

Title	TTCの還元機構とAnaerobiosisの意義について (Nachlasらの考えに対する疑義)
Author(s)	大鳥, 利文
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	<a href="http://hdl.handle.net/11094/28391">http://hdl.handle.net/11094/28391</a>
DOI	
rights	
Note	

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

## 【 13 】

氏名・(本籍)	大 <small>おお</small> 鳥 <small>とり</small> 利 <small>とし</small> 文 <small>ふみ</small>
学位の種類	医 学 博 士
学位記番号	第 282 号
学位授与の日付	昭和 37 年 3 月 26 日
学位授与の要件	医学研究科 外科系 学位規則第 5 条第 1 項該当
学位論文題目	TTC の還元機構と Anaerobiosis の意義について (Nachlas らの考えに対する疑義)
	(主 査)                              (副 査)
論文審査委員	教授 水川 孝      教授 久保 秀雄      教授 清水 信夫

## 論 文 内 容 の 要 旨

rat liver mitochondria を用いて, tetrazolium 塩が電子伝達系のどの部位から electron を accept するかを再検討し, tetrazolium 塩の組織化学の理論的基礎をかためようとするもので, 本論文ではとくに TTC の還元が cytochrome oxidase level で行われるとの Nachlas, Seligman らの主張に疑義をとえ, あわせて生体内酸化還元酵素系に対する anaerobiosis の意義を明らかにしようとするものである。

### 〔方法並びに成績〕

#### 実験材料:

- 1) rat liver mitochondria(Mt.)      2) yeast lactic dehydrogenase(Y-LDH),      3) xanthine oxidase,
- 4) cytochrome c(cyt.c)およびcytochrome a(cyt.a)

#### 実験方法:

Mt. の succinate TTC-reductase activity および精製 cytochrome 酸化酵素標品 (cyt.c+cyt.a) の TTC 還元能の測定には有機溶媒による抽出比色法を用い, Y-LDH と xanthine oxidase は直接比色法により日立自記電比色計により自記させた。その他, 比色計としては日立光電比色計, Beckmann DK- II, Cary 光電比色計などを用いた。なお, 溶液中の酸素濃度の測定には萩原酸素電極を用いた。

#### 実験成績:

- 1) succinate を加えない場合の Mt. の endogenous TTC-reductase activity は open vessel で反応させるとほとんどみとめられないが, evacuate する空気を N<sub>2</sub> gas でおきかえて反応させると endogenous activity が常にとめられ, しかもこの activity は KCN, Antimycin A や malonate により阻害されない。
- 2) Mt. の succinate TTC-reductase activity は evacuate したり空気を N<sub>2</sub> gas でおきかえても増加しない。(TTC の還元は open vessel のときの 20~30%増加するが, この 20~30%の増加は evacuate したり

$\text{N}_2$  gas でおきかえたときの endogenous TTC-reductase activity に相当している。)

3) open Vessel では succinate を加えてから TTC の還元が起り始めるまでに潜伏時間があると思われる。この潜伏時間は open Vessel で Mt. が溶液中の酸素を消費しつくすのに要する時間に相当している。

4) Mt. の succinate TTC-reductase activity は open vessel で KCN ( $2 \times 10^{-3}\text{M}$ ) や Antimycin A を加えることによって強く阻害されるが、Thunberg 管を用いて evacuate するか  $\text{N}_2$  gas でおきかえて反応させると阻害度は著しく減弱する。また  $\text{O}_2$  10% CO 90% を含む gas で空気をおきかえて反応させても強く阻害されるが、100% CO gas でおきかえて反応させると阻害は著しく減弱する。

5) malonate による阻害も空気  $\text{N}_2$  gas におきかえて反応させると open vessel のときに比べて阻害度は著しく減弱する。

6) TTC を添加しても Mt. の酸素吸収の速度は変化しないかむしろ増加する。なお、TTC の添加および Mt. の凍結融解は Mt. の oxidative phosphorylation を uncouple させる。

7) Mt. は p-phenylene diamine や hydroquinone を加えても TTC を還元しない。

8) xanthine oxidase は oxidase 作用により溶液中の酸素濃度が 0% になってはじめて TTC ( $E_{1/2} = -0.49\text{V}$ ) を還元し始める。INT ( $E_{1/2} = -0.09\text{V}$ ) の還元は溶液中の酸素濃度が 0% でなくても起る。

9) Y-LDH も自酸化により溶液中の酸素濃度が 0% になってはじめて TTC を還元し始める。

INT の還元は xanthine oxidase と同様溶液中の酸素濃度が 0% にならなくても起る。

10) 奥貫教授らの精製 cytochrome 酸化酵素標品 (cyt.c + cyt.a) は hydroquinone を加えると強い酸素吸収を示すが TTC を還元しない。

