OUKA
Osaka University Knowledge Archive

Title	Candida lipolyticaの単離ミトコンドリアでのクエン酸生成とその制御
Author(s)	光島, 健二
Citation	大阪大学, 1978, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/2729
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

Osaka University

*Candida lipolytica*の単離ミトコンドリアでのクエン酸生成とその制御

大阪大学附属図書館
53.5.15

1977年

光島健二

*Candida lipolytica*の単離ミトコンドリアでの クエン酸生成とその制御

1977年

光島健二

まえがき

微生物工業において、醗酵生理学や生産機構の解明は、培養工学的な研究とともに、微生物のもつ潜在的能力の、質的かつ量的な改善に大きな貢献をもたらした。近年、微生物学において、二つの飛躍的な発展がみられた。一方は、分子遺伝学、分子生物学の進歩であり、醗酵工学にも多大の影響を及ぼした。代謝制御、酵素生合成機構の研究成果による、アミノ酸醗酵、核酸醗酵の確立は、この最たるものである。これに比し、細胞分画法の導入により進展した細胞生物学、細胞生理学の手法は、いまだに、醗酵生理、生産面に積極的に取り入れられていない。

著者がここに取り上げた、炭化水素資化性酵母 *Candida lipolytica* によるクエン酸醗酵の、クエン酸蓄積機構、代謝制御に関する研究は、多数報告されているにもかかわらず、いずれもが、クエン酸の生成系および分解系の酵素の活性調節、量的増減という、酵素学的な立場から論じられており、結論がだされていない。しかしながら、真核生物である酵母細胞の物質代謝を、詳細に把握するためには、細胞生物学的な立場から、問題とする酵素群の局在する細胞内小器官での代謝機構の知見が必須である。

この研究では、グルコースを炭素源とした培地で増殖した *C. lipolytica* 細胞から、細胞内でのクエン酸生成の場であるミトコンドリアを単離するとともに、そこでのクエン酸生成、制御機構を生理学的かつ酵素学的に明らかにして、クエン酸醗酵機構を細胞生理学的に解明することを目的とした。

このような応用微生物分野での、細胞生理学的研究は今、始まったばかりであり、今後の発展が大いに期待され

る。　本研究で得られた成果は、基礎的知見に過ぎず、まだまだ解明されねばならない問題を多々残してはいるが、醗酵生理、生産への工学的応用の一助になれば、幸いである。

1977年 12月

著　者

目　　次

緒　　論　1

第1章　対数期細胞からのミトコンドリアの単離と呼吸特性　7
第1節　緒　　言　7
第2節　実験材料および方法　9
第3節　結　　果　14
1. クエン酸生産の経時変化　14
2. 対数期スフェロプラストの調製　15
3. 対数期ミトコンドリアの電子顕微鏡観察　18
4. 単離された対数期ミトコンドリアの呼吸特性　20
A. 各種基質酸化における対数期ミトコンドリアの呼吸機能　23
B. 酸化的リン酸化系の各種阻害剤の効果　25
第4節　考　　察　28
第5節　要　　約　30

第2章　定常期（クエン酸生成期）細胞からのミトコンドリアの単離と呼吸特性　32
第1節　緒　　言　32
第2節　実験材料および方法　33
第3節　結　　果　35
1. 定常期スフェロプラストの調製　35
2. 定常期ミトコンドリアの電子顕微鏡観察　40
3. 単離された定常期ミトコンドリアの呼吸特性　41
A. 各種基質酸化における定常期ミトコンドリアの呼吸機能　41
B. 電子伝達系阻害剤の効果　44

第4節　考　察　45
第5節　要　約　47

第3章　ミトコンドリアのチトクロム類の分光分析　48
第1節　緒　言　48
第2節　実験材料および方法　49
第3節　結　果　51
1. ミトコンドリアのチトクロム組成　51
2. b型チトクロムの分光分析　55
第4節　考　察　59
第5節　要　約　61

第4章　ミトコンドリアでのクエン酸生成とその制御　62
第1節　緒　言　62
第2節　実験材料および方法　64
第3節　結　果　68
1. 定常期および対数期ミトコンドリアでのクエン酸生成　68
2. 定常期ミトコンドリアの代謝に及ぼすアデニンヌクレオチドの効果　79
3. ミトコンドリア抽出液中の isocitrate dehydrogenase 活性に対するアデニンヌクレオチドの効果　83
4. アデニンヌクレオチド類の細胞内含有量　86
第4節　考　察　87
第5節　要　約　92

総括および結論　94

文　献　100

緒　　論

クエン酸醗酵の歴史は、1893年 Wehmer による糸状菌 Penicillium 属での発見に始まる。その後ショ糖からクエン酸蓄積能の高い菌株が Aspergillus 属の中から多く見い出され、1917年 Currie[1] は Asp. niger を用い、対糖収率を55%にまで上昇させ、以降の糸状菌によるクエン酸の工業的製造の端緒になった。その後も黒カビを使用して、Bernhauer[2]、Butkewitsh[3] らが、本邦でも坂口[4]、照井[5,6] らが詳細な研究を行なった。また Asp. niger 以外でも Asp. awamori[7]、Asp. aureus、Asp. saitoi[8,9]、Asp. oryzae[10] での工学的研究が試みられた。1940年代までクエン酸生産は、表面培養法によっていたのであるが、戦後1952年 Miles Laboratory が液内培養法での工業化に成功した。以来両製造法は併立の状態にあり、今日では全世界のクエン酸総生産量の90%以上が醗酵法により製造され[11]、酢酸、乳酸醗酵とともに有機酸醗酵の主流をしめている。

Asp. niger によるクエン酸醗酵機構の研究も、種々の基質の検討、収支論的な実験から多くの仮説が提出されたが、1940年頃まで定説と云えるものはなかった[12]。この方面での研究の進展は Krebs 一派による動物組織でのトリカルボン酸（TCA）回路（クエン酸回路）の証明[13]に負うところ大である。また Wood-Werkman 反応[14]による炭酸固定の研究、アイソトープによるトレーサー実験[15~17]の適用により、クエン酸合成が C2 化合物（アセチル-CoA）と C4 化合物であるジカルボン酸（オキザロ酢酸）の縮合反応[18]によるという基本的な経路が明らかにされた。さらに Cleland と Johnson[19] は、オキザロ酢酸の供給経路

が C_3 化合物（ピルビン酸あるいはホスホエノールピルビン酸）への炭酸固定反応によることを、直接的かつ定量的に示し、醗酵経路がほぼ解明されるに至った。

多くの生体にとって、糖代謝の中間体たるクエン酸がこの醗酵において異常な蓄積をみるのは如何なる理由によるのか。この問は充分には解明されていない。*Asp. niger* ではクエン酸生成と TCA 回路の各酵素活性の変動に明瞭な相関関係のあることが Ramakrishnan ら[20,21]の実験で明らかにされた。すなわちクエン酸を蓄積しない培地で生育した菌体、あるいはクエン酸蓄積培地で蓄積開始前の菌体には、TCA 回路のすべての酵素活性が証明されるが、蓄積期に入れば pyruvate dehydrogenase, citrate (si)-synthase (EC 4.1.3.7) 活性が著しく増加するのに比し、isocitrate dehydrogenase や aconitate hydratase (EC 4.2.1.3) 活性は低下し、最盛期では証明できなくなる。しかしクエン酸の生成分解に関与する諸酵素の消長を規制する内的条件と、生育の外的（培養）条件との相関関係についての知見は現在最も欠乏していると云える。

1960 年代に入り、酵母による有機酸生産に関する報告がなされ、最近 *Candida* 属酵母によってクエン酸が生産されることが見い出された[22]。しかもこれまでの糖質醗酵から石油系炭化水素を原料とする醗酵[23]が指頭し、n-パラフィンからのクエン酸生産の試みが行なわれた。*Candida* 属酵母、*Arthrobacter* 属細菌、*Penicillium* 属糸状菌が優秀な生産菌として知られている[24]。なかでも、*C. lipolytica* のクエン酸収率は最も高く[25,26]、田淵ら[26]は鉄イオンの調節により副生するイソクエン酸を抑え、クエン酸の対原料収率を 140 ～ 150 % にまで高めた。また Akiyama ら[27,28]は aconitate hydratase の阻害剤であるモノフ

ルオロ酢酸感受性菌を誘導し、イソクエン酸の副生を抑制するのに成功した。

酵母によるクエン酸生成経路、蓄積機構の研究は現在活発に進められており、前述したクエン酸の生産性向上に大きな役割を演じている[29]。基本的な代謝経路は、Asp. niger の場合とほぼ同一と見なされる。クエン酸の前駆体オキザロ酢酸の補給経路は、グルコースからの醗酵では、ホスホエノールピルビン酸の炭酸固定によると考えられるが、n-アルカンの醗酵の場合、β-酸化で生じたアセチル-CoAの関与するグリオキシル酸回路が主要な働きをしていると思われる。またTabuchiら[30, 31]は奇数アルカンを炭素源にした時、β-酸化で生じたプロピオニル-CoAをピルビン酸に酸化する経路—メチルイソクエン酸回路—の存在を想定した。

一方Candida酵母のクエン酸蓄積機構の研究では、クエン酸を多量に生産する時期の細胞においてもaconitate hydratase を始め、クエン酸分解系の酵素活性が充分存在することが示された。すなわち、クエン酸蓄積の要因は、糸状菌ではいわゆる酵素合成の抑制であるのに対し、酵母では酵素活性の阻害であると推定されている[29]。この事実は、著者の所属する研究室で以前行なわれた結果でも支持されており、田下[32]によれば、クエン酸生成期の細胞内では、オキザロ酢酸の濃度が上昇し、その結果 aconitate hydratase、isocitrate dehydrogenase (NAD^+) (EC 1.1.1.41) 活性が顕著に阻害されるとしている。

しかし広範な研究にもかかわらず、醗酵機構がいまだに解明されたとは言い難いのはなぜか。第一の理由に、かつて細胞内の物質代謝の研究に見られたように、細胞を1つの酵素水溶液の詰まった袋 (Enzyme bag) とみなし、代

謝反応を個々の酵素のレベルで研究してきたことが挙げられる。　細胞内で進行する物質代謝の諸反応は細胞の内部構造、とりわけ独自の代謝機能を有する小器官（organelle）についての詳細な知識なしには正しく理解できない。　細胞の構造と機能に関する研究は、1940年代に入り、電子顕微鏡の生物試料への応用と超遠心分離機の開発によりもたらされた細胞分画法の導入で、飛躍的に進展した。　こうした細胞生物学の立場から、物質代謝と調節機構を論じるようになったのは、比較的最近である。　また分画された細胞小器官による *in vitro* 系が、実験手段としてしばしば用いられ、物質と細胞の相互関係を論ずるのに非常に役立っている。

Candida 酵母のクエン酸醗酵機構を細胞生物学的に解明するためには、単離ミトコンドリア・レベルでの研究が最も重要であろう。　その理由として次の3点が挙げられる：　1）細胞質内で解糖系を経て生成されたピルビン酸は、ミトコンドリア内に輸送され、TCA回路により酸化される；　2）その際ミトコンドリア内では、放出されたエネルギーの酸化的リン酸化反応によるATPの高エネルギー結合の形への変換が起こる；　3）ミトコンドリアは脂肪酸のβ－酸化の場でもある。

ミトコンドリアの構造と機能の研究は、1948年 Hogeboom ら[33]がラット肝臓から始めて、生理活性を有するミトコンドリアを単離するとともに、Green ら[34]，Lehninger らがTCA回路の場であることを証明して以来、急速に発展し、酸化的リン酸化の作用機作も相当解明されるに到った。　しかし酵母では固い細胞壁が障害となって、良質のミトコンドリアの調製が遅れ、研究が活発になされ出したのは、ここ10数年である。　主に *Saccharomyces* 属

酵母を用いて、酸化的リン酸化機能や形態形成（biogenesis）などの研究が進展した。　一方TCA回路を中心にした物質代謝および代謝調節機構の研究が行なわれだしたのは最近であり、そのほとんどが高等動物の組織のミトコンドリアを材料にしており、酵母における研究は皆無である。

本論文においては、炭素源としてグルコース、カーパラフィンから、それぞれ70%(w/w)および90%(w/w)の収率でクエン酸を生産しうるC. lipolytica MT4を使用し、グルコース培地で対数増殖期とクエン酸生成期である定常期の酵母細胞から、それぞれミトコンドリアを単離し、その呼吸特性を明らかにするとともに、クエン酸生成を中心にTCA回路の代謝特性を比較して細胞のクエン酸生産の要因について考察した。

第1章では、使用菌株であるC. lipolytica MT4の酵母ミトコンドリアの生理学的かつ基礎的知見を得る目的で、グルコースを炭素源にクエン酸非生産期である対数増殖後期まで培養した細胞から、良質のミトコンドリアを単離する方法を新たに確立するとともに、種々の呼吸特性について明らかにした。　また他の酵母や高等動物のミトコンドリアとの比較についても検討を加えた。

第2章では、クエン酸生産が培地中のアンモニウムイオンの消失に伴なう定常期への移行により開始されることから、定常期の酵母細胞よりミトコンドリアを調製する方法を種々検討し、対数期とは異なる単離法で得たミトコンドリアの呼吸特性を調べ、第1章で得られた対数期ミトコンドリアの特性と比較検討した。

第3章では、ミトコンドリアの呼吸系をさらに詳細に研究するため、対数期ミトコンドリアの呼吸チトクロムの

分光分析を行ない、酸化還元差スペクトルの測定から、チトクロム組成を調べた。　また二波長分光測定、差スペクトル測定によるb型チトクロム類の定性分析も試みた。

第4章では、対数期および クエン酸生産期からのミトコンドリアによるクエン酸生成に及ぼす種々の要因について研究した。　両増殖相のミトコンドリアでの収支論的な対比を行なうとともに、アデニンヌクレオチド類のミトコンドリアでのクエン酸生成を含めた物質代謝に及ぼす効果を詳細に調べた。　つぎに上記の結果を直接確かめる目的で、NAD^+ 依存性 isocitrate dehydrogenase 活性に対する、アデニンヌクレオチド類の影響、さらには細胞内のアデニンヌクレオチド含有量についても併せて検討した。　これらのミトコンドリア・レベルでの結果を総合的に把握することにより、C. lipolytica MT4 によるグルコースからのクエン酸生産の要因について考察した。

第1章　対数期細胞からのミトコンドリアの単離と呼吸特性

第1節　緒　言

酵母の中でも、有胞子酵母である *Saccharomyces* 属酵母は遺伝解析が可能で、培養条件や変異によりミトコンドリアの呼吸機能を変化させることができる。それゆえ、酵母の単離ミトコンドリアでの酸化的リン酸化の研究や、最近のミトコンドリアの biogenesis の研究[35,36]には主として、*S. cerevisiae* と *S. carlsbergensis* が使用される。

酵母細胞からのミトコンドリアの調製法は、古くは機械的に細胞を破砕後、遠心分画法によっていたが、ミトコンドリアに与える損傷が大きいのが難点であった[37-39]。後にこの点はより温和な手段であるミル型ガラス・ホモジナイザー[40]やコロイド・ミル[41]を使用する方法により改良された。

一方これとは別に、カタツムリ消化液の酵母細胞壁溶解活性を利用した酵母のスフェロプラスト（あるいはプロトプラスト）化は古くから知られており[42]、スフェロプラストの低張破砕によるミトコンドリアの単離も試みられた[43]。そして1964年 Duell ら[44]が *S. cerevisiae* から、1966年に Ohnishi ら[45]が *S. carlsbergensis* から、それぞれカタツムリ消化液を用いた酵素法によりミトコンドリアを単離し、呼吸機能の測定と電子顕微鏡観察から、生化学的かつ形態学的に無傷（intact）であることが確かめられた。

このように酵母ミトコンドリアの調製法には大別して2種あるが、構造と機能の面から、酵素法の方がより良質のミトコンドリアが得られるようである。しかし、酵素

法ではカタツムリ消化液の溶解活性が酵母の種類、培養条件、増殖相により著しく異なるという欠点がある。この点はSH-還元剤で細胞を前処理することにより，改善されることもあるが[46, 47]，すべての場合に有効であるとはかぎらない。従ってカタツムリ消化液を用いる方法の適用範囲は広くない。

Candida 属酵母は *Saccharomyces* 属にくらべ，一般にカタツムリ消化液に対し感受性は低く[48]、多くは機械法によっている[49]。しかし *C. utilis* の場合は酵素法の適用も可能であり[48, 50, 51]，ときには機械法との併用処理も行なわれている[52]。

使用菌株である *C. lipolytica* MT4 からのミトコンドリアの単離では，生化学的に無傷の試料を得る目的から酵素法を用い，しかもSH-還元剤を使用せずスフェロプラストを調製することを心がけた。一方 *Arthrobacter luteus* の生産する酵母細胞壁溶解酵素[53]（商品名 Zymolyase：キリンビール K.K. 製）が *C. lipolytica* にも有効であるという報告[54, 55]から，本実験ではこの酵素を用いて処理条件を検討した。

本章では、グルコースを炭素源に対数増殖後期まで培養した *C. lipolytica* を用いて，まずミトコンドリアの調製法を確立し，得られたミトコンドリアの構造および機能面での良質性を形態学的，生化学的に検定した。つぎにミトコンドリアの呼吸系とくに酸化的リン酸化機能について詳細に調べ，その特徴をこれまでに報告された他の起源のミトコンドリアと比較対照した。

第2節　実験材料および方法

試　薬

ADPトリス塩，ATPカリウム塩，ウシ血清アルブミン，NADHナトリウム塩，オリゴマイシンはSigma社（U.S.A.）製のものを使用した。　ショ糖，ロテノン，KCN，2,4－ジニトロフェノールは半井化学K.K.（京都）製を，アンチマイシンAはP-L Biochemicals 社（U.S.A.）製を使用した。

ロテノン，アンチマイシンA，オリゴマイシンはエタノール（99.5％）に溶かした。　呼吸測定に用いた種々の基質は蒸溜水に溶解後，KOHあるいはHClでpH 6.5　に調節した。

ZymolyaseはキリンビールK.K.（東京）から購入し，使用にあたってスフェロプラスト調製用溶液（後述）に溶解後，不溶物を遠心分離とミリポア・フィルターで取り除いた。

使用菌株および培養条件

この研究で使用した菌株は、著者の所属する研究室保存のクエン酸生産酵母 *C. lipolytica* MT4 である。

培地組成は表1-1に示した通りである。　保存用寒天斜面には、硫酸アンモニウムのかわりに，カザミノ酸0.25％と寒天2％加えたものを用いた。

前培養では，寒天培地より一白金耳をとり，50 ml 培養液（500 ml Erlenmeyer flask）に接種し，24時間振とう培養した。　本培養において，前培養液を新しい培地で約10倍に希釈し，その希釈液1 mlを200 ml培養液（1 l flask）に植菌し，30℃でロータリーシェーカー（回転速度180rpm，

表 1-1　培地組成

Glucose	5.0 %
$(NH_4)_2SO_4$	0.1
KH_2PO_4	0.05
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.05
Yeast extract	0.1

pH 5.4

回転半径4cm）により振とう培養を行なった。約13～14時間後，培養液のOD550nm値（光路長1cm）が0.8に達した対数増殖後期に，4000×g 10分間 0°Cで遠心分離し，集菌した。以下の操作はすべて0～4°Cで行なった。集菌後細胞を2回蒸溜水で洗浄した。なお後述の図1-1の実験のように，長時間培養する時，25，45，63，72時間において$CaCO_3$を添加し，pHを5付近に調節した。

スフェロプラストの調製

洗浄菌体（約3.5g 湿重量）をスフェロプラスト調製用溶液である0.75Mショ糖，0.1mMエテレンジアミン四酢酸（EDTA·K2）を含む10mMリン酸カリウム緩衝液(pH7.3)で1回洗浄後（3000×g 10分間），同溶液に28mlになるよう分散した。Zymolyase（525mg）を7mlの同溶液に溶解後，上記の細胞分散液と混合し（酵素の最終濃度は15mg/ml），氷冷中（0～4°C）でゆるやかに撹拌しながら，2時間，酵素処理した。処理中のpHの低下は1M KOHの添加により，pH 7付近に保った。

スフェロプラストの形成は細胞分散液を後述するミト

コンドリア調製用溶液で希釈後，550 nm での OD 値の減少を追跡して調べた。 約2時間の反応後，元の細胞の70～80% はスフェロプラスト化するが，この時 OD_{550nm} 値は40～45% に低下した。 スフェロプラストは反応後 1500×g 10分間遠心分離し，1度スフェロプラスト調製用溶液で洗浄した。

スフェロプラスト形成中の細胞数の測定

図1-1の説明に示すごとく，反応液を等張液（0.75 M ショ糖を含む）あるいは低張液（0.25 M ショ糖を含む）に分散後，残存する全細胞数を hemocytometer で計数した。

遠心分画時におけるチトクロム $c+c_1$ の定量

遠心分画による各区分の試料は 0.25M ショ糖溶液に分散後，2つのキュベット（光路長 1cm）に2.9 ml ずつ分配した。 一方にジチオナイトの微粉末を1～2 mg と 0.1 ml の水を加え還元状態に，他方に 0.2M フェリシアン化カリウムを 0.1 ml 添加，酸化状態にした後，日立 356 型二波長／ダブルビーム分光光度計を用い，酸化－還元差スペクトル[56, 57]を記録した。 チトクロム $c+c_1$ の定量は A_{550nm} の吸収極大と A_{540nm} の差から，分子吸光係数 $\varepsilon = 19.0\ mM^{-1} \cdot cm^{-1}$ の値を用いて計算した[57]。

ミトコンドリアの調製

洗浄後のスフェロプラストを最少量（約2 ml）のスフェロプラスト調製用溶液（0.75M ショ糖を含む）に分散後，

0.35M ショ糖，0.1mM EDTA，10mM リン酸カリウム緩衝液（pH 7.3），1mg/ml のウシ血清アルブミンからなるミトコンドリア調製用溶液22ml と混合し、約3分間ゆるやかに撹拌した。この操作でスフェロプラストは浸透圧ショックにより溶菌する。このホモジェネートから2000×g，5分間の遠心分離により得られた沈殿を用いて，同様の処理を再度繰返した。この2回の溶菌操作により得られた上清液を混合し，再び2000×g，5分間遠心分離した。この上澄から10,000×g，10分間の遠心分離により，ミトコンドリアを沈降させ，得られた沈殿を2～3回ミトコンドリア調製用溶液で洗浄した。この操作によるミトコンドリアの収率は、元の細胞に対し，約4mg ミトコンドリア蛋白質／g細胞湿重量であった。

電子顕微鏡観察[58,59]

酵母細胞の場合，対数期まで培養した菌体を蒸溜水で洗浄後，1.5％過マンガン酸カリウム固定液で6～12時間固定した。

単離ミトコンドリアの場合，試料を0.25M ショ糖を含むミトコンドリア調製用溶液（アルブミンを除く）で洗浄後，0.25M ショ糖，50mM リン酸カリウム緩衝液（pH 7.3）を含む1％四酸化オスミウム固定液で1時間，0～4℃で固定した。

固定後の操作は大隅の総説[58,59]を参考に，エタノールによる脱水，プロピレンオキシド処理，エポキシ樹脂による包埋を行なった。得られた包埋カプセルから超薄切片を作製し，飽和酢酸ウラニウムで染色後，日立電子顕微鏡HS 7A型で観察した。

ミトコンドリアの呼吸測定

特にことわらないかぎり、使用した反応液の組成は表1-2に示す通りである。なおリン酸カリウム緩衝液のpH,

表1-2 対数期ミトコンドリアの呼吸測定に用いた反応液組成。

Sucrose	0.25 M
EDTA	0.1 mM
KCl	10 mM
K-phosphate buffer (pH 6.5)	10 mM
Bovine serum albumin	1 mg/ml

ショ糖濃度の効果を調べた実験では，各々の成分のみを変化させた。

単離ミトコンドリアは呼吸測定に先だって，0.25Mのかわりに0.4Mショ糖を含む反応液に分散（8～10 mgミトコンドリア蛋白質/ml）し，氷中で保存した。

ミトコンドリアの酸素吸収は30°C，容量2mlのウォータージャケット付き反応セルの中で，Yellow Springs 社製（U.S.A.）4004型 クラーク型の酸素電極を使用し，ポーラログラフ法で測定した[60]。電解電圧は0.6 Vである。ミトコンドリア試料を添加し温度平衡後，各種の呼吸基質やADPあるいは阻害剤を加え，その時の酸素消費の経過曲線を自動記録した[61]。なお反応液の飽和酸素濃度は萩原[61]やBalcavage[41]のデータを引用した。

P/O比および呼吸調節率（Respiratory control ratio）はChanceとWilliamsの方法[56]により次式から求めた。

$$P/O比 = ADP/O比 = \frac{添加したADP量(n\,mole/ml)}{ADP存在下(state3)に消費した酸素量(n\,atom/ml)}$$

$$RC比 = \frac{\text{state 3 (ADP存在下) での酸化(呼吸)速度}}{\text{これに続く state 4 (ADP消費後) の酸化(呼吸)速度}}$$

蛋白質量の測定

ミトコンドリアの蛋白質量はウシ血清アルブミンを標準試料としてLowryらの方法[62]で決定した。

クエン酸の測定

培養液1mlに1N HCl 2ml加え炭酸カルシウム，クエン酸カルシウムを溶解後，3000 rpm, 5分間遠心分離し，上澄み分のクエン酸量をSternの方法[63]により決定した。

第3節 結 果

1. クエン酸生産の経時変化

使用菌株C. lipolytica MT4はn-パラフィンのみならずグルコースからもクエン酸を蓄量生産することができる。図1-1はグルコースを炭素源とした時の典型的なクエン酸蓄積経過を示している。対糖収率は約70% (w/w)に達した。なお図示しなかったが，イソクエン酸も同時に副生したが，その量はクエン酸の約1/6で，n-パラフィンの場合に比し，かなり低濃度である。クエン酸の生産開始期がn-パラフィンを炭素源にした時と同様，定常

