

脂質過酸化反応によるミトコンドリア機能の変化とビスコクラウリン型アルカロイドによる阻害作用

岡山大学医学部附属病院中央放射線部（部長：山本道夫教授）

青 野 要

岡山大学医学部放射線医学教室（主任：山本道夫教授）

森本節夫・橋本啓二・佐藤 功
上者郁夫・木本 真・江添 弘
竹田芳弘・三宅正淑・林 英博
若林寿生・玉井豊理・森野靖雄

高知医科大学生物学教室（主任：内海耕健教授）

白 石 則 之

（昭和55年9月29日受稿）

Key words: Lipid Peroxidation
Cepharanthine (Biscoclaurine Alkaloid)
Mitochondrial Function

緒 言 目 的

放射線の生物作用の中で、その生化学的效果として脂質過酸化反応の促進¹⁾と酸化的リン酸化の低下²⁾は一般によく知られている事実である。この両者は一見別の生物作用の如く考えられるけれども、生体内での脂質過酸化反応は生体膜系では特に著しく、膜のもつ色々な生物活性がそれを構成する磷脂質中の高度不飽和脂肪酸の酸化反応によって生ずる脂質過酸化反応で阻害される可能性が大きいことから、両者は極めて深い関係にあるものと思われる。此の様に考えれば、放射線による酸化的リン酸化能の低下はミトコンドリア膜の脂質過酸化反応と密接に関係しているためによるという可能性が大きい。

以上の緒言において述べた見解に基づいてラット肝ミトコンドリアの2価鉄 (Fe^{++}) による脂質過酸化反応に伴うミトコンドリアのエネルギー転換反応阻害機構を研究し、生体膜における K^+ 区画性に対する安定化作用^{3,4)} や又放射線による白血球減少症に対して治療作用のある⁵⁾ ビスコクラウリン型アルカロイドの一種である cepharanthine が Fe^{++} によるミトコンドリア脂質過酸化反応の阻害を減少し、同時に脂質過酸化反応に対しても強い阻害作用を示すことを明らかにした。またこの様な阻害作用は放射線による生体膜の脂質過酸化反応にも見られ、これら反応機構を解析し得られた結果について報

告する。

材料と方法

ラット肝ミトコンドリアは Hogeboom-Schneider の変法⁶⁾ により蔗糖密度勾配による遠心分離にて分画した。ミトコンドリアはまた必要に応じて 0.15M KCl-10mM Tris·HCl (pH7.4) にて 2 回洗浄し実験に供した。リポゾームは大豆レシチンを硅酸カラムクロマト法にて分画し、多重膜リポゾームを 0.15M KCl-10mM Tris·HCl (pH7.4) にて調製したがその方法は図 1 に示した。

脂質過酸化反応は Fe^{++} 及び ^{60}Co 照射により誘導した。 ^{60}Co 照射は放射研装置 ($^{60}Co2000$ キューリー) により調製されたリポゾームを室温にて 9.6Krad 照射し 0℃ 3 時間以内に実験に供した。尚 cepharanthine の作用は照射後のリポゾームに cepharanthine を添加して測定した。

ミトコンドリアの機能は主として閉塞型キュベットを用いクラーク型酸素電極により測定した。またミトコンドリアの ATP ase 活性は遊離する無機リン酸を高橋氏法⁷⁾ にて測定した。脂質過酸化反応で形成されるマロンディアルデヒドは Hunter 等の TBA 反応⁸⁾ により測定した。蛋白質は BSA を標準とし、ビュレット法⁹⁾ にて測定、また使用した試薬はすべて特級であり、ビスコクラウリン型アルカロイドは化

-Cepharanthine	+Cepharanthine
24mg SBL in $CHCl_3$;	24mg SBL in $CHCl_3$;
thin film	same as left
with rotary	
evaporator	
	+0.3ml of
+0.3ml of	0.3M glucose
0.3M glucose	50 μ g/ml
(in 0.15M NaCl)	Cepharanthine
	(in 0.15M NaCl)
vortex	same as left
dialysis against	same as left
0.15M NaCl	same as left
over night	same as left
^{60}Co γ -irradiation	same as left
incubation at 37°C	same as left
0, 2, 4 hr での	
glucose, MDA 測定	

