特集 ミトコンドリア研究

順天堂医学 35 (4)
P. 443~454 (1990)

エネルギー転換系の低酸素圧適応**

Adaptation to low oxygen tension in energy transduction system

大 家 裕*

HIROSHI OYA, Ph.D.

生命維持について基本的な一側面を担うエネルギー代謝は、生物種的生活様式の多様性を反映し、きわめて変化に富んでいる。嫌気的環境に棲息する回虫について調べた結果、その嫌気の代謝においてミトコンドリアに局在する特異な呼吸鎖電子伝達系が存在し、その末端酸化酵素として複合体Ⅱが重要な役割を果たしていることが判明してきた。複合体Ⅱは、哺乳類などでは逆反応のコハク酸脱水素酵素として機能しているが、両者を生化学的・分子生物学的レベルで比較解析したところ、回虫にみられる特異性が実は回虫と哺乳類の各構成要素間の同一性と多様性の微妙な交錯によって表現されていることが次第に明らかになってきた。

このようにして、特殊な領域の研究が一般的な問題との接点を持つようになり、ミトコンドリア損傷に起因する臨床医学の分野との関りも現実となりつつある。最近その実態が明らかになってきたミトコンドリアミオパチーにおける電子伝達鎖構成成分の欠損とその補償的治療法の問題、また脳・心臓の虚血時のコハク酸蓄積におけるフマル酸呼吸などとの関連についても考察する。

索引用 語：寄生虫，嫌気的エネルギー代謝，電子伝達複合体Ⅱ，ミトコンドリアミオパチー，虚血現象

Key words : parasite, anaerobic energy metabolism, electron transfer complex Ⅱ, mitochondrial myopathy, ischemia

はじめに

生命現象をささえる基本的側面のひとつであるエネルギー代謝は、細菌から高等動物であるわれわれ哺乳類にいたるまで、基本的な原理をつらぬきながらも、その生活様式の多様性を反映して多彩な表現型式をとっている。

われわれが長年研究の対象としてきた寄生蠕虫——といっても主として力をそそいできたのは回

虫であるが、この生物も消化管という酸素分圧の低いところに生息しているにもかかわらず、酸素ときわめて親和性の高いヘモグロビンが筋肉・体腔液（高等動物の血液に相当する）に含まれており、さらに筋肉・ミトコンドリアが酸素の存在下で酸素消費を示すことから、好氣的代謝が主として研究されていた時期があった¹⁾²⁾。ところが1960年代の後半より1970年代初頭にかけて、本論で詳しく述べる PEPCK—コハク酸経路と呼ばれる嫌氣的糖分解経路が、カキの閉殻筋を始めとするいくつかの無脊椎動物で証明され³⁾、これと同じ経路が回虫にも存在することが判明するにいたった⁴⁾。それ以来、回虫のエネルギー代謝は低酸素圧に適応したエネルギー転換系の一つのモデルと考えられるようになり、われわれもこの線に沿っ

* 順天堂大学医学部寄生虫学講座教授

Department of Parasitology, Juntendo
University School of Medicine, Tokyo, Japan

** 第250回順天堂医学会学術集会〔Sept. 21, 1989〕
〔Jan. 10, 1990 原稿受領〕

た研究を進めてきた⁵⁾⁶⁾。とくに最近では、この PEPCK-コハク酸経路の末端の部分のフマル酸・コハク酸転換反応の解明に精力を集中している。

この末端反応には、後に述べるように回虫ミトコンドリアの特異な電子伝達機構が関与していることが判明したが、研究が進むにつれて、この特異性が実はミトコンドリア電子伝達系単位の基本構成における高等動物との同一性と、各構成要素間に見られる微妙な多様性の交錯によって表現されていることが次第に明らかになってきた⁷⁾⁸⁾。

これらの結果は、エネルギー転換系の進化の道筋を考えなおす上で貴重な情報を提供するとともに、高等動物におけるミトコンドリアについて考える上でも示唆的な点があると思われる。本稿では、回虫に関するわれわれの最近の知見につき、エネルギー代謝における統一性と多様性という視点を踏まえつつまとめてみたい。

PEPCK-コハク酸経路

多細胞真核生物における低酸素圧適応は、とくに寄生性の動物においてその生活様式の多様性を反映し変化に富んでいる。生息する環境における酸素の供給度に対応して、われわれ哺乳類とほとんど変わらない好気的代謝を示すもの、Homolactic fermenter と呼ばれ酸素を一切必要とせず乳酸発酵のみをおこなうもの、糖分解の後半に PEPCK (ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ) —コハク酸経路をもち条件嫌気性動物として分類される一群などがある。このなかではエネルギー転換系の進化適応という観点から、特に興味深いのが PEPCK-コハク酸経路である。哺乳類など高等動物においては、直接のエネルギー源であるグルコースは解糖系とそれに続く TCA 回路により分解され、その間にいわゆる酸化的リン酸化により ATP が合成される。これに対しわれわれが研究対象としている回虫成虫は小腸という低酸素分圧環境下に生息し、その糖分解経路は高等動物とは異なっており、このような糖分解経

