

## 農作物防腐剤オルトフェニルフェノール (OPP) のミトコンドリア毒性

角田 香澄<sup>1)</sup> 北川 章<sup>2)</sup>

### 要 旨

農作物、特にリンゴ等果実類に使用されている保存剤 OPP のミトコンドリア毒性について単離ラット肝ミトコンドリアおよび亜ミトコンドリア粒子 (SMP) を用いて検討した。OPP は無傷ミトコンドリアの NAD 系およびコハク酸酸化系呼吸をほぼ同等の強さで阻害した。RC 比は用量依存性に低下したが、ADP/O 比の低下は見られなかった。このことは OPP が呼吸阻害作用を示すが除共役作用を示さないことを示している。OPP の呼吸阻害作用の機序を解明する目的で SMP の NADH 酸化系 (NADH oxidase) およびコハク酸酸化系 (succinate oxidase) への影響について検討した。無傷ミトコンドリアの呼吸に対する阻害と異なり、OPP は succinate oxidase より NADH oxidase を強力に阻害することが判明した。この結果は OPP が構造破壊ミトコンドリアでは電子伝達系を阻害するが、無傷ミトコンドリアでは内膜不透過性であり、電子伝達阻害ではなく、内膜の細胞質側表面に局在する酵素を非特異的に阻害することによりミトコンドリアの機能損傷をきたすことを示唆している。

キーワード : OPP, ミトコンドリア

### 緒 言

我々の食卓に上る食品には、長期保存（腐敗防止や酸化防止）や色調、風味の保持等を目的として多種類の食品添加物が用いられている。現在我が国で使用が許可されている食品添加物は、指定添加物、既存添加物、天然香料と一般飲食物添加物にわけられ約 1500 種類が使用されている。一方で過剰摂取により人体への影響が懸念されている添加物もいくつかある。例えばハムやベーコンで発色剤として使用されている亜硝酸塩は、様々な条件下で強い発癌性を持つ N-ニトロソ化合物に変換されることが知られている<sup>1)</sup>。その為、食品添加物の健康への影響は消費者の間で高い関心を集めている。

OPP は指定添加物の 1 つで、1970 年代以前は農薬として使用されていたが、その後は食品添加物として認可、使用されている。OPP はフェノールにベンゼン環が結合した構造で、強い防黴効果を持ち、主に柑橘類の表皮に散布または塗布して使用されている<sup>2)</sup>。ところが、優れた防黴効果を持つ反面、OPP の投与によりラットで膀胱癌の発症が確認されている<sup>3)</sup>。さらに OPP による発癌は、その代謝産物である phenylbenzoquinone による酸化的 DNA 損傷でおこる可能性も示唆されている<sup>4)</sup>。

ミトコンドリアは、独自の遺伝子を持ち、主にエネルギーの生合成を担う他、カルシウム濃度の恒常

性や活性酸素種 (ROS) の生成、細胞死の調節に大きく関与している。その為単離ラット肝ミトコンドリアを用いて多種の化学物質のミトコンドリア呼吸系への影響が検討され、多くのタイプの化合物がミトコンドリア呼吸系を損傷することが確認されている<sup>5)</sup>。OPP 同様に主に柑橘類の防黴剤として用いられている thiabendazole が、ミトコンドリアの呼吸鎖酵素複合体 II の UQ の酸化還元活性を阻害することも確認されている<sup>6)</sup>。

OPP は肝臓の cytochrome P450 経路で代謝されること<sup>7)</sup>、肝細胞への細胞毒性を持つことから<sup>8)</sup> 肝臓機能へ何らかの影響を与えることが考えられる。

そこで本研究では、OPP の肝臓機能への影響を詳細にするために、ミトコンドリア毒性について単離ラット肝ミトコンドリアおよび亜ミトコンドリア粒子 (SMP) を用いて検討した。

