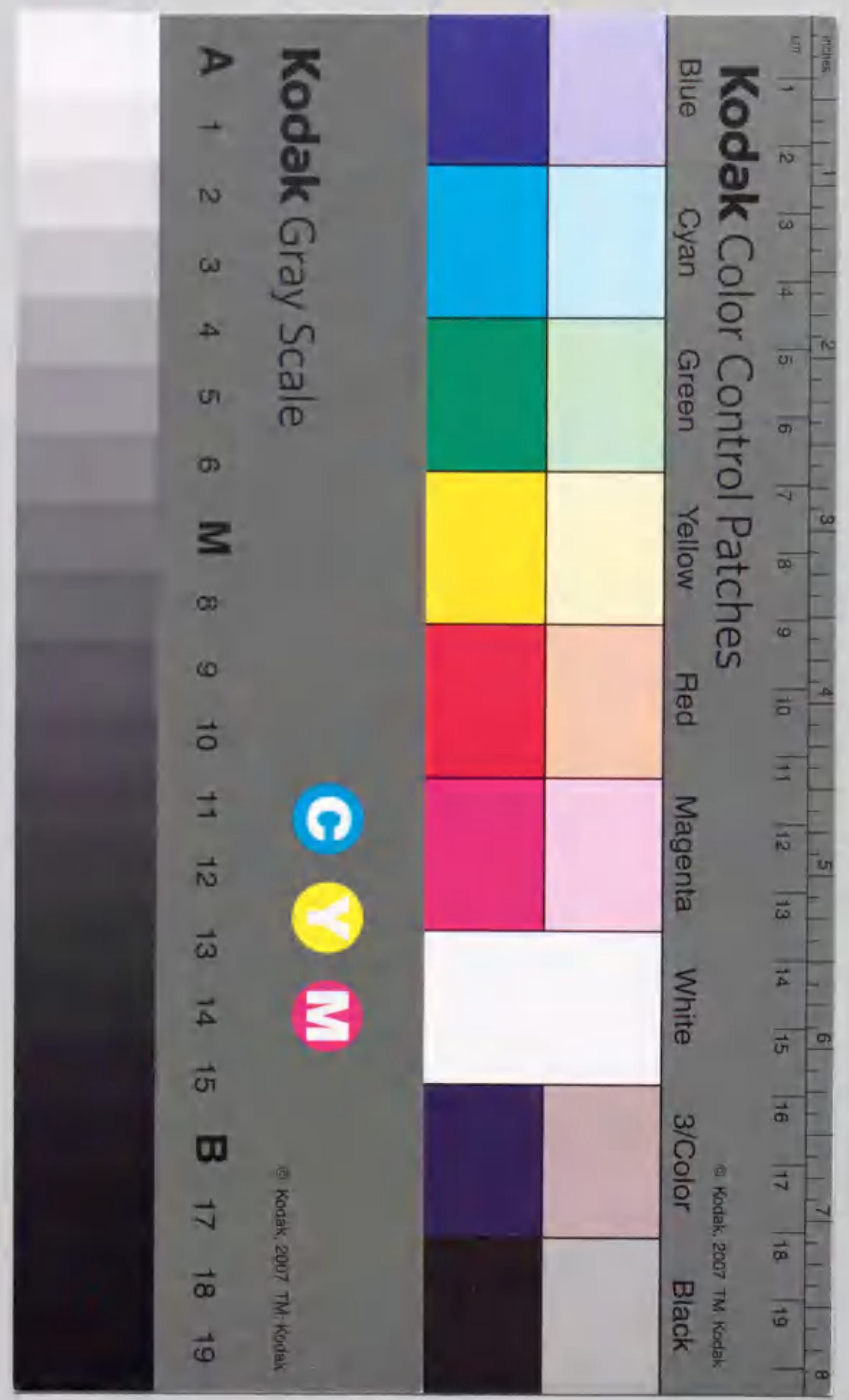


微小管重合によるリネソームの形態変化と
新規の微小管結合膜クワック質による
多極性リネソームの形成

金子智行



博士論文

報告番号 甲第 4248 号

①
微小管重合によるリポソームの形態変化と
新規の微小管結合膜タンパク質による
多極性リポソームの形成

名古屋大学大学院 理学研究科 分子生物学専攻

博士課程（後期課程）

金子 智行

1999年 2月

目次

要旨	1
序論	4
1. 生体膜とリボソーム	
2. 細胞骨格タンパク質	
3. 細胞モデルの再構築	
材料と方法	12
結果	19
1. 微小管重合によるリボソームの形態変化	
2. 微小管結合膜タンパク質による多極性リボソームの形成	
考察	53
謝辞	67
参考文献	68

要旨

細胞や細胞内器官は膜によって外部から区画され、それぞれの機能に応じた特異的な形態をしている。しかもこれらの形は成長、分裂、融合などにより刻々と変化する。これら膜小胞の動的機構を探るために、我々はリポソームと細胞骨格からなるモデル系を開発している。

本研究では、第一にウシ脳由来の微小管と生体から単離された脂質を用いて、リポソームの形態変化に対する脂質組成の影響と、微小管の重合能や生体内で微小管を構成するチューブリン以外の成分（微小管結合タンパク質 (microtubule associated proteins : MAPs)）の影響を暗視野顕微鏡法により詳細に検討した。第二にはウシ脳の膜画分から新規の 100 kDa タンパク質 (MAMP-100) を主成分とする微小管結合膜タンパク質 (microtubule associated membrane proteins : MAMPs) を単離精製し、微小管と共にリポソームに組み込み、その封入された微小管の重合によりリポソームを多極型に変形させることに成功した。

