Aspergillus ochraceus* 産生色素 secalonic acid D の生物活性：*単離肝ミトコンドリアへの作用**

中丸 輝彦^{*1}, 河合 清^{*1}, 野沢 義則^{*1},
前林 行雄^{*2}, 山崎 幹夫^{*2}

T. NAKAMARU^{*1}, K. KAWAI^{*1}, Y. MAEBAYASHI^{*2}, M. YAMAZAKI^{*2}:

The biological activity of secalonic acid D from *Aspergillus ochraceus*. Effects on mitochondrial reactions.

Abstract

The biochemical property of a xanthone derivative, secalonic acid D (SA-D) was compared with that of an anthraquinone derivative, skyrin which had been demonstrated to be an uncoupler on the oxidative phosphorylation in mitochondria. Both compounds were revealed to have pKa values at very close pH to each other (SA-D at pH 6.4, skyrin at pH 6.1). SA-D was found to emit a strong fluorescence (Ext. 380 nm, Em. 535 nm) when dissolved in organic solvents or bound by liposomes, mitochondria, or BSA, whereas skyrin did not show any fluorescence even when bound by these materials. SA-D was demonstrated to uncouple the oxidative phosphorylation in mitochondria at very close concentrations to those of skyrin, but not to induce mitochondrial swelling, though skyrin displayed both abilities of uncoupling mitochondrial respiration and of inducing mitochondrial swelling.

Secalonic acid D (以下 SA-D と略, Fig. 1) は *Penicillium oxalicum*¹⁾ や *Aspergillus ochraceus*²⁾ から単離された xanthone 誘導体で, 動物への腹腔内投与により激しい腹膜炎を起こすことが知られている³⁾ が, 生物活性についての詳しい知見は未だ得られていない. Anthraquinone 色素 skyrin (Fig. 1) は 1, 8, (1', 8')-位にフェノール性水酸基を有するが, 生理的条件下では酸解離を示さず, 酸解離性を示して除共役作用の発現に関与するのは 6, 6'-位の水酸基であることが証明された⁴⁾. SA-D も skyrin と同様に 1, 8, (1', 8')-位に水酸基を見せる化合物であるが, xanthone 骨格であることから, anthraquinone のそれ

Fig. 1. Chemical formulae of skyrin, SA-D, and their ionized forms.

とは性質が異なり, Fig. 1 に示したような電子の移動を起こして中性付近の pH で酸解離性を示し, 単離肝ミトコンドリアに対して除共役作用を呈することが予想される. SA-D の生物活性を研究するに当たり, その酸解離性, 生体膜への結合性および除共役作用について skyrin のそれと比較検討したので, その成績を報告する.

^{*1} 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)

^{*2} 千葉大学生物活性研究所(〒280 千葉市亥鼻1-8-1)
Reserch Institute for Chemobiodynamics, Ciba
University (Inohana, Chiba-shi, Chiba-280)

実験材料および方法

SA-D は前報の方法²⁾に従って, *A. ochraceus* から単離した. Skyrin は岐阜薬科大学北村助教授から分与されたものを使用した. ADP, Tris は Sigma 社製のものを, 牛血清アルブミン (BSA, fraction V) は Armour 社製のものを, それぞれ用いた. ラット肝ミトコンドリアは基本的には Schneider の方法³⁾に従って, 10 mM Tris-Cl (pH 7.4), 0.5 mM EDTA を含む 0.25 M ショ糖溶液を用いて調製した. ミトコンドリアの呼吸機能および膨潤化は前報⁴⁾の方法に従って測定した. 分光分析ならびに蛍光分析は日立 320S 自記分光光度計ならびに日立 MPF-3 型自記蛍光光度計を用いて行った. ミトコンドリアのタンパク質は Lowry の方法⁶⁾に従って定量 (BSA を標準タンパク質として使用) した.

実験結果および考察

SA-D は pH 依存性のスペクトル変化を示し, pH 値の増大に伴って 355 nm 吸光度が増大する. Anthraquinone 色素 skyrin も同様なスペクトル変化を起こし, 酸性側 pH では 460 nm に, アルカリ性側 pH では 535~540 nm にそれぞれ極大吸収を示す. Fig. 2 に SA-D (355 nm) および skyrin (540 nm) の分光学的滴定の結果を示した. 両化合物の pKa 値は非常に近く, skyrin では 6,6'-位水酸基の解離による

Fig. 2. Spectrophotometric titrations of skyrin and SA-D. Buffer systems (50 mM) were shown in the top of the figure. Skyrin; 30 μ M, SA-D; 20.5 μ M.

