

# 岡山医学会雑誌

第89巻7, 8合併号 (第992, 993号)

昭和52年8月30日発行

## 生体膜系に対するビスコクラウリン型 アルカロイドの作用とその作用機序に関する研究

### 第 1 報

細胞膜傷害による $K^+$ 遊出に対するセファランチンの阻止作用

岡山大学医学部第一病理学教室 (主任教授 妹尾広知丸)

宮 原 正 信

岡山大学医学部附属癌源研究施設生化学研究部門 (主任教授 小田琢三)

内 海 耕 造

岡山大学医学部薬理学教室 (主任教授 佐伯清美)

杉 山 勝 三

岡山大学医学部附属病院中央放射線部 (部長 山本道夫)

青 野 要

(昭和51年11月24日受稿)

溶液反応を中心とした生化学がSolid状態の場に成立する生物学特に生体膜系に直面して新たな研究課題と方法論が開発され、近年その研究の進展には著しいものがある。中でも細胞膜のもつ生物学的意味についてはこれらの生化学的研究とあいまって細胞生物学の進歩により次々と新たな生理機能が明らかにされてきた。そして癌研究における細胞膜の癌性形質転換に伴う変化は特に注目される所となっている。現在細胞膜の生理的機能については極めて多くの性質が知られ、それらの主なものだけでも次の様に極めて多岐に渡る生命活動にとって重要な働き

を営んでいる。1. 細胞内外物質の区画, 2. 物質輸送, 3. 細胞特異性の基定, 4. 細胞相互の認識, 5. 細胞膜結合酵素とその活性変動, 6. 細胞外部情報の細胞内への伝達, 等々が挙げられる。しかしこの様な多くの性質についての知見にもかかわらず尚生体膜の分子生物学的機構については不明な点が多い。我々は細胞表面或いは細胞膜の化学的或いは物理的修飾によって細胞膜の性質を解析し生体膜系の安定性が極めて種々な生理的意味をもつ事を示唆するデータを得ている。中でもビスコクラウリン型アルカロイドはその広い薬理作用がかなり細胞膜安定性に関係

する事が明らかにされた。

本稿ではこのアルカロイドの中、特にセファランチン (cepharanthine) 「セ」がもつ毒物中和作用、白血球減少症、抗アレルギー作用等の性質に注目し生体膜の種々の生物活性に対する膜修飾作用とそれのもたらす生物活性から生体膜機能の解析を試みると共に「セ」の薬理作用の生化学的解明を試みることを目的とした。本報告は、「セ」が最も顕著な生物活性を示すと考えられている毒物中和作用について解析を試みた。即ち「セ」は台湾産タマサキツヅラフジから抽出されたビスコクラウリン型アルカロイドで図1に示す様な構造式をもつ事が近藤等<sup>1</sup>に

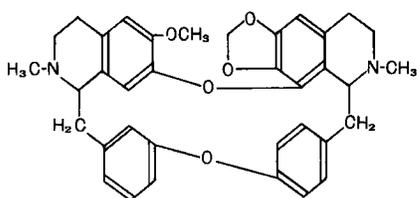


図1 セファランチンの構造式

より明らかにされ、それが強い蛇毒溶血作用を阻止する事が報告されている<sup>2</sup>。この作用機構に関しては毒素中和、リパーゼ阻害、等によるとされているが分子機構については尚明らかでない。ここではその溶血阻止作用が生体膜安定化作用による事について報告する。

#### 材料及び方法

材料には人および家兎赤血球、移植後7~9日目の Ehrlich 腹水癌細胞および AH-130 腹水肝癌細胞を Hanks 液または 0.15 M コリンクロライド-10 mM Tris-HCl (pH 7.4) にて洗滌し、氷冷状態に保ち実験に供した。

方法は細胞内  $K^+$  の流出は  $K^+$  電極により反応液中の  $K^+$  の変化を記録した<sup>3</sup>。またこの時使用した反応液は主として 0.15 M コリンクロライド-10 mM Tris-HCl (pH 7.4) で反応は 25℃~37℃、反応液量は 3 ml とした。生体膜電位の測定は Hoffman らの方法により<sup>4,5</sup> シアニン系色素 3,3-dipropylthio-dicarbocyanine iodide ( $diSC_3(5)$ ) の蛍光変化により 622 nm を励起光とし 670 nm 蛍光を測定した。その他使用した薬物はすべて試薬特級である。蛋白法の定量は Laury の方法に従った。

