

## 脂質過酸化物により劣化させられたチューブリンの GTPase活性に対するSH基還元剤 (グルタチオン・システイン) の回復効果

川上美佐子<sup>1)</sup>, 中野 美江<sup>1)</sup>, 清原 利文<sup>1)</sup>, 土井 裕司<sup>1,2)</sup>

<sup>1)</sup>(武庫川女子大学生活環境学部食物栄養学科)

<sup>2)</sup>(武庫川女子大学バイオサイエンス研究所)

## The Protective Effect of SH Reductants (Glutathione and Cysteine) on Tubulin GTPase Activity Deteriorated by Lipid Peroxides

Misako Kawakami<sup>1)</sup>, Mie Nakano<sup>1)</sup>, Toshifumi Kiyohara<sup>1)</sup>, and Hiroshi Doi<sup>1,2)</sup>

<sup>1)</sup>Department of Food Science and Nutrition,  
School of Human Environmental Sciences,

Mukogawa Women's University, Nishinomiya 663-8558, Japan

<sup>2)</sup>Interdisciplinary Research Institute for Bioscience,

Mukogawa Women's University, Nishinomiya 663-8558, Japan

Tubulin, which is a main component of the cytoskeleton, plays various important roles in cellular processes such as axonal transport, ciliary and flagellar movement, cell division, and cell segregation in the form of microtubules. The aim of the present study was to examine the effect of SH reductants on phospholipid peroxides-induced inhibition of tubulin GTPase activity. Lipid peroxides were prepared by photooxidation of lipid S100 of phospholipid obtained from soybean. Tubulin GTPase activity was most inhibited by lipid photooxidized for 24 hours among ones for 16 and 24 hours. The more the amount of lipid peroxides is added, the more the activity is inhibited. Tubulin GTPase activity was lowered even in the presence of a slight amount of lipid peroxides. This suggests that the presence of a slight amount of lipid peroxides influences cellular functions *in vivo*. Prepared lipid peroxides was identified as a monohydroperoxide by an electrochemical detection through HPLC and a mass spectrometry. Glutathione and cysteine was used as water soluble reductants. Tubulin GTPase activity deteriorated by lipid peroxides was restored by the addition of water soluble reductants. The results presented above suggest that glutathione and cysteine have a protective effect on cellular aging by the reduction of materials oxidized *in vivo*.

### 緒言

チューブリンは真核細胞内に普遍的に存在し、重合により微小管を形成する。形成された微小管は、

神経伝達、細胞分裂、細胞の形態維持など様々な細胞機能に関与している<sup>1-6)</sup>。このようにチューブリンの重合は、生体内における細胞機能発現の要であるといえる。

脂質過酸化物の生体への取込みは、食品中に含まれる微量の脂質過酸化物の摂取や、細胞膜の酸化による生成などの経路が考えられる。脂質過酸化物は、生体内において肝細胞の機能低下を導き、高度に過酸化した油の動物への投与は、小腸、肝臓、肺の細胞の壊死や充血を生じ、動物の生育が押えられ、死に至らしめる<sup>7)</sup>。In vitro 実験で明らかにされた過酸化物の生体成分に対する相互作用から推測すれば、生成された脂質過酸化物は細胞内成分と相互作用することによってその機能に影響を与え、疾患や老化の原因となっていると考えられる。また、脂質過酸化物によるタンパク質の損傷については多くの報告がある<sup>8-12)</sup>。

筆者らは現在までに、チューブリンへの脂質過酸化物の影響を検討して来ており<sup>13,14)</sup>、脂質過酸化物がチューブリン重合を阻害することを報告している。また、様々な脂溶性還元剤には脂質過酸化物により劣化させられたチューブリンの Guanosine-5'-triphosphatase (GTPase) 活性を回復させる効果があることを報告している<sup>15-17)</sup>。特にビタミン A 類による防御効果については詳細に報告している<sup>18)</sup>。

生体内には様々な抗酸化系が存在しており、グルタチオンは主要な細胞内抗酸化剤の一つであり、ほとんどの哺乳動物細胞中に高濃度で見出される代表的な水溶性還元剤である<sup>19,20)</sup>。

また SH 基が、チューブリンの重合に関与しているという報告も見られる<sup>21,22)</sup>。

そこで今回は、水溶性還元剤、特に SH 基還元剤の効果を検討することにした。グルタチオンとシステインは SH 基還元剤としてよく知られており、脂溶性還元剤とは異なり、水溶性であることから生体内への過剰摂取による害が小さいなどの利点を持っている。本実験では、脂質過酸化物により低下させられたチューブリンの GTPase 活性を回復させる水溶性還元剤として、グルタチオンとシステインを使用した。

