アンスラキノ色素 Skyrin の除共役作用と 6,6'-位水酸基の関与

河 合 清*・中丸 輝彦*・野沢 義則*

K. KAWAI, T. NAKAMARU, Y. NOZAWA: The uncoupling action of skyrin and the involvement of 6,6'-hydroxyl groups in the uncoupling action on mitochondrial respiration.

Abstract

Effects of anthraquinone pigments, skyrin and emodin, on mitochondrial reactions have been compared. Both pigments exhibited the uncoupling effects on oxidative phosphorylation of isolated rat liver mitochondria, accompanying a weak inhibition on state 3 respiration. Emodin exhibited much stronger uncoupling effect than that of skyrin. O-methylated derivatives of skyrin and emodin at 6,6'-and 6-hydroxyl group, respectively, did not uncouple mitochondrial respiration, indicating the involvement of these phenolic hydroxyl groups in the uncoupling actions on the oxidative phosphorylation of mitochondria. Skyrin induced mitochondrial swelling in KCl isotonic solution. Whereas emodin did not induce. These results indicate that biological properties of skyrin, which has dimer structure of emodin, and emodin are of some differences from each other.

Penicillium islandicum Sopp から単離されたアンスラキノ色素 skyrin は emodin の二量体構造にあたり, skyrin をアルカリ性下で還元分解することにより容易に emodin が得られる¹⁾. Emodin は経口投与により著しい毒性を発現する (LD₅₀ 3.7 mg/kg)²⁾. しかし, emodin の二量体構造を有する skyrin については未だ生物活性や毒性については知られていない. 化学構造的に両色素は類似した性質を示すことが考えられるが, 物理的には, 分子当りの水酸基数の多い skyrin が emodin より脂溶性が低く, 両色素の生物活性に若干の相異が見られることが予測される. そこで生物活性の一端を知ることを目的として, ラット肝ミトコンドリアの呼吸系におよぼす両色素の影響を比較検討したので, その成績について報告する.

実験材料および方法

Emodin, skyrin および dimethylskyrin は名古屋市中大薬学部荻原教授から, physcion (parietin) は岐阜薬

科大学北村助教授からそれぞれ供与された. ADP およびトリスは Sigma Chemicals 社製のものを使用した. その他の試薬は市販品特級試薬を用いた. ラット肝ミトコンドリアは Schneider の方法³⁾ に従って, 亜ミトコンドリア粒子は Ruzicka and Crane の方法⁴⁾ に従って, それぞれ調製した. ミトコンドリアおよび亜ミトコンドリア粒子の呼吸機能はガルバーニ型酸素電極 (給水化学研究所製) を用いて測定した. ミトコンドリアタンパク質はビウレット法⁵⁾ により定量した.

実験結果および考察

図2はラット肝ミトコンドリアの酸化的リン酸化反応に対する skyrin および emodin の影響を比較検討した結果を示している. 両色素とも除共役作用を呈し, state 4 呼吸の開放 (RC index および P/O ratio の低下) をもたらした. 脂溶性の高い emodin は skyrin より強力な除共役作用を呈し, 濃度増加に伴って state 3 呼吸の阻害作用も呈した. Emodin による state 3 呼吸の阻害作用は, 亜ミトコンドリア粒子の酸素消費能には影響を与えないことから, 電子伝達系への直接の作用ではないものと思われる. Skyrin お

* 岐阜大学医学部生化学教室 (〒500 岐阜市司町40) Department of Biochemistry, Gifu University School of Medicine (Tsukasamachi 40, Gifu 500)

Fig. 1 Formulae of skyrin, emodin, and physion

Fig. 2 Uncoupling effects of skyrin and emodin on mitochondrial respiration.

Reaction medium was essentially composed of 675 μ moles sucrose, 30 μ moles KCl, 15 μ moles $MgCl_2$, 15 μ moles phosphorous, 16 μ moles succinate, 1.5 μ moles EDTA, and 60 μ moles Tris-Cl, pH 7.4 in a final volume of 3.0 ml.

- Inhibition of emodin on RC index
- " " on P/O ratio
- Inhibition of skyrin on RC index
- " " on P/O ratio

および emodin の O-メチル誘導体である dimethyl-skyrin および physcion (parietin) は実験に使用した濃度 (最終濃度 25 μM) では除共役作用を全く示さなかった。このことは skyrin の 6,6'-位の水酸基および emodin の 6-位の水酸基が除共役作用発現に重要な役割りを果していることを示している。酸解離基を

Fig. 3 Induction of mitochondrial swelling by skyrin. Reaction medium contained 300 μ moles KCl, 1.5 μ moles EDTA, and 40 μ moles Tris-Cl, pH 7.4, in a final volume of 2.0 ml.

持つ除共役剤の作用機序は、その H^+ -輸送性に基づき、ミトコンドリア内膜を介する $[H^+]$ 濃度勾配を消去することにあると考えられており⁶⁾, skyrin および emodin による除共役作用も、上述のフェノール性水酸基の H^+ 解離性によるものと思われる。また一般に、肝ミトコンドリアに強力な除共役作用を有する物

質は細胞毒性を有することから, skyrin, emodin とともに肝実質細胞に毒性を発現することが推測される。

図3は skyrin により誘起されるミトコンドリアの膨潤 swelling を, skyrin の濃度と膨潤化の初速度との関係について示している。0.15 M KCl 溶液に懸濁したミトコンドリアは skyrin の添加により急速に膨潤化し, 光散乱の低下(吸光度の減少)を起こした。ミトコンドリアの膨潤速度は図に示されているように, skyrin の濃度増大に伴って顕著に増大したが, overall swelling は $10 \mu\text{M}$ より高濃度では, skyrin の濃度増大に伴って逆に抑制され, NaCl 等張液中ではこの傾向が特に顕著に現われた(河合未発表データ)。図3に示されているように, emodin は実験に使用した濃度ではこのような作用を全く示さなかった。

以上の結果, skyrin および emodin がミトコンドリアの酸化的リン酸化反応に除共役作用を呈し, その作

用発現には 6,6'-位および 6-位のフェノール性水酸基の存在が重要であること, Skyrin がミトコンドリアの構造変化(膨潤)を起こすこと, ならびに skyrin と emodin の性質が若干異なることなどが判明した。

引用文献

- 1) Howard, B.H. and Raistrick, H.: *Biochem. J.* **56**, 56 (1954)
- 2) Wells, J.M., Cole, R. J. and Kirksey, J. R.: *Appl. Microbial*, **30**, 26 (1975)
- 3) Schneider, W.C.: *J. Biol. Chem.* **176**, 259 (1948)
- 4) Ruzicka, F.J. and Crane, F.L.: *Biochim. Biophys. Acta* **223**, 71 (1970)
- 5) Yonetani, T.: *J. Biol. Chem.* **236**, 1680 (1961)
- 6) McLaughlin, S.G.A. and Dilger, J.P.: *Physiol. Rev.* **60**, 825 (1980)