



Title	ミトコンドリア膜の凍結障害 : 凍結融解した肝臓ミトコンドリアの酸化系の変化について
Author(s)	荒木, 忠
Citation	低温科学. 生物篇, 28, 1-9
Issue Date	1971-01-25
Doc URL	<a href="http://hdl.handle.net/2115/17763">http://hdl.handle.net/2115/17763</a>
Type	bulletin (article)
File Information	28_p1-9.pdf



[Instructions for use](#)

## ミトコンドリア膜の凍結障害\*

### I. 凍結融解した肝臓ミトコンドリアの酸化系の変化について

荒 木 忠

(低温科学研究所)

(昭和45年8月受理)

### I. 緒 言

生細胞は凍結融解によって障害を受け、その障害を受けた細胞の細胞膜は半透性を失っていることが良く知られている。この細胞膜の障害が細胞の凍結障害の原因であるか結果であるかについては未だ不明であるが、細胞の凍結障害に密接に関連していることは多くの研究者によって示唆されている。著者<sup>1,2)</sup>も酵母細胞を凍結処理すると、細胞膜や細胞内のミトコンドリアが障害を受けることから、膜状構造の凍結障害を重視している。従って、このような膜状構造に於いて、構成々分の配列のどの部位が構造的にどのように変化するかを捉えることによって、凍結障害の機構を解明することができると考えている。そのためには、細胞のような複雑な系ではなく、できるだけ単純な膜構造の系で調べる必要がある。その点、ミトコンドリアは殆んど膜構造から成っていて細胞膜と同じように選択的透過性を有しており、生体内に於いて代謝機能に重要な役割を果しているものであること、また、膜の分子構築についても比較的良く調べられており<sup>3-5)</sup>、酸化的磷酸化系の各構成々分の配列や構造の変化と膜構造の変化を結びつけ易いことから最適な材料であろう。このミトコンドリアの凍結障害についてはいくつかの報告<sup>6,7)</sup>があるが、殆んどがミトコンドリアの形態又は P/O 比を調べたもので、凍結処理による膜構造の変化については Lusena<sup>8)</sup>によってグルタミン酸脱水素酵素及び  $\beta$ -ヒドロキシ酪酸脱水素酵素の脱離が調べられているにすぎない。

以上の観点から、ミトコンドリアの膜構造の凍結障害を分子レベルで究明する一環として、本実験では、凍結融解によるミトコンドリアの機能の障害と冷却速度との関係を調べ、更に、膜構造を成す酸化系の構成々分のどの部分が凍結融解の影響を受けるかを検討した。

### II. 材料及び方法

ミトコンドリアの調製：家兎の肝臓を 0.21 M ソルビット、0.07 M 蔗糖、1 mM エチレンジアミン四酢酸 (EDTA)、0.05% 牛血清アルブミンを含む 0.01 M トリス塩酸緩衝液 (pH 7.4) 中で細片に切りきざみ、テフロンホモゲナイザーでホモゲナイズし、Whittaker<sup>9)</sup>の方法で分画調製した。得られたミトコンドリアは 0.25 M 蔗糖、0.2 mM EDTA、0.05% 牛血清アルブミンを含

\* 北海道大学低温科学研究所業績 第 1110 号

む 0.01 M トリス塩酸緩衝液 (pH 7.4) に浮遊させて実験に供した。浮遊液の滲透濃度を変える場合は、上記組成の溶液のうち、蔗糖濃度を 0.1 M 又は 0.5 M としたものを用いた。

**凍結融解処理：** ミトコンドリア浮遊液を 0.2~1.0 ml ずつ試験管 (内径 9 mm) 又は平底アルミニウム缶 (内径 30 mm) に入れ、各種の冷却速度で凍結させた後、30°C の温浴槽に移し振盪しながら急速に融解した。冷却速度 0.1~50°C/分 で凍結する場合は、試験管に入れた試料 1 ml を予め -2°C に冷却しておいたアルコール槽中で植氷して凍結を開始させ、所定の冷却速度で -40°C まで冷却した。更に、この凍結試料を液体窒素に浸して、その温度まで冷却した。冷却速度 100~1500°C/分 で凍結する場合は、平底アルミニウム缶に入れる試料の量を適宜に変えて、それをドライ・アイス-アルコール又は液体窒素に浸して凍結させ、液体窒素の温度まで冷却した。なおこれらの冷却速度を測定するために、直径 0.1 mm の銅・コンスタンタンで作った熱電対を試料中に挿入しておき、温度記録計に自記させた。