## 材料および方法

### 1. チューブリンの調製

チューブリンは牛脳より硫酸分別とイオン交換法を組み合わせた Lee らの方法により調製された<sup>23-25)</sup>。牛脳は阪本食品興業株式会社(西宮)から恵与された。調製の全ての行程は 4℃ で速やかに行われた。調製されたチューブリンは使用時まで、1 M Sucrose, 0.1 mM Guanosine-5'-

triphosphate (GTP), 0.5 mM マグネシウムイオンを含むリン酸緩衝液 (pH7.0) 中で、-80℃ で保存された。使用時に Sucrose の除去、ならびに使用緩衝液への平衡化のため、Sephadex G-25 (M) によるバッチゲルろ過 (1.0 × 10 cm column) を行った後、更に 15,000 rpm, 4℃ で 30 分間遠心し、使用緩衝液で平衡化させた Sephadex G-25 (M) によるゲルろ過 (1.0 × 15 cm column) を行い、精製チューブリンとした<sup>26)</sup>。チューブリン濃度は  $E_{275} = 1.09 \text{ ml} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  として求めた<sup>27)</sup>。

### 2. 脂質過酸化物の調製および確認

脂質は細胞膜がリン脂質であることを考慮して大豆由来のレシチンを使用した。レシチンは日清製油から恵与されたリポイド S100 であった。リポイド S100 は 10 mg/ml になるようにメタノールに溶解後、光増感剤としてメチレンブルー (終濃度 0.004%) を加えた。これを低温室 (4℃) で攪拌を行いながら 16 および 24 時間、40 cm の高さから 30 W のレフランプで光照射し過酸化させた。その後、ディスポシル SL (ナカライテスク, 京都) にてメチレンブルーを除去し、濃縮乾固した。一方、メチレンブルーを加えず光照射していないものを未酸化脂質とした。

得られた脂質過酸化物の確認のため、光照射脂質はメタノールに溶解後、25 μl を ODS カラム (4.6 I.D. × 150 mm) を接続した HPLC (東ソー, 東京) に供与された<sup>28,29)</sup>。溶出溶媒は、電気化学検出を考慮して 30 mM 酢酸リチウムを含むメタノール:水 (95:5/v:v) が使用され、流速は 1.0 ml/min であった。検出は 210 nm での紫外吸収測定と、アプライボルト-300 mV による電気化学検出 (ECD) (医理化機器製, モデル Σ 985, 京都) によった<sup>30)</sup>。溶出溶媒には常にヘリウムガスを流しておいた。また、得られた脂質過酸化物を確認するため、LCMS-QP800 (島津製作所, 京都) でのエレクトロスプレーイオン化によるマススペクトロメトリーを行った。過酸化度も測定した<sup>31)</sup>。

### 3. システインおよびグルタチオンの調製

システイン (ナカライテスク, 京都) およびグルタチオン (KOJIN Co., Ltd.) は、pH7.0 の 0.5 mM のマグネシウムイオンを含む 10 mM リン酸緩衝液中に、1 mM 濃度に溶解して使用した。

### 4. その他の試薬

使用された全ての試薬は、本研究目的に沿った十分純度の高いもので、特級またはそれ以上の規格で

脂質過酸化物により劣化させられたチューブリンのGTPase活性の  
SH基還元剤（グルタチオン・システイン）による回復効果

あった。

5. 脂質過酸化物及びグルタチオンまたはシステイン添加時のチューブリンのGTPase活性の測定

チューブリンは微小管を形成して細胞内機能を発現することから、チューブリン重合を測定することは、チューブリン機能発現の指標となる。チューブリン重合の測定法としては、濁度法や粘度法が知られており<sup>32,33</sup>、我々も先の研究では濁度法を使用した<sup>13</sup>。しかし、この方法では高濃度のチューブリン調製物が多量に必要である。さらに、1つの測定に要する時間も長く、同時に複数のアッセイをすることが出来ない。GTPase活性測定と重合とが連動していることは既に著者らによって報告されている<sup>34</sup>。そこで今回は、重合測定に替えてGTPase活性を測定することにした。

