

チューブリンの GTPase 活性に及ぼす リン脂質過酸化物の影響†

川上 美佐子, 長谷川 喜代三, 土井 裕 司

(武庫川女子大学生生活環境学部食物栄養学科)

Effect of Phospholipid Peroxides on GTPase Activity of Tubulin

Misako Kawakami, Kiyozo Hasegawa and Hiroshi Doi

Department of Food Science and Nutrition,

School of Human Life and Environmental Science,

Mukogawa Women's University, Nishinomiya, Hyogo 663, Japan

Tubulin presences universally in eucaryotic cells, and forms microtubules by self-assembly. Microtubules participate various cell functions. As cell membranes are composed of phospholipid, lipid peroxides will be assumed not only to be taken in the body from foodstuffs but also to be produced in the biological system. Based on the roles of tubulin in cell, it is possible that lipid peroxides make cell to deteriorate through the interaction with tubulin. The mechanism of cell deterioration has not yet been made clear. We have taken notice of GTPase activity of tubulin in order to make clear the interaction between lipid peroxides and tubulin. There are two steps of forming oligomer and forming microtubules. The relationship between the assembly and GTPase activity is not enough made clear. First, the effect of magnesium ion on GTPase activity of tubulin is made clear in this paper. In the presence of only 0.5mM magnesium ion, the appearance of GTPase activity was confirmed. It means that GTPase activity reveals in the step of oligomer formation. This activity, however, was very small. In order to make clear the effect of lipid peroxides, GTPase activity was examined at 10mM magnesium ion of the optimum concentration. Lipid peroxides were prepared from lecithin by photooxidation at 4°C. Lipid peroxides inhibited GTPase activity. This result suggests that lipid peroxides give some effect on cell functions.

結 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、細胞の形態維持、細胞運動、神経伝達など様々な細胞機能に関与している¹⁾²⁾³⁾。

一方、食品から摂取された脂質過酸化物は酵素などのタンパク質に作用し、肝細胞の機能を低下させることが知られている⁴⁾。生体内で生成される脂質過酸化物の体内細胞への影響はまだ十分には解明されていないが、細胞を劣化させると考えられる。

細胞膜がリン脂質より構成されていることから、過酸化されたリン脂質がチューブリンと相互作用し、細胞機能に影響を及ぼしている可能性がある。著者らは現在までに、チューブリンへの脂質過酸化物の影響を検討してきた⁵⁾。

† 本研究の一部は1994年日本農芸化学会大会 (東京: 講演番号3Pa6)にて発表された。

チューブリンは α , β の2つのサブユニットから成るタンパク質で, GTP*を結合している。チューブリンが微小管を形成するとき, チューブリンに結合しているGTPはGDP**に加水分解される。チューブリンの微小管への重合は, オリゴマーの形成を経て微小管を形成する2段階が考えられている。チューブリンが微小管を形成するときのGTPase活性はオリゴマー形成時に発現されるのか, それとも微小管形成時に発現されるのか, についての議論がある⁶⁾⁷⁾⁸⁾⁹⁾。

チューブリンは微小管を形成してはじめて, 細胞機能に関与することから, 細胞機能の発現と微小管形成との関係は深い。従って, 微小管形成を測定することは細胞機能を検討するうえで重要な意味をもつ。

微小管形成を測定する方法としては多量のチューブリンを必要とする濁度法¹⁰⁾や粘度法¹¹⁾が知られている。しかし, チューブリンは牛脳から僅か数十ミリグラムしか精製出来ないため, 少量のチューブリンで多くの重合度測定実験を行う方法が求められている。チューブリンのGTPase活性発現機構が明らかとなれば, その測定方法により, 微量で短時間に多数の試料が処理出来ることから, GTPase活性で重合度を検討するのが適している。

