***Emericella varicolor* の産生する毒性代謝産物 asteltoxin の生物活性： 単離肝ミトコンドリアへの呼吸阻害作用**

河 合 清*¹, 前林 行雄*², 野沢 義則*¹, 山崎 幹夫*²

K. KAWAI*¹, Y. MAEBAYASHI*², Y. NOZAWA*¹ and M. YAMAZAKI*²:

The biological activity of a toxic metabolite asteltoxin from
Emericella varicolor: The inhibition on respiratory
system in isolated rat liver mitochondria

Abstract

The effects of asteltoxin, which is a toxic metabolite of *Aspergillus stellatus* Curzi and *Emericella varicolor* NHL 2881, on oxidative phosphorylation in isolated rat liver mitochondria has been examined in order to assess its cytotoxicity. It was found that this toxin specifically inhibited the energy transfer system of the oxidative phosphorylation in mitochondria.

Emericella varicolor NHL 2881 から強力な呼吸毒作用を有する二次代謝産物 EV-toxin が単離され、すでに *Aspergillus stellatus* Curzi から単離されている asteltoxin¹⁾ と構造が一致することが判明した²⁾。Asteltoxin は hexatriene 側鎖を有する α -pyrone 誘導体で、aurovertins³⁾ や citreoviridin⁴⁾ に似た構造を有し、しかも呼吸毒作用を示すことから、これら類似化合物と同様の生物活性、即ち単離肝ミトコンドリアの呼吸系に対するエネルギー転移阻害作用^{5), 6)} を示すことが推測された。Asteltoxin は大腸菌の BF₁-ATPase 活性を強く阻害することがすでに見出されている⁷⁾ が、酸化的リン酸化反応の呼吸鎖（電子伝達反応）への作用および除共役作用の有無については未だ検討されていない。そこで、ラット肝ミトコンドリアを用いた実験で、酸化的リン酸化反応への影響を酸素電極法により検討した結果、asteltoxin がミトコンドリアの

呼吸系に対して特異的にエネルギー転移反応を阻害し、高濃度でも電子伝達系反応への阻害作用や除共役作用を示さないことが判明したので報告する。

実験材料および方法

〔試薬〕 ADP, ATP, および Tris は Sigma Chemicals 社製、牛血清アルブミン (BSA, Fraction V) は Armour 製薬社製のをそれぞれ用いた。それ以外の薬品は市販品特級試薬を用いた。

〔方法〕 Asteltoxin は *Emericella varicolor* NHL 2881 の乾燥菌体から抽出・精製²⁾ した。ラット肝ミトコンドリアは 0.5 mM EDTA および 10 mM Tris-Cl (pH 7.4) を含む 0.25 M ショ糖等張溶液を用いて調製した。ミトコンドリア画分は 3 回、7,500, 7,500, および 6,500×g で各 10 分間遠心洗浄した後、約 8 ml のショ糖等張液に懸濁して実験に供した。遠心操作をはじめ、全ての操作は 4°C 以下で行った。

ミトコンドリアの呼吸機能（酸化的リン酸化反応）は Galvani 型酸素電極（Sensanics Japan 社製）を用いて測定した。反応液（終量 3 ml）は 0.225 M ショ糖、10 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 5 mM リン酸, 0.5 mM EDTA, および 20 mM Tris-Cl, pH 7.4 を含む。反応液中のミトコンドリアは約 1 mg/ml になる

*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 City
500)

*² 千葉大学生物活性研究所 (〒280 千葉市亥鼻1-8-1)
Research Institute for Chemobiodynamics,
Chiba University (Inohana, 1-8-1, Chiba City
280)

よう調製した。ミトコンドリアのタンパク質量はBSAを標準タンパク質として、Lowryらの方法⁹⁾に従って定量した。

実験結果および考察

Asteltoxinの呼吸阻害作用の機構について酸素電極法により検討した結果をFig. 1に示した。単離されたラット肝ミトコンドリアは高い呼吸活性を示した(RC比:6.0, P/O比:1.9)。ミトコンドリアのstate 4呼吸にasteltoxinを添加すると、state 4呼吸の速度には目立った変化が生じなかったが、もはやADP添加によるstate 3呼吸への転換が起こらなくなった(曲線1)。しかし、除共役剤2,4-dinitrophenol(DNP)の添加により直ちに解放されてstate 3呼吸様の酸素消費が始まった。state 3呼吸にasteltoxinが添加されると酸素消費は直ちに阻害されてstate 4呼吸様状態が得られ、DNPの添加により再び酸素消費が始まった(曲線2)。

Asteltoxinの濃度と阻害効果との関係についてFig. 2に示した。Asteltoxinにより阻害された呼吸とstate 3呼吸との比率(asteltoxin-induced RC index)はasteltoxinの濃度増加に伴って増大したが、高濃度でもstate 4呼吸に匹敵する酸素消費速度以上の阻害は見られなかった。また、DNPにより解放された呼吸の速度はasteltoxinの濃度増加に伴う影響が見られなかった。

Fig. 1. Effect of asteltoxin on oxidative phosphorylation in isolated mitochondria. Reaction mixture contained 675 μ moles sucrose, 30 μ moles KCl, 15 μ moles phosphorus, 1.5 μ moles EDTA, 60 μ moles Tris-Cl, pH 7.4 and 3 mg of mitochondrial protein in a final volume of 3.0 ml. Reaction was performed at 30°C.

Fig. 2. Asteltoxin-induced respiratory control. Reaction condition was same as Fig. 1.

以上の実験成績はasteltoxinがミトコンドリアの酸化的リン酸化反応におけるエネルギー転移反応を特異的に阻害し、電子伝達反応の阻害作用や除共役作用を持たないことを示している。Asteltoxinの阻害作用は BF_1 -ATPase活性への阻害作用⁷⁾と同様に F_1 -ATPase (β -subunit)に直接作用するものと考えられる。また、asteltoxinによる上述の作用は実験動物への強力な呼吸毒作用の分子機序を説明している。

結 語

Emericella varicolor NHL 2881 から単離された強力な呼吸毒素asteltoxinのラット肝ミトコンドリアの呼吸系への影響を検討した。Asteltoxinは強力なエネルギー転移阻害作用を有することが判明した。

引 用 文 献

- 1) Kruger, G. J., Steyn, P. S., Vleggaar, R. J. C. S. Chem. Comm. (1979), 441.
- 2) 前林行雄, 鈴木重紀, 堀江義一, 村井知子, 山崎幹夫 マイコトキシ 17, (1983).
- 3) Mulheim, L. J., Beechey, R. B., Leworthy, D. P., Osseltin, M. D., J. C. S. Chem. Comm., (1974) 874.
- 4) Sakabe, N., Goto, T., Hirata, Y., Tetrahedron Letters (1964) 1825.
- 5) Lardy, H., Connolly, J. L., Johnson, D., Biochemistry 3, 1961 (1964).
- 6) Linnett, P. E., Mitchell, A. D., Osseltin, M. D., Mulheim, L. J., Beechey, R. B., Biochem. J. 170, 503 (1978).
- 7) Satre, M., Biochem. Biophys. Res. Commun. 100, 267 (1981).
- 8) Lowry, O. H., Rosenbrough, N. L., Farr, A. L., Randall, R. J., J. Biol. Chem. 193, 265 (1951).