チューブリンのみからの微小管形成は、高濃度のグリセリンの存在が必要である。我々は先の研究で、低濃度(0.5mM)のマグネシウムイオンの存在下でもGTPase活性は発現されるが、高濃度(10mM)のマグネシウムイオンの方がより高い活性を発現することを報告している<sup>13,35</sup>。そこで今回もアッセイ系は、10mM マグネシウムイオン存在下で行う事にした。アッセイ系は、チューブリン濃度 1.0mg/ml で、0.1mM GTP, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 3.4M Glycerol を含む 10mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) 中に 1.0mg/ml の脂質過酸化物を含んでいた。アッセイにはマイクロチューブを使用し、一つの反応系は全量を 500 $\mu$ l として行った。反応の開始はアッセイ系を 0 $^{\circ}$ C から 37 $^{\circ}$ C に加温することにより行い、10分、20分および30分後に 100 $\mu$ l の 3M 過塩素酸を添加し反応を停止した。なお、ブランクにはチューブリンを加える前に 100 $\mu$ l の 3M 過塩素酸を加えておいた。以下の操作は Seckler らの方法に従った<sup>36</sup>。30分で反応を停止したのは、重合を濁度法または粘度法で測定した場合、37 $^{\circ}$ C、15~20分でチューブリンはその重合がプラトーに達するからである<sup>35</sup>。アッセイ系への添加順序は塩化マグネシウム、基本緩衝液、脂質過酸化物、グルタチオンあるいはシステイン、そしてチューブリンの順であった。

6. HPLCでのGTPase活性の測定

GTPase活性は、生成した Guanosine-5'-diphosphate(GDP)をHPLCで定量することによって測定した。HPLCシステムは東ソー製でODSカラム(4.6 I.D.×150mm)を接続し、紫外可視検出

器はモデル UV-8020、ポンプはデュアルポンプCCPS、インテグレーターはクロマトコーダ21を用いた。移動相は4mMリン酸テトラブチルアンモニウムを含む0.2Mリン酸二カリウム-0.1M酢酸緩衝液(pH 6.5)を使用時に再精製水で3/4に希釈して使用した。流速は1.0ml/min、検出波長は253nmであった。

GTPおよびGDPの253nmでの分子吸光係数をいずれも13,700として、既知濃度のGTP(Type II, Sigma, St. Louis. MO. USA)溶液を検量線作成に用いた<sup>37</sup>。

結果および考察

1. 照射時間(16および24時間)の違いにより得られた脂質過酸化物のチューブリンのGTPase活性への影響

Fig. 1. に示すように、24時間光照射で得られた脂質過酸化物を添加した場合がチューブリンのGTPase活性を一番よく阻害していた。また、16時間光酸化した脂質添加での活性は、直線的な反応生成物の生成が観察されたが、24時間酸化で得られ

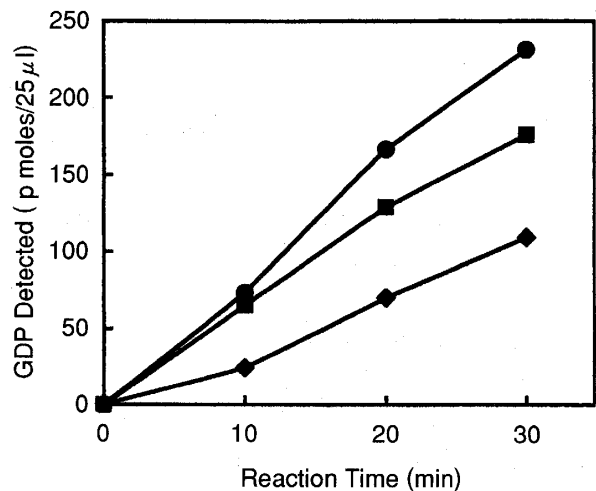


Fig. 1. Effect of lipids photooxidized for 16 and 24 hours on tubulin GTPase activity.

- control: no lipid peroxides
- +lipid peroxides: 16 hours photooxidation
- ◆ +lipid peroxides: 24 hours photooxidation

た脂質過酸化物添加ではGTPase活性測定中にも相互作用がどんどん進み、活性は常に阻害されていっ

た。それぞれの脂質過酸化物を HPLC に接続した ECD で測定した。ECD の結果によると 16 時間の光酸化されたものは、モノヒドロペルオキシドであると考えられた(図には示していない)(寺尾, 私信)。24 時間のものは酸化が進み過ぎていることが確認された<sup>18)</sup>。このため、チューブリンの GTPase 活性が強く阻害されたと考えられる。しかし、生体中にそのように強く過酸化された脂質過酸化物が存在するとは考えにくい。