Fig. 3. Excitation and emission spectra of SA-D. Reaction mixture contained 60.6 μ M BSA, 20.5 μ M SA-D, and 50 mM Tris-Cl, pH 7.4, in a final volume of 2 mL. Curve 1 and 2 show the excitation and emission spectra, respectively. Curve 3 shows the emission spectrum of SA-D without BSA.

pH 6.1, SA-D では 1,1'-位水酸基の解離による pH 6.4 が観測された. このことは SA-D が skyrin と同様に脂溶性のアニオンとして生体膜系に作用することを示唆している. SA-D と生体膜との相互作用は蛍光分光法的に確認された. Fig. 3 は SA-D の励起および発光スペクトルを示している. SA-D は水溶液中では極めて弱い蛍光を発するのみ (曲線③) であるが, BSA (曲線②), 電子伝達粒子, またはリン脂質膜小胞 (リポソーム) の存在下で強い蛍光 (Ext. 380 nm, Em. 535 nm) を発することが判明した. SA-D の蛍光強度は octanol 中やリポソーム存在下で特に大きく, リン脂質二層膜を基本構造とする生体膜系に強い親和性を有することが示された. BSA は多種多様の脂溶性低分子, 特に脂溶性アニオンを結合する性質を有している⁷⁾が, SA-D も BSA に結合して, 380 nm 光の照射下に強い蛍光を発することが判明した (Fig. 3). Fig. 4 は BSA への SA-D の結合数および結合定数を蛍光法により検討した結果を示している. SA-D は BSA 分子と 1:1 の分子化で結合 ($K_d = 2 \times 10^6 / M$) することが示された.

単離肝ミトコンドリアの酸化的リン酸化反応におよ

Fig. 4. Fluorophotometric analysis of the interaction between SA-D and BSA. SA-D was titrated with various concentrations of BSA by means of fluorophotometric technique. (A) and r mean the concentration of unbound SA-D and the molar ratio of bound SA-D and BSA, respectively. Reactions were carried out by using 50 mM Tris-Cl, pH 7.4.

ばすの影響について酸素電極法により検討した結果、SA-D は skyrin とほぼ同じ強さの除共役作用⁴⁾を示し、約 50 nmoles/mg protein でミトコンドリアの酸化的リン酸化反応を完全に除共役した。ミトコンドリアの state 3 呼吸に対する阻害作用は skyrin のそれより若干強いことが判明した。ミトコンドリアの酸化的リン酸化反応への除共役作用は、その物質の強い脂溶性と中性近辺での酸解離性に基づくことが知られており^{8), 9)}, SA-D の除共役作用も強い脂溶性と 1, 1'-位のフェノール性水酸基の酸解離性による非ベクトル的な H^+ 輸送性に基づくものと思われる。単離肝ミトコンドリアは種々の化合物の添加により、膜のイオン透過性に異常を起こして膨潤化し、クリステが消失する¹⁰⁾。このとき可視光線の光散乱または吸光度の急速な減少を伴い¹¹⁾, 分光学的に測定・記録することが可能である。除共役作用と膨潤化誘起作用とは必ずしも平衡関係が見られないが、肝臓毒性の強い aflatoxin や luteoskyrin 等で膨潤化誘起作用が観察されており^{12), 13)}, 膨潤化誘起作用の有無を検討するこ

とは興味深い。Skyrin は除共役作用を示し、またミトコンドリアの膨潤化を起こす⁴⁾。しかし SA-D は除共役作用を有するにもかかわらず膨潤化誘起作用を示さないことが判明した。

結 論

SA-D 脂溶性のアニオンとして BSA や生体膜系に作用し、強い蛍光を発する (Ext. 380 nm, Em. 535 nm)。BSA へは 1:1 で結合 ($K_d=2 \times 10^6/M$)。単離肝ミトコンドリアの酸化的リン酸化反応に対して輸送体として作用し、除共役作用を呈するが、ミトコンドリアの膨潤化を誘起しないことが判明した。

引 用 文 献

- 1) Steyn, P. S.: Tetrahedron **26**, 51 (1970).
- 2) Yamazaki, M., Maebayashi, Y. and Miyaki, K.: Chem. Pharm. Bull. **19**, 199 (1971).
- 3) Harada, M., Yano, S., Watanabe, H., Yamazaki, K.: Chem. Pharm. Bull. **22**, 1600 (1974).

- 4) 河合 清, 中丸輝彦, 野沢義則: マイコトキシン **15**, 19 (1982).
- 5) Schneider, W.C.: J. Biol. Chem. **176**, 259 (1948).
- 6) Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J.: J. Biol. Chem. **193**, 265 (1951).
- 7) Kragh-Hansen, U.: Pharmacol. Rev. **33**, 17 (1981).
- 8) Mitchell, P.: Biol. Rev. **41**, 445 (1966).
- 9) McLaughlin, S.C.A., Dilger, J.P.: Physiol. Rev. **60**, 825 (1980).
- 10) Lehninger, A.L.: Physiol. Rev. **42**, 467 (1962).
- 11) Tedeschi, H. and Harris, D.L.: Arch. Biochem. Biophys. **58**, 52 (1955).
- 12) Bababunmi, E.A. and Bassir, O.: FEBS Lett. **26**, 102 (1972).
13. Ueno, Y., Ueno, I., Tatsuno, T. and Uraguchi, K.: Jap. J. Exptl. Med. **34**, 135 (1964).