回虫の NADH-フマル酸レダクターゼに対するビチオノールの阻害作用

井熊一宏,* 牧村瑞恵, 村越善衛

日本大学薬学部

Inhibitory Effect of Bithionol on NADH-Fumarate Reductase in *Ascarides*

Kazuhiro IKUMA,* Mizue MAKIMURA, and Yoshie MURAKOSHI

College of Pharmacy, Nihon University, 7-1, Narashinodai

7-chome, Funabashi 274, Japan

(Received June 28, 1993)

To elucidate the mechanism of anthelmintic action of bithionol, the inhibitory effect of the drug on NADH-fumarate reductase (NADH-FR) of *Ascaris lumbricoides suum* was examined. NADH-FR, an enzyme of anaerobic carbohydrate metabolic pathway was solubilized from the mitochondria of the worm's muscle with deoxycholate, and then partially purified with the monoethanolamine-Sepharose 4B column chromatography. Rhodoquinone (RQ), which is required for the electron transfer from NADH to fumarate, was separated from the enzyme protein and phospholipids. Although the enzyme protein fraction eluted from the above column did not show NADH-FR activity, this enzyme was reactivated by the addition of purified RQ and phosphatidylcholine. The IC_{50} value of bithionol for reconstituted NADH-FR was $18 \pm 2 \mu\text{M}$. The inhibition type was competitive to RQ. Bithionol inhibited at most 30% NADH-ferricyanide reductase, which did not require RQ, even at high concentration of $150 \mu\text{M}$. These results suggest that the pharmacological action of bithionol, a phenolic anthelmintic, depends on the inhibition of the electron transport system by the competition with RQ.

Keywords—bithionol; NADH-fumarate reductase; ascaris; rhodoquinone; phospholipid

緒 言

駆虫薬ビチオノール [bis(2-hydroxy-3,5-dichlorophenyl)sulfide] は条虫に対し卓効を示すことが知られているが,¹⁾ 肺吸虫に対しても強力で安全な治療効果を示すことが横川らにより報ぜられている。²⁾ 著者ら^{3,4)} 及び新村^{5,6)} は、ビチオノールが寄生虫の炭水化物代謝経路のうち嫌氣的糖質代謝を阻害することを明らかにしてきたが、詳細な作用機序は明らかにされていない。今回、著者らは、回虫の炭水化物代謝経路中の NADH を補酵素とするフマル酸レダクターゼの必須構成成分であるロドキノン (RQ) 及びリン脂質を粗酵素蛋白部分から分離した。そして、それより再構成した酵素を用い、ビチオノールの NADH-フマル酸レダクターゼに対する阻害作用を調べ、その機序を考察した。

実 験 の 部

方法及び材料

1. 使用薬物 ビチオノール (ナトリウム塩を使用), ヘキサクロロフェン, ヘキシルレゾル

シノール, ジクロロフェンは東京化成, ニクロサミド, cytochrome c (type III from horse heart), L- α -phosphatidylcholine (type II-S from soybean), coenzyme Q₁₀ (CoQ₁₀) は Sigma, disodium fumarate は半井化学薬品, sodium deoxycholate (DOC) は Difco, sodium cholate (CA), 及び Wakogel C-300 は和光純薬, Sepharose 4B は Pharmacia, Bio-Beads SM-2 は Bio-Rad から入手した. Coenzyme Q₁ (CoQ₁), coenzyme Q₂ (CoQ₂) はエーザイより恵与された.

2. NADH-フマル酸レダクターゼ (NADH-FR) の可溶化 NADH-FR は, 屠殺場より入手したブタ回虫 (*Ascaris lumbricoides suum*) より斜紋筋を集め, 9 倍量の 1 mM EDTA を含有したリン酸緩衝液 (pH 7.4) を加え細切後, ホモジナイズした. ホモジネートを 1000×*g*, 10 分間遠心後, 上清をガーゼでろ過し, ろ液はさらに 100000×*g*, 60 分間遠心した. 沈澱分画を上記緩衝液で洗浄後, 0.9 倍量の 1 mM EDTA を含んだ 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4, buffer A) に懸濁した. この懸濁液 (5—6 mg protein/ml) に 0.4% DOC を加えて 30 分放置後, 127000×*g*, 60 分遠心分離し, その上清からろ過により浮遊物を除き可溶化酵素液とした.

