HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	ミトコンドリア膜の凍結障害　II ： ミトコンドリアの酸化系の凍結障害を受ける部位について
Author(s)	荒木, 忠
Citation	低温科學. 生物篇, 30, 23-31
Issue Date	1972-12-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/17795
Type	departmental bulletin paper
File Information	30_p23-31.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

Tadashi ARAKI 1972 Freezing Injury of the Mitochondrial Membrane II. A Site, Susceptible to Freeze-thawing, in the Oxidation Systems of Rabbit Liver Mitochondria. *Low Temperature Science, Ser.* ***B, 30.*** (With English Summary p. 30)

ミトコンドリア膜の凍結障害

II. 肝臓ミトコンドリアの酸化系の凍結障害を受ける部位について*

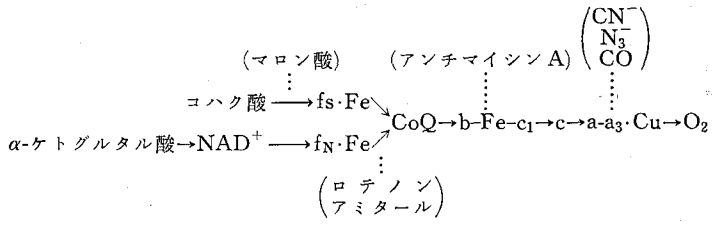
荒　木　　忠
(低温科学研究所)

(昭和47年8月受理)

I. 緒　　言

前報[1]でも述べたように，膜状構造の凍結障害は生細胞の凍結障害と密接に関連しており，膜状構造における構成成分の配列のどの部位がどのように凍結融解によって変化されるかを調べることは細胞障害の機構を明らかにする上からも，また膜構造の維持における水の役割を知る上からも，大きな意味を持っていると考える。

このような観点から，膜を構成している蛋白が酵素活性を有し，その変化を生化学的に調べることのできるミトコンドリアを用いて，膜状構造の凍結障害の機構を明らかにすることを目的とした。第1報[1]では，ミトコンドリアの酸化機能に及ぼす凍結融解の影響を冷却速度との関係で調べ，コハク酸及びα-ケトグルタル酸の酸化系が障害を受けることを示した。このコハク酸及びα-ケトグルタル酸のような基質はミトコンドリアにおいて，第1図のような経路で酸化されるとされている。



第1図　ミトコンドリアの電子伝達酸化系と代表的な阻害剤（カッコ内）の作用

fs·Feはコハク酸脱水素酵素，f_N·FeはNAD^+脱水素酵素，CoQは補酵素Q，b-Fe-c_1はチトクロームC還元酵素，cはチトクロームC，a-a_3·Cuはチトクローム C 酸化酵素を表わす。

本実験では，このコハク酸及びα-ケトグルタル酸の酸化系のどの部位が凍結障害を受けるかをいろいろな阻害剤や電子受容体を用いて調べ，それらの酸化還元酵素の膜における存在位置との関連において凍結障害の機構の考察を試みた。

* 北海道大学低温科学研究所業績　第1207号

II. 材料及び方法

ミトコンドリアの調製： 家兎の肝臓より，Whittakerの方法[2]で分画調製したミトコンドリアを0.21 M ソルビット，0.07 M 庶糖，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。

凍結融解処理： ミトコンドリア浮遊液を0.1～1.0 mlずつ試験管 (内径9 mm) 又は平底ステンレス缶 (内径25 mm，高さ6 mm) に入れ，各種の冷却速度で凍結させた後，30°C の温浴槽に移し急速に融解させた。冷却速度0.1°C/分 で凍結する場合は，試験管に入れた試料1.0 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，0.1°C/分 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 (−196°C) まで冷却した。冷却速度500°C/分 で凍結する場合は，試料0.5～1.0 mlを液体窒素に直接浸して凍結させ，その温度まで冷却した。冷却速度約2000°C/分 で凍結する場合は，平底ステンレス缶に入れた試料0.1～0.4 mlを融点付近の温度 (約 −150°C) に下げたフレオン22に浸して凍結させた後，液体窒素に移し，その温度まで冷却した。

