



Title	ミトコンドリア膜の凍結障害 III : 凍結融解した肝臓ミトコンドリアの α -ケトグルタル酸脱水素酵素複合体の失活の要因
Author(s)	荒木, 忠; ARAKI, Tadashi
Citation	低温科学. 生物篇, 33, 1-9
Issue Date	1976-03-18
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/17816
Type	departmental bulletin paper
File Information	33_p1-9.pdf



Tadashi ARAKI 1975 Freezing Injury in the Mitochondrial Membrane III. Some Factors Affecting the Inactivation of α -Ketoglutarate Dehydrogenase Complex in Frozen and Thawed Mitochondria. *Low Temperature Science, Ser. B, 33.* (With English Summary p. 9)

ミトコンドリア膜の凍結障害

III. 凍結融解した肝臓ミトコンドリアの α -ケトグルタル酸脱水素酵素複合体の失活の要因*

荒 木 忠

(低温科学研究所)

(昭和50年10月受理)

I. 緒 言

前報^{1,2)}でも述べたように、細胞内における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いると考えられるので、ミトコンドリアを用いて、凍結障害の機構を明らかにすることを目的として本実験を行なった。ミトコンドリアを凍結融解すると、その処理条件にもよるが酸化機能は多かれ少なかれ障害を受け、特に α -ケトグルタル酸脱水素酵素複合体の活性が著しく低下することがみられた²⁾。

本実験では、この α -ケトグルタル酸脱水素酵素複合体の凍結融解による活性低下の原因を明らかにするため、抽出した酵素複合体及びミトコンドリアに内在する酵素複合体の活性低下をもたらす要因を検討した。

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 EDTA、0.05% 牛血清アルブミンを含む 0.02 M トリス塩酸緩衝液 (pH 7.4) 中でホモゲナイズし、Hogeboom の方法³⁾ で分画調製した。得られたミトコンドリアは 0.25 M 蔗糖-0.02 M トリス塩酸緩衝液 (pH 7.4) に浮遊させて実験に供した。

α -ケトグルタル酸脱水素酵素複合体の調製： 家兎の肝臓から Sanadi らの方法⁴⁾ に従って、酵素複合体を分離し、Hirashima らの方法⁵⁾ に従って部分的に精製した。

凍結融解処理： ミトコンドリア浮遊液を 0.5~3.0 ml ずつ試験管に入れ、前報²⁾ に述べたように、冷却速度 800°C/min 又は 0.1°C/min で凍結させ、液体窒素の温度まで冷却した。その温度で充分保持してから、30°C の温浴槽中で、氷晶が消失するまで急速に融解した。

酵素活性の測定： ミトコンドリアの α -ケトグルタル酸脱水素酵素複合体の活性を測定する場合は、予めミトコンドリア浮遊液を pH 10.2 に修正してから、Artex dismembrator で 0°C、90 秒間超音波処理して、活性測定の実験に供した。活性は Sanadi の方法⁶⁾ に従って、30°C における NAD^+ の還元を波長 340 nm の吸収で測定し、モル吸光係数を $6.22 \times 10^3 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ とし

* 北海道大学低温科学研究所業績 第 1752 号

て算出した。反応混液 (pH 7.2) の組成は磷酸カリウム 200 μ moles, システイン塩酸 10 μ moles, CoA 0.15 μ mole, NAD⁺ 1 μ mole, α -ケトグルタル酸ナトリウム 5 μ moles, アンチマイシン A 6 μ g と酵素液で、全量を 3.0 ml とした。

磷脂質成分の分離と定量: ミトコンドリア及び抽出酵素複合体からの脂質は Folch らの方法⁷⁾に従って、クロロホルム-メタノール (2:1) で抽出した。これを予め 120°C で 1 時間活性化したシリカゲル H の薄層 (厚さ 0.30 mm) にスポットし、クロロホルム・メタノール・醋酸・水 (25:15:4:2 v/v) の溶媒系で展開して分離した。磷脂質の同定は同時に展開した標準磷脂質との比較によってなされた。これら磷脂質成分は、有機溶媒で溶出してから、Shibuya らの方法⁸⁾で有機燐を測定して定量した。

