

## 鰹節発酵菌由来の色素 flavoglaucin と auroglaucin によるミトコンドリアの構造と呼吸機能への傷害作用

The Impairing Effects of Flavoglaucin and Auroglaucin Derived from Fermented Fungi of Dried Bonito on Mitochondrial Structure and Respiratory Function

角田香澄 三宅義明 糸魚川政孝 河合 清

Kasumi TSUNODA Yoshiaki MIYAKE Masataka ITOIGAWA Kiyoshi KAWAI

キーワード：ミトコンドリア, Flavoglaucin, Auroglaucin, 膨潤化, 脱共役

Key words : Mitochondria, Flavoglaucin, Auroglaucin, Swelling, Uncoupling

### 要約

鰹節の熟成過程で数種類の *Aspergillus (Eurotium)* 属真菌が着生し、このことが鰹節のうまみに重要な働きをしていることが知られている。我々は *Eurotium herbariorum* から benzohydroquinone 色素 flavoglaucin および auroglaucin を単離した。Flavoglaucin については、これまでに大腸癌抑制作用が報告されている。化学物質によるアポトーシス細胞死誘発機序の1つにミトコンドリアのイオン透過性変化 (permeability transition) の誘発、チトクロムcの遊離等、ミトコンドリアの機能への作用が関与していることが知られている。そこで今回、単離ラット肝ミトコンドリアを用いて、両色素によるミトコンドリアの構造及び呼吸機能への影響を検討した。その結果、両色素はミトコンドリアの膨潤化誘起作用および脱共役作用を示すことが判明した。

### Abstract

The epiphytosis of *Aspergillus (Eurotium)* fungi to dried bonito during its aging process is critical for the umami taste. We have isolated the benzohydroquinone pigments flavoglaucin and auroglaucin from the dried bonito fungus *Eurotium herbariorum*. Flavoglaucin is known to repress intestinal carcinogenesis. The alteration of mitochondrial function such as permeability transition and release of cytochrome c is known to participate in the induction of apoptosis by chemical compounds. In this study, we have investigated the effects of flavoglaucin and auroglaucin on mitochondrial structure and respiratory function, using isolated rat liver mitochondria.

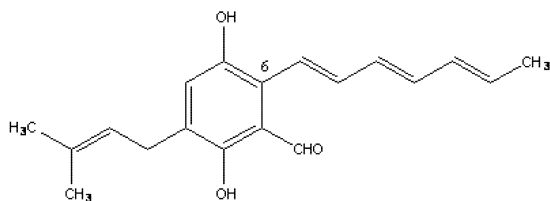
Both pigments were found to induce mitochondrial morphological alteration (swelling) and to exert the uncoupling effect on oxidative phosphorylation.

## 1. 序論

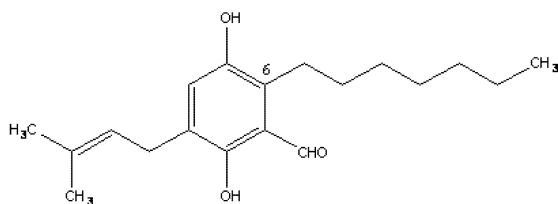
納豆や醤油、みそといった日本古来の食品の多くは、その熟成課程で真菌の働きが大きく関与している。鰹節は、その熟成過程で数種類の *Aspergillus (Eurotium)* 属真菌が着生し、このことが調理時のうまみに重要な働きをしていることが知られている<sup>(1)</sup>。

真菌が産生する2次代謝産物の中には、肝毒性や発がん性などヒトの健康に有害なものが多量に見出されているが、鰹節に着生する真菌はそのような有害物質を生産しない。ウサギを用いた主色素 flavoglaucin の毒性実験では大量投与により弱い肝毒性が見出されているのみである<sup>(2)</sup>。

Flavoglaucin および auroglaucin (Fig. 1) は、*Aspergillus (Eurotium)* 属が産生する benzohydroquinone 色素で構造上飽和炭化水素鎖と不飽和炭化水素鎖を有することで異なり、現在までにラジカル捕捉作用<sup>(3)</sup>や抗酸化作用<sup>(4)</sup>、大腸癌抑制作用<sup>(5)</sup>等、人の健康に有益であることを示唆する働きが報告されている。