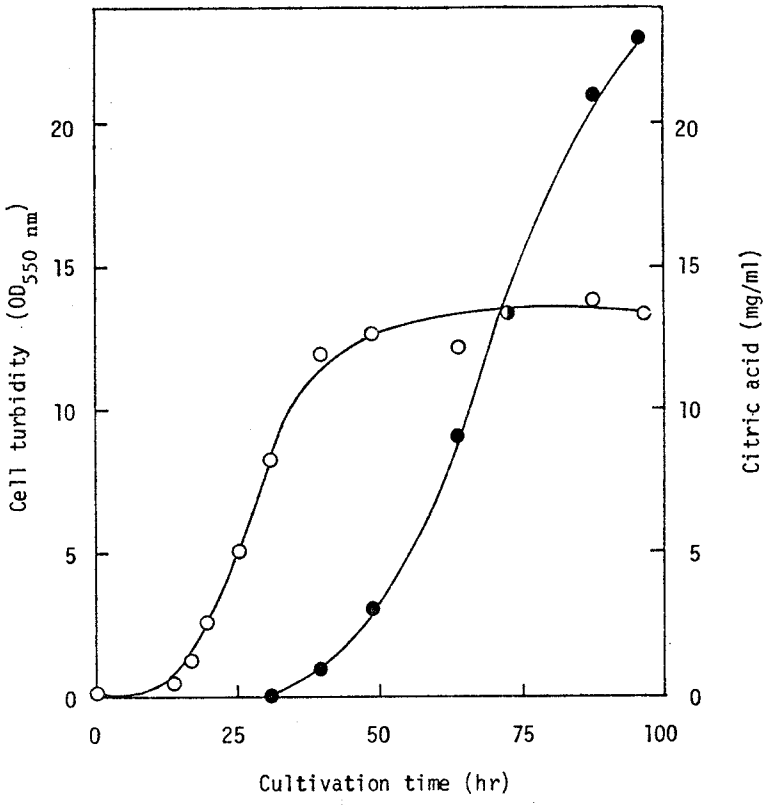


図1-1 C. lipolytica MT4 によるグルコースからのクエン酸生産の培養経過。

酵母細胞を炭素源としてグルコースを含む培地に植菌し，実験方法で述べたように培養した。培養開始後25, 45, 63, 72時間に $CaCO_3$ を添加し pH 5 に調節した。
—○—：OD550 nm，—●—：クエン酸。

期への移行期に一致することから，クエン酸生産が培地中のアンモニウムイオンの消失に伴ない始まるものと思われる。この章での対数期ミトコンドリアの調製に用いた細胞は，13～14時間培養で OD550 nm 値が 0.8 のものである。集菌時における培養液中のクエン酸量は0である。

2. 対数期スフェロプラストの調製

酵素処理温度がミトコンドリアの構造と生理的機能に

影響を及ぼす可能性が考えられるので，スフェロプラストの形成を氷冷中（0～4°C）および30°Cで行なった。

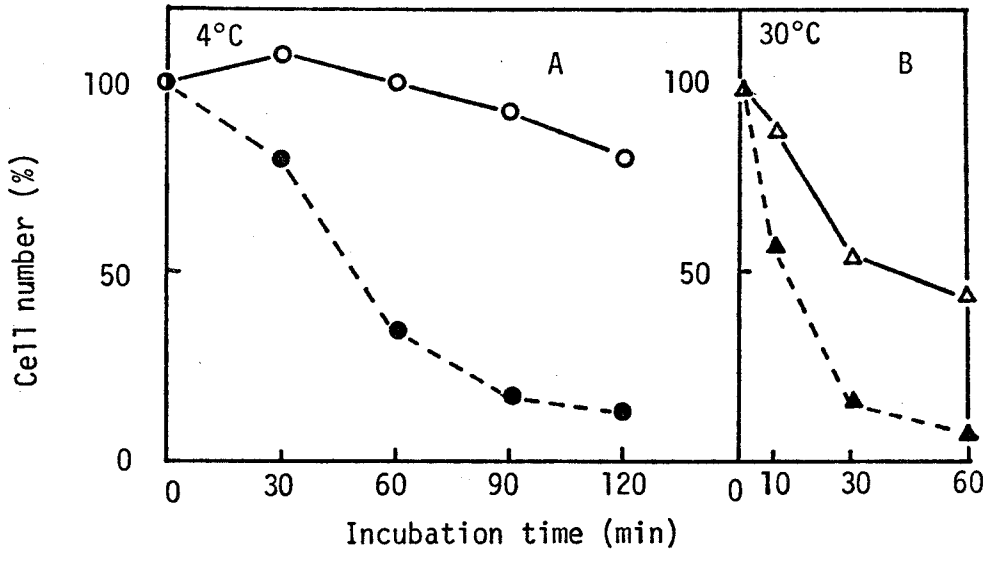


図1-2　対数期の*C. lipolytica*細胞からのスフェロプラスト形成に及ぼす温度の影響。

細胞は実験方法で述べたように，対数期から集菌洗浄後，0.75M ショ糖を含むスフェロプラスト調製用溶液に分散し，Zymolyase溶液と混合，酵素処理を開始した。(A)細胞分散液（7.9×10^8 cells/ml）は酵素濃度15mg/ml，ゆるやかな撹拌下で氷冷（0～4°C）処理した。(B)細胞分散液（8.7×10^8 cells/ml）は5mg/ml の酵素濃度でゆるやかな撹拌下，30°Cで処理した。反応中，懸濁液の一部はスフェロプラスト調製用溶液（○，△）あるいは0.25M ショ糖を含む溶液（●，▲）で100倍に希釈後，細胞数をhemocytometerで測定した。

実線：総細胞数（0.75M ショ糖），破線：浸透圧処理後の細胞数（0.25M ショ糖）。細胞数は元の酵母細胞数のパーセントで表わした。

図1-2は対数期の細胞を0.75M ショ糖溶液中，2種の異なる温度でZymolyase処理（最終濃度は0～4°Cの時15mg/ml，30°Cの時5mg/ml）した時の全細胞数および形成したスフェロプラスト数の経時変化をみたものである。ここで100%は反応開始時における全細胞数に相当する。図中の破線は0.25M ショ糖溶液でスフェロプラストの溶菌処理後に残った細胞であることから，実線と破線の差が形成された

スフェロプラストの数に相当する。　酵素処理でよく用いられる30℃処理（B）において，細胞の溶菌が著しく，60分後には50%以上がそうであった。　これに対し氷冷処理（A）では細胞の破壊は90～120分で10～20%程度であった。　またスフェロプラストの形成も30℃ではわずか40%であったが，0～4℃処理では70～80%に達した。

低温処理（0～4℃）でスフェロプラストが安定かつ高収率で得られることから，ミトコンドリアの標識酵素として

表1-3　遠心分画でのチトクロムc+c_1の分布。

Fraction	4°C 50 min		10 mg/ml 100 min		30°C 30 min		5 mg/ml 60 min	
	Total content	%	Total content	%	Total content	%	Total content	%
Sup. on incubation	0.8	2.9	1.1	3.5	7.3	28.2	9.7	42.4
Sup. on wash	1.4	4.7	1.8	6.1	4.7	18.0	3.6	15.7
2,000 g ppt.(4°C)	14.8	50.8	11.2	38.0				
1,000 g ppt.(30°C)					8.0	30.5	5.6	24.4
10,000 g ppt.	6.3	21.6	9.0	30.4	2.8	10.9	1.5	6.6
10,000 g sup.	5.8	20.0	6.5	22.0	3.2	12.4	2.5	10.9

Total content = nmoles of cyt. c + c_1 per 2 g wet cell.

洗浄菌体をスフェロプラスト調製用溶液に0.1g細胞湿重量/mlになるよう分散した。　Zymolyase処理は0~4℃，酵素濃度10mg/ml，または30℃，5mg/mlの酵素濃度で行なった。　遠心分画法は次の通りである。［ ］内は30℃処理した細胞に特異的に用いた条件である。　なお操作は4℃以下で行なった。

表に記述した酵素処理時間に1000×g［2000×g］10分間遠心分離により集菌し，1度スフェロプラスト用溶液で洗浄した。　得られたスフェロプラストは0.25Mショ糖を含むミトコンドリア調製用溶液に約0.1g湿重量（元の細胞）/mlになるよう分散，低張破壊した。　2回［1回］の破砕処理（burst）後，2000×g［1000×g］5分間遠心分離した。　得られた上澄（sup.）区分を10,000×g 10分間遠心分離して，10,000×g沈殿（ppt.）と10,000×g上澄（sup.）とに分画した。

反応液中の上澄，洗浄処理後の上澄，低張破砕後の沈殿，10,000×g遠心分離での沈殿と上澄の各区分におけるチトクロムc+c_1を実験方法で述べたように定量した。

チトクロム $c+c_1$ を用い，酵素処理後の遠心分画での分布を調べたのが表1-3である。　低温処理の場合，反応液および洗浄後の上澄区分中のチトクロム $c+c_1$ 量は，30°Cに比較しかなり低かった。　この事実は図1-2でもみられるように，酵素処理中の細胞の破壊が少ないことを意味している。　また低温，100分間の処理において，ミトコンドリア画分と考えられる 10,000×g 沈殿区分に回収されるチトクロム $c+c_1$ 量は，30°C，30分処理時の3倍程度高かった。この結果はミトコンドリアを収率よく得るためにはZymolyase処理を低温（0～4°C）で行なう必要があることを示している。

3. 対数期ミトコンドリアの電子顕微鏡観察

図1-3は炭素源として5%グルコースを用い，対数増殖後期まで培養した *C. lipolytica* MT4 細胞の超薄切片像である。　クリステを有するミトコンドリアの典型的な構造が認められ，その膜は二重膜構造をとっていることがわかる。　その他，二重膜構造の核膜で囲まれた核，endoplasmic reticulum，細胞膜，細胞壁などの細胞内器官が明瞭に認識される。

図1-4は実験方法で述べた操作法により単離されたミトコンドリア区分の超薄切片像である。　大部分がミトコンドリア固有のクリステを有し，内部構造が保存された粒子である。　大きさは 0.5～1.0 μm 程度で形状も揃っている。　他の細胞内小器官の混入も観察範囲内では認められず，その結果ここで単離したミトコンドリアは形態学的に良質であると結論できる。

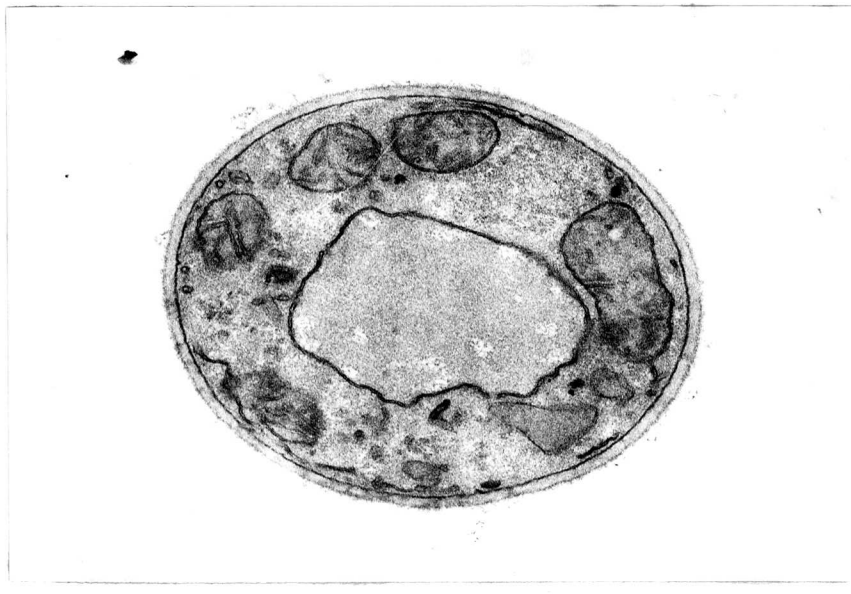


図1-3. 対数期の *C. lipolytica* 細胞の電子顕微鏡像。過マンガン酸カリウム固定。倍率は20,000倍（写真上での1cmは0.5μmに相当）である。

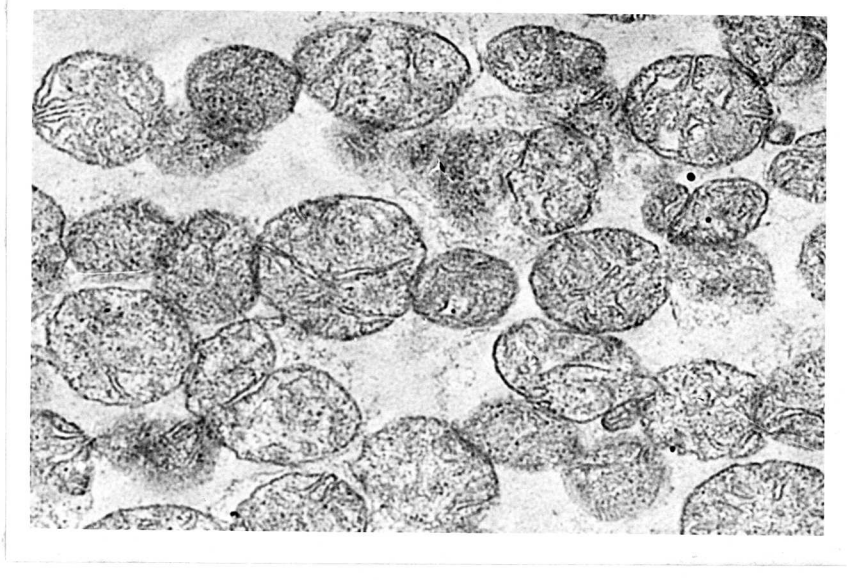


図1-4. *C. lipolytica* から単離した対数期ミトコンドリアの電子顕微鏡像。四酸化オスミウム固定。倍率は20,000倍である。

4. 単離された対数期ミトコンドリアの呼吸特性

単離ミトコンドリアの呼吸はポーラログラフ法で測定を行なった。典型的な呼吸経過曲線を図1-5に示す。呼吸基質としてNAD連結基質であるピルビン酸＋リンゴ酸，（外部から添加したNADH，コハク酸を用いた。いずれの基質の場合でも，呼吸（酸化）速度はADPの有無により明らかに調節されている。単離ミトコンドリアの良質性を示す指標になる呼吸調節率（RC比）は高く，ピルビン酸＋リンゴ酸で3.1～4.9，NADHの場合3.2～4.6の値を示した。他方，ADP/O比で求められるP/O比はピルビン酸＋リンゴ酸を基質とした時2.7～2.8で，理論値3にきわめて近い値になった。

ピルビン酸＋リンゴ酸とコハク酸を基質として，ミトコンドリア呼吸機能に関連する（state3呼吸下での）酸化速度Q_{O_2}，RC比，そしてP/O比に及ぼす反応温度，ショ糖濃度およびpHの効果を調べた。

図1-6は反応温度の効果について調べたものである。両基質とも温度の上昇（25℃→35℃）に伴ない，state 3でのQ_{O_2}の上昇がみられた。他方，RC比，P/O比はどちらの基質でも温度に依存せず一定値を示したことから，酸化的リン酸化機能はこの温度範囲内では影響されないことがわかった。

図1-7はミトコンドリアの浸透圧安定化剤（osmotic stabilizer）としてのショ糖濃度の効果をみたものである。最も顕著なのはQ_{O_2}（state 3）への影響であり，0.25Mにおいて最も高い値を示したが，特に0.4Mから0.6Mへの変化でQ_{O_2}は急激に低下した。一方，RC比は0.4Mで最適値を示し，0.6Mでは低下がみられた。これに及し

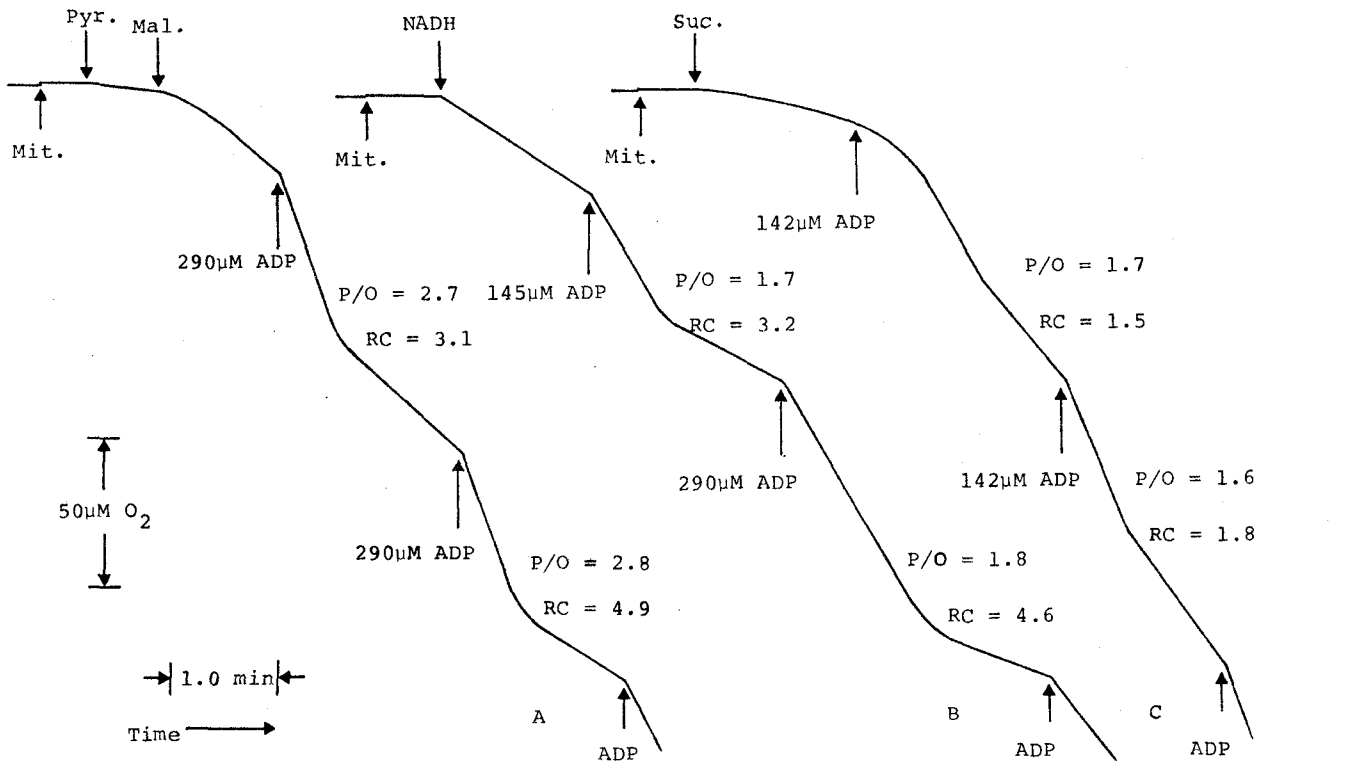


図1-5　対数期の細胞から調製した *C. lipolytica* ミトコンドリアにおける種々基質酸化での呼吸経過曲線。

反応液（最終容量：2 ml）は0.25Mショ糖，0.1mM EDTA，10mMリン酸カリウム緩衝液（pH 6.5），10 mM KCl，1 mg/mlアルブミンを含む。酸素消費はクラーク型酸素電極を用い，30°Cでポーラログラフ法により測定した。添加は次に示す通りである：Mit.；ミトコンドリア0.38 mg蛋白質/ml（AとC）あるいは0.19 mg蛋白質/ml（B），Pyr.；ピルビン酸 5 mM，Mal.；リンゴ酸 5 mM，NADH 1 mM，Suc.；コハク酸 5 mM．ADP濃度は図中に示す通りである。

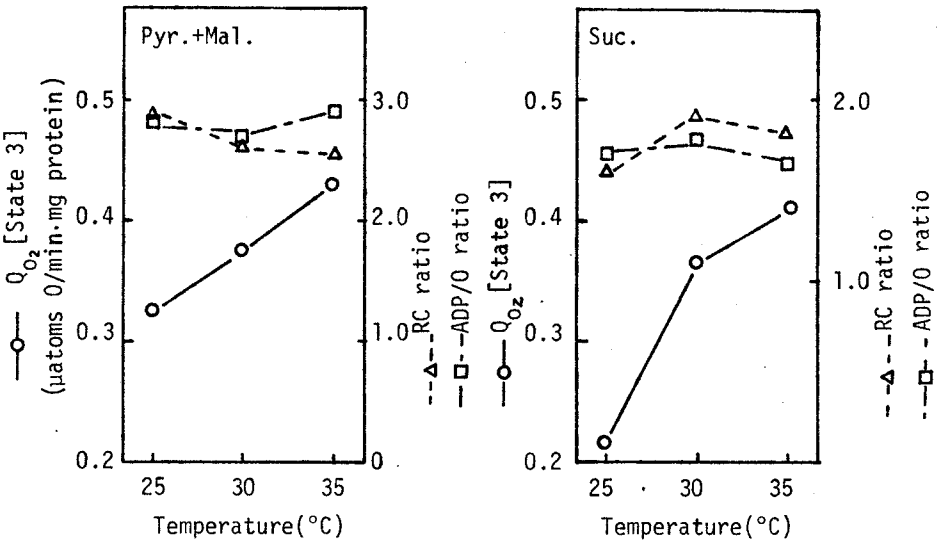


図1-6　対数期ミトコンドリアの呼吸機能に及ぼす反応温度の効果。

呼吸反応の条件は温度のみ変化させ，反応液組成は実験方法で述べた通りである。　図1-5に示したような呼吸経過曲線から state 3 での酸化速度（Q_{O_2}），P/O（=ADP/O）比，RC比を測定した。

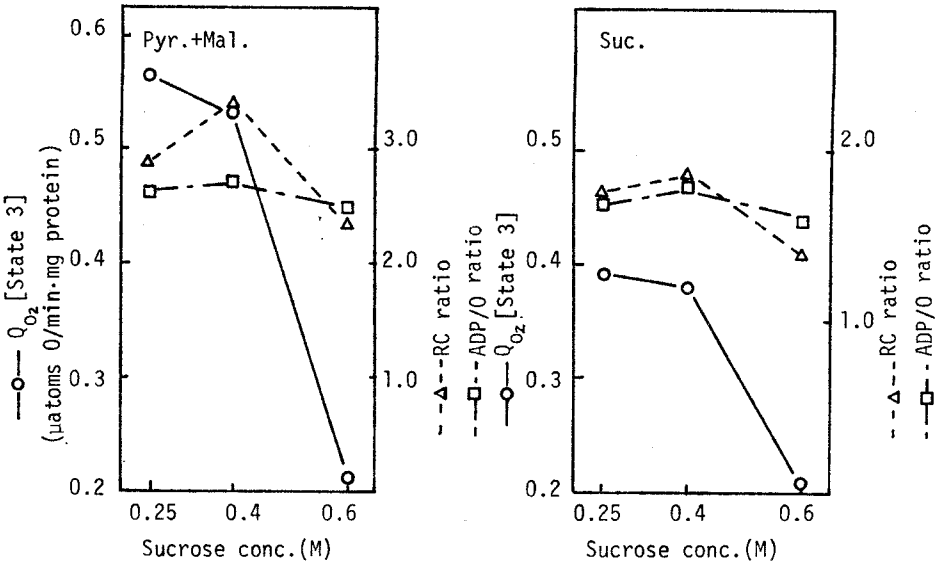


図1-7　対数期ミトコンドリアの呼吸機能に及ぼすショ糖濃度の効果。

呼吸反応の条件は反応液組成（実験方法参照）のうちショ糖濃度のみを変化させ，30℃ で測定した。

リン酸化機能に関連するP/O比は両基質ともショ糖濃度に対し不変であった。

反応系のpHの呼吸に及ぼす影響を図1-8に示す。呼吸速度はpH7で最大値を示し，6以下では低下が著るしい。RC比はpH 6.5に最高を示したが，6以下，7以上では呼吸機能は損われた。P/O比はこの場合でもpH 5.4～7.6の範囲内でほぼ一定値を保った。

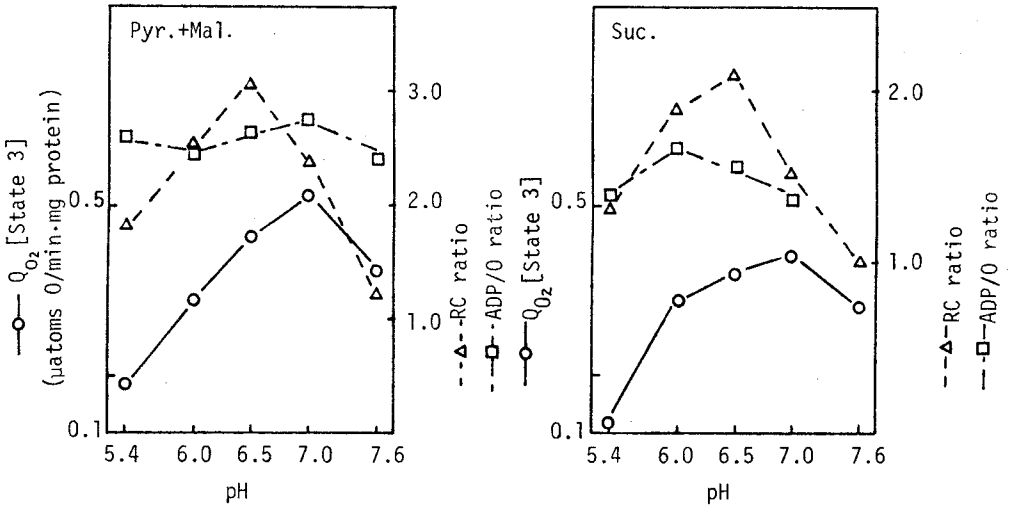


図1-8 対数期ミトコンドリアの呼吸機能に及ぼす反応液pHの効果。
呼吸反応の条件は反応液組成（実験方法参照）のうち，リン酸カリウム緩衝液のpHのみを変化させ，30°Cで測定した。

以上3つの実験から，以下の呼吸測定の反応条件として温度30°C，ショ糖濃度0.25M，pH 6.5を採用することにした。

A. 各種基質酸化における対数期ミトコンドリアの呼吸機能

表1-4に各種基質酸化での呼吸速度（state 3でのQ_{O_2}），

RC比, P/O (=ADP/O) 比の値をまとめた。 C. lipolytica から単離した対数期ミトコンドリアはクエン酸, イソクエン酸, α-ケトグルタール酸 (2-オキソグルタール酸), のTCA回路中間体のみならず, NADH, α-グリセロリン酸, L-乳酸, N,N,N',N'-tetramethyl-p-phenylenediamine (TMPD)+アスコルビン酸や表示しなかったがエタノールといった基質を酸化し, 図1-5に示すようなADPの有無による呼吸調節を受けた。 高い Q_{O_2} 値を示したピルビン酸+リンゴ酸, NADH, コハク酸では, RC比でも高い値が得られた (図1-5参照)。 以上の結果より, 単離ミトコンドリアは生化学的にも正常な機能を有しているものと結論した。

