

報文

## 日本産大麦分級粉からの微小管形成促進物質の精製

川口真規子<sup>1\*</sup>、関口綾子<sup>2</sup>、山中裕佳子<sup>2</sup>、土井裕司<sup>2</sup><sup>1</sup>兵庫栄養調理製菓専門学校栄養士科 (662-0883 兵庫県西宮市北昭和町 9-32)<sup>2</sup>武庫川女子大学生生活環境学部食物栄養学科 (662-8558 兵庫県西宮市池開町 6-46)

\*著者連絡先 E-mail: kawaguchi@hyoei.ac.jp

(受取日: 2007年2月8日、受理日: 2007年3月8日)

要旨: 大麦分級粉を材料として、微小管形成促進物質の探索と精製法の検討を行った。ステップワイズ法による DEAE-Sephadex A-50 イオン交換クロマトグラフィー、次いで Bio-Gel P-4 ゲルろ過クロマトグラフィーにより分画し、得られた画分の中で比較的 low molecular weight の画分 120-1, 120-2 を用いて牛脳チューブリン(Tb)の GTPase 活性への影響を検討した。その結果、画分 120-1 を添加することにより、Tb の GTPase 活性はコントロールの 5.1 倍となり、このことから画分 120-1 が強力な賦活活性を有する画分であることが明らかになった。得られた GTPase 活性賦活活性画分の分子量は 1340.8 で、N 末端のアミノ酸配列は A-D-G-E-V-G-V-G-P であった。

キーワード: 大麦、分級粉、チューブリン、微小管、GTPase 活性

## 1. はじめに

現在、日本では死亡率の低下により平均寿命が延びる一方で、出生率の低下が著しいことにより、人口全体に占める高齢者の割合が急速に高くなっている。この割合は 2005 年には 20% を超え [1]、2010 年には世界でもっとも高い水準である 22% を超えると予想されている。急激な高齢化に伴ってさまざまな問題が生じている。その一つが老人性認知症患者の増大である。老人性認知症には脳疾患性型とアルツハイマー型があるが、アルツハイマー型認知症では微小管系の劣化との関連性が示唆されており、脳細胞の萎縮や細胞数の減少も観察されている [2]。微小管とは、チューブリン(Tb)の重合によって形成される細胞骨格の形成素材である。細胞内で形成された微小管は、細胞分裂や細胞内輸送、細胞の形態維持など多様な機能を果たしている [3]。筆者らは、Tb の重合につい

て検討を重ねてきており [4, 5]、そうした研究の遂行過程において、微小管形成を促進する物質を食品中から摂取することにより老化が抑制できるのではないかと考えた。

そこで、紀元前約 5000 年前から歴史的な食料資源として栽培され、安全性が証明されており、現在でも安価に入手できる大麦に注目した。大麦は外皮が固く除去しにくい。また、以前の精麦法では味、消化率も劣り、大麦中のタンパク質やでんぷんは湿熱変性を引き起こして大麦の有効な成分を失わせてしまっていた。しかし近年、分級製粉法が開発され、タンパク質を未変性のまま製粉することが可能になったことから、大麦分級粉中の活性成分の検索が可能となった。前述のような利点に加え、さらに三次機能が見出されればアルツハイマー型認知症などの諸問題に対応した大麦由来食品の開発が期待できる。本研究では、大麦分級粉から

Tb の重合を促進する物質、すなわち微小管形成促進物質の探索と、その精製法の確立を目的とした。さらに、得られた賦活活性物質の組成・純度等についても検討を行った。

## 2. 材料及び試薬

### 2.1. チューブリン (Tb)

牛脳より Tb を Lee らの硫酸分画とイオン交換法とを組み合わせた方法[6, 7, 8]により調製した。牛脳は阪本食品興業から恵与された。牛を屠殺後、脳を氷冷して輸送し、1時間以内に Tb 精製のための処理を行った。

### 2.2. 大麦分級粉

大麦は、大阪府立大学大学院森田尚文教授より西日本産甘本二条大麦を恵与された。イトメン株式会社に大麦の製粉化を委託した。大麦分級粉は、ドラフトバーレー分級製粉法で製粉化された外層部の分級粉、95-80%分級粉、を使用した。

### 2.3. 試薬

Guanosine-5'-triphosphate, disodium salt は Sigma 社の Type II であった。Cell SepT1 は Membrane Filtration Products 社製、DEAE-Sephadex A-50 gel は Amersham Pharmacia Biotech 社製、Bio-Gel P-4 (medium) gel は Bio Rad 社製であった。その他、使用された試薬はすべて特級以上の純度のものであった。