チューブリンの重合には, マグネシウムイオンが不可欠であり, 低濃度のマグネシウムイオン(0.5mM)ではオリゴマーまでしか形成されない¹²⁾。そこで先ず, 低濃度マグネシウムイオン共存下でのGTPase活性発現を, HPLCを用い, GDPの生成量を測定することによって検討した。その結果, 重合の全段階でのGTPase活性発現が明らかとなった。次に, 微小管形成, 即ち, 細胞機能発現への脂質過酸化物の影響の指標として, 最適マグネシウムイオン濃度(10mM)において, チューブリンのGTPase活性に及ぼす脂質過酸化物の影響を検討した。

材料と方法

1. 材 料

1-1. チューブリン

チューブリンは牛脳より調製した。牛脳は阪神食肉衛生検査所より入手した。チューブリンは硫酸分別とイオン交換を組み合わせたLeeらの方法により調製

された¹³⁾¹⁴⁾¹⁵⁾。全ての行程を4℃にて速やかに行った。調製されたチューブリンは使用時まで, 1M Sucrose, 0.1mM GTP及び0.5mM MgCl₂を含む10mM Phosphate Buffer (pH7.0)中で, -80℃にて保存した。使用時には, Sucroseの除去並びに使用Bufferへの平衡化のために, 使用Bufferで平衡化されたSephadex G-25(m)によるパッチゲルろ過(1.0×7cm column)を行った後, 15,000rpm, 4℃で30分間遠心した¹⁶⁾。その後, 更に, 使用Bufferで平衡化されたSephadex G-25(m)によるゲルろ過(1.0×15cm column)を行ったものをチューブリンとして用いた。チューブリン濃度はE₂₇₅=1.09ml mg⁻¹ cm⁻¹として求めた¹⁷⁾。

1-2. 脂質過酸化物

細胞膜がリン脂質であることを考慮して, 脂質としてレシチンを用いた。レシチンは日清製油から提供されたリポイドS100であった。レシチンに, 光増感剤としてメチレンブルーの終濃度が0.004%となるように加え, 10mg/mlにメタノールで溶解した。これを低温室にて10時間攪拌を行いながら, 40cmの高さから60Wのレフランプで照射し, 過酸化させた。その後, ディスポシルSL(ナカライテスク製)にてメチレンブルーを除去, 濃縮乾固した。調製されたものを脂質過酸化物として, 使用Bufferで1.0mg/mlになるように溶解して用いた。一方, メチレンブルーを加えず, 照射していないものを未酸化脂質とした。

2. 方 法

2-1. 脂質過酸化物の確認及び純度検定

得られた脂質過酸化物の確認の為に, 以下の2つの実験を行った。

先ず, 1.0mg/ml脂質過酸化物はメタノールで50倍希釈し, 紫外吸収スペクトルを測定した。測定には, 日立分光光度計U2000を使用した。次に, TLCを行った。1.0mg/ml未酸化脂質, 1.0mg/ml脂質過酸化物をシリカゲル60プレート(Merck社 No. Art 5721)にスポットし, 展開溶媒(CHCl₃:CH₃OH:H₂O=65:24:1, V/V/V)で展開した。展開終了後溶媒を飛散させ, ヨウ素法と炭化法で検出を行った。

純度検定は, 寺尾らの方法によるODSカラム(コスモシルパックDカラム, 4.6mm I.D.×150mm)を用いたHPLCで行った¹⁸⁾¹⁹⁾。溶出溶媒としてCH₃OH:H₂O=95:5(V/V)を用い, 波長233nmでの検出を行った。

Abbreviation;

*:Guanosine-5'-triphosphate

** :Guanosine-5'-diphosphate

***:Electrochemical Detection

HPLC での ECD*** の検出は、コスモシール ODS カラム (4.6mm I.D. × 150mm) に通し、移動相溶媒として 30mM LiCH₃COO を含む CH₃OH : H₂O : CH₃COOH = 76 : 24 : 0.1 (V/V/V) を用いた。この溶媒には常にヘリウムガスを流しておいた。ECD 検出時、Apply Volt は -300mV であった²⁰⁾。ECD 検出には、医理化機器製アンペロメーターΣ 985 を使用した。ECD 検出は、ヒドロペルオキシドやヒドロキシル誘導体が、電極上で電気化学的に還元されて電極電流を発生することに基づいている。この方法ではヒドロペルオキシ基そのものを直接検出するという点で優れている。