図 1 ^{60}Co 照射のための多重膜リポゾームの調製法

研生薬 K·K の恵与によるものでアルコールに溶解して使用した。

実験結果

1. Fe^{++} によるミトコンドリア脂質過酸化反応と酸化的リン酸化能の低下

すでに Hunter⁸⁾ や内海等¹⁰⁾ が示す様に Fe^{++} によってミトコンドリアは脂質過酸化反応を起こし、その膨潤を誘起する。此の膨潤の機構については尚明らかにされていないが、このようなミトコンドリアではその酸化的リン酸化能や呼吸調節機構の低下が予期される。図 2 は Fe^{++} と incubate する前後のラット肝ミトコンドリアのエネルギー転換反応活性の変化を示す。(図 2 挿入) 即ち Fe^{++} 添加後に示される急激な酸素消費は膜脂質過酸化反応によるもので、過酸化反応を起こさないミトコンドリアで示される高い呼吸調節能 (RCI) や ADP/O¹¹⁾ 比は過酸化反応と共に state 4 呼吸の増大によって RCI (呼吸調節率) の低下と ADP/O 比の低下をもたらす。(表 1)

2. ミトコンドリア脂質過酸化反応に伴う ATP ase 活性の変動

Fe^{++} 誘導の脂質過酸化反応に伴い、ミトコンドリアの酸化的リン酸化能や呼吸調節能が低下することから、膜脂質過酸化反応により、エネルギー転換反応の主役を演ずる膜酵素の一種 Mg^{++} -ATP ase 活性に変動がもたらされる可能性が示唆される。此の様な理由により、 Fe^{++} によって誘導される脂質過酸化反応に伴って、どの様にミトコンドリアの ATP ase 活性が変化するかについて測定を行った。

測定結果は図 3 に示す如く脂質過酸化反応によるマロンディアルデヒド (MDA) 形成に伴い Mg^{++} -ATP ase 活性の著しい亢進が認められる。此れに反して DNP-ATP ase 活性は MDA 形成には全く関係しない。(図 4) 即ち、潜在 ATP ase (latent ATP ase) が活性化され、合成されるべき ATP 合成反応が分解反応が分解反応に傾くことを示しているものと言える。勿論、このとき MDA 形成が一定量以上になるまでは此の活性化は認められず、此の活性化には MDA 形成に伴う膜構造変化が重要であ

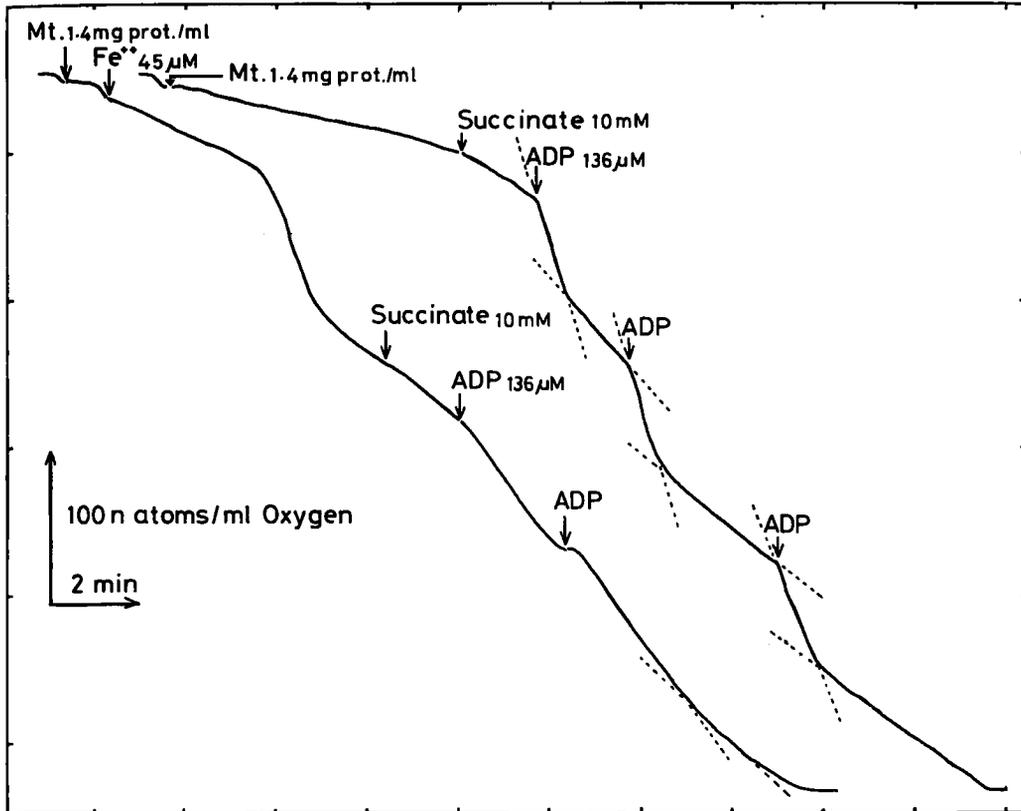


図2. Fe²⁺によるラット肝ミトコンドリアの酸化的リン酸化能及び呼吸調節能の低下

表1. 種々濃度の Fe²⁺添加によるラット肝ミトコンドリアの酸化的リン酸化能と呼吸調節能の変化
実験条件は図2と同じ

	State 3 respiration rate (n atoms/min/mg prot.)	RCI	ADP/O
Control	86.07	4.30	2.00
+Fe ²⁺ (7.4 μM)	59.84	3.85	1.92
.. (37.0 μM)	50.80	2.93	1.89
.. (74.0 μM)	41.92	2.38	1.76