ミトコンドリア膜の可溶化： 無処理又は凍結処理ミトコンドリア浮遊液に0.01 mg/mg 蛋白ビタミンE，0.5 M 塩化カリウム，2 mM EDTAを補充し，これに100 mg/ml コール酸ナトリウムを最終濃度0.3 mg/mg 蛋白となるように加え，30°C で攪拌しながら15分間反応させて膜を可溶化させた。浮遊液中の蛋白質量は血清アルブミンを標準液として，ビウレット法で定量した。

酵素活性の測定： 呼吸能 (酸化系全体としての活性) は萩原の方法[3]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 での酸素の吸収量を測定し，mg 蛋白質当りの吸収される酸素量 n atoms で表わした。

コハク酸及びNADH脱水素酸素の活性は電子受容体として2,6-ジクロロフェノールインドフェノール (以下DCIPと略す) を用い，その還元を波長600 nmでの吸収の減少によって測定し，モル吸光係数を $21.0\times10^3\ cm^{-1}M^{-1}$ として算出した。反応混液は10 mM 燐酸カリウム (pH 7.4)，2 mM 窒化ナトリウム，5 mg/ml 牛血清アルブミン，30 μg/ml DCIP，10 mM コハク酸ナトリウム又は1 mM NADH 及び酵素としてのミトコンドリア試料から成る。反応は25°C で基質を添加して開始させた。コハク酸脱水素酵素の活性化はミトコンドリア試料を50 mM 燐酸カリウム (pH 7.4)，10 mg/ml 牛血清アルブミン，40 mM コハク酸ナトリウム，2 mM 窒化ナトリウム混液に浮遊し，30°C で15分間孵置して行なった。

α-ケトグルタル酸脱水素酵素の活性はKaufman[4]の方法に従って，1 μg/ml アンチマイシンAの存在下で NAD^+ の還元を波長340 nmの吸収で測定し，モル吸光係数を $6.22\times10^3\ cm^{-1}M^{-1}$ として算出した。

コハク酸及びNADH-チトクロームC還元酵素の活性はフェリチトクロームCの還元を波長550 nmでの吸収の増加によって測定し，モル吸光係数を $19.2\times10^3\ cm^{-1}M^{-1}$ として算出した。反応混液は20 mM 燐酸カリウム (pH 7.4)，2 mM 窒化ナトリウム，10 μM EDTA，0.7 mg/ml フェリチトクロームC (Sigma Chemical Co.)，10 mM コハク酸ナトリウム又はNADH及びミトコンドリア試料から成り，反応は25°C で基質を添加してから開始させた。特に，ロ

テノン感受性 NADH-チトクローム C 還元酵素の場合は予め基質無添加の反応混液に 30 μM ロテノンを加えて1分間静置後，基質を添加して反応を開始させた。

チトクローム C 酸化酵素の活性はフェロチトクローム C の酸化を波長 550 nm での吸収の減少によって測定し，モル吸光係数を $19.2\times10^3\ cm^{-1}M^{-1}$ として算出した。反応混液は 20 mM 燐酸カリウム (pH 7.4)，0.4 mM フェロチトクローム C (Sigma Chemical Co., type III をアスコルビン酸で還元したもの) 及びミトコンドリア試料から成り，25°C で基質の添加によって反応を開始させた。

