Aflatoxin B₁ 生合成関連物質 versicolorin A, B による ミトコンドリア電子伝達阻害作用

河合 清^{1*}, 久田 和夫^{2*}, 中丸 輝彦^{2*}, 野沢 義則^{2*}, 浜崎 徹^{3*}

K. KAWAI^{*1}, K. HISADA^{*2}, T. NAKAMARU^{*2}, Y. NOZAWA^{*2}, and
T. HAMASAKI^{*3}: The inhibition of mitochondrial respiratory
chains by versicolorins A and B which are related
to aflatoxin B₁ biosynthesis

Summary

The effects of versicolorins A & B on the respiratory chains of mitochondria were studied using electron transport particles (ETP) prepared from rat liver mitochondria. Both compounds depressed the respiration of ETP, exerting markedly stronger inhibition on NAD-linked than on succinate-linked respiratory system. Of the two compounds, versicolorin B, which has bis-tetrahydrofuran ring, was found to be eminently stronger inhibitor than versicolorin A which had bis-dihydrofuran ring. Neither succinate dehydrogenase (complex II) nor cytochrome *c* oxidase (complex IV) of the respiratory chain was affected by both compounds. NADH-CoQ₂ reductase (complex I) and durohydroquinone oxidase (complex III and IV) activities were depressed by these compounds, exerting a stronger inhibition on the latter reaction. These results apparently indicate that versicolorins A & B interfere mainly with the redox reaction of the complex III (cytochrome *bc*₁ complex) and at the same time weakly with complex I (NADH-CoQ₁₀ reductase). It was thus concluded that versicolorins A & B depressed mitochondrial respiration by direct interactions with respiratory enzymes involving in the electron transport system in mitochondria.

強ガン原性マイコトキシン aflatoxin B₁ の生合成中間物質 versicolorin A (Fig. 1) は bis-dihydrofuran 環を持つ anthraquinone 化合物で、高等動物に対する発癌性は未だ証明されていないが、単離肝細胞や *Salmonella* 菌を用いた実験により遺伝毒性 (genotoxic activity) を有する

Fig. 1. Structures of versicolorins A and B

^{*1} 中京女子大学家政学部 (〒474 愛知県大府市横根町)

Faculty of Home Economics, Chukyo Women's University (Yokone, Ohbu 474)

^{*2} 岐阜大学医学部 (〒500 岐阜市司町40)

Gifu University School of Medicine (Tsukasa 40, Gifu 500)

^{*3} 鳥取大学農学部 (〒680 鳥取市湖山町 4-101)

Faculty of Agriculture, Tottori University (Koyama 4-101, Tottori 680)

ことが証明された¹⁾。また、*versicolorin A* はミトコンドリア毒性も示し、単離ラット肝ミトコンドリアの酸化リン酸化反応に対して強力な除共役作用を示し²⁾、ATP の合成を阻害する。*Versicolorin A* の除共役作用発現には anthraquinone 核の β -位水酸基の存在が重要であることから、除去役作用の機構として、酸解離性による H^+ -輸送性が考えられている³⁾。*Versicolorin A* は除共役作用発現濃度よりやや高濃度でミトコンドリアの state 3 呼吸を抑制する⁴⁾が、その機序についての知見は未だ得られていない。今回、*versicolorin A, B* による呼吸抑制作用の機序を、電子伝達粒子 (ETP) を用いて、主に電子伝達酵素への阻害作用を検討した。その結果、*versicolorin A, B* ともミトコンドリアの電子伝達酵素 complex III の酸化還元反応を阻害し、bis-dihydrofuran 環を有する *versicolorin A* より bis-tetrahydrofuran 環を有する *versicolorin B* (Fig. 1) の方が強力な阻害作用を示すことが判明した。