**Auroglaucin**



**Flavoglaucin**

Fig. 1 Structures of flavoglaucin and auroglaucin

ミトコンドリアの主な働きは、ATP合成と、細胞内Ca濃度の維持であるが、その他に細胞死の調節、ROS(活性酸素種)生成等も行われる。外因性の化学物質によるアポトーシス細胞死誘発機序の1つに、イオン透過性変化(permeability transition)の誘発、チトクロムcの

遊離等、ミトコンドリアの機能の変化が関与していることが知られている<sup>(6)</sup>。Flavoglaucin のミトコンドリア呼吸系への影響は、既に河合らにより検討されており、低濃度で顕著な脱共役作用を示すことが確認されている<sup>(7)</sup>。しかし auroglaucin のミトコンドリアへの影響についてはいまだ詳細に報告されていない。そこで、本研究ではラット肝ミトコンドリアを用いて、auroglaucin のミトコンドリアの構造および機能への影響について flavoglaucin と比較検討した。

## 2. 実験材料および実験方法

### 1) 実験試薬

Flavoglaucin および auroglaucin は、*Enrotium herbariorum* から単離、精製した<sup>(3)</sup>。両色素は、実験には N,N-dimethylformamide (DMFA) 溶液として用いた。Tris-(Hydroxymethyl)aminomethane (Tris と略記)、ADP および牛血清アルブミン (BSA, fraction V) は、Sigma Chemical Co. よりそれぞれ購入した。その他の試薬は、全て市販品特級試薬を用いた。

### 2) 実験方法

#### 2)-1 ラット肝ミトコンドリア画分の調製

ミトコンドリア画分は、基本的には Schneider の方法<sup>(8)</sup>に従い、河合らにより一部改良された方法<sup>(9)</sup>に従って、ラット肝ホモジネートから調製した。調製用溶液として 0.5mM EDTA、10mM Tris-HCl を含む 0.25M sucrose (pH7.4) を用いた。操作は全て 4℃以下で行った。調製したミトコンドリア画分は、2～3ml の冷ショ糖溶液に懸濁し、氷冷下に保ち 2～3 時間以内に実験が終了するように使用した。

#### 2)-2 ラット肝ミトコンドリアの呼吸活性の測定

ミトコンドリアの呼吸活性は Galvani 型酸素電極 (飯島電子工業) を用いて測定した。呼吸活性測定用反応液は 0.15M KCl、5mM MgCl<sub>2</sub>、1mM EDTA、5mM 無機リン酸および 20mM Tris-HCl (pH7.4) を含み、使用30分前から 30℃恒温槽中で温度および溶存酸素量を平衡化した。ミトコンドリアは等張反応液に懸濁させ、呼吸基質 (グルタミン酸またはコハク酸) を添加し、その後 ADP を加えるとリン酸化反応が始まり、呼吸は加速される。この状態を state 3 呼吸と呼び、ADP が消費されて呼吸が抑制された状態を state 4 呼吸と呼ぶ。この state 3 呼吸と state 4 呼吸の比率を respiratory control (RC) 比として、また添加 ADP (nmol) と消費酸素量 (natom) の比率から ADP/O 比をそれぞれ求めた。RC 比および ADP/O 比の低下は脱共役作用を示す。State 3 呼吸の阻害比はコントロール値を 100 として計算した。State 3 呼吸の阻

害はミトコンドリア内膜のイオン透過阻害や電子伝達（呼吸鎖）阻害等複数因子により影響されるため、呼吸鎖酵素への直接の阻害を表しているものではない。

### 2)-3 ラット肝ミトコンドリアの膨潤化の測定

ミトコンドリアは膨潤化に伴って光散乱性が低下（吸光度の低下）することから、Tedeschi と Harris の方法<sup>(10)</sup>に従い、550nm の吸光度の減少を Beckman 自記分光光度計 DU-70 を用いて測定した。測定用反応液は 0.15M KCl、20mM Tris-HCl (pH7.4) を含み、室温で測定した。