III. 結　　果

コハク酸の酸化系：コハク酸の酸化能は無処理対照ミトコンドリアでは 51.7 n atoms/mg 蛋白/分であるが，冷却速度 500°C/分で凍結処理したミトコンドリアでは 48.0 n atoms/mg 蛋白/分に減少し，無処理対照に比べて 93% であった。この冷却速度より大きい約 2000°C/分で凍結処理したミトコンドリアでは 45.2 n atoms/mg 蛋白/分，またこの冷却速度より小さい 0.1°C/分で凍結処理したミトコンドリアでは 36.4 n atoms/mg 蛋白/分の活性を示し，各々無処理対照に比べて 88%，70% で，凍結融解による活性の低下がみられた。しかも，凍結時の冷却速度が 500°C/分より大きくても小さくても，活性の低下率が大きくなる傾向がみられた。このような，凍結障害がコハク酸の酸化系のどの部位で起っているかを調べるため，凍結処理したミトコンドリアを試料とし，低張な反応液中でコハク酸脱水素酵素及びコハク酸-チトクローム C 還元酵素の活性を測定した (第1表)。電子受容体 DCIP の還元で測定したコハク酸脱水素

第1表　ミトコンドリアのコハク酸の酸化系に及ぼす凍結融解の影響

凍結条件	コハク酸の酸化		コハク酸脱水素酵素		コハク酸-チトクローム C 還元酵素 (n moles 還元されるチトクローム C/mg 蛋白/分)
	n atoms/mg 蛋白/分	%	n moles 酸化されるコハク酸/mg 蛋白/分	%	
無処理対照	51.7	100	50.6	100	12.8
冷却速度 0.1°C/分	36.4	70	43.5	86	35.4
冷却速度 500°C/分	48.0	93	49.1	97	13.0
冷却速度 約2000°C/分	45.2	88	48.1	95	19.4

酵素の活性をみると，冷却速度 500°C/分又は約 2000°C/分で凍結処理した試料でも各々 49.1，48.1 n moles/mg 蛋白/分で，無処理対照ミトコンドリアの活性 50.6 n moles/mg 蛋白/分と殆んど変化は認められなかった。僅かに凍結融解による活性の低下がみられたのは，冷却速度 0.1°C/分で凍結処理した場合で，その活性は 45.5 n moles/mg 蛋白/分に減少し，無処理対照に比べて 86% の活性であった。

コハク酸-チトクローム C 還元酵素の活性は冷却速度 500°C/分で凍結処理した場合 13.0 n moles/mg 蛋白/分で，無処理対照ミトコンドリアの活性 12.8 n moles/mg 蛋白/分と殆んど同じであるが，冷却速度約 2000°C/分又は 0.1°C/分で凍結処理した場合，その活性は各々

19.4, 35.4 n moles/mg 蛋白/分で無処理対照の活性の約1.5倍及び2.8倍に増加した。以上の結果は，電子受容体又は基質の酵素えの接近が膜によって影響されているとも考えられるので，凍結融解したミトコンドリアをコール酸ナトリウムで可溶化してから，コハク酸脱水素酵素，コハク酸-チトクロームC還元酵素及びチトクロームC酸化酵素の活性を測定した。

第2表 凍結処理後コール酸で可溶化したミトコンドリアのコハク酸酸化系に関与する各酵素の活性

凍結条件	コハク酸脱水素酵素 (n moles酸化されるコハク酸/mg 蛋白/分)		コハク酸-チトクロームC還元酵素 (n moles 還元されるチトクロームC/mg 蛋白/分)	チトクロームC酸化酵素 (n moles 酸化されるチトクロームC/mg 蛋白/分)
	—	活性化		
無処理対照	87.4	126	84.6	214
冷却速度 0.1℃/分	89.6	132	85.7	218
冷却速度 500℃/分	93.4	129	82.5	188
冷却速度 約2000℃/分	90.8	120	84.9	204

その結果は第2表に示すように，コハク酸脱水素酵素の活性はコール酸での可溶化によって増大し，無処理対照の活性は87.4 n moles/mg 蛋白/分で，可溶化しない場合 (50.6) の約1.7倍に増加した。凍結融解したミトコンドリアでも，可溶化によって，この酵素の活性は無処理対照の場合と同じように増大するが，凍結融解による活性の低下は認められなかった。この酵素は基質存在下，30℃での孵置という前処理によって活性化され，その比活性が増大することが知られている。そこで，無処理対照と凍結処理したものとで同じ活性を示しても，質的な違いが考えられるので，基質による酵素の活性化を調べてみた。しかし，無処理対照と凍結処理したものとで，この酵素の活性化に差は認められなかった。