3. RQ の分離 Monoethanolamine-Sepharose 4B (Monoet-Seph) column chromatography を用い, 可溶化酵素液より酵素蛋白と RQ を分離した. Monoet-Seph は, Shaltiel の方法⁷⁾に従って調製した.

可溶化酵素液 (570 mg protein) を buffer A (0.5% CA, 1 mM dithiothreitol (DTT), 100 mM NaCl を含有) で 2 倍に希釈し, buffer B (0.2% DOC, 0.25% CA, 1 mM DTT, 100 mM NaCl を含有した buffer A) で平衡化した Monoet-Seph column (2.8×6 cm) に適用し, buffer B で十分に洗浄した. 樹脂の上部に結合していた蛋白を含まない赤色物質 (B 分画) を完全に溶出させた後, 同緩衝液の NaCl 濃度を 500 mM に上げ, 結合していた酵素蛋白 (A 分画) を溶出させた (Fig. 1). A 分画は直ちに 1 mM DTT を含んだ buffer A で 3 倍に希釈し, 不活性化酵素液とした.

4. 回虫筋より RQ の抽出精製及び確認^{8,9)} 回虫筋ミトコンドリア分画に 1.6 倍量のクロロホルム-メタノール (2:1) を加え, 4°C, 30 分間攪拌抽出し, 3000 回転, 10 分間遠心分離しクロロホルム層を分取し, 沈渣は再度抽出に用いた. 得られたクロロホルム層は 40°C に加温して溶媒を除去し, 残渣に筋 1 g 当り 1 ml の冷アセトンを加え溶解後, -20°C で 24 時間放置した. 析出物を 3000 回転, 10 分間遠心して除去後アセトン層を減圧乾固し, クロロホルム-ベンゼン (1:1) に溶解し, Wakogel C-300 column (2.6×30 cm) を用い, 上記溶媒にて溶出される赤色部分を集め溶媒を除去して RQ の結晶を得た. 得られた結晶は, エタノールに溶解し, 酸化型ではそのまま, 還元型は sodium borohydride を加えて混和し, 4—20 分放置後それぞれ紫外吸収を測定した. 酸化型は 283—284 nm, 還元型は 291—292 nm に最大吸収を確認した. また, 薄層クロマトグラフィーによる RQ の確認は, Silicagel 70 FM plate を用い, クロロホルム-ベンゼン (1:1) で展開した. 分離したスポットはプレートを風乾後, 0.1% sodium borohydride 溶液に浸して還元した. 次いで 0.1% 塩酸で過剰の還元剤を除いた後, 1% ニトロブルーテトラゾリウムを噴霧し, 赤外線ランプで数分間加温することにより, 生成するフォルマザンの発色で確認した.

5. 再構成酵素液の調製 上記不活性化酵素液に phosphatidylcholine (1 mg/mg protein) 及び回虫筋ミトコンドリア分画より精製した RQ (0—250 μ g/mg protein) を加え, 30 秒ずつ 2 回超音波処理した後, 4°C で 60 分攪拌して, 酵素系を再構成した.¹⁰⁾ 再構成酵素液に含まれる界面活性剤の除去には, Bio-Beads を使用した.¹¹⁾

6. 酵素活性の測定¹²⁻¹⁴⁾ 再構成酵素液中の NADH-FR 活性は, 1 mM fumarate, 0.05 mM NADH, 1 mg ウシ血清アルブミン (BSA), 酵素液 (30—100 μ g protein) を含む 100 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) (全量 3 ml) 中, 37°C で反応を行い, NADH の消費に伴う 340 nm の吸光度の減