ことを示唆している。

3. Fe²⁺によるミトコンドリア K⁺ の遊出と cepharanthine による阻害

Fe²⁺添加に伴うミトコンドリア膜脂質過酸化反応に伴いミトコンドリア膜の K⁺ 区画性が低下し、ミトコンドリア内に存在する K⁺ が遊出する可能性がある。既によく知られている如くミトコンドリアの ATP 合成能には内膜のイオン区画性を必要とし、Mitchell の化学浸透圧説¹²⁾ に立脚すれば H⁺ や陽イオンの透過性亢進は A-

TP 合成能の低下をきたす原因となり得る。また、ATP 合成能には H⁺ の透過と共役した K⁺ の区画性も重要であることも明らかにされている¹³⁾。事実図5に示す如くミトコンドリアは K⁺ Fe²⁺による MDA 形成に伴って K⁺ の遊出が亢進される。ここで Fe²⁺の添加されていないミトコンドリアでも K⁺ の遊出が認められているが、これは K⁺ 電極で反応後の K⁺ を測定するため、ミトコンドリアをコリン溶液中に浮遊させていることによるものである。此の様な Fe²⁺によるミトコンドリアの MDA 形成に伴う K⁺ の遊出は膜安定化作用のある cepharanthine^{3,4)} (ビスコクラウリン型アルカロイドの一種) 存在下に著明な抑制が認められる。此の研究と関連して著者等は既にミトコンドリアをフォスホリパーゼ A₂ 処理して K⁺ を遊出させる場合 cepharanthine が強く阻害することを認めている¹⁴⁾が本研究の結果もそれと極めてよく一致す

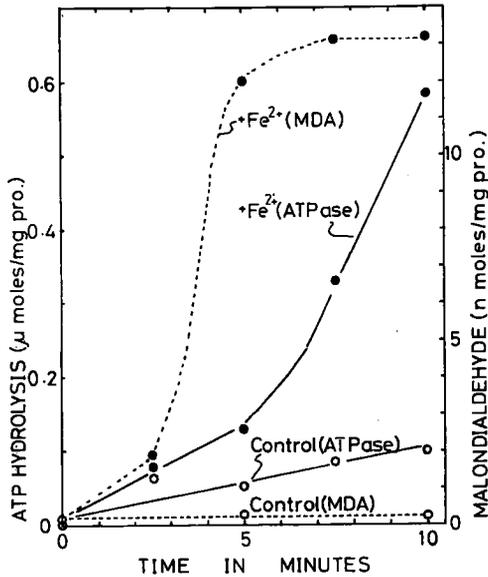


図3. Fe⁺⁺によるラット肝ミトコンドリアのMg⁺⁺-ATPase 活性の変動
0.15M KCl-10mM Tris-HCl (pH7.4) の溶液で2回洗滌したラット肝ミトコンドリアを0.15M KCl-10mM Tris-HCl (pH7.4) 5mM MgCl₂ 溶液中に25℃にて incubate し 70μM Fe⁺⁺を添加した時の MDA量と Mg-ATPase 活性の変動を示す。

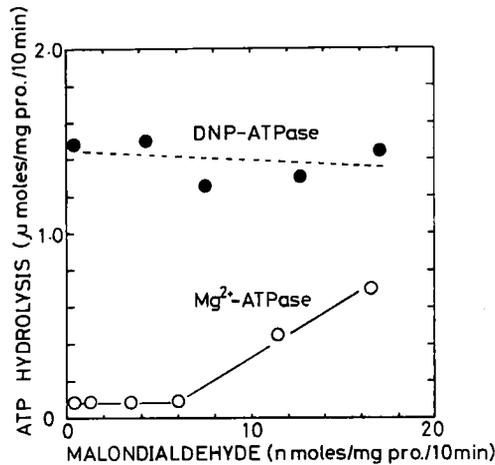


図4. ラット肝ミトコンドリア中に形成されるM-DA量と Mg-ATPase 活性の関係
実験条件は図3に同じ
DNP-ATPase は反応液中に 5 × 10⁻⁵M DNPを添加して示される。
潜在 ATPase 活性を示す。