Dimyristoyl phosphatidyl choline (DMPC) と phosphatidyl glycerol (PG) を混合したリポソーム (DMPC-PG リポソーム) の内部で微小管を重合させると、リポソームは両方向に突起を伸ばして形態変化する。これは、微小管重合に伴って発生する力により、脂質二重層膜の変形が起きるためであると考えられている。今回、Phosphatidyl ethanolamine (PE) と PG を混合したリポソーム (PE-PG リポソーム) と phosphatidyl choline (PC) と PG を混合したリポソーム (PC-PG リポソーム) の内部で微小管を重合させたところ、従来の DMPC-PG リポソームよりも効率よく変形した。脂質の存在下では微小管の重合が阻害されるが、重合阻害の程度はいずれの脂質組成でもほとんど同じであった。したがって、脂質組成による形態変化の違いは、微小管の重合量に起因するものではない。一般に DMPC-PG リポソームより PE-PG リポソームや PC-PG リポソームの方が柔軟性に富んでいる。したがって、微小管重合による形態変化の容易さは、リポソームの柔軟性に起因すると考えられる。

従来、リポソーム内で重合させる微小管として、MAPs 粗画分の入ったチュー

プリン試料 (C3X チュープリン) が用いられてきた。今回、MAPs の影響を検討するために、DEAE-Sepharose カラムクロマトグラフィーで精製した MAPs を含まないチュープリン試料 (DEAE チュープリン) との比較を行った。C3X チュープリンを用いた場合には、変形したリボソームの約 80 % が両方向に突起を出しているリボソーム (二極性リボソーム) になるのに対して、DEAE チュープリンでは、片方向にしか突起を出さないリボソーム (一極性リボソーム) の割合が 90 % 以上であった。これは、MAPs を除去することにより微小管の動的不安定性が活発になったために、片方の端が短縮したためであると考えられる。