### 2)-4 タンパク質の定量

タンパク質は標準物質として BSA を使用し、Lowry らの方法<sup>(11)</sup>により測定した。

## 3. 実験結果

### 1) Flavoglucuin および auroglucuin によるミトコンドリア膨潤化の誘起

Fig. 2 に flavoglucuin のミトコンドリア膨潤化誘起作用を分光学的に検討した結果を示した。KCl 等張液に懸濁したミトコンドリアに flavoglucuin を加えると、550nm の吸光度が急速に低下した。このことは、flavoglucuin がミトコンドリアの膨潤化を誘起したことが示唆された。Flavoglucuin によるミトコンドリアの膨潤は透過性遷移阻害剤である cyclosporin A により完全に阻害された (Fig.2)。膨潤化の速度およびスケールは、flavoglucuin の濃度の増加に依存して増大した (Fig.2)。次に Auroglucuin によるミトコンドリアの膨潤化誘起作用を測定した。Auroglucuin の添加によりミトコンドリアは膨潤化を引き起こしたが、膨潤化は継続すること

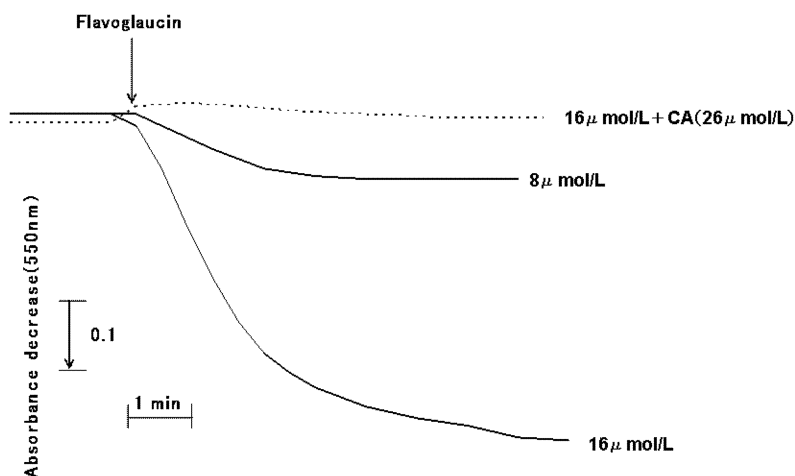


Fig. 2 Induction of mitochondrial swelling by flavoglucuin in isotonic KCl medium. The reaction medium was composed of 0.15 M KCl, 20 mM Tris-HCl, and 0.22 mg of mitochondrial protein in a final volume of 2.5 mL (pH7.4). The numbers at the end of each curve show the final concentrations of flavoglucuin. CA indicates cyclosporin A.

なく途中で停止した (Fig.3)。Auroglaucin による膨潤化反応の停止後に flavoglaucin を添加すると反応は再進行した (Fig.3)。結果には示さないが Auroglaucin の作用も cyclosporin A の添加により完全に阻害された。

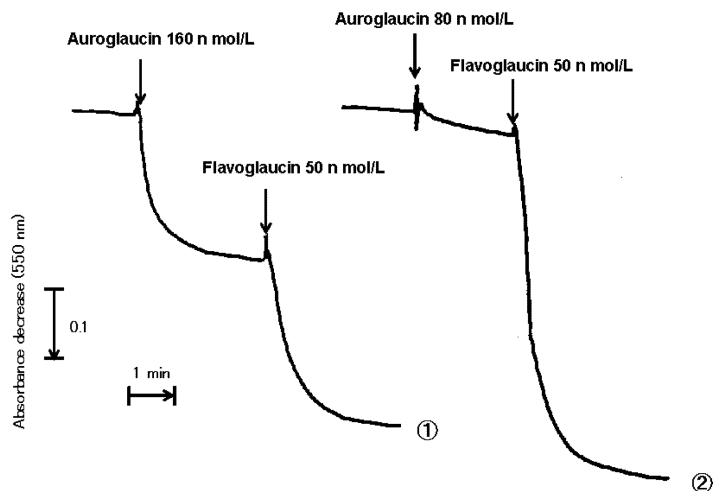


Fig. 3 Induction of mitochondrial swelling by auroglaucin in isotonic KCl medium. 0.18 mg of mitochondrial protein was contained in a final volume of 2.5 mL reaction medium (pH 7.4). Reaction conditions were the same as in Fig. 2.