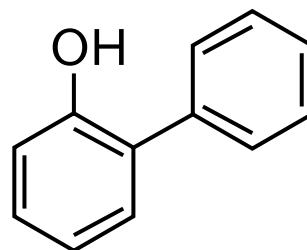


Fig.1 Structure of OPP

1) 鹿児島純心女子大学看護栄養学部健康栄養学科

2) 至学館大学健康科学部栄養科学科

## 実験試薬および方法

### 試薬

OPPは(株)和光純薬から購入し、実験にはN,N-dimethylformamide (DMFA)溶液(50mM)として用いた。ADP-2Na, antimycin A, Trizma base (Tris), 血清アルブミン (BSA, fraction v) は, Sigma Chemical 社からそれぞれ購入した。その他の試薬は, 全て市販品特級試薬を用いた。

### 実験方法

#### ラット肝ミトコンドリア画分およびSMPの調製

ミトコンドリア画分は, 基本的にはSchneiderの方法<sup>9)</sup>に従い, 河合らにより一部改良された方法<sup>10)</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。SMPは河合らの方法に従って, 凍結・融解により構造破壊したミトコンドリアから調製した<sup>11)</sup>。

#### 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。

ミトコンドリアを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(溶存酸素の消費)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<sup>12)</sup>。RC比およびADP/O比の低下は酸化的リン酸化に対する除共役作用を示す。State 3呼吸の阻害率はOPP非添加のstate 3呼吸値を100としてオキシグラフから算出した。