また、リボソームの突起全体の長さは変わらずに突起部分が移動するという、微小管の動的不安定性では説明のできない現象が観察された。解析の結果、リボソーム内で微小管が移動していることが判明した。微小管の移動に伴って、リボソームを形成している脂質の方も球状部から管状部へ、管状部から球状部へスムーズに変換されていると推察される。しかも、リボソーム内の DEAE チュープリンに MAPs を添加していくと、加えた MAPs の量に依存して二極性リボソームの割合が増加した。これらの結果は MAPs と膜との間に何らかの相互作用があることを示唆している。確かに、MAPs を結合していない微小管はリボソームと結合できないにも拘らず、MAPs を結合した微小管はリボソームと結合した。この MAPs 成分中でリボソームに結合する能力があるのは MAP1 であった。しかし、MAPs のその他の主な構成成分である MAP2 と tau を単離精製して DEAE チュープリンと共にリボソームに封入すると、リボソームに結合しないにも拘らず、二極性リボソームの割合が増加した。このことから、リボソームの形態変化の違いは、かならずしも膜と微小管成分との直接的な結合によるものではないといえる。

細胞内で細胞骨格が安定なネットワークを構築するためには、細胞膜との間になんらかの結合や相互作用が働いている必要がある。事実、アクチン線維の場合には、膜に結合させるためのさまざまなタンパク質が同定されている。しかしながら微小管の場合には、どのようなタンパク質が細胞膜との結合に介在しているかは未だに明らかではない。そこで、微小管に結合する膜タンパク質を単離し、

その機能を解明するために、ウシ脳の膜画分を用いて界面活性剤により膜タンパク質を抽出し、微小管に結合するタンパク質のみを分画した。使用した界面活性剤は陽イオン性の界面活性剤のひとつである Cetyl Pyridinium Chloride (CPC) とした。その他の陰イオン性や両性、非イオン性の界面活性剤では微小管と結合する膜タンパク質は抽出できなかった。CPC で抽出された微小管結合膜タンパク質 (MAMPs) は主成分として 100kDa タンパク質 (MAMP-100) を含む画分であった。この MAMPs を DEAE チューブリンに加えると微小管の重合を促進することがわかった。また、この MAMPs を C3X チューブリンと共にリボソームに封入し、微小管を重合させると、リボソームが多極型に変形した。

MAMP-100 の抗体を作成し、ウシ大脳と小脳を免疫染色したところ、MAMP-100 は大脳のグリア細胞と小脳のブルキンエ細胞に存在することがわかった。これらのことから、この MAMP-100 は新規の微小管結合膜タンパク質であり、微小管を膜に安定に繋ぎ留める働きをしていると考えられる。予想通り、C3X チューブリンのみを封入したリボソームでは、二極性や一極性リボソームだけであったものが、MAMPs を同時に封入したリボソームでは様々な方向に突起を出したりリボソーム (多極性リボソーム) が観察された。このことから、微小管結合膜タンパク質のような微小管を膜に繋ぎ留めておくタンパク質が存在すれば、リボソームは多極型に変形できることがわかった。逆に、リボソームを多極型に変形させるには、微小管結合膜タンパク質のような微小管を膜に繋ぎ留めるタンパク質が必要であるといえる。

序論

細胞の形態はどのようにして構築されるのか、それは生物の形態形成の仕組みの解明にとって最も重要な問題の一つであり、まだ解明されていない問題でもある。生物体を構成している各種の細胞は、それぞれ特有の形態を形成することが知られている。たとえば、神経細胞は樹状突起や軸索突起を生じ、心筋細胞は紡錘形をとり、赤血球は中心部が陥入した円盤状をなす。そして細胞や細胞内器官は、生理的条件の変化に応じて様々に形態を変化させる。これらの形態形成や形態変化を直接つかさどっているのは細胞骨格と呼ばれる細胞内繊維状構造である。細胞骨格は微小管、アクチン線維、中間径線維から構成されているが、それらの形態形成における役割分担は必ずしも明らかではない。我々は形態形成の基本メカニズムを探るために、これら細胞骨格と人工脂質二重膜小胞（リボソーム）からなるモデル系を開発している。