するものである。

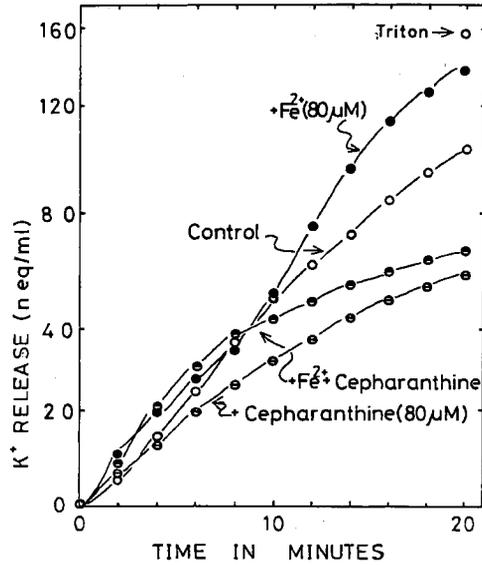


図5. Fe⁺⁺によるラット肝ミトコンドリア内 K⁺ の遊出促進と cepharanthineによる阻害
調製されたラット肝ミトコンドリアを0.15M Choline-10mM Tris (pH2.4) にて2回洗滌し、同じ溶液中、25℃にて incubate した場合の溶液中の K⁺ 濃度の変化を示す。
この溶液中ではミトコンドリア内 K⁺ は遊出し易いが、80μM の Fe⁺⁺で脂質過酸化反応を行うとより遊出度合が促進される。これに対して cepharanthine は阻害作用を示す。

4. Fe⁺⁺による酸化的リン酸化活性の低下に対する cepharanthineの阻止作用

Cepharanthine が Fe⁺⁺誘導によるミトコンドリアの K⁺ 区画性変化を阻止する事は、此のアルカロイドが Fe⁺⁺によるミトコンドリアのエネルギー転換反応阻害に対しても阻止的に作用する可能性を示唆する。この様な考えに立脚して、Fe⁺⁺によるミトコンドリアの ATP 合成や呼吸調節能に対するこのアルカロイドの作用について検討した。実験結果は、表2に示す如く AD P/O比や RCI の低下に対して cepharanthine は阻止的に作用し、又 Fe⁺⁺による Mg⁺⁺-ATPase 活性の亢進に対しても阻害的に作用する。勿論 DNP-ATPase に対しては Fe⁺⁺は影響を示さずまた cepharanthine も作用しない。