薬物はバリノマイシン、グラミシジンは、Calbio

chem, リゾレシチン, phosphatidyl choline, Type III (卵黄), phospholipase A (*Vipera russelli*) は Sigma chemical Co., マムシ毒 (*Agkistrodon halys blomhoffii*) を使用した。また cepharanthin は化研生薬の恵与により, HVJ (hemagglutinating virus of Japan) は大阪大学微研, 岡田喜雄博士の恵与によった。

#### 実験結果および考察

##### 1. 蛇毒および関連物質による細胞内 $K^+$ 遊出に対する「セ」の阻止作用

蛇毒による赤血球の溶血作用に先行して  $K^+$  の遊出が起る。即ち図2の如く赤血球浮遊液に phosphatidyl choline を添加すると蛇毒によって  $K^+$  の遊出ならびに溶血が起る。この  $K^+$  の遊出は微量の「セ」添加によって阻止される。勿論この時添加された phosphatidyl choline, 「セ」, 蛇毒はそれぞれ単独に添加された場合  $K^+$  の遊出の起らないことはいうまでもない。これらのことから蛇毒による細胞内  $K^+$  の遊出は蛇毒内に含まれる phospholipase A の作用によるリゾ体の形成によることが示唆される。事実 phosphatidyl choline 存在下に精製 phospholipase A を添加することにより  $K^+$  の遊出が誘起され、これに対しても「セ」は阻止作用を示す(図3)。長谷川<sup>2</sup>らによれば溶血阻止作用は phospholipase A の酵素活性に関係している可能性が示唆されている。

しかし、phospholipase A 活性により生成されるリゾ体 (lysolecithin) による赤血球からの  $K^+$  遊出も「セ」によって阻止され、「セ」はむしろリゾ体による膜のミセル化に対して阻害を示す事が示唆される。(図4) この様な赤血球で観察された「セ」の阻止作用は Ehrlich 腹水癌細胞や AH-130 腹水肝癌細胞でも共通して見られる現象である。

##### 2. 種々の細胞膜修飾に伴う細胞内 $K^+$ 遊出に対する「セ」の作用

上記の実験事実は「セ」が生体膜に作用し、その物理化学的性質を安定化する様に作用している事を示唆する。その性質をより明らかにする目的で細胞膜を種々の薬物で修飾し膜の区画性を変化させた場合「セ」がどの様に作用するかを実験した。一般に細胞膜は、SH グループと作用する重金属によって  $K^+$  の区画性を低下するが<sup>6</sup>、図5に示す如く酢酸鉛による赤血球内  $K^+$  の遊出に対しても「セ」は強い阻止作用を示す。

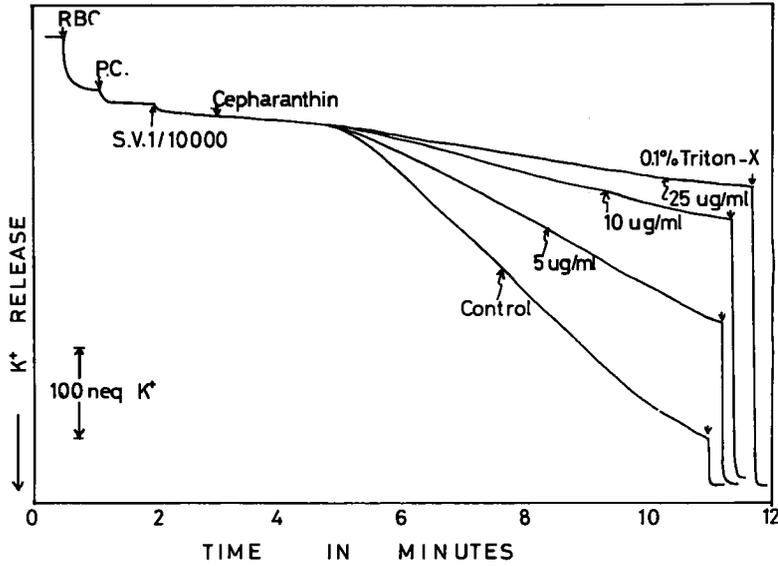


図2 ウサギ赤血球の蛇毒によるカリウム溶出に対するセファランチンの阻害作用  
 ウサギ赤血球 ( $1.3 \times 10^7$  細胞/ml) を  $0.15 \text{ mM}$  をコリンクロライド  $10 \text{ mM}$  トリス塩酸緩衝液 (PH7.4) 細胞に  $37^\circ\text{C}$  で反応させたもの PC = レシチン, SV = 蛇毒, Triton = TritonX-100