表1-4 対数期細胞から調製したC. lipolytica ミトコンドリアにおける種々基質酸化での酸化的リン酸化活性。

Substrate	$Q_{O_2}^*$ [State 3]	P/O ratio	RC ratio
Pyruvate + Malate	400- 590	2.4-2.9	2.5-4.9
Citrate	220- 360	2.5-2.8	1.8-2.1
α-Ketoglutarate	180- 310	2.3-2.6	1.7-1.9
Isocitrate	50- 70	1.8-2.2	1.1-1.2
Succinate	370- 450	1.6-1.8	1.8-2.2
NADH	450- 660	1.5-2.0	2.6-4.6
α-Glycerophosphate	300- 400	1.4-1.7	1.7-2.0
Ascorbate + TMPD	1890-2310	0.6	1.2
L-Lactate	80- 110	1.6-1.9	1.5-1.9

* natoms O/min per mg protein

種々の基質を用いた酸素消費測定は図1-5で説明した。 基質濃度はNADHとTMPDでは1mM, 他の基質では5mMである。

ピルビン酸＋リンゴ酸，クエン酸，α－ケトグルタール酸はミトコンドリア内で酸化されて，NADHを生ずる。このようなNAD－連結基質を用いたとき，P/O比は2.3～2.9であり，理論値3に近い値を示した。他方，コハク酸，α－グリセロリン酸といったコエンザイムQ，チトクロムb付近に電子を与える基質ではP/O比が1.4～1.8で，2に近い値をとった。リン酸化部位IIIでのみエネルギーを供給しうるアスコルビン酸＋TMPDの場合，P/O比は1に近かった。L－乳酸の酸化ではP/O比は2に近く，*S. carlsbergensis*のミトコンドリアで得られた値1[45]とは異なり，違った経路で電子伝達が行なわれていると考えられる。

一般に酵母ミトコンドリアは動物組織のものとは異なり，外部から加えたNADHを高い速度で酸化することが知られている。*C. lipolytica*ミトコンドリアでも外部添加のNADHを急速に酸化し，Q_{O_2}，RC比ともに充分高い値を示した。しかしP/O比は2であり，NAD－連結基質での値3から正確に1低く，1つのリン酸化部位が欠けていることを意味している。

B．酸化的リン酸化系の各種阻害剤の効果

表1-5は電子伝達系阻害剤の影響をみたものである。酸化的リン酸化部位I，II，IIIでの各電子伝達の阻害剤として，ロテノン（3×10^{-5}M），アンチマイシンA（5×10^{-7}M），KCN（5×10^{-4}M）をそれぞれ使用した。前述のようにP/O比が3を示すNAD－連結基質（ピルビン酸＋リンゴ酸，α－ケトグルタール酸）を使用した時，アンチマイシンA，KCNはその酸化を完全に，ロテノンもほぼ完全に阻害した。2に近いP/O比を有するコハク酸や外部添加のNADHの酸

化はアンチマイシンAやKCNで完全に阻害されたが，ロテノンではまったく阻害されなかった。

表1-5　対数期ミトコンドリアの種々基質酸化時に添加した電子伝達系阻害剤の影響。

Substrate	Inhibition %		
	Rotenone 3×10^{-5}M	Antimycin A 5×10^{-7}M	KCN 5×10^{-4}M
Pyruvate + malate	94.3	100.0	100.0
α-Ketoglutarate	76.7	97.7	100.0
Succinate	0.0	100.0	100.0
NADH	0.7	100.0	100.0
Ascorbate + TMPD	0.0	2.7	100.0
L-Lactate	42.8	68.0	83.7

各阻害剤をstate 3での基質酸化時に添加した。呼吸阻害の程度をパーセント表示した。

この実験結果はNAD－連結基質の酸化によりミトコンドリア内に生じたNADHの酸化は，第1のリン酸化部位と共役しロテノン阻害を受けるのに対し，外部から添加したNADHの酸化は，リン酸化部位Iを経由せず電子伝達を行なうことを明らかにした。

P/O比が1であるアスコルビン酸＋TMPDを基質とした時，KCNによってのみ完全阻害がみられた。　L－乳酸の酸化はいずれの阻害剤によっても部分的阻害しか見い出されず，とくにKCNによる完全阻害が観察されないのは，この酸化の経路が複雑であることを示唆している。

図1-9はアンカップラーとエネルギー転移阻害剤の効

果を調べたものである。　アンカップラーとして 2,4-ジニトロフェノール（DNP）を 10^{-4} M添加した時，ピルビン酸＋リンゴ酸の酸化速度は state 3 でみられた速度にまで増大した。　他方，エネルギー転移阻害剤のオリゴマイシン（2.1 μg/mg蛋白質）は state 3 での酸化速度を state 4 のレベルに低下させた。　ここでさらに DNP を加えると，ほぼ完全に元の酸化速度に回復した。　この結果は，他の酵母や哺乳動物のミトコンドリアでの結果と一致している。

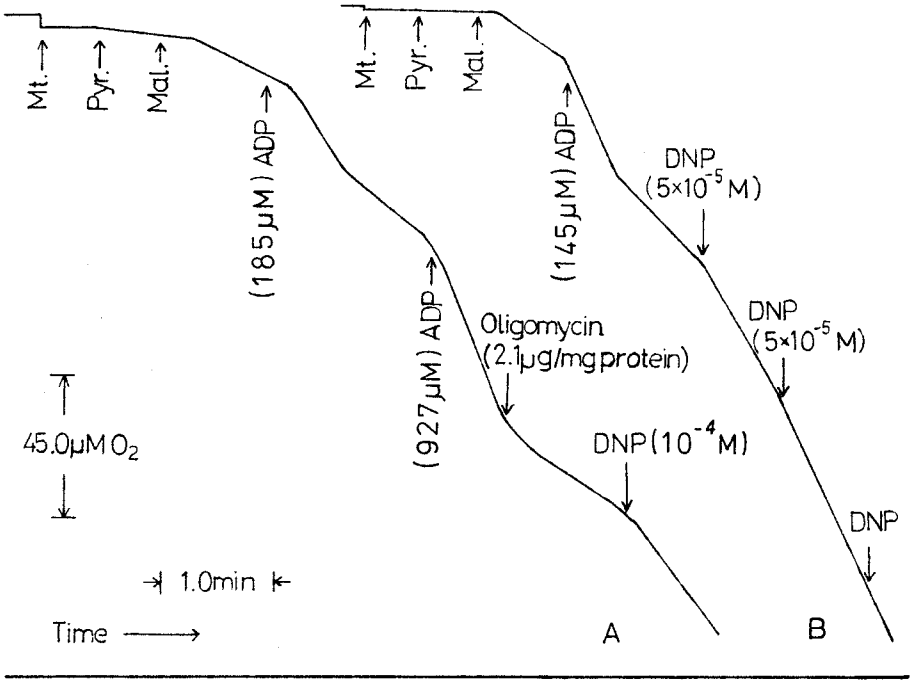


図 1-9　対数期ミトコンドリアのピルビン酸＋リンゴ酸酸化時での 2,4-ジニトロフェノール（DNP）とオリゴマイシンの添加効果。
呼吸経過曲線は図 1-5 で記述したように測定した。　ミトコンドリア蛋白質濃度は，それぞれ 0.45 mg/ml (A)，0.48 mg/ml (B) である。　なお DNP，オリゴマイシン，ADP の濃度は図中に示した。

第4節　考　察

対数増殖後期の *C. lipolytica* の細胞はカタツムリ消化液による細胞壁溶解に対し抵抗性を示したが，このことは *Candida* 酵母の細胞壁の組成や微細構造が，カタツムリの酵素で容易に消化される *Saccharomyces* 酵母のそれとはかなり異なっていることによると思われる。　図1-2で見られたように，Zymolyase 処理を還元剤や proteinase のない状態で，低温（0～4°C）下で操作した時，形成するスフェロプラストは安定化され，結果的にミトコンドリアの高い収率が保証されると考えられる（表1-3）。　ここで確立されたミトコンドリアの調製法は，通常用いられるカタツムリ消化液に対して非感受性の酵母細胞に適用できたことから，対数期にある他の酵母細胞に対しても応用できる可能性がある。

前述の方法で単離された *C. lipolytica* の対数期ミトコンドリアの無傷性は，高い呼吸活性（図1-5）と電子顕微鏡観察（図1-4）から，生化学的かつ形態学的に立証された。

ミトコンドリアの呼吸がショ糖濃度，温度や pH など種々の処理条件により大きく左右された（図1-6～8）が，なかでもショ糖濃度の効果は著るしい（図1-7）。　試みたショ糖濃度範囲内で P/O 比の変動はないが，Q_{O_2} や RC 比は 0.25～0.4 M に最適値を示し，0.6 M では急激に低下した。　*S. carlsbergensis*[45] や HeLa 細胞のミトコンドリア[64]でみられたように，浸透圧安定化剤としてショ糖のかわりにマニトールやソルビトールを使用した場合，高濃度でも呼吸機能が安定に保たれるかもしれない。

表 I-4,5 の結果から，NAD－連結基質の酸化ではリン酸化部位 I，II，III のすべてにおいて電子伝達がみられ，P/O 比 3 が得られた。従って部位 I でのリン酸化に関して，この C. lipolytica ミトコンドリアは哺乳動物のそれと同様の挙動をとり，リン酸化部位 I を欠く Saccharomyces 酵母[41, 45, 46]とは著るしく異なっていた。

Kat ら[65, 66]，Ohnishi[67]，そして Grossman ら[68]の観察によれば，最適条件下で対数増殖している C. utilis の細胞から調製したミトコンドリアでは，ロテノン感受性や部位 I でのエネルギー共役はみられず，P/O 比はこの値をとるのに対し，定常期の細胞，低い酸素供給条件や鉄制限[69, 70]下で成育した細胞からのミトコンドリアの呼吸は，P/O 比 3 を有しロテノン感受性であった。

これに対して，C. lipolytica ミトコンドリアは後述するように（第 2 章参照），培養相の変化にかかわらず部位 I でのリン酸化反応が認められた。

もう 1 つの著るしい C. lipolytica ミトコンドリアの特徴は，NADH が外部から添加されるか，内部で供給されるかにより，NADH の酸化的リン酸化能が異なることである。一般に，酵母ミトコンドリア[44, 45, 51]は哺乳動物のそれ[71]とは異なり，外部添加の NADH をリン酸化と共役して高い速度で酸化できる。酵母ミトコンドリアの内膜が NAD^+ や NADH に対し透過性を示さない[47]ことを考慮すれば，C. lipolytica ミトコンドリアはクリステに局在すると思われる 2 種の異なる型の NADH dehydrogenase (EC 1.6.99.3) を持つと考えられる。すなわちロテノン感受性 NADH dehydrogenase はクリステの内表面に位置し，内部供給の NADH を酸化するのに対し，ロテノン非感受性 NADH dehydrogenase

は外表面に局在し，ミトコンドリア外から添加したNADHを酸化する。

同様の観察は他の種類の酵母[45, 51, 70]や *Aspergillus niger*[72], *Neurospora crassa*[73], *Physarum polycephalum*[74]といった糸状菌のミトコンドリアでも報告されている。

第5節　要　約

1. 対数増殖期の *Candida lipolytica* MT4 細胞からミトコンドリアの調製法を検討し，新たな酵素処理法により良質のミトコンドリアを高収率で単離することができた。この方法の特徴は *Arthrobacter luteus* が生産する酵母細胞壁溶解活性をもつ"Zymolyase"を使用し，0～4°Cの低温処理で収率よく（70～80%），スフェロプラストを生成させるところにある。

2. ミトコンドリアの呼吸速度は種々の条件により影響されるが，特に浸透圧安定化剤としてのショ糖濃度が0.4 M以上，または反応系のpHが6以下あるいは7以上においてRC比で代表される呼吸機能が顕著に抑制された。

3. 単離ミトコンドリアが構造的にも機能的にも無傷であることが電子顕微鏡観察と呼吸測定でみられた高い呼吸調節率（ピルビン酸＋リンゴ酸やNADHを基質としたとき4～5の値を示した）により確かめられた。

4. このミトコンドリアはTCA回路の中間体のみならずNADH, α-グリセロリン酸, アスコルビン酸+TMPDなどを高い速度で酸化した。 またP/O比はNAD-連結基質であるピルビン酸+リンゴ酸では2.7, NADH, コハク酸では1.7の値を示した。 P/O比の測定, 電子伝達系阻害剤の実験結果から, このCandidaミトコンドリアはリン酸化部位Iを欠くSaccharomyces酵母と異なり, 3つのリン酸化部位I, II, IIIすべてを有していることが判明した。

5. 外部添加のNADHはロテノンに非感受性の"外部"の酸化経路により電子伝達され, P/O比2を示すのに対し, ミトコンドリアで内生したNADHの酸化はP/O比が3であり, その酸化はロテノンにより阻害された。

第2章　定常期(クエン酸生成期)細胞からのミトコンドリアの単離と呼吸特性

第1節　緒　言

Akiyama らの研究[27,28]や著者の所属する研究室で得られた知見[32]から，*Candida lipolytica* によるクエン酸生産がTCA回路の代謝調節と密接に関連していることは明白である。　またTCA回路や脂肪酸のβ－酸化に関与する酵素群がミトコンドリアのマトリックス（可溶性区分）や内膜に局在していると考えられている[75]。

他方，第1章で述べたように，*C. lipolytica* MT4 のクエン酸蓄積が対数期ではなく，アンモニウムイオンの消失による定常期への移行に伴って起こる。　従って対数期とクエン酸生成期の酵母細胞からミトコンドリアを単離し，生化学的な特徴を比較することは，細胞のクエン酸生産におけるミトコンドリアの役割を研究する上に重要である。

カタツムリ消化液を用いる酵素法と同様，第1章で確立した Zymolyase 処理によるミトコンドリア調製法は対数期細胞に特異的であるので，定常期細胞に適用できる新たな単離法の確立が必要となった。　そこでクエン酸蓄積期から集菌した細胞を用いて，細胞壁溶解活性を示す酵素の探索を行なった。

本章では，定常期の *C. lipolytica* MT4 細胞から新たにミトコンドリアを調製する方法を確立するとともに，得られたミトコンドリアの無傷性を検定し，呼吸特性を明らかにした。　また第1章の対数期ミトコンドリアの呼吸特性と比較して，ミトコンドリアの代謝特性がクエン酸生成に及ぼす要因について考察した。

第2節　実験材料および方法

試薬

ミトコンドリア調製に用いた溶菌酵素は，協和醗酵K.K.（東京）製のCytophage sp.が生産する"Lytic enzyme #2"と近畿ヤクルトK.K.（西宮）製のlysozymeである。Lytic enzyme #2はスフェロプラスト調製用溶液に溶かし，不溶物を除去後使用した。他に溶菌酵素としてTrichoderma virideの生産する"Cellulase onozuka"（近畿ヤクルトK.K.），ある種のカビが生産する"Lytic enzyme #3"（協和醗酵K.K.）を使用した。またカタツムリ消化液（snail enzyme）としてIndustrie Biologique Française製の"Suc d'helix pomatia"を用いた。

ソルビトールは半井化学K.K.のものを使用した。他の試薬については第1章で記述した通りである。

使用菌株および培養条件

使用菌株と培養方法は第1章に準ずる。ただし本培養は前培養液を0.5ml植菌して行ない，24時間後に$CaCO_3$（殺菌済）添加により培地のpHを5付近に調節し，定常期である40時間まで培養を続けた。その時の培地中のクエン酸量は約1mg/mlである。

定常期細胞に対する各種細胞壁溶解酵素の効果

定常期まで培養したC. lipolytica細胞を蒸溜水で洗浄し，0.75Mショ糖溶液（スフェロプラスト調製用，第1章参照）に分散後，表2-1に示すごとく，各種の酵素を所定

濃度になるよう添加し，30℃（特定のものは氷冷中）180分間処理した。酵素処理後，細胞分散液を前述の0.75Mショ糖の等張液あるいは低張破砕用の0.25Mショ糖溶液で希釈し，550nmにおけるODの減少を調べた。結果の表示は，反応開始時における0.75Mおよび0.25Mショ糖溶液中（同じ希釈率）でのOD550nm値を100％とした。

スフェロプラストの調製

定常期の細胞（約7.2g湿重量）を蒸留水で2回洗浄後，ショ糖のかわりに1.25Mソルビトールを含むスフェロプラスト調製用溶液（第1章参照）で1回洗浄し（3000×g 10分間），のち同溶液に分散した。39mlの細胞分散液に対し，あらかじめ同溶液で溶かしたLytic enzyme #2（9ml）とlysozyme（6ml）をそれぞれ最終濃度が5mg/ml，2.5mg/mlになるよう添加し，30℃でゆるやかに往復振とうしながら2.5時間酵素処理した。なお反応中のpHは7付近を保つよう適宜1M KOHを加えた。

この処理によるスフェロプラストの収率は40～45％である（後述）。以下の操作は0～4℃で行なった。得られたスフェロプラストは1500×g.10分間で遠心分離し，1～2度スフェロプラスト調製用溶液で洗浄した。

ミトコンドリアの調製

ミトコンドリア調製用溶液（第1章参照）として，ショ糖のかわりに0.5Mソルビトールを使用した。洗浄した定常期スフェロプラストを30mlのミトコンドリア調製用溶液中で徐々に分散させることにより，浸透圧的に溶菌

した。　得られた溶菌液を 2000×g, 5分間遠心分離し、その沈殿に対して同様の処理を行なった。　この浸透圧差による破壊処理を合計3回行ない，各々の遠心分離で得られる上澄を混合後，溶菌しなかった細胞や細胞破砕物を除去するため，再度 2000×g, 5分間遠心分離した。　この上澄画分から 13,000×g, 10分間の遠心分離操作によりミトコンドリア粒子を沈降させた。　実験に先だって，2，3回ミトコンドリア調製用溶液で洗浄した。　収率は約 1.3 mg ミトコンドリア蛋白質/g 湿重量 である。

ミトコンドリアの呼吸測定

詳細は第1章で述べた方法と同じである。　ただし呼吸測定に使用した反応液のショ糖濃度は，この定常期ミトコンドリアの場合，0.25M から 0.5 M へと上昇させた。

その他

電子顕微鏡観察，蛋白質量の測定は第1章の方法で述べた通りである。

第3節　結　　果

1. 定常期スフェロプラストの調製

対数期の細胞に適用したミトコンドリア調製法が対数期以降の増殖相での細胞に対しても有効か否か調べるため

菌体増殖とスフェロプラスト生成率の関係をみたのが図2-1である。　対数期以後の増殖比速度(μ)の低下に伴ない，スフェロプラスト生成率の低下がみられ，クエン酸生産期である定常期細胞に対して第1章で述べた酵素処理法は適用できないことがわかった。

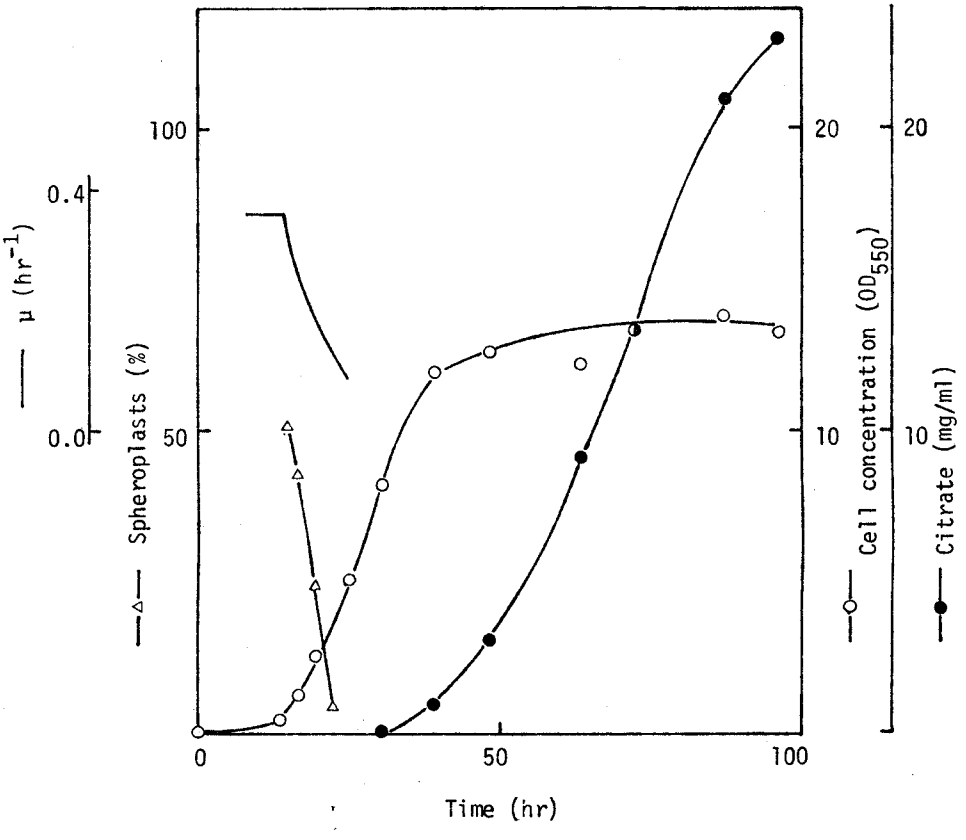


図2-1　Zymolyase処理(0～4°C)によるスフェロプラスト生成率と菌体増殖との関係。
培養時間の異なる増殖相から細胞を集菌，洗浄しスフェロプラスト生成率を求めた。　スフェロプラストの調製ならびに生成率の測定は図1-2の説明に準じて行なった。

定常期の細胞の場合，機械法で単離するのが常法であるが，できるだけ良質のミトコンドリアを得る必要性から，酵素法で単離することを目的に種々検討を加えた。

表て-1は定常期細胞を用いて，種々の細胞壁溶解酵素の単独，併用，連用処理による溶菌効果についてまとめたものである。

表て-1. 各種細胞壁溶解酵素の単独，併用あるいは連用処理による定常期細胞の溶菌効果。

Enzyme system	Residual OD_{550} (%)	
	0.75M sucrose	0.25M sucrose
(A) Zymolyase	73	68
Zymolyase + Lytic enzyme #2	76	71
Zymolyase + Lytic enzyme #3	65	71
Zymolyase + Lysozyme	73	74
Zymolyase + Snail enzyme	65	71
Zymolyase + Lytic enzyme #2 + Lysozyme	62	64
Zymolyase + Lytic enzyme #3 + Snail enzyme	55	59
Lytic enzyme #3 + Snail enzyme	63	68
Cellulase onozuka ⟶ Zymolyase	72	76
Cellulase onozuka	100	100
(B) Lytic enzyme #2 + Lysozyme	61	49
Lytic enzyme #2	62	66
Lysozyme	100	91
Lytic enzyme #2 ⟶ Lysozyme	86	78
Lysozyme ⟶ Lytic enzyme #2	51	47
Lytic enzyme #2 + Lysozyme*	74	73

* Incubated at 4°C for 240 min.