表-1 PEPCK-コハク酸経路をもつ主な寄生虫

寄 生 虫	PK/PEPCK	ME
Nematoda: 線虫類		
<i>Ascaris lumbricoides</i> : 回虫	0.04	NAD>NADP
<i>Trichinella spiralis</i> : 旋毛虫	0.31	NADP
<i>Haemonchus contortus</i> : 捻転胃虫	0.62	NADP
<i>Dictyocaulus viviparus</i> : ウシ肺虫	0.90	なし
Trematoda: 吸虫類		
<i>Fasciola hepatica</i> : 肝絛	0.03	NAD>NADP
<i>Dicrocoelium dendriticum</i> : 楯形吸虫	0.05	NAD>NADP
Cestoda: 条虫類		
<i>Hymenolepis diminuta</i> : 縮小条虫	0.18	NADP
<i>Moniezia expansa</i> : 拡張条虫	0.60	NAD, NADP
Acanthocephala: 鉤頭虫類		
<i>Moniliformis dubius</i> : 鎖状鉤頭虫	0.34	NAD, NADP
<i>Schistosoma mansoni</i> : マンソン住血吸虫	>10.0	

住血吸虫には PEPCK-コハク酸経路は認められない。

路をもつ寄生性の動物の存在が多数明らかにされてきつつある。

これらの動物においては、糖分解の前半は高等動物同様解糖系に沿って進行し、ホスホエノールピルビン酸 (PEP) が生成する。しかしこの後のステップでは、PEP は高等動物のようにピルビン酸キナーゼ (PK) によってピルビン酸になるのではなく、ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ (PEPCK) の作用により CO₂ を固定しオキザロ酢酸 (OAA) に変化する。そして、このような経路をとるものにおいては、PK/PEPCK の値が表-1 に見られるようにきわめて低い。また PEP から OAA への CO₂ 固定反応は、動物により IDP, あるいは GDP よりの ITP・GTP 生成と共転している。

このようにして生じた OAA は、さらにリンゴ酸脱水素酵素の逆反応によりリンゴ酸 (Malate) となりミトコンドリア膜を通過する。ミトコンドリア内に入ったリンゴ酸は、不均化反応によりピルビン酸 (Pyruvate) とフマル酸 (Fumarate) を生ずる。このフマル酸は、リンゴ酸がピルビン酸を生成する際、この反応と共転して、NAD より生じた NADH の還元当量を利用し、コハク酸へと変化する。この PEP からコハク酸にいたる経路をわれわれは PEPCK-コハク酸経路と呼んでいる (図-1)。この PEPCK-コハク酸経路は寄生蠕虫類においては、線虫・吸虫・条虫の別な

図-1 糖代謝経路の比較

く分布し(表-1), また寄生原虫トリパノソーマなどの原虫でも観察されている。この経路におけるリンゴ酸からのピルビン酸の生成は、リンゴ酸酵

素 (Malic enzyme) の酸化的脱炭酸反応によるものであり、一般的には NADP が補酵素として関与することが知られているが、回虫では脱炭酸と NAD→NADH 反応との共転が主役を果たすことが明らかにされている。しかしながら表-1に示すように、寄生虫によっては NADP→NADPH がこの反応に共役している場合も知られている。

この PEPCK-コハク酸経路は、本邦ではあまり関心が拂われていないようであるが、初めにも一寸ふれたように、はじめカキの閉殻筋においてその詳細が研究され、引きつづいて Saz and Lescure (1969)⁴⁾により回虫筋における存在が認められたものである。その後、潮干帯に棲む二枚貝(軟体動物)やゴカイの類(環形動物)に広く分布し、潮の干満による酸素供給量の変化に対応して好気・嫌気両呼吸の切替をおこなっていることが明らかとなった。PEPCK-コハク酸経路が線虫(袋形動物)・吸虫・条虫(扁形動物)を含め、前口動物と呼ばれる大きな動物群に広範囲に分布し(図-2)、原生動物である原虫の一部にもみられている事実は、この経路が従来考えられていたようなきわめて限られた特殊な経路であるというよりは、エネルギー代謝系の環境適応という点から、むしろかなり一般性をもつものではないかという

図-2 動物の分類

ことが予想される。エネルギー代謝の進化・適応という立場を踏まえ、エネルギー代謝系の本質・実態をより適確に理解するためには、この経路の分布に関し、より広範な細部に立ちいたった研究が期待される。以上述べたように PEPCK-コハク酸経路について、その道筋は明らかにされてはきたものの、その末端におけるコハク酸生成の詳細なメカニズムについては十分な説明はなされていなかった。Saz らによりこの反応にミトコンドリア電子伝達系の複合体 I が関与し、この共役部位を駆動して ATP を得るという点を示唆する実験結果が報告されていたが⁹⁾、電子伝達経路なども含め直接的な証拠は示されておらず、その説明は長い間この分野の研究者の最大の目標のひとつとなっていた。われわれはこの点を明らかにすべく、この15年余を回虫成虫ミトコンドリアを用いて研究を進めてきたのであるが、まず最初に判明したのは、以下に述べるようにこの末端における反応にはきわめて特徴的な b 型シクロムを含む電子伝達鎖が関与しているという事実であった。