コハク酸-チトクロームC還元酵素の場合にも，コール酸による可溶化で酵素活性の増大がみられ，無処理対照のものの活性 (84.6 n moles/mg 蛋白/分) と凍結処理のものの活性 (85.7, 82.5, 84.9) とで差は認められなかった。

チトクロームC酸化酵素の場合でも，無処理対照のものの活性は214 n moles/mg 蛋白/分で，凍結処理したものの活性は各々218, 188, 204 n moles/mg 蛋白/分で差はみられず，凍結融解による酵素活性の低下は認められなかった。

以上のように，ミトコンドリアを凍結処理してから可溶化した場合の各酵素活性に可溶化した無処理対照の活性との差が認められないことから，可溶化しないミトコンドリアのコハク酸脱水素酵素の凍結による僅かな活性低下は，酵素蛋白自身が失活するのではなく，基質と酵素蛋白との接近が妨げられるような変化によって起ると考えられる。

α-ケトグルタル酸の酸化系： α-ケトグルタル酸の酸化系全体としての活性は，凍結融解によって，処理条件により度合は異なるが低下することがみられた。無処理対照ミトコンドリアでは，その活性は18.1 n atoms/mg 蛋白/分であるが，冷却速度0.1℃/分で凍結処理したミトコンドリアでは7.2 n atoms/mg 蛋白/分に減少した。また，冷却速度500℃/分及び約2000℃/分

で凍結処理したミトコンドリアでの活性は各々 16.3, 11.2 n atoms/mg 蛋白/分 に低下した。このように，凍結処理したミトコンドリアでの α-ケトグルタル酸の酸化系全体としての活性は冷却速度が 500°C/分 より大きくても小さくても著しく減少した。この酸化系のどの段階が凍結融解によって障害を受けるのかを調べるため，凍結処理したミトコンドリアを用い，α-ケトグルタル酸脱水素酵素群及び NADH 脱水素酵素の活性を低張な反応溶液中で測定した(第 3 表)。

第 3 表 ミトコンドリアの α-ケトグルタル酸の酸化系に及ぼす凍結融解の影響

凍結条件	α-ケトグルタル酸の酸化		α-ケトグルタル酸脱水素酵素群		NADH 脱水素酵素
	n atoms O/mg 蛋白/分	%	n moles 還元される NAD^+/mg 蛋白/分	%	(n moles酸化される NADH/mg 蛋白/分)
無処理対照	18.1	100	4.04	100	152
冷却速度 0.1°C/分	7.2	40	1.41	35	161
冷却速度 500°C/分	16.3	90	3.63	90	146
冷却速度 約2000°C/分	11.2	62	2.10	52	162

無処理対照ミトコンドリアでの α-ケトグルタル酸脱水素酵素群の活性は，4.04 n moles/mg 蛋白/分 で酸化系全体としての活性 (18.1 n atoms/mg 蛋白/分) に比べて 22% と著しく低かった。しかし，冷却速度 0.1°C/分 で凍結処理したミトコンドリアでは，この酵素活性は 1.41 に低下し，冷却速度 500°C/分 及び約 2000°C/分 で凍結処理したミトコンドリアでは各々 3.63, 2.10 n atoms/mg 蛋白/分 に低下し，酸化系全体としての活性の場合と同じ傾向で低下することがみられた。これに反して，NADH 脱水素酵素の場合，無処理対照ミトコンドリアでのこの酵素活性は 152 n moles/mg 蛋白/分 で，いずれの凍結処理をしたミトコンドリアでも，この酵素活性は 146～162 n moles/mg 蛋白/分 で，凍結融解による活性の変化はみられなかった。これらの無処理又は凍結処理ミトコンドリアをコール酸ナトリウムで可溶化してから，各酵素の活性を測定した結果を第 4 表に示す。