III. 結 果

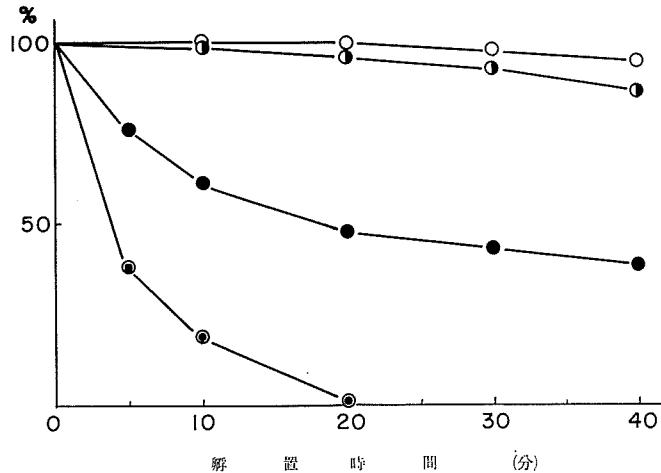
前報²⁾では、ミトコンドリアの α -ケトグルタル酸脱水素酵素複合体 (α -KGDC と略す) の凍結による活性低下の傾向は α -ケトグルタル酸の酸化系全体としての活性低下の傾向と同じであることから、 α -ケトグルタル酸の酸化系全体としての活性低下は α -KGDC の失活に由来すると考えられた。そこで、ミトコンドリアから抽出精製した α -KGDC に及ぼす凍結融解の影響を調べた。第 1 表は凍結処理による α -KGDC の活性変化を示す。ミトコンドリアの α -KGDC の活性は凍結融解によって低下し、その活性低下は急速凍結の場合 (800°C/min) より緩慢凍結の場合 (0.1°C/min) の方が著しく、無処理対照の 68% までに低下した。これに反して、ミトコンドリアから抽出した α -KGDC の活性は殆んど凍結融解の影響を受けず、緩慢凍結の場合でも低下率は 12% であった。この両者の障害度の違いは酵素複合体の存在状態の違いによる可能性も考えられるが、ミトコンドリアの α -KGDC が凍結処理後酵素活性を測定するまでの間及び測定中にも漸減することから、ミトコンドリアの α -KGDC 活性が凍結によって低下することは酵素蛋白の変性以外の要因が重複していることが示唆された。

第 1 表 α -KGDC 活性に及ぼす凍結融解の影響

試 料	凍 結 条 件	α -KGDC 活性	
		n mole NAD ⁺ /分/mg 蛋白	%
ミトコンドリア	無 処 理 対 照	42.1	100
	急速凍結 (800°C/min)	39.8	95
	緩慢凍結 (0.1°C/min)	28.6	68
抽出した α -KGDC	無 処 理 対 照	128.9	100
	急速凍結 (800°C/min)	130.4	101
	緩慢凍結 (0.1°C/min)	114.5	88

ミトコンドリアに内在する α -KGDC の活性低下に及ぼす温度及び pH の影響を調べた。第 1 図に示すように、無処理対照ミトコンドリアを 30°C で 40 分間孵置しても、 α -KGDC の活性に変化はみられないが、処理ミトコンドリアを 30°C で孵置すると、 α -KGDC の活性低下がみられた。急速凍結ミトコンドリアでは、孵置による α -KGDC の活性低下は小さいが、緩

慢凍結ミトコンドリアでは、時間の経過につれて、 α -KGDCの活性が著しく低下し、40分後には50%に低下した。超音波処理ミトコンドリアを30°Cで孵置すると、 α -KGDCの活性低下は一層著しく、孵置20分後完全に失活した。第2図はミトコンドリアの α -KGDCの失活の温度依存性を示す。無処理対照ミトコンドリアを0°Cから40°Cまでの温度で5分間孵置しても、 α -KGDCの活性に変化はみられないが、凍結処理ミトコンドリアでは、25°C以上の温度での孵置による α -KGDCの失活が著しくなった。抽出した α -KGDCの失活は32°C付近まで