また、POV も測定した²¹⁾。

2-2. チューブリンの GTPase 活性の測定

チューブリンのみの微小管再構成は、高濃度のグリセリン共存下で行われるので、全てのアッセイ系でグリセリンを共存させた。アッセイ系は、チューブリン濃度 1.0mg/ml で 0.1mM GTP, 3.4M Glycerol を含む 10mM Phosphate Buffer (pH7.0) 中で行った。反応液は基本 Buffer 中にチューブリンと、設定濃度のマグネシウムイオン (MgCl₂ を使用) および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、全量を 500μl として行った。反応の開始はアッセイ系を 0℃ から 37℃ に加温することにより行い、15分、30分後に 100μl の 3N HClO₄ で反応を停止させた。その後、遠心により除タンパクを行い 3N KOH で中和後、1/7 量の 1M K₂HPO₄ - 0.5M CH₃COOH を加え、-20℃ に保存した。GTPase 活性測定時にこれを解凍し、形成された沈殿を遠心で除去後、HPLC 用サンプルとした。コントロールはチューブリンを加える前に 3N HClO₄ を加えておいた。30分 で反応を停止したのは、37℃、15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¹²⁾。アッセイ系への添加順序は、MgCl₂、基本 Buffer、脂質過酸化物、チューブリンの順であった。

マグネシウム濃度依存性の検討を行う時は、まず、終濃度 0.5mM あるいは 10mM MgCl₂ を加えた後、基本 Buffer を加え、チューブリンを添加したものをサンプルとした。脂質過酸化物の影響を測定する時は、脂質過酸化物を加えた後、チューブリンを添加し、実験を行った。

2-3. HPLC 条件

HPLC システムは東ソー製であった。紫外可視検

出器は UV-8020、ポンプはデュアルポンプ CCPS、インテグレーターとしてはクロマトコーダ 21 を用いた。カラムはワイエムシイ製 ODS カラム (4.6mm I.D. × 250mm) を用いた。移動相は、0.2M K₂HPO₄, 0.1M CH₃COOH, 4mM TBAP (Tetrabutyl Ammonium dihydrogenphosphate), pH6.5, を使用時に超純水にて 3/4 倍に希釈し、フィルターでろ過した後、脱気して使用した。流速は 1.0ml/min で行い、検出波長は 253nm であった。

2-4. GTPase 活性計算

GTPase 活性は、生成した GDP を HPLC により定量することによって測定した。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 スタンダード溶液を調製した²²⁾。GTPase 比活性の算出は、HPLC で得られた反応前と反応後の GDP の面積を基に、絶対量既知の GTP の面積と比較することによって行った。計算のため NEC 製パーソナルコンピュータ PC9801UM を用いた。

結果と考察

研究対象妥当性への考察

社会の高齢化にともない、細胞の老化や加齢の影響に興味を持たれ始めてきた。我々は今までに、加齢に伴う脂質過酸化物の増加や、老化脳での細胞の形態変化に注目してきた。本研究は、チューブリンの細胞内での機能および脂質過酸化物の生体中での挙動に着目して、両者の相互作用を検討したものである。

食品中で生成された過酸化物を体内に摂取すると、毒性が現れることはよく知られており⁴⁾、また、生体中にも脂質が存在していることから、その過酸化物が生体に何らかの作用を及ぼしていることが考えられる。生体での過酸化反応を考える時は、生体膜がリン脂質であることにまず注目すべきである。事実、生体試料から検出されるヒドロペルオキシドは、リン脂質ヒドロペルオキシドである²³⁾。ヒトでは動脈硬化症患者、肝炎や糖尿病患者でホスファチジルコリンヒドロペルオキシドの濃度が高い²⁴⁾。そこで本研究では、リン脂質過酸化物を研究対象とし、リン脂質としては大豆レシチンを用いた。