**呼吸能の測定：** ミトコンドリアの呼吸能は萩原の方法<sup>10)</sup>に従い半密閉型の自記呼吸酸素測定装置 (柳本製) を用いて、25°C での酸素の吸収量で測定した。状態 III の呼吸は基質及び ADP を添加した定常状態 III のときの呼吸速度を求め、無処理対照に対する百分率で表わした。呼吸調節率及び ADP/O 比は Chance and Williams の方法<sup>11)</sup>に従って、呼吸能の測定するとき自記させたポーログラムから計算して求めた。呼吸調節率は基質のみを添加して ADP の存在しない定常状態 IV のときの呼吸速度に対する基質及び ADP の存在する定常状態 III の呼吸速度の比で表わした。また、ADP/O 比は添加した一定量の ADP が消費つくされるまでの酸素吸収量に対する添加 ADP 量の比で表わした。

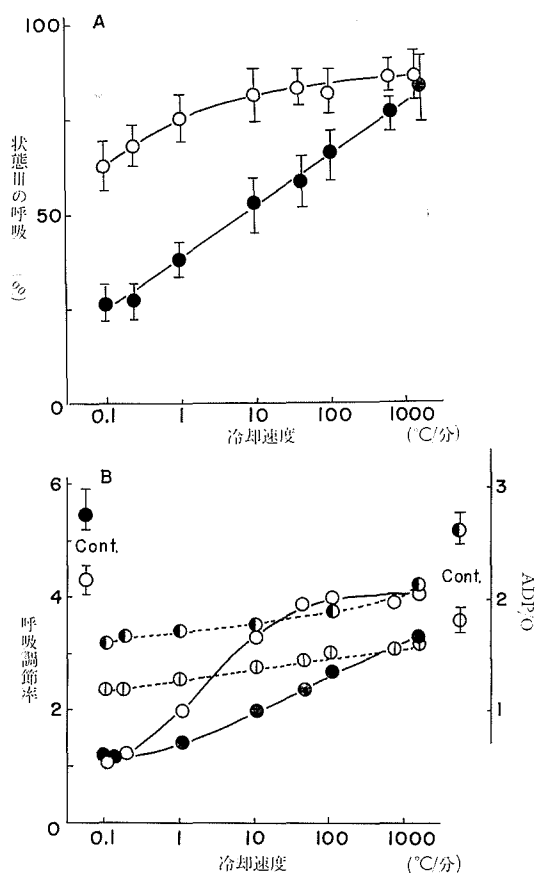
**$\alpha$ -ケトグルタル酸脱水素酵素の活性の測定：** 無処理又は凍結処理ミトコンドリア浮遊液を 56,000 $\times$ g, 30 分間遠心分離して、上清部分と沈渣部分とに分け、上清部分はそのまま、沈渣部分は 0.25 M 蔗糖溶液で最初の容量に再浮遊させてから、それぞれに 0.05 M ラウリル硫酸ナトリウムを最終濃度 1.2 mg/mg 蛋白質となるように加え、酵素を可溶化させて酵素活性の測定に供した。浮遊液中の蛋白質量は血清アルブミンを標準溶液として、ビウレット法で定量した。

$\alpha$ -ケトグルタル酸脱水素酵素の活性は 1  $\mu$ g/ml のアンチマイシン A の存在下で、Kaufman の方法<sup>12)</sup>に従って NAD<sup>+</sup> の還元で生ずる NADH を 340 m $\mu$  の吸収で測定した。得られた測定値から、NADH の 340 m $\mu$  に於けるモル吸光係数を  $6.22 \times 10^6$  cm<sup>2</sup>/mole として、そのモル濃度を算出した。

