

テトラヒメナのチトクロムペルオキシダーゼ 活性についての研究

——ミトコンドリアの分化に関して——

京都大学結核胸部疾患研究所 細胞化学部

平 井 圭 一

緒 言

ミトコンドリア (Mt と略す) の機能の中で最も代表的なものは、呼吸及びエネルギー代謝に関するものであり、この点に関して Mt はすべての生物に普遍的な生命活動を営んでいると言える。しかしながら、その個々の様式について比較してみると、決して単一のものではなく、背景となる生物種、生育環境等で種々の変異がみられ、Mt もまた他の細胞内小器官と同様に系統発生的に分化して来たことが示されている。

Mt の呼吸系 (電子伝達系) には 図 1 に示されるように多くの系路が存在する¹¹⁾。この中で最も分化していると考えられているのは、呼吸基質や NAD (P) から与えられた電子がチトクロム系を通り、チトクロムオキシダーゼによって O_2 に伝達される系である。この系によって哺乳動物の心筋 Mt をはじめ、多くの好氣的細

胞は最も能率良くエネルギーを獲得している。

さて、このような好氣的生物を地球上に出現させる原因になったのは O_2 の発生であるが、その結果必然的に発生したであろう H_2O_2 を代謝する機能も当然出現したと考えられる。その一つとして Mt 内ではチトクロムペルオキシダーゼがあげられる。この酵素は分子量約 35,000 でプロトヘミンを有するヘム蛋白質の一種で¹⁸⁾、 H_2O_2 存在下に還元型チトクロム C を特異的に酸化する働きがあるが、生理的意義はいっさい不明である。現在までに、Mt 内での存在が確認されているのは、酵母 *Saccharomyces cerevisiae*^{11,12)}、*S. carsbergensis* のチトクロム C ペルオキシダーゼ¹⁷⁾ のみで、動物界での存在及び分布は全く知られていない。

本研究の目的は、チトクロムペルオキシダーゼの動物界での分布、生理的役割及び系統発生的な変異性を調べることで、Mt の分化につい

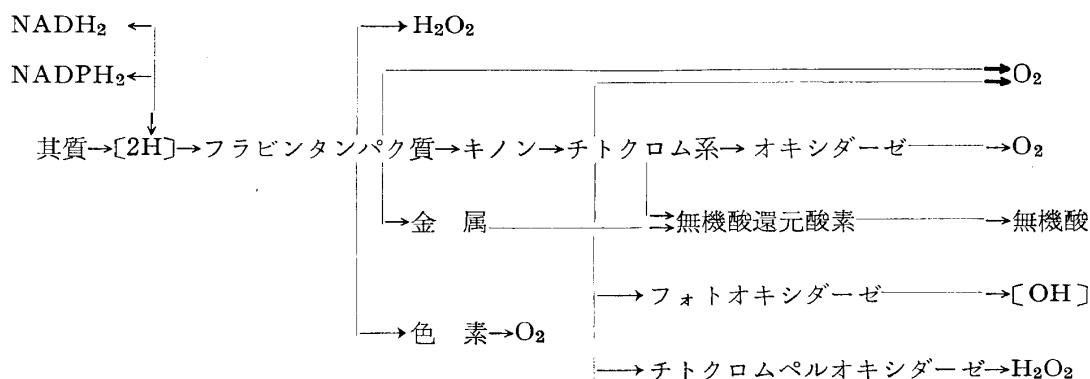


図 1 電子伝達系の分化¹¹⁾

て、一つの指標を与えようとするものであり、また高等動物の Mt, 特に心筋 Mt の機能をより良く理解するための一助にしようとするものである。

以上のような考えから、分類学上最下等の原生動物について検索を開始した。検索の一つの目安として、予備実験で呼吸活性を測定し、好気的生活者であるにもかかわらず、チトクロムオキシダーゼ活性の低い種類について目標をしばることにした。その結果、偶然、繊毛虫の一種で好気的なテトラヒメナが上記の条件に一致する性質を有することが判明したので、細胞化学的検索を行なったところ、Mt にペルオキシダーゼ活性が局在することが見出された。本研究では、電顕細胞化学的及び生化学的方法により、テトラヒメナの Mt ペルオキシダーゼ活性について解析を試み、同酵素がチトクロムペルオキシダーゼである可能性について考察を加える。