赤血球膜の研究では、膜の内側から脂質の過酸化が進行するらしいし、加齢により脳や肝臓での過酸化されたリン脂質の蓄積が顕著である²⁴⁾。膜の内側で生成された脂質過酸化物が細胞質タンパク質と相互作用

を起こす事は十分ありえる。チューブリンは細胞質中
にあって、機能的に重要なタンパク質であり、脳中に
最も多いタンパク質である。

これらの事実は、研究対象としてのレシチンと
チューブリンの妥当性を証明している。我々は、
チューブリンと脂質過酸化物の相互作用を微小管形
成に基づく濁度法で検討してきた⁹⁾。今回、より微量
でしかも短時間で検討できる方法として GTPase 活性
測定を検討したので、それが有効であることを結果と
してここに示すものである。

脂質過酸化物の確認と純度検定

Fig. 1 は脂質過酸化物の TLC の結果を示したも
のである。未酸化脂質はホスファチジルコリンのワンス
ポットが検出された。脂質過酸化物は、ホスファチジ
ルコリンのスポットの下に、光酸化されたことより生
じた二次生成物のスポットが見られた。

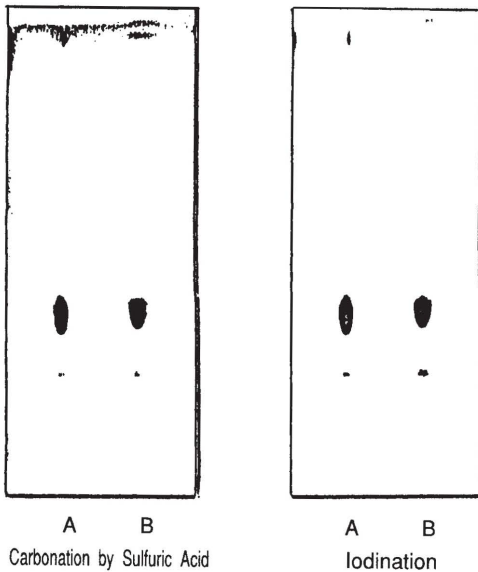


Fig. 1. Thin Layer Chromatography of Lecithin and
Lecithin Peroxides on a Silica Gel Plate.

A : Non-treatment
B : Photooxidization

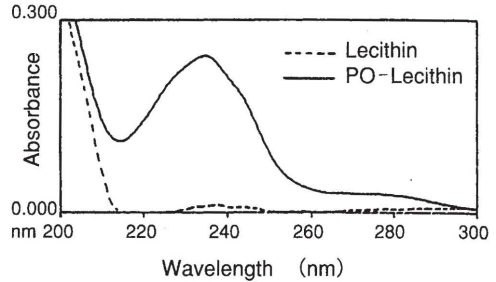


Fig. 2. Ultraviolet Absorption Spectra of Lecithin
and Lecithin Peroxides.

Absorbance was measured at 20 μ g/ml in
methanol.

また、脂質の光酸化による変化を紫外吸収スペクト
ル的に検討した結果を Fig. 2 に示している。この図に
示されているように光酸化によって 233nm での顕著
な吸収増大が観察され、過酸化が確認された。
233nm での吸収の増加は、主としてヒドロペルオキ
シドの生成によるものと考えられる²⁵⁾。