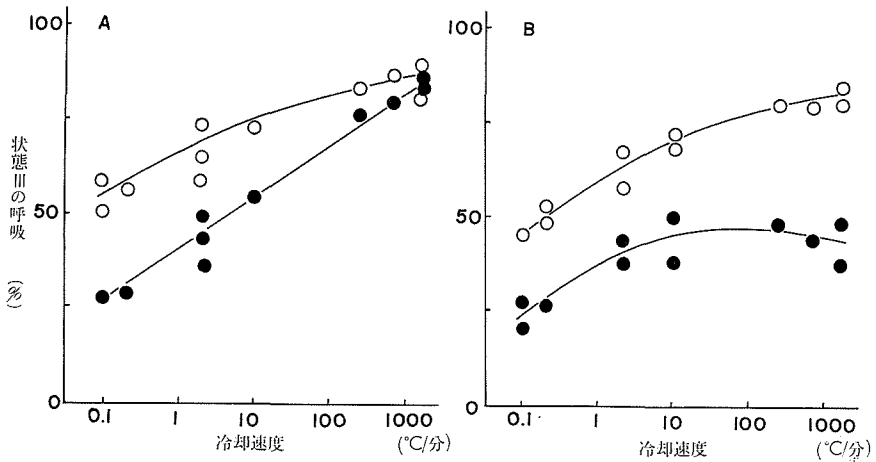
### III. 結 果

家兎の肝臓から採り出したミトコンドリアでは、コハク酸を基質とした場合、状態 III の呼吸能は 72~94 m $\mu$  atom O/分/mg 蛋白質で、呼吸調節率及び ADP/O 比はそれぞれ 4.01~4.44 及び 1.82~1.96 であり、また、 $\alpha$ -ケトグルタル酸を基質とした場合、状態 III の呼吸能は 11.1~21.6 m $\mu$  atom O/分/mg 蛋白質で、呼吸調節率及び ADP/O 比は各々 5.18~5.90, 2.58~2.72 で調製日によって相当活性が異なった。このように元の活性の異なるミトコンドリアであっても、0.1°C/分~1500°C/分間の各種の冷却速度で -196°C まで凍結し、融解後の活性を測定して無処理対照に対する百分率で表わすと、その変化はいずれの試料でも同一傾向を示した。

第1図Aにみられるように、ミトコンドリアを約1000°C/分の冷却速度で凍結すると、処理ミトコンドリアの呼吸能(状態III)の障害の度合は基質がコハク酸のときでも $\alpha$ -ケトグルタル酸のときでも同じで、無処理対照に対して80~85%の値を示すが、凍結の際の冷却速度が小さくなるにつれて、状態IIIの呼吸能の障害の度合は大きくなる。その低下の度合は基質がコハク酸のときよりも $\alpha$ -ケトグルタル酸のときの方が著しい傾向がみられた。例えば、冷却速度0.1°C/分の凍結処理では、基質がコハク酸のときの状態IIIの呼吸能が62%であるのに対して、 $\alpha$ -ケトグルタル酸のときの呼吸能(状態III)は25%に減少した。実験方法の項で述べたように、この呼吸の測定で得られたポーラログラムから、呼吸調節率及びADP/O比を算出し、その一例を第1図Bに示した。無処理対照ミトコンドリアの呼吸調節率は、基質がコハク酸のとき4.2で $\alpha$ -ケトグルタル酸のとき5.5であり、ADP/O比は基質がコハク酸のとき1.8で $\alpha$ -ケトグルタル酸のとき2.6であった。このようなミトコンドリアを1000°C/分ぐらいの冷却速度で凍結処理すると、呼吸調節率及びADP/O比の低下がみられた。その低下の度合は基質によって異なり、基質が $\alpha$ -ケトグルタル酸のとき特に大きかった。即ち、 $\alpha$ -ケトグルタル酸のとき5.5の呼吸調節率が3.3まで、また2.6のADP/O比が1.7まで低下した。凍結時の冷却速度が小さくなれば、呼吸調節率及びADP/O比の低下する度合も大きくなる傾向がみられた。例えば冷却速度0.1°C/分の凍結処理ではどちらの基質の場合でも呼吸調節能を示さなくなった。また、ADP/O比もコハク酸のとき1.2近くまで、 $\alpha$ -ケトグルタル酸のとき1.6ぐらいまで低下した。このように凍結の際の冷却速度の違いによって、それぞれの基質での呼吸能、呼吸調節率及びADP/O比の障害の度合が異なることがみられた。