実験材料・実験方法

1. 細胞培養

テトラヒメナ (*Tetrahymena pyriformis*, W株) を 2% のプロテオースペプトン、1% 酢酸ナトリウム及び 1% グルコースを含む液体完全培地 (pH 7.2) で静置培養 (28°C) し、培養 6 日目 (静止期) の細胞を電顕細胞化学的検索に供した。生化学的実験には、毎分 100 サイクルで水平振盪培養した 3 日目 (後対数期) の細胞を用いた。

2. 電顕細胞化学⁶⁾

Avers のチトクロムペルオキシダーゼ活性検出のための反応液¹⁾を、テトラヒメナ用に少し改変した液に生細胞を入れ、室温で 3 分間反応させ、す早く洗った後、3% グルタルアルデヒドと 1% オスミック酸で固定した。固定試料はアルコール脱水後、エポン 812 に包埋した。超薄切片の作製及び観察には、LKB ウルトラトーム及び日本電子製 JEM-7A 電子顕微鏡を使用した。

酵素反応液の組成は、24mg% p-アミノジフ

ェニルアミン、30mg% p-メトキシ-p'-アミノジフェニルアミン、0.008% H₂O₂、0.35M マンニット、0.05% (w/v) 牛血清アルブミン、0.1mM EDTA 及び 10mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.5) から成る。

3. 生化学的分析

小林の方法⁸⁾で Mt 画分を得、分光学的に酵素活性を測定した。

a. Mt 画分の調製⁸⁾

細胞を氷冷したマンニット液 (0.35M マンニット、0.05% (w/v) 牛血清アルブミン、0.1mM EDTA 及び 5mM のトリス緩衝液、pH 7.2 を含む) に浮遊させ、テフロン回転棒付きのガラスホモジナイザーで静かに摩砕し、6,000g で 5 分間遠沈して、沈澱物を Mt 画分とした。純度の検定は主に電顕的観察によったが、目立った他の細胞内小器官の混入は見られず、ほぼ均一に Mt のみから成立っていた。しかしながら Mt の約 30% のものに、膨潤及び外膜の破損がみられた。

b. 酵素活性測定

i) p-フェニレンジアミンの酸化：

分離 Mt の酵素活性は、1cm の光路程を持つガラスセル中で、白記分光光度計を用いて測定した。即ち、480nm の吸光度の変化から、ペルオキシダーゼ活性によって、基質 (H₂O₂) と電子供与体 (p-フェニレンジアミン) から酸化色素が 30°C において生成される速度を得た。反応液は、50.0mM p-フェニレンジアミン、149 μ M H₂O₂、0.35M マンニット、0.1mM EDTA 及び 0.05% (w/v) 牛血清アルブミンから成っており、反応液の pH は 5mM リン酸緩衝液 (pH 6~8) か 10mM サク酸緩衝液 (pH 5) で調製した。

反応液から H₂O₂ 除くことによって、p-フェニレンジアミンを基質とするオキシダーゼ活性を測定した。

ii) 還元型チトクロム C の再酸化¹⁶⁾：

H₂O₂ 存在下に Mt によるウマ心筋及び緑濃菌の還元型チトクロム C に対する再酸化能をそれぞれ 550nm 及び 551nm の吸光度の変化によ

り測定した。反応液は、0.25mM の還元型チトクロムC、15 μ M H₂O₂ 及び6mM リン酸緩衝液を含んでいる。還元型チトクロムCは酸化型標品を少量の亜ニチオン酸ナトリウムで還元し、蒸留水及びリン酸緩衝液に対し透析して得た。平均還元度は98%であった。

iii) ピロガロールの酸化：

Chance らの常法³⁾に従って、室温で1mg のMt が H₂O₂ 存在下5分間に生成するプルプロガリン量を測定し、PZ 値(プルプロガリンNo.)を算定した。