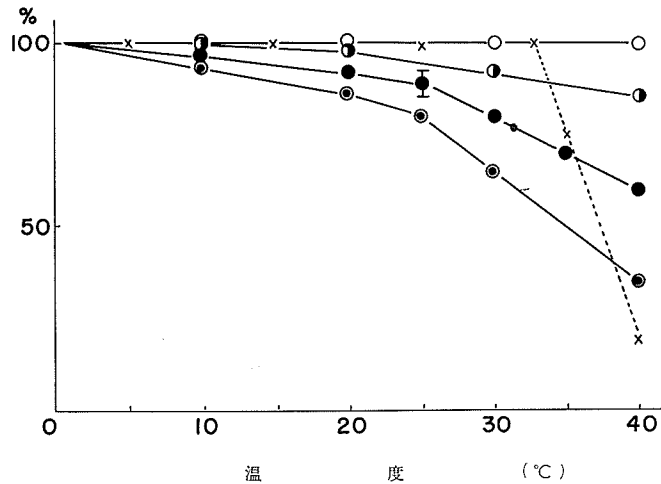


第1図 ミトコンドリアにおける α -KGDC 活性の孵置による経時的変化

pH 7.4, 30°Cにて孵置

酵素活性 (%) は孵置前の酵素活性に対する孵置後の酵素活性の百分率で表わす

○—○, 無処理ミトコンドリア; ◐—◐, 急速凍結ミトコンドリア; ●—●, 緩慢凍結ミトコンドリア; ⊙—⊙, 超音波処理ミトコンドリア



第2図 α -KGDC の活性低下の温度依存性

α -KGDC (pH 7.4) は各温度で5分間孵置してから、30°Cで酵素活性を測定した

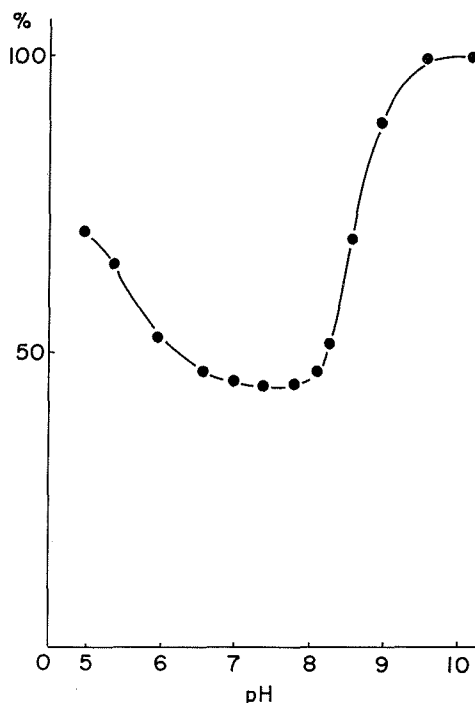
○—○, 無処理対照ミトコンドリア; ◐—◐, 急速凍結ミトコンドリア; ●—●, 緩慢凍結ミトコンドリア; ⊙—⊙, 超音波処理ミトコンドリア; ×…×, 抽出精製した α -KGDC

はみられなかった。32°C以上の温度での α -KGDCの失活は既に報告しているHirashimaらの実験結果⁵⁾と一致する。

第3図はミトコンドリアにおける α -KGDCの失活に及ぼすpHの影響を示す。緩慢凍結ミトコンドリアをpH 9.5以上で30°C 15分間孵置しても、 α -KGDCの活性の変化はみられないが、pH 6.5から8.1までの間で孵置すると、活性は著しく低下した。

α -KGDCの失活が温度及びpH依存性であることから、失活に酵素反応の介在していることが示唆された。ミトコンドリア膜は殆んど蛋白質と脂質で構成されているので、それぞれの分解酵素反応を阻害又は促進する物質の α -KGDCの失活に及ぼす影響を検討した(第2表)。蛋白質分解酵素の阻害剤であるフェニルメチルサルホニル弗化物(PMSF)及びハイドロキシマーキュリフェニルサルホン酸(HMSA)を添加して、緩慢凍結ミトコンドリアを孵置した場合、 α -KGDCの活性低下はPMSF又はHMSAの存在しない場合と

同程度で、低下率は35.2~42.9%であった。一方、遊離脂肪酸との結合力が強くミトコンドリアの安定剤である血清アルブミンの存在下では、 α -KGDCの活性低下が僅かに抑制され、低下