定常期細胞を集菌洗浄し，0.75Mショ糖を含むスフェロプラスト調製用溶液(第1章)に分散後，所定の酵素液を加え，特にことわらないかぎり，30°Cで180分間処理した。初発の細胞懸濁液のOD_{550nm}は約30である。

Aの系列で，各種酵素の濃度は次の通りである：Zymolyase；15mg/ml，Lytic enzyme #2；2mg/ml，Lytic enzyme #3；2mg/ml，lysozyme；2mg/ml，snail enzyme；8000 units/ml，Cellulase onozuka；20mg/ml。なおsnail enzyme溶液中には0.013%のシスティン塩酸塩を含む。またCellulase onozukaの使用の場合，反応液中の緩衝液はNa-クエン酸緩衝液(17mg/ml，pH4.5)を用いた。Bの系列では，すべての酵素濃度は2.5mg/mlである。Lysozyme単独の反応液中のpHは6，Lytic enzyme #2単独のとき8である。連用処理(a→b"表示)の場合，aの酵素で30°C，1時間前処理した。

反応後，細胞懸濁液を0.75Mおよび0.25Mショ糖濃度で100倍希釈し，OD_{550nm}の値を求めた。結果の表示は初発のそれぞれのOD値を100%としている。

30℃での酵素処理後，細胞分散液を 0.75M ショ糖の等張液と浸透圧差破砕用の 0.25M ショ糖を含む低張液で希釈し OD550nm 値の減少を調べた。　なお対数期細胞では，Zymolyase，0～4℃，2時間の処理で，低張液での OD 値が 40% 程度にまで減少する。

Zymolyase 単独，他の溶解酵素との併用あるいは Cellulase onozuka による前処理はいずれも大きな効果を示さなかった。　しかし，Lytic enzyme #2 と lysozyme の組み合わせは酵素処理中の顕微鏡観察と OD550nm 値の減少からスフェロプラスト形成に最も有効であることを示唆した。　Lytic enzyme #2，lysozyme 単独処理の溶菌効果の相違から，それぞれの酵素の作用機作は異なるが，Lytic enzyme #2 は定常期細胞に対し溶菌作用を有し，lysozyme 存在下で始めて，スフェロプラストの生成を可能にすると考えられる。

他方，低温（0～4℃）での併用処理は溶菌作用が低く，酵素濃度を上昇させても効果は認められなかった。

Lytic enzyme #2 と lysozyme を併用した時のスフェロプラスト生成率の経時変化を調べたのが図2-2である。　スフェロプラストの形成は浸透圧安定化剤として用いる糖の種類と濃度により顕著な影響を受けた。　対数期細胞に適用した 0.75M ― 0.25M ショ糖の系では，1時間の酵素処理で約20%のスフェロプラスト形成がみられたが，さらに反応時間を長くすると逆に低下した。　ショ糖濃度を2倍（1.5M）に上昇させても効果はなかった。

ショ糖の代りにソルビトールを用いたところ，0.75M－0.25M系で，時間とともにスフェロプラスト生成の増大がみられ，1.25M－0.25M 系において，2～3 時間の反応で 40～45% の収率が得られた。

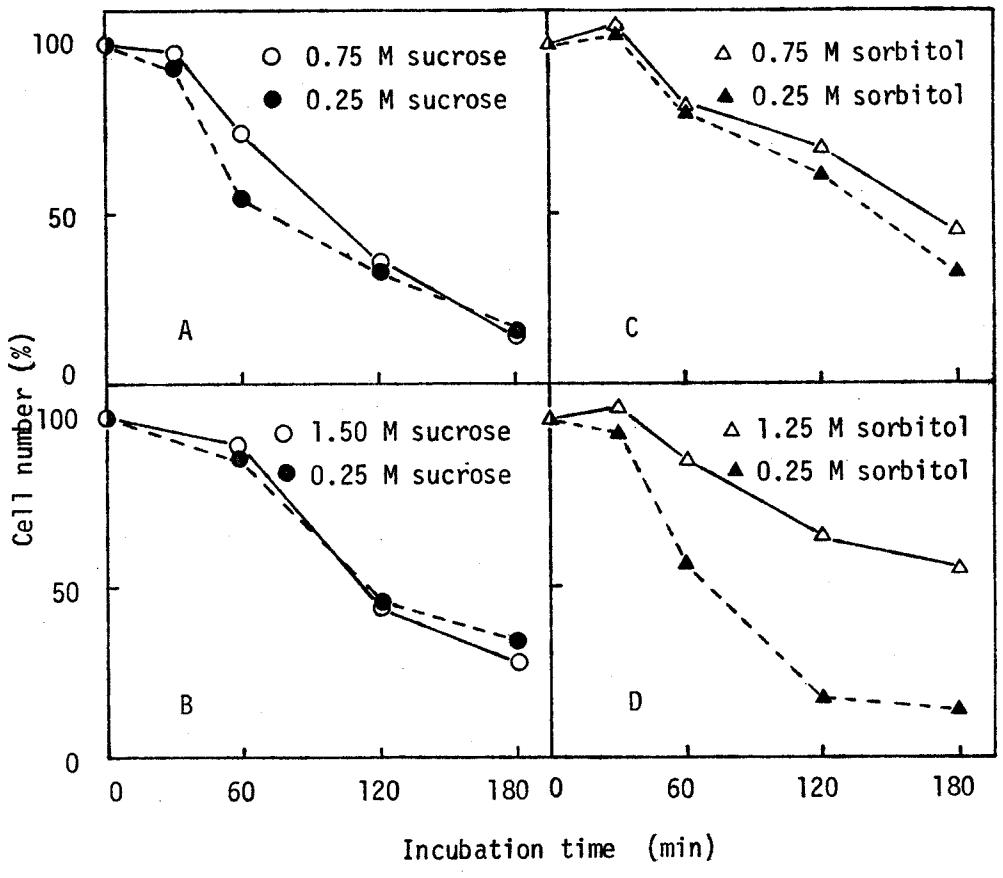


図2-2. 定常期の*C. lipolytica*細胞からのスフェロプラスト形成に及ぼす分散用溶液の影響。

定常期から集菌した細胞を洗浄後，等張液としてのショ糖(0.75M(A)あるいは1.50M(B))またはソルビトール(0.75M(C)あるいは1.25M(D))溶液に分散した。反応はLytic enzyme #2とlysozymeとともに最終濃度2.5mg/mlになるように添加し，30℃で行なった。なお最終の細胞懸濁液の濃度はそれぞれ1.3×10^9(AとC)，1.1×10^9 cells/ml (BとD)であった。反応液の一部を等張液および低張液[0.25Mショ糖(AとB)あるいは0.25Mソルビトール溶液(CとD)]で100倍希釈し，細胞数の経時変化を追跡した。その他の詳細は図1-2に示した通りである。

定常期細胞からソルビトール溶液を用いて，スフェロプラストが収率よく得られることから，浸透圧操作によるミトコンドリアの調製が可能になった。確立された単離

方法は実験方法に記述した通りである。　ただしミトコンドリア調製用溶液のソルビトール濃度は、ミトコンドリアの損傷をできるだけ少くするために 0.25M から 0.5M に上昇させた。

2. 定常期ミトコンドリアの電子顕微鏡観察

図 2-3 は定常期細胞から単離したミトコンドリア分画の超薄切片像である。　対数期ミトコンドリアと比較して、内部の構造的な差は認められなかった。　粒子径はほぼ均一で 0.5 μm 前後であり、対数期ミトコンドリアより小型である。　また他の細胞内小器官の混入も認められなかった。

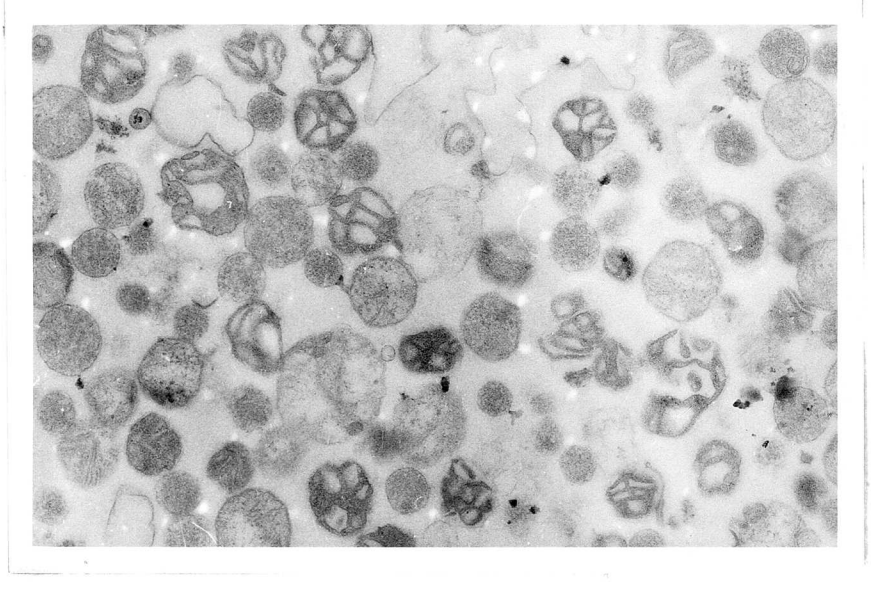


図 2-3. 定常期の C. lipolytica から単離したミトコンドリアの電子顕微鏡像。　四酸化オスミウム固定。　倍率は 20,000 倍である。

3. 単離された定常期ミトコンドリアの呼吸特性

図2-4はポーラログラフ法で記録した定常期ミトコンドリアの呼吸経過曲線である。 ADPの有無による呼吸調節が認められ，ピルビン酸＋リンゴ酸の酸化ではRC比が2.0～2.5，NADHでは1.4～1.7であった。 しかしながら対数期ミトコンドリア（図1-5）と比較して，RC比はいずれの酸化でも少し低かった。

図2-5は呼吸基質としてピルビン酸＋リンゴ酸を用い，定常期ミトコンドリアの呼吸機能に与える反応系のpHとショ糖濃度の影響について調べたものである。 pHが6以下あるいは7以上になると，state3での呼吸速度（Q_{O_2}）はかなり低下した。 RC比もpH7以上では低下し，呼吸機能が損われるが，P/O比で代表されるリン酸化反応はpHの変動による影響を受けなかった。

ショ糖濃度が0.25M，0.5Mのとき，呼吸機能の変化は認められなかったが，0.75MになるとQ_{O_2}の急激な減少がみられた。 この点対数期ミトコンドリアと類似していた。

A. 各種基質酸化における定常期ミトコンドリアの呼吸機能

種々基質酸化下における呼吸経過曲線からstate3でのQ_{O_2}，RC比，P/O比の値をまとめたのが表2-2である。定常期ミトコンドリアはTCA回路の中間体やNADHを酸化し，ピルビン酸＋リンゴ酸といったNAD-連結基質の酸化では，P/O比は理論値3に，コハク酸や外部添加のNADHの酸化では理論値2に近い値を示した。 この結果は対数

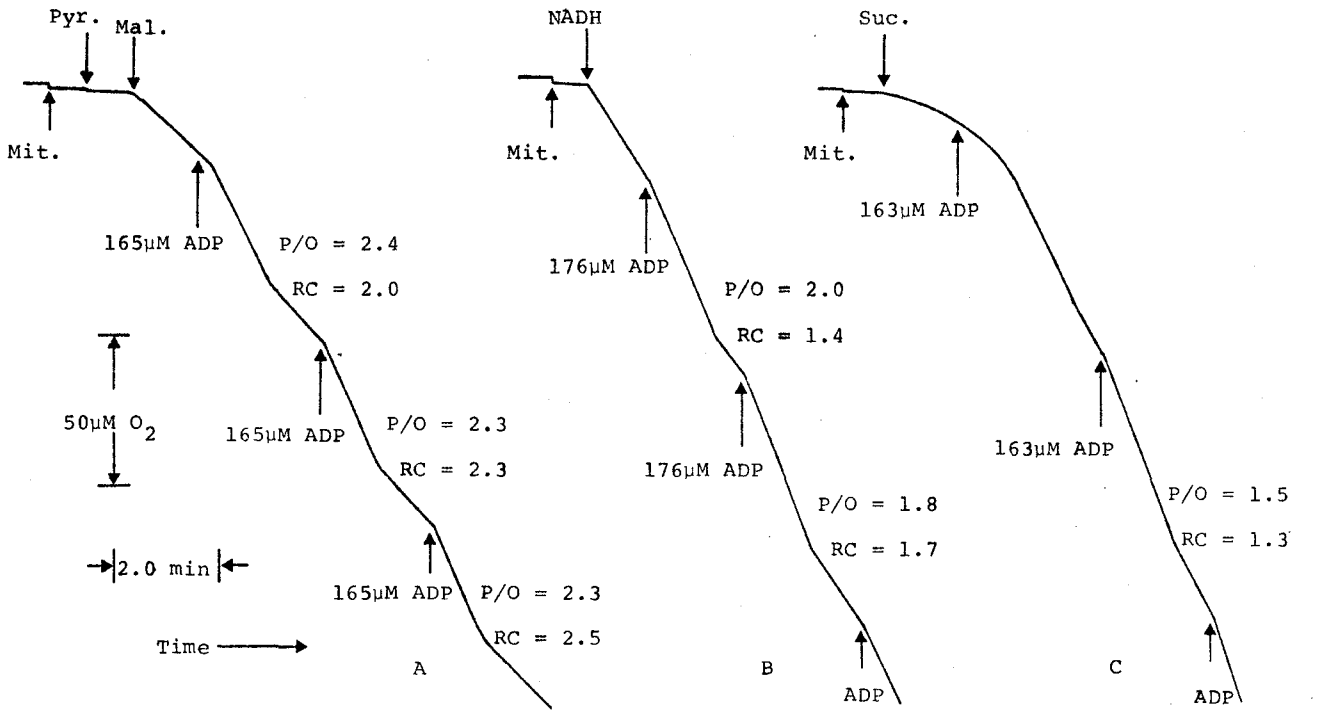


図 2-4. 定常期の細胞から調製した C. lipolytica ミトコンドリアにおける種々基質酸化での呼吸経過曲線。

実験条件は次の点を除いて図1-5の説明で述べた通りである：反応液中のショ糖濃度；0.5M，ミトコンドリアの蛋白質濃度；0.37 mg/ml (A)，0.16 mg/ml (B)，0.51 mg/ml (C)。

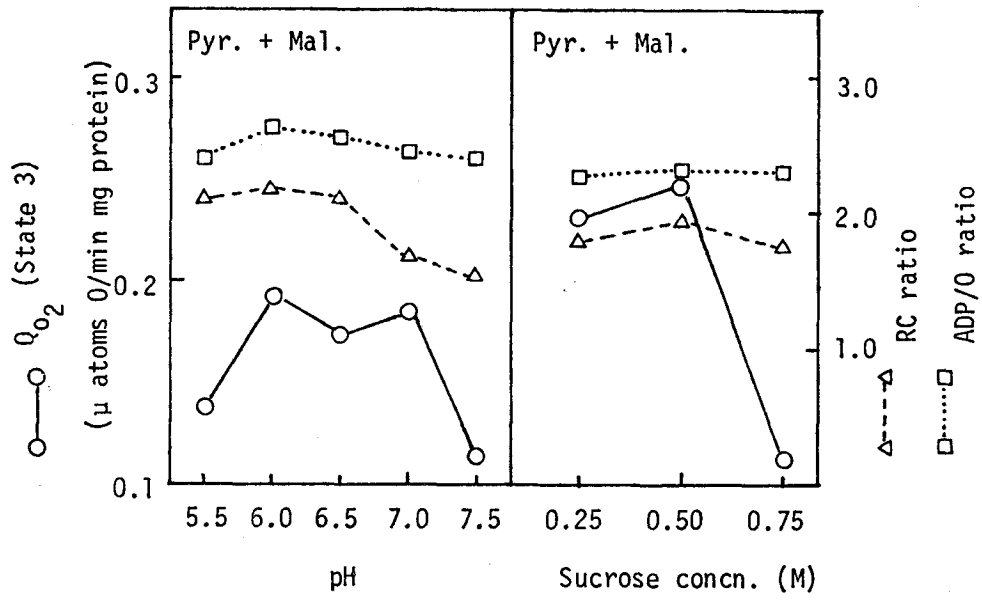


図2-5. 定常期ミトコンドリアの呼吸機能に及ぼす反応液の pH (左) とショ糖濃度(右)の効果。
呼吸基質としてピルビン酸＋リンゴ酸を使用した。 実験の詳細は図1-7,8に準じた。

表2-2. 定常期細胞から調製した *C. lipolytica* ミトコンドリアにおける種々基質に対する酸化的リン酸化活性。

Substrate	Q_{O_2}* [State 3]	P/O ratio	RC ratio
Pyruvate + Malate	150-270	2.3-2.8	2.0-2.6
Citrate	13- 39	2.0-2.6	1.2-1.3
α-Ketoglutarate	37- 70	2.2-2.5	1.4-1.7
Succinate	120-190	1.4-1.7	1.1-1.4
NADH	400-540	1.8-2.0	1.3-1.7

* natoms O/min per mg protein

図2-4で示した呼吸経過曲線から種々の値を求めた。 基質濃度は NADH 1mM を除き, すべて 5mM である。

期ミトコンドリアと同様である。

しかしながら酸化速度に関する挙動は両方のミトコンドリアで大きな差異がみられた。外部から添加したNADHの酸化速度は400～540 natoms O/min・mg蛋白質で，対数期ミトコンドリアによる酸化速度（450～660 natoms O/min・mg蛋白質）とほぼ等しいにもかかわらず，TCA回路中間体の種類により酸化速度の相違の程度が異なっていた。クエン酸蓄積期である定常期のミトコンドリアで，state 3でのクエン酸とα-ケトグルタール酸の酸化速度は対数期（クエン酸非生産期）ミトコンドリアで得られた値の10～20%に激減した。他方，ピルビン酸＋リンゴ酸，コハク酸の酸化速度は定常期ミトコンドリアで50%程度の低下を示すにとどまった。

B. 電子伝達系阻害剤の効果

表2-3は各種基質酸化での電子伝達系阻害剤の影響を調べた結果である。

表2-3. 定常期ミトコンドリアの種々基質酸化に対する電子伝達系阻害剤の影響。

Substrate	Inhibition (%)		
	Rotenone 3×10^{-5}M	Antimycin A 5×10^{-7}M	KCN 5×10^{-4}M
Pyruvate + malate	89.4	95.0	97.3
Succinate	0.0	92.5	94.7
NADH	13.0	100.0	100.0

各種阻害剤をstate 3での基質酸化条件で添加した。呼吸阻害の程度はパーセントで表示した。

ピルビン酸＋リンゴ酸の呼吸はいずれの薬剤（ロテノン，アンチマイシンA，KCN）によっても阻害されるが，コハク酸やNADHの場合，ロテノン阻害はみられなかった。これらの結果とP/O比の測定結果から，定常期ミトコンドリアは3つのリン酸化部位をすべて有しており，対数期のものと差異はなかった。

第4節　考　察

Lytic enzyme #2 が lysozyme の存在下で C. lipolytica の定常期細胞に対し，高い細胞壁溶解活性を有しており，スフェロプラスト生成を介してミトコンドリアの単離を可能にした。浸透圧安定化剤としてショ糖よりソルビトールの方が有効であった。これはソルビトールがスフェロプラストの安定化をもたらした結果，その形成率を高めた（40～45%の収率）ためと考えられる。

単離ミトコンドリアの無傷性は電子顕微鏡での観察結果，呼吸調節能そしてピルビン酸＋リンゴ酸やNADH酸化における高い呼吸速度（それぞれ150～270，400～540 natoms/min・mg蛋白質）により支持されており，対数期ミトコンドリアと同様，生理学的な実験に使用できる。

またP/O比の測定や電子伝達系阻害剤の実験結果から定常期ミトコンドリアは対数期のものと同様，3つのリン酸化部位を有しており，この点，Saccharomyces 酵母[41, 45, 46]や C. utilis[65-70]とは異なり哺乳動物のミトコンドリアと類似

していた（第1章・第4節考察 参照）。このように両増殖相から調製したミトコンドリアにおいて、呼吸特性での定性的な差異は認められなかった。

しかし、顕著な相違がstate 3でのTCA回路中間体の基質酸化速度で見られた。両者のミトコンドリア調製法は異なるが、外部添加のNADH酸化活性にはほとんど差がなかった。しかるに定常期ミトコンドリアでは、TCA回路中間体の酸化速度の低下がみられ、その程度は基質の種類により大きく異なっていた（表2-2）。対数期と比較し、クエン酸生産期ミトコンドリアでは、ピルビン酸＋リンゴ酸の酸化速度は約50%の低下であったが、クエン酸の分解系に関与するクエン酸やα-ケトグルタール酸の酸化速度は10～20%にまで低下した。

両増殖相でのNADH酸化活性に差異がないことより、上述の活性低下に部位IIとIIIでの酸化的リン酸化能は無関係である。また呼吸活性低下の程度が種々のNAD-連結基質で異なることから、酸化的リン酸化部位Iでの不活化が原因とも思われない。

それゆえ、上述の結果はクエン酸以降の酸化に関与する酵素 aconitate hydratase (EC 4.2.1.3) や isocitrate dehydrogenase (NAD^+) (EC 1.1.1.41) （あるいは $NADP^+$ 依存性酵素 (EC 1.1.1.42)), とくにα-ketoglutarate dehydrogenase複合体の活性あるいは酵素量が、クエン酸蓄積期のミトコンドリアにおいてかなり低下したことに起因すると考えられる。

第5節　要　約

1. 定常期の *Candida lipolytica* MT4 細胞からソルビトール溶液中，30°C で"Lytic enzyme #2"と lysozyme の併用処理により，40～45% の収率でスフェロプラストが生成した。　その結果，浸透圧差による溶菌操作により良質のミトコンドリアの単離が可能になった。

2. 得られたミトコンドリアはピルビン酸＋リンゴ酸の酸化で 2.0～2.5 の RC 比を有しており，なお充分な呼吸調節能を持っていた。　外部添加の NADH を基質とした時の呼吸速度は高く（400～540 natoms O/min・mg 蛋白質），対数期で得られた値とほぼ一致した。

3. P/O 比がピルビン酸＋リンゴ酸の酸化で 2.4，NADH，コハク酸酸化で 2.0～1.5 であった。　リン酸化部位 I，II，III にそれぞれ特異的な阻害剤ロテノン，アンチマイシン A，KCN は所定の段階で電子伝達を阻害した。
以上の結果，定常期ミトコンドリアも対数期のものと同様，ミトコンドリアで内生した NADH の酸化に3つのリン酸化共役部位が含まれることが示された。

4. 定常期ミトコンドリアでの基質酸化速度は，対数期ミトコンドリアと比較した時，基質の種類により大きな変動がみられた。　ピルビン酸＋リンゴ酸の酸化速度は対数期ミトコンドリアでの値の 50% 程度であるのに対し，クエン酸，α-ケトグルタール酸での酸化速度の減少は 80～90% に達した。

第3章　ミトコンドリアのチトクロム類の分光分析

第1節　緒　言

1925年 Keilinによるチトクロムの再発見以来，今日に至るまで，いろいろな生物のチトクロムに関する酵素化学的，機能的研究の発展はめざましい。　チトクロムは好気性生物のみならず，多くの嫌気性生物にも存在し，硫酸塩呼吸，硝酸塩呼吸にも，また光合成反応でも重要な役割を演じている。　すなわち電子伝達を伴なう生命現象にひろく関与していることが明らかになっている[76]。

好気性生物の場合，基質を分子状酸素で酸化し，その間に遊離されるエネルギーを生物の利用できる形〝ATP〟として捕捉するが，その基質酸化で重要な機能を果たすのがチトクロムである。　現在では動物や酵母の細胞呼吸に関与するチトクロム成分は a, b, c, c_1 の4種であることが確立されている。

最近，動物[77-82]，植物[83]，酵母[84]のミトコンドリアで，少なくとも2種以上のチトクロムb成分が電子伝達系に含まれることが明らかになってきた。　それらは互いに分光学的，速度論的性質やアンチマイシンに対する反応性などにより識別されている。　チトクロムbが直接高エネルギー中間体を形成し，リン酸化反応に関与するという報告もあるが，呼吸系やエネルギー獲得系における各チトクロム成分の機能については不明の点が多い[85]。

本章では対数増殖後期から単離した *Candida lipolytica* MT4 ミトコンドリアの生理機能とりわけ呼吸特性解明の一環として，呼吸系チトクロム類の定量および定性分析を

分光光学的に行なった。　さらに二波長分光測定と差スペクトルの分析により，各種還元剤に対する挙動が異なるb型チトクロムの3成分の存在について述べる。

第2節　実験材料および方法

使用菌株，培養条件および対数期の *C. lipolytica* 細胞からのミトコンドリアの調製法は，第1章で記述した通りである。　ここではチトクロムの分光測定の方法について記述する。

チトクロムの分光測定

対数期ミトコンドリアを 0.25M ショ糖，0.1mM EDTA，10mM リン酸カリウム緩衝液（pH 6.5）からなる反応液（第1章参照，ただしアルブミンは除く）に分散後使用した。チトクロムの分析は，日立356型 二波長／ダブルビーム分光光度計を用い，室温および液体窒素の温度下で測定した。

チトクロム類の定量・定性分析ではダブルビーム様式［double beam (split) mode］を使用し，嫌気（還元）－好気（酸化）差スペクトル[56]を求めた。　室温の場合，光路長が1cmであるキュベット双方に同量のミトコンドリア懸濁液（5.5mg蛋白質/ml）を入れ，試料側に最終濃度5mM のコハク酸（pH 6.5）を添加し上部を流動パラフィンで密封，対照側には同量の蒸溜水を添加した。　試料側が嫌気状態に

なり，チトクロムの還元を確かめた後，コハク酸嫌気－好気差スペクトルを 650 nm から 500 nm の波長走査により記録した。　その後試料側に微量（1～2 mg）の粉末ジチオナイト（$Na_2S_2O_4$）を添加し，同様の差スペクトルを測定した。

液体窒素の温度下での測定[86]には，特殊な低温用アタッチメントを分光器に装着し，3 mm 光路長のキュベットを使用した。　操作法は原則的に同じである。　試料側でのコハク酸あるいはジチオナイト添加による還元状態の確認後，液体窒素で冷却し，コハク酸嫌気－好気とジチオナイト還元－酸化（好気）差スペクトルを記録した。

なお室温での差スペクトルからのチトクロム類の定量は，各チトクロムの α 吸収帯付近での二波長吸収差より，それぞれのモル吸収係数（ε）を用いて行なった[56, 57]。　二波長の組み合せは：チトクロム $a + a_3$；$A_{605nm} - A_{630nm}$，b 型チトクロム；$A_{565nm} - A_{575nm}$，チトクロム $c + c_1$；$A_{550nm} - A_{540nm}$　である。　また ε 値は順に 16.5 $mM^{-1} \cdot cm^{-1}$，17.9 $mM^{-1} \cdot cm^{-1}$，19.0 $mM^{-1} \cdot cm^{-1}$ の値を採用した。　チトクロム $a+a_3$ 含量はチトクロム a と a_3 含量の合計であり，b 型の含量も種々のチトクロム b 成分の総量を意味する。　チトクロム c と c_1 は室温では区分できないので，チトクロム $c+c_1$ と表現した。

b 型チトクロムの還元を経時的に測定する実験では 565 nm－575 nm の二波長様式［two wavelength (dual) mode］を使用した。　1 cm 光路のキュベットに 2.0 ml のミトコンドリア懸濁液を入れ，順にコハク酸（5 mM）と KCN（1 mM），ATP（2 mM），アンチマイシン A（2.5 μM）　最後にジチオナイトを添加して行なった。　アンチマイシン A およびジチ

オナイトで還元される成分を調べる実験では，目的の薬剤を加える前段階まで上記の方法通りに行ない，のちふたつのキュベット（1cm光路）に同量ずつ分配し，試料側に目的の薬剤を加えて差スペクトルを室温で記録した。液体窒素の温度下で記録する場合，3mm光路のキュベットを使用した。

第3節 結 果

1. ミトコンドリアのチトクロム組成

図3-1は酸化（好気）状態を対照にして，コハク酸呼吸時またはジチオナイト添加による還元状態間との室温における差スペクトルを示している。605 nmと550 nmにそれぞれ吸収極大をもつチトクロム $a+a_3$ とチトクロム $c+c_1$ の量は両還元状態において，ほとんど差はなかった。しかし，b型チトクロムの吸収極大は，コハク酸還元では564 nmであったのが，ジチオナイト添加による還元状態では565 nmに遷移するとともに，量的にも2倍以上増加した。

液体窒素の温度で得られた差スペクトルを図3-2に示す。チトクロム $a+a_3$ とチトクロム $c(+c_1)$ の吸収極大はそれぞれ603 nmと547 nmに遷移した。また低温での551 nm付近にある肩（shoulder）は，おそらくチトクロム c_1 に由来するものであろう。他方，563 nmと556 nmにb型チトクロムのふたつの吸収帯（peak）が観察されたが，ジチ