### 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>13)</sup>により定量した。

## 実験結果

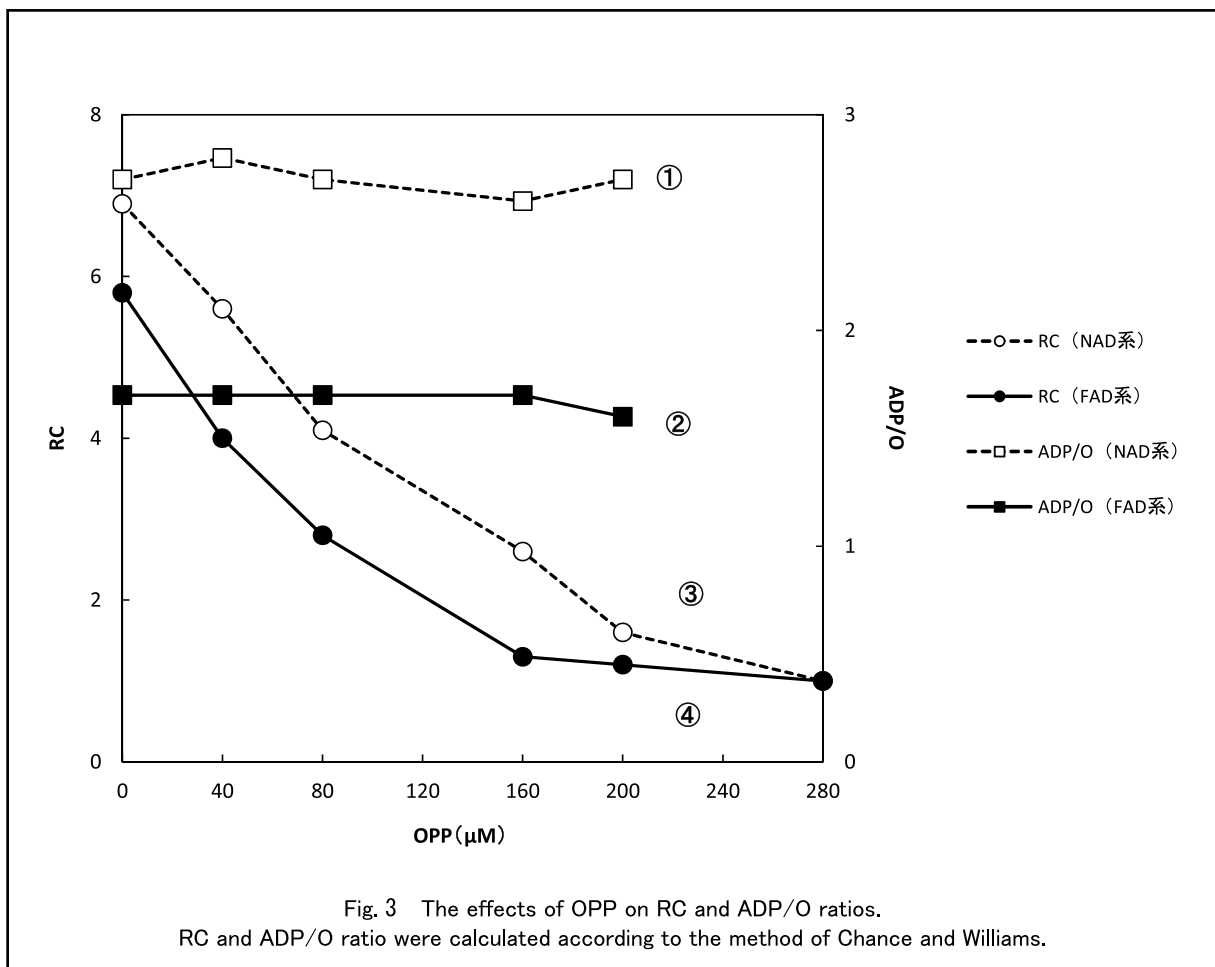
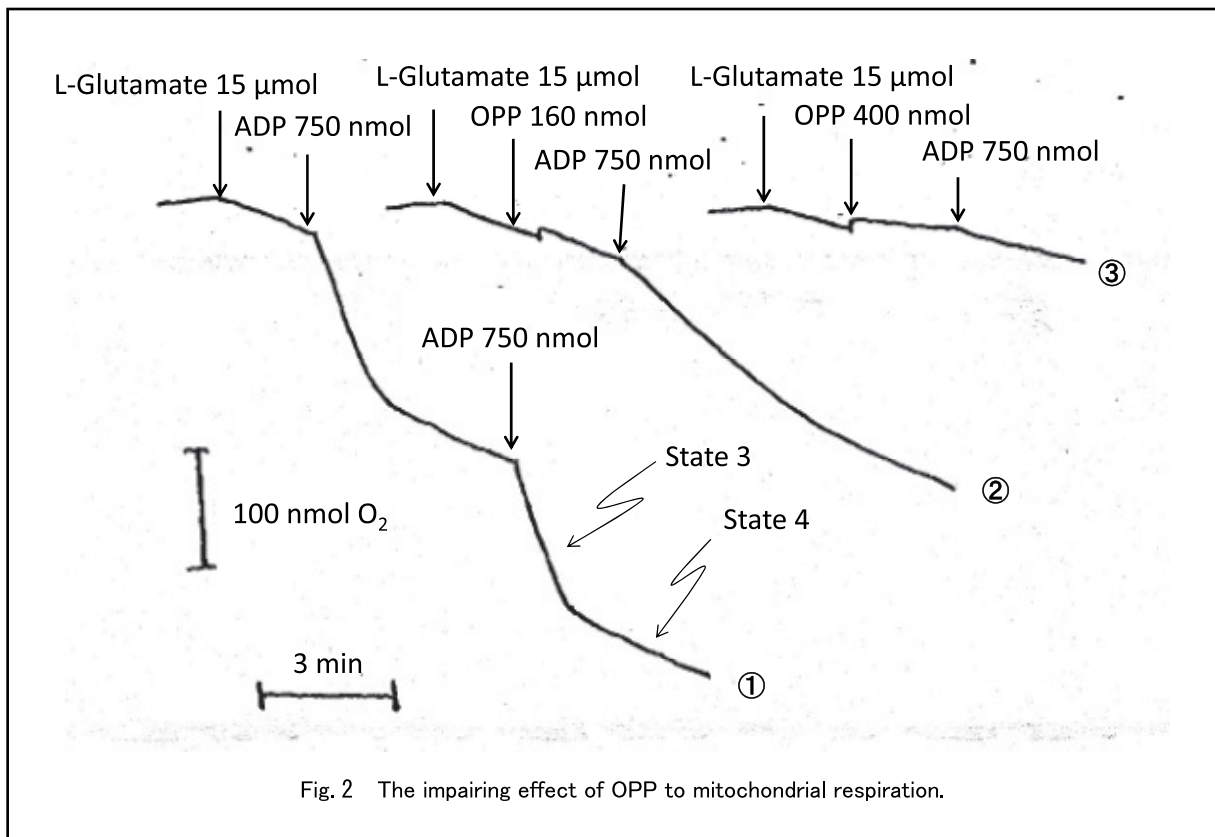
### OPPの呼吸阻害作用