第3図 緩慢凍結ミトコンドリアにおける α -KGDCの失活とpHの関係

緩慢凍結ミトコンドリアは各pHで、30°C 15分間孵置してから、pH 7.2に修正し、 α -KGDCの活性を測定した

第2表 α -KGDCの活性低下に及ぼす各種添加物の影響

	α -KGDC 活性 (n mole NAD ⁺ /分/mg 蛋白)		低下率 (%)
	対 照	孵 置 後	
無 添 加	30.4	19.4	36.8
フェニルメチルサルホニル弗化物 (0.3 mM)	29.8	19.3	35.2
〃 (1.5 mM)	25.4	15.5	39.0
ハイドロキシマーキュリフェニルサルホン酸 (1.5 mM)	31.5	18.0	42.9
〃 (3.0 mM)	30.9	19.3	37.6
10 mg/ml 牛血清アルブミン	30.2	21.2	29.8
1 mM EGTA	15.6	11.9	23.7
20 mM MgSO ₄	24.3	19.9	18.1
5 mM CaCl ₂	40.2	12.9	67.9

緩慢凍結処理ミトコンドリアを上記添加物の存在下で30°C, 10分間孵置した

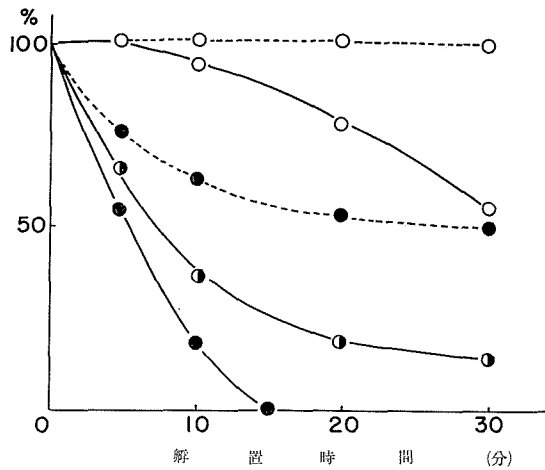
$$\text{低下率 (\%)} = \frac{\text{対照値} - \text{孵置後の値}}{\text{対 照 値}} \times 100$$

率は 29.8% であった。また、ミトコンドリアのホスホリパーゼ A を阻害すると報告⁹⁾されている EGTA 或は MgSO₄ の存在下では、活性低下が抑制され、低下率はそれぞれ 23.7%, 18.1% であった。反対に、ホスホリパーゼ A の活性を促進する CaCl₂ の存在下では、 α -KGDC の活性低下は著しく、低下率は 67.9% であった。

第 2 表の結果から、ミトコンドリアにおける α -KGDC の失活にはホスホリパーゼ A が関与していることが考えられるので、ミトコンドリアへの蛇毒ホスホリパーゼ A の作用が α -KGDC 活性にどのように影響するかを調べた。第 4 図に示すように、緩慢凍結ミトコンドリアに蛇毒ホスホリパーゼ A を作用させると、時間の経過につれて、 α -KGDC の活性が低下し、15 分後には完全に失活した。このとき、蛇毒ホスホリパーゼ A と

同時に血清アルブミンが存在すると、 α -KGDC の失活が部分的に抑制されることがみられた。無処理ミトコンドリアに蛇毒ホスホリパーゼ A を作用させると、約 5 分間 α -KGDC の活性に変化はみられないが、その後時間の経過につれて、徐々に活性の低下がみられた。

このホスホリパーゼ A による α -KGDC の失活の促進が、酵素活性を阻害する物質の産生によるのか、或は α -KGDC が直接ホスホリパーゼ A によって分解されることによるかを検討するため、抽出した α -KGDC に蛇毒ホスホリパーゼ A を作用させて、 α -KGDC の活性変化と磷脂質含量の変化との関係を調べた (第 3 表)。抽出した α -KGDC を 30°C で 30 分間孵置し