フマル酸還元とシクロム b₅₅₈

1978年当教室の林ら¹⁰⁾は、回虫成虫筋ミトコンドリアおよび蛭ミトコンドリア分画を用い、このミトコンドリア中に α -グリセロリン酸・リンゴ酸・NADH・コハク酸などの基質により還元され、フマル酸添加により酸化される b 型シクロムが存在することを、シクロムの α 吸収帯の吸光度変化に基づく実験により明らかにした。この b 型シクロムは常温で 560nm に α ピークを持ち、液体窒素温度下の低温スペクトルでは 558 nm を主とする二つのピークを持つことからシクロム b₅₅₈ と命名した(図-3)。このようにして、PEPCK-コハク酸経路末端におけるコハク酸の生成は、ミトコンドリア電子伝達系の一部とシクロム b₅₅₈ を含む分枝鎖によっておこなわれるフマル酸呼吸によるものであることが判明した。これに類する b 型シクロムを含む側鎖は、特殊な環境に生息する寄生性の動物に広く見られる(表-2)。

図-3 回虫筋垂ミトコンドリア画分におけるシクロム b₅₅₈ の Dithionite による酸化還元差スペクトル

表-2 電子伝達側鎖を有する寄生虫

Parasite	b type cytochrome in side chain	a a ₃	
		Spectrum	Activity
<i>A.lumbricoides</i> 回虫	552, 560	—	±
<i>D.immitis</i> イヌ糸状虫	559	—	+
<i>C.sinensis</i> 肝吸虫	556	—	+
<i>F.hepatica</i> 肝蛭	557	598	+
<i>H.diminuta</i> 縮小条虫	557	—	+
<i>T.hydatigena</i> 胞状条虫	(555)	603	
<i>M.expansa</i> 拡張条虫	556	594~601	
<i>A.cantonensis</i> 広東住血線虫	—		
<i>M.elongatus</i> ブタ肺虫	—		
<i>S.mansoni</i> マンソン住血吸虫			

点線以下の寄生虫には側鎖は検出されていない。

つぎにわれわれはこの b 型シクロムの回虫ミトコンドリアにおける局在性、またいわゆるミトコンドリア電子伝達系とのかかわりについて研究を進めた。

通常哺乳類ミトコンドリアにおいては電子伝達系は内膜に局在し、それぞれ複合体 I (NADH-ユビキノン酸化還元酵素)・複合体 II (コハク酸-ユビキノン酸化還元酵素)・複合体 III (ユビキノール-シクロム c 酸化還元酵素)、および複合体 IV (シクロム c 酸化酵素)と呼ばれる機能単位として複合体を形成している。そしてこれら複合体と、

ユビキノンやシトクロムcといった比較的低分子の電子伝達物質によって形成される電子伝達鎖が、TCA 回路などで生成された NADH やコハク酸から酸素への呼吸鎖を形成している。高宮らはミトコンドリア膜の界面活性剤による可溶化、またそれに続く種々の分画法を検討した結果、シトクロム b_{558} がコハク酸-ユビキノン酸化還元酵素として単離した複合体Ⅱに局在していることを明らかにした¹¹⁾。つまり精製標品におけるこのbシトクロムのスペクトルの特徴は、林らが垂ミトコンドリア画分で観察したフマル酸で酸化される成分のそれとほぼ完全に一致していた。また精製した複合体Ⅱと複合体Ⅰ-Ⅲ (NADH-シトクロムc酸化還元酵素複合体) との再構成実験においても、NADH により還元したシトクロム b_{558} はフマル酸により酸化された。これらの結果より図-4に示すような、回虫成虫筋におけるフマル酸呼吸を中心とした電子伝達系の実体が明らかになった¹¹⁾。実際に精製複合体Ⅱが高いフマル酸還元酵素活性を持っていることが北らにより示されたが¹²⁾、同時に回虫成虫筋ミトコンドリアにおける複合体Ⅱの含量が、全ミトコンドリアタンパクの約8%ときわめて高い点は複合体Ⅱの回虫成虫における生理的意義の重要性を示している¹³⁾。逆に複合体Ⅲや最終的に酸素に電子伝達を行う複合体Ⅳの含量は哺乳類と比較して低い値を示し、低酸素圧の環境に対応した、これら複合体の形質発現に対する何らかの制御機構が存在していることが考えられる。

複合体Ⅱのb型シトクロムについては、複合体Ⅲのb型シトクロムとは異なり、直接電子伝達には関与せず、単に複合体形成に必要な構造的成分であるという見解が、主にウシ心筋複合体Ⅱを用いた哺乳類の研究からなされていた。この理由のひとつとして、哺乳類複合体Ⅱのb型シトクロムはコハク酸などの基質により速やかには還元されないという点が挙げられる。Hatefi¹⁴⁾らはウシ複合体Ⅱシトクロムb (シトクロム b_{560}) を単離して、その電子伝達能を調べているがその速度は生理的な値よりはるかに遅く、その存在意義は研究者の間での論点となっていた。しかしわれわれの回虫