〔総括〕

mitochondria における succinate TTC-reductase の KCN, CO または Antimycin A による阻害は、Nachlas, Seligman らのいうごとく「cytochrome oxidase level に succinate TTC-reductase activity を有する部位があってこの部位で TTC の還元が阻害されている」のではなくて、これらの阻害剤により mitochondria の呼吸が阻害されると溶液中の酸素濃度が 0% になるまでは flavoprotein level から TTC へ electron が transfer されないためにみられる阻害である。

このように KCN, CO あるいは Antimycin A による阻害は、いわば cytochrome oxidase level での「みかけの阻害」であって、Nachlas, Seligman らは anaerobiosis の flavoprotein におよぼす影響を無視し、open vessel でも mitochondria の呼吸により溶液中の酸素濃度が 0% になることに気付いていないためにこのような誤った結論に到達したものと思う。

この anaerobiosis の flavoprotein に対する意義は、flavin enzyme である xanthine oxidase や yeast lactic dehydrogenase を用いて実証することができ、tetrazolium 塩の還元もまた酸化還元電位の理論にしたがうものであることがいえる。

## 論文の審査結果の要旨

### I. 目的

組織化学的に広く用いられている tetrazolium 塩が mitochondria の電子伝達系のどの部位から電子を受

容するかを再検討し、本論文ではとくに TTC の還元が cytochrome oxidase level で行われるとの Nachlas Seligman らの主張に疑義をとまえ、あわせて生体内酸化還元酵素系に対する anaerobiosis の意義を明らかにするとともに tetrazolium 塩の組織化学の理論的基礎をかためようとするものである。

## II. 方法ならびに成績

実験方法としては、mitochondria の succinate TTC-reductase 活性と精製 cytochrome 酸化酵素（奥貫）の TTC 還元能の測定には有機溶媒による抽出比色法を用い、yeast lactic dehydrogenase と xanthine oxidase の TTC および INT reductase 活性の測定は直接比色法を考案して日立自記光電比色計により自記させている。他方これらの標品の溶液中の酸素濃度の測定には萩原酸素電極を用いて記録している。その結果次のような事実をみとめている。

- 1) mitochondria の succinate TTC-reductase 活性は N<sub>2</sub> gas 気中で反応を行っても open vessel のときに比べ、N<sub>2</sub> gas 気中で endogenons TTC-reductase 活性に相当する活性の増加があるだけである。
- 2) open vessel の実験では succinate を加えてから TTC の還元が起り始めるまでには潜伏時間があり、この時間は open vessel で mitochondria が溶液中の酸素を消費しつくすのに要する時間に相当している。
- 3) mitochondria の succinate TTC-reductase 活性は open vessel ではほぼ 100% 阻害されるが、溶液中の酸素を除くと著しく阻害度が減弱する。また 10% でも O<sub>2</sub> gas を含むと CO gas は succinate TTC-reductase 活性を阻害するが、O<sub>2</sub> gas を含まない 100% CO gas 気中では阻害度は減弱する。
- 4) TTC を添加しても mitochondria の呼吸速度は変化しないかむしろ増大する。また p-phenylene diamine や hydroquinone を加えても mitochondria は TTC を還元しない
- 5) xanthine oxidase や yeast lactic dehydrogenase は oxidase 作用ないし自酸化により溶液中の酸素を消費しつくすと TTC を還元しはじめる。INT の場合は溶液中の酸素濃度と無関係である。
- 6) 奥貫らの精製 cytochrome 酸化酵素標品 (cyt.c+cyt. a) は hydroquinone を加えると強い酸素吸収を示すが、TTC を還元しない。

## III. 総括

mitochondria における succinate TTC-reductase の KCN, CO, または Antimycin A による阻害は、Nachlas-Seligman らのいうごとく、「cytochrome oxidase level に TTC を還元する部位があってこの部位より前で電子の伝達を阻害するものは TTC の還元を阻害する」のではなくて、これらの阻害剤は mitochondria の呼吸を阻害するため溶液中の酸素濃度が 0% にならないので、flavoprotein は電位が下ることができず TTC を還元しないものと思われる。

したがって本論文は、mitochondria の flavoprotein が anaerobiosis に大きい影響をうけること、および succinate TTC-reductase 活性の部位が flavoprotein level にあることを明らかにしたもので、tetrazolium 塩による脱水素酵素系の組織化学の理論的基礎となる貴重な研究であるばかりでなく生化学的見地よりしても極めて有意義な論文であると信じる。