実験結果

1. 電顕的処見⁶⁾

写真2, 3, 4に示したように、Avers のチトクロムペルオキシダーゼ反応液に浸した細胞では、そのMt内の電子密度が、反応させなかった細胞(写真1)と比較して高くなっていることから、Mtにペルオキシダーゼ活性が存在することが示唆された。反応液からH₂O₂を除くと、Mtの酸化活性は明瞭に弱くなったが、なお存在していた。しかし、この場合は、10mM のNaN₃あるいは1mM のKCNで完全に反応は陰性になったので、恐らくチトクロムオキシダーゼによる活性と思われる。一方、H₂O₂存在下のペルオキシダーゼ活性は、写真5に示されるように、10mM のNaN₃で陰性にならず、従って両者の反応は各々別の酵素反応によるものであった。ペルオキシダーゼ活性の場合、反応時間を1分間にしても常にMt内に沈澱物が

見られることから、同酵素活性がMt内にあるのはほぼ確実であろう。

グルタルアルデヒドやアセトンで前固定した細胞では、ペルオキシダーゼ活性が消失し、70°Cの熱処理にも感受性を示した。10mM の3-アミノ-1,2,4-トリアゾールでは阻害されなかった。

Mt内でのペルオキシダーゼ活性の微細な局在性に関しては、写真3, 4, 5から小管状クリステと関係があるらしいが、反応酸化物の電子密度が低く、また拡散しやすい性質のため、深く考察することは出来なかった。反応時間を3分間より長くすると、Mt内の沈澱物が小滴状に凝集したり(写真5)、Mt外へ拡散したり、脂肪滴への吸着等が見られ、方法的にも十分信頼できなかった。従って分離Mtによる生化学的実験の必要が生じ次の実験を行なった。

2. 分離Mtの酵素活性

a. p-フェニレンジアミンの酸化

表Iに各pHにおけるMtの酵素活性及びアジドによる阻害を示した。この表から、テトラヒメナのMtにオキシダーゼ活性と区別されるペルオキシダーゼ活性が存在することは明らかであり、その至適pHは7付近にあった。アルカリ側ではアジドによる阻害はなく、酸性になるに従ってペルオキシダーゼ活性は強く阻害された。これはアジドイオン(N₃⁻)による阻害ではなく、アジ化水素(HN₃)によるものであることを示している。表IIに2, 3の阻害剤による酵素活性への影響を示したが、ペルオキシダー

