2-Aminoethylisothiuronium (AET) 誘導体のミトコンドリア呼吸におよぼす影響

小澤 光, 百瀬和享, 原 洋一, 趙 台淳

東北大学医学部薬学科¹⁾Effects of 2-Aminoethylisothiuronium (AET) Derivatives
on Mitochondrial RespirationHIKARU OZAWA, KAZUTAKA MOMOSE, YOICHI HARA,
and CHO TAI SOONPharmaceutical Institute, Tohoku University¹⁾

(Received February 27, 1969)

Effects of twenty five species of 2-aminoethylisothiuronium (AET) derivatives on the phosphate controlled respiration of rat liver mitochondria were studied using oxygen electrode apparatus.

Among these compounds, 2-aminoethyl-N'-p-chlorophenylisothiuronium bromide hydrobromide is the most potent inhibitor. The inhibitory site might be located in the electron transport system of mitochondria. The inhibitory action was confirmed by manometric method.

Doherty²⁾ 等により 2-aminoethylisothiuronium (AET) が放射線防護物質として見出されて以来, その誘導体が数多く合成され, Distefano 等³⁻¹⁰⁾ によりその薬理作用が種々検討された. 小沢等¹¹⁻¹⁷⁾ も AET 誘導体をあらたに合成し, その薬理作用についてすでに報告した. AET 誘導体は中性溶液で transguanylation を起し, 2-mercaptoethylguanidine (MEG) 誘導体に変化することが知られている.^{2,18)}

一方 guanidine 系化合物に関する生化学的研究として mitochondria (Mt) の oxidative phosphorylation に対する作用について興味ある報告¹⁹⁻²³⁾ がみられる.

以上の観点から著者等は新らしく合成した AET 誘導体が Mt における electron transport system, あるいは

- 1) Location: Aobayama, Sendai.
- 2) D.G. Doherty, W.T. Burnett, *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **89**, 312 (1955).
- 3) V. Distefano, D.E. Leary, D.G. Doherty, *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, **117**, 425 (1956).
- 4) V. Distefano, D.E. Leary, K.D. Little, *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, **126**, 158 (1959).
- 5) V. Distefano, D.E. Leary, *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, **126**, 304 (1959).
- 6) V. Distefano, P.S. Korn, D.E. Leary, *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, **134**, 341 (1961).
- 7) V. Distefano, J.J. Klahn, D.E. Leary, *Radiation Res.*, **17**, 792 (1962).
- 8) V. Distefano, P.S. Korn, D.E. Leary, *Radiation Res.*, **18**, 177 (1963).
- 9) V. Distefano, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **114**, 588 (1964).
- 10) V. Distefano, J.J. Klahn, *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, **151**, 236 (1965).
- 11) 小澤 光, 原 洋一, 薬誌, **88**, 156 (1968).
- 12) 小澤 光, 原 洋一, 薬誌, **88**, 314 (1968).
- 13) 小澤 光, 原 洋一, 薬誌, **88**, 747 (1968).
- 14) 小澤 光, 原 洋一, 薬誌, **88**, 933 (1968).
- 15) 小澤 光, 原 洋一, 薬誌, **88**, 1270 (1968).
- 16) 小澤 光, 久保田克巳, 原 洋一, 薬誌, **88**, 1352 (1968).
- 17) 小澤 光, 原 洋一, 日薬理誌, **64**, 467 (1968).
- 18) T. Hino, K. Tanaami, K. Yamada, S. Akaboshi, *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, **14**, 1193 (1966).
- 19) G. Hollunger, *Acta Pharmacol. Toxicol.*, **11** (suppl), 1 (1955).
- 20) B.C. Pressman, *J. Biol. Chem.*, **238**, 401 (1963).
- 21) B. Chance, G. Hollunger, *J. Biol. Chem.*, **238**, 432 (1963).
- 22) J.B. Chappell, *J. Biol. Chem.*, **238**, 410 (1963).
- 23) R.J. Guillory, E.C. Slater, *Biochim. Biophys. Acta.*, **105**, 221 (1965).

TABLE I. Chemical Structures of Isothiuronium Derivatives and the Inhibitory Actions on Mitochondrial Respiration

$$\left[\begin{array}{c} \text{R}_1 \\ | \\ \text{R}_2-\text{N}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SC} \begin{array}{l} \nearrow \text{NHR}_3 \\ \searrow \text{NHR}_4 \end{array} \\ | \\ \text{R}_2 \end{array} \right]^{2+} \cdot 2\text{X}^-$$