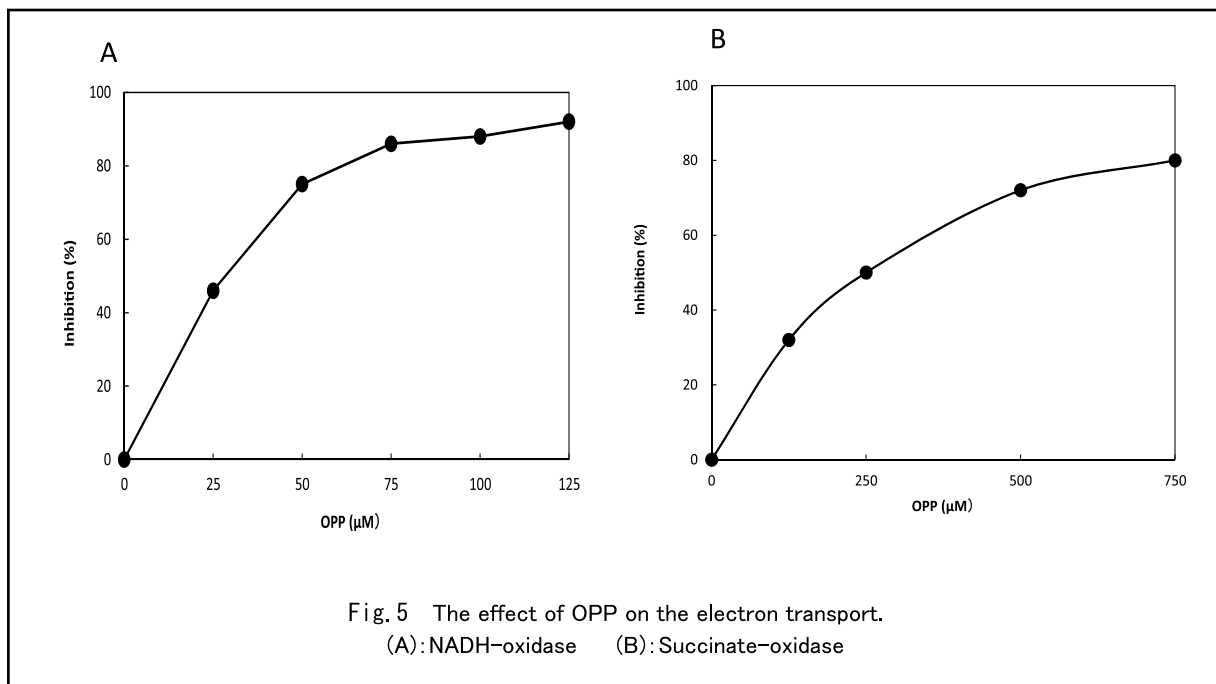
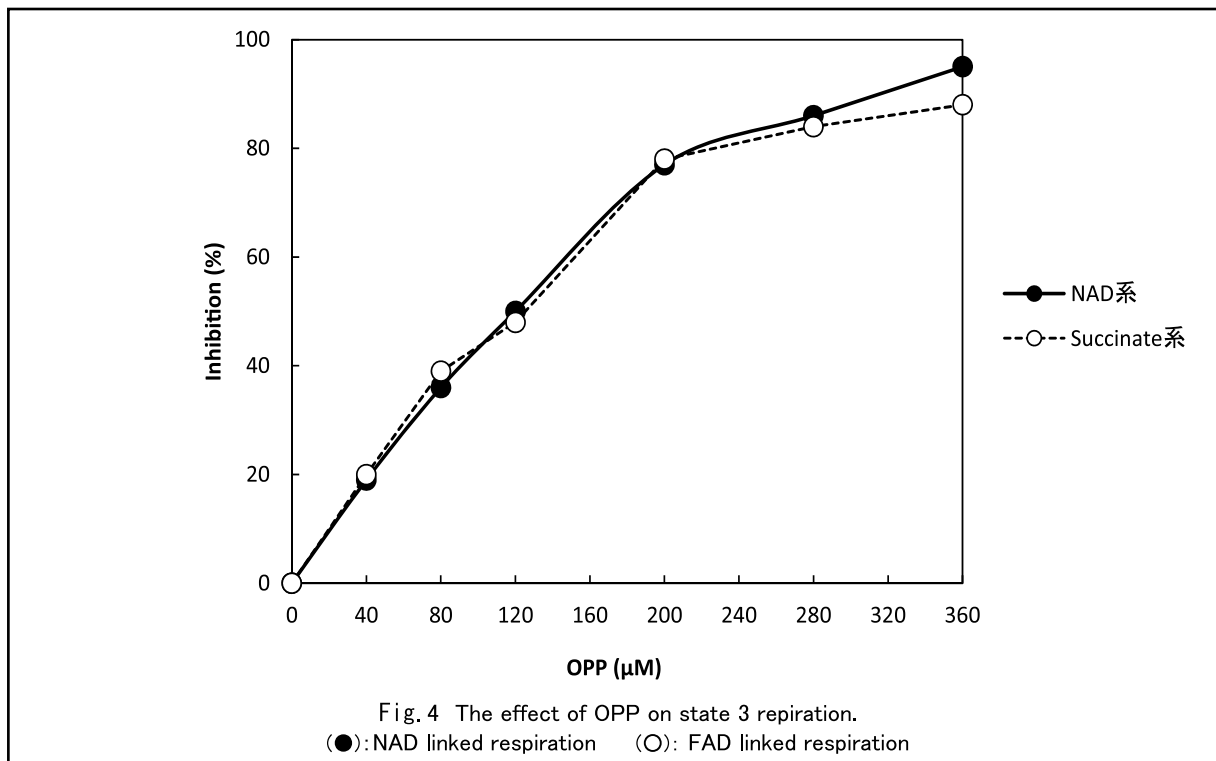
単離ラット肝ミトコンドリアの呼吸系へのOPPの影響について酸素電極法により検討した(Fig. 2)。調製したミトコンドリアは高い呼吸活性を示し, NAD系呼吸(L-グルタミン酸酸化系呼吸)では高いRC比およびADP/O比を示した(curve 1)。State 4呼吸へのOPPの添加によりstate 3呼吸は顕著に阻害されたが, state 4呼吸の加速は見られなかった(curve 2)。さらに高濃度のOPPでは呼吸はさらに強力に阻害され, ADP添加によるstate 3呼吸は誘導されなかった(curve 3)。これらの結果から, 単離ラット肝ミトコンドリアの呼吸系に対してOPPが呼吸抑制作用を示し, 除共役作用は示さないことが推測された。