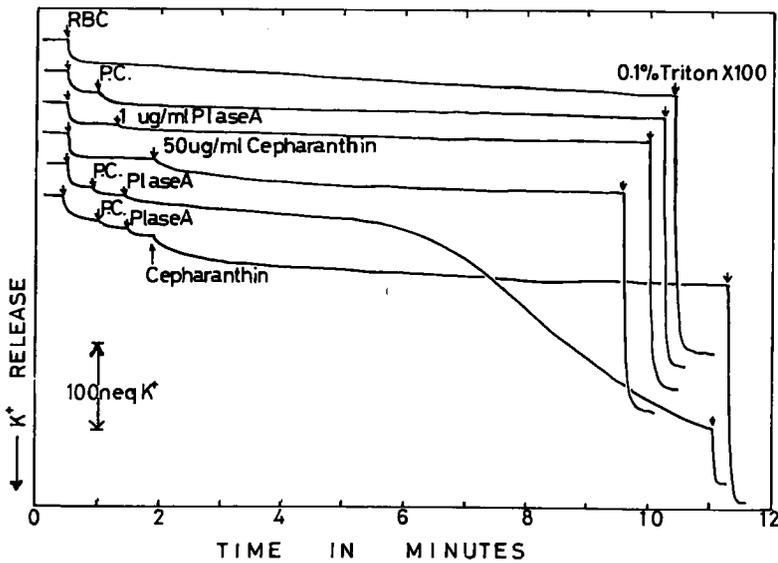


図3 家兎赤血球のカリウム区画性に対するホスホリパーゼ、レシチン及びセファランチンの作用  
 反応条件は図2に同じ。但し PC =  $50 \mu\text{g}/\text{cc}$  ホスホリパーゼA は  $1 \mu\text{g}/\text{cc}$ 、セファランチン  $50 \mu\text{g}/\text{cc}$  を使用

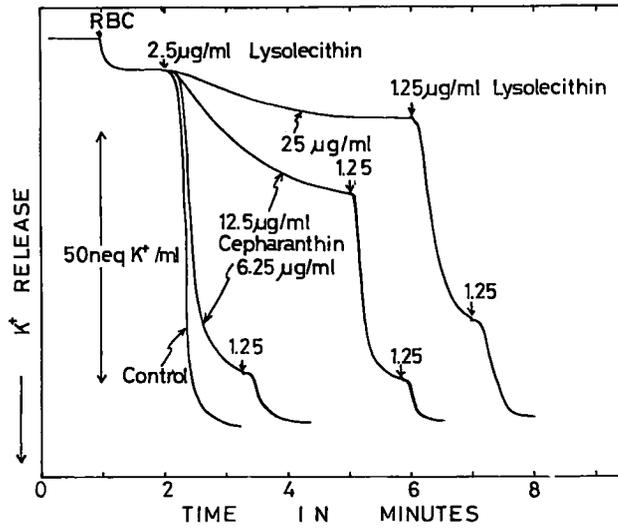


図4 家兎赤血球のリゾレシチンによるカリウム漏出に対するセファランチンの阻止作用

反応条件は図2に同じ。但し使用細胞数は $5.2 \times 10^6$ 細胞/mlを使用，リゾレシチン濃度は $2.5 \mu\text{g}/\text{cc}$ でセファランチンは $6.25 \sim 25 \mu\text{g}/\text{cc}$ を使用した。