第1図 A. 肝臓ミトコンドリアの呼吸(状態III)に及ぼす各種冷却速度による凍結融解の影響  
○, コハク酸; ●,  $\alpha$ -ケトグルタル酸  
状態IIIの呼吸は凍結処理ミトコンドリアの呼吸(状態III)の無処理対照に対する百分率で表わす  
B. 肝臓ミトコンドリアの呼吸調節率, ADP/O比に及ぼす各種冷却速度による凍結融解の影響  
呼吸調節率: ○, コハク酸; ●,  $\alpha$ -ケトグルタル酸  
ADP/O比: (⊕), コハク酸; (⊖),  $\alpha$ -ケトグルタル酸



第2図 A. 0.5 M 蔗糖溶液に浮遊したミトコンドリアの呼吸(状態 III) に及ぼす各種冷却速度の凍結融解の影響  
○, コハク酸; ●,  $\alpha$ -ケトグルタル酸  
B. 0.1 M 蔗糖溶液に浮遊したミトコンドリアの呼吸(状態 III) に及ぼす各種冷却速度の凍結融解の影響  
○, コハク酸; ●,  $\alpha$ -ケトグルタル酸

そこで、凍結前のミトコンドリアの形態が異なっても同じ傾向がみられるかどうかを検討してみた。ミトコンドリアの容積及び形態は浮遊外液の蔗糖濃度の変化と共に変ることが報告<sup>13)</sup>されているので、ミトコンドリアの機能には殆んど影響しない範囲内で浮遊液の蔗糖濃度を変えて、ミトコンドリアの収縮又は膨潤した状態と凍結時の冷却速度との関係を調べてみた結果を第2図に示す。0.5 M 蔗糖溶液に浮遊したミトコンドリアを各種冷却速度で凍結処理した場合、その処理ミトコンドリアの状態 III の呼吸能は等張溶液の場合(第1図 A)と殆んど同じ障害の度合及び傾向を示した(第2図 A)。0.1 M 蔗糖溶液に浮遊したミトコンドリアを凍結処理した場合、基質が $\alpha$ -ケトグルタル酸のときの呼吸能が急速凍結(冷却速度 100~1000°C/分)で著しく障害を受け 37~42% にまで低下した(第2図 B)。それ以外は殆んど等張溶液の場合と変りなかった。このように凍結時の冷却速度が小さいとき、凍結障害の度合は凍結前のミトコン

第1表 凍結処理ミトコンドリアの $\alpha$ -ケトグルタル酸酸化に及ぼす $\text{NAD}^+$ の効果

処 理 条 件	$\alpha$ -ケトグルタル酸の酸化 ( $\text{m}\mu$ atom O/分/mg 蛋白質)		増 加 率	
	無 添 加	$\text{NAD}^+$ 添加		
無 処 理 対 照	I	21.1	21.1	1.00
	II	18.8	18.8	1.00
急速凍結 (1200°C/分)	I	16.7	16.7	1.00
	II	15.6	15.7	1.01
緩慢凍結 (0.2°C/分)	I	5.3	7.2	1.46
	II	4.7	6.1	1.40
低張溶液浮遊後急速凍結 (1200°C/分)	I	6.7	6.7	1.00
	II	5.6	6.0	1.07

I 及び II は調製日の異なる試料を用いた実験である

ドリアの収縮又は膨潤した状態と関係なく殆んど同程度であるのに対して、冷却速度が大きくなると、膨潤したミトコンドリアの $\alpha$ -ケトグルタル酸の酸化系が凍結障害を受け易くなった。