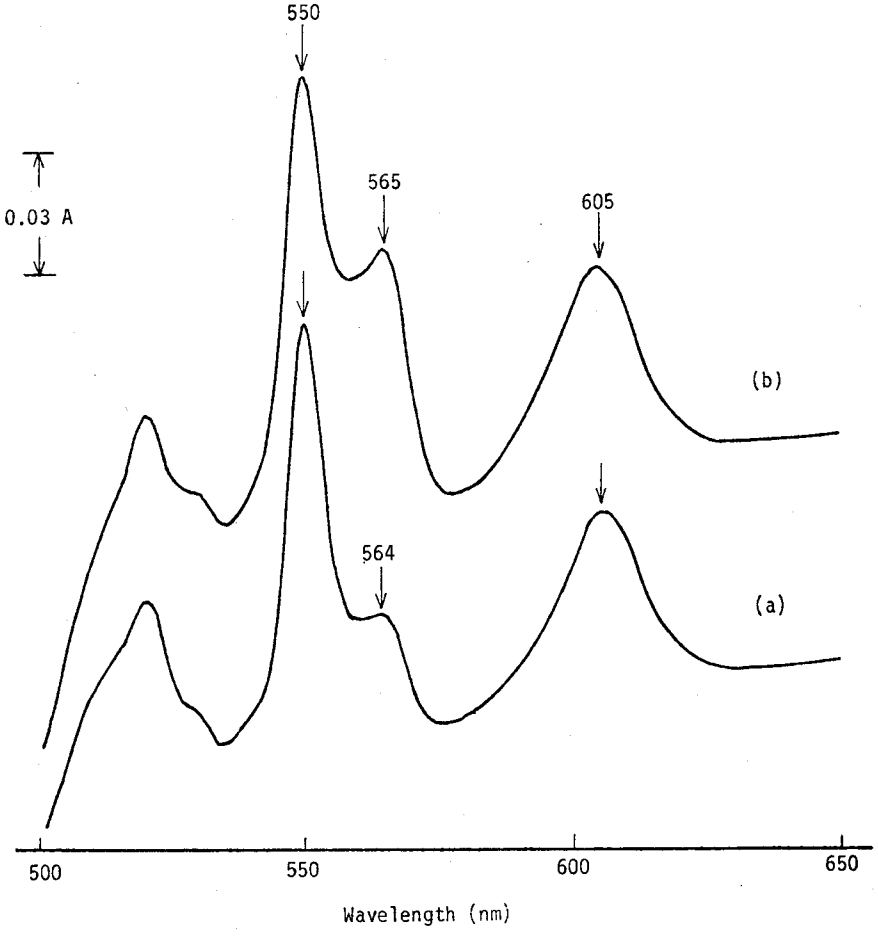


図3-1. *C. lipolytica* ミトコンドリアの室温での差スペクトル。

対数期ミトコンドリアを0.25Mショ糖, 0.1mM EDTA, 10mM KCl, 10mMリン酸カリウム緩衝液(pH6.5)からなる反応液4mlに5.5mg蛋白質/mlになるように分散した。このミトコンドリア懸濁液を2つのキュベットに分割した。試料側キュベットのミトコンドリアは5mMコハク酸添加で還元し, 対照側キュベットのミトコンドリアは好気条件に置いた。試料側が嫌気状態になるのを待って, コハク酸嫌気－好気差スペクトルを記録した(a)。その後ジチオナイト(1～2mg)を試料側に添加し, 差スペクトルを記録した(b)。光路長は1cmである。

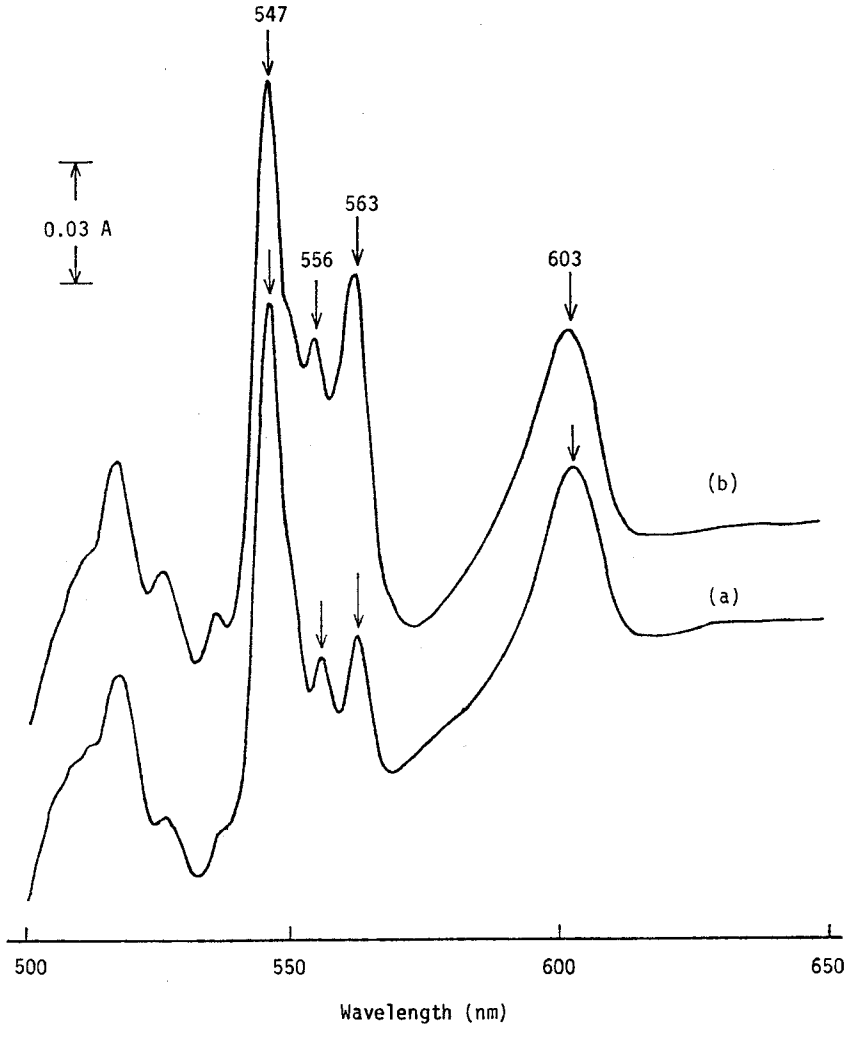


図3-2. C. lipolytica ミトコンドリアの液体窒素の温度下での差スペクトル。

酵母ミトコンドリアを反応液に6.4 mg蛋白質/mlになるように分散した。試料側キュベットに5mMコハク酸(a)あるいはジチオナイト(b)を添加し，ミトコンドリア懸濁液を嫌気(還元)状態にした。試料側，対照側キュベットを直ちに液体窒素で凍結させた。そしてコハク酸嫌気－好気(a)あるいはジチオナイト還元－好気(酸化)(b)差スペクトルを記録した。光路長は3mmである。

オナイト添加により吸収の増大がみられた。　しかし，これらふつの吸収帯が室温でみられた 565 nm に極大をもつ成分の二峰（double peak）に相当するのか，あるいはふつの異なる成分に由来するのか不明である。

図3-1から，この対数期ミトコンドリアのチトクロム含量を求めた（表3-1）。チトクロム $c+c_1$ やb型チトクロムの含量に比して，チトクロム $a+a_3$ 含量は *Saccharomyces* ミトコンドリアより高く，いわゆる動物心筋と類似した傾向を示した[48,87]。　コハク酸で還元されたb型チトクロム量はジチオナイト還元で得られた値の50%にも満たなかった。　それ故，このミトコンドリアはコハク酸で充分還元されないb型チトクロム成分を含むと考えられる。

表3-1. *C. lipolytica* ミトコンドリアのチトクロム組成

Cytochrome	Dithionite	Content (nmoles/mg protein)
$a + a_3$	-	0.40
	+*	0.43
b-type	-	0.25
	+*	0.55
$c + c_1$	-	0.87
	+*	0.92

* A few grains of dithionite in the sample cuvette.

チトクロム含量は図3-1で示した，還元状態（コハク酸または，ジチオナイト添加によりもたらされる）と酸化状態間の差スペクトルから計算した。

2. b型チトクロムの分光分析

動物や植物におけるb型チトクロムの成分であるb-566とb-562はアンチマイシン[77, 80, 83, 88]あるいはATPによるエネルギー化[80, 83]により還元されることが知られている。また植物ではコハク酸のような呼吸基質ではなく，ジチオナイトにより還元される成分が存在する[83]。そこでこのミトコンドリアのb型成分の還元に及ぼすアンチマイシンとジチオナイトの効果を二波長様式を用い 565 nm－575 nmでの吸収変化を測定して調べた（図3－3）。

ミトコンドリア懸濁液には，基質であるコハク酸と共に末端の電子伝達を阻害するためKCNを同時添加した。急速な還元後，その速度が減少し，ほとんど零に達した時ATPをミトコンドリア懸濁液に加えた。この手段によって，b型チトクロムの約40%が還元された（図のAの状態）。アンチマイシンAの添加により，状態Bへの急激な還元が起こった（約70%の還元に相当）。さらにジチオナイトの添加で，b型チトクロムの100%還元が達成された（図のCの状態）。この図から明らかなように，アンチマイシンAとジチオナイトはこのミトコンドリアのb型チトクロム成分の著しい還元をひきおこした。

そこでアンチマイシンAやジチオナイトの添加により還元されるb型成分をダブルビーム様式の差スペクトルにより分析した。

図3-4はアンチマイシンA存在下で還元される成分のスペクトルであり，図3-3で示した状態BとA間の差スペクトルに相当する。568nmでの顕著な吸収帯とともに560nm付近の肩そして550nmでの谷が観察された。液体窒素下の測定では，565nmに大きな，557.5nmに小さな

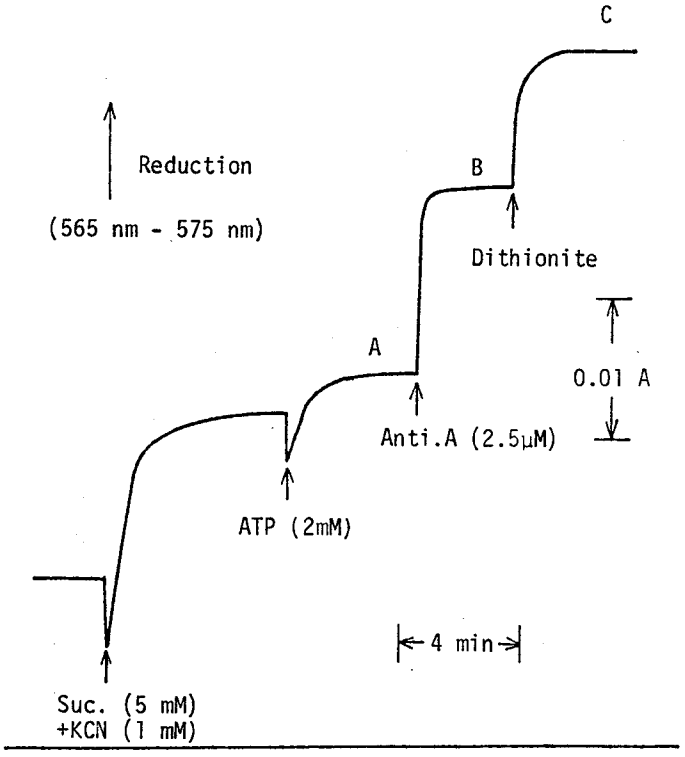


図3-3、C. lipolytica ミトコンドリアでのb型チトクロムの還元に及ぼすアンチマイシンA (Anti. A) とジチオナイトの効果。

反応液に懸濁したミトコンドリア分散液(4.5 mg蛋白質/ml)に5mMコハク酸(Suc.)と1mM KCNを加えた。 b型チトクロムの還元は、室温で二波長様式を用い565nm－575nmでの吸収増大を記録することにより追跡していった。 他の条件は図中に示した。 光路長は1cmである。

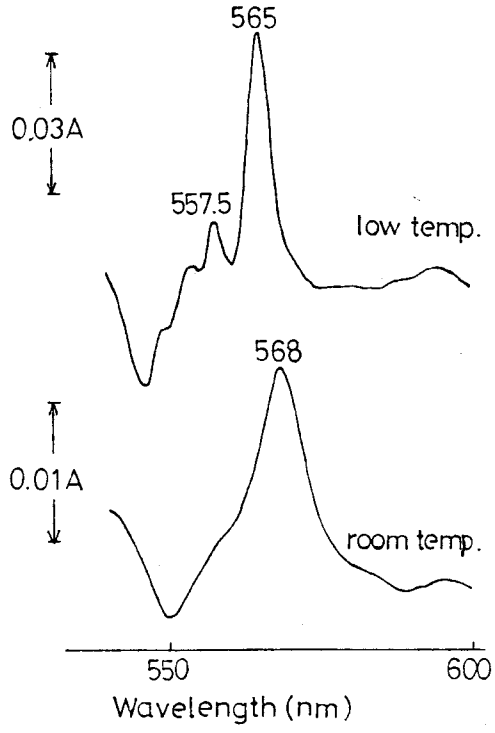


図3-4. C. lipolytica ミトコンドリアにおけるb型チトクロムに及ぼすアンチマイシンAの効果を示すスペクトル。

反応液で分散したミトコンドリア(5.4mg蛋白質/ml)にコハク酸(5mM)+KCN(1mM)を添加後，2mM ATPを加えた(図3-3参照)。懸濁液を2つのキュベットに分割後，アンチマイシンAを2.5μM(0.46nmole/mg蛋白質)の濃度で試料キュベットに加えた。図3-3でのB−Aに相当する，2つのキュベット間の吸収差をダブルビーム様式で室温(光路1cm)と液体窒素の温度(光路3mm)で記録した。

吸収極大がみられた。これらのスペクトルは図3-1,2で示されたコハク酸呼吸で還元される成分では説明できない。

次にコハク酸とアンチマイシンA存在下で誘導された還元状態(図3-3のB)に対するジチオナイト添加効果を調べたのが図3-5である。得られたスペクトルは図3-3

でのC－B差スペクトルに相当するが，561nmから563nmの波長範囲で広い吸収極大を有していた。　このスペクトルは図3-1の565nmに極大を有する成分の影響を受けているものと考えられる。　なぜなら，この成分はコハク酸では部分的に，ジチオナイトにより完全に還元されるからである。　しかし，図3-5のスペクトルが図3-1，2や図3-4のスペクトルと吸収極大を異にすることから，コハク酸やアンテマイシンAでは還元されずジチオナイトにより還元される成分を含むものと思われる。

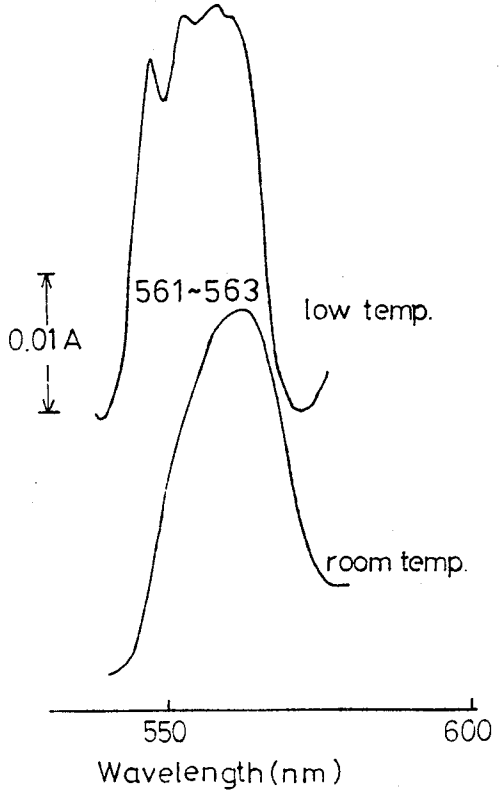


図3-5. C. lipolytica ミトコンドリアにおけるb型チトクロムに及ぼすジチオナイトの効果を示すスペクトル。

図3-3のごとく，ミトコンドリア分散液(5.0mg蛋白質/ml)に，コハク酸(5mM)＋KCN(1mM)，ATP(2mM)，アンテマイシンA(2.5μM；0.50n mole/mg蛋白質)を順次添加した。　懸濁液を2つのキュベットに分割し，試料側にジチオナイト(1~2mg)を加えた。　そして図3-3でのC－Bに相当する，2つのキュベット間の吸収差を室温と液体窒素の温度下で測定した。　他の条件は図3-4と同じである。

第4節　考　察

*Saccharomyces*属酵母のチトクロム $a+a_3$ 含有量は他のチトクロムに比し相対的に低く，チトクロム $c+c_1$ のそれの10～20%程度であることが知られている[48,87]。これに対し，*C. lipolytica* ミトコンドリアのチトクロム $a+a_3$ 量は高く，チトクロム $c+c_1$ の約45%の値を示した。この事実は*C. utilis* や *C. mycoderma* で得られた結果に類似していた[48,87]。b型チトクロムは565nmに吸収極大を示したが，多くのb型チトクロムの吸収極大が562nmであることから，この吸収波長は*C. lipolytica* に特異的なものと思われる。

図3-1, 2で観察されたように，b型チトクロムの還元の程度は用いる還元剤の種類に依存している。ジチオナイト還元とコハク酸呼吸との差スペクトル（図示せず）をとってみると，565nmに極大，558nm付近に肩（液体窒素下では，それぞれ563nmと556nmの吸収帯に相当する）が観察された。このことは室温で565nmに吸収極大を有するb成分が，コハク酸呼吸では部分的に，ジチオナイトにより完全に還元されることを意味する。この性質は哺乳動物[79]や植物ミトコンドリア[83]に存在するb-562の性質と同じである。

最近，動物・植物や酵母において，スペクトルや速度論的な特性により，またアンチマイシンやATPに対する挙動により区分できるいくつもしくはそれ以上のb成分が存在することが報告されている。図3-3の結果は，*C. lipolytica* ミトコンドリアでもb型チトクロム成分のあるものが，アンチマイシンAやジチオナイトにより還元されることを示唆している。

アンチマイシンはb型チトクロム成分のスペクトル変化，特にb-566の還元やb-562の長波長側への遷移(red shift)を引き起こすことが知られている[78]。　図3-4から明らかなように，アンチマイシンAで誘導された568nmに極大をもつ大きな吸収帯は二峰性を示さないことから，前述の565nmに吸収帯を有する成分のred shiftとは考えられない。560nm付近に見られた肩がアンチマイシンAによる還元成分に由来するのか，他成分のred shiftの結果なのか明らかではない。　しかし，アンチマイシンAが568nmに極大をもつ一成分を特異的に還元したのは明らかである。　それゆえ，この成分が哺乳動物や植物のチトクロムb-566に相当するものと思われる。

植物ミトコンドリアで，LambowitzとBonner[83]は呼吸鎖に関与する4つのb成分の他に，ジチオナイトによってのみ還元される1種以上のb成分の存在を明らかにした。　図3-5で示されたスペクトルが，コハク酸呼吸で部分的に還元される成分だけでは説明できない。　このことを考慮すれば，*C. lipolytica* ミトコンドリアがコハク酸呼吸ではなく，ジチオナイトにより還元されるb成分（吸収極大が561nm～563nm）を1種あるいはそれ以上含んでいると考えられる。

図3-3,4,5で得られた結果は，*C. lipolytica* ミトコンドリアがコハク酸，アンチマイシンA，ジチオナイトによる還元状態で，異なる挙動をとる少なくとも3種のb型チトクロム成分を有することを示している。

これら3成分が呼吸鎖の電子伝達やエネルギー転移にいかに関与するのか，今後の課題であろう。

第5節　要　　約

1. Candida lipolytica MT4 の対数期細胞から調製したミトコンドリアのチトクロム系を，コハク酸呼吸やジチオナイト添加による還元状態と酸化（好気）状態間での2種の差スペクトル測定により研究した。　両還元状態下での，チトクロム $a+a_3$ とチトクロム $c+c_1$ の含量にはほとんど差がなかったが，コハク酸呼吸によるb型チトクロムの還元の程度はジチオナイトで還元される量の50%以下であった。

2. 565nm－575nm の二波長分光分析と差スペクトルにより，この酵母ミトコンドリアには次にあげる少なくとも3種の異なるb型チトクロム成分が存在することが示された：1) コハク酸では部分的に，ジチオナイトにより完全に還元される成分（565nm にα吸収帯を有する）；2) アンチマイシンA存在下でその還元が誘導される成分（568nm にα吸収帯を有する）；3) 添加ジチオナイトによってのみ還元される成分（1種あるいはそれ以上：561nm～563nm にα吸収帯を有する）。機能的な挙動から判断すると，その吸収極大はこの酵母に特異的であると考えられるが，第1，2の成分は哺乳動物ミトコンドリアのチトクロム b-562 と b-566 にそれぞれ相当すると思われる。

第4章　ミトコンドリアでのクエン酸生成とその制御

第1節　緒　言

ミトコンドリアは細胞内における代謝産物の〝生体酸化〟の場である。　糖，アミノ酸，脂肪酸など細胞質で生じた代謝物は分子状酸素の存在下でミトコンドリア内に輸送された後，TCA回路に入り脱水素反応と脱炭酸反応の連鎖により酸化的に分解される。　その時放出されるエネルギーは酸化的リン酸化反応により，ATPあるいは他の高エネルギー結合の形で保存される。

このようにTCA回路における物質代謝は呼吸鎖の電子伝達系やATP生成系と密接に関係しており，ミトコンドリア内のエネルギー状態つまりアデニンヌクレオチドのリン酸化の程度（ATP/ADP比）やピリジンヌクレオチドの酸化還元状態（NADH/NAD^+比）がフィードバック的にTCA回路の代謝を制御している。

さらにTCA回路は脂肪酸のβ－酸化やケトン体の生成といった他の代謝系のみならず，糖新生（gluconeogenesis）や脂肪酸の合成（lipogenesis）などミトコンドリア外（細胞質）の物質代謝とも相互的に関連し合っている。

TCA回路の代謝制御は，酸化経路を触媒する酵素群と代謝産物やコファクターによる各酵素活性の調節に帰すことができる。　ピリジンヌクレオチド（NAD^+, $NADP^+$）の酸化還元状態は各脱水素酵素反応を制御している。　またアデニンヌクレオチド（ATP, ADP, AMP）はある種の酵素，例えばpyruvate dehydrogenase複合体やisocitrate dehydrogenase（NAD^+）（EC 1.1.1.41）のコファクター（アロステリック酵素

では正あるいは負のエフェクター と呼ばれる) であり，代謝調節の一因を担なっている。

細胞質で解糖系 (glycolysis) により生成したピルビン酸はミトコンドリア内に輸送されTCA回路で代謝される。クエン酸はTCA回路の入口に位置し，ピルビン酸の酸化産物であるアセチル-CoA と，オキザロ酢酸から citrate (si)-synthase (EC 4.1.3.7) により生成される重要な中間体であり，その生成は他の代謝系にも重大な影響を及ぼす。

最近 gluconeogenesis や lipogenesis のさかんな動物組織から調製したミトコンドリアでのピルビン酸の代謝およびクエン酸生成を含めたTCA回路の調節に関する研究が活発に行なわれている[89-98]。その結果，クエン酸生成の基質であるアセチル-CoA，オキザロ酢酸の供給経路やTCA回路の制御機構は，ミトコンドリアの起源である各組織に特異的であることが明らかになった。

第1章，2章の結果から，異なる増殖相より単離したミトコンドリアでのクエン酸生成とTCA回路における制御に関する比較研究は，Candida lipolytica MT4 細胞のクエン酸生産の要因を評価するのに必須であると思われる。しかし，酵母ミトコンドリアを用いた研究は皆無であり，何の情報も利用することができない。

本章では，C. lipolytica の対数期およびクエン酸生産期である定常期ミトコンドリアを用いて，リンゴ酸存在下でのピルビン酸代謝とクエン酸生成を比較検討した。さらにアデニンヌクレオチドによる isocitrate dehydrogenase (NAD^+) 活性の調節を通じての代謝制御とクエン酸生成機構との密接な関連性を論じ，細胞のクエン酸蓄積の要因について考察した。また従来報告されている哺乳動物ミトコンドリアでの代謝調節機構とも比較し，この酵母の特異性につい

ても述べる。

第2節　実験材料および方法

試　薬

アデニンヌクレオチド類，ピリジンヌクレオチド類，フルオロクエン酸(バリウム塩)，hexokinase (EC 2.7.1.1) [Type IV]，ウシ血清アルブミン，ホタル lantern extract (luciferase) は Sigma 社製である。　アンチマイシンAは P-L Biochemicals 社製を使用し，代謝物の分光学的定量に用いた酵素は malate dehydrogenase (EC 1.1.1.37) (Sigma 社製) を除き Boehringer Mannheim (Germany) 社から購入した。ピルビン酸カリウムをはじめ，他の試薬は半井化学 K.K.，和光純薬 K.K. の特級を使用した。　水は脱イオン，蒸溜して使用した。　リンゴ酸は蒸溜水に溶解後，KOH で pH 6.5 に調節し，基質として用いた。

培養条件ならびにミトコンドリアの調製

使用菌株，培養方法は第1章で述べた通りに行なった。対数期細胞は培養開始後約14時間に，クエン酸生産期である定常期細胞は40時間に集菌した。　後者の場合，24時間の培養後 $CaCO_3$ 添加により，培養液中の pH を5に調節した。

ミトコンドリアは対数期および定常期の *C. lipolytica* 細胞から，それぞれ第1章，第2章で記述した酵素処理法

に従い調製した。 単離ミトコンドリアは 0.25M (対数期ミトコンドリア) あるいは 0.5M ショ糖 (定常期ミトコンドリア), 0.1mM EDTA, 10mM リン酸カリウム緩衝液, pH 6.5, 10mM KCl, 1mg/ml ウシ血清アルブミンからなる反応液に分散し, 使用するまで氷冷中で保存した。

ミトコンドリアによる反応 (incubation)

ミトコンドリアによる反応は, 呼吸基質 (特にことわらないかぎりピルビン酸とリンゴ酸) を添加した反応液中で, ゆるやかに振とうしながら 30°C で行なった。 反応は多くの場合, ミトコンドリア分散液を最終濃度約 1mg蛋白質/ml になるよう添加することにより開始した。 State 4 (ADP無添加) から, 異なるミトコンドリアの酸化状態への移行実験では, アデニンヌクレオチドやその他薬剤の添加は, 反応開始後 10分に行なった。

State 3 への移行では, 酵母 hexokinase (最終濃度 40 units/ml) とグルコース (10mM) を ADP添加前 5分に加えた。必要な時間間隔で, ミトコンドリア懸濁液の一部 (0.8ml) を取り出して, 0.2ml の冷 30% 過塩素酸と混合し反応を停止させた。 生じた蛋白質の沈殿を 10,000×g, 10分間, 4°C の遠心分離で取り除いた。 脱蛋白の抽出液は 7M KOH で pH 7 に中和後, $KClO_4$ の沈殿を遠心分離で除去した。

TCA回路中間体の定量

中和したミトコンドリア抽出液中の代謝産物を定量した。 クエン酸は Williamson と Corkey の方法[99]により, またピルビン酸[100], リンゴ酸[101], イソクエン酸[102], α-ケトグ

ルタール酸[103]も分光光度計を用いて酵素法により定量した。ミトコンドリア蛋白質はウシ血清アルブミンを標準にLowryらの方法[62]により測定した。

ミトコンドリアのisocitrate dehydrogenase活性の測定

ミトコンドリア抽出液は次のように調製した。全段階4°Cで行なった。定常期ミトコンドリア(7.6mg蛋白質)を25%(w/v)グリセロールを含む0.1Mリン酸カリウム緩衝液(pH 7.0) 5.5mlに分散後，海上電機超音波発生装置(4280型)を用い19.5kHz，2Aで7秒間の超音波破砕操作を3回繰り返した。この処理は氷冷中，ステンレススチール製の遠沈管で行なった。

生じた亜ミトコンドリア粒子は100,000×g，30分間の超遠心分離で沈降させた。得られた上澄区分を2気圧の窒素ガス下，PM-30の膜を装備したアミコン・ダイアフロー装置を用いて，総量15mlの，グリセロールを含む上記の緩衝液で脱塩濃縮した。得られた2mlの濃縮溶液(1.2mg蛋白質を含む)をisocitrate dehydrogenase活性の測定に用いた。なお，この標品にはNADH，NADPHの酸化活性は検出されなかった。

NAD^+依存性酵素およびisocitrate dehydrogenase ($NADP^+$) (EC 1.1.1.42)活性は，ミトコンドリアによる反応実験と同様の条件下で，NAD^+あるいは$NADP^+$の340nmでの還元を日立124型分光光度計を用い，計録計で追跡することにより測定した。反応温度は30°Cである。反応液は80mMリン酸カリウム緩衝液(pH 6.5)，3mM $MgCl_2$，0.25mMのNAD^+または$NADP^+$，2μMアンチマイシンA(エタノール溶液)，指定した濃度のアデニンヌクレオチド，そして種々濃度の

イソクエンから成っている。総容量はミトコンドリア抽出液 50μl を含め 2.0 ml である。

基質として DL-イソクエン酸を使用したが，濃度表示は酵素的に活性な異性体に基づいた。イソクエン酸を除くすべての成分をキュベット（光路長 1cm）中で混合し，30℃，2分間温度平衡後，イソクエン酸溶液を添加，反応を開始した。初期反応速度を測定し，活性を 1mg ミトコンドリア蛋白質(抽出液中)，1分間あたりの増加した NADH または NADPH の μmole 数（μmoles / min・mg 蛋白質）で表示した。なお，用いたアデニンヌクレオチド濃度は 259nm の吸光度から決定した。

細胞内アデニンヌクレオチド類の測定

対数期と定常期の細胞抽出液は次のように調製した。1ml の培養液に 0.2ml の冷 36% 過塩素酸を加え，氷冷中で 15分間放置した。KOH で pH 7 に中和後，0.4ml の 0.1M リン酸カリウム緩衝液，pH 7.3，を加え，さらに H_2O で総量を 2.5ml としたのち凍結保存した。定量に際し，解凍を行ない，蛋白質沈殿と $KClO_4$ を遠心分離により除いた後，細胞抽出液中のヌクレオチド類を分析した。

アデニンヌクレオチド類は 50mM トリス・塩酸緩衝液(pH 7.4)を使用した以外は，Foulds の方法[104]にもとずく Kotani らの方法[105]に従い，luciferase 法で決定した。なおミリポア膜（孔径：0.65μm）を通過後の培養沪液には，ヌクレオチド類は検出されなかった。細胞内ヌクレオチド類の含有量は Conway と Downey の報告[106]で示された，1g の湿重量の細胞が 0.78ml の細胞内容量（intracellular space）に相当するという仮定に基づき計算した。ここで OD550nm 値が 1.0 の細胞

分散液濃度は 3.31 mg 細胞湿重量/ml に相当する。

第3節 結 果

1. 定常期および対数期ミトコンドリアでのクエン酸生成

両増殖相から単離したミトコンドリアにおけるクエン酸の生成を調べた結果が表4-1である。

表4-1. 対数期および定常期の細胞から調製した *C. lipolytica* ミトコンドリアでのクエン酸生成に及ぼす呼吸基質の効果。

Substrate	Citrate produced (nmoles/mg protein)			
	Log-phase mitochondria		Stationary-phase mitochondria	
	0-15 min	15-30 min	0-15 min	15-30 min
Pyruvate + Malate	245	109	141	123
Pyruvate + Bicarbonate	N.D.*	N.D.*	N.D.*	N.D.*
Pyruvate	N.D.*	N.D.*	2	-2
Malate	N.D.*	N.D.*	5	0

* Not detectable.