写真説明

写真2を除いた他は酢酸ウラニウムとクエン酸鉛による電子染色を施してある。

写真1 テトラヒメナの細胞表面近くの電顕写真

小管状構造のクリステを有するミトコンドリア(mt)とmucocyst(mc)がみられる。

倍率 ×29,200

写真2, 3, 4 pH 7.5 のチトクロムペルオキシダーゼ活性検出液中で3分間反応させた細胞

酵素反応によってミトコンドリアの電子密度が高くなっている。写真3, 4で円形のクリステの断面に、反応産物の沈澱が見られる。

倍率 写真2 ×8,000, 写真3 ×75,000, 写真4 ×56,000

写真5 10mM のアジドを含む pH 7.5 のチトクロムペルオキシダーゼ活性検出液中で3分間反応させた細胞

ミトコンドリア(mt)のペルオキシダーゼ活性はアジドで阻害されなかった。写真の下方の2つのミトコンドリアでは反応産物が小滴状に凝集している(矢印)。

倍率 ×47,200

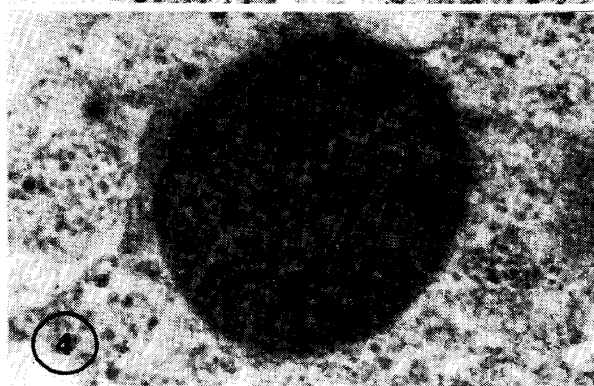
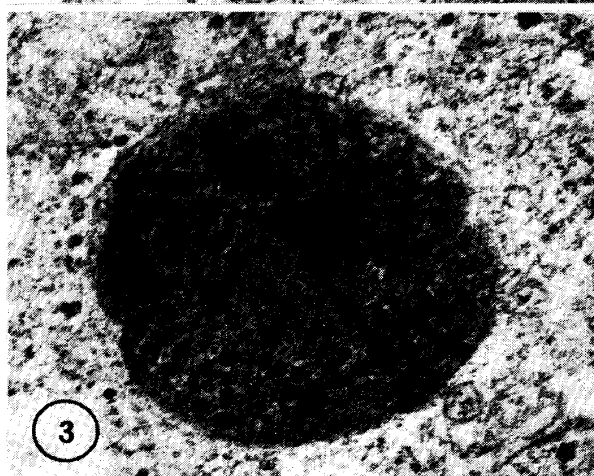
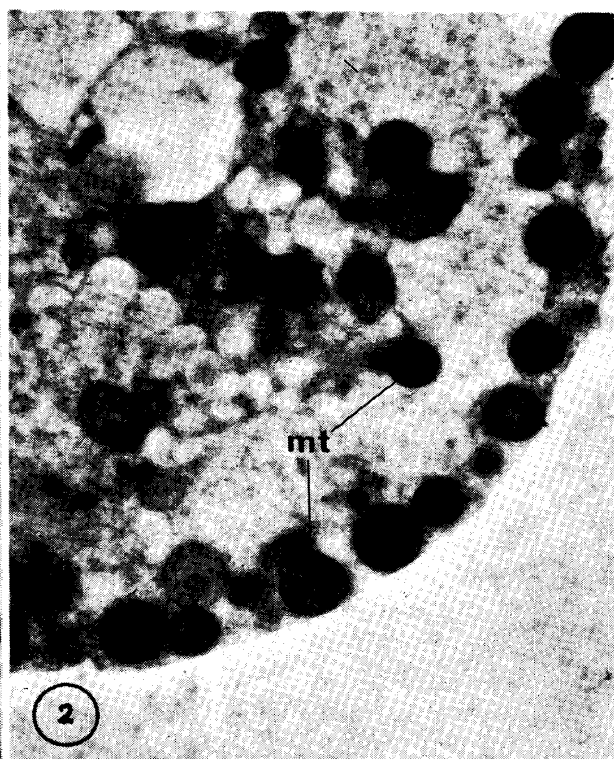
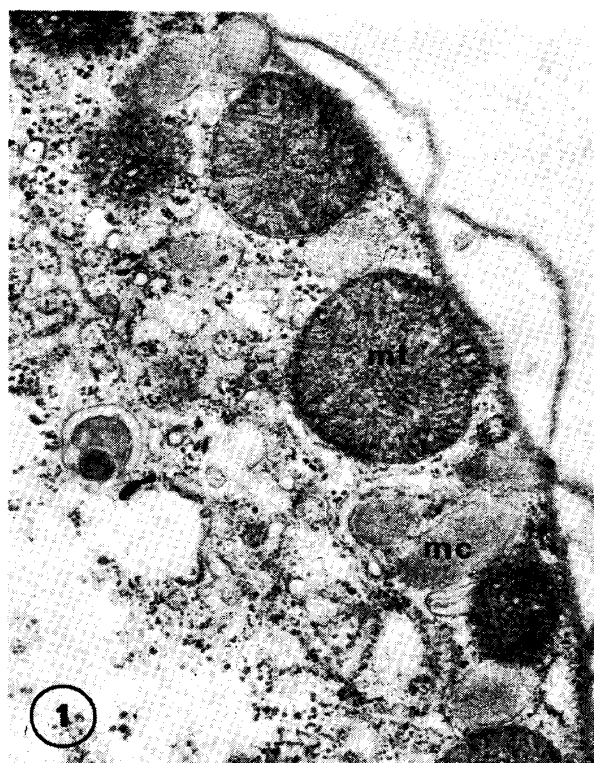