マススペクトロメトリの結果, Fig. 2. に示すように、未酸化脂質が分子量 782 として観察された。16 時間の光酸化により生成された脂質過酸化物では、814 の分子量が観察されたことにより、モノヒドロペルオキシドであると同定された。このことから、実験には 16 時間過酸化させた脂質過酸化物を使用することにした。

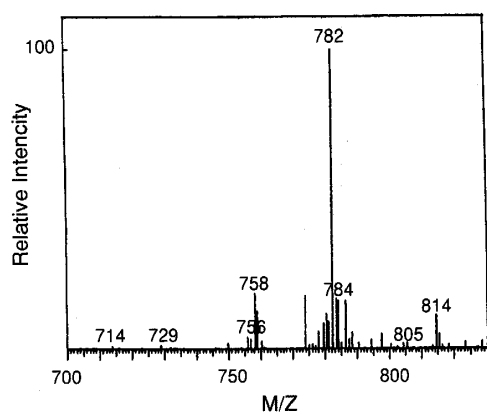


Fig. 2. Mass spectrum of lipid photooxidized for 16 hours.

## 2. 脂質過酸化物量の影響

Fig. 3. は、脂質過酸化物の添加量を 0.1, 0.5 および 1.0mg/ml と変化させたときの結果である。脂質過酸化物の添加濃度に依存して、チューブリンの GTPase 活性は低下することが確認された。少量の脂質過酸化物の添加によってもチューブリンの GTPase 活性が低下したことから、たとえ僅かな脂質過酸化物の存在でも生体内においては大きく影響を受けることが示唆された。

## 3. 水溶性還元剤量の濃度効果

Fig. 4. はグルタチオンの添加量を変えた時のチューブリンの GTPase 活性を示したものである。グルタチオンの添加量が増加すると脂質過酸化物により低下させられたチューブリンの GTPase 活性は、僅かではあるが回復した。グルタチオンは脂質

過酸化物により低下させられたチューブリンの GTPase 活性を回復させる効果を有しているものと考えられる。

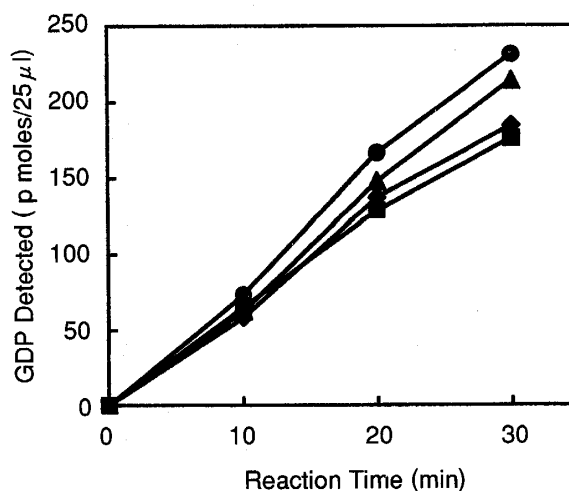


Fig. 3. Effect of lipid peroxides on tubulin GTPase activity.

- control: no lipid peroxides
- +1.0mg/ml lipid peroxides
- ◆ +0.5mg/ml lipid peroxides
- ▲ +0.1mg/ml lipid peroxides

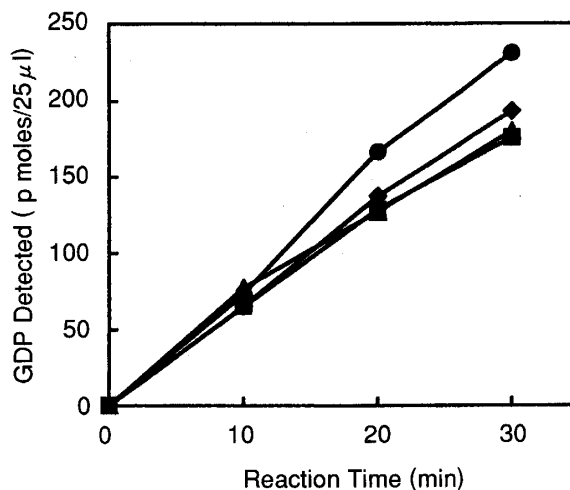


Fig. 4. Effect of lipid peroxides and glutathione on tubulin GTPase activity.