## 2) Flavoglaucin のミトコンドリア呼吸系への影響

ミトコンドリアの NAD 系呼吸への flavoglaucin の影響について酸素電極を用いて検討した (Fig.4)。調製したミトコンドリアはオキシグラフのコントロール曲線で示したように呼吸鎖とリン酸化系が強く共役した呼吸活性を示し、明瞭な state 3 呼吸と state 4 呼吸が認められた。RC 比と ADP/O 比はそれぞれ 6.6 と 2.7 であった。Flavoglaucin を state 4 呼吸に添加すると、その後の state 3 呼吸がわずかに抑制される一方、state 4 呼吸が著しく加速された。このことから flavoglaucin がミトコンドリアの呼吸系に対して脱共役作用を有することが示唆された。Fig.5 に flavoglaucin の濃度依存性の RC、ADP/O 比および state 3 呼吸への影響を示した。Flavoglaucin を添加すると State 3 呼吸が抑制される一方 State 4 呼吸は加速され、RC 比が顕著に低下した。ADP/O 比も濃度依存的に低下したことから flavoglaucin が脱共役作用を有することが示された。

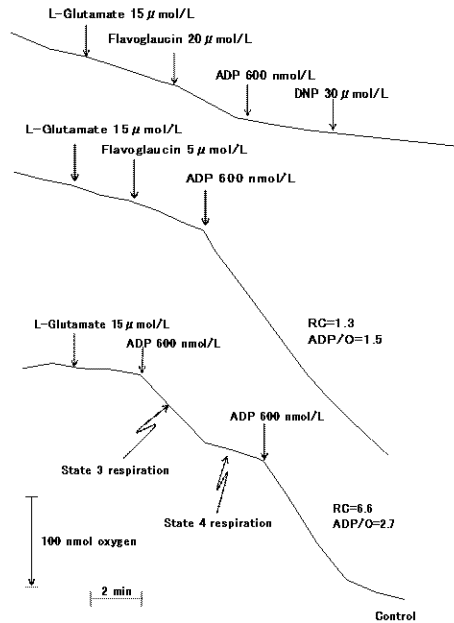


Fig. 4 Effect of flavoglaucin on mitochondrial NAD-linked respiration  
The reaction medium contained 0.15 M KCl, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM inorganic phosphate, 0.5 mM EDTA, 20mM Tris-HCl, and 0.8 mg of mitochondrial protein in a final volume of 2.0 mL (pH7.4). The reaction was carried out at 30°C.

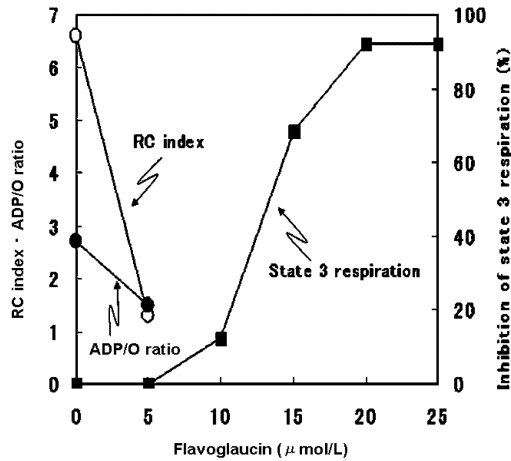


Fig. 5 Uncoupling effect of flavoglaucin on mitochondrial respiration  
Reaction conditions were same as in Fig. 4.

### 3) Auroglaucin のミトコンドリア呼吸系への影響

Fig.6 に auroglaucin のミトコンドリアの NAD 系呼吸への影響を検討した結果を示した。コントロールではミトコンドリアは明瞭な state 3 呼吸と state 4 呼吸を示し、RC 比と ADP/O 比はそれぞれ 12 と 2.9 であった (Fig.6)。State 4 呼吸に添加した auroglaucin は、その後の state

3呼吸を抑制し state 4呼吸を加速させることでRC比およびADP/O比を顕著に低下させ、その作用は濃度依存的であった (Fig.7)。これらの結果から auroglaucin は flavoglaucin と同様に脱共役作用を示すことが明らかとなった。