この $\alpha$ -ケトグルタル酸酸化能の凍結による低下がどうして起るかを検討してみた。 $\alpha$ -ケトグルタル酸の酸化には $\text{NAD}^+$ が関連しており、ミトコンドリアに存在する $\text{NAD}^+$ が凍結処理によって何んらかの変化を受けるために酸化能の低下がもたらされることも考えられる。そこで、処理ミトコンドリアの $\alpha$ -ケトグルタル酸の酸化に及ぼす $\text{NAD}^+$ の影響を調べた。第1表に示すように、無処理対照及び急速凍結処理ミトコンドリアでは、 $\text{NAD}^+$ の添加によって $\alpha$ -ケトグルタル酸の酸化の促進は認められなかった。また、低張溶液に浮遊したミトコンドリアを急速凍結した場合でも、 $\text{NAD}^+$ の添加による酸化促進はみられなかった。しかし、緩慢凍結処理ミトコンドリアでは、 $\text{NAD}^+$ の添加によって $\alpha$ -ケトグルタル酸の酸化速度が無添加の場合に比べて1.40~1.46倍に促進された。このことから、緩慢凍結した場合、ミトコンドリアにもともと存在している $\text{NAD}^+$ が反応に寄与できないような存在状態の変化が凍結処理によって引き起されていると考えられる。しかし、いずれの凍結処理ミトコンドリアでも、 $\text{NAD}^+$ が十分に存在するときの $\alpha$ -ケトグルタル酸の酸化能は無処理対照の場合に比べて小さいことから、 $\alpha$ -ケトグルタル酸の酸化系の酵素が障害を受けていると考えられる。

この $\alpha$ -ケトグルタル酸の酸化系のどの部分が凍結障害を受けているかを検討するため、処理ミトコンドリアを $56,000 \times g$ , 30分間遠心分離して、上清部分と沈渣部分とに分け、それぞれの $\alpha$ -ケトグルタル酸脱水素酵素の活性を調べてみた。等張溶液に浮遊したミトコンドリアを緩慢凍結した場合と、低張溶液に浮遊したミトコンドリアを急速凍結した場合では $\alpha$ -ケトグルタル酸の酸化系(状態 III の呼吸)がより顕著に凍結障害を受けるので、両者の凍結試料での実験結果を第2表に示す。 $\alpha$ -ケトグルタル酸脱水素酵素の活性は急速凍結によって75%に低下するが、緩慢凍結によっては著しく低下し、20%近くまで減少した。この酵素活性は、どちらの凍結条件で処理しても、全部 $56,000 \times g$ , 30分の遠心で沈澱する部分に認められ、上清部

第2表 ミトコンドリアの $\alpha$ -ケトグルタル酸脱水素酵素活性に及ぼす凍結融解の影響

凍結条件	試料	蛋白質濃度 (mg/ml)	$\alpha$ -ケトグルタル酸脱水素酵素の活性 ( $m\mu$ mole NADH/分/0.1 ml 試料)
無処理	ミトコンドリア浮遊液 (0.25 M 蔗糖)	30.9	12.93 (4.18)*
冷却速度 0.2°C/分	ミトコンドリア浮遊液 (0.25 M 蔗糖)	30.9	2.64 (0.85)*
	上清	10.7	0
	沈渣	21.4	2.66 (1.24)*
冷却速度 (1200°C/分)	ミトコンドリア浮遊液 (0.1 M 蔗糖)	30.0	9.07 (3.23)*
	上清	5.3	0
	沈渣	25.1	10.58 (4.21)*

\* 括弧内は $\alpha$ -ケトグルタル酸脱水素酵素の比活性 ( $m\mu$  mole NADH/分/mg 蛋白質)

分には全く認められなかった。このように、ミトコンドリアを急速凍結した場合、 $\alpha$ -ケトグルタル酸の酸化系全体としての活性は40%前後まで低下する(第2図B)にも拘らず、 $\alpha$ -ケトグルタル酸脱水素酵素の活性は75%にしか低下しないことから、脱水素反応以後の酸化系に変化が起っていると考えられる。これに対して、緩慢凍結の場合は、 $\alpha$ -ケトグルタル酸の酸化系全体としての活性も $\alpha$ -ケトグルタル酸脱水素酵素の活性も20~25%に低下することから、酵素自身が失活しているか、または基質と反応できないような膜構造の変化が起っていると考えられる。