OPPの呼吸阻害作用について用量依存性の影響を検討した(Fig. 3)。データはオキシグラフから計算した。NAD系呼吸およびコハク酸酸化系呼吸においてRC比は用量依存性に低下した(curves 3, 4)が, ADP/O比の低下は僅少であった(curves 1, 2)。この結果はOPPが呼吸阻害作用のみを示し, 除共役作用を有しないことを示している。

OPPの呼吸阻害作用について用量依存性変化を検討した(Fig. 4)。データはオキシグラフから計算し, コントロール実験のstate 3呼吸を100%として阻害率を計算した。OPPがNAD系呼吸およびコハク酸酸化系呼吸に対してほぼ同様の強さで阻害することが判明した。約120 μMで50%阻害が得られた。

OPPの呼吸阻害作用メカニズムを知るためにSMPを用いて検討した(Fig. 5)。SMPはミトコンドリア内膜の内外側反転小胞で, 共役機能を有せず, コハク酸や, 本来膜不透過性のNADHを呼吸基質として直接酸化する。OPPは用量依存性の阻害作用を示したが, NADH oxidase に対しては無傷ミトコンドリアの呼吸系に対する阻害より強力であり, また, succinate oxidase に対しては無傷ミトコンドリアの呼吸に対する阻害より弱いことが判明した。この結果はOPPが低濃度ではNAD系呼吸の電子伝達酵素複合体I(NADH-UQ oxidoreductase)を特異的に阻害することを示している。高濃度下ではNADH oxidase, succinate oxidaseの両電子伝達系がOPPにより阻害された。





電子伝達阻害部位についての検討

OPPが低濃度でNADH酸化系の酵素複合体Iにおける電子伝達を阻害することを示唆する結果が得られた。ミトコンドリアの電子伝達系は酵素複合体I~IVおよびUQとcytochrome cから成り立っている。阻害部位についてSMPを用いてさらに検討した (Fig. 6)。OPP非添加系のコントロール実験ではNADH oxidaseは antimycin Aにより阻害され, rotenoneおよび

antimycin A 阻害部位に対する電子伝達バイパスを形成するTMPD<sup>14)</sup>により阻害が解除された (curve 1)。しかし, TMPDによりOPPによるNADH oxidase阻害が解除されなかった。TMPD添加後にcytochrome c oxidaseの人工基質ascorbateを添加するとNADH oxidase活性が回復した (curve 2)。

これらの結果は, OPPが呼吸鎖酵素複合体Iのrotenone阻害部位以外の部位で電子伝達系を阻害する

ことを示唆している。コハク酸酸化系呼吸においても同様の結果が得られ、OPPが酵素複合体IIにおける電子伝達を阻害することが判明した (date not shown)。さらに高濃度のOPPでは ascorbate の添加による呼吸の回復が見られず、酵素複合体IV (cytochrome c

oxidase)も阻害されることを示す結果が得られた (curve 3)。以上の結果、OPPが低濃度では酵素複合体Iの酵素活性を阻害するが、濃度の上昇に伴い、電子伝達系を複数個所において非特異的に阻害することが判明した。

