単離ラット肝ミトコンドリアの呼吸系に対する demethylsterigmatocystin および sterigmatin の除共役作用: sterigmatocystin との比較検討

河合 清^{*1}, 中丸 輝彦^{*1}, 久田 和夫^{*1}, 塩尻 博之^{*1},
野沢 義則^{*1}, 浜崎 徹^{*2}

K. KAWAI^{*1}, T. NAKAMARU^{*1}, H. HISADA^{*1}, H. SHIOJIRI^{*1}, Y. NOZAWA^{*1},
T. HAMASAKI^{*2}: The uncoupling effect of demethylsterigmatocystin
and sterigmatin on rat liver mitochondria:
A comparison with sterigmatocystin

Summary

The effects of sterigmatin and its structural isomer, demethylsterigmatocystin, on mitochondrial respiration were studied in comparison with sterigmatocystin. Both compounds uncoupled the oxidative phosphorylation of rat liver mitochondria, causing marked decreases in RC index and P/O ratio. Sterigmatin, in which the xanthone and dihydrobisfuran moieties are fused in a linear style, was more toxic to mitochondrial function than demethylsterigmatocystin which had an angular shape. In addition, the uncoupling activity of sterigmatocystin was markedly decreased by its demethylation.

Demethylsterigmatocystin (Fig. 1) は強癌原性マイコトキシン sterigmatocystin (Fig. 1) の脱メチル化体であり, sterigmatocystin と同様に dihydrobisfuran 環を有することから癌原性を有することが予想されるが, 癌原性についての知見は未だ得られていない。Sterigmatin (Fig. 1) は demethylsterigmatocystin の構造異性体で dihydrobisfuran 環と xanthone 環とから成立っているが, 両環が直線状に融合していることから, sterigmatocystin や demethylsterigmatocystin とは異った性質を示すことが考えられる。事実, sterigmatin は sterigmatocystin や aflatoxin B₁ と異って核小体分離を起こさないことから癌

Fig. 1. Structures of sterigmatocystin, demethylsterigmatocystin, and sterigmatin

原性を有しないものと考えられている¹⁾。In vitro 癌原性検索の一手法として最近開発された遊離肝細胞 DNA 修復テスト^{2,3)}でも sterigmatin は sterigmatocystin や aflatoxin B₁ と比べて極めて弱い活性を示すのみである⁴⁾。同じ dihydrobisfuran 環と xanthone 環を持つが両者の結合様式の違いにより分子構造が非常に異なる構造異性体 sterigmatin (linear form) および demethylsterigmatocystin (angular form) についてさらに生物活性を比較する目的で, 単離ラット肝ミトコンドリアの ATP 合成系反応への作用を, す

*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 鳥取大学農学部農芸化学教室 (〒680 鳥取市湖山町4-01) Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture, Tottori University (Koyama 4-101, Tottori City 680)

でに除共役作用により ATP 合成を阻害することが知られている sterigmatocystin⁵⁾と比較しながら検討した。その結果 linear form をとる sterigmatin が angular form をとる demethylsterigmatocystin より強力な阻害作用を示し、また sterigmatocystin の脱メチル化によりその阻害作用が顕著に減弱化することが判明した。

材料および方法

試薬： Sterigmatocystin, demethylsterigmatocystin, および sterigmatin は著者らにより *Aspergillus versicolor* (Vuill.) Tiraboschi から単離した⁵⁾。実験には N,N-dimethylformamide に溶解して用いた。Tris-(hydroxymethyl) aminomethane (Tris), ADP, 牛血清アルブミン (BSA) は Sigma Chemicals 社製のものを用いた。その他の試薬は市販品特級試薬を用いた。

実験方法： ラット肝ミトコンドリア画分は 10 mM Tris-Cl および 0.5 mM EDTA を含むショ糖等張液 (pH 7.4) を用いて、Wistar 白色系ラット (200~250 g) から常法⁷⁾に従って調製した。ミトコンドリアの呼吸活性は酸素電極 (Sensanics Japan 社製) を用いて 30°C で測定した。呼吸活性測定用反応液は 697.5 μ mol ショ糖, 30 μ mol KCl, 15 μ mol MgCl₂, 15.5 μ mol 無機リン酸, 1.5 μ mol EDTA, 60 μ mol Tris-Cl, および 1.6 mg ミトコンドリアタンパク質を終量 3.1 ml 中に含み、反応槽外側を恒温水 (30°C) で灌流し、定温を保つようにした。ミトコンドリアの呼吸活性 (RC および P/O 比) は Chance and Williams⁸⁾の方法に従ってオキシグラフから計算した。タンパク質量は BSA を標準タンパク質として Lowry⁹⁾の方法に従って定量した。