#### IV. 考 察

ミトコンドリアの凍結障害の機構を明らかにするためには、凍結処理後、その機能がどのように変化しているかを知らねばならないであろう。実験の結果、凍結融解したミトコンドリアでは凍結時の冷却速度によって異なった凍結障害がみられた。

大きな冷却速度で凍結処理した場合、コハク酸及び $\alpha$ -ケトグルタル酸の酸化系は障害を受け、特に低張溶液に浮遊したミトコンドリアほど、 $\alpha$ -ケトグルタル酸の酸化系の障害が顕著であるが、 $\text{NAD}^+$ を補足しても呼吸の促進は認められない。このように、 $\alpha$ -ケトグルタル酸の酸化系全体としての呼吸の低下は著しいのに比べて、 $\alpha$ -ケトグルタル酸脱水素酵素の活性の低下は僅かである。しかも、凍結処理後 $56,000\times g$ 、30分間の遠心上清部に $\alpha$ -ケトグルタル酸脱水素酵素の活性は認められない。従って、急速凍結によってミトコンドリアにもともと存在する $\text{NAD}^+$ の存在状態の変化及び膜からの $\alpha$ -ケトグルタル酸脱水素酵素の脱離が起るほどではないが、 $\alpha$ -ケトグルタル酸の脱水素反応によって生じる電子が電子伝達系にスムーズに伝達されないような膜構造の変化が起っていると考えられる。Inabaら<sup>14)</sup>は0.05M蔗糖溶液に浮遊したミトコンドリアをドライ・アイス-アセトンで凍結融解を3回繰り返してから遠心分離すると $144,000\times g$ 、30分間の遠心上清部分に $\alpha$ -ケトグルタル酸脱水素酵素の活性の77%が認められるが、ミトコンドリア内膜の破片に相当する $33,000\times g$ 、15分~ $144,000\times g$ 、30分の部分に残り23%の活性がみられることを報告している。従って、低張溶液に曝らされて膨化したミトコンドリアは内部の水分量が増加しているために大きな冷却速度で凍結されれば、急速な脱水でミトコンドリア膜内を急激に水が移動することによって膜の破壊が起り断片化されることが予想される。しかし、一般に生細胞でみられるように、膨化したミトコンドリアの内部に氷晶が形成される可能性もあり、それによって膜の破壊が起ることも考えられる。

これに対して、小さな冷却速度で凍結処理した場合、冷却速度が小さいほどコハク酸及び $\alpha$ -ケトグルタル酸の酸化系の障害の度合は大きくなる。 $\alpha$ -ケトグルタル酸を酸化するとき、 $\text{NAD}^+$ の添加で呼吸が促進されること、また、 $\alpha$ -ケトグルタル酸脱水素酵素のミトコンドリア膜からの脱離はみられないが、活性が著しく低下することがみられた。従って、ミトコンドリア膜に於いて $\text{NAD}^+$ の存在状態が変化するとともに、 $\alpha$ -ケトグルタル酸脱水素酵素の失活又は基質と反応できないような膜構造の変化が起っていると考えられる。この緩慢凍結による膜構造の変化がどうして起るかを考察するとき、次のような実験事実から、その変化の原因が示唆されるであろう。1) 緩慢凍結による障害は凍結前の浮遊液の蔗糖濃度(0.1M~0.5M)には無