5. Fe⁺⁺によるミトコンドリア膜の脂質過酸化反応に対する cepharanthine の阻害作用

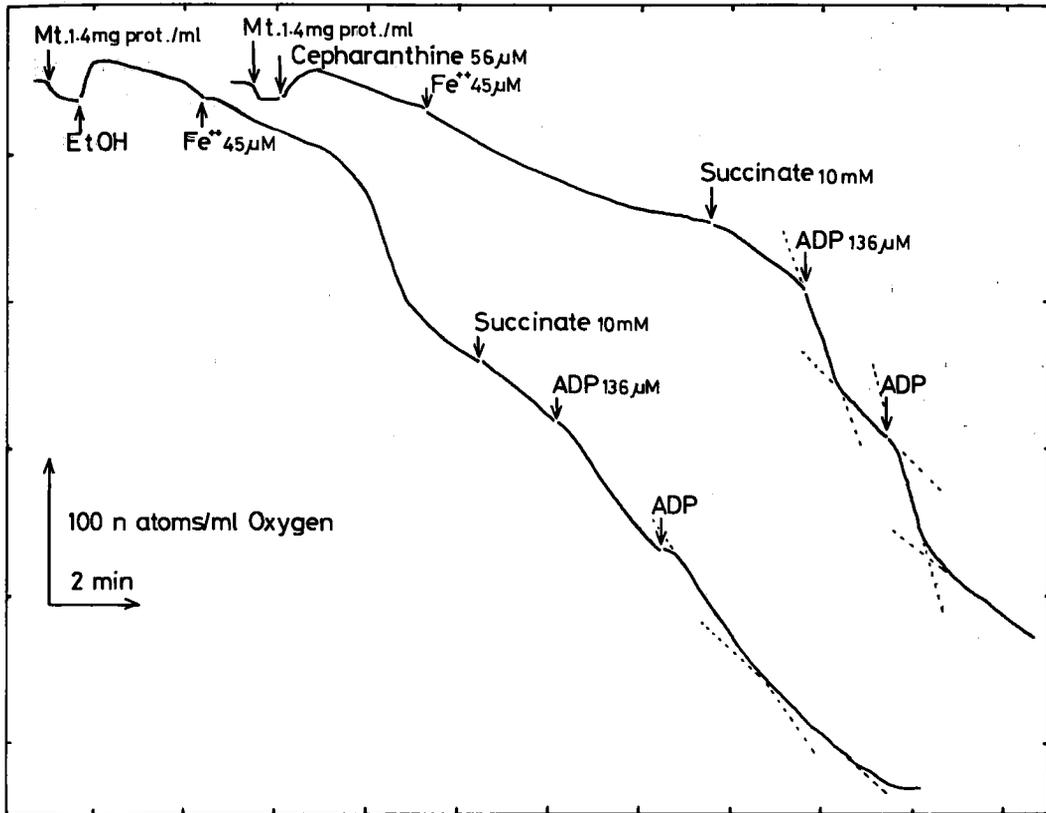


図6. Fe²⁺によるラット肝ミトコンドリアの酸化的リン酸化能の低下に対する cepharanthine の阻止作用
 実験条件は図2に同じ
 cepharanthine はアルコール溶液とし、反応液の1/2,000 以下の量を添加した。

表2. Fe²⁺によるラット肝ミトコンドリアの酸化的リン酸化能や呼吸調節能の低下に対する cepharanthine による阻止作用
 実験条件は図7に同じ

	State 3 respiration rate (n atoms/min/mg pro.)	RCI	ADP/O
Control	64.38	3.09	1.85
+Fe ²⁺ (77μM)	37.49	1.69	0.91
+Fe ²⁺ +Cepharanthine(100μM)	60.74	2.73	1.67

以上の様に cepharanthine は Fe²⁺によるミトコンドリア膜の脂質過酸化反応に伴うエネルギー代謝の低下に対して阻止的に作用するが、これが異なる膜安定化作用によるものか否かを検討した。図6に示す如く、Fe²⁺添加に伴うミトコンドリア膜の脂質過酸化反応は、酸素消費

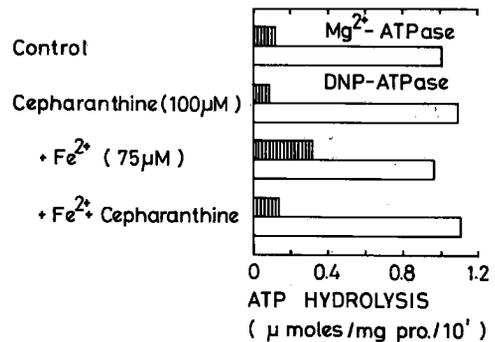


図7. ラット肝ミトコンドリアの ATP ase 活性の Fe²⁺による促進に対する cepharanthine の阻止作用
 実験条件は図3に同じ。

と平行するが、この実験において示される如く、

cepharanthine 存在下には Fe^{++} 添加による酸素消費も著しく阻害される。この事は脂質過酸化反応そのものに対しても cepharanthine が阻害的に作用する可能性を示唆するものである。この様な理由により Fe^{++} によるミトコンドリア膜で形成される MDA に対する cepharanthine の作用を検索した。結果は図 8 に示す如く cepharanthine は Fe^{++} による脂質過酸化反応に対して強い阻害作用を示した。これらの結果は、 Fe^{++} によるミトコンドリアのエネルギー代謝活性の低下は cepharanthine の添加により軽減するが、それは cepharanthine の膜安定化作用と同時に脂質過酸化反応阻害作用による事を示唆する。

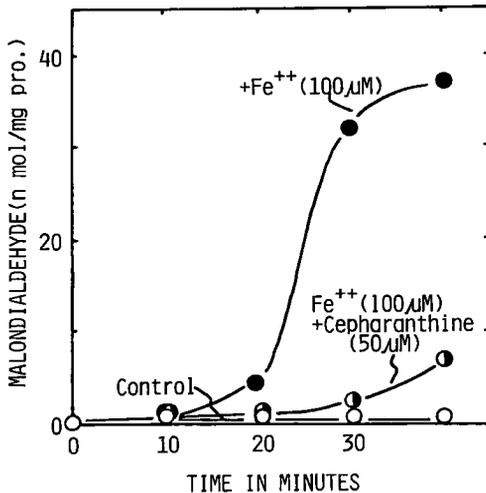


図 8. ラット肝ミトコンドリアの Fe^{++} による脂質過酸化反応と cepharanthine による阻害。調整されたラット肝ミトコンドリアを $0.15M$ $KCl-10mM$ $Tris$ ($pH-7.4$) にて 2 回洗滌し、 $100\mu M$ Fe^{++} と共に $25^{\circ}C$ にて incubate した時に生ずる MDA を TBA 反応にて測定した。cepharanthine は反応を初める前から添加した。