## 3. 方法

### 3.1. 大麦分級粉からの GTPase 活性賦活物質の精製

大麦分級粉の 30 倍量の冷却アセトンを加え 1 分間攪拌後アセトン処理し、アセトンパウダーを得た。アセトンパウダー 16 g にイオン交換水 100 ml を加え、室温にて 1 時間攪拌・抽

出した。さらに透析膜 Cellu Sep T1 (Nominal MW 3,500) を用い、再精製水約 800 ml を加えて 4°C で 16 時間透析を行った。得られた透析外液をステップワイズ法による DEAE-Sephadex A-50 イオン交換クロマトグラフィーにより分画した。溶出液として 5-120 mM Triethylamine-CO<sub>2</sub> Buffer (pH 8.5) を用いた。得られた画分の中から賦活活性が認められた画分についてはさらに Bio-Gel P-4 ゲルろ過クロマトグラフィー (Φ2.5 cm × 100 cm) に供し、分画をすすめた。このとき溶出液は 0.1% 酢酸を使用した。精製フローを Figure 1 に示した。

### 3.2. GTPase 活性測定

各精製段階における画分について、牛脳から調製した Tb に対する GTPase 活性への賦活活性を測定した。GTPase 活性は、Seckler らの方法を基にして測定された[9]。すなわち、10 mM MgCl<sub>2</sub>、3.4 M グリセロールおよび 0.1 mM GTP を含む 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) 反応液 0.5 ml 中に Tb 濃度が 1.0 mg/ml、各画分を 0.01 mg/ml になるようマイクロチューブに分注した (total volume 0.5 ml)。画分を加えないものをコントロールとした。反応は試料温度を 37°C に加温することにより開始とした。反応開始より 0, 15, 30 分後に 0.10 ml の HClO<sub>4</sub> を加えて反応を止めた。氷中で 10 分放置後、遠心分離 (2°C、7,000 rpm、10 min) を行った。上清を 480 μl 取り、3 M KOH、1 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-0.5 M CH<sub>3</sub>COOH の順にそれぞれ 80 μl ずつ加えて中和させ、さらに遠心分離 (2°C、7,000 rpm、10 min) を行った[10, 11]。上清をサンプルとして HPLC に供した。カラムは ODS (2.0 mm × 250 mm) を用い、溶出液は 0.1 M CH<sub>3</sub>COOH と 4 mM tetrabutylammonium phosphate を含む 0.2 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 6.5) であった。そのときの流速は 0.2 ml/min

であった。253 nm における吸収を測定することにより GTP および GDP を検出した。微小管形成は GTPase 活性に連動しているため [12]、反応時間に伴う GTP、GDP の増減を算出し、微小管形成の指標とした。

### 3.3. 活性画分の同定

#### i) 精製標品の純度検定

ゲルろ過クロマトグラフィーで分画された最終精製標品(画分 120-1)の純度について HPLC を用いて検定した。ODS カラム (4.6

mm×250 mm) を用い、10% アセトニトリルを溶出液として使用した。流速は 1.0 ml/min であった。220 nm における吸収を測定した。

#### ii) アミノ酸配列の決定

Edman 法によりアミノ酸シーケンサー (Hewlett Packard 社) にてアミノ酸配列の決定を試みた。

#### iii) 分子量の測定

Tb GTPase 賦活活性物質の分子量の決定を TOF-MS (MALDI TOF Mass Spectrometer AXIMA-CFR、島津製作所) により行った。