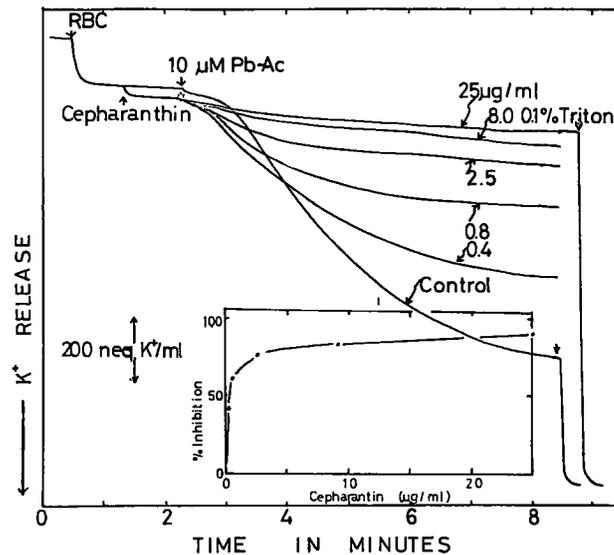


図5 酢酸鉛による赤血球カリウム漏出に対するセファランチンの阻止作用

反応条件は図2に同じ。但し使用家兎赤血球数は $6.3 \times 10^7$ 細胞/ml Pb-Ac=酢酸鉛を示す。挿入図は酢酸鉛添加後6分におけるセファランチンのカリウム漏出阻害のパーセントを示す。

この膜の区画性変化の安定化作用は最近、Hoffmanらによって改変されたシアニン系色素の蛍光変化による生体膜電位の測定を利用しても証明された。即ち赤血球に酢酸鉛を添加すると $K^+$ の遊出に先だっ

てすみやかな膜電位の形成が示される。(図6 蛍光の低下は内部負の膜電位が形成された事を示しこの低下度から電位が計算される?)その後 $K^+$ の遊出に従って電位が消失するが、これは $K^+$ 区画性が回復し

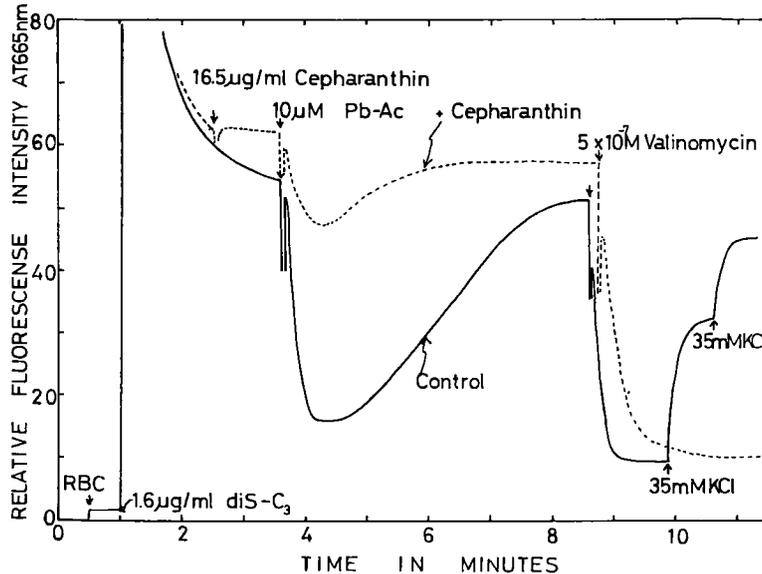


図6 酢酸鉛による赤血球の膜電位変化とセファランチンによる電位変化阻害

反応条件は図2に同じ。但し使用細胞数は $1.2 \times 10^7$ 細胞/mlでシアニン系色素( $dis-C_3$ )の622nmによる励起に伴う675nmの蛍光強度変化により膜電位を測定したもの。

たためである。というのはその後で $K^+$ のみを通すイオノホアの一種バリノマイシン添加によりすみやかに膜電位の形成が示されるからである。この様な酢酸鉛による膜電位形成に対し「セ」は強い阻害作用を示し、 $K^+$ の遊出に先がけて起る区画性ないしは透過性の亢進に対して阻止作用を示すことが明らかにされた。

またヘキサン様な有機溶媒が生体膜の $K^+$ 区画性を変化させることはすでに明らかにされているが、「セ」はその作用に対しても阻制的に働く(図7)。しかし「セ」の作用はすべての $K^+$ 区画性増加に対して阻制的に作用するのではなく、例えばイオノホアであるグラミシジン、バリノマイシンや、センダイビルス(HVJ)、界面活性剤等による $K^+$ 区画性低下に対しては何等阻止作用を示さない。