図-4 回虫筋ミトコンドリアにおけるフマル酸呼吸

シトクロム b_{558} に関する結果から、現在では哺乳類についてもその機能についての再検討がおこなわれ始めている。

ここで注意しなければならないのは、図-4における回虫のコハク酸生成を導く複合体Ⅱを中心とする還元当量の流れが、哺乳類など好気性生物の複合体Ⅱのそれとは逆方向であるという点である。つまり複合体Ⅱが、回虫ではフマル酸還元酵素単位として機能し、高等動物ではコハク酸脱水素酵素単位として働くということである。このような電子伝達の方向性の決定要因としては、次項で述べるようにそれぞれの複合体Ⅱ自身の持つ特徴を考慮せねばならないが、さらにそれとは別の要因も関与している。そのひとつとして両者の電子伝達鎖におけるキノンの相違がある。回虫成虫筋ミトコンドリアには、ロドキノンが存在することはすでに報告されていたが¹⁵⁾¹⁶⁾、これは哺乳類におけるユビキノンの構造類似体であり、前者の酸化還元電位はユビキノンの10~100mVに対し-63mVとかなり低い値になっている。われわれはウシ心筋複合体Ⅰと回虫複合体Ⅱを、リポソームに組み込んだ再構成系による実験を試み、ロドキノンの添加により NADH からフマル酸への電子伝達活性が認められる一方、ユビキノン添加によっては活性の発現はみられないという結果を得た¹³⁾ (図-5)。この事実は、細菌のフマル酸呼吸系におけるメナキノン同様、ミトコンドリアの NADH-フマル酸還元系に酸化還元電位の低いキノン類が必須であることを示している。

図-5 ウシ心筋 complex I と回虫 complex II の再構成系におけるキノン添加の影響

フマル酸還元酵素としての回虫成虫複合体 II

現在までにわれわれが明らかにしたところによると⁷⁾⁸⁾¹²⁾¹³⁾, 単離した回虫複合体 II におけるコハク酸-ユビキノン酸化還元酵素活性 (SDH) とフマル酸還元酵素活性 (FRD) の比は 0.05 であり, 出発材料の筋ミトコンドリアにおける値と同一であった。これに対し, ウシ心筋やラット肝ミトコンドリアではそれぞれ 32, 20 と高い値を示した (表-3)。一般に好気性生物ではこの値は高く, 嫌気性生物では低い傾向があるが, 回虫成虫におけるこの値は, 大腸菌を嫌氣的培養条件でフマル酸還元酵素を誘導した時の値に近く, 複合体 II は哺乳類では TCA 回路系酵素のひとつとしてコハク酸酸化によるフマル酸生成の方向に, 回虫成虫ではフマル酸還元によるコハク酸生成の方向に偏っているという実験事実とよく一致している。

また表-3 で注目すべき点は, 回虫受精卵および二期幼虫におけるこの比が回虫成虫と哺乳類の中間の値を示し, しかも受精卵から二期幼虫へと進むにしたがって, その値が高くなっているという事実⁹⁾である。外界で发育する回虫卵は, その細胞分裂・発生に酸素を必要とし, 卵殻内での最終

表-3 Succinate-ubiquinone reductase と Fumarate reductase 活性

Preparation	(μmol/min per mg protein)		SDH/FRD (pH 7.4~7.5)
	Succinate-ubiquinone reductase	Fumarate reductase	
<i>Ascaris</i>			
Isolated complex II	2.04	40.8	0.050
Muscle mitochondria	0.136	2.72	0.050
Egg mitochondria	0.0547	0.0521	1.05
2nd larva	0.021	0.004	5.20
Bovine heart mitochondria	0.135	0.00422	32
Rat liver mitochondria	0.154	0.0077	20

发育段階である第二期幼虫は高いシトクロム c 酸化酵素活性を示す¹⁷⁾。林らはこの点を分光学的にも詳細に解析し, この時期の幼虫に哺乳類同様の電子伝達系シトクロム群が存在していることを明らかにしている¹⁸⁾。これらの結果は回虫複合体 II にアイソザイムが存在するのか? また好気呼吸をおこなうミトコンドリアと嫌気呼吸をおこなうミトコンドリアが, 独立に同一細胞あるいは組織中に存在するのか? という, 非常に興味深い疑問をわれわれに投げかけるものである。この問いに答えるためには, さらに複合体 II の内部に立ち入った知見が必要となる。