- control: no lipid peroxides
- +1.0mg/ml lipid peroxides
- ◆ +1.0mg/ml lipid peroxides + 0.1mM glutathione
- ▲ +1.0mg/ml lipid peroxides + 0.01mM glutathione

脂質過酸化物により劣化させられたチューブリンのGTPase活性の  
SH基還元剤（グルタチオン・システイン）による回復効果

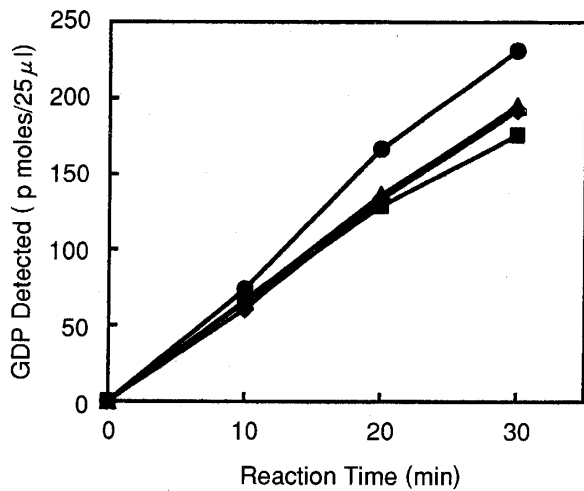


Fig. 5. Effect of lipid peroxides and cysteine on tubulin GTPase activity.

- control: no lipid peroxides
- +1.0mg/ml lipid peroxides
- ◆ +1.0mg/ml lipid peroxides+0.1mM cysteine
- ▲ +1.0mg/ml lipid peroxides+0.01mM cysteine

Fig. 5. はシステインの添加量を変えた時のチューブリンのGTPase活性を示したものである。システインの場合も、添加量が増加するに従って脂質過酸化物により低下したチューブリンのGTPase活性は回復させられた。すなわち、システインにも脂質過酸化物により低下したチューブリンのGTPase活性を回復させる効果が認められた。

生体内には、生体外から摂取された脂質過酸化物および生体内で生成された過酸化脂質のいずれもが存在していることが知られており、それらの脂質過酸化物が他の生体内物質と相互作用していることは十分推察される。脂質過酸化物が老化の要因の一つになっていることも古くから知られている。すなわち、還元系が存在しているにもかかわらず、脂質過酸化物が存在することは事実であり、生体に悪影響を及ぼしている。このことは、脂質過酸化物の影響を少なくすることが老化を抑制することにつながることを意味しており、そのためには、更に生体内還元系を多くすることが必要と考えられ、現在の高齢化社会に求められていることである。

本実験結果より、グルタチオンとシステインは、チューブリンのGTPase活性を維持する作用を持ち、細胞機能を恒常化させ、細胞の老化を抑制し、生体内で生じた脂質過酸化物の生体への影響を防御

する効果があることが確認された。よって、生体の老化抑制のための一方策として、水溶性還元剤を投与または摂取することが望ましいと考えられる。

## 要約

チューブリンは重合により微小管を形成し、様々な細胞機能を発現する。チューブリンは微小管を形成する時、GTPase活性を発現する。よって、このGTPase活性を測定することは細胞機能の指標となる。脂質過酸化物が細胞の劣化を導くことはよく知られている。細胞膜はリン脂質より構成されていることから、細胞膜中の脂質が酸化させられて、細胞の老化を導いている可能性が考えられる。そこで、脂質過酸化物により劣化させられたチューブリンのGTPase活性を回復させることを目的として、水溶性の抗酸化剤を用い、その回復効果を検討した。調製された脂質過酸化物は、HPLCに接続されたECDおよびマススペクトルの測定からモノヒドロペルオキシドであることが確認された。水溶性還元剤としては、グルタチオンとシステインを使用した。脂質過酸化物の添加量が増加するごとに、チューブリンのGTPase活性は大きく阻害された。また、極少量の脂質過酸化物の存在下でも、チューブリンのGTPase活性は低下した。このことは、生体内の極僅かな脂質過酸化物の存在でも、生体に影響を与えることを示唆するものである。いずれの水溶性還元剤の添加の場合も、脂質過酸化物により劣化させられたチューブリンのGTPase活性は僅かではあったが回復した。これらの事実はグルタチオンとシステインが、生体で生じた酸化生成物を還元することで細胞機能を復活させ、細胞の老化を抑制する効果のあることを示唆するものである。