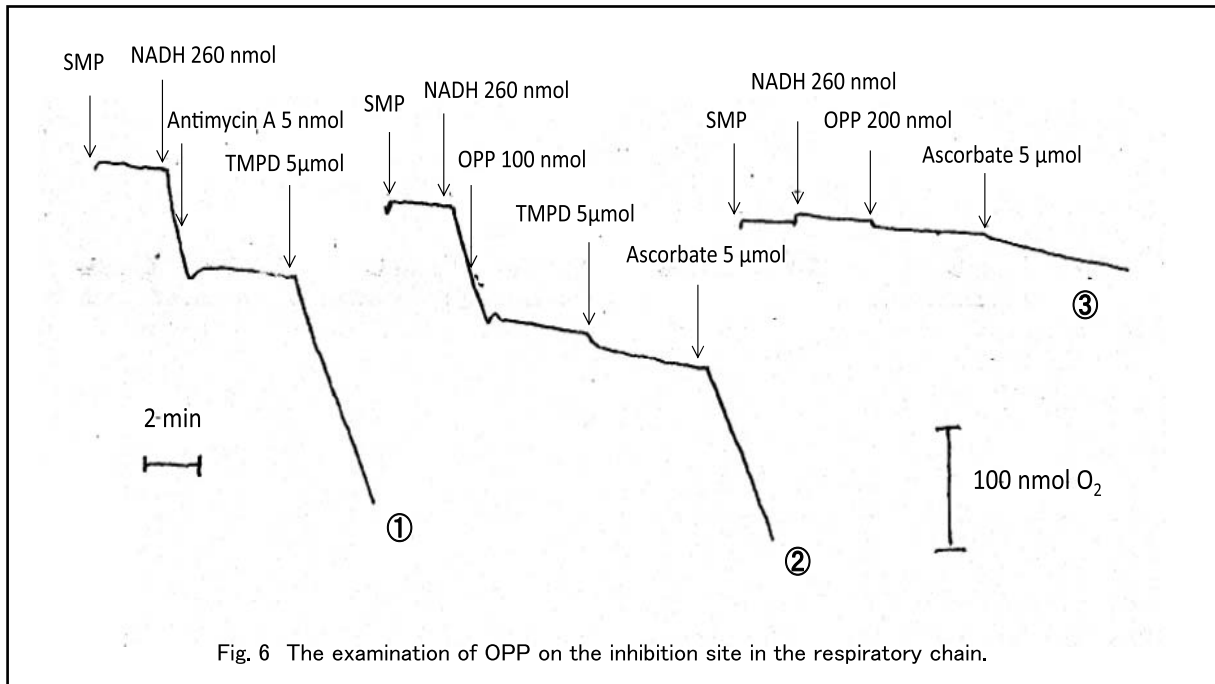


Fig. 6 The examination of OPP on the inhibition site in the respiratory chain.

### 考 察

OPPのミトコンドリア呼吸阻害作用について検討した。OPPは単離した無傷ミトコンドリアのNAD系およびコハク酸酸化系呼吸にたいしてほぼ同強度の呼吸阻害作用を示した。ミトコンドリア内膜の内外側反転小胞SMPを用いた実験では、NADH酸化系がコハク酸酸化系より強力に阻害され、OPPがミトコンドリアの電子伝達酵素複合体Iの活性を阻害することが判明し、無傷ミトコンドリアの呼吸に対する阻害とは異なった結果が得られた。これらの結果は、OPPがミトコンドリア内膜不透過性であり、無傷ミトコンドリアへの作用とSMPへの作用とでは作用機序が異なることを示している。OPPがフェノール化合物であり、フェノールやクレゾールと同様の、タンパク質変性作用に基づく呼吸阻害であることを示唆している。OPPがミトコンドリア呼吸阻害作用を示すことは、カビ等、真核生物への増殖阻害作用を示すことになり、また同時に、OPP処理農産物の摂取による肝臓機能への影響も推察される。しかし、呼吸阻害作用（ミトコンドリア毒性）としては強力でないことから、特に多量摂取による肝蓄積がない限りミトコンドリア毒性による肝臓機能への影響は生じないと考えられる。

### 謝 辞

本研究実施にあたり、実験方法について指導してくださいました至学館大学名誉教授 河合 清先生に深謝いたします。

### 文 献

- 1) Olsen P., et.al.: Animal feeding study with nitrite-treated meat., IARC Sci., Publ.57 : 667-645,1984.
- 2) IARC working group on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans.: *Ortho*-phenylphenol and its sodium salt. In IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risk of chemicals to humans., IARC no.30,Lyon:329-344, 1983.
- 3) Hiraga K., Fujii T.: Induction of tumours of the urinary bladder in F344 rats by dietary administration of *o*-phenylphenol., Food Chem. Toxicol. 22: 865-870, 1984.
- 4) Murata M., Moriya K., Inoue S., Kawanishi S.: Oxidative damage to cellular and isolated DNA by metabolites of a fungicide *ortho*-phenylphenol., Carcinogenesis. 20 (5): 851-857,1999.
- 5) Rodriguez RJ, Acosta D Jr.: Inhibition of mitochondrial function in isolated rat liver mitochondria