少を測定した。また、この再構成酵素液に混在する諸種酵素の活性は次の方法で測定した。

NADH oxidase (NADH-Ox) 活性は上記反応混液から fumarate を除いた系で行った。NADH のモル吸光係数は $6.27 \times 10^{-3} \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ とした。

NADH-シトクローム c レダクターゼ (NADH-Cyt) 活性は、0.2 mM NADH, 30 μM シトクローム c, 1 mg BSA 及び酵素液 (10–50 μg protein) を含んだ 100 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) (全量 3 ml) 中でシトクローム c の還元に伴う 550 nm の吸光度の増加を測定した。

コハク酸-シトクローム c レダクターゼ (Succ-Cyt) 活性は、NADH の代わりに 0.3 mM succinate を基質とし、NADH-Cyt と同様に測定した。シトクローム c のモル吸光係数は $0.0185 \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ とした。

NADH-ferricyanide レダクターゼ (NADH-Ferri) は、400 μM NADH, 1 mM ferricyanide, 1 mg BSA 及び酵素液 (10–30 μg protein) を含んだ 100 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) (全量 3 ml) 中で ferricyanide の還元に伴う 440 nm の吸光度の減少を測定した。

コハク酸-ferricyanide レダクターゼ (Succ-Ferri) は、1 mM succinate, 0.25 mM ferricyanide, 1 mg BSA 及び酵素液 (30–100 μg protein) を含んだ 100 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) (全量 3 ml) 中で上記と同様に測定した。Ferricyanide のモル吸光係数は $1 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ とした。

7. 諸種駆虫薬の酵素阻害作用 酵素阻害作用の検索には、上記再構成酵素を使用した。使用した駆虫薬はエタノールに溶解し、インキュベート開始直前にそれぞれの酵素活性測定用のセル中に 50 μl 添加した。エタノールのみ添加時の酵素活性を 100% とし、諸種駆虫薬の阻害曲線から IC_{50} を求めた。阻害形式は、二重逆数プロットより求めた。

8. 蛋白定量 BSA を標準として Bradford 法¹⁵⁾により測定した。

結 果

RQ 及びリン脂質再添加による酵素の再活性化

可溶化酵素液の RQ を含む B 分画は、Monoet-Seph column 適用により酵素蛋白 A 分画より完全に分離された (Fig. 1)。

A 分画に存在する諸種酵素のうち、NADH-FR は A 分画のみでは活性がなく、又は精製した RQ やリン脂質を単独添加してもまったく酵素活性を示さなかったが、両者を添加することにより再活性化された (Table I)。リン脂質は市販の phosphatidylcholine が回虫筋ミトコンドリア分画からのそれと同じ添加効果を示したことから市販品を使用した。

再活性化に必須の RQ とリン脂質の濃度依存性を試験したところ、酵素蛋白 1 mg 当たり RQ は 100 μg (Fig. 2)、リン脂質は 1 mg (Fig. 3) で最大活性を示した。

哺乳動物で RQ に相当する生体キノンである ユビキノン (CoQ_{10}) 及びその誘導体の添加効果を検索した。試験した酵素のうち、NADH-Ox,

Fig. 1. Elution Pattern of the Solubilized Fraction on a Monoethanolamine-Sepharose 4B Column

Fraction solubilized with 0.4% deoxycholate (570 mg) was applied to a column (2.8 $\times$ 6 cm) equilibrated with 50 mM phosphate buffer (pH 7.4) containing 0.2% deoxycholate, 0.25% cholate, 1 mM dithiothreitol, 1 mM EDTA and 100 mM NaCl (buffer B). Elution was performed with the buffer B at a flow rate of 150 ml/h, and 70-ml fractions were collected (fraction B). Arrow indicates the exchange of elution buffer for the buffer B containing of 500 mM NaCl. Following eluate was collected as the inactive enzyme (fraction A).