関係である。2) 急速凍結したミトコンドリアを  $-25^{\circ}\text{C}$  に保持すると、短時間のうちに呼吸調節能を失い、徐々にあるが状態 III の呼吸能が低下する。但し、 $-40^{\circ}\text{C}$  以下の温度ではそのような変化はみられない<sup>15)</sup>。3) Lusena<sup>8)</sup> はミトコンドリアを  $-5^{\circ}\text{C}$  ~  $-20^{\circ}\text{C}$  に凍結保存することによるグルタミン酸脱水素酵素の脱離と各凍結温度で濃縮される濃度に相当する蔗糖溶液に浮遊したミトコンドリアからのグルタミン酸脱水素酵素の脱離がほぼ一致することを報告している。これらの事実から、冷却速度が小さい場合の凍結障害は  $-40^{\circ}\text{C}$  以上の比較的高い温度で濃縮された溶液中に長時間曝されることによると考えられる。このことは、高濃度の蔗糖溶液によるグルタミン酸脱水素酵素の構造及び活性の変化が報告<sup>16)</sup> されていることから支持される。しかし、緩慢凍結によって障害を受けたミトコンドリアと非常によく似た現象が臓器の虚血状態又はエイジング (Ageing) によって障害を受けたミトコンドリアでみられている。これらの障害はミトコンドリアに内在するホスホリパーゼ A の作用で生ずるリゾレンチンによって引き起されることが示唆<sup>17,18)</sup> されている。従って、凍結融解過程で内在するホスホリパーゼ A が作用して障害を引き起こすことも考えられるが、この点に関しては今後の検討に俟ねばならない。

## V. 摘 要

ミトコンドリア膜の凍結障害の機構を明らかにするため、凍結融解による膜構造の変化を捉える観点から、ミトコンドリアの酸化系の変化を凍結条件との関連において調べた。

1) 凍結融解によるミトコンドリアの呼吸障害は冷却速度が小さいほど大きかった。その度合はコハク酸の酸化系と  $\alpha$ -ケトグルタル酸とで異なることがみられた。

2) 凍結前のミトコンドリア浮遊液の滲透濃度を変えて凍結処理した場合、低張溶液に浮遊したミトコンドリアの  $\alpha$ -ケトグルタル酸の呼吸能は急速凍結によって障害を受け易いが、コハク酸の呼吸能は急速凍結でも等張溶液のときと同じであった。緩慢凍結による障害の度合は等張溶液のときと殆んど同じで、滲透濃度に無関係であった。

3) 無処理又は急速凍結処理ミトコンドリアの  $\alpha$ -ケトグルタル酸の酸化速度は、低張溶液の場合でも、 $\text{NAD}^+$  の添加によって促進されないが、緩慢凍結処理ミトコンドリアでは  $\text{NAD}^+$  の添加によって酸化速度の促進がみられた。

4) 低張溶液に浮遊したミトコンドリアを急速凍結した場合では、 $\alpha$ -ケトグルタル酸の酸化速度の低下ほど  $\alpha$ -ケトグルタル酸脱水素酵素の活性低下は認められないが、緩慢凍結したミトコンドリアでは  $\alpha$ -ケトグルタル酸の酸化速度の低下と  $\alpha$ -ケトグルタル酸脱水素酵素の活性の低下が殆んど同じであった。しかし、いずれの凍結処理でも、 $\alpha$ -ケトグルタル酸脱水素酵素の活性は  $56,000 \times g$ , 30 分間の遠心上清部分に認められなかった。

## 文 献

- 1) 荒木 忠 1965 酵母細胞の醗酵に及ぼす凍結融解の影響. 低温科学, 生物篇, **23**, 97-109.
- 2) 荒木 忠 1969 酵母細胞に於けるバスツール効果に及ぼす凍結融解の影響. 低温科学, 生物篇, **27**, 31-40.
- 3) Green, D. E. and Perdue, J. F. 1966 Correlation of mitochondrial structure and function. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **137**, 667-684.