ミトコンドリア(約1.6mg蛋白質)と表示した基質を含む反応液(総量1.8ml)中で30℃, 30分間反応させた。反応液は0.25M(対数期ミトコンドリア)もしくは0.5Mショ糖(定常期ミトコンドリア), 0.1mM EDTA, 10mM リン酸カリウム緩衝液(pH 6.5), 10mM KCl, 1mg/ml アルブミンを含む。各基質の最終濃度は $KHCO_3$ 10mM を除きすべて5mMである。各15分間で総反応液中に生成したクエン酸を実験方法で述べたように定量した。

どちらのミトコンドリアもリンゴ酸の存在下でのみ，ピルビン酸を酸化し，クエン酸を生成した。　定常期ミトコンドリアによるクエン酸生成は，時間に対し直線的であったが，最初の15分間の生成量（141 nmoles/mg蛋白質）は対数期ミトコンドリアでの値（245 nmoles/mg蛋白質）より低かった。　基質としてピルビン酸単独，ピルビン酸＋$KHCO_3$，リンゴ酸単独の場合，クエン酸生成はほとんど認められなかった。　ピルビン酸と$KHCO_3$を含む反応液に pyrurate carboxylase（EC 6.4.1.1）の活性化剤であるATP[94]を添加しても効果がなかった（データは表示していない）。　表4-1の結果は，ピルビン酸もしくはリンゴ酸が単独に存在している時酸素消費が観察されないと云う実験結果と一致する。

次に定常期ミトコンドリアでの実際のクエン酸生成の時間経過を示す（図4-1, 2, 3）。　呼吸基質としてピルビン酸とリンゴ酸を使用した。　ADP不在の抑制呼吸（state 4）下では，30分間の反応中，ほぼ直線的にクエン酸が蓄積した（図4-1）。　反応開始後10分に3mMのADP添加によるstate 3の活発な呼吸状態下では，反応系内のクエン酸量は低下したが，これはクエン酸の酸化が活性化されたためである（後述）。　ADP 0.3mMの添加では，酸化的リン酸化反応によるADP消失の結果，再びstate 4の呼吸状態に戻るが，クエン酸蓄積速度もまた元に戻った。　このように，クエン酸生成はADPの有無により強く制御されている。

フルオロクエン酸は aconitate hydratase（EC 4.2.1.3）の阻害剤であることが知られている[107,108]。　クエン酸以降の代謝を止め，ピルビン酸とリンゴ酸からの代謝産物をすべてクエン酸として回収する目的で，フルオロクエン酸添

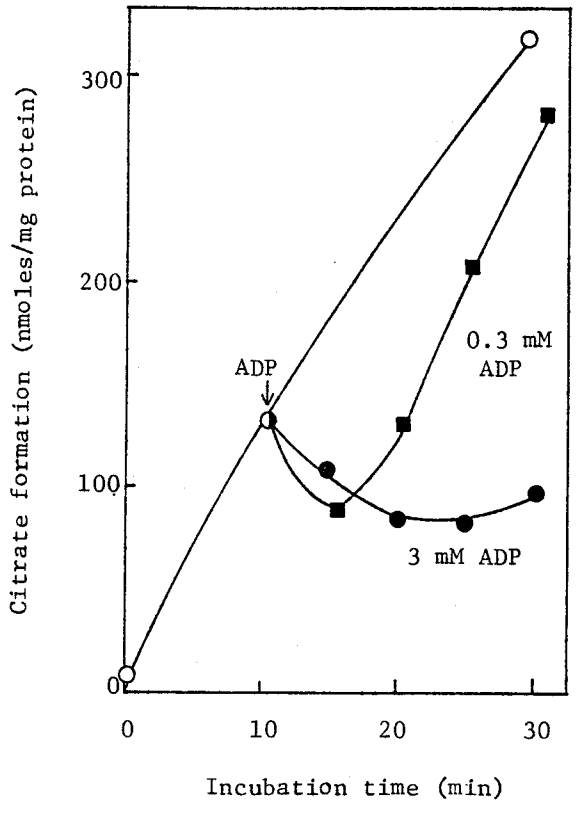


図4-1. 定常期ミトコンドリアによるクエン酸生成とそれに及ぼすADPの添加効果。

ミトコンドリアを最終1.09mg蛋白質/mlの濃度で5mMピルビン酸と5mMリンゴ酸を含む定常期ミトコンドリア用反応液（表4-1参照）に分散し，30℃30分間反応させた。反応開始後10分に，ミトコンドリア懸濁液の一部（3ml）を取り出し，最終濃度0.3mM（■）および3mM（●）のADP（0.33ml）と混合，さらに20分間反応を続けた。他の条件は実験方法で述べた通りである。

加効果について調べた（図4-2）。用いたフルオロクエン酸の濃度は0.2mMであるが，1/10の濃度でも同様の結果が得られている。

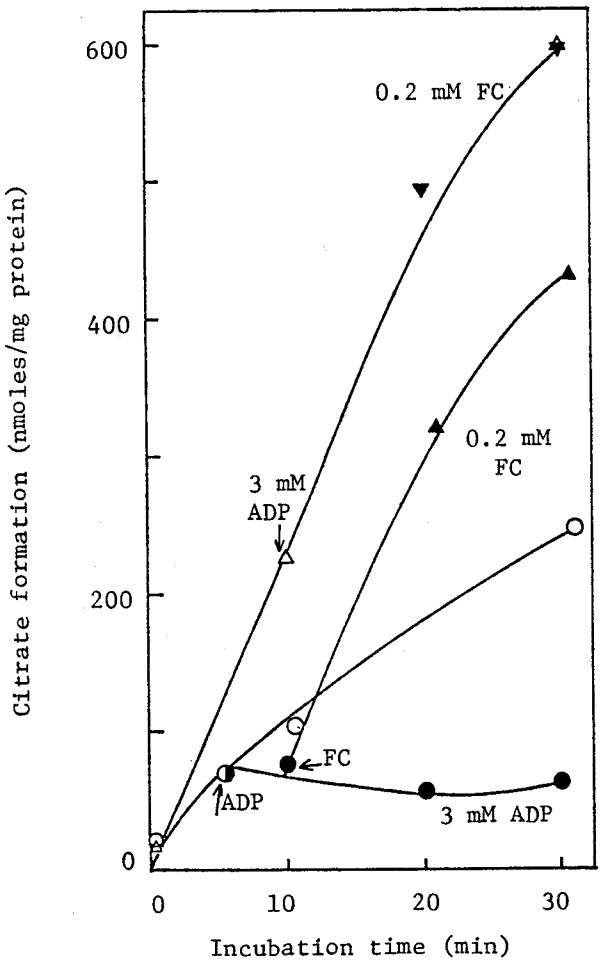


図4-2. 定常期ミトコンドリアでのクエン酸生成に及ぼすADPとフルオロクエン酸(FC)の効果。

ミトコンドリアを5mMピルビン酸と5mMリンゴ酸を含む反応液中、フルオロクエン酸(FC)の存在下(0.2mM; △)あるいは不在下(○)で30℃, 30分間反応させた。フルオロクエン酸存在下の場合, 反応開始後10分に, ミトコンドリア懸濁液(0.77mg蛋白質/ml) 1.6mlと0.11mlのADP溶液(最終濃度3mM)を混合し, さらに20分間反応を続けた(▼)。他方対照(○)のサンプルでは, 反応開始後5分にミトコンドリア懸濁液(0.87mg蛋白質/ml) 4.0mlと0.29mlのADP溶液(最終濃度3mM)を混合し, 反応を続けた(●)。さらに5分後, その一部(1.7ml)を取り出し, 0.09mlのFC溶液(最終濃度0.2mM)と混合させ, 反応を続行した(▲)。その他の条件は実験方法ならびに図4-1に従った。

反応開始時にフルオロクエン酸を添加した時，30分間の反応でクエン酸蓄積量は対照（無添加）の約2倍に増加した。　このことは state 4 での定常期ミトコンドリアのピルビン酸＋リンゴ酸酸化において，代謝産物の約50%がクエン酸であり，残りがクエン酸以後の有機酸であることを示している。

フルオロクエン酸の効果は，state 3（ADP存在下）においても同様に観察されている。　逆に，図4-1でみられたADPの効果はフルオロクエン酸存在下では認められなかった。　ミトコンドリア代謝に及ぼすフルオロクエン酸の優位性は，ADPがTCA回路で aconitate hydratase 反応以降の代謝に影響を与えることを示唆する。

ADP，フルオロクエン酸の効果をさらに詳細に研究するため，クエン酸のほかに他のTCA回路の有機酸ーイソクエン酸とα-ケトグルタール酸の生成をみたのが図4-3である。　State 4 の対照実験では，クエン酸とともにα-ケトグルタール酸が生成し，その速度はほぼ等しく，実験期間中一定であった（両代謝産物とも約 120 nmoles/10 min・mg蛋白質）。　しかしイソクエン酸の生成量はきわめて低かった。　クエン酸合成のフラックス（flux）を決定するためのフルオロクエン酸添加実験では，クエン酸生成は2倍あるいはそれ以上に増大するのに対し，α-ケトグルタール酸，イソクエン酸量は一定値を保った。　阻害剤の有無にかかわらず，3つの中間体の合計量はほぼ同じであった（それぞれ 220，200 nmoles/10 min・mg蛋白質）。　この結果より，定常期ミトコンドリアは主生成物としてクエン酸とα-ケトグルタール酸を，副生成物としてイソクエン酸を少量生産することがわかる。

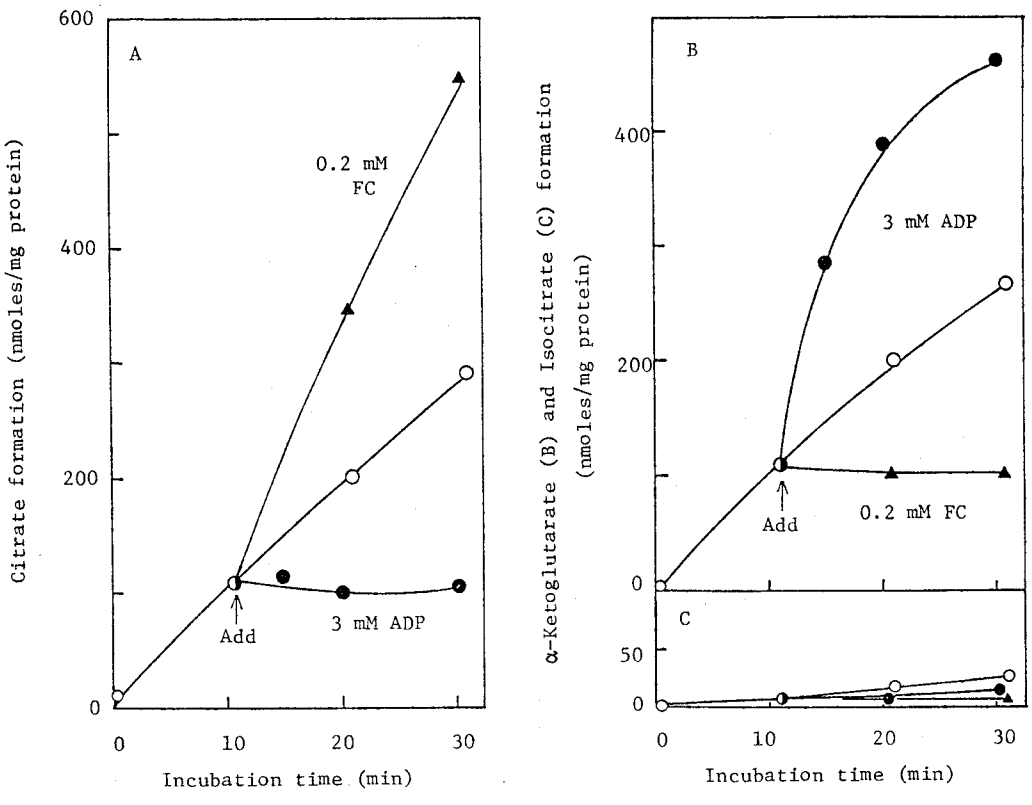


図4-3. 定常期ミトコンドリアによるクエン酸(A), α-ケトグルタール酸(B), イソクエン酸(C) の生成に及ぼすフルオロクエン酸(FC)とADPの効果。

ミトコンドリア(8.8mg蛋白質)を5mMピルビン酸と5mMリンゴ酸を含む総量9.5mlの反応液中 30℃で反応させた。 10分後, ミトコンドリア懸濁液の一部を最終濃度0.2mMのフルオロクエン酸(▲)もしくは最終濃度3mMのADP(●)と混合し, state4 の呼吸状態にある対照(○)とともに, さらに20分間反応を続けた。 他の条件は実験方法で示した通りである。

ADPの添加では, α-ケトグルタール酸生成の著しい増大とクエン酸量の減少が観察された。 α-ケトグルタール酸の加速された生成速度は時間とともに低下したが, これは酸化的リン酸化反応によるADP濃度の減少, 消失に由来すると考えられる。

次に，対数期ミトコンドリアを用いて同様の実験を行ない，定常期ミトコンドリアの結果と比較した。 図4-4はフルオロクエン酸の添加効果をみたものである。

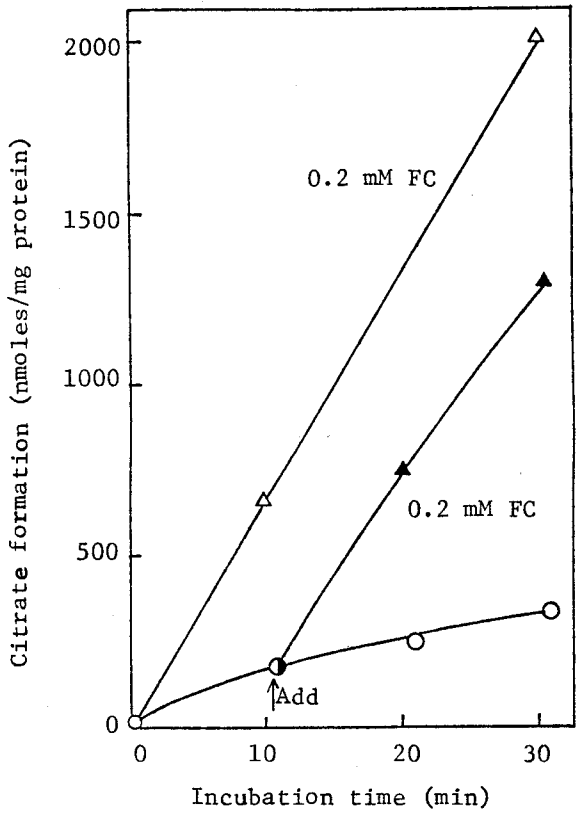


図4-4. 対数期ミトコンドリアによるクエン酸生成とそれに及ぼすフルオロクエン酸(FC)の影響。

ミトコンドリアをピルビン酸とリンゴ酸(それぞれ5mM)を含む対数期ミトコンドリア用反応液(表4-1参照)中で，フルオロクエン酸の存在下(0.2mM；△)または不在下(○)に，30℃，30分間反応させた。最終濃度は0.93mgミトコンドリア蛋白質/mlであった。また対照(○)のサンプルでは，反応開始後10分にミトコンドリア懸濁液の一部(1.7ml)を取り出し，最終濃度0.2mMのフルオロクエン酸溶液(0.09ml)と混合し，さらに反応を続けた(▲)。他の条件は実験方法で示した通りである。

反応開始時に添加した場合，クエン酸生産速度は30分間一定であり，生成量は無添加の対照に比し約7倍の増加を示した。なお対照のstate4呼吸下におけるクエン酸生成量は定常期ミトコンドリアのそれよりも高かった。またフルオロクエン酸存在下でのクエン酸生成のフラックスは約2000 n moles/30 min・mg蛋白質で，定常期の約600 n moles/30 min・mg蛋白質の3倍強であった（図4-2参照）。この図から，対数期ミトコンドリアにおけるstate4でのピルビン酸＋リンゴ酸酸化の代謝産物は，15～20%がクエン酸であり，残りがクエン酸以降の（TCA回路）中間体であることがわかる。

図4-5はADP，フルオロクエン酸の添加効果をクエン酸，イソクエン酸，α－ケトグルタール酸の生産について調べたものである。対照（state 4呼吸下）では，α－ケトグルタール酸はクエン酸量の約2倍生成した。反応開始後10分から20分の10分間において，上記3つの中間体の総生成量は370 n moles/mg蛋白質であり，これはフルオロクエン酸存在下でのクエン酸生成量（640 n moles/mg蛋白質）の58%に相当した。またフルオロクエン酸添加により，α－ケトグルタール酸量の低下が見られ，その酸化が示唆された。この事実から，対数期ミトコンドリアではTCA回路におけるα－ケトグルタール酸以降の分解系フラックスも活発であり，定常期ミトコンドリアと大いに異なっていることがわかる。

ADP添加によるstate3呼吸では，定常期ミトコンドリア同様，クエン酸量の低下とα－ケトグルタール酸量の増加が観察された。しかし，酸化的リン酸化によるstate4への再移行に伴ない，クエン酸は再び上昇するが，

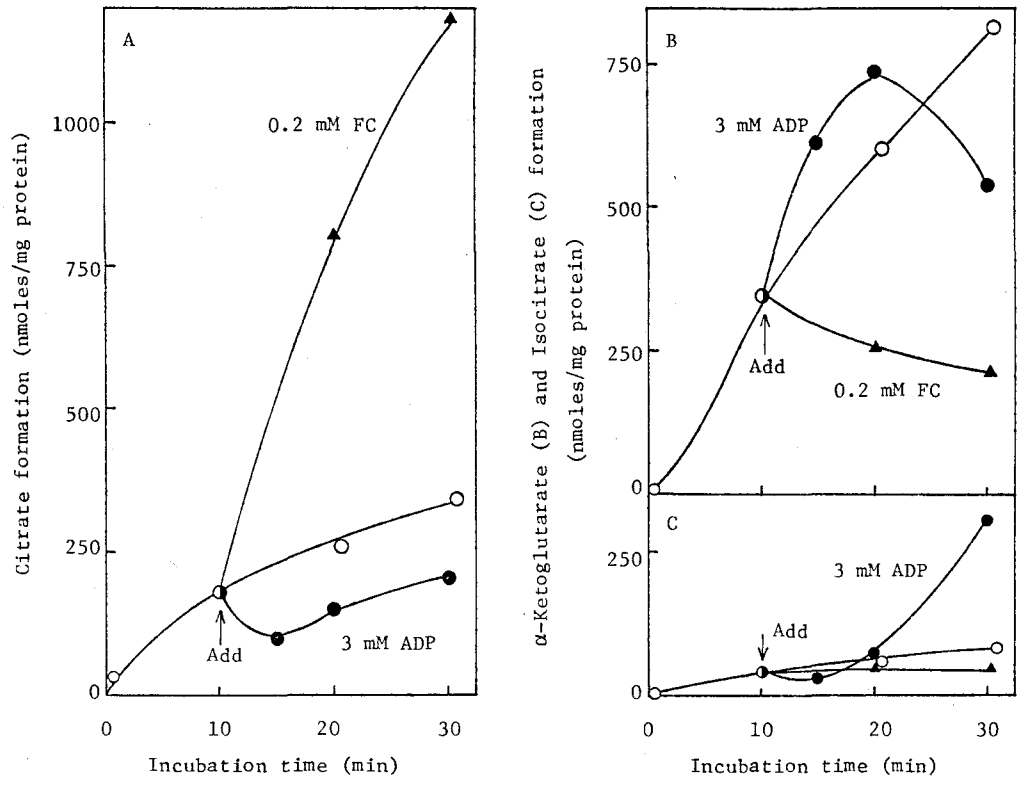


図4-5. 対数期ミトコンドリアによるクエン酸(A), α-ケトグルタール酸(B), イソクエン酸(C)の生成に及ぼすフルオロクエン酸(FC)とADPの効果。

実験方法の詳細は図4-3の説明に準じた。ただしミトコンドリアの反応液中の最終濃度は1.09 mg蛋白質/mlであった。

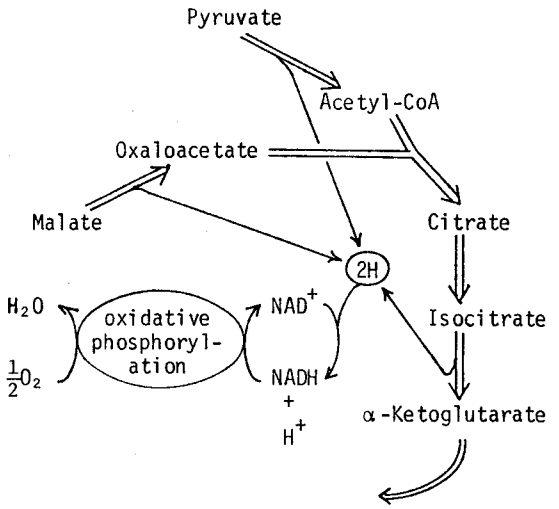
α-ケトグルタール酸量は著しく低下し, イソクエン酸量の増大がみられた。この増大はミトコンドリア内で生成したATPによるisocitrate dehydrogenaseの活性阻害によるものかもしれない。

定常期と対数期ミトコンドリア間の，state 4 でのピルビン酸とリンゴ酸代謝の差異を定量的に研究した（表4-2）。　この実験で，10分間反応でのピルビン酸，リンゴ酸の消費，クエン酸，イソクエン酸，α-ケトグルタール酸の各生産量を測定した。

定常期ミトコンドリアでは，3つの有機酸生成量は 321 nmoles/mg蛋白質 で消費ピルビン酸（358 nmoles/mg蛋白質）に対する収率は90%に達した。　基質酸化に伴なう NADH の生成は，1分子のクエン酸あるいはイソクエン酸の生成では2分子に，α-ケトグルタール酸生成では3分子になる。NADH 1分子は呼吸系により酸化され，½ O2 に電子伝達される。　そこで理論的に生成する NADH の対酸素原子収率を求めたところ 78% になった。

他方，対数期ミトコンドリアの場合，消費ピルビン酸に対する，3つの生成した有機酸のモル収率は 58% であり，NADH の対酸素原子収率も 58% の値を示した。　これらの事実はα-ケトグルタール酸酸化が，対数期においては活発であるが，定常期ではきわめて制限されていることを意味し，図4-3,5 の結果と一致した。　以上の結果は，第2章で得られた，定常期ミトコンドリアのα-ケトグルタール酸酸化速度が対数期での値に比較してかなり低下していたという結果とも一致する。

表4-2. 定常期および対数期ミトコンドリアによるピルビン酸，リンゴ酸の消費とTCA回路中間体の生成。



	Stationary-phase mitochondria (nmoles/mg protein·10 min)		Log-phase mitochondria (nmoles/mg protein·10 min)	
[I] Consumption				
(1) Pyruvate	358		1020	
(2) Malate	641		753	
(3) Oxygen	1030*		2440*	
[II] Formation		NADH		NADH
Citrate	132	264	207	414
Isocitrate	24	48	136	272
α-Ketoglutarate	165	495	247	741
(4) total	321		590	
(5) total (NADH)		807		1427
[III] Yield	(%)	(%)	(%)	(%)
(4)/(1)	90		58	
(4)/(2)	50		78	
(5)/(3)		78		58