Comps. No.	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	X	Inhibition		
						0.1 mM	0.5 mM	1 mM
I	H	H	H	H	Br		— ^{a)} (↓) ^{b)}	
II	H	H	H	H	½SO ₄		—(↓)	—(↓)
III	H	H		H	Br		↓(↓)	↓↓(↓↓)
IV	H	H		H	Br	↓(↓)	↓↓↓(↓↓)	
V	H	H	—CH ₂ —CH ₂ —		Br		—(—)	—
VI	H	H	CH ₃	CH ₃	Br		—(—)	↓
VII	H	H	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	Br		—(—)	—
VIII	H	H			Br		—(—)	—
IX	H	H		H	Br	↓	↓↓(↓)	↓↓↓(↓↓)
X	H	CH ₃	H	H	Cl		—(—)	—
XI	H	CH ₃		H	Br		—(—)	—
XII	H	CH ₃	—CH ₂ —CH ₂ —		Br		—(—)	—
XIII	H	CH ₃	CH ₃	CH ₃	Br		—(—)	—
XIV	H	CH ₃	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	Br		—(—)	—
XV	H	CH ₃			Br		—(↓)	—
XVI	H	C ₂ H ₅	H	H	Cl		—(—)	—
XVII	H	C ₂ H ₅		H	Br		—(—)	—
XVIII	H	C ₂ H ₅	—CH ₂ —CH ₂ —		Cl		—(—)	—
XIX	H	C ₂ H ₅	CH ₃	CH ₃	Br		—(—)	—
XX	H	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	Br		—(—)	—
XXI	H	C ₂ H ₅			Br		—(—)	—
XXII	CH ₃	CH ₃	H	H	Br		—(—)	—
XXIII	CH ₃	CH ₃	—CH ₂ —CH ₂ —		Br		—(—)	—
XXIV	CH ₃	CH ₃			Br		—(—)	—
XXV		$\begin{array}{c} \text{CH}_2-\text{S} \\ \\ \text{CH}_2-\text{N}^+ \end{array} \begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \end{array} \begin{array}{c} \text{C}-\text{NH}_2 \cdot \text{HBr} \\ \diagup \\ \diagdown \end{array}$			Br		↓(—)	↓

Detailed experimental conditions were described in Fig. 1.

a) inhibition of the respiration in the presence of ADP (state-3)

b) In the case of absence of ADP (state-4) the inhibition represented in parenthesis.

—<10% ↓<30% ↓↓<70% ↓↓↓>70%

それに共役した oxidative phosphorylation に対しいかなる影響を与えるかについて検討し若干の知見を得たので報告する。

実験方法

Mt はラット肝より調製した。呼吸活性は酸素電極法²⁴⁻²⁵⁾ および Warburg 検圧計法²⁵⁾ により測定した。

24) B. Hagihara, *Biochim. Biophys. Acta*, **46**, 134 (1961).

25) H. Ozawa, S. Natori, K. Momose, *Chem. Pharm. Bull.* (Tokyo), **15**, 1095 (1967).

Fig. 1. Polarographic Tracings showing Effects of 2-Aminoethyl-N'-*p*-chlorophenylisothiuronium Bromide Hydrobromide (IV) on the Mitochondrial Respiration

The reaction mixture was an air-equilibrated solution containing 0.3M mannitol, 10mM phosphate, 2.5mM $MgCl_2$, and 0.25mM EDTA, in a final volume of 2.5 ml (pH 7.4). Additions were 0.1 ml (curve A) or 0.2 ml (curve B) of mitochondrial suspension (Mt), 25 μ l of 0.3M sodium succinate (Succ) (curve A) or 0.3M sodium glutamate (Glut) (curve B), 10 μ l of 0.08M adenosine-5'-diphosphate disodium salts (ADP, obtained from Sigma, 98% purity), 25 μ l of 5 mM 2,4-dinitrophenol (DNP) and 25 μ l of 50 mM 2-aminoethyl-N'-*p*-chlorophenylisothiuronium bromide hydrobromide (IV). The additions are indicated by arrows. The incubation was carried out at 25°. Controls were shown by broken lines.

結果および考察

Table I に新 AET 誘導体 25 種についてその化学構造と、Mt の呼吸に対する作用を酸素電極法により測定した結果について示している。その結果 phenyl (III), *p*-chlorophenyl (IV) および naphthyl (IX) を有する誘導体に顕著な state-3 呼吸の抑制がみられ、これらの化合物についてその阻害作用と構造との相関々係についてみると Table I に示す 2-aminoethylisothiuronium の R_3 が phenyl あるいは naphthyl group で R_1, R_2, R_4 は H である場合に阻害作用を示している。Fig. 1 は化合物 IV についての呼吸に対する作用を酸素電極法で測定した結果である。State-4 の呼吸状態に対しこの物質を添加すると瞬間的に呼吸解放がみられるがまもなく state-4 の呼吸あるいはそれより低い呼吸活性を示した。ひきつづいて ADP を添加したが state-3 の呼吸も抑制された。また 2,4-Dinitrophenol (DNP) を加えたがその阻害は解放されなかった。このことより、AET 誘導体は Mt の electron transport system を阻害するものと考えられる。したがって AET が transguanylation した結果得られると考えられる guanidine 誘導体はすでに報告²⁶⁾したとおり hexylguanidine のごとく energy transfer reactions に阻害作用を示すものとは全く作用態度が異なるものと考えられる。

なお 2-aminoethyl isothiuronium 誘導体が酸素電極装置の電極と反応して見かけ上の呼吸抑制を示すことが考えられるので Warburg 検圧計法により阻害作用の最も強かった化合物 IV について種々の濃度における作用を検討した。その結果 Fig. 2 にみられるように濃度の増加につれて酸素消費量が減少しており AET 誘導体は電極には作用しないことが判明した。

Fig. 2. Effects of 2-Aminoethyl-N'-*p*-chlorophenylisothiuronium Bromide Hydrobromide on the Respiration of Rat Liver Mitochondria Determined Manometrically

Incubation mixture contained 0.25M sucrose, 10 mM inorganic phosphate, 0.2 mM EDTA, 2.5 mM $MgCl_2$, 0.2 ml of mitochondrial suspension and 0.2 ml of 0.5M sodium succinate. The final volume was 2.0 ml. pH 7.4. The incubation was initiated by addition of sodium succinate placed in side arm. In the center well 0.2 ml of 20% potassium hydroxide was placed. The final concentrations of the added isothiuronium derivative are indicated in the figure.