Aspergillus chevalieri 産生色素 flavoglaucin によるミトコンドリアの呼吸阻害作用および膨潤化誘起作用

中丸 輝彦^{*1}, 河 合 清^{*1}, 北村 二朗^{*2}, 野沢 義則^{*1}

T. NAKAMARU^{*1}, K. KAWAI^{*1}, J. KITAMURA^{*2}, and Y. NOZAWA^{*1}:

Inhibition of Mitochondrial Respiration and Induction of Mitochondrial Swelling by Flavoglaucin from *Aspergillus chevalieri*

Abstract

The effect of flavoglaucin, a benzoquinol pigment from *Aspergillus chevalieri* (Mangin) Thom et Church, on mitochondrial respiration was studied using isolated rat liver mitochondria. Flavoglaucin exhibited an uncoupling effect, causing marked decreases in RC index and P/O ratio of mitochondrial respiration. The ID₅₀ was around 20 μM. Flavoglaucin induced drastic swelling of mitochondria at the uncoupling concentrations even in isotonic sucrose solution in which pseudo-energized swelling is inhibited. It was suggested, thus, that the induction of mitochondrial swelling might be responsible for the uncoupling activity of flavoglaucin, since flavoglaucin do not possess any dissociable group at physiological pH range.

Aspergillus chevalieri (Mangin) Thom et Church は黒変米原因菌として知られており、菌糸から anthraquinone 色素 physcion (parietin), erythroglauclin, および benzoquinol 色素 flavoglaucin, auroglauclin, dihydroauroglauclin, tetrahydroauroglauclin などが単離されている^{1)~3)} Flavoglaucin および auroglauclin (Fig. 1) は *Aspergillus glaucus* グループに属する多くの菌により広く産生されるが、auroglauclin の変異原性についての知見⁴⁾ 以外には、生物活性についての知見は殆んど得られていない。Flavoglaucin および auroglauclin は脂溶性の強い化合物で、やや長い脂肪族鎖を有していることから、生体膜、特にリン脂質二層膜部分に強い親和性を示し、膜機能の低下をもたらすことが予想される。そこで、比較的多量に産生される flavoglaucin について単離

Flavoglaucin R = n-C₇H₁₅
Auroglauclin = -(CH=CH)₃-CH₃

Fig. 1. Structures of auroglauclin and flavoglaucin.

肝ミトコンドリアの呼吸系への影響を検討したところ、除共役 (uncoupling) 作用を示すことが判明した⁵⁾。一般に、ミトコンドリアの酸化的リン酸化反応を強力に除共役する物質 (uncoupler) は脂溶性が強く、同時に弱酸性または弱塩基性の解離基を有するという構造的特徴を持つ^{6), 7)}が、flavoglaucin は解離基を持たないにもかかわらず除共役作用を発現し、同時に latent ATPase 活性を顕性化することが判明した⁸⁾。このことは flavoglaucin がプロトン非輸送型の除共役剤であることを示唆している。今回、flavoglaucin の除共役作用の分子機構を解明する目的で、ミトコンドリア内膜への flavoglaucin の作用、

^{*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} 岐阜薬科大学微生物学教室 (〒502 岐阜市三田洞東)
Laboratory of Microbiology, Gifu College of
Pharmacy (Mitahora Higashi, Gifu 502)

特にミトコンドリアの膨潤化誘起作用について分光学的に検討を加えたので、その成績について報告する。

実験材料および方法

〔試薬〕 Flavoglaucin は *Aspergillus chevalieri* (Mangin) Thom et Church の乾燥菌体から抽出・精製した (1)。ADP および Tris は Sigma 化学社製のものを、牛血清アルブミン (BSA) は Armour 製薬社製の fraction V をそれぞれ使用した。その他の試薬は市販品特級試薬を用いた。

〔方法〕 ラット肝ミトコンドリア画分は、基本的には Schneider の方法⁹⁾ に従って調製した。ミトコンドリアの呼吸機能は Galvani 型酸素電極を用いて測定した。反応液組成は終量 3 ml (pH 7.4) 中にショ糖 (675 μ mnle), KCl (30 μ mol) $MgCl_2$ (15 μ mnle), 無機リン酸 (15 μ mole), EDTA (1.5 μ mole), コハク酸 (15 μ mole), Tris-Cl (60 μ mole) およびミトコンドリア (3 mg タンパク質) を含み、300 または 500 nmole ADP を添加して呼吸を開始させた。RC 比, P/O 比, および state 3 呼吸は Chance and Williams の方法⁹⁾ に従ってオキシングラムから計算した。ミトコンドリアの膨潤化 (swelling) は Tedeschi and Harris の発見¹⁰⁾ に従って 550 nm 吸光度の減少を日立 320S 型自記分光光度計を用いて測定した。ミトコンドリアタンパク質は Lowry ら¹¹⁾ の方法に従って、BSA を標準タンパク質として、定量した。

Fig. 2. The effect of flavoglaucin on mitochondrial respiration. Curves 1, 2, and 3 show the effect on state 3 respiration, RC index, and P/O ratio, respectively.