コール酸で膜を可溶化すると，α-ケトグルタル酸脱水素酵素群の活性は，無処理対照のも

第 4 表 凍結処理後コール酸で可溶化したミトコンドリアの α-ケトグルタル酸の酸化系に関与する各酵素の活性

凍結条件	α-ケトグルタル酸脱水素酵素群		NADH–チトクローム C 還元酵素 (n moles 還元されるチトクローム C/mg 蛋白/分)	
	n moles 還元される NAD^+/mg 蛋白/分	%	ロテノン感受性	ロテノン非感受性
無処理対照	2.48	100	19.1 ± 6.1	45.2 ± 7.6
冷却速度 0.1°C/分	0.98	39	18.4	46.9
冷却速度 500°C/分	2.02	81	20.5	46.3
冷却速度 約 2000°C/分	1.82	73	17.8	48.7

のでも 2.48 n moles/mg 蛋白/分 に減少し，コール酸処理による失活がみられたが，凍結処理による活性の低下は，可溶化しない場合の酸化系全体としての活性及び α-ケトグルタル酸脱水素酵素群の活性の凍結による低下（第3表参照）と同一傾向を示し，凍結時の冷却速度が 500 °C/分 より大きくても小さくても，失活の度合が大きかった。

これに反して，NADH-チトクローム C 還元酵素の場合には，ロテノン感受性及び非感受性の両者とも測定値のフレは大きいが，凍結融解による活性の低下は認められなかった。特に，ミトコンドリア内膜に存在し，α-ケトグルタル酸の酸化で生じる電子の伝達に関与すると考えれるロテノン感受性 NADH-チトクローム C 還元酵素の凍結処理による失活は認められなかった。

以上のように，凍結融解による α-ケトグルタル酸の酸化系全体としての活性低下は α-ケトグルタル酸脱水素酵素群の失活によると予想される。

IV. 考 察

ミトコンドリアを凍結融解すると，コハク酸及び α-ケトグルタル酸の酸化系が障害を受け，凍結時の冷却速度が 500°C/分 より大きくても小さくても，その障害の度合が大きくなる傾向がみられた。このような凍結障害が酸化系のどこのところで起るかを調べるためには，膜構造に内蔵されている各酵素蛋白を遊離させて，基質や電子受容体及び阻害剤等の酵素との接近が反応速度を限定しないようにしなければならない。そこで，その一方法として，0.5 M 塩化カリウムの存在下でコール酸によって可溶化してから，各酵素の活性を測定した。測定された各酵素の活性の間に差があり，速度論的考察は不可能であるけれども，コハク酸の酸化系に関与する各酵素，コハク酸脱水素酸素，コハク酸-チトクローム C 還元酵素，チトクローム C 酸化酵素等では，凍結処理による活性の変化は認められなかった。一方，膜を可溶化しないミトコンドリアにおけるコハク酸脱水素酵素の活性は，酸化系全体としての活性の場合ほど，凍結による低下率は大きくないが，小さな冷却速度での凍結処理によって活性の低下がみられた。以上の結果から，コハク酸脱水素酵素蛋白自身は凍結融解によって失活されないが，膜に存在するこの酵素蛋白は基質との接近が妨げられると考えられる。また，可溶化しないミトコンドリアでのコハク酸-チトクローム C 還元酵素の活性は凍結融解によって増加することから，外から加えられるチトクローム C に対する膜の透過性が増していると考えられる。α-ケトグルタル酸の酸化系では，ミトコンドリアを可溶化したときもそうでないときも，α-ケトグルタル酸脱水素酵素群の凍結融解による失活がみられた。しかも，凍結処理によってこの酵素の活性の低下する傾向は酸化系全体としての活性の凍結による低下傾向と同じであった。一方，NADH 脱水素酵素及びロテノン感受性 NADH-チトクローム C 還元酵素等の電子伝達系の各酵素の凍結融解による失活は認められなかった。従って，α-ケトグルタル酸の酸化系全体としての活性の低下は α-ケトグルタル酸脱水素酵素群の失活によると考えられる。しかし，この酵素の活性は酸化系全体としての活性に比べて非常に小さいので，この点に関しては，今後の検討に俟ねばならない。また，酸化系に関与する各酵素の活性をコール酸で可溶化してから測定したとき，α-ケトグルタル酸脱水素酵素群やコハク酸及び NADH-チトクローム C 還元酵素の