### 3. 膜安定化作用、特にコレステロールとの比較

以上のデータを総合して考えると「セ」は生体膜の特定の物理化学的变化に対し安定化作用を示し、

作用機序は尚明らかでないが膜流動性の低下に関与する事が考えられる。この可能性を検討する目的で一般に膜流動性を低下させると考えられるコレステロールの作用と比較した。図8はその結果であり、酢酸鉛による赤血球からの $K^+$ 遊出に対しコレステロール添加は若干の阻止作用を示している。ここでコレステロールの作用が顕著でない原因はコレステロールが細胞膜に十分に組み込まれるためにはリン脂質とコレステロールで作られたリポソームと細胞を長時間接触させる必要があり、本実験ではその組み込みが不充分のため作用が顕著に表われなかったものと考えられる。従ってこの実験結果は「セ」が膜流動性を低下させるように作用している可能性を示すものであり、今後更に膜流動性自身の測定を行って作用機序を明らかにしたい。

### 結 論

ビスコクラウリン型アルカロイドの一種セファランチンは強力な溶血阻止作用を示すがこの作用機序

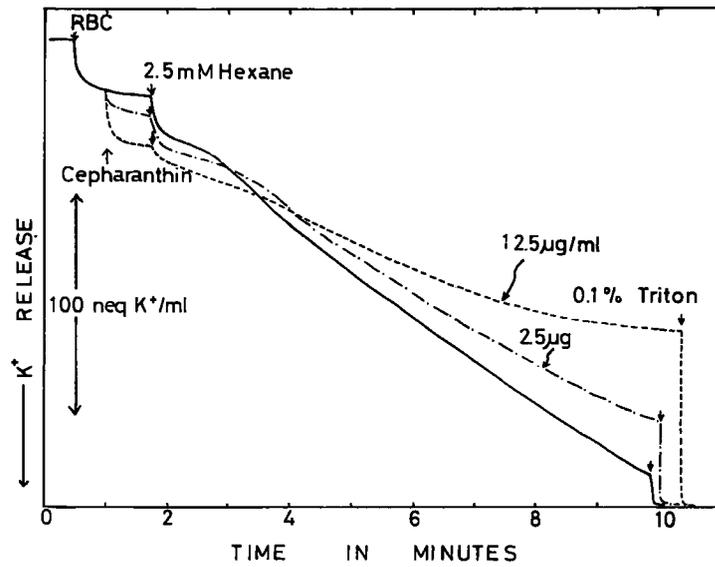


図7 赤血球のヘキサンによるカリウム漏出に対するセファランチンの阻止作用

反応条件は図2に同じ

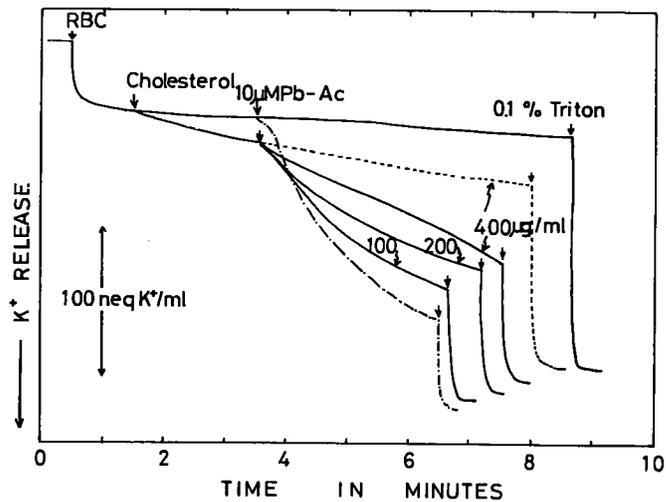


図8 赤血球の酢酸鉛によるカリウム漏出に対するコレステロールの阻止作用

反応条件は図7に同じ、添加コレステロールの濃度は図の中を示す通りである。

の解析は膜の物質区画性のための物理化学的性質の解明に役立つ。この様ないみでこのアルカロイドの生体膜に対する作用を解析し、次のような結果を得た。

1. セファランチンは蛇毒, phosphatidyl choline 存在下の phospholipase A, リゾレシチンによる赤血球や腹水癌細胞の  $K^+$  遊出に対して阻止作用を示す。
2. 重金属による細胞膜の SH 基の修飾, 有機溶媒