表 I. 各 pH における Mt の酵素活性およびアジドによる阻害

pH	ペ ル オ キ シ ダ ー ゼ			オ キ シ ダ ー ゼ		
	比 活 性		阻 害	比 活 性		阻 害
	NaN ₃ のない場合	NaN ₃ のある場合	%	NaN ₃ のある場合	NaN ₃ のある場合	%
5.0	15.9±9.21	0.0	100.0	—	—	
6.0	41.7±11.25	1.7±6.92	95.9	0.0	—	
7.0	147.0±16.92	73.5±19.70	50.0	21.0±16.21	0.0	100
7.2	141.9±12.07	92.6±9.30	34.6	46.4±11.99	0.0	100
7.5	115.3±11.29	92.3±7.23	19.9	48.6±7.10	0.1	99.8
7.8	101.6±9.63	100.6±9.84	1.0	36.2±5.36	-0.1	100
8.0	22.9±5.87	22.5±5.62	1.7	18.2±3.01	0.0	100

基質: 50.0mM p-フェニレンジアミン 149μM H₂O₂ (ペルオキシダーゼの場合)

測定温度: 30°C

比活性: 480nm における吸光度の変化/0.01/mg蛋白/分

表 II. Mt の酵素活性に及ぼす阻害剤の影響

阻 害 剤	ペ ル オ キ シ ダ ー ゼ		オ キ シ ダ ー ゼ	
	比 活 性		比 活 性	
	$\frac{\Delta \text{吸光度} 480}{0.01} / \text{mg} / \text{分}$	%	$\frac{\Delta \text{吸光度} 480}{0.01} / \text{mg} / \text{分}$	%
な し	115.3±11.29		40.2±5.78	
NaN ₃ 10.0mM	92.3±7.38	19.9	0.0	100
KCN 1.0mM	15.4±2.12	86.6	-0.2	100
3-アミノ-1, 2, 4-トリアゾール 10.0mM	114.3±13.11	0.8		

基質: 50.0mM P-フェニレンジアミン 149μM H₂O₂ (ペルオキシダーゼの場合)

測定条件: 30°C, pH 7.5

ゼ活性は3-アミノ-1, 2, 4-トリアゾールで阻害されなかったもので、カタラーゼ^{4,5)}や他の組織(白血球等)のペルオキシダーゼとは性質を異にしていた。これらの処見は、前述の電顕的観察と一致していた。一つの問題は、他のペルオキシダーゼには見られないコハク酸による色素の酸化抑制が、ここでは見られたことである(表 III)。一つの可能性として、酸化還元電位の低いコハク酸から、電子伝達系を通して電子がペルオキシダーゼに流れたために、色素の酸化が拮抗されたと考えることが出来る。コハク酸によって色素が直接還元されたのではないかという疑いは、Mtを含まない反応液での実験から

完全に否定されている。

b. ピロガロールの酸化

準嫌氣的条件下で Mt によるピロガロールの酸化能(H₂O₂を要求)を測定したところ、0.977 mg の Mt が 5 分間に 0.2165mg のプルプロガリンを生成し、PZ 値は0.2215と計算された。この反応は 10mM の3-アミノ-1, 2, 4-トリアゾールで何ら影響されなかった。

c. 還元型チトクロムCの再酸化

表 IV に、二種類の還元型チトクロムCを基質にしたときの、Mt による再酸化活性を示す。緑濃菌のチトクロムCを基質にした場合の方が、ウマ心筋チトクロムCに対するより強いべ

表 III. アジドの存在下に色素を基質としたときの Mt のペルオキシダーゼ活性に及ぼすコハク酸の影響

		比 活 性	
		$\frac{\Delta \text{吸光度}_{480}}{0.01} / \text{mg/分}$	%
対 照		92.3 $\pm$ 7.38	100.0
コハク酸	25 mM	65.2 $\pm$ 7.11	70.0
コハク酸	50 mM	32.5 $\pm$ 2.84	35.2
コハク酸	125 mM	23.8 $\pm$ 2.10	25.8
コハク酸 + アンチマイシン A	125 mM 0.2 mM	28.2 $\pm$ 4.59	30.6