TABLE I. Reconstitution of Several Enzymes Eluted from Monoethanolamine-Sepharose 4B Column by Rhodoquinone and/or Phosphatidylcholine

Preparations	Enzyme activities ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protein)			
	NADH-fumarate reductase	NADH oxidase	NADH-cytochrome c reductase	Succinate-cytochrome c reductase
Fraction A	0	4 ± 2	15 ± 2	50 ± 6
Fraction A+rhodoquinone	0	9 ± 2	25 ± 2	62 ± 7
Fraction A+phosphatidylcholine	0	7 ± 1	23 ± 3	94 ± 11
Fraction A+rhodoquinone +phosphatidylcholine	127 ± 11	114 ± 10	259 ± 24	130 ± 6

Fraction A (indicated in Fig. 1) was incubated with either phosphatidylcholine (1 mg/mg protein) or purified rhodoquinone (0.1 mg/mg protein), or both of them at 4°C for 60 min. Enzyme activities were determined as described in the Methods. Each value represents the mean $\pm$ S.E. from three different experiments.

Fig. 2. Effects of Rhodoquinone on the Various Enzymes in the Eluate (Fraction A)

Enzyme activities in the fraction A were determined by changing concentrations of rhodoquinone in the presence of NADH (absent in the case of succinate-cytochrome c reductase), phosphatidylcholine (1 mg/mg protein) and each substrate. $\circ$, NADH-fumarate reductase; $\bullet$, NADH oxidase; Δ , NADH-cytochrome c reductase; $\blacktriangle$, succinate-cytochrome c reductase.

Fig. 3. Effects of Phosphatidylcholine on the Various Enzymes in the Eluate (Fraction A)

Enzyme activities in the fraction A were determined by changing concentrations of phosphatidylcholine in the presence of NADH (absent in the case of succinate-cytochrome c reductase), rhodoquinone (50 $\mu\text{g}/\text{mg}$ protein) and each substrate. Symbols correspond to those in Fig. 2.

NADH-Cyt 及び Succ-Cyt は CoQ 誘導体により一部活性化されたが, NADH-FR は活性化されず, RQ 添加の場合だけ活性化された. しかしながら, NADH-Ferri 及び Succ-Ferri は, いずれのキノンを添加しても活性化されなかった (Table II).

TABLE II. Effects of Several Quinones on the Partially Purified Enzymes

Enzymes	Specific activity ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protein)				
	Rhodoquinone	CoQ ₁₀	CoQ ₂	CoQ ₁	—
NADH-fumarate reductase	130 $\pm$ 11	2	3	3	0
NADH oxidase	109 $\pm$ 13	17 $\pm$ 2	24 $\pm$ 6	23 $\pm$ 5	7 $\pm$ 1
NADH-cytochrome c reductase	260 $\pm$ 17	62 $\pm$ 9	54 $\pm$ 13	52 $\pm$ 13	23 $\pm$ 2
Succinate-cytochrome c reductase	138 $\pm$ 7	128 $\pm$ 13	110 $\pm$ 16	100 $\pm$ 15	94 $\pm$ 9
Succinate-ferricyanide reductase	603 $\pm$ 52	580	665	616	525 $\pm$ 37
NADH-ferricyanide reductase	7820 $\pm$ 450	6680	6590 $\pm$ 310	6290 $\pm$ 180	7530 $\pm$ 320

Fraction A (indicated in Fig. 1) was incubated with or without rhodoquinone, CoQ₁₀, CoQ₂, or CoQ₁ (0.1 mg/mg protein), and phosphatidylcholine (1 mg/mg protein). The enzyme activities were determined as described in the Methods. Each value represents the mean $\pm$ S.E. from two to seven different experiments.

諸種酵素に対するビチオノールの阻害

キノン類で再活性化をされた NADH-FR, NADH-Ox, NADH-Cyt 及び Succ-Cyt の酵素はビチオノールによって強く阻害され, その IC₅₀ はそれぞれ 18 $\pm$ 2, 25 $\pm$ 5, 50 $\pm$ 5 及び 66 $\pm$ 8 μM であった. これに対し, Succ-Ferri に対するビチオノールの IC₅₀ 値は 132 μM で, NADH-Ferri に対しては 150 μM でも酵素阻害は約 30% にすぎなかった (Table III).