回虫成虫複合体 II の特徴

複合体 II は種間を問わず, 基本的に 4 つのサブユニットから形成されるという共通の構造をとっている (図-6)。分子量約 70Kd の最も大きいサブユニットは FAD を結合し (Fp), 3 種の異なった鉄硫黄クラスターを含む分子量約 30Kd のサブユニット (Ip) とともに, 比較的親水性の触媒部位を形成している。この Fp と Ip サブユニットをミトコンドリア内膜または細菌細胞膜へ結合させるために, 2 つの小さな分子量の疎水性サブユニットが必要である。この疎水性サブユニットは通常ヘム b を結合しており, シトクロム b 成分として分光学的に観察され, われわれはこれらを cybL および cybS サブユニットと呼んでいる¹³⁾。

このシトクロム b 成分は単に膜へのアンカーと

図-6 Complex II によるコハク酸酸化とフマル酸還元

としての役割のみならず、膜中に局在するキノン類と複合体Ⅱの電子伝達に必須な成分として機能すると考えられており、前々項で述べた回虫複合体Ⅱのシトクロム b_{558} がこれに当たる。図-6に示すように、この4つのサブユニットが哺乳類ではコハク酸からユビキノン、回虫ではロドキノンからフマル酸へと逆方向の反応を触媒しているが、この反応の方向性の決定要因を探るうえでの手掛かりとして、補欠分子族の性質の興味ある相違点がいくつかみついている。

前にも述べたように、複合体Ⅱに含まれるシトクロム b は哺乳類ではコハク酸などの基質により還元され難いが、回虫成虫の場合は速やかに還元される。両者の酸化還元電位を比較してみると、ウシ心筋では -190mV とコハク酸-フマル酸系の $+30\text{mV}$ に対してかなり低いが、一方、回虫でわれわれが調べた結果では -34mV とウシ心筋より高く、コハク酸による還元性の相違を説明し得る値となっている¹⁾。また Ip サブユニットに含まれる鉄硫黄クラスターについても、哺乳類では最も酸化還元電位の高い成分である S-3 クラスターはコハク酸で完全に還元され、その EPR シグナルが消失するのに対し、回虫の場合は完全には還元されず、回虫の S-3 クラスターは哺乳類のそれより低い酸化還元電位を持つことが判った¹⁹⁾。この性質は細菌のフマル酸還元酵素にも見られる性質であり、回虫では -400mV の酸化還

表-4 Complex II の比較

	Ascaris	Beef Heart
Subunits	4	4
SDH/FRD (pH7.4~7.5)	0.05	32
Reducibility of cyt b (II) with succinate	Yes	No
Em of cytb (II)	-34mV	-190mV
Reducibility of Fe-S_3 with succinate	+	++
Em of Fe-S_3^*	$\leq 30\text{mV}$	65mV
Quinone	Rhodo- (-63mV)	Ubi- ($10\text{--}100\text{mV}$)

**Wolinella succinogenes* (-24mV) *E. coli* (-70mV)

元電位を持つ NADH から $+30\text{mV}$ のフマル酸への還元当量の流れがロドキノンも含め、各成分の酸化還元電位にしたがって進んでいることが判かった。

以上の性質の比較を表-4にまとめたが、このような回虫と哺乳類の複合体Ⅱにおける相違点をさらに明確にし、複合体Ⅱ内の電子伝達の機序を知るためには各サブユニットにおけるタンパク質としての、さらにはその一次構造に関する情報が必要である。そこでわれわれは回虫成虫複合体Ⅱの各サブユニットについてタンパク質化学的および免疫学的分析をおこない、哺乳類であるウシ心筋のそれと比較し、以下のような結果を得た^{13) 20)}。Fp サブユニットは両者できわめて性質が似ており、アミノ酸組成・抗原性の点でほとんど一致していた。また補欠分子族であるFADの結合する部位に関し、FADが共有結合しているヒスチジンを含むペプチドおよびAMPとの相互作用に必須と考えられている領域についてのペプチドの分析をおこなった結果、両者とも高い相同性を持っていることが判明した(図-7)。Ipはアミノ酸組成は類似していたものの、抗回虫Ip抗体は哺乳類Ipと反応せず、また抗ウシIp抗体も回虫Ipとは反応しなかった。これはIpサブユニットに含まれる鉄硫黄クラスターの性質が両者で異なっている点と合わせ、電子伝達の方向性の決定

いても解析中であるが、これから得られる情報をもとに同じ基本構成をもちながら、進化の歴史的試練を経たサブユニットにおける差異の微妙な組み合わせが形成されてきた過程について、探ることができるのではないかと考えている。