Fig. 3 は、使用した試料脂質および脂質過酸化物を
HPLC により分析したときの結果を表している。未
酸化レシチンでは 9 分のところにホスファチジルコ
リンのピークが見られ、リン脂質としての純度が高い
ことが明らかとなった。他方、脂質過酸化物では分析
開始 2 分のところにヒドロペルオキシドと考えられる
ピークが出現し、未酸化脂質にみられた 9 分のピーク
が減少した。また、光酸化レシチンの ECD 検出にお
いても 2 分のところにピークが認められた (Fig. 4)。
ECD の特性から考慮して、Fig. 3 での 2 分のピーク
はヒドロペルオキシドであったことを意味している。

TLC, UV および 2 種類の HPLC の結果から、レ
シチンを光酸化させると大部分がヒドロペルオキシド
となっていたことが確認された。

また、POV 測定では、コントロールとして用いた
レシチンには反応が認められず、脂質過酸化物では値
が 668meq/kg であった。

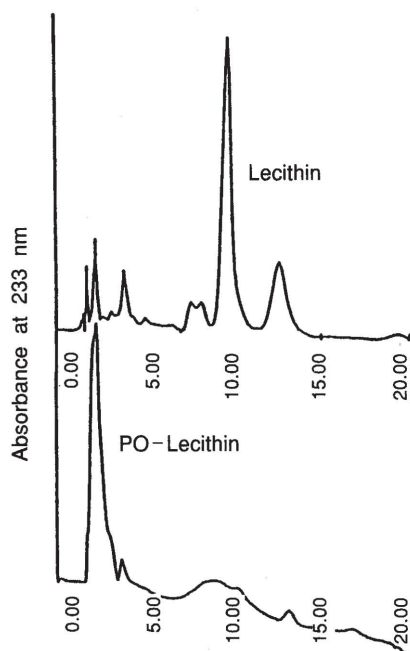


Fig. 3. HPLC Analyses of Lecithin and Lecithin Peroxides on an ODS Column Eluted with Methanol : Water = 95 : 5 (V/V) Containing 30mM Lithium Acetate.

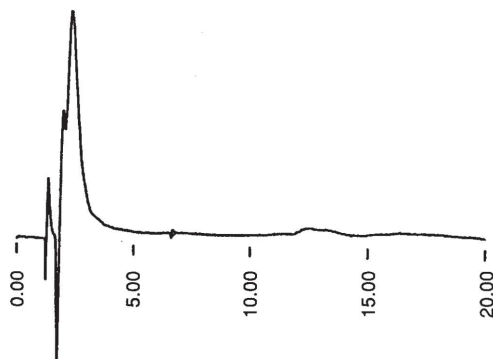


Fig. 4. HPLC Analysis of Lecithin Peroxides on an ODS Column Eluted with the Buffer Described in Fig. 3.

Detection was carried out by an electrochemical detector, Irika model Σ985, at -300mV .

マグネシウム濃度依存性

Fig. 5は 0.5mM MgCl_2 存在下でのチューブリンのGTPase活性を示している。反応時間の経過とともにGDPの生成量の増加が観察され、明らかにGTPase活性が発現されていることが確認された。この事実は、オリゴマー形成段階ですでにGTPase活性が発現されていたことを意味している。よって、Carrierら⁸⁾の報告である「GTPase活性は微小管形成時に発現される」ではなく、Doiら⁹⁾の「オリゴマー形成時にGTPase活性は発現される」を支持するものである。

本研究はまた、チューブリンとある物質との相互作用をGTPase活性測定で検討することが可能であることを支持する最初の報告である。

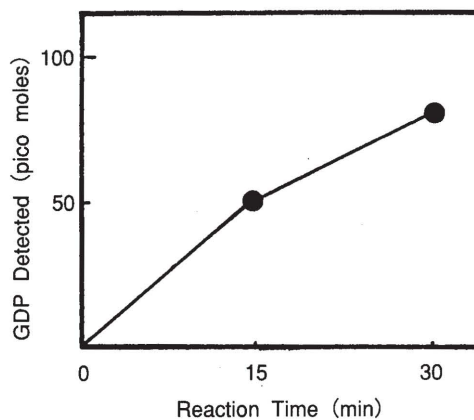


Fig. 5. GTPase Activity of Tubulin in the Presence of 0.5mM MgCl_2 .