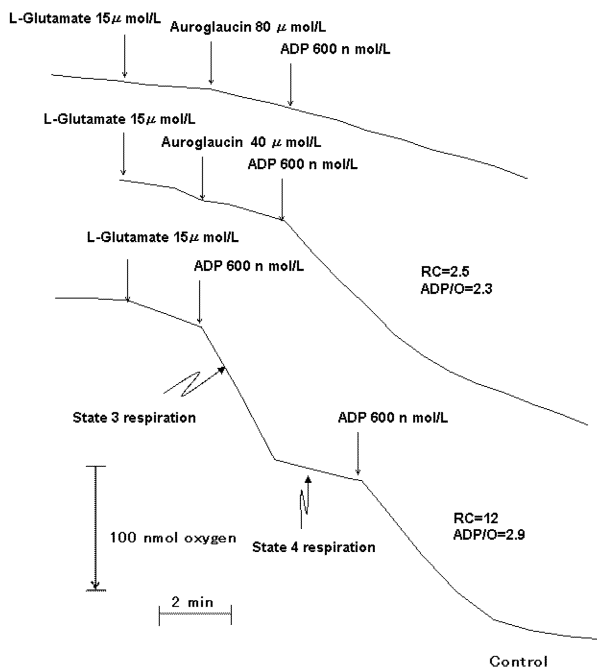


Fig. 6 Effect of auroglaucin on mitochondrial NAD-linked respiration  
0.45 mg of mitochondrial protein was contained in a final volume of 2.5 mL reaction medium. Other reaction conditions were the same as in Fig. 4.

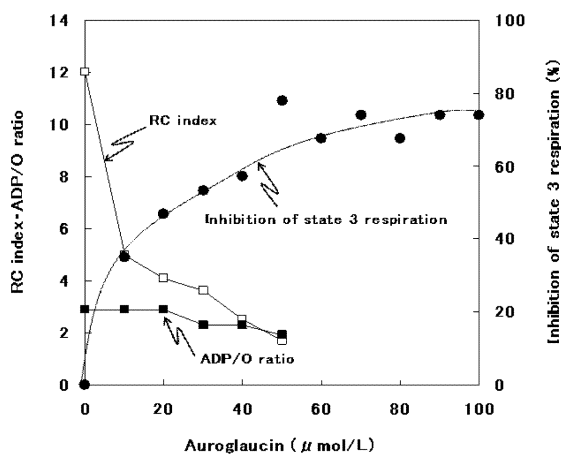


Fig. 7 Uncoupling effect of auroglaucin on mitochondrial respiration  
Reaction conditions were the same as in Fig. 6.

#### 4. 考察

Flavoglaucin と auroglaucin についてミトコンドリアの構造に及ぼす影響を検討したところ、等張 KCl 溶液に懸濁されたミトコンドリアは、低濃度の flavoglaucin で顕著な膨潤化を誘発した。Auroglaucin は flavoglaucin 同様、膨潤化を起こしたが、膨潤化の過程が flavoglaucin と異なることを示唆する結果が得られた。立体構造の差によるものなのか、脂溶性の相違に基づくものなのかについては不明であるが、二重結合がミトコンドリアの構造変化（膨潤化）には直接関与しないことが示唆された。

両物質のミトコンドリアの膨潤化に関する分子機序が異なることを示唆する結果が得られたことから、ミトコンドリア呼吸系への影響について酸素電極を用いて比較検討した。Flavoglaucin と auroglaucin は、NAD およびコハク酸酸化系呼吸の state 3 呼吸を抑制する一方 state 4 呼吸を加速させる（脱共役作用）ことでミトコンドリア呼吸系を損傷することが判明した。脱共役作用を示す化学物質のほとんどが脂溶性の弱酸に属し、ミトコンドリア内膜を介する  $H^+$  濃度勾配【 $\Delta pH$ 】を消去する性質を有することが明らかにされているが<sup>(12)</sup>、両色素による脱共役作用の分子機序は、その化学構造から生理的 pH 環境で  $H^+$  の解離を伴うことは考えられない。そのため両色素がミトコンドリア内膜の構造変化を起こし、 $H^+$  のリークを発生させたことによると思われるが、その機序の解明には更なる実験が必要である。Auroglaucin は flavoglaucin と比較して state 3 呼吸抑制作用が強く、抑制された呼吸はミトコンドリア呼吸鎖の阻害剤 antimycin A および rotenone の阻害部位を越えた電子伝達バイパスを形成する N,N,N,N-tetramethyl-p-phenylenediamine (TMPD) により開放されたことから、脱共役作用に加えて電子伝達阻害作用も示すことが示唆された。詳細な阻害機序に関しては今後さらに検討する必要がある。

