was also observed in ovary homogenate.
2. By the addition of succinate, fumarate and malate, oxygen uptake in ovary homogenate was stimulated.
3. In ovary homogenate, NaN<sub>3</sub> inhibited oxygen uptake both with and without the exogenous succinate. In muscle homogenate, however, NaN<sub>3</sub> inhibited only the endogenous respiration.
4. When the endogenous respiration of muscle homogenate was fully inhibited with NaN<sub>3</sub>, oxygen uptake was reinitiated by the addition of succinate.
5. In muscle homogenate, the apparent CO<sub>2</sub> output shown by the addition of malate was inhibited by the pretreatment with NaN<sub>3</sub> or NaF. Although NADH had no effect on the inhibition by NaN<sub>3</sub>, this coenzyme added simultaneously with malate stimulated the apparent CO<sub>2</sub> output in muscle homogenate pretreated with NaF.