## 謝辞

マススペクトロメトリーの御指導を戴きました本学部の升井洋至講師に厚くお礼申し上げます。

本研究の一部は、平成9年度および10年度文部省科学研究費補助金奨励研究A(No.09780019)によって行われたものである。

## 文献

1. 酒井彦一, 微小管の構造と働き, 培風館, 東京 (1983)
2. 宝谷紘一, 堀尾哲也, 遺伝, 40, 21-27(1986)
3. Purich, D.L. and Kristofferson, D., *Adv.*

- Protein Chem.*, **36**, 133-212(1984)
4. Horio, T. and Hotani, H., *Nature*, **321**, 605-606(1986)
  5. O'Brien, E.T., Voter, W.A. and Erickson, H.P., *Biochemistry*, **26**, 4148-4156 (1987)
  6. Carlier, M-F., *Cell Biophysics*, **12**, 105-117 (1988)
  7. 金沢和樹, 栄養食糧学会誌, **43**, 1-15(1990)
  8. 宮沢陽夫, 農化, **62**, 1491-1494(1988)
  9. 宮沢陽夫, 蛋白質・核酸・酵素, **36**, 413-419(1991)
  10. Kanazawa, K., Kanazawa, E. and Natake, M., *Lipids*, **20**, 412-419(1985)
  11. Kanazawa, K., Ashida, H., Miyamoto, S., Danno, G. and Natake, M., *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **34**, 363-373(1988)
  12. Chiba, H., Doi, H., Yoshikawa, M. and Sugimoto, E., *Agric. Biol. Chem.*, **40**, 1001-1010(1976)
  13. 川上美佐子, 金沢和樹, 土井裕司, 栄養食糧学会誌, **46**, 89-91(1990)
  14. 川上美佐子, 長谷川喜代三, 土井裕司, 武庫川女子大学紀要(自然科学), **42**, 17-23(1994)
  15. 川上美佐子, 平成5年度科学研究費補助金実績報告書(1994)
  16. 川上美佐子, 平成9年度科学研究費補助金実績報告書(1998)
  17. 川上美佐子, 平成10年度科学研究費補助金実績報告書(1999)
  18. Kawakami, M., Ward, L. and Doi, H., *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **75**, 635-641(1998)
  19. 仁木鋭雄, 蛋白質・核酸・酵素, **33**, 2976-2978(1988)
  20. Anderson, M.E., in *Advances in Pharmacology*, Academic Press, New York, Vol. **38**, pp.65-78(1997)
  21. Kuriyama, R. and Sakai, H., *J. Biochem.*, **76**, 651-654(1974)
  22. Mellon, M.G. and Rebbun, L.I., *J. Cell Biol.*, **70**, 226-238(1976)
  23. Weisenberg, R.C., Borisy, G.G. and Taylor, E.W., *Biochemistry*, **7**, 4466-4479 (1968)
  24. Weisenberg, R.C. and Timasheff, S.N., *Biochemistry*, **9**, 4410-4416(1970)
  25. Lee, J.C., Frigon, R.P. and Timasheff, S.N., *J. Biol. Chem.*, **248**, 7253-7262 (1973)
  26. Na, G.C. and Timasheff, S.N., *J. Mol. Biol.*, **151**, 165-178(1981)
  27. Andreu, J.M. and Timasheff, S.N., *Biochemistry*, **21**, 6465-6478(1982)
  28. 寺尾純二, 過酸化脂質実験法(増補版), (金田尚志, 植田信夫編), 医歯薬出版, 東京, pp.229-233(1987)
  29. 寺尾純二, 化学と生物, **30**, 666-670(1992)
  30. Terao, J., Shibata, S. and Matsushita, S., *Anal. Biochem.*, **169**, 415-423(1988)
  31. Asakawa, T. and Matsushita, S., *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **55**, 619-620(1978)
  32. Gaskin, F., Cantor, C.R. and Shelanski, M.L., *J. Mol. Biol.*, **89**, 737-758(1974)
  33. Gaskin, F., in *Methods in Enzymology*, ed. by Frederickson, D.W. and Cunningham, L.W., Academic Press, New York, Vol. **85**, pp.433-439(1982)
  34. Doi, H., Imanishi, T., Iwami, K., and Ibuki, F., *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 245-246 (1991)
  35. 土井裕司, 生化学, **59**, 284-289(1987)
  36. Seckler, R., Wu, G-M. and Timasheff, S.N., *J. Biol. Chem.*, **265**, 7655-7661 (1990)
  37. 生化学データブック, 東京化学同人, 東京, p.1061(1979)