* natoms/mg protein·10 min

反応は5mMピルビン酸と5mMリンゴ酸の存在下に30℃，10分間行なった。対数期および定常期細胞から調製したミトコンドリアを，最終蛋白質濃度がそれぞれ0.9 mg/ml，0.98 mg/mlになるように添加した。他の条件は実験方法に記述した通りである。総反応液中に生成した3つの中間体を測定し，ピルビン酸とリンゴ酸の消費に対する，生成物合計のモル収率(Yield)をパーセントで示した。NADHの生成量は，クエン酸，イソクエン酸の1分子の生成に伴ない，2分子のNADHが，α-ケトグルタール酸生成では3分子のNADHが内生することに基づき，それぞれの中間体の生成量から計算した。

2. 定常期ミトコンドリアの代謝に及ぼすアデニンヌクレオチドの効果

ADP添加による state 3 呼吸下での物質代謝についてさらに詳細に研究した。 図4-6に活性化された呼吸状態(state 3)での定常期ミトコンドリアのピルビン酸とリンゴ酸代謝に及ぼすADP濃度の効果を示す。

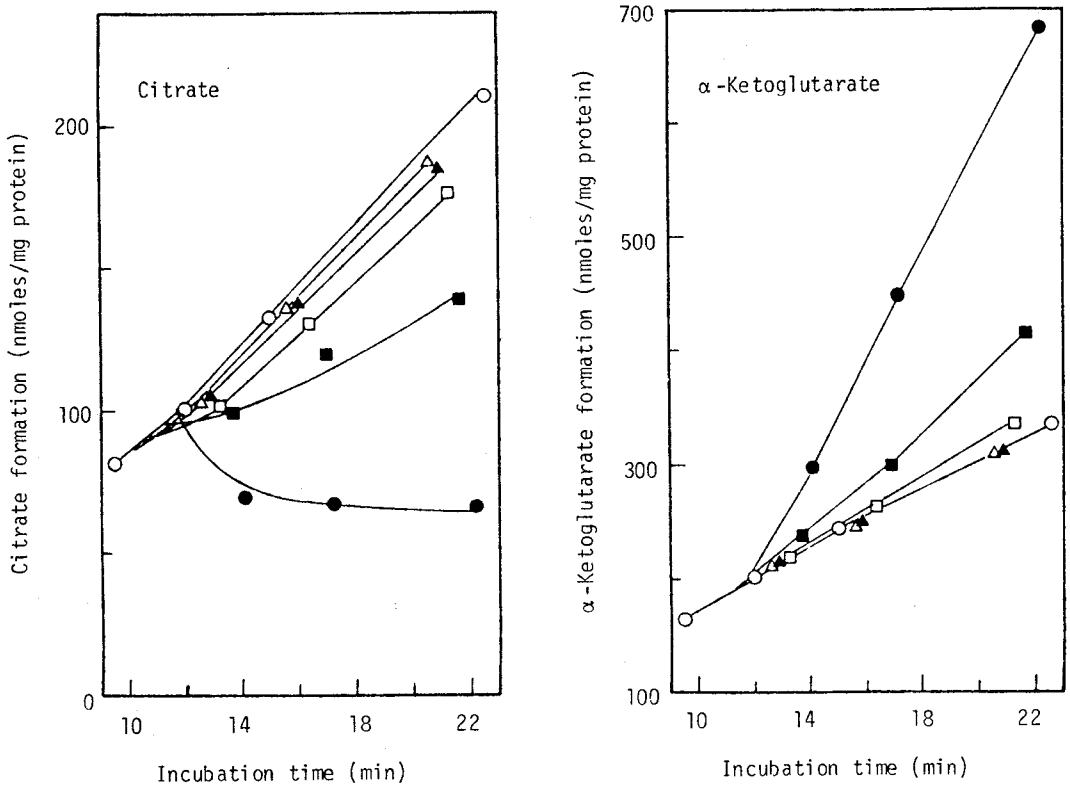


図4-6. 定常期ミトコンドリアでのクエン酸とα-ケトグルタール酸生成に及ぼす state 3 呼吸下での ADP 濃度の影響。

ミトコンドリア(12.3 mg蛋白質)を 5 mM ピルビン酸と 5 mM リンゴ酸の存在下, 総量 13.9 ml の反応液に分散後, 30°C で反応させた。 5分後 hexokinase とグルコースを最終濃度がそれぞれ 40 units/ml, 10 mM になるように添加した。 反応開始後 10分に懸濁液の一部(2.2 ml)を 20秒間隔で取り出し, 種々濃度の ADP 溶液(0.12 ml)と, 低濃度のものから順に, 混合した。 さらに 30°C で 10分間反応を続け, クエン酸とα-ケトグルタール酸の生成経過を追跡した。 ADP 濃度は次の通りである: ○, 0 μM; △, 1 μM; ▲, 3 μM; □, 10 μM; ■, 30 μM; ●, 100 μM。

酸化的リン酸化反応によるADP濃度の減少を妨げるためhexokinaseとグルコースを反応液に添加した。ADP添加後，主生成物であるクエン酸とα-ケトグルタール酸の生成を追跡した。ADP濃度の増大に伴ない，クエン酸生成速度は低下し，逆にα-ケトグルタール酸の生産は著るしく増大した。0.1mMのADP添加により，α-ケトグルタール酸生成速度は無添加の対照(state 4)に比し，約4倍上昇するとともに両生成物の生産速度も2倍になった。

非共役(uncoupling)の酸化状態下におけるピルビン酸とリンゴ酸の代謝を種々濃度の2,4-ジニトロフェノールを用いて研究した(表4-3)。

表4-3. 定常期ミトコンドリアでのクエン酸とα-ケトグルタール酸生成に及ぼす2,4-ジニトロフェノールの効果。

2,4-Dinitrophenol (μM)	Citrate increased for 10 min (nmoles/mg protein)	(%)*	α-Ketoglutarate increased for 10 min (nmoles/mg protein)	(%)*	Sum for 10 min (nmoles/mg protein)	(%)*
0	83	100	98	100	181	100
4	90	108	103	105	193	107
20	104	125	118	120	222	123
100	107	129	173	176	280	155

* Relative value to the control without the inhibitor.

5mMピルビン酸と5mMリンゴ酸を含む反応液中で，ミトコンドリアを初発濃度1.31mg蛋白質/mlになるよう分散した。図4-6の説明で述べたように，30°Cで反応を開始し，10分後に懸濁液の一部(1.7ml)を，種々濃度の2,4ジニトロフェノール溶液(0.09ml)と混合，さらに10分間反応を続けた。10分間の反応中に増加したクエン酸とα-ケトグルタール酸量を測定した。阻害剤を含まない対照との比較を行ないパーセントで表示した。

2,4-ジニトロフェノールの添加により，クエン酸とα-ケトグルタール酸の生産速度はともに同程度増加した。State 4の抑制呼吸を解放するのに充分な100 μMの濃度（第1章参照）において，10分間の両中間体生成量は無添加に比較し，55%高い値を示した。図4-6と表4-3の結果は，state 3でのα-ケトグルタール酸生成の促進現象が呼吸速度の増大によるものではなく，添加ADPやその代謝物の作用に由来していることを示している。

表4-4はクエン酸とα-ケトグルタール酸の生成に及ぼすATPの添加効果を調べたものである。

表4-4. 定常期ミトコンドリアでのクエン酸とα-ケトグルタール酸生成に及ぼすATPの効果。

ATP (mM)	Citrate formed for 10 min (nmoles/mg protein)	(%)*	α-Ketoglutarate formed for 10 min (nmoles/mg protein)	(%)*	Sum for 10 min (nmoles/mg protein)	(%)*
0	71	100	105	100	176	100
0.3	104	146	50	48	154	88
1.0	98	138	60	57	158	90
3.0	25	35	128	122	153	87

* Relative value to the control without ATP.

初発濃度1.27 mg蛋白質/mlのミトコンドリア懸濁液を10分間反応させた後，その一部(1.4ml)を各種濃度のATP溶液(0.18ml)と混合した。反応に関する他の条件や結果の表示は表4-3の説明で述べた通りである。

1.0 mM 以下の ATP 濃度で，クエン酸の生成は約 40 % 上昇したが，α-ケトグルタール酸生成は無添加の約 50 % にまで減少した。主生成物であるクエン酸と α-ケトグルタール酸の総量は，ATP の有無にかかわらずほぼ同じであり，citrate (si)-synthase を通る代謝のフラックスは影響を受けなかった。この事実は，ADP 添加実験の結果（図 4-6）と対照的である。

次に，クエン酸と α-ケトグルタール酸間の代謝の流れ（flow）に及ぼす種々の AMP 濃度の効果を調べた（表 4-5）。

表 4-5. 定常期ミトコンドリアによるクエン酸と α-ケトグルタール酸生成に及ぼす AMP と ATP の効果。

Addition	Citrate formed for 10 min		α-Ketoglutarate formed for 10 min		Sum for 10 min	
	(nmoles/mg protein)	(%)*	(nmoles/mg protein)	(%)*	(nmoles/mg protein)	(%)*
None	129	100	128	100	257	100
0.3 mM ATP	163	126	58	45	221	86
1 μM AMP	121	94	140	109	261	102
3 μM AMP	89	69	166	130	255	99
10 μM AMP	9	7	226	177	235	91
10 μM AMP + 0.3 mM ATP	142	110	68	53	210	82
30 μM AMP	-56**		285	223	229	89
30 μM AMP + 0.3 mM ATP	108	84	87	68	195	76
100 μM AMP	-121**		323	252	202	79

* Relative value to the control without addition.

** Minus sign shows decrease in amount of citrate.

ミトコンドリアを初発濃度 0.92 mg 蛋白質/ml で反応させた。反応開始後 10 分に懸濁液の一部 (1.6 ml) を取り出し，ATP の共存もしくは不在下で，種々濃度の AMP 溶液 (0.2 ml) と混合した。他の反応条件ならびに結果の表示は表 4-3 の説明で述べた通りである。

AMPは両生成物の総量に影響を与えることなく，α-ケトグルタール酸の生産を促進し，しかもADPの場合よりもさらに低濃度で有効であった。 100μM AMPの添加により，クエン酸量は添加前の値（165 nmoles/mg蛋白質）の25%に低下した。 AMP添加反応において，ミトコンドリア分散液中でのADPとATP濃度はAMPに比し，きわめて低い値を維持していた。 また低濃度のAMP（10～30μM）でみられた，α-ケトグルタール酸生産の促進も，高濃度のATP（0.3mM）が共存すると，顕著に抑制された。

3. ミトコンドリア抽出液中の *isocitrate dehydrogenase* 活性に対するアデニンヌクレオチドの効果

定常期ミトコンドリアからの抽出液中の NAD^+ および $NADP^+$ 依存性 *isocitrate dehydrogenase* 活性のアデニンヌクレオチド類に対する挙動について調べた（図4-7, 8）。

図4-7はATP無添加あるいは共存下で，種々基質（イソクエン酸）濃度での NAD^+-*isocitrate dehydrogenase* の反応速度に及ぼすAMP(左)とADP(右)の効果をみたものである。AMP（0.1～0.5 mM）存在下でのプロットはシグモイドの飽和曲線を示した（図4-7(左)）。 0.5mM AMPが存在する時，0.8 mMのイソクエン酸濃度において，最大の酵素活性が観察された。 しかしながら，0.8mM以下の基質濃度では，AMPあるいはADPがないとまったく反応が進まなかった。V_{max} を0.9 μmoles NADH/min・mg蛋白質と仮定すると，最大反応速度の1/2を与える基質濃度である［isocitrate］0.5値はAMP濃度が0.5mM, 0.1mMの時，それぞれ0.23mM, 0.51mMとなった。 AMPはこのように V_{max} に影響を与えることなく，イソクエン酸に対するみかけの K_m を減少

させた。 0.3 mM ATP の添加により，0.1mM AMP 存在時の $[isocitrate]_{0.5}$ 値は 0.51mM から 0.72mM に増加し，ATP が AMP による活性化を部分的に阻害することが示された。

イソクエン酸に関する反応次数は Hill プロットの傾きから決定した。 低濃度の AMP では，反応次数は ATP の存在にかかわらず約 3.8 であったが，0.5mM AMP において，この次数は 2.6 に低下した。

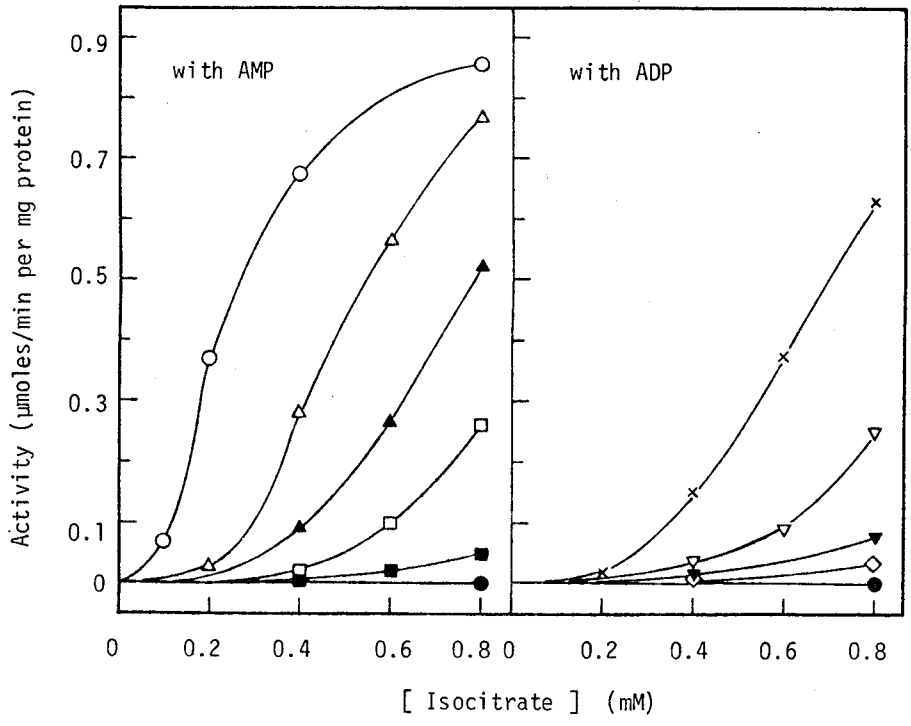


図4-7. ミトコンドリア抽出液中の NAD^+-*Isocitrate dehydrogenase* 活性とイソクエン酸濃度との関係に及ぼす，ATPの存在または不在下での種々濃度の AMP と ADP の効果。

酵素活性測定法は実験方法で述べた。 添加したアデニンヌクレオチド濃度は下に示した通りである。

- —○— 0.5 mM AMP
- —△— 0.1 mM AMP
- —▲— 0.1 mM AMP + 0.3 mM ATP
- —□— 0.03mM AMP
- —■— 0.03mM AMP + 0.3 mM ATP
- —×— 0.5 mM ADP
- —▽— 0.1 mM ADP
- —▼— 0.1 mM ADP + 0.3 mM ATP
- —◇— 0.03mM ADP
- —●— No Addition

ADP は基質濃度と反応速度に関して同様な図を与えたが，[isocitrate]$_{0.5}$ 値は同濃度の AMP で得られた値より，高かった（図 4-7 (右)）． ATP はまた ADP による活性化効果を部分的に阻害した。

図 4-8 は抽出液中の $NADP^+$- *isocitrate dehydrogenase* 活性に対するイソクエン酸濃度の効果をみたものである。この酵素の反応速度は明らかに古典的な Michaelis-Menten の式に従う。 イソクエン酸に対する V_{max} と K_m はそれぞれ 0.4 μmoles NADPH/min·mg 蛋白質，80μM である。 AMP, ADP, ATP のアデニンヌクレオチド類は NAD^+-*isocitrate dehydrogenase* と異なり，この酵素の活性に何ら効果を示さなかった。

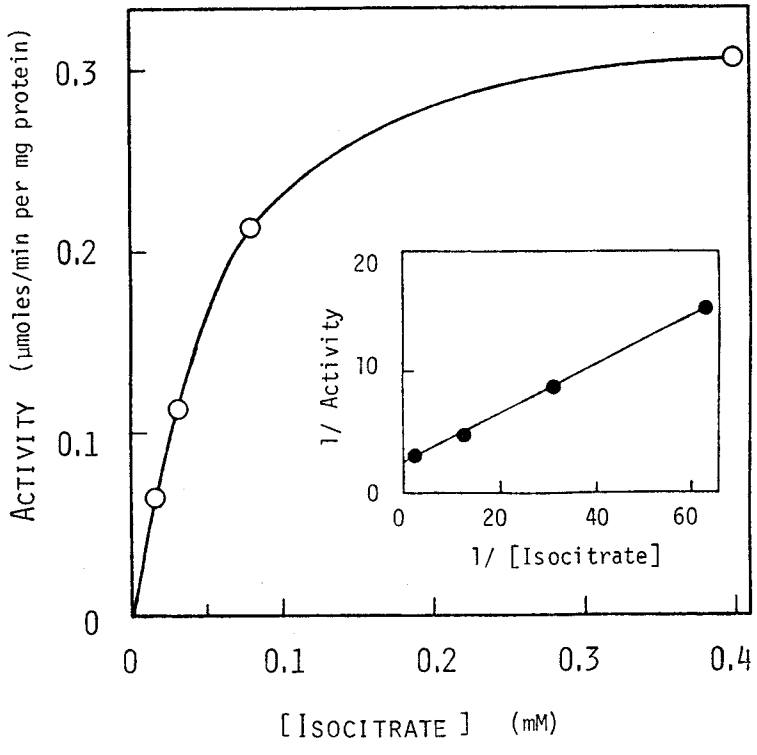


図 4-8. ミトコンドリア抽出液中の $NADP^+$- *isocitrate dehydrogenase* 活性とイソクエン酸濃度との関係。

酵素活性の測定は実験方法で述べた通りである． 挿入図は同結果の二重逆数プロットである。

4. アデニンヌクレオチド類の細胞内含有量

両増殖相の細胞内アデニンヌクレオチド類の含有量を測定した（表4-6）。対数期細胞中のヌクレオチドの総量は約4.1 mMと高いが，培養経過にともないその値は顕著に低下した。窒素制限によりもたらされたクエン酸生産期である定常期細胞のアデニンヌクレオチド総量は0.74mMであり，対数期の値の18%に相当した。

ATPとADP含量の減少の程度（それぞれ78%と81%の減少）に比較して，AMP含量の低下はもっとも著しく，90%に達した。その結果 (ATP + ½ ADP)/(ATP + ADP + AMP) として定義されるアデニル酸エネルギーチャージの値[109]は，0.63から0.75に上昇した。

表4-6. 対数期および定常期でのアデニンヌクレオチドの細胞内含有量。

	Log phase	Stationary phase
	(mM)	(mM)
Total adenylate	4.13	0.74
ATP	2.27	0.49
ADP	0.68	0.13
AMP	1.18	0.12
Energy charge	0.63	0.75

細胞抽出液の調製，アデニンヌクレオチドの分析，細胞内のヌクレオチド含有量の決定は実験方法で記述した通りである。アデニル酸エネルギーチャージは次式より計算した[109]：

the energy charge = (ATP + 1/2 ADP)/(ATP + ADP + AMP) 。

第4節　考　察

ミトコンドリアによるクエン酸生成において citrate (si)-synthase の基質であるオキザロ酢酸とアセチル－CoA の供給経路は，その起源により種々異なっている。ラット肝臓[93]，脳[94]，脂肪組織[95]そしてアオバエ筋肉[96,97]ミトコンドリアは，ピルビン酸と $KHCO_3$ からクエン酸を生成することができ，他方ウシ副腎ミトコンドリア[98]はリンゴ酸単独からクエン酸を生産しうる。Pyruvate carboxylase 活性の低いラット心臓[89-91]，肺[92]ミトコンドリアでは，オキザロ酢酸の外的供給源（リンゴ酸など）を加えると，活発なクエン酸生成が観察される。

これに反し，C. lipolytica ミトコンドリアでのクエン酸生成では，ピルビン酸とリンゴ酸の存在を必須とした（表4-1）。リンゴ酸はミトコンドリア内でのオキザロ酢酸供給源になるとともに，クエン酸，α－ケトグルタール酸のミトコンドリアからの流出に対するカウンターイオン[110]としても生理的に重要な役割を演じているものと思われる。リンゴ酸存在下でのピルビン酸代謝に関して，対数期と定常期ミトコンドリア間にふたつの有意な差異がみられた（図4-3,5と表4-2）。第1に，定常期ミトコンドリアによるピルビン酸の消費が対数期ミトコンドリアでの値の35%に低下したことと，第2に，定常期ではTCA回路での α-ketoglutarate dehydrogenase 複合体を通る代謝のフラックスが非常に減少していたことである。後者は定常期細胞での in vivo のクエン酸蓄積にかなり貢献していると思われる。しかし，対数期ミトコンドリアのα－ケトグルタール酸酸化は活発であった（表4-2）。

定常期ミトコンドリアのピルビン酸代謝に及ぼすアデニンヌクレオチドの添加実験は，代謝制御機構において，ミトコンドリア内 isocitrate dehydrogenase (NAD^+) 活性のヌクレオチドによる調節が重要な要因であることを示唆した。

ウシ[111]，ブタ心臓[112]の NAD^+- isocitrate dehydrogenase の活性は ADP 依存性を示すのに対し，Saccharomyces cerevisiae[113-115]，Neurospora crassa[116]，Aspergillus niger[117] といった微生物起源の同酵素は，ADP ではなく AMP により活性化される。またエンドウ由来の酵素[118]は AMP，ADP により影響を受けないと云われる。これらに比し，C. lipolytica ミトコンドリアの NAD^+- isocitrate dehydrogenase は比較的低濃度のイソクエン酸（0.8mM以下）では，その活性化に AMP あるいは ADP を絶対的に必要とした。ATP は逆に ADP，AMP による活性化を阻害する働きを示した。この実験で用いたイソクエン酸濃度は，他のミトコンドリア内での濃度が約 0.3mM であるという報告[111]から判断して生理学的な条件であると思われる。

他の酵母の酵素[119]と同様，NAD^+- isocitrate dehydrogenase の AMP や ADP によるアロステリックな活性化は，イソクエン酸に関する反応次数が4に近い値を示すという事実により特徴づけられている。低濃度のイソクエン酸において，AMP による活性化が ADP より優れていることから，マトリックス内の AMP 濃度が NAD^+- isocitrate dehydrogenase の活性化，さらにはミトコンドリアでのピルビン酸代謝に重要な影響を与えているに違いない。

他方，$NADP^+$- isocitrate dehydrogenase は修飾因子（この場合アデニンヌクレオチド）による制御を受けなかった。この酵素は NAD^+ 依存性酵素の活性化に好ましくない状態，例えば正のエフェクター濃度が極端に低いとか，イソクエン酸

濃度が低い，とか NAD^+ に比し $NADP^+$ 濃度が高いような場合にのみ，TCA 回路で重要な働きをしているものと思われる。

ADP による state 4 から state 3 への移行は次の2つの変化を伴なうであろう。第1に，ミトコンドリア内部での ADP 濃度の上昇による NAD^+-isocitrate dehydrogenase の活性化であり，第2に，ミトコンドリア内の $NADH/NAD^+$ 比を低下させるであろう電子伝達の活性化[89]と，それに伴なう脱水素反応の活性化である。アンカップラーを用いた実験で明らかなように（表 4-3），電子伝達の活性化はクエン酸とα-ケトグルタール酸の生成をともに上昇させた。それゆえ，state 3 でみられるα-ケトグルタール酸生成の促進は，添加 ADP とおそらくその分解産物の AMP[90] による NAD^+-isocitrate dehydrogenase の活性化に帰すことができる。表 4-5 と図 4-7 の結果は，クエン酸からα-ケトグルタール酸への酸化において，AMP が ADP よりかなり有効な促進作用を有することを示している。またこの結果は AMP が容易に酵母ミトコンドリア内へ輸送されうることを示唆している。

図 4-7, 8 でみられたように，AMP 存在下での NAD^+-isocitrate dehydrogenase の活性化が 10 倍濃度の ATP により部分的に阻害されること，また $NADP^+$ 依存性酵素がアデニンヌクレオチド類による影響を受けないことを考慮すれば，0.3 mM ATP が state 4 でのα-ケトグルタール酸生成を約 50% 阻害したという事実から次のような考察が可能であろう：state 4 では，ミトコンドリアにあらかじめ存在していた AMP と ADP（その濃度は心臓[90]，肝臓[120,121] ミトコンドリアで観察されるように，低いと思われる）により NAD^+-isocitrate dehydrogenase が活性化され，結果的にクエン酸

のα-ケトグルタール酸への酸化が触媒されている。

以上の結果を総合して，このミトコンドリアによるリンゴ酸存在下でのピルビン酸代謝が NAD⁺- isocitrate dehydrogenase活性により敏感に調節され，主要なエフェクターがアデニンヌクレオチド類のうち特にAMPであると結論される。この種の調節機構はアオバエ飛翔(flight)筋肉ミトコンドリアにおいてもみられる[96]。ただしこの場合の中心的なエフェクターはAMPではなくATP/ADP比である。

哺乳動物ミトコンドリアでの広範な研究[89-91, 94, 96]はTCA回路がNADH/NAD⁺比やATP/ADP比あるいは両者により制御されていることを示している。これは哺乳動物の調節酵素，例えばpyruvate dehydrogenase複合体[122]やisocitrate dehydrogenase (NAD⁺)のエフェクターがAMPではなくADPやATPであるという事実と合致としている。

しかしながら微生物では[114, 116]，NAD⁺- isocitrate dehydrogenaseの活性化剤であるAMPがATP/ADP比よりもTCA回路における，より重要なエフェクターであることが推測されていた。本研究で始めて明らかにしたように，C. lipolytica ミトコンドリアでの代謝制御がその典型的な例であると云える。

Barnesら[123]はS. cerevisiaeのNAD⁺- isocitrate dehydrogenaseとアデニル酸エネルギーチャージとの対応について，エネルギーチャージが0.7以上の範囲でわずかに上昇するなら，酵素活性は急速に低下することを報告している。In situでのミトコンドリア内のアデニンヌクレオチド類の含有量を正確に評価する方法は，今のところ開発されていない。そこで細胞内含有量を決定した(表4-6)。定常期細胞中の総アデニル酸量は対数期細胞の約20%程度であったが，