第 4 図 ミトコンドリアにおける α -KGDC の活性に及ぼす蛇毒ホスホリパーゼ A の影響

蛇毒ホスホリパーゼ A (0.01 mg/mg ミトコンドリア蛋白) 及び 10% 牛血清アルブミンの存在下、pH 7.4, 30°C にて孵置

無処理対照ミトコンドリア: ○---○, 無添加; ○—○, ホスホリパーゼ A 添加

緩慢凍結ミトコンドリア: ●---●, 無添加; ●—●, ホスホリパーゼ A 添加, ●—●, ホスホリパーゼ A 及び血清アルブミン添加

第 3 表 蛇毒ホスホリパーゼ A による α -KGDC の活性及び磷脂質の変化

処 理 条 件	酵 素 活 性 (n mole NAD ⁺ /分/mg 蛋白)	磷 脂 質 含 量 (μ g Pi/mg 蛋白)
無 処 理 対 照	129.6 (100)	3.47
30°C, 30 分間孵置	116.8 (90)	3.49
蛇毒ホスホリパーゼ A 存在下で 30°C, 30 分間孵置	35.2 (27)	2.45
蛇毒ホスホリパーゼ A } 牛血清アルブミン } 存在下で 30°C, 30 分間孵置	71.3 (55)	2.44

無処理対照は蛇毒ホスホリパーゼ A の存在下で孵置しない場合のもの。抽出した α -KGDC (20 mg 蛋白) に蛇毒ホスホリパーゼ A (1 mg, 200 Unit) を加え、30°C で 30 分間反応させた

ただけでは、活性の低下も僅かであり、磷脂質含量に変化は認められなかった。蛇毒ホスホリパーゼ A を 30°C で 30 分間作用させると、磷脂質含量が減少し、酵素活性も著しく低下して、対照に対して 27% であった。これに反して、蛇毒ホスホリパーゼ A と共に血清アルブミンが存在すると、磷脂質含量が血清アルブミンの存在しない場合と同程度に減少するが、酵素活性は 55% に低下したにすぎなかった。血清アルブミンが α -KGDC の失活を部分的に抑えることが明らかである。

第 4 表 ミトコンドリアにおける α -KGDC 活性及び磷脂質の変化

試 料	孵置条件	酵素活性 (n mole NAD ⁺ /分/mg 蛋白)	磷 脂 質 (μg Pi/mg 蛋白)					
			総 磷脂質	Lyso- PL	PE	CL	PC	その他
無 処 理 対 照 ミトコンドリア	—	41.7	9.48	0.09	3.12	1.26	4.17	0.85
	30°C, 30 分	40.8	9.49	0.10	3.09	1.27	4.20	0.83
緩 慢 凍 結 ミトコンドリア	—	29.2	9.46	0.15	3.04	1.25	4.15	0.87
	30°C, 30 分	12.5	9.31	0.36	2.77	1.17	4.18	0.83

Lyso-PL: リゾホスファタイド, PE: ホスファチジルエタノールアミン, CL: カルジオリピン,
PC: ホスファチジルコリン

第 4 表はミトコンドリアにおける α -KGDC の活性変化と磷脂質成分の変化との関係を示した。ミトコンドリアを緩慢凍結すると、 α -KGDC の活性は 70% に低下するが、全磷脂質含量の変化は認められなかった。僅かにホスファチジルエタノールアミンの減少に反比例してリゾホスファタイドの増加がみられた。緩慢凍結ミトコンドリアを 30°C で 30 分間孵置すると、 α -KGDC の活性が著しく低下するとともに、全磷脂質含量の減少が認められ、ホスファチジルエタノールアミンとカルジオリピンの減少及びリゾホスファタイドの増加が著しかった。これに反して無処理ミトコンドリアを 30°C で 30 分間孵置しても、 α -KGDC の活性変化も、磷脂質成分の変化も認められなかった。

IV. 考 察

肝臓ミトコンドリアを緩慢凍結すると、その α -KGDC の活性が低下するとともに、磷脂質成分が僅かに変化することがみられた。しかも、凍結処理ミトコンドリアを 25°C 以上の温度で孵置すると、 α -KGDC の活性が更に著しく低下するとともに、磷脂質の減少が著しかった (第 4 表)。ミトコンドリアにおける α -KGDC の失活は温度及び pH 依存性を示し (第 2, 3 図)、ホスホリパーゼ A の活性を促進する条件のもとで、失活は著しかった (第 2 表)。更に、抽出した α -KGDC は凍結融解によって殆んど失活されないが、蛇毒ホスホリパーゼの A 作用で活性低下が著しかった (第 3 表)。しかも、ホスホリパーゼ A による磷脂質の変化が同じでも、血清アルブミンが存在すると、 α -KGDC の失活は不完全ながら防御されることがみられた。