#### 大麦分級粉

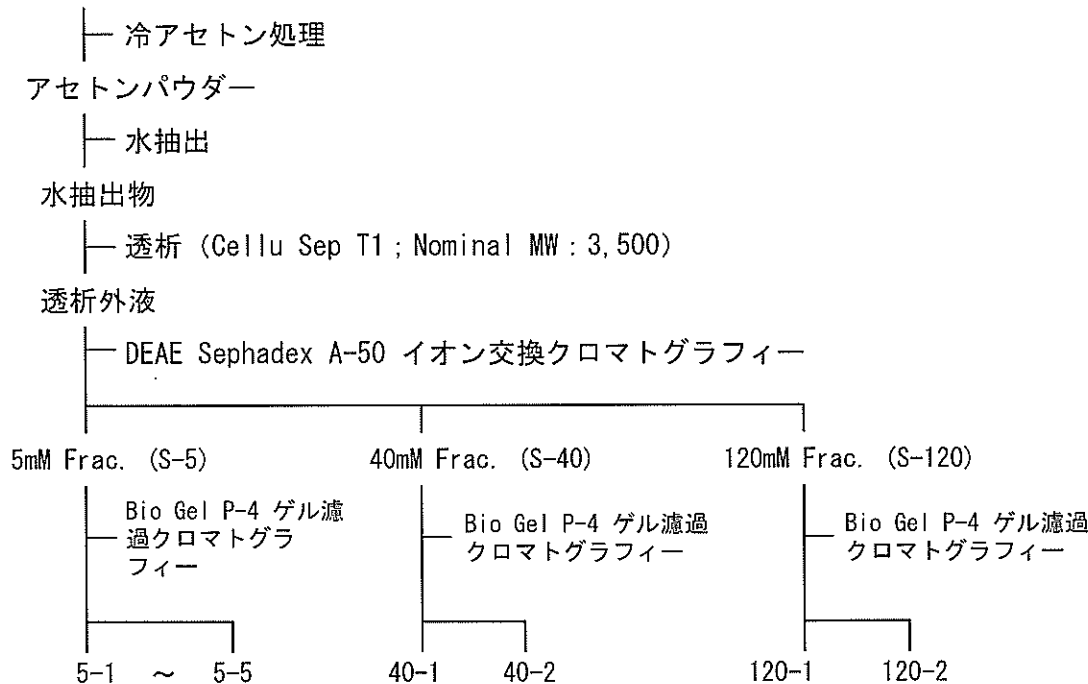


Figure 1. Purification of tubulin GTPase activating peptides

## 4. 結果

### 4.1. 大麦分級粉からの GTPase 活性賦活物質の精製および GTPase 活性測定

DEAE-Sephadex A-50 イオン交換クロマトグラフィーで得られた 3 つの画分を S-5、S-40、S-120 とした。画分 S-120 には GTPase 活性賦活活性が認められたので、その画分を Bio-Gel P-4 ゲルろ過クロマトグラフィーに供し、更なる精製を行った。画分 S-120 からは

2 つのピーク (画分 120-1, 120-2) が得られた (Figure 2)。これらの標品について Tb GTPase 賦活活性の測定を行ったところ、いずれの画分にも賦活活性が認められた。各画分の比活性を Figure 3 に示した。さらに、これらの画分を HPLC に供し、220 nm における吸収を測定する検出法で検討した結果、単一のピークが得られたので非常に精製度の高い標品であることが確認された。