基質: 50.0 mM p-フェニレンジアミン
149 μ M H₂O₂
10 mM NaN₃

測定条件: 30°C, pH 7.5

表 IV. Mt のペルオキシダーゼによる還元型チトクロム C の再酸化

基 質	比 活 性
	nmoles チトクロム C / mg / 分
チトクロム C $\cdot$ Fe ²⁺ (550, ウマ心筋)	12.6
チトクロム C $\cdot$ Fe ²⁺ (551, 緑濃菌)	22.95
+ NaN ₃ (10 mM)	14.11

測定条件: 28°C, pH 7.2, 15 μ M H₂O₂

ルオキシダーゼ活性が検出された。pH 7.2 で 10 mM のアジドによる反応阻害は 38.4 % と計算され、p-フェニレンジアミンを基質にしたときの同 pH における阻害 34.6 % (表 I) と近似している。オキシダーゼ活性については、ウマ心筋還元型チトクロム C について測定したが、0.2 mM の ADP を加えてもほとんど見られなかった。

考 察

電顕的な酵素活性測定と、高純度に分離された Mt 画分を用いての生化学的な酵素活性測定の両方によって、テトラヒメナの Mt に動物では初めて特殊なペルオキシダーゼ活性の存在が立証された。この酵素は、緑濃菌のチトクロム C 及び、それよりは活性が劣るが、ウマ心筋の

チトクロム C に対し反応性を有することから、チトクロムペルオキシダーゼの一種と考えられる。この酵素活性が他の酵素や、金属による非特異的な触媒作用によるものでないことは、熱処理や固定剤に対する感受性、阻害剤に対する反応性等から明らかである。3-アミノ-1,2,4-トリアゾールに耐性であるので、テトラヒメナのペルオキシダーゼに局在するカタラーゼ²⁾の関与も否定された。Mt による p-フェニレンジアミンの過酸化的酸化が、コハク酸によって抑制されることは、ペルオキシダーゼ活性が Mt の電子伝達系と関連していることを暗示しているのであろう。また、Mt のピロガロール酸化能 (PZ 値 0.2215) は、精製された白血球ペルオキシダーゼの PZ 値 1220 に比べて低いが⁷⁾ (本実験では精製していない点もあるが)、一般にチトクロムペルオキシダーゼの特徴である¹⁶⁾。

今までに、チトクロムペルオキシダーゼが Mt に局在していることが確められているのは、1, 2 の酵母についてのみであるが^{1,12,17)}、細胞内小器官の発達がない緑濃菌に同酵素活性が証明され⁹⁾、硫黄細菌からは酵素が抽出されスペクトルの分析がされている¹⁴⁾。テトラヒメナの Mt ペルオキシダーゼ活性は酸性側でのみアジドによって強く阻害されたが、緑濃菌のチトクロムペルオキシダーゼの性質 (10 mM のアジドで pH 5.5 では 95 % 阻害されるが、pH 7.5 では不明瞭)⁹⁾ 及び酵母のそれ (pH 6 で完全阻害)¹⁶⁾ と極めて良く類似している。

Mt (電子伝達系) の分化を考えると、チトクロムペルオキシダーゼの持つ意味はまだ分らない。哺乳動物の心筋・肝にはチトクロムペルオキシダーゼはないという¹⁷⁾。果して下等な生物のみにあって高等な生物には分布しないのであろうか。しかし少なくともテトラヒメナの Mt ペルオキシダーゼ (チトクロムペルオキシダーゼ) に関しては、進化論的に通性嫌気性菌である酵母や緑濃菌とそう遠くない位置にあるのであろう。山中は比較生化学的研究で^{13,15)}、テトラヒメナのチトクロム C は細菌型 (緑濃菌) であることから、両者は比較的近い類縁関係にあるのであろうと述べている。分類学的には、