6. ^{60}Co 照射リポゾームの脂質過酸化反応に対する cepharanthine の作用

予備的実験の結果によって、cepharanthine は Fe^{++} のみならず superoxide に依存した脂質過酸化反応に対しても阻害的に作用することを明らかにしている。しかし、本研究の本来の目的である放射線による生体膜脂質過酸化反応に対してどのような作用を示すかを、 ^{60}Co 照射によるレシチンリポゾームの脂質過酸化反応に対す

る影響によって検討を加えた。その結果は図 9 に示す如く、レシチンリポゾームの ^{60}Co 照射による MDA 形成の増大が cepharanthine の添加に伴って低下させられる事が明らかになった。此の際、リポゾーム膜にあらかじめ cepharanthine を組み込まれたものでも、又、リポゾームに後から cepharanthine を添加しても同様の結果が示された。

考 察

近年、脂質過酸化反応は生体老化と関係して注目されるようになり¹²⁾、特に放射線による加齢の促進は DNA の傷害と並んで重要な作用と考えなければならなくなっている。この様な現状において遺伝子に関係した分子生物学の進歩におかれて、放射線による脂質過酸化反応はそれ研究が進んでいないというのが現段階の研究状況であろう。しかし乍ら、かなり古くから放射線照射により生体内 ATP 含有量が低下し、それがミトコンドリアの酸化的リン酸化能の低下によることが明らかにされている²⁾。此の原因は放射線照射赤血球の溶血度合の亢進や、 K^{+} 遊出の亢進等を考え合わせると⁵⁾、反応により膜の物質区画性が低下する事に基づくものと解釈すれば、かなり説明することが容易となる。事実 K^{+} を含むリン脂質リポゾームに Fe^{++} を添加し、脂質過酸化反応を誘導すると、リポゾーム内 K^{+} の遊出が起こる。此れと同じことは分離ミトコンドリアでも観察され、脂質過酸化反応に伴い、ミトコンドリアのイオン区画性が低下し、酸化的リン酸化能が低下することがうかがえる。本研究で用いたビスコクラウリン型アルカロイドはこれら膜イオン区画性低下を阻止する様に作用することが明らかにされているが此の Fe^{++} による脂質過酸化反応に伴う K^{+} 遊出に対しても阻害的に作用する。しかも全く予期されなかった脂質過酸化反応までも阻止されることが明らかになった。此等の阻害度合は cepharanthine の濃度に依存して強く示されるけれども、種々のビスコクラウリン型アルカロイドの中で head to head 型の diether 結合をもつものに共通して此の様な脂質過酸化反応阻止作用が認められる。