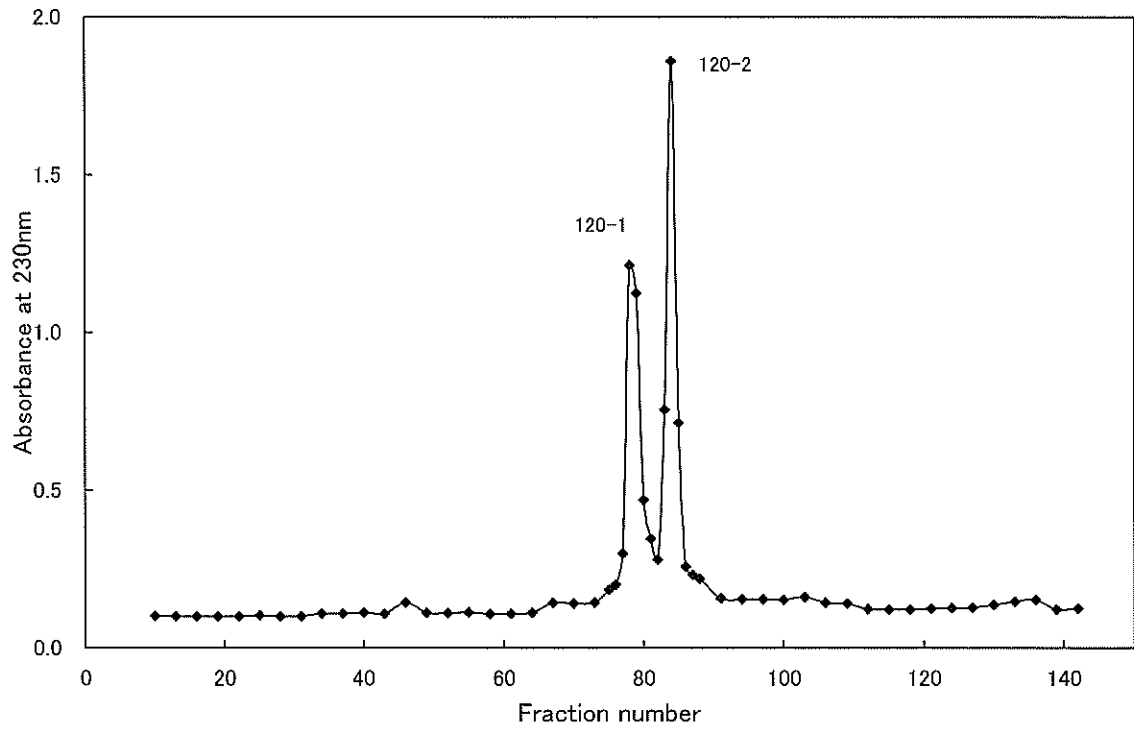


Figure 2. Bio-Gel P-4 Chromatography of 120mM Eluate from DEAE-Sephadex A-50 Chromatography

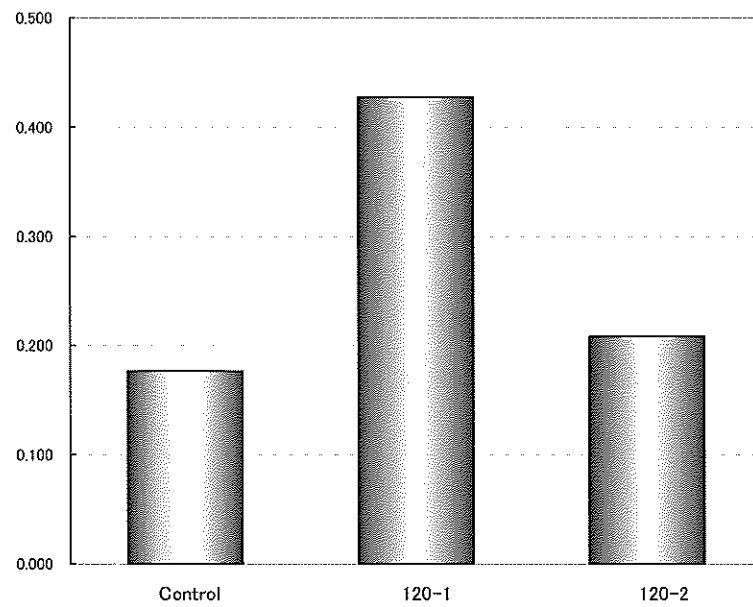


Figure 3. The Effect of Microtubule Assembly Promoting Peptides from Barley Flour on the Tubulin GTPase Specific Activity

#### 4. 2. 賦活活性画分の同定

TOF-MS による分子量測定の結果、画分 120-1 については分子量 1340.8 辺りでピークが現れた。画分 120-2 についても分子量測定を試みたが、1000 前後の分子量であることが確認されたのみで確定には至らなかった。

高い賦活活性を有した画分 120-1 のアミノ酸配列をアミノ酸シークエンサーによって決定することを試みた。その結果、N 末端から 9 番目までのアミノ酸配列は A-D-G-E-V-G-V-G-P であった。

#### 5. 考察

チューブリン (Tb) は真核細胞に普遍的に存在しているタンパク質である。Tb はマグネシウム、グリセロール、GTP の共存下で加温すると、重合して微小管を形成する [13]。微小管は細胞骨格を構成し、細胞内輸送、細胞輸送、神経伝達、紡錘体として細胞分裂を行うなど様々な機能を果たしている。これらの機能は、Tb が微小管を形成することによって初めて発現される。Tb の  $\alpha$  サブユニットと  $\beta$  サブユニットには GTP が結合しており、Tb が微小管を形成する際、 $\beta$  サブユニットの GTP が GTPase によって GDP に加水分解される。本実験では、反応液中に生成された GDP 量を測定し、Tb の機能活性の指標とした。また、Tb は神経伝達に深く関与していることから、中枢神経の集合体である脳に多く含有されているため、Tb の調製材料として牛脳を用いた。

アルツハイマー症では、大脳皮質の神経細胞死による灰白質の減少により、脳全体の萎縮がみられる。この神経細胞死には、タウ蛋白のリン酸化が関与していると考えられている [2]。タウ蛋白とは、神経細胞内の物質輸送に重要な微小管に結合したタンパク質で、微小管の形成を促進したり、束ねたりする機能をもっている。また、アミロイドはアルツハイマー病の初期病