材料および方法

〔試薬〕*Versicolorin A* および *B* は著者らにより *Asperillus versicolor* (Vuill.) Tiraboschi から単離され⁵⁾、N,N-dimethylformamide (DMFA) 溶液として実験に供された。NADH および Tris は Sigma Chemical 社から、antimycin A は Boehringer Mannheim 社から、牛血清アルブミン (BSA, fraction V) は Armour 製薬社から、durohydroquinone (DHQ) は東京化成(株)から、それぞれ購入した。Coenzyme Q_2 および coenzyme Q_{10} は名古屋大学医学部小沢高将教授およびユーザイ(株)からそれぞれ供与された。その他の試薬は全て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 Schneider の方法⁶⁾に従って Wistar 系白色ラット (200~250 g 体重) の肝臓から、電子伝達粒子 (ETP) は Ruzicka and Crane の方法⁷⁾に従って凍結破壊ミトコンドリアから、それぞれ調製した。調製用等張液には 10 mM Tris-Cl および 0.5 mM EDTA を含む 0.25 M ショ糖溶液 (pH 7.4) を用い、全ての操作を 0~4°C で行った。電子伝達酵素の活性測定には 10 mM KCl, 5 mM $MgCl_2$, 0.5 mM EDTA および 20 mM Tris-Cl を含む 0.225 M ショ糖溶液 (pH 7.4) を反応液として用いた。

NADH およびコハク酸酸化酵素の活性は酸素電極法により測定した。NADH-Co Q_2 還元酵素 (complex I) の活性は antimycin A の存在下に NADH の酸化速度を自記分光光度計を用いて測定した⁸⁾。コハク酸脱水素酵素 (complex II) 活性は antimycin A の存在下に phenazine methosulfate (PMS) を人工電子受容体として用い⁹⁾、酸素電極法により測定した。Durohydroquinone (DHQ) 酸化酵素 (complex III+IV) 活性および cytochrome c 酸化酵素 (complex IV) 活性は DHQ およびアルコールビン酸を人工基質に用いて酸素電極法により、それぞれ測定した。分光学的分析には日立 320S 型自記分光光度計をいた。タンパク質の定量は BSA を標準タンパク質に用いて Lowry らの方法¹⁰⁾に従って行った。

結果および考察

コハク酸および NADH 酸化酵素に対する *versicolorin A, B* の影響

電子伝達粒子のコハク酸および NADH 酸化酵素に対する *versicolorin B* の影響を酸素電極法により検討した (Fig. 2)。*Versicolorin B* は両酸化酵素に対して顕著な阻害作用を示した。*Versicolorin A* も *B* と同様に両酸化系反応を阻害したが、その阻害率は *B* の場合より著しく小さかった (結果省略)。*Versicolorin B* 添加後に Co Q_{10} を添加するとコハク酸酸化系反応の場合は *versicolorin B* による阻害が解除されたが、NADH 酸化酵素の場合は阻害が解除されなかった。

Fig. 2. The effects of versicolorin B on succinate- and NADH- oxidases in ETP

Reaction mixture contained 675 μmol sucrose, 30 μmol KCl, 15 μmol MgCl_2 , 1.5 μmol EDTA, 60 μmol Tris-Cl, and 1 mg of ETP protein in a final volume of 3.1 ml (pH 7.4).

Reaction was initiated by adding succinate or NADH and was carried out at 30°C.

DHQ 酸化酵素に対する versicolorin B の影響

電子伝達粒子による DHQ の酸化反応および versicolorin A, B の影響を酸素電極法により検討した (Fig. 3). DHQ は cytochrome *b* に電子を供与する人工基質として種々の実験系によく用いられ¹¹⁻¹⁸), DHQ の添加により酸素の消費が始まる. DHQ の酸化反応に対して versicolorin B は顕著な阻害作用を示した. NADH 酸化酵素の場合と同様に, versicolorin A による阻害は B に較べて著しく弱いことが判明した (結果省略).

コハク酸脱水素酵素に対する versicolorin A, B の影響

コハク酸脱水素酵素 (complex II) の活性を人工電子受容体 PMS を用いて酸素電極法により測定した (Fig. 4). Antimycin A により complex III の電子伝達反応を完全に阻害した後, versicolorin B の影響を検討したが, 極めて弱い影響が見られるのみで, 濃度増大に伴う阻害率の増大効果は見られなかった.

Cytochrome *c* 酸化酵素に対する versicolorin B の影響

Cytochrome *c* 酸化酵素 (complex IV) の活性を tetramethyl-p-phenylenediamine (TMPD) の存在下に, アスコルビン酸を人工基質に用いて酸素電極法により測定した (Fig. 5). DHQ 酸化

Fig. 3. The effect of versicolorin B on DHQ oxidase in ETP
Reaction condition was same as in Fig. 2. Reaction was
initiated by adding DHQ as a substrate for the complex III.