これは培養経過中の窒素制限に由来するのかもしれない。しかし，定常期細胞での窒素代謝と，アデニル酸を中心とした核酸代謝との対応については今後の問題である。

ATP生成の場であるミトコンドリアの役割を考えると，実際のマトリックス内では，測定された値よりもADPとAMP（酸化的リン酸化の基質として）のより低いレベル，ATPのより高いレベルが期待される．

定常期細胞において，表4-6に示されたようなAMPの極端な減少，ATP(負のエフェクター)/AMP(正のエフェクター)比の上昇そしてアデニル酸エネルギーチャージの増大[123]は in situ のミトコンドリア内での NAD^+- isocitrate dehydrogenase 活性に対し，抑制的な状態をもたらすであろう。

AMP含量の低下は，α-ketoglutarate dehydrogenase 複合体を通る代謝のフラックスの低下とともに，定常期細胞におけるクエン酸の蓄積に対して，重要な要因であると考えられる。

第5節　要　約

1．2種の異なる増殖相の *Candida lipolytica* MT4 細胞から調製したミトコンドリアを用いて，基質であるピルビン酸の代謝とクエン酸生成を調べた。この酵母ミトコンドリアによるクエン酸合成には，オキザロ酢酸の外的供給源としてリンゴ酸を必要とした。State 4（ADP無添加）の呼吸下で，定常期（クエン酸生成期）ミトコンドリアはピルビン酸の消費モル数に対し，90％の収率でクエン酸，α-ケトグルタール酸と少量のイソクエン酸を生成した。これに対し，対数期ミトコンドリアでは，その収率は58％であり，α-ケトグルタール酸以後の代謝が活発であることが明らかになった。

2．定常期ミトコンドリアによるクエン酸，α-ケトグルタール酸生成に及ぼすアデニンヌクレオチドの添加効果について検討し，次の結果を得た。

a）0.1mM ADPを添加した時（state 3），クエン酸量の低下と，それに伴なうα-ケトグルタール酸生成速度の4倍の増加がみられた。

b）アンカップラーである2,4-ジニトロフェノール（0.1mM）は呼吸増大をもたらすが，クエン酸とα-ケトグルタール酸生産をともに増加させた。

C）AMPはADPと同様，クエン酸からα-ケトグルタール酸への酸化を促進したが，その効果はADPの場合より，かなり低濃度で有効であった。

d）0.3mM ATPの添加により，α-ケトグルタール酸生成の抑制とともにクエン酸生産の約50％の増大が認められ，AMPやADPとは逆の効果を示した。

3. 上記の結果を説明するため，定常期ミトコンドリアの抽出液中の isocitrate dehydrogenase 活性を測定した。Isocitrate dehydrogenase (NAD^+) (EC 1.1.1.41) は調節酵素であり，AMPやADPによるアロステリックな活性化を受けたが，その活性化はATPにより阻害された。$NADP^+$-isocitrate dehydrogenase (EC 1.1.1.42)はアデニンヌクレオチド類による調節を受けなかった。

4. 培養時における細胞内のアデニンヌクレオチド含量を測定した。対数期に比し，定常期細胞ではATP, ADP, AMP含量はいずれも低く，総アデニル酸量は20%程度に減少した。とりわけAMP量の低下は著しく，対数期細胞での含有量の約10%に過ぎなかった。

5. 以上の事実を総合した結果，C. lipolytica による定常期でのクエン酸生産が，1) TCA回路上でα-ケトグルタール酸以降の代謝フラックスがかなり低下していること，2) アロステリック酵素であるミトコンドリアの NAD^+-isocitrate dehydrogenase 活性が，細胞内のアデニンヌクレオチド濃度とりわけ活性化剤であるAMP濃度の激減により，きびしく抑制されていることが原因で起こるものと考えられる。

総括および結論

Candida lipolytica はグルコース，n-パラフィンからクエン酸を著量生産することから，工業的利用価値も高く，多くの研究者により醗酵生理学的かつ培養工学的な面から研究が続けられてきた。醗酵機構に関する研究も数多く報告されているが，いずれもが代謝系に関与する細胞内酵素の活性調節，量的増減という面からのみ論じられており，いまだに解明されたとは云えないのが現状である。

著者は *C. lipolytica* MT4 によるグルコースからのクエン酸生産を，クエン酸生成の場と考えられる細胞内小器官ミトコンドリアでの代謝機構の面から解明すべく研究を進めてきた。クエン酸蓄積が対数増殖期でなく，窒素源の消失にともなう定常期に起こることから，両増殖相の細胞内，とくにミトコンドリアにおける代謝転換が予期され，その検討が試みられた。

両増殖相の細胞からミトコンドリアを単離して，呼吸特性を比較するとともに，ミトコンドリアでのクエン酸生成を含めた代謝特性を明らかにし，細胞のクエン酸蓄積の要因について考察を行なったのが本論文である。ここで得られた結果は次のように総括結論される。

第1章では，対数期の *C. lipolytica* 細胞から，ミトコンドリアの調製法を検討し，新たな酵素法による良質のミトコンドリアの単離が可能となった。対数期ミトコンドリアの無傷性は電子顕微鏡観察とTCA回路中間体を基質とした時の高い呼吸速度，高い呼吸調節率（ピルビン酸＋リンゴ酸酸化で 3.5～4.9）により確かめられた。P/O 比の測定と各種の電子伝達系阻害剤の添加実験から，対数期ミト

コンドリアは動物のミトコンドリアと同様，3つのリン酸化部位を有することが明らかになった。　この点，リン酸化部位Ⅰを欠くといわれる Saccharomyces 酵母や特定の培養条件において部位Ⅰのリン酸化がみられる C. utilis の場合と大いに異なる。　外部から加えたNADHの酸化は，NAD-連結基質の酸化とは異なり，P/O比が2で，かつロテノン（リン酸化部位Ⅰでの阻害剤）阻害を受けないことより，他の酵母ミトコンドリア同様，ミトコンドリア内膜の外側に局在したロテノン非感受性の NADH dehydrogenase (EC 1.6.99.3) により酸化されるものと思われる。

第2章では，クエン酸生産期の定常期細胞に適用できるミトコンドリア調製法を確立した。　第1,2章で用いたスフェロプラスト形成法，ミトコンドリア調製法は種々の酵母の生理学的な研究に利用できるものと期待される。　また，得られたミトコンドリアの呼吸特性を調べ，対数期の場合と比較した。　定常期ミトコンドリアは，対数期のものと同様，構造的にも機能的にも無傷であり，3つのリン酸化部位を有し，電子伝達系に差異はみられなかった。

対数期と定常期ミトコンドリアの呼吸特性におけるもっとも顕著な相違は，TCA回路の各種中間体の state 3 での酸化速度にみられた。　外部の NADH 酸化速度にはほとんど差がなかったが，呼吸基質としてクエン酸やα-ケトグルタール酸を使用したとき，定常期ミトコンドリアの酸化速度は対数期ミトコンドリアでの値の 10～20% であった。

この事実はクエン酸蓄積期から調製したミトコンドリアでは，α-ketoglutarate dehydrogenase 複合体をはじめ，aconitate hydratase (EC 4.2.1.3), isocitrate dehydrogenase の活性が低下し，その結果 TCA 回路でのクエン酸以降の酸

化系が，著しく抑制されたためと考えられる。　このような代謝のフラックスの低下が *in vivo* におけるクエン酸生産と密接な関連があると思われる。

第3章では，ミトコンドリアの呼吸系をさらに詳細に研究するため，呼吸チトクロムの分光分析を行なった。対数期ミトコンドリアのチトクロム組成を酸化還元差スペクトルを用いて調べた結果，チトクロム $a+a_3$ の含有量が比較的高く，いわゆる動物心筋型を示した。　チトクロム $a+a_3$ およびチトクロム $c+c_1$ の含量は，コハク酸呼吸またはジチオナイトによる両方の還元状態において，ほとんど差を見い出せなかった。　しかし，b型チトクロムの場合，コハク酸呼吸ではその還元が不充分であり，ジチオナイト還元で得られた値の50%以下であった。

次に呼吸基質により還元されないb型チトクロムの成分について検討を加えた。　二波長分光測定および差スペクトル分析により，各種還元剤に対する挙動の異なる，少なくとも次の3種のb型チトクロム成分が存在することが明らかになった：　1) 565nmに吸収極大を有し，コハク酸呼吸では部分的に，ジチオナイトにより完全に還元される成分；　2) 568nmに吸収極大を有し，アンチマイシンAにより特異的に還元される成分；　3) 561～563nm付近にα吸収帯を示し，ジチオナイトで新たに還元される成分（1種あるいは2種以上）。　1)と2)の成分は還元剤に対する反応性から考察すると，動物ミトコンドリアでみられるチトクロム b-562と b-566にそれぞれ相当するものと思われる。　しかし，1)と2)の成分の吸収極大がともに既知の吸収波長から2～3nm長波長側にあり，これらの成分が，*C. lipolytica* MT4に特異的なものであると考えられる。

第4章では，単離ミトコンドリアにおけるピルビン酸の代謝とクエン酸生成を含むTCA回路の制御に関して比較研究を行ない，細胞のクエン酸蓄積の要因について検討した。

両増殖相から調製したミトコンドリアはともに，ピルビン酸からのクエン酸生成において，リンゴ酸を外部のオキザロ酢酸供給源として必要とした。State 4（ADP無添加）の抑制された呼吸状態では，定常期ミトコンドリアはピルビン酸＋リンゴ酸から，ほぼ1:1の割合でクエン酸とα-ケトグルタール酸を，そして少量のイソクエン酸を生成した。消費ピルビン酸に対する3つの有機酸のモル収率は90%であり，α-ケトグルタール酸以後の酸化的代謝のフラックスがきわめて低いことが判明した。他方，対数期ミトコンドリアではその収率は58%であり，α-ケトグルタール酸のTCA回路上での酸化は活発であった。

C. lipolytica ミトコンドリアのピルビン酸代謝がアデニンヌクレオチド類，とりわけAMPにより敏感に制御されていることが明らかになった。またその機構がアデニンヌクレオチド類によるミトコンドリア内の *isocitrate dehydrogenase* (NAD^+) (EC 1.1.1.41) 活性の調節に帰すことができた。State 4の呼吸時における，AMPの添加，あるいはADP添加によるstate 3への移行により，クエン酸量の低下とα-ケトグルタール酸生成の促進がみられた。この効果において，AMPはADPに比較し，より低濃度で有効であった。この事実はアロステリック酵素である NAD^+-*isocitrate dehydrogenase* の活性化剤として，ADPよりAMPの方が効果的であったと云う実験結果と一致する。

一方ATPは，ADPやAMPによる上記の NAD^+ 依存性酵素の活性化を部分的に阻害し，ピルビン酸代謝でもAMPの有

無にかかわらず，α-ケトグルタール酸の生成を抑え，クエン酸生成を増加させた。

ミトコンドリア抽出液中には，isocitrate dehydrogenase ($NADP^+$) (EC 1.1.1.42) 活性も見い出されたが，アデニンヌクレオチド類による調節を受けず，TCA回路の代謝制御に関与していないと考えられる。

対数期とクエン酸蓄積期である定常期での細胞内アデニンヌクレオチド含量の測定結果は，定常期細胞のAMP含量が対数期での値のわずか10%程度にまで低下したことを示すとともに，定常期での NAD^+-isocitrate dehydrogenase がその活性化において，かなり抑制的な条件下に置かれていることを示唆した。菌体増殖からクエン酸生産への代謝転換を引き起こすであろうアデニル酸の激減は，培養における窒素制限に由来するものと思われる。

これらの結果から，対数増殖期から定常期への移行にともなう C. lipolytica MT4 のクエン酸生産が，細胞内とりわけミトコンドリア内における 1) TCA回路でのα-ケトグルタール酸代謝のフラックスの低下 と 2) AMP(活性化剤)含有量の減少による NAD^+-isocitrate dehydrogenase 活性の低下 に起因するものと結論した。

クエン酸醗酵の機構を，細胞生理学的に解明するための第1段階として，著者はミトコンドリアでのクエン酸生成の代謝調節に焦点をあて研究を進めてきた。しかしながら，細胞内においてミトコンドリアが独立した存在ではなく，TCA回路上での代謝は細胞質(cytoplasm)における物質代謝(解糖系や gluconeogenesis など)と密接に関連し合っている。特に，細胞質の関与するオキザロ酢酸の供給

経路はミトコンドリアでのクエン酸生成に重要な影響を及ぼす。　本研究で得られた成果は醗酵機構の基礎的知見を与えるものであり，今後新たなアプローチとして，ミトコンドリアと細胞質との相互作用に関する研究の発展が期待される。

文　　献

1) Currie, J. N.: J. Biol. Chem., 31, 15 (1917).
2) Bernhauer, K.: Biochem. Z., 172, 296 (1926).
3) Butkewitsch, W. S.: Biochem. Z., 136, 224 (1923).
4) 坂口，山谷：農化，8，489 (1932).
5) 照井：醸学，14，233 (1937).
6) 照井：醸学，19，721 (1941).
7) 中沢，武田，中野：農化，13，52 (1937).
8) 尾崎，福本，鈴木：醗酵協，13，134 (1955).
9) 尾崎：農化，29，611 (1955).
10) 坂口：農化，7，748 (1931).
11) 尾崎：微生物工業，(朝井編)，p. 371，朝倉書店 (1956).
12) 照井：微生物工業，(朝井編)，p. 359，朝倉書店 (1956).
13) Krebs, H. A.: Advan. Enzymol., 3, 191 (1943).
14) Wood, H. G., Werkman, C. H., Hemingway, A., Nier, A. O.: J. Biol. Chem., 142, 31 (1942).
15) Foster, J. W., Carson, S. F., Anthony, D. S., Davis, J. B., Jefferson, W. E., Long, M. V.: Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 35, 663 (1949).
16) Lewis, K. F., Weinhause, S.: J. Am. Chem. Soc., 73, 2500 (1951).
17) Martin, S. M., Wilson, P. W., Burris, R. H.: Arch. Biochem., 26, 103 (1950).
18) Stern, J. R., Ochoa, S.: J. Biol. Chem., 191, 161 (1951).
19) Cleland, W. W., Johnson, M. J.: J. Biol. Chem., 208, 679 (1954).
20) Ramakrishnan, C. V., Martin, S. M.: Can. J. Biochem. Physiol., 32, 434 (1954).
21) Ramakrishnan, C. V., Steel, R., Lentz, C. P.: Arch. Biochem. Biophys., 55, 270 (1955).
22) 田淵，田中，阿部：農化，42，440 (1968).
23) 田淵，田中，阿部：農化，43，154 (1969).
24) 児玉，中原，大森：微生物利用学概論，(山田編)，p. 124，地球社 (1974).
25) 阿部，田淵，田中：農化，44，493 (1970).
26) 田淵，田中，田原，阿部：農化，44，562 (1970).
27) Akiyama, S., Suzuki, T., Sumino, Y., Nakao, Y., Fukuda, H.: Agr. Biol. Chem., 37, 879 (1973).

28) Akiyama, S., Suzuki, T., Sumino, Y., Nakao, Y., Fukuda, H.: Agr. Biol. Chem., 37, 885 (1973).
29) 田淵：酵母における適応と制御，(長谷川編)，p. 191，東大出版会 (1977).
30) Tabuchi, T., Serizawa, N., Uchiyama, H.: Agr. Biol. Chem., 38, 2571 (1974).
31) Tabuchi, T., Serizawa, N.: Agr. Biol. Chem., 39, 1055 (1975).
32) 田下：大阪大学大学院工学研究科 修士論文 (1975).
33) Hogeboom, G. H., Schneider, W. C., Palade, G. E.: J. Biol. Chem., 172, 619 (1948).
34) Green, D. E., Loomis, W.F., Auerbach, V. H.: J. Biol. Chem., 172, 389 (1948).
35) Ashwell, M., Work, T. S.: Annu. Rev. Biochem., 39, 251 (1970).
36) Linnane, A. W., Haslam, J. M., Lukins, H. B., Nagley, P.: Annu. Rev. Microbiol., 26, 163 (1972).
37) Nossal, P. M.: Biochim. Biophys. Acta, 14, 154 (1954).
38) Nossal, P. M.: Biochem. J., 57, 62 (1954).
39) Vitols, E., Linnane, A. W.: J. Biophys. Biochem. Cytology, 9, 701 (1961).
40) Ohnishi, T., Hagihara, B.: J. Biochem., 55, 584 (1964).
41) Balcavage, W. X., Mattoon, J. R.; Biochim. Biophys. Acta, 153, 521 (1968).
42) Eddy, A. A., Williamson, D. H.: Nature, 179, 1252 (1957).
43) Heyman-Blanchet, T., Zajdela, F., Chaix, P.: Biochim. Biophys. Acta, 36, 569 (1959).
44) Duell, E. A., Inoue, S., Utter, M. F.: J. Bacteriol., 88, 1762 (1964).
45) Ohnishi, T., Kawaguchi, K., Hagihara, B.: J. Biol. Chem., 241, 1797 (1966).
46) Kováč, L., Bednárová, H., Greksák, M.: Biochim. Biophys. Acta, 153, 32 (1968).
47) von Jagow, G., Klingenberg, M.: Eur. J. Biochem., 12, 583 (1970).
48) 押野，荻原：醗工誌，51，639 (1973).
49) Linnane, A. W., Vitols, E., Nowland, P. G.: J. Cell Biol., 13, 345 (1962).
50) Light, P. A., Garland, P. B.: Biochem. J., 124, 123 (1971).
51) Ohnishi, T., Sottocasa, G., Ernster, L.: Bull. Soc. Chim. Biol., 48, 1189 (1966).

52) Ohnishi, T., Asakura, T., Yonetani, T., Chance, B.: J. Biol. Chem., 246, 5960 (1971).
53) Kitamura, K., Kaneko, T., Yamamoto, Y.: J. Gen. Appl. Microbiol., 18, 57 (1972).
54) Kaneko, T., Kitamura, K., Yamamoto, Y.: Agr. Biol. Chem., 37, 2295 (1973).
55) Yamamura, M., Teranishi, Y., Tanaka, A., Fukui, S.: Agr. Biol. Chem., 39, 13 (1975).
56) Chance, B., Williams, G. R.: Advan. Enzymol., 17, 65 (1956).
57) 萩原：蛋白質・核酸・酵素，13，370 (1968).
58) 大隅：蛋白質・核酸・酵素，12，1198 (1967).
59) 大隅：蛋白質・核酸・酵素，13，47 (1968).
60) 河合：蛋白質・核酸・酵素，13，599 (1968).
61) 萩原：蛋白質・核酸・酵素，10，1689 (1965).
62) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J.: J. Biol. Chem., 193, 265 (1951).
63) Stern, J. R.: Methods in Enzymology, (Colowick, S. P., Kaplan, N. O., ed.), Vol. 3, 425, Academic Press Inc., New York (1957).
64) 小林：細胞分画法，(佐藤編)，p.168，岩波書店 (1972).
65) Katz, R.: FEBS Lett., 12, 153 (1971).
66) Katz, R., Kilpatrick, L., Chance, B.: Eur. J. Biochem., 21, 301 (1971).
67) Ohnishi, T.: FEBS Lett., 24, 305 (1972).
68) Grossman, S., Cobley, J. G., Singer, T. P.: J. Biol. Chem., 249, 3819 (1974).
69) Light, P. A., Ragan, C. I., Clegg, R. A., Garland, P. B.: FEBS Lett., 1, 4 (1968).
70) Light, P. A., Garland, P. B.: Biochem. J., 124, 123 (1971).
71) Lehninger, A. L.: Harvey Lectures, 49, 176 (1955).
72) Watson, K., Smith, J. E.: Biochem. J., 104, 332 (1967).
73) Weiss, H., von Jagow, G., Klingenberg, M., Bücher, T.: Eur. J. Biochem., 14, 75 (1970).
74) Barnes, R., Colleran, E. M., Jones, O. T. G.: Biochem. J., 134, 745 (1973).
75) Lardy, H. A., Ferguson, S. M.: Annu. Rev. Biochem., 38, 991 (1969).
76) 奥貫，山中，折井，和田：チトクロム，(奥貫，山中編)，p.1，朝倉書店 (1970).
77) Sato, N., Wilson, D. F., Chance, B.: Biochim. Biophys. Acta, 253, 88 (1971).

78) Wikström, M. K. F.: Biochim. Biophys. Acta, 253, 332 (1971).
79) Wikström, M. K. F.: Biochim. Biophys. Acta, 301, 155 (1973).
80) Dutton, P. L., Erecinska, M., Sato, N., Mukai, Y., Pring, M., Wilson, D. F.: Biochim. Biophys. Acta, 267, 15 (1972).
81) Slater, E. C.: Biochim. Biophys. Acta, 301, 129 (1973).
82) Phelps, D. C., Crane, F. L.: Biochem. Biophys. Res. Comm., 60, 576 (1974).
83) Lambowitz, A. M., Bonner, W. D., Jr.: J. Biol. Chem., 249, 2428 (1974).
84) Sato, N., Ohnishi, T., Chance, B.: Biochim. Biophys. Acta, 275, 288 (1972).
85) 村岡: 蛋白質・核酸・酵素, 20, 278 (1975).
86) Chance, B.: Methods in Enzymology, (Colowick, S. P., Kaplan, N. O., ed.), Vol. 4, 273, Academic Press, New York (1957).
87) 押野, 萩原: 醗工誌, 51, 631 (1973).
88) Brandon, J. R., Brocklehurst, J. R., Lec, C. P.: Biochemistry, 11. 1150 (1972).
89) LaNoue, K., Nicklas, W. J., Williamson, J. R.: J. Biol. Chem., 245, 102 (1970).
90) LaNoue, K. F., Bryla, J., Williamson, J. R.: J. Biol. Chem., 247, 667 (1972).
91) LaNoue, K. F., Walajtys, E. I., Williamson, J. R.: J. Biol. Chem., 248, 7171 (1973).
92) Evans, R. M., Scholz, R. W.: Biochim. Biophys. Acta, 381, 278 (1975).
93) Walter, P., Paetkau, V., Lardy, H. A.: J. Biol. Chem., 241, 2523 (1966).
94) Patel, M. S., Tilghman, S. M.: Biochem. J., 132, 185 (1973).
95) Martin, B. R., Denton, R. M.: Biochem. J., 125, 105 (1971).
96) Johnson, R. N., Hansford, R. G.: Biochem. J., 146, 527 (1975).
97) Hansford, R. G.: Biochem. J., 146, 537 (1975).
98) Simpson, E. R., Boyd, G. S.: Eur. J. Biochem., 22, 489 (1971).
99) Williamson, J. R., Corkey, B. E.: Methods in Enzymology, (Lowenstein, J. M., ed.), Vol. 13, 450, Academic Press, New York (1969).
100) Czok, R., Lamprecht, W.: Methods of Enzymatic Analysis, (Bergmeyer, H. U., ed.), 2nd edn., Vol. 3, 1446, Academic Press, New York (1974).
101) Gutmann, I., Wahlefeld, A. W.: Methods of Enzymatic Analysis, (Bergmeyer, H. U., ed.), 2nd edn., Vol. 3, 1585, Academic Press, New York (1974).

102) Siebert, G.: Methods of Enzymatic Analysis, (Bergmeyer, H. U., ed.), 2nd edn., Vol. 3, 1570, Academic Press, New York (1974).
103) Bergmeyer, H. U., Bernt, E.: Methods of Enzymatic Analysis, (Bergmeyer, H. U., ed.), 2nd edn., Vol. 3, 1577, Academic Press, New York (1974).
104) Foulds, J.: J. Bacteriol., 107, 833 (1971).
105) Kotani, H., Shinmyo, A., Enatsu, T.: J. Bacteriol., 129, 640 (1977).
106) Conway, E. J., Downey, M.: Biochem. J., 47, 347 (1950).
107) Williamson, J. R., Olson, M. S.: Biochem. Biophys. Res. Commun., 32, 794 (1968).
108) Brand, M. D., Evans, S.M., Mendes-Mourão, J., Chappell, J. B.: Biochem. J., 134, 217 (1973).
109) Atkinson, D.E., Walton, G. M.: J. Biol. Chem., 242, 3239 (1967).
110) Chappell, J. B.: Brit. Med. Bull., 24, 150 (1968).
111) Chen, R. F., Plaut, G. W. E.: Biochemistry, 2, 1023 (1963).
112) Cohen, P. F., Colman, R. F.: Biochemistry, 11, 1501 (1972).
113) Kornberg, A., Pricer, W. E., Jr.: J. Biol. Chem., 189, 123 (1951).
114) Hathaway, J. A., Atkinson D. E.: J. Biol. Chem., 238, 2875 (1963).
115) Barnes, L. D., Kuehn, G. D., Atkinson, D. E.: Biochemistry, 10, 3939 (1971).
116) Sanwal, B. D., Stachow, C. S.: Biochim. Biophys. Acta, 96, 28 (1965).
117) Ramakrishnan, C. V., Martin, S. M.: Arch. Biochem. Biophys., 55, 403 (1955).
118) Cox, G. F., Davies, D. D.: Biochem. J., 105, 729 (1967).
119) Atkinson, D. E., Hathaway, J. A., Smith, E. C.: J. Biol. Chem., 240, 2682 (1965).
120) Heldt, H. W., Klingenberg, M., Milovancev, M.: Eur. J. Biochem., 30, 434 (1972).
121) Danks, S. M., Chappell, J. B.: Biochem. J., 142, 353 (1974).
122) Taylor, S. I., Mukherjee, C., Jungas, R. L.: J. Biol. Chem., 250, 2028 (1975).
123) Barnes, L. D., McGuire, J. J., Atkinson, D. E.: Biochemistry, 11, 4322 (1972).

謝　　辞

この研究を行なうにあたり，有益なる御指導，御助言を賜わりました大阪大学工学部　合葉修一教授，江夏敏郎助教授，岡田弘輔教授をはじめ，原田篤也教授（産業科学研究所），大嶋泰治教授，田口久治教授，芝崎　勲教授，市川邦介教授，新名惇彦博士，小川隆平博士　ならびに教室員の方々に心から感謝致します。

また，研究の便宜を図っていただきました柿原克史氏，坪田康信氏に深謝致します。

本論文に関係ある主な報告

1. Respiration Activity in Mitochondria Prepared from Cells of *Candida lipolytica* at Different Growth Phases

   Journal of Fermentation Technology, 54, 863 (1976)

2. Spectral Properties of Cytochromes in *Candida lipolytica* Mitochondria

   Journal of Fermentation Technology, 55, 84 (1977)

3. Control of Citrate and 2-Oxoglutarate Formation in *Candida lipolytica* Mitochondria by Adenine Nucleotides

   Biochimica et Biophysica Acta (in press)