以上の実験結果から、ミトコンドリアに存在するホスホリパーゼ A が緩慢凍結によって活性化され、膜の磷脂質を分解するようになる。その結果、ホスホリパーゼ A による分解産物 (遊離脂肪酸とホスファタイド) か、或は、 α -KGDC の存在する付近の膜構造の変化によって、

α -KGDC の活性低下がもたらされると推論される。この推論は、コール酸又はホスホリパーゼに曝らされたミトコンドリアにおいて、血清アルブミンか又はミトコンドリア脂質のミセルの存在が α -KGDC の最大活性を得るのに必要であるという Allmann らの報告¹⁰⁾ 及び α -KGDC と構造的に似ているピルビン酸脱水素酵素複合体の失活が血清アルブミンによって完全に防御されるという Wieland の報告¹¹⁾ をも説明可能であろう。更に、ミトコンドリアの老化過程で、DNP によって促進される ATPase の活性低下や呼吸調節能の低下が遊離された長鎖脂肪酸によってもたらされるという事実^{12,13)}、及び虚血状態の臓器中でミトコンドリアの機能が遊離脂肪酸によって妨げられるという事実¹⁴⁾ からも支持されるであろう。

Linn は α -KGDC がプロテアーゼによって各構成酵素に解離され、その活性が低下すること、そのプロテアーゼは低張溶液でミトコンドリア膜から脱離され、至適 pH が 6.5~7.5 で、60°C、5 分処理で失活し、HMSA によって完全に阻害されることを報告している¹⁵⁾。また、Waite らは pH 8.8 付近で磷脂質を分解するホスホリパーゼ A がミトコンドリアに存在することを報告している⁹⁾。これらの事実を考え合せば、緩慢凍結で誘発されるホスホリパーゼ A の活性化によって磷脂質が分解され、膜構造が変化されるためプロテアーゼが α -KGDC に接近可能となり、その活性を低下させることも考えられる。しかし、 α -KGDC の失活が HMSA (プロテアーゼ阻害剤) によって防御されないこと、及び抽出した α -KGDC の活性が蛇毒ホスホリパーゼ A の作用によって低下することから、プロテアーゼによる α -KGDC の失活の可能性は薄いであろう。この点に関しては今後の検討に俟ねばならない。いずれにしても、ミトコンドリアは緩慢凍結によって内在するホスホリパーゼ A の活性化が誘発され、膜構造の変化とともに、 α -KGDC の活性低下及び呼吸調節能、酸化的磷酸化能等の諸機能の低下がもたらされることは明らかであろう。

V. 摘 要

ミトコンドリアの凍結障害の機構を明らかにするため、凍結融解によってもたらされる α -ケトグルタル酸脱水素酵素複合体の失活の要因を膜を構成する磷脂質の変化との関連において検討した。

1) ミトコンドリアの α -KGDC 活性は凍結処理によって低下し、その活性低下は急速凍結より緩慢凍結で著しく、30% 以上であった。これに反して、ミトコンドリアから分離精製した α -KGDC を緩慢凍結しても、酵素活性は約 10% しか減少しなかった。

2) 無処理対照ミトコンドリアを 30°C で孵置しても α -KGDC の活性低下はみられないが、凍結処理又は超音波処理ミトコンドリアでは、30°C での孵置による α -KGDC の失活が更に著しかった。この α -KGDC の失活は温度及び pH 依存性を示した。

3) α -KGDC の温度依存性失活は CaCl_2 の存在で促進され、EGTA, MgSO_4 , 血清アルブミンの存在下で部分的に阻止された。

4) ミトコンドリアに蛇毒ホスホリパーゼ A を作用させると、 α -KGDC の失活は著しく促進された。

5) 抽出精製した α -KGDC に蛇毒ホスホリパーゼ A を作用させると、酵素活性が 27%

に減少するとともに燐脂質の分解がみられた。このとき、血清アルブミンが存在すると、燐脂質の分解度は同程度でも、酵素活性は55%にしか減少せず、ホスホリパーゼAによる失活がアルブミンによって防御されることがみられた。