- 4) Crane, F. L., Stiles, J. W., Prezbindowski, K. S., Ruzicka, F. J. and Sun, F. F. 1968 The molecular organization of mitochondrial cristae. *In* Regulatory Functions of Biological Membranes, (J. Färnefelt, *ed.*), Elsevier Publ., Amsterdam, London, N. Y., 21-56.
- 5) Racker, E. 1967 Resolution and reconstitution of the inner mitochondrial membrane. *Fed. Proc.*, **26**, 1335-1340.
- 6) Privitera, C. A., Greiff, D., Strength, D. R., Anglin, M., and Pinkerton, H. 1958 Oxidative phosphorylation by mitochondrial suspensions after freezing and storage at low temperatures. *J. Biol. Chem.*, **233**, 524-527.
- 7) Trump, B. F., Young, D. E., Arnold, E. A., and Stowell, R. E. 1965 Effects of freezing and thawing on the structure, chemical constitution, and function of cytoplasmic structures. *Fed. Proc.*, **24**, Suppl. 15, 114-168.
- 8) Lusena, C. V. 1965 Release of enzymes from rat liver mitochondria by freezing. *Can. J. Biochem.*, **43**, 1787-1798.
- 9) Whittaker, V. P. 1966 The ultrastructure of mitochondria. *In* Regulation of Metabolic Processes in Mitochondria, (J. M. Tager, S. Papa, E. Quagliariello, and E. C. Slater, *eds.*), Elsevier Publ., Amsterdam, London, N. Y., 1-27.
- 10) Hagihara, B. 1961 Techniques for the application of polarography to mitochondrial respiration. *Biochim. Biophys. Acta*, **46**, 134-142.
- 11) Chance, B., and Williams, G. R. 1956 The respiratory chain and oxidative phosphorylation. *Advanc. Enzymol.*, **17**, 65-134.
- 12) Kaufman, S. 1955  $\alpha$ -Ketoglutaric dehydrogenase system and phosphorylating enzyme from heart muscle. *In* Methods in Enzymology, (S. P. Colowick, and N. O. Kaplan, *eds.*), Acad. Press Inc., N. Y., Vol. 1, 714-722.
- 13) Stoner, C. D. and Sirak, H. D. 1969 Osmotically-induced alterations in volume and ultrastructure of mitochondria isolate from rat liver and bovine heart. *J. Cell Biol.*, **43**, 521-538.
- 14) Inaba, K., Wakabayashi, A. and Oda, T. 1967 Localization of TCA Cycle dehydrogenases in the mitochondria. *Acta Med. Okayama*, **21**, 167-176.
- 15) 荒木 忠 (未発表).
- 16) Yielding, K. L. 1970 Modification by sucrose of the catalytic activity and physical properties of glutamic dehydrogenase. *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, **38**, 546-551.
- 17) Honjo, I. and Ozawa, K. 1968 Lysolecithin inhibition of mitochondrial metabolism. *Biochim. Biophys. Acta*, **162**, 624-627.
- 18) 小沢和恵・本庄一夫 1969 疾患とミトコンドリア, 特に Ischemia 効果を中心にして. 蛋白質・核酸・酵素, **14**, 894-905.

### Summary

In order to elucidate the mechanism of freezing injury sustained by the mitochondrial membrane, one of the most important intracellular membraneous structures, changes in the oxidation systems were examined under various freezing conditions. The results obtained from this experiment are as follows.

1) Mitochondrial respiration (State III) was more or less hindered by freeze-thawing, depending upon the cooling rate; the respiration rate decreased as the cooling rate became slow. In comparison to substrates of succinate and  $\alpha$ -ketoglutarate, the most noticeable reduction of the respiration rate was found in the latter substrate in slow freezing.

2) Mitochondria, suspended in hyper- (0.5 M) and hypotonic (0.1 M) sucrose solution, showed no change in respiration in comparison to the suspension in isotonic solution,

except for the fact that the respiration with  $\alpha$ -ketoglutarate was reduced by rapid freezing.

3) In the examination of the effect of addition of  $\text{NAD}^+$  in the assay system, the oxidation rate of  $\alpha$ -ketoglutarate was accelerated after slow freezing, whereas no change was seen in the control and rapidly frozen-thawed specimens.

4) The activity of  $\alpha$ -ketoglutaric dehydrogenase showed a higher reduction by slow freezing than by rapid freezing. According to the centrifugation test of the frozen and thawed specimens it was shown that there was no release of  $\alpha$ -ketoglutaric dehydrogenase into the supernatant fluid.