現在までに、酸化的リン酸化の脱共役作用を示し、ミトコンドリアの膨潤化を誘発するカビ毒や薬物が多数見出されているが<sup>(13)</sup>、脱共役作用と膨潤化誘起作用とは必ずしも平行しないことから、flavoglaucin と auroglaucin の脱共役作用と膨潤化誘起作用の関連性については今後更に詳細に検討する必要がある。本研究により flavoglaucin および auroglaucin がミトコンドリアの構造と機能に対して傷害作用を示すことが明らかとなったが、単離肝ミトコンドリアを用いた in vitro 実験であり、またかなり高濃度下での実験であることから、本結果は直接両色素の in vivo 肝毒性を示唆するものではないと考えられる。



## 参考文献

- (1) 吉松藤子、下村道子、生田目久美. 1986 だし汁に関する研究 (カビ付けの影響). 調理科学, Vol.19 No.4, 285-288.
- (2) Nazar M, Ali M, Fatima T, Gubler C. J. 1984 Toxicity of flavoglaucin from *Aspergillus chevalieri* in rabbits. Toxicol. Lett., 23 (2), 233-237.
- (3) Li Y, Li X, Lee U, Kang J.S, Choi H.D, Sona B.W. 2006 A new radical scavenging anthracene glycoside, asperflavin ribofuranoside, and polyketides from marine isolate of the fungus microsporium. Chem. Pharm. Bull.(Tokyo), 54 (6), 882-883.
- (4) Miyake Y, Ito C, Itoigawa M, Osawa T. 2009 Antioxidants produced by *Eurotium herbariorum* of filamentous fungi used for the manufacture of karebushi,dried bonito (Katsuobushi). Biosci. Biotechnol. Biochem., 73 (6), 1323-1327.
- (5) Yoshimi N, Wang A, Morishita Y, Tanaka T, Sugie S, Kawai K, Yamahara J, Mori H. 1992 Modifying effects on fungal and herb metabolites on azoxymethane-induced intestinal carcinogenesis in rats. Jpn. J. Cancer. Res., 83 (12), 1273-1278.
- (6) Kumarswamy R, Chandna S. 2009 Putative partners in Bax mediated cytochrome-c release: ANT, CypD, VDAC or none of them?. Mitochondrion, 9 (1), 1-8.
- (7) Kawai K, Mori H, Kitamura J. 1983 The uncoupling effect of flavoglaucin, a quinol pigment from *Aspergillus chevalieri* (Mangin), on mitochondrial respiration. Toxicol. Lett., 19 (3), 321-325.
- (8) Schneider W.C. 1948 Intracellular distribution of enzymes; the oxidation of octanoic acid by rat liver fractions. J. Biol. Chem., 176, 259-266.
- (9) 河合清. 1989 ミトコンドリア. 毒性試験講座6, 毒性生化学, 96-101.
- (10) Tedeshi H, Harris D. 1955 The osmotic behavior and permeability to non-electrolytes of mitochondria. Arch Biochem. Biophys., 58, 52-67.
- (11) Lowry O.H, Rosebrough N.J, Farr A.L, Randall R.J. 1951 Protein measurement with folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193, 265-275.
- (12) Heytler P.G. 1980 Uncouplers of oxidative phosphorylation. Pharmacol. Ther., 10 (3), 461-472.
- (13) Nakamaru T, Shiojiri H, Kawai K, Nozawa Y, Maebayashi Y, Yamazaki M.1984 The effects of toxic metabolites, violaceol-I and -II, from *Emericella violacea* on mitochondrial respiration. Proc.Jpn.Assoc.Mycotoxicol.,19, 30-33.