変であることが知られているが、これを除去する治療法の研究なども行われており [14]、アルツハイマー症の防止や症状の軽減方法についてさまざまなアプローチが試みられている。本研究の目的は、微小管形成の促進の指標である Tb の GTPase 活性賦活物質を大麦分級粉から精製する方法の確立と、精製した物質の組成や分子量等を明らかにすることである。

大麦は古くから世界中で食用として栽培されている穀物で、歴史的にもその安全性は証明されている。さらに大麦は米や小麦よりもタンパク質含量が高く、ビタミン類、ミネラル、食物繊維などの補足効果もある。しかも安価である。しかし、外皮が固く除去しにくい、製麦しても味も消化率も劣るという点から純食用への利用消費の現状は低い。最近、穀粒表面から順次削り取って製粉化する分級粉法 (ドラフトバーレー分級製法) が開発された。このことより、タンパク質は未変性と考えられ、大麦の付加価値を高めるべく大麦分級粉中の生理活性物質が検索できるのではないかと考えた。本研究室では大麦分級粉として、西日本産甘木二条大麦をドラフトバーレー分級製法により製粉化した 95~80%分級粉を使用した。

大麦分級粉からの微小管形成促進物質の探索の第 1 段階として DEAE-Sephadex A-50 によるステップワイズ法を用い [15, 16]、得られた画分をさらに Bio-Gel P-4 ゲル濾過クロマトグラフィーによって分離し、複数の画分を得た。一般的に、分子量の大きい物質は、立体構造を持っている可能性が高いため分解されやすく、不安定である。また、体内への吸収の観点からも低分子の画分を検討することが望ましいと考えられる。これらの観点から、得られた画分の中でも溶出位置から考えて比較的低分子の画分である画分 120-1, 120-2 を用いて Tb の GTPase 活性への影響を検討した。その結果、画分 120-1 の添加により Tb の GTPase 活性は

非常に高くなり、コントロールの5.1倍となった。このことから、画分120-1が強力な賦活活性を有する画分であると示唆される。また、データは示さなかったがHPLCによる純度検定では、いずれの画分も一つの大きなピークとして現れた。このことから、今回試みた精製法により得られたGTPase活性賦活活性画分は非常に純度の高いものだといえる。

大麦分級粉の外層部(80-90%分級粉)のアミノ酸組成はグルタミン酸、グリシン、プロリン、アラニンに富み、その他にアスパラギン酸、バリン、リジンなどを含むことが報告されている[16]。シーケンサーを用いてアミノ酸配列を分析した結果、得られたGTPase活性賦活活性画分120-1は、N末端から順にアラニン、アスパラギン酸、グリシン、グルタミン酸、バリン、グリシン、バリン、グリシン、プロリンで構成されるペプチドであった。TOF-MSによる分子量測定の結果では分子量1340.8の物質であったことから、さらに5~6個のアミノ酸の存在が示唆される。より正確な配列決定が必要である。しかしながら、今回精製したGTPase活性賦活活性物質が低分子のペプチドであることが明らかとなったことで、食品として摂取した際の有効性が大いに期待できる。本ペプチドが、生体にどのような影響を及ぼすかに関しては細胞を用いた培養実験で検証しており[15]、別報にて報告する予定である。

また、大麦以外に米、小麦、白甘藷中のGTPase活性賦活物質の検索を試みたが、現在のところ、見出されていない。ここで精製された標品の価値を高める結果であり、著者らは大麦の隠された価値を本研究から見出したものと考えている。

なお、昨年著者らの大麦分級粉からの微小管形成促進物質について特許が下りたことを付記しておく(特許公開平11-12299)。

## 謝辞

本研究の遂行にあたり文部科学省科学研究費補助金基盤研究(C)(No.16500526)および飯島記念食品科学振興財団(平成13年度学術奨励金)の支援を頂いた。また、日本私立学校振興・共済財団私立大学等経常費補助金を受けた(ID:357)。TOF-MSでの分析では島津製作所にお世話になりました。ここに記して謝意を表す。