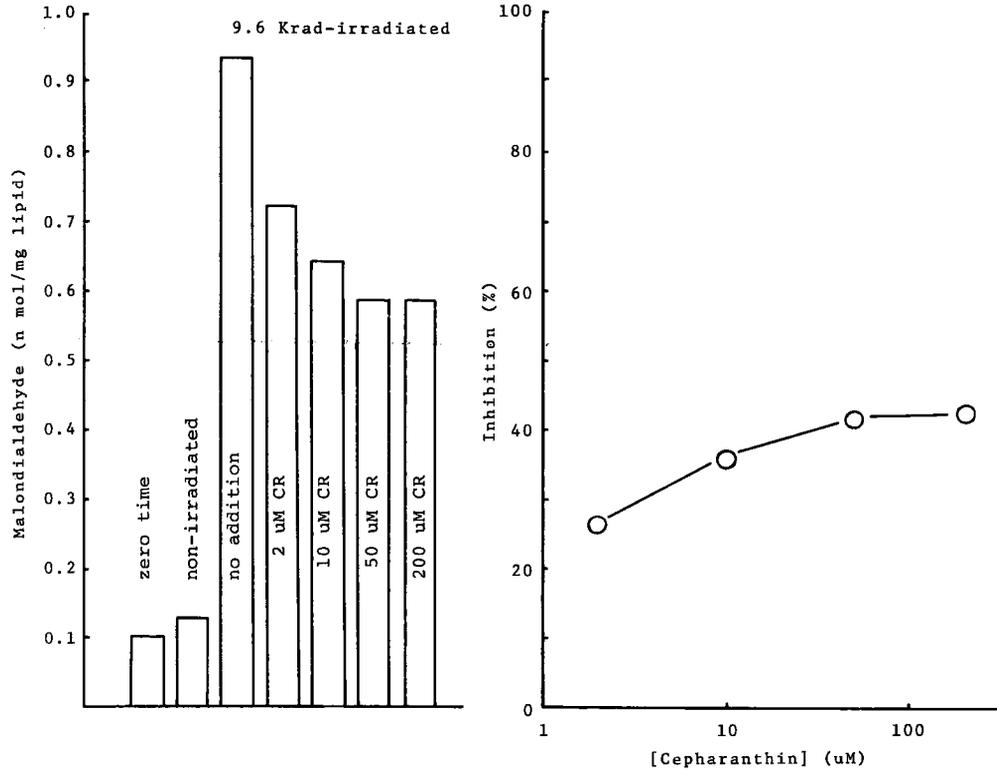


図9. 大豆レシチン多重膜リポソーム ^{60}Co 照射による脂質過酸化反応と cepharanthine による阻害
 実験方法にのべた調整法にて作ったりポソームを 37°C にて ^{60}Co 照射を行い、 0°C 、3時間後に MDA を TBA 反応にて測定した。cepharanthine はリポソームの調整時に添加しても調整後添加しても同じ様な阻害度を示す。

表3. ラット肝ミトコンドリアの Fe^{++} による脂質過酸化反応に対する種々ビスコクラウリン型アルカロイドの阻害作用
 実験条件は図8と同じ
 Head to Head 型の diether 結合をもつビスコクラウリン型アルカロイドに共通して脂質過酸化反応阻害作用が認められる。

Type of Alkaloid		% of Inhibition
Biscoclaurine	Head to Head Dauricine	79
	" Cepharanthine	97
	" Homoaromoline	95
	" Berbamine	92
	" Tetrandrine	88
	" Fangchinoline	98
	" Isotrilobine	95
Coclaurine	Head to Tail Cycleanine	90
	" Norcycleanine	48
	N-methyl coclaurine	86
	Papaverine	20

此のアルカロイドにはラジカルスカベンジャーとしての作用はなく、これが生体膜を脂質過酸化反応の受けにくい構造に修飾していることを示唆している。しかも予備の実験から Fe^{++} のみならず superoxide や他の誘導物質による過酸化反応に加えて、 ^{60}Co の放射線による過酸化反応にも阻害作用が認められる。此のことは癌の治療において我々が度々遭遇するところの放射線照射による白血球減少症が、此のアルカロイドによってかなり軽減される事とも深い関係があることを示唆しているものといえる。今後更に此のアルカロイドの放射線照射によって起こる生体エネルギー転換反応の低下に対する作用を検討したい。

結 論

分離ミトコンドリアの脂質過酸化反応に伴うミトコンドリア機能の変化を追求し、その機能変化を阻止する薬物としてビスコクラウリン型アルカロイドが作用することを明らかにした。即ち、

1. Fe^{++} はミトコンドリア膜の脂質過酸化反応を誘起しそれに伴って酸化的リン酸化能を低下する。
2. Fe^{++} による酸化的リン酸化能の低下は、膜のイオン区画性の低下に加えて、潜在ATP ase活性の亢進によるものである。
3. Fe^{++} によるミトコンドリアのイオン区画性の低下は cepharanthineの様なビスコクラウリン型アルカロイドで強く阻止される。
4. cepharanthine のこの様な作用は Fe^{++} に

よるミトコンドリアの酸化的リン酸化能低下に対しても阻制的に作用する。

5. この様な Fe^{++} によるミトコンドリア機能の低下に対する cepharanthineの阻制的作用は膜安定化作用に加えて脂質過酸化反応の阻害作用にも依存している。
6. ^{60}Co 照射による大豆レシチンリポゾームの脂質過酸化反応に対しても cepharanthine は阻制的に作用する。
7. cepharanthine の此の様な作用はビスコクラウリン (Bisococlaurine) 型アルカロイドの head to head 型の diether結合をもつものに共通して認められる。