による膜脂質の修飾による細胞内  $K^+$  の遊出に対してもセファランチンは阻止作用を示す。

3. これに反し, アイオノホアであるグラミシジン, バリノマイシンやセンダイビールス (HVJ), 界面活性剤等による細胞膜の  $K^+$  区画性の低下に対しては作用を示さない。
4. セファランチンの  $K^+$  遊出阻止作用は膜の流動性の低下による事が示唆される。

## 文

## 献

1. 近藤平三郎, 山下泰朗, 慶松一郎: タマサキツヅラフジのアルカロイドに就て. 薬学雑誌54:620-633, 1934
2. Hasegawa, S. and Takahashi, K.: Therapeutic application of cepharanthin for the snake venom injury. Saishin Igaku, 7: 627-631, 1958
3. 内海耕造, 長谷川亨, 緒方正名: 石油成分のエネルギー転換反応に対する作用. 医学と生物学, 91: 13-18, 1975
4. Hoffman, J. F.: Determination of membrane potentials in human and amphiuma red blood cells by means of a fluorescent probe. J. Physiology, 239: 519-552, 1974
5. 内海耕造, 宮原正信: 蛍光色素による生体膜電位の測定法 化学の領域 増刊号 「蛍光測定 of 生化学研究への応用」: 117, 61-71, 1976
6. Passow, H.: The red blood cell: Penetration, distribution, and toxic actions of heavy metals in "Effect of metals on cells, subcellular elements, and macro molecules" ed J. iloff, J. R. Coleman and M. W. Miller Charles, C, Thomas Publisher, Springfield, U S A P. 291-344, 1972
7. Sims, P. J., Waggoner, A. S., Wang, C. and Hoffman, J. F.: Studies on the mechanism by which cyanine dyes measure membrane potential in red blood and phosphatidyl choline vesicles. Biochemistry, 13: 3315-3330, 1974
8. Inbar, M and Shintzky, M.: Increase of cholesterol level in the surface membrane of lymphoma cells and its inhibitory effect on ascites tumor development. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 71: 2128-2130, 1974

**Effect of biscoclaurin alkaloids of the biomembrane system  
and its action mechanisms**

**Part I. Inhibitory effects of cepharanthine on the  
K<sup>+</sup>-release after the injury to cell membrane**

**Masanobu MIYAHARA, Kozo UTSUMI\*, Katsumi SUGIYAMA\*\*  
and Kaname AONO\*\*\***

Department of Pathology, \*Department of Biochemistry, Cancer Institute,

\*\*Department of Pharmacology and \*\*\*Department of Radiation Biology,

Okayama University Medical School, Okayama

Concerning the physiological properties possessed by the cell membrane, recently an attention has been called on various problems such as the cell recognition mechanism to begin with, and the mutual relationships among the intercellular communication mechanism, as well as the metabolism adjustment of membrane binding enzymes, aside from the compartmentation of substances. Essentially the physico-chemical properties of the membrane of cancer cell and proliferating cells are important in relation to the treatment of cancer. And attempts are being made to change the cell metabolism by artificially altering the physico-chemical properties of the cell membrane.

Cepharanthine, one of the biscoclaurin alkaloids, is known from olden days to possess a thanatophidia hemolytic property, but this property seems to bring about the change in the physico-chemical properties of the cell membrane, and it is interesting in the point that this substance may have a membrane modifying property. For these reasons, during the investigation on the actions of alkaloids on the cell membrane many interesting phenomena have been elucidated. This report presents the results recently obtained about the changes in physico-chemical properties of biological membrane by the treatment with cepharanthine. The obtained results were as follows.

1. Cepharanthine inhibits K<sup>+</sup>-release from red blood cells when these cells are treated with snake venom, phospholipase A, lysolecithine, lead acetate and hexane. But the alkaloid does not inhibit K<sup>+</sup>-release induced by ionophores, surface active agents and HVJ.
2. Cepharanthine inhibits the hyperpolarization of membrane potential induced by lead acetate or hexane.
3. Similar inhibitory effect of cholesterol on K<sup>+</sup>-release from the cells by the treatment with lead acetate is observed.
4. From these results it is suggested that the inhibitory action of cepharanthine on K<sup>+</sup>-release from cells is due to the action of decrease in membrane fluidity.