哺乳類とフマル酸呼吸

上述のように、PEPCK-コハク酸経路は寄生生物に限らず、酸素分圧の変化する環境に棲息する前口動物にかなり広範囲にみられるが、これらの特徴を踏まえ代謝系の進化・適応という観点から、現在の高等動物にみられる解糖系+TCA回路という型式をみなおすと非常に興味深い対比がみられる。そして、系統樹では後口動物に属し平素は好氣的代謝をおこなっているわれわれ哺乳類においても、環境状況によってはフマル酸呼吸が発動するのではないかと考えることを考えさせるいくつかの基礎・臨床医学上の例がある。一寸古いデータになるが、ラットミトコンドリアは嫌氣的条件下において、ミトコンドリア内の還元力の2~5%をフマル酸呼吸により処理することが可能であるとの報告がある²²⁾。この値は、前述の前口動物に属する環形動物であるイトミミズ *Tubifex* ミトコンドリアにおいて、50%の還元力がフマル酸呼吸により処理されるという事実²³⁾と比較すると決して高い値とはいえないが、哺乳類での効率を高める工夫はないものかという可能性とあわせ考えると、やはり考慮に値する実験事実といえよう(図-9)。このラットにおけるフマル酸呼吸はわれわれの追試によっても確かめられている。最近の報告としては、虚血および hypoxia 時の心臓²⁴⁾²⁵⁾・脳組織²⁶⁾、さらには酸素の供給度が抑制されるコンタクトレンズ装着時の角膜組織²⁷⁾等でコハク酸の著明な蓄積、あるいは蓄積を示唆する酵素活性の変動が報告されている。これら種々の組織のコハク酸の生成経路の一つとして、従来、グルタミンを前駆体とする経路が考えられていたが、最近、少なくとも心臓においては、hypoxia 時のコハク酸蓄積がミトコンドリアの呼

図-9 NADHで還元したミトコンドリア電子伝達系のフマル酸による酸化。A: ラット心筋 B: *Tubifex*

吸系を介することや、コハク酸の生産が再酸素化時の損傷から組織を防禦することを示唆する成績が灌流した心臓の系で得られている²⁴⁾。また、単離したラット心臓ミトコンドリアを用いた実験においても、NADHの酸化に伴ったフマル酸の還元が観察され、ATPも生産されることが明らかにされている²²⁾。

さらに興味深いこととしてつぎのようなことがある。哺乳類ミトコンドリア複合体Ⅱにも回虫のシトクロム b_{558} とよく似たb型シトクロムが存在し、その生理的意義がいまひとつ判然としていないことについてはすでに述べたが、虚血現象をエネルギー代謝の点から追求している研究者のなかには、回虫で得られた知見から、このbシトクロムは、高等動物の祖先型がフマル酸呼吸をおこなっていた時代の痕跡ではないかと考えている者もある。これらの知見は好氣的ミトコンドリアの嫌氣条件下における潜在的生理機能の存在を示唆する

ものであるが、これが、上述したような条件嫌気性動物における、複合体Ⅱの関与に起因するコハク酸生成と同一機構によるものであるか否か、また、虚血・hypoxia 時における補償経路としての臨床上的意義など、今後の研究がまたれ、眼科あるいは脳外科の研究グループと共同研究を開始したところである。フマル酸呼吸と関連した臨床上の問題としては、さらにミトコンドリアサイトパッチがあろう。^{28) 29) 30)} この病気はミトコンドリア呼吸鎖の電子伝達複合体 (Electron transfer Complex) の欠損、または損傷によっておこるが、欠損の部位によって致命的なものと治療可能なものがある (図-10)。ここでは治療可能な複合体Ⅲ (ユビキノール-シトクロムc酸化還元酵素) 欠損の例を述べる。発症時8歳の少女であった患者のクリスチヌ-ソファーは、歩行中突然足に刺すような激痛を覚え、動悸が激しくなり、呼吸困難におちいる発作におそわれた。症状はさらに悪化し、13歳の頃には1ブロック歩くのが限度となり、16歳では電動椅子で学校に通うほどに進行したが、多数の医師の診察にもかかわらず診断をくだすことができなかった。彼女の病気は18歳のときまたま訪れたオレゴン大学医学部の、小児科医と同大学分子生物学研究所の Capaldi 教授との共同研究により、複合体Ⅲの欠損によるミトコンドリアサイトパッチであると判明し、ビタミンK₃とアスコルビン酸の投与によって日常生活に支障がない程度までに回復している^{31) 32)}。彼女は毎日4gのビタミンCと60 mgのビタミンK₃ (錠剤で18錠) を服用しているが、その治療の原理は図-11に示すように、ビタミンK₃とアスコルビン酸により末端酸化酵素である複合体Ⅳへの電子の流れのバイパスを作り、酸素呼吸を可能にするというものである。しかしながら、末端酸化酵素である複合体Ⅳが欠損した場合はバイパスによる酸素呼吸は不可能であり、このために致命的になるものと考えられる。この場合も複合体Ⅰと複合体Ⅱが正常であれば、電子を主鎖から複合体Ⅱへ流すフマル酸呼吸を活性化してやることによる補償的な療法の可能性はないものであろうか？。ひるが

Type	Complex				
	I	II	III	IV	
A	+	+	-	-	Fatal
B	+	+	-	+	Remediable
C	+	+	+	-	Fatal
D	-	+	+	-	Fatal