活性は，可溶化しないミトコンドリアの酸化系全体としての活性に比べて小さかった。このことは，Singer 等が報告しているように，NADH 脱水素酵素や NADH-チトクローム C 還元酵素は可溶化の処理方法によって活性が異なるという事実[5] 及び NADH 脱水素酵素は尿素やプロテアーゼ処理によって NADH-チトクローム C 還元酵素に転換するという事実[6] から，膜の可溶化によって，これらの酵素蛋白が変化を受け，正常な膜構造を成しているときと異なるためとも考えられ，今後に残された問題であろう。

次に，凍結障害を受けるこれらの酵素の膜における存在位置から，凍結処理によるミトコンドリア膜の障害を受ける部位について考察してみた。酸化系に関与する酵素群の膜における存在位置については数多くの報告があり，Jagow 等[7] はコハク酸脱水素酵素がミトコンドリアの内膜内側の比較的表層近辺に存在し，内蔵されているチトクローム C は内膜の外側に存在していると報告している。また，α-ケトグルタル酸脱水素酵素群の存在位置について，Green 等[8-10] はミトコンドリア外膜に存在すると報告しているが，稲葉等[11] は低張溶液に曝らしたミトコンドアをドライ・アイス-アルコール中で 3 回凍結融解を繰り返し遠心分画すると，内膜の破片に相当する画分に 23% 近い活性が認められることより，内膜表面に弱く結合していると想像しており，一般には，他のクエン酸回路の酵素群と同様マトリックス内に可溶性で存在するか，或いは，内膜の内側にゆるく結合していると考えられている。このようなことから，ミトコンドリアは凍結融解によって，外から加えられるチトクローム C が内膜外側に接近できるような外膜の変化を受けると共に，α-ケトグルタル酸脱水素酵素群の失活及びコハク酸脱水素酵素への基質の接近が妨げられるような内膜内側の表層構造の変化を受けると予想される。

V. 摘　　要

膜状構造の凍結障害の機構を明らかにすることを目的とし，凍結処理によって活性の低下がみられるミトコンドリアの酸化系の障害部位を検討するため，その系に関与する各酵素群の凍結融解による活性の変化を調べた。

コハク酸の酸化系の場合，凍結融解してからコール酸で可溶化したミトコンドリアでは，コハク酸脱水素酵素，コハク酸-チトクローム C 還元酵素，チトクローム C 酸化酵素等の酵素活性の低下はみられなかった。一方，可溶化しないミトコンドリアでは，凍結融解によってコハク酸脱水素酵素の活性が減少すること，及びコハク酸-チトクローム C 還元酵素の活性が増加することがみられた。

α-ケトグルタル酸の酸化系の場合，凍結融解してから可溶化したミトコンドリアでは，NADH 脱水素酵素及び NADH-チトクローム C 還元酵素の活性の低下はみられなかった。一方，凍結処理ミトコンドリアを可溶化してもしなくても，α-ケトグルタル酸脱水素酵素群の活性の低下がみられ，その活性低下は α-ケトグルタル酸の酸化系全体としての活性の凍結処理による低下と同一傾向を示した。