The reaction was performed in 10mM phosphate buffer, $\text{pH}7.0$, containing 0.5mM MgCl_2 , 0.1mM GTP and 3.4M glycerol at 37°C . Tubulin concentration was 1.0mg/ml . GDP produced was determined using an HPLC system.

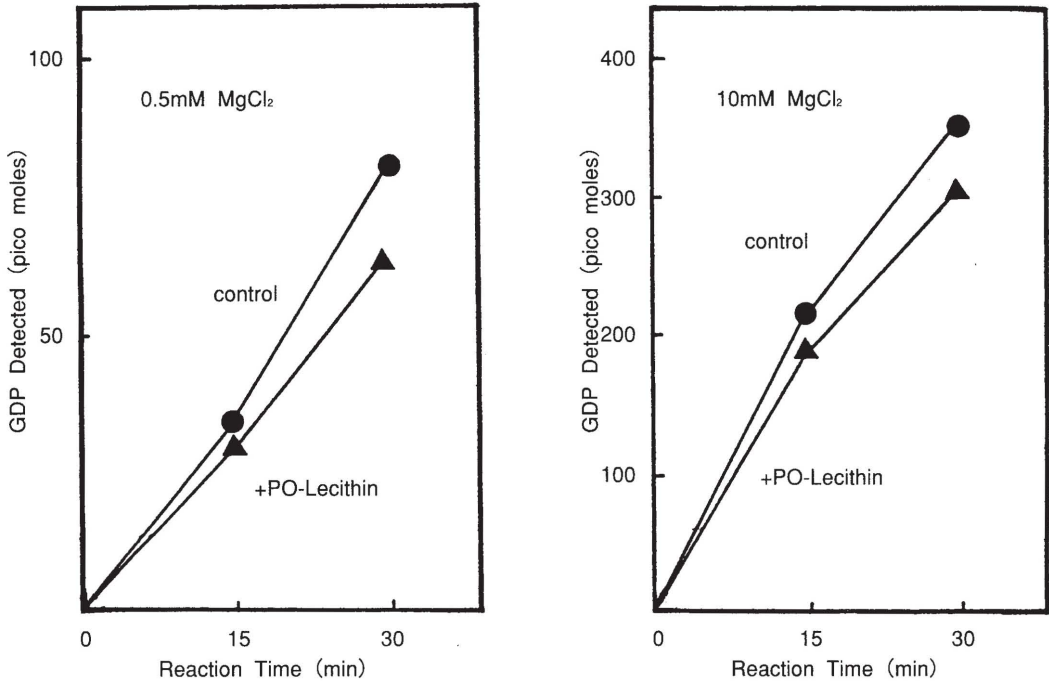


Fig. 6. Effects of PO-Lecithin on GTPase Activity of Tubulin in the Presence of 0.5mM or 10mM MgCl₂.

The reaction was performed as described in Fig. 5.

マグネシウム濃度依存性と脂質過酸化物の影響

Fig. 6は0.5mMまたは10mMマグネシウムイオン共存下で、脂質過酸化物が50 μ l存在しているときのチューブリンのGTPase活性を示している。

少量の脂質過酸化物の添加は、GTPase活性を阻害することも明らかになった。微小管形成を指標として、脂質過酸化物の影響を検討したとき、脂質過酸化物は明らかに微小管形成を阻害した⁵⁾。ここでの結果は、脂質過酸化物が、チューブリンのオリゴマー形成段階で微小管形成を阻害していることを示すものである。

チューブリンに作用する多くの薬剤の存在が知られている²⁶⁾。それらの薬剤は、チューブリンに作用することによって微小管形成に影響しているものと考えられる。例えば、抗真菌剤として多くの薬剤が知られているが²⁷⁾、それらは真菌の微小管形成を阻害することによって真菌の生育を抑制して、薬効を発揮していると考えられる。