テトラヒメナが動物の範疇に入ることは、絨毛による運動性、哺乳動物の培養細胞と非常によく似た栄養要求性¹⁰⁾等から一応うなずける。従って、生物の進化の過程の中で、嫌気的生命の次に好気的生命が出現し、そこから動物と植物とが進化して行ったとすれば、その分岐点近くの呼吸の機能を、この原生動物は Mt の中に維持し続けているのではないだろうか。

要 約

1. 原生動物テトラヒメナのペルオキシダーゼ活性について、電顕細胞化学的及び分離 Mt による生化学的研究を行なった。
2. 電顕処見では、ペルオキシダーゼ活性は Mt に局在し、クリステの部分との関連が強かった。活性は pH 7.5 で 10mM のアジドに耐性を示したが、固定操作や 60°C の熱処理に感受性であった。
3. 高純度に分離された Mt で、 H_2O_2 存在下に p-フェニレンジアミンが酸化された。アジドによる阻害は pH 依存性を示し、pH 7.8 以上では阻害されず、pH 7.5 で 19.9%、pH 7.0 で 50%、pH 6.0 で 95.9% 阻害された。カタラーゼの阻害剤 3-アミノ-1,2,4-トリアゾールでは影響されなかった。また色素の酸化活性はコハク酸によって拮抗的に抑制され、Mt のペルオキシダーゼ活性の電子伝達系との関連が示唆された。
4. 分離 Mt のペルオキシダーゼ活性によって、ウマ心筋還元チトクロム C 及び緑濃菌還元チトクロム C が酸化され、後者の場合、10mM のアジドによる酸化抑制は pH 7.2 で 38.4% であった。これらのことから、テトラヒメナの Mt ペルオキシダーゼはチトクロムペルオキシダーゼの一種と思われる。
5. テトラヒメナの Mt にはチトクロムオキシ

ダーゼによると思われるオキシダーゼ活性があったが、アジドで完全阻害され、ペルオキシダーゼ活性とは明瞭に区別された。

謝 辞

テトラヒメナ及び緑濃菌チトクロム C を、それぞれご恵与下さった京都府立医科大学岸田綱太郎博士及び大阪大学山中健生博士に謝辞を述べると共に、本研究に適切なご助言とご指導を賜った山中博士及び高松英雄教授に、厚く感謝の意を表します。

本研究は文部省科学研究費により援助された。

文 献

- 1) Avers, C.J.: J. Bacteriol., 94: 1225, 1967.
- 2) Baudhuin, P. et al.: Biochem. Biophys. Res. Commun., 20: 53, 1965.
- 3) Chance, B. and Maehly, A.C.: Methods Enzymol., 2: 773, 1955.
- 4) Hirai, K.: J. Histochem. Cytochem., 17: 585, 1969.
- 5) Hirai, K.: ibid. 19: 434, 1971.
- 6) Hirai, K.: Proc. 4th Intern. Cong. Histochem. Cytochem., 1972, p. 357.
- 7) Keilin, D. and Hartree, E.F.: Biochem. J., 49: 88, 1951.
- 8) Kobayashi, S.: J. Biochem., 53: 444, 1965.
- 9) Lenhoff, H.M. and Kaplan, N.O.: Methods Enzymol., 2: 758, 1955.
- 10) Lwoff, S.A.: Biochemistry and Physiology of Protozoa Vol. 1, 1951.
- 11) 丹羽允, 佐藤了, 現代の生物学, 2: 271, 1966.
- 12) Sels, A. and Cocriamont, C.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 32: 192, 1968.
- 13) Yamanaka, T. and Okunuki, K.: J. Biol. Chem. 239: 1813, 1964.
- 14) Yamanaka, T. and Okunuki, K.: Biochim. Biophys. Acta, 220: 354, 1970.
- 15) 山中健生, 生化学, 43: 47, 1971.
- 16) Yonetani, T. and Ray, G.S.: J. Biol. Chem., 240: 4503, 1965.
- 17) Yonetani, T. and Ohnishi, T.: J. Biol. Chem., 241: 2983, 1966.
- 18) Yonetani, T.: J. Biol. Chem., 242: 5008, 1967.