## 文献

1. 「住民台帳に基づく人口・人口動態及び世帯数」(平成18年3月31日現在) 総務省自治行政局市町村課
2. 立石潤: アルツハイマー病の最先端(1995) 羊土社, 東京
3. Purich, D. L., and Kristofferson, D., Microtubule assembly: a review of progress, principals, and perspectives, *Adv. Protein Chem.*, **36**, 133-212 (1984).
4. Doi, H., Kawaguchi, M., and Timasheff, S. N., Polymerization and calcium binding of the tubulin-colchicine complex in the GDP State, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **67**, 1643-1652 (2003).
5. Doi, H., Kawaguchi, M., and Timasheff, S. N., Ultracentrifugal behaviors of the tubulin-colchicine complex in the GDP state, *J. Biol. Macromol.*, **3**, 117-125 (2003).
6. Weisenberg, R. C., and Timasheff, S. N., Aggregation of microtubule submit protein, effect of divalent cations, colchicine and vinblastine, *Biochemistry*, **9**, 4110-4116 (1970).
7. Lee, J. C., Frigon, R. P., and Timasheff, S. N., The chemical characterization of calf brain microtubule submits *J. Biol. Chem.*, **248**, 7253-7262 (1973).

8. Na, G. C., and Timasheff, S. N., Interaction of calf brain tubulin with glycerol, *J. Mol. Biol.*, **151**, 165-178 (1981).
9. Secklaer, R., Wu, G. -M. and Timasheff, S. N. Interactions of tubulin with guanylyl-( $\beta$ - $\gamma$ -methylene)diphosphonate - Formation and assembly of a stoichiometric complex - *J. Biol. Chem.*, **265**, 7655-7661 (1990).
10. Kawakami, M., Ward, L., and Doi, H. Inhibition of tubulin guanosine-5'-triphosphatase by lipid peroxides: Protective effects of vitamin A derivatives, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **75**, 635-641 (1998).
11. Kawakami, M., Ward, L., and Doi, H., Mechanisms of tubulin modification by phosphatidylcholine hidroperoxides, *Lipids*, **35**, 205-211 (2000).
12. Doi, H., Imanishi, T., Iwami, K., and Ibuki, F. Is microtubule assembly not associated with GTP hydrolysis? *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 245-246 (1991).
13. Lee, J. C., and Timasheff S. N., The reconstitution of microtubules from purified calf brain tubulin, *Biochemistry*, **14**, 5183-5187 (1975).
14. Akiyama, H., and McGeer, P. L., Specificity of mechanisms for plaque removal after A beta immunotherapy for Alzheimer disease, *Nat. Med.*, **10**, 117-118 (2004).
15. Doi, H., and Kawakami, M., Detection of microtubule assembly promoting peptide from classified barley flour and its effect on the growth of microorganisms, Abstr. 2<sup>nd</sup> International Conference of Food Factors. Kyoto, 22. (1999).
16. Doi, H., Sekiguchi, A., Kawaguchi, M., and Kawakami, M., Microtubule assembly promoting peptides from classified barley flour, Abstr. 17<sup>th</sup> International Congress of Nutrition, Wien, 431 (2001).
17. 土井裕司、川上美佐子、大麦分級粉のアミノ酸組成とプロテアーゼ活性 武庫川女子大紀要 (自然科学) **41**, 19-25 (1993).

### **Purification of Microtubule Assembly Promoting Material from Japanese Classified Barley Flour**

Makiko Kawaguchi<sup>1,\*</sup>, Ayako Sekiguchi<sup>2</sup>, Yukako Yamanaka<sup>2</sup>, and Hiroshi Doi<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Department of Nutrition, Hyogo NCC College, 9-32 Kitashowa-cho, Nishinomiya, Hyogo 662-0833, Japan

<sup>2</sup> Department of Food Science and Nutrition, Mukogawa Women's University, 6-46 Ikebiraki-cho, Nishinomiya, Hyogo 663-8558, Japan

\*Correspondence should be addressed. E-mail: kawaguchi@hyoei.ac.jp

(Received February 8, 2007; Accepted March 8, 2007)

ABSTRACT

Microtubule assembly promoting material was purified from Japanese classified barley flour. An assay of the tubulin GTPase activity was utilized to detect microtubule assembly promoting materials. The water extract, which was obtained from the 95-80% classified barley flour treated with cold acetone, subjected to an ion exchange chromatography on a DEAE-Sephadex A-50 column. The active fraction (S-120) was further fractioned by a size exclusion chromatography on a Bio-Gel P-4 gel column. The fraction 120-1 obtained from a Bio-Gel P-4 column activated the tubulin GTPase 5.1 fold comparing with control. The molecular weight of the fraction was 1340.8 and the N-terminus was A-D-G-E-V-G-V-G-P-.

Key words: Barley, Classified flour, Tubulin, Microtubule assembly, GTPase activity

責任編集者：瀧井幸男