6) ミトコンドリアにおいても、凍結及び解凍による α -KGDC活性の低下とともに、燐脂質成分が分解されることがみられた。

文 献

- 1) 荒木 忠 1970 ミトコンドリア膜の凍結障害 I. 凍結融解した肝臓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) 荒木 忠 1972 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. 低温科学, 生物篇, **30**, 23-31.
- 3) Hogeboom, G. H. 1955 Fractionation of cell component of animal tissues. In *Methods in Enzymology*, Vol. I (S. P. Colowick and N. O. Kaplan, eds.), Academic Press Inc., New York, 16-19.
- 4) Sanadi, D. R. and Littlefield, J. W. 1952 Studies on α -ketoglutaric oxidase. II. Purification and properties. *J. Biol. Chem.*, **197**, 851-862.
- 5) Hirashima, M., Hayakawa, T., and Koike, M. 1967 Mammalian α -keto acid dehydrogenase complexes. II. An improved procedure for the preparation of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex from pig heart muscle. *J. Biol. Chem.*, **242**, 902-907.
- 6) Sanadi, D. R. 1969 α -ketoglutarate dehydrogenase from pig heart. In *Methods in Enzymology*, Vol. XIII (J. M. Lowenstein, ed.), Academic Press Inc., New York, 52-55.
- 7) Folch, J., Lees, M. and Sloane-Stanley, G. H. 1957 A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, **226**, 497-509.
- 8) Shibuya, I., Honda, H. and Maruo, B. 1967 A simplified colorimetry without incineration of phosphorus in phosphatides. *Agr. Biol. Chem.*, **31**, 111-114.
- 9) Waite, M., Scherphof, G. L., Boshouwers, F. M. G. and Van Deenen, L. L. M. 1969 Differentiation of phospholipases A in mitochondria and lysosomes of rat liver. *J. Lipid Res.*, **10**, 411-420.
- 10) 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.
- 11) Wieland, O. H. 1975 On the mechanism of irreversible pyruvate dehydrogenase inactivation in liver mitochondrial extracts. *FEBS Letters*, **52**, 44-47.
- 12) Chefurka, W. 1966 Oxidative phosphorylation in *in vitro* aged mitochondria. I. Factors controlling the loss of the dinitrophenol-stimulated adenosine triphosphatase activity and respiratory control in mouse liver mitochondria. *Biochemistry*, **5**, 3887-3903.
- 13) Chefurka, W. and Dumas, T. 1966 Oxidative phosphorylation in *in vitro* aged mitochondria. II. Dinitrophenol-stimulated adenosine triphosphatase activity and fatty acid content of mouse liver mitochondria. *Biochemistry*, **5**, 3904-3911.
- 14) Boime, I., Smith, E. E. and Hunter, E., Jr. 1970 The role of fatty acids in mitochondrial changes during liver ischemia. *Arch. Biochem. Biophys.*, **139**, 425-443.
- 15) Linn, T. C. 1974 Studies on the apparent stability of bovine kidney α -ketoglutarate dehydrogenase complex. *Arch. Biochem. Biophys.*, **161**, 505-514.

Summary

The inactivation of α -ketoglutarate dehydrogenase complex (KGDC) by freeze-thawing was examined along with alteration of membrane phospholipid in order to elucidate the mechanism of freezing injury in mitochondria.

The decrease in KGDC activity was dependent upon the rate of freezing. KGDC activity in slowly frozen and thawed mitochondria decreased to 68% and further decreased during incubation. This inactivation during incubation was dependent upon the temperature and pH. Furthermore, when intrinsic phospholipase A was either inhibited or stimulated, there was a respective decrease or increase in KGDC inactivation. KGDC activity in mitochondria was markedly inhibited by exogenous venom phospholipase A, and this inhibition was partially prevented with bovine serum albumin.

The activity of the partially purified KGDC decreased slightly after slow freezing, but remained constant during incubation. However, the activity of this enzyme complex was markedly reduced when incubated in the presence of venom phospholipase A.