脂質過酸化物がチューブリンのGTPase活性を阻害

したことから、生体内で生じた脂質過酸化物もチューブリンに作用して微小管形成に影響することが明らかとなった。このことは、脂質過酸化物は細胞の劣化に幾らかの影響を与えることを示唆するものである。

以上の結果と、脂質過酸化物が加齢とともに増加していくことを考えると、細胞の老化と、細胞骨格系の劣化との相関を考慮しなければならない。今後、社会の高齢化にともなった研究を遂行することを念頭において、細胞骨格系と脂質過酸化物との相互作用についての詳細なメカニズムを明らかにするとともに、細胞の老化と脂質過酸化物との相関を検討していく予定である。

謝 辞

本研究の一部は、平成5年度文部省科学研究費補助金奨励研究A(研究代表者 川上美佐子, 課題番号05858006)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 (1983), 培風館 (東京)
- 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) 金沢和樹, 栄食誌, **43**, 1-15(1990)
- 5) 川上美佐子, 金沢和樹, 土井裕司, 栄食誌, **46**, 89-91(1990)
- 6) Horio, T. and Hotani, H., *Nature*, **321**, 605-606(1986)
- 7) O'Brien, E. T., Voter, W. A. and Erickson, H. P., *Biochemistry*, **26**, 4148-4156(1987)
- 8) Carlier, M-F., *Cell Biophysics*, **12**, 105-117(1988)
- 9) Doi, H., Imanishi, T., Iwami, K., and Ibuki, F., *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 245-246(1991)
- 10) Gaskin, F., Cantor, C. R. and Shelanski, M. L., *J. Mol. Biol.*, **89**, 737-758(1974)
- 11) Gaskin, F., in *Methods in Enzymology*, ed. by Frederiksen, D. W. and Cunningham, L. W., Academic Press, New York, vol. **85**, pp.433-439(1982)
- 12) 土井裕司, 生化学, **59**, 284-289(1987)
- 13) Weisenberg, R. C., Borisy, G. and Taylor, E., *Biochemistry*, **7**, 4466-4479(1968)
- 14) Weisenberg, R. C. and Timasheff, S. N., *Biochemistry*, **9**, 4110-4116(1970)
- 15) Lee, J. C., Frigon, R. P. and Timasheff, S. N., *J. Biol. Chem.*, **248**, 7253-7262(1973)
- 16) Na, G. C. and Timasheff, S. N., *Biochemistry*, **19**, 1347-1354(1980)
- 17) Andreu, J. M. and Timasheff, S. N., *Biochemistry*, **21**, 6465-6472(1982)
- 18) 寺尾純二, 過酸化脂質実験法(増補版)(金田尚志, 植田伸夫編), pp.229-233(1987), 医歯薬出版 (東京)
- 19) 寺尾純二, 化学と生物, **30**, 666-670(1992)
- 20) Terao, J., Shibata, S. S. and Matsushita, S., *Anal. Biochem.*, **169**, 415-423(1988)
- 21) Asakawa, T. and Matsushita, S., *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, **55**, 619-620(1978)
- 22) Bock, R. M., Ling, N-S., Morell, S. A. and Lipton, S. H., *Arch. Biochem. Biophys.*, **62**, 253-264(1956)
- 23) 宮沢陽夫, 農化, **62**, 1491-1494(1988)
- 24) 宮沢陽夫, 蛋白質・核酸・酵素, **36**, 413-419(1991)
- 25) Little, C. and O'Brien, P. J., *Biochem. J.*, **106**, 419-423(1968)
- 26) 佐藤良博, ファルマシア, **21**, 662-668(1985)
- 27) 名取信策, 飯田知子, 矢原一郎, 蛋白質・核酸・酵素, **28**, 789-800(1983)