NADH-FR に対するビチオノールの阻害形式

RQ とリン脂質によって活性化された NADH-FR の活性値を RQ に対する二重逆数プロットし, ビチオノールの阻害形式を調べた. ビチオノールは添加された RQ に対して競合的に拮抗し, その K_i 値は 5.1 $\pm$ 1.4 μM であった (Fig. 4).

また, ビチオノールと同様にフェノール性 OH 基を有する駆虫薬の IC₅₀ は 9.3—30 μM であった (Table IV). 阻害形式は, ジクロロフェ

TABLE III. Inhibitory Effects of Bithionol on the Reconstituted Enzymes

Enzymes	IC ₅₀ of bithionol (μM)
NADH-fumarate reductase	18 $\pm$ 2
NADH oxidase	25 $\pm$ 5
NADH-cytochrome c reductase	50 $\pm$ 5
Succinate-cytochrome c reductase	66 $\pm$ 8
Succinate-ferricyanide reductase	132 $\pm$ 14
NADH-ferricyanide reductase	>150 ^{a)}

The inhibition by bithionol of the enzymes in the fraction A treated with rhodoquinone (0.1 mg/mg protein) and phosphatidylcholine (1 mg/mg protein) was studied as described in the Methods.

a) The inhibition by bithionol of NADH-ferricyanide reductase was only about 30% at 150 μM . The inhibition by bithionol at the higher concentration could not be examined because of the insolubility.

Fig. 4. Double-Reciprocal Plots of NADH-Fumarate Reductase against the Concentration of Rhodoquinone

Enzyme activities were determined in the absence (O), or presence of 10 μM (Δ) or 15 μM (▲) of bithionol as described in the Methods.

TABLE IV. Inhibitory Effects of Phenolic Anthelmintics on NADH-Fumarate Reductase

Anthelmintics	IC ₅₀ (μM)	Type of inhibition
Bithionol	18±2	Competitive
Hexylresorcinol	9.3	Competitive
Hexachlorophene	13	Mixed type
Dichlorophen	14	Competitive
Niclosamide	30	Competitive

Values represent the mean±S.E. from at least two different experiments. Type of inhibition was assessed by the double-reciprocal plots.

ン、ヘキシルレゾルシンノール、ニコロサミドは RQ に対して競合型を、ヘキサクロロフェンは混合型を示した (Table IV). しかし、高濃度のビチオノールは RQ に競合しなかった (Fig. 5).

Fig. 5. Inhibitory Effects of Bithionol on NADH-Fumarate Reductase Activity

Enzyme activities were determined in the absence (○) or presence of 10 μM (Δ) or 30 μM (□) of bithionol as described in the Methods.

考

察

ビチオノールが寄生虫に特異的に存在する嫌氣的糖質代謝経路のフマル酸レダクターゼなどの酵素系を阻害することから、その駆虫作用は回虫筋のエネルギー産生を抑制することに基づくものと考えられる。⁸⁻⁹⁾ フマル酸レダクターゼには電子供与体として FMNH₂ 又は FADH₂ を要求する酵素と NADH を要求する酵素 (NADH-FR) の2つの異なった酵素が存在し、ビチオノールは前者をほとんど阻害しないが、後者を顕著に阻害することが示されている。^{5,6)} NADH-FR は complex I, II 及び RQ より構成されと考えられており、^{14,16)} 特に嫌氣的条件下において棲息する寄生虫でその活性が高い。^{6,17)} 今回使用したブタ回虫の成虫は、腸管内に棲息し嫌氣的な代謝を活発に行っており、NADH-FR 等の嫌氣的糖質代謝酵素源として適していると考えた。しかし、回虫は吸虫類、条虫類と異り厚い外皮を有しているため、臨床的にビチオノールは回虫の駆虫薬としては用いられていない。また、NADH-FR は非常に不安定であって、著者らは Monoet-Seph column chromatography を用いて、はじめて NADH-FR 系から活性発現に必須な RQ 及びリン脂質と A 分画の酵素蛋白とを緩やかな条件で分離し得た。A 分画は類似の酵素を含んでおり、純粋な NADH-FR を分離することができなかったが、同分画に RQ とリン脂質を添加することにより活性は認められ、同系の再構成に成功した。また、A 分画はリン脂質のみの再添加では、まったく NADH-FR 活性を示さなかったことから、RQ はほぼ完全に上記樹脂により分離されたことが分かった。