図-10 ミトコンドリアミオパチーにおける電子伝達鎖欠損 ※上の表における (-) は欠損を表す

図-11 Complex III欠損ミオパチー治療の原理

えて、再び回虫成虫筋ミトコンドリアの呼吸鎖をかえりみると、本ミトコンドリアも形の上では複合体Ⅳが“欠損”したミトコンドリアであり、異なる点は、ヒト複合体Ⅳ欠損ミトコンドリアが細胞のエネルギー要求を満たし得ない、したがって生理的に十分に機能しないミトコンドリアであるのに対して、回虫ミトコンドリアは複合体Ⅳが欠損しているにもかかわらず、ロドキノン・複合体Ⅱを介するフマル酸呼吸によって嫌气的ミトコンドリアとして生理的に機能している点である。しかも、すでに述べた通り、回虫の生活史上自由生活期の幼虫期では、複合体Ⅳを有する好气的ミトコンドリアとして機能する。

このように考えてくると—寄生線虫である回虫を用いた好気・嫌気の呼吸系の実態の解析、さらには現在の焦点となりつつある両呼吸系の転換の遺伝子レベルでの制御を含めた機構の研究が、

エネルギー転換系の進化・適応に関して示唆に富む知見を提供するだけでなく、意外なところで臨床上の諸問題と深くかかわる可能性があることも指摘したい。

おわりに

本稿に示された内容は、ごく最近のデータに基づくものを除き、さきに発表された綜説⁷⁾⁸⁾と重複する部分が多い。順天堂医学会での口演内容という特殊事情と、読者に理解していただきやすいようにとの配慮も働いて、敢えて重複を辞すことなく記述した。この点のご諒承をお願いする次第である。

本稿の内容は、長年に亘る教室員諸氏の努力の結晶である。稿を終わるに際し、本研究の進展を深くご理解をもって長年にわたり見守ってくださり、ご助言・ご助力を惜しまれなかった恩師板東丈夫本学名誉教授、つねに研究の第一線を担って不撓不屈の努力を重ねてきた故林 久子・青木 孝両助教授、高宮信三郎・北 潔両講師、山崎 浩・古島理江子両助手、円滑な研究の遂行に惜しめない協力をいただいた那須野加代子・森(高瀬)恵子・伊藤(玉木)敦子・坪内暁子等の教室員諸氏、さらにこの間当教室に在籍し、研究に励まれた馬玉倉博士を始めとする研究者の方々に深い感謝をささげたい。また多数の国内外の研究機関の先生方のご厚情・ご助力にもあづかった。あわせて深謝申し上げる次第である。

文 献

- 1) 大家 裕：蛔虫の代謝系－糖質代謝を中心として。生体の科学, **12**: 62~70, 1961
- 2) 大家 裕：蛔虫の代謝系－糖質代謝を中心とする現在の問題点。医学の歩み, **61**: 292~297, 1967
- 3) Hochachika, P. W. and Mustafa, T.: Invertebrate Facultative Anaerobiosis. Science, **178**: 1056~1060, 1972
- 4) Saz, H. and Lescure, O. L.: The Function of phosphoenolpyruvate carboxykinase and malic enzyme in the anaerobic formation of succinate by *Ascaris lumbricoides*. Comp. Biochem. Physiol., **30**: 49~60, 1969
- 5) 大家 裕, 林 久子：寄生適応よりみた回虫のエネルギー代謝。生体の科学, **27**: 22~34, 1976
- 6) 大家 裕：寄生動物の低酸素圧環境への適応。日本医師会雑誌, **84**: 180~191, 1978
- 7) Oya, H. and Kita, K.: The physiological significance of complex II (succinate-ubiquinone reductase) in respiratory adaptation. In The Comparative Biochemistry of Parasitic Helminths (Bryant ed.) Chapman and Hall, London 35~53, 1989
- 8) 大家 裕：寄生虫の代謝－その統一性と多様性。最新医学の進歩, **44**: 686~694, 1989
- 9) Köhler, P. and Saz, H. J.: Demonstration and possible function of NADH : NAD⁺ Transhydrogenase from *Ascaris* muscle mitochondria. J. Biol. Chem., **251**: 2217~2225, 1976
- 10) Hayashi, H. and Oya, H.: An insoluble cytochrome b-560 complex and its participation in fumarate reduction in *Ascaris* mitochondria. Fourth International Congress of Parasitology 1978, Warszawa 78
- 11) Takamiya, S., Furushima, R. and Oya, H.: Electron transfer complexes of *Ascaris suum* muscle mitochondria. II. Succinate-coenzyme Q reductase (complex II) associated with substrate reducible cytochrome b-558. Biochim. Biophys. Acta, **848**: 99~107, 1986
- 12) Kita, K., Takamiya, S., Furushima, R., Ma, Y. C. and Oya, H.: Complex II is a major component of the respiratory chain in the muscle mitochondria of *Acaris suum* with high fumarate reductase activity. Comp. Biochem. Physiol., **89B**: 31~34, 1988
- 13) Kita, K., Takamiya, S., Furushima, R., Ma, Y. C., Suzuki, H., Ozawa, T. and Oya, H.: Electron-transfer complexes of *Ascaris suum* muscle mitochondria. III. Composition and fumarate reductase activity of complex II. Biochim. Biophys. Acta, **935**: 130~140, 1988
- 14) Hatefi, Y. and Galante, Y. M.: Isolation of cytochrome b₅₆₀ from complex II (succinate-ubiquinone oxidoreductase) and its reconstitution with succinate dehydrogenase. J. Biol. Chem., **255**: 5530~5537, 1980
- 15) Ogawa, H., Natori, S., Sato, M. and Ozawa, H.: Rhodoquinone-9 from *Ascaris lumbricoides*.