以上の実験結果及び各酵素群の存在位置から，ミトコンドリアの凍結障害は凍結融解によって内膜内側の表層近辺の構造が変化を受けることによると考えられる。

文 献

1) 荒木 忠 1970 ミトコンドリア膜の凍結障害 I. 凍結融解した肝蔵ミトコンドリアの酸化系の変化について. 低温科学, 生物篇, **28**, 1-9.
2) Wittaker, 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, New York, 1-27.
3) Hagihara, B. 1961 Techniques for the application of polarography to mitochondrial respiration. *Biochim. Biophys. Acta*, **46**, 134-142.
4) Kaufman, S. 1955 α-Ketoglutaric dehydrogenase system and phosphorylating enzyme from heart muscle. *In* Methods in Enzymology (S. P. Colowick, and N. O. Kaplan, *eds.*), Academic Press, New York, **1**, 714-722.
5) Watari, H., Kearney, E. B. and Singer, T. P. 1963 Studies on the respiratory chain-linked reduced nicotinamide adenine dinucleotide dehydrogenase IV. Transformation of the dehydrogenase into cytochrome c reductase-diaphorase by the action of acid-ethanol. *J. Biol. Chem.*, **238**, 4063-4073.
6) Cremona, T., Kearney, E. B., Villavicencio, M. and Singer, T. P. 1963 Studies on the respiratory chain-linked DPNH dehydrogenase V. Transfomation of DPNH dehydrogenase to DPNH-cytochrome reductase and diaphorase under the influence of heat, proteolytic enzymes and urea. *Biochem. Z.*, **338**, 407-442.
7) Jagow, G. and Klingenberg, M. 1970 Pathways of hydrogen of mitochondria of *Saccharomyces carlsbergensis*. *Eur. Biochem. J.*, **12**, 583-592.
8) Bachmann, E., Allmann, D. W. and Green, D. E. 1966 The membrane systems of the mitochondrion I. The S fraction of the outer membrane of beef heart mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.*, **115**, 153-164.
9) Allmann, D. W., Bachmann, E. and Green, D. E. 1966 The membrane systems of the mitochondrion II. The K fraction of the outer membrane of beef heart mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.*, **115**, 165-171.
10) Green, D. E., Bachmann, E., Allmann, D. W. and Perdue, J. F. 1966 The membrane systems of the mitochondrion III. The isolation and properties of the outer membrane of beef heart mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.*, **115**, 172-180.
11) Inaba, K., Wakabayashi, A. and Oda, T. 1967 Localization of TCA cycle dehydrogenases in the mitochondria. *Acta Med. Okayama*, **21**, 167-176.

Summary

Mitochondrial membrane is one of the typical cellular membrane systems consisting of oxidative enzymes. In order to determine susceptible sites in oxidation systems to freeze-thawing, biochemical changes in enzymes related to oxidative reactions were examined under various freezing conditions. The results obtained are as follows.

1) Activities of systems oxidizing succinate and α-ketoglutarate in mitochondria were decreased by freeze-thawing. The decrease in these activities was lowest at a cooling rate of 500°C/min.

2) The activity of succinic dehydrogenase, one of the enzymes taking part in the oxidation of succinate, was slightly decreased by freeze-thawing, while that of succinate-cytochrome c reductase was markedly increased. When freeze-thawed mitochondria was solubilized by cholate, on the contrary, activities of these enzymes (suc-

cinic dehydrogenase, succinate-cytochrome c reductase, cytochrome c oxidase etc.) were hardly changed by freeze-thawing.

3) Activities of the α-ketoglutaric dehydrogenase complex and oxidized α-ketoglutarate were decreased by freeze-thawing, in particular, a marked decrease was found in the case of slow freezing. There was no change in activities of NADH dehydrogenase and NADH-cytochrome c reductase by freeze-thawing even though freeze-thawed mitochondria was solubilized.

It was suggested that alterations of the internal layer of mitochondrial inner membrane may be involved in the freeze-thaw damage to oxidation systems.