結果および考察

調製したミトコンドリアは高い呼吸活性を示し、コハク酸および L-グルタミン酸を呼吸基質に用いて P/O 比 1.8 および 2.7 がそれぞれ得られた。Sterigmatocystin, demethylsterigmatocystin, および sterigmatin の添加により、濃度依存性にミトコンドリアの呼吸活性が抑制され、RC 比および P/O 比の低下が見られた。Fig. 2 および 3 はコハク酸 (4.8 mM) および L-グルタミン酸 (4.8 mM) をそれぞれ呼吸基質として酸化しているミトコンドリアの酸化的リン酸化反応に対する各マイコキシンの影響を検討した結果

Fig. 2. Effects of sterigmatocystin and related mycotoxins on oxidative phosphorylation of mitochondria oxidizing succinate

Reaction mixture was composed of 697.5 μ mol sucrose, 30 μ mol KCl, 15 μ mol MgCl₂, 15.5 μ mol inorganic phosphate, 1.5 μ mol EDTA, 60 μ mol Tris-Cl, and 1.6 mg of mitochondrial protein in a final volume of 3.1 ml (pH 7.4). Reaction was initiated by adding 15 μ mol succinate and 500 nmol ADP and was carried out at 30°C. P/O ratio was calculated by the method of Chance and Williams⁸⁾.

Fig. 3. Effects of sterigmatocystin and related mycotoxins on oxidative phosphorylation of mitochondria oxidizing L-glutamate

Reaction conditions were the same as in Fig. 2, except the addition of 15 μ mol L-glutamate instead of succinate as a substrate.

を示している。溶媒および呼吸活性測定用反応液への溶解度が小さいために完全阻害に至るまでの濃度は得られなかったが、Fig. 2 および 3 は呼吸阻害（ATP 生成阻害）の強さに関して *sterigmatocystin* ≫ *demethylsterigmatocystin* および *sterigmatin* ≫ *demethylsterigmatocystin* の関係を明白に示している。RC 比の低下率においても同様の関係が得られた（結果省略）。すなわち “linear form” の *sterigmatin* が “angular form” の *demethylsterigmatocystin* よりはるかに強力に ATP 合成反応を阻害し、また *sterigmatocystin* の脱メチル化は呼吸阻害作用の顕著な減弱化をもたらすことを示している。*Sterigmatocystin* の脱メチル化はその脂溶性の低下を来し、ミトコンドリア膜への分配率の低下や膜透過速度の低下が生じ、そのことにより ATP 合成阻害作用や細胞毒性⁴⁾ の減弱化がもたらされたものと考えられる。また *sterigmatin* と *sterigmatocystin* がほぼ同程度の ATP 合成阻害作用や細胞毒性⁴⁾ を示すのもこの脂溶性強度の類似に起因するものと思われ、多くの除共役剤の構造的特性に見られるように^{10,11)}、これらのマイコトキシンによる ATP 合成阻害作用も少なくとも 2 個のフェノール性水酸基の存在（酸解離性）と分子の親脂性とに依存しているものと思われる。

以上、*sterigmatocystin*, *demethylsterigmatocystin*, および *sterigmatin* による呼吸阻害作用（ミトコンドリアにおける ATP 生成阻害作用）を比較検討した結果、その強さの順位が *sterigmatocystin*, *sterigmatin*

≫ *demethylsterigmatocystin* であることが判明した。この成績は遊離ラット肝細胞への細胞毒性の強さ⁴⁾ と良い相関性を示し、ミトコンドリアにおける ATP 生成反応への阻害作用が細胞毒性の一因であることを示唆している。

引用文献

- 1) 寺尾 清: マイコトキシン, 1, 6 (1975).
- 2) Williams, G.M.: *Cancer Res.*, **37**, 1845 (1977).
- 3) Williams, G.M., Laspia, M.F., Dunkel, V. C.: *Mutation Res.*, **97**, 359 (1982).
- 4) Mori, H., Sugie, S., Yoshimi, N., Kitamura, J., Niwa, M., Hamasaki, T., Kawai, K.: *Mutation Res.*, in press (1986).
- 5) Kawai, K., Nakamaru, T., Nozawa, Y., Maebayashi, Y., Yamazaki, M., Natori, S.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **48**, 1001 (1984).
- 6) Turner, W.B., Aldridge, D.C.: “Fungal Metabolites II” p. 182 (1983), Academic Press, New York.
- 7) Schneider, W.C.: *J. Biol. Chem.*, **176**, 259 (1948).
- 8) Chance, B., Williams, G.R.: *Advances in Enzymology*, **17**, 65 (1956).
- 9) Lowry, O.H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R.J.: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951).
- 10) Hemker, H.C.: *Biochim. Biophys. Acta*, **63**, 46 (1962).
- 11) Terada, H.: *Biochim. Biophys. Acta*, **639**, 225 (1981).