- by azole antifungals., *J Biochem Toxicol.*11(3):127-131,1996.
- 6) Zhou Q, Zhai Y, Lou J, Liu M, Pang X, Sun F.: Thiazobenzazole inhibits ubiquinone reduction activity of mitochondrial respiratory complex II via a water molecule mediated binding feature., *Protein Cell.* 2(7): 531-42, 2011.
- 7) Roy D.: Cytochrom P-450 catalyzed redox cycling of ortho-phenylphenol. *Biochem Int.*22:849-857,1990.
- 8) Sugihara N, Shimomichi K, Furuno K.: Cytotoxicity of food preservatives in cultured rat hepatocytes loaded with linolenic acid., *Toxicology.* 120(1): 29-36,1997.
- 9) Schneider WC.: Intracellular distribution of enzymes; the oxidation of octanoic acid by rat liver fraction., *J Biol Chem.* 176 : 259-266,1948.
- 10) 河合 清 : ミトコンドリア . 毒性試験講座 6, 毒性生化学 : 96-101,1989.
- 11) Kawakami M, Harada N, Hiratsuka M, Kawai K, Nakamura Y.: Dietary isothiocyanates modify mitochondrial functions through their electrophilic reaction., *Biosci Biotechnol Biochem.* 69(12): 2439-44.,2005.
- 12) Chance B, Williams GR.: Respiratory enzymes and oxidative phosphorylation., *J Biol Chem.* 217 : 383-438, 1955.
- 13) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ.: Protein measurement with folin phenol reagent., *J Biol Chem.* 193:265-275, 1951.
- 14) Mustafa MG, Cowger ML, Labbe RF, King TE.: General nature of "Wurster's blue shunts" in the respiratory chain., *J Biol Chem .* 243(8): 1908-18.,1968.

## Mitochondria toxicity of o-phenyl phenol (OPP), a protector of edible crop from fungal contamination

Kasumi Tsunoda<sup>1)</sup>, Akira Kitagawa<sup>2)</sup>

1) Department of Health and Nursing, Faculty of Nursing and Nutrition,  
Kagoshima Immaculate Heart University

2) Faculty of Wellness, Shigakkan University

Key words : OPP, Mitochondria

### Abstract

Mitochondria toxicity of OPP, a protector of agricultural products from fungal contamination, was examined using isolated rat liver mitochondria and submitochondrial particles (SMP) to gain insight into the toxicity mechanism. OPP repressed both NAD- and FAD linked respirations in a similar inhibition potential giving an ID<sub>50</sub> at around 120  $\mu$  M. The respiratory control ratio (RC ratio) was decreased in a dose dependent manner, but the ADP/O ratio was merely slightly influenced, indicating the respiration-repressing effect of OPP without exerting the uncoupling effect. In order to know the mechanism for the respiration repressing action of OPP, the effect of OPP on the electron transport system was examined by using SMP. OPP was found to inhibit NADH oxidase at prominently lower concentrations (ID<sub>50</sub> at 60  $\mu$  M) than those for the inhibition to the succinate oxidase (ID<sub>50</sub> at 500  $\mu$  M), showing no consistent result from that of experiment with intact mitochondria. This result indicates that OPP specifically inhibited the electron transport at NADH-ubiquinone oxidoreductase (complex I) of the respiratory chain at low concentrations and did it in a non-specific manner in SMP. From these results it was proposed that OPP is not able to permeate across mitochondrial inner membranes and only interacts with enzymes located in the outer surface of the inner membranes, resulting in the non-specific impairing of mitochondrial function.

---