Fig. 4. The effect of versicolorin B on succinate de-
hydrogenase of ETP
Reaction was initiated by adding succinate. Versi-
colorin B (Vers. B) was added after antimycin A
which specifically inhibited the respiratory chain at
cytochromes bc_1 region.

酵素 (complex III+IV) の活性は versicolorin B により顕著に阻害された (Fig. 3) が, アスコルビン酸を呼吸基質に用いた complex IV の酸化還元反応は阻害されなかった. このことは versicolorin B が complex III (cytochromes bc_1 complex) における電子伝達反応を阻害することを示唆している.

以上, versicolorin A および B が電子伝達粒子の complex III の酸化還元反応を選択的に阻害

Fig. 5. The effect of versicolorin B on cytochrome *c* oxidase in ETP

Reaction was initiated by adding ascorbate in the presence of TMPD which mediates electron transfer between ascorbate and cytochrome *c* oxidase. Other conditions were same as in Fig. 2.

することを示唆する結果が得られた。Aflatoxin B₁ の生合成中間物質 averufin も complex III の cytochromes *bc*₁ 間の電子伝達反応を特異的に阻害することがこれまでに見出されている^{14,15)} が, versicolorin A, B の場合, 阻害強度は明らかに averufin のそれより弱く, また NADH-CoQ₂ 還元酵素 (complex I) および NADH-duroquinone 還元酵素 (complex I) も強力では無いが versicolorin B により阻害される (未発表結果) ことから, 特異的に complex III のみを阻害するとは云えず, averufin とは弱干異った性質が示された。Complex III に対する versicolorin の阻害機序についても興味深い問題が残されているが, コハク酸酸化酵素系の場合, CoQ₁₀ の添加により versicolorin B による阻害が解除されることから, antimycin A¹⁶⁾ や averufin (未発表結果) と同様に complex III における CoQ₁₀ 結合タンパク質との相互作用 (CoQ₁₀ との競合的結合) に基く可能性も考えられる。しかし, versicolorin による阻害が強力で無いことおよび反応系への溶解性が小さいことなどの悪条件のため, このことを詳しく検討するのは極めて困難である。

引用文献

- 1) Wong, J.J., Singh, Hsieh, D.P.H.: Mutation Res., 44, 447 (1977).
- 2) Mari, H., Kitamura, J., Sugie, S., Kawai, K., Hamasaki, T.: Mutation Res., 143, 121 (1985).
- 3) 河合 清, 野沢義則, 前林行雄, 山崎幹夫, 浜崎 敏: マイコトキシン, 18, 35 (1985).
- 4) 河合 清, 野沢義則: 生体エネルギー研究会第11回討論会講演要旨集, p. 16 (1985).
- 5) Hamasaki, T., Hatsuda, Y., Terashima, N., Renbutsu, M.: Agric. Biol. Chem., 31, 11 (1967).
- 6) Schneider, W.C.: J. Biol. Chem., 176, 259 (1948).
- 7) Ruzicka, F.J., Crane, F.L.: Biochim. Biophys. Acta, 223, 71 (1970).
- 8) Hatefi, Y., Rieske, J.S.: Methods Enzymol., 10, 235 (1967).
- 9) King, T.E.: Methods Enzymol., 10, 322 (1967).
- 10) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J.: J. Biol. Chem., 193, 265 (1951).
- 11) Kröger, A., Klingenberg, M.: Eur. J. Biochem., 34, 358 (1973).
- 12) Kröger, A., Klingenberg, M.: Eur. J. Biochem., 34, 231 (1973).
- 13) Boveris, A., Erecinska, M., Wagner, M.: Biochim. Biophys. Acta, 256, 223 (1972).
- 14) 河合 清, 中丸輝彦, 久田和夫, 野沢義則, 浜崎 敏: マイコトキシン, 23, 23 (1986).
- 15) 河合 清, 中丸輝彦, 久田和夫, 野沢義則, 浜崎 敏: マイコトキシン, 24, 19 (1986).
- 16) Takamori, S., King, T.E.: Science, 44, 852 (1964).