- des var. suis*. Tetrahedron letter, **24**: 1969~1970, 1969
- 16) Sato, M., Yamada, K. and Ozawa, H.: Rhodoquinone specificity in the reactivation of succinoxidase activity of acetone-extracted *Ascaris* mitochondria. Biochem. Biophys. Res. Commun. **46** : 578~582, 1972
 - 17) Oya, H., Costello, L. C. and Smith, W. N.: The comparative biochemistry of developing *Ascaris* eggs. II. Changes in cytochrome oxidase activity during embryonation. J. Cell Comp. Physiol., **62** : 287~294, 1963
 - 18) Hayashi, H., Sato, N., Oya, H. and Hagihara, B.: Cytochrome compositions in developing *Ascaris* eggs and adult muscle. In Dynamics of energy-transducing membranes (Ernst, Estabrook and Slater eds.) Elsevier Scientific Publishing Co, Amsterdam, The Netherlands 1974
 - 19) Hata, T. A., Kita, K., Furushima, R., Oya, H. and Itoh, D.: ESR studies on iron-sulfur clusters of complex II in *Ascaris suum* mitochondria which exhibits strong fumarate reductase activity. FEBS Lett, **242** : 183~186, 1988
 - 20) Furushima, R., Kita, K., Takamiya, S., Konishi, K., Aoki, T. and Oya, H.: Conservation of flavin binding domain in flavoprotein subunit of Complex II which functions as fumarate reductase in *Ascaris suum* mitochondria. Submitted
 - 21) Kita, K., Oya, H., Gennis, R. B., Ackrell, B. A. C. and Kasahara, M.: Human Complex II (succinate-ubiquinone oxidoreductase): cDNA cloning of iron sulfur (Ip) subunit of liver mitochondria. Biochem. Biophys. Res. Commun. in press
 - 22) Wilson, M. A. and Cascarano J.: The energy-yielding oxidation of NADH by fumarate in submitochondrial particles of rat tissues. Biochim. Biophys. Acta, **216** : 54~62, 1970
 - 23) Schöttler, U.: The energy-yielding oxidation of NADH by fumarate in anaerobic mitochondria of *Tubifex* sp. Comp. Biochem. Physiol., **58B** : 151~156, 1977
 - 24) Wiesner, R. J., Rösen, P. and Grieshaber, M. K.: Pathways of succinate formation and their contribution to improvement of cardiac function in the hypoxic rat heart. Biochem. Med. Metab. Biol., **40** : 19~34, 1988
 - 25) Hohl, C., Oestreich, R., Rösen, P., Wiesner, R. J. and Grieshaber, M. K.: Evidence for succinate production by reduction of fumarate and check hypoxia in isolated adult rat heart cells. Arch. Biochem. Biophys., **257** : 527~535, 1987
 - 26) Lust, W. D., Arai, H., Yasumoto, Y., Whittingham, T. S., Djuricic, B., Mrsulja, B. B. and Passonneau, J. V.: Ischemic encephalopathy. In Cerebral Energy metabolism and Metabolic Encephalopathy (McCandless ed) Plenum Press 1985
 - 27) Hill, R. M., Rengstorff, R. M., Petralli, J. P. and Sim, V. M.: Critical oxygen requirement of the corneal epithelium as indicated by succinic dehydrogenase reactivity. Amer. Jnl. of Optom. & Physiol. Optics, **51** : 331~339, 1974
 - 28) Takamiya, S., Yanamura, W., Capaldi, R. A., et al.: Mitochondrial myopathies involving the respiratory chain: A biochemical analysis. Ann. N. Y. Acad. Sci., **488** : 33~43, 1986
 - 29) 佐藤 猛: ミトコンドリア ミオパシー. (XIII) 筋疾患. Annual review 神経, 227~241, 1986
 - 30) 北 潔, 高宮信三郎, 大家 裕: (特集) ミトコンドリア脳筋症-ミトコンドリア電子伝達系の遺伝子発現, アセンブリーとその異常. 神経研究の進歩, **31** : 592~603, 1987
 - 31) Kennaway, N. G., Buist, N. R. H., Darley-Usmar, V. M., Papadimitrion, A., Dimauro, S., Kelley, R. I., Capaldi, R. A., Blank, N. K. and D'Agostino, A.: Lactic acidosis and mitochondrial myopathy associated with deficiency of several component of complex III of the respiratory chain Pediatric Research, **18** : 991~999, 1984
 - 32) Eleff, S., Kennaway, N. G., Buist, N. R. H., et al.: ³¹P NMR study of improvement in oxidative phosphorylation by vitamin K₃ and C in a patient with a defect in electron transport at complex III in skeletal muscle. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **81** : 3529~3533, 1984