此の研究に際し御指導、御協力を頂きました高知医科大学生物学教室の内海教授及び放医研生物部の中沢博士に厚く御礼申し上げます。

文 献

1. Wills, E.D.: Effects of irradiation on subcellular components. 1. Lipid peroxide formation in the endoplasmic reticulum. *J. Rad. Res.* 17, 217-228, 1970.
2. Van Bekkum, D.W.: The effect of X-ray on the phosphorylation in vivo. *Biochim. Biophys. Acta* 25, 487-492, 1957.
3. Utsumi, K., Miyahara, M., Inoue, M., Mori, M., Sugiyama, K., and Sasaki, J.: Inhibition by cepharanthine on red blood cell potassium release induced by lead acetate and lysolecithin. *Cell Struct. Funct.* 1, 133-136, 1975.
4. Utsumi, K., Miyahara, M., Sugiyama, K. and Sasaki, J.: Effect of bisococlaurine alkaloid on the cell membrane related to membrane fluidity. *Acta Histochem. Cytochem.* 9, 59-68, 1976.
5. 飯田荘介: 放射線照射による人赤血球の溶血とセファランチンの阻害効果. 岡山医学会雑誌 91, 1129-1137, 1979.
6. Utsumi, K.: Relation between mitochondrial swelling induced by inorganic phosphate and accumulation of P^{32} in mitochondrial Pi fraction. *Acta Med. Okayama* 17, 259-271, 1963.
7. 高橋泰常: 組織中無機磷真値と creatine 磷酸の定量法, 及び豚精子の phosphoamidase, creatine phosphokinase 作用について. 生化学 26, 690-698, 1955.
8. Hunter, F.H. Jr., Gebicki, J.M., Hoffsten, P.E., Weinstein, J. and Scott, A.: Swelling and lysis of rat mitochondria by ferrous ions. *J. Biol. Chem.* 238, 828-835, 1963.
9. Layne, E.: Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins. *Methods Enzymol.* 3, 447-454, 1957.
10. Utsumi, K., Yamamoto, G. and Inaba, K.: Failure of Fe^{2+} induced lipid peroxidation and swelling in the mitochondria isolated from ascites tumor cells. *Biochim. Biophys. Acta* 105, 368-371, 1965.

11. Chance, B. and Williams, C.R.: The respiratory chain and oxidative phosphorylation. *Adv. Enzymol.* **17**, 65—134, 1956.
12. Mitchell, P.: *Chemiosmotic Coupling in Oxidative and Photosynthetic Phosphorylation* Glynn Resarch Ltd., Bodmin, England, pp. 144—147, 1966.
13. Miyahara, M. and Utsumi, K.: Oxidative phosphorylation controlled by potassium in rat liver mitochondria. *Cell Struct. Funct.* **1**, 51—59, 1975.
14. Miyahara, M., Aono, K., Queseda, J.S., Shimono, K., Baba, Y. and Yamashita, S.: Protection by cepharanthine of the mitochondrial function from damage induced by snake venome, phospholipase A₂, lysolecithin and lead. *Cell Struct. Funct.* **3**, 61—65, 1978.
15. 山中直樹, 吉岡 保, 内海耕健: 老化と過酸化反応. *医学のあゆみ* **87**, 573—580, 1976.

**Alteration of mitochondrial functions by lipid peroxidation
and inhibition by biscoclaurine alkaloid**

**Kaname AONO, Setsuo MORIMOTO*, Keiji HASHIMOTO*,
Katashi SATO*, Ikuo JOJA*, Shin KIMOTO*, Hiroshi EZOE*,
Yoshihiro TAKEDA*, Masayoshi MIYAKE*, Hidehiro HAYASHI*,
Hisao WAKABAYASHI*, Toyosato TAMAI*, Yasuo MORINO*
and Noriyuki SHIRAISHI****

Department of Central Clinical Radiology (Chief Director : Prof. M. Yamamoto)

and

*Department of Radiation Medicine (Director : Prof. M. Yamamoto);

Okayama University Medical School, Okayama 700, Japan,

**Department of Medical Biology (Director : Prof. K. Utsumi);

Kochi University Medical School, Nangoku-shi 783, Japan

During investigation of the changes in mitochondrial function accompanying lipid peroxidation, it was found that a biscoclaurine alkaloid protected their functional changes. The results obtained were as follows:

1) Fe^{2+} induces lipid peroxidation of isolated mitochondria, resulting in deterioration of oxidative phosphorylation. 2) This deterioration relates to alteration in ion compartmentation of the mitochondrial membrane and an increase in latent ATPase activity. 3) This deterioration by Fe^{2+} in ion compartmentation of mitochondrial membrane is strongly protected by a biscoclaurine alkaloid, cepharanthine. 4) Cepharanthine also inhibits the mitochondrial lipid peroxidation induced by Fe^{2+} . 5) The protective effect of cepharanthine against deterioration in mitochondrial functions caused by Fe^{2+} depends on its inhibitive action on lipid peroxidation as well as on its membrane stabilizing action. 6) Cepharanthine inhibits the lipid peroxidation of soybean lecithine liposomes by ^{60}Co -irradiation. 7) The action of cepharanthine described above is common to head to head type of biscoclaurin alkaloids which have diether bonds.