RQ は、ほ乳類の CoQ₁₀ に相当し、CoQ₁₀ の2位の -OCH₃ が -NH₂ に置換した化学構造をもつ生体キノンであるが、その特異性については回虫で多く報告されている。^{9,12,18)} しかし、Table II に示したように、CoQ₁₀ や側鎖の isoprene が短い CoQ₂ や CoQ₁ は酵素の再活性化に対し RQ の代わりとはならず、NADH-FR の活性化は RQ に特異的な作用であった。これは、酸化還元電位や脂溶性の違いによるものと推察される。

NADH-FR に対するビチオノールの IC₅₀ は 18 μM であり、RQ に対して競合的に拮抗するが、NADH-Ferri のようにキノン類の添加効果を受けなかった酵素に対してほとんど阻害しない (Table III). このことは、ビチオノールの作用がキノン類と関係することを示唆するものであろう。

しかし、ピチオノールは、 IC_{50} 値の約 3 倍の高濃度を用いると酵素を阻害はするものの、もはや RQ とは競合せず、おそらく活性発現に必須な蛋白の疎水性部分と不可逆的に結合するものと推察される。また、他のフェノール性駆虫薬も RQ と競合する (Table IV) ことから、これらの薬物に共通した性質であると考えられる。

以上より、ピチオノールは寄生虫のエネルギー獲得に関与する NADH-FR のような嫌氣的糖質代謝経路の酵素系において、RQ に競合的に拮抗することが示され、このことが本薬物の駆虫作用に強く関連しているものと考えた。

引用文献

- 1) 沢田 勇, 寄生虫学雑誌, **6**, 8 (1956).
- 2) M. Yokogawa, H. Yoshimura, T. Okura, M. Sano, M. Tsuji, M. Iwasaki, H. Hirose, *Jpn. J. Parasitol.*, **10**, 317 (1961).
- 3) 村越善衛, 守屋芳子, 新村宗敏, 牧村瑞恵, 日薬理誌, **64**, 117§ (1968).
- 4) 新村宗敏, 村越善衛, 日本大学薬学研究報告, **17**, 11 (1977).
- 5) 新村宗敏, 日大医学雑誌, **36**, 651 (1977).
- 6) 新村宗敏, 千葉医学雑誌, **56**, 243 (1980).
- 7) S. Shaltiel, *Methods Enzymol.*, **34**, 126 (1974).
- 8) Y. Shimomura, T. Ozawa, *Biochem. Int.*, **2**, 313 (1981).
- 9) M. Sato, H. Ozawa, *J. Biochem.*, **65**, 861 (1969).
- 10) A. Kroger, *Methods Enzymol.*, **53**, 579 (1978).
- 11) P. W. Holloway, *Anal. Biochem.*, **53**, 304 (1973).
- 12) K. Kita, S. Takamiya, R. Furushima, Yu-chang Ma, H. Suzuki, T. Ozawa, H. Oya, *Biochim. Biophys. Acta*, **935**, 130 (1988).
- 13) S. Takamiya, R. Furushima, H. Oya, *Molecular Biochem. Parasitol.*, **13**, 121 (1984).
- 14) S. Takamiya, R. Furushima, H. Oya, *Biochim. Biophys. Acta*, **848**, 99 (1986).
- 15) M. M. Bradford, *Anal. Biochem.*, **72**, 248 (1976).
- 16) 林 栄一, 寺田 護, 寄生虫学雑誌, **22**, 1 (1973).
- 17) 新村宗敏, 村越善衛, 日本大学薬学研究報告, **17**, 54 (1977).
- 18) M. Sato, K. Yamada, H. Ozawa, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **46**, 578 (1972).