実験結果および考察

単離肝ミトコンドリアの呼吸活性への flavoglaucin の阻害作用を酸素電極法で検討した結果を Fig. 1 に示した。Flavoglaucin は state 4 呼吸を解放して RC 比および P/O 比の顕著な低下をもたらし、同時に state 3 呼吸の阻害作用を示した。RC 比および P/O 比の低下作用は flavoglaucin が除共役作用を有することを示しており、約 30~40 μ M でミトコンドリアの呼吸は完全に解放 (RC=1.0) された。Flavoglaucin による state 3 呼吸への阻害作用は除共役濃度では比較的弱く、20 μ M を越えると著しく増強された。L-グルタミン酸を呼吸基質に用いた反応でも flavoglaucin はほぼ同程度の阻害作用を示した。

酸素電極法によりミトコンドリアの呼吸活性を測定中、flavoglaucin の添加によりミトコンドリアの溶解が進行し、反応液の光透過性 (透明度) が顕著に上昇してゆくことが肉眼的にも観察された。そこで flavoglaucin によるミトコンドリアの膨潤化および溶解について分光光度計を用いて検討した。

Fig. 3. The induction of mitochondrial swelling. Reaction mixture of curve 1 was composed of 300 μ moles KCl, 40 μ moles Tris-Cl (pH 7.4) and 1.4 mg of mitochondrial protein in a final volume of 2.0 ml. Reaction mixture of curve 2 was composed of 450 μ moles sucrose, 20 μ moles KCl, 10 μ moles $MgCl_2$, 10 μ moles phosphorus, 40 μ moles Tris-Cl (pH 7.4) and 1.4 mg of mitochondrial protein in a final volume of 2.0 ml.

KCl 等張溶液 (0.15 M KCl, 20 mM Tris-Cl, pH 7.4) 中では種々の物質がミトコンドリアの膨潤化 (pseudo-energized swelling) を誘起する^{12), 13)} が, ショ糖等張液 (0.25 M ショ糖) 中では膨潤化が抑制されている¹³⁾ ことが知られている。Flavoglaucin は KCl 等張溶液中だけでなく, ショ糖等張溶液中においても顕著な膨潤化を誘起した。特に KCl や無機リン酸を含むショ糖等張溶液中では膨潤化速度が一層増大することが判明した。図 3 に, flavoglaucin により誘起されるミトコンドリアの膨潤化を flavoglaucin の濃度と初速度 ($\Delta A/\text{min}$) との関係について示した。Flavoglaucin は除共役作用発現濃度で強力な作用を示した。

ミトコンドリアの酸化的リン酸化反応を除共役する物質は一般に脂溶性が強く, 分子中に弱酸または弱塩基性の解離基を有し, 生理的 pH 域に pK 値を有することから, ミトコンドリア内膜の内外側間に作られた $[H^+]$ 勾配を除共役剤自身が H^+ 輸送体として作用して消去することにより除共役作用を発現するもの^{14), 15)} と考えられているが, flavoglaucin の場合, 解離基を持たないため, 上述のタイプの除共役剤には属さないことが考えられる。

ミトコンドリアの酸化的リン酸化反応は超音波処理や低張処理などにより内膜構造を破壊することにより容易に除共役される。Flavoglaucin は除共役濃度でショ糖等張溶液, 特に KCl の存在下で antimycin A 非感受性の膨潤化を誘起することが観察された。このことは flavoglaucin 自身が H^+ 輸送性を発現するのではなく, 内膜構造を顕著に変化させることにより, 本来, 膜不透過性の H^+ が容易に内膜を透過することになり, $[H^+]$ 勾配が消去されることを示唆している。

Flavoglaucin によるこのような作用には, $n\text{-C}_7\text{H}_{15}$ 側鎖が関与しているものと思われる。

引用文献

- 1) 北村二郎, 栗本珍彦, 横山復次: 薬学雑誌 76, 972 (1956).
- 2) Bachmann, M., Luthy, J., Schlatter, C.: J. Agric. Food Chem., 27, 1342 (1979).
- 3) Hamasaki, T., Fukunaga, M., Kimura, Y., Hatsuda, Y.: Agric. Biol. Chem., 44, 1685 (1980).
- 4) Hamasaki, T., Kimura, Y., Hatsuda, Y., Nagao, M.: Agric. Biol. Chem., 45, 313 (1981).
- 5) Kawai, K., Mori, H., Kitamura, J.: Toxicol. Lett., in press.
- 6) Terada, H.: Biochim. Biophys., Acta 639, 225 (1981).
- 7) Heytler, P. G.: "Inhibitors of Mitochondrial Function", p. 199 (1981), Pergamon Press, Oxford, New York, Toronto, Sydney, Paris, Frankfurt.
- 8) Schneider, W. C.: J. Biol. Chem., 176, 259 (1948).
- 9) Chance, B., Williams, G. R.: J. Biol. Chem., 227, 383 (1955).
- 10) Tedeschi, H., Harris, D. L.: Arch. Biochem. Biophys., 58, 52 (1955).
- 11) Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J.: J. Biol. Chem., 193, 263 (1951).
- 12) Lehninger, A. L.: Physiol. Rev., 42, 467 (1962).
- 13) Blondin, C. A., Vail, W. J., Green, D. E.: Arch. Biochem. Biophys., 129, 158 (1969).
- 14) Mitchell, P., Moyle, J.: Biochem. J., 104, 588 (1967).
- 15) McLaughlin, S. G. A., Dilger, J. P.: Physiol. Rev., 60, 825 (1980).