1. 生体膜とリボソーム

脂質を水に懸濁すると脂質二重層を形成し、その膜は自然に閉じて閉鎖小胞となる。このようにして作られた人工的な小胞をリボソームと呼ぶ。そしてこの膜は、基本的に生体膜と同様の性質を持っている。リボソームは生体膜の脂質二重層部分の動態を検討する上で有効なモデル系であり、生体膜を単純化した実験系として従来より研究されてきた [Bangham, 1995; Lasic, 1995]。生体の膜器官にはいろいろな形があり、独自の膜タンパク質によって機能する。しかし、これらを構成する膜は極めて類似した構造をもっている。生体膜がすべて脂質二重層からなることは、生体膜を凍結切断すると、2枚の脂質単分子膜の中央で割れることを示した電子顕微鏡写真で証明された [Branton, 1966]。この二重層構造は脂質分子の性質に起因しており、脂質の親水性部分が直接水相に接するように集合するのに対して、疎水性部分は疎水結合によってお互いに相互作用し合うために二重

層が形成されるのである。脂質分子は単純で人工的な条件下でも自然に配列して二重層を作る。現在、生体膜の基本構造として広く認められているモデルは、1972年に Singer と Nicolson によって提唱された流動モザイクモデルである [Singer & Nicolson, 1972]。このモデルは、脂質二重層にタンパク質分子がモザイク状に埋め込まれているというもので、従来のモデルより膜構造が動的で流動性に富むことを強調している。この脂質分子膜の中に存在するタンパク質分子がランダムに動きまわったのでは十分な機能を発揮できない。そこで微小管やアクチン線維などの細胞骨格やスペクトリンなどの裏打ちタンパク質が膜タンパク質の動きを制御したり、細胞の形を決める働きをしていると考えられている。また、膜小胞器官は移動、変形、分裂、融合など、常時能動的に運動・変化している。これらの運動や構造変化を支援し、具体化させている装置が、微小管やアクチン線維などの細胞骨格から成るネットワークである。

2. 細胞骨格タンパク質

<微小管>

微小管は直径約 25 nm の細長い管状構造体で、チューブリンとよばれるタンパク質が自己集合して形成される。1本の微小管は13本のプロトフィラメントからなっており、その構成単位は、カルボキシル末端に酸性アミノ酸を多数含む [Ponstingl *et al.*, 1983; Sackett *et al.*, 1985] 分子量約 50 kDa の α チューブリンと β チューブリンからなるヘテロダイマーであり、それぞれのアミノ酸配列は一部分で異なっている [Weber & Osborn, 1985]。これらチューブリンのヘテロダイマーからなる微小管は条件により、サブユニットであるチューブリンダイマーとフィラメントの間でダイナミックな重合・脱重合変換を起こす [Carrier, 1989; Erickson & O'Brien, 1992; Bayley *et al.*, 1994]。この変換を制御する因子はいくつも知られており、温度もその一つである。例えば、低温 (0~10 °C) ではチューブリンダイマー分子への解離 (脱重合) が促進され、20~37 °C では微小管重合が促進される。一

方、カルシウムイオンはサブユニットへの解離を促進する。また、重合するチューブリンには GTP が結合しているが、微小管重合に引き続いて生じるこの加水分解は微小管の動態に深く関わっている [Dustin, 1984]。

<微小管結合タンパク質>

微小管の管壁には、種々のタンパク質が結合している [Kim *et al.*, 1979; Voter & Erickson, 1982]。これらのタンパク質は、微小管結合タンパク質 (MAPs) と総称される。チューブリンの一次構造が、生物種間、細胞種間でよく保存されているのに対し、MAPs は細胞の種類によって多様性に富んでいる。微小管の機能の多様性は、主として MAPs のこの多様性によるものと考えられる [Wiche *et al.*, 1991]。MAPs はチューブリンの重合を促進し、形成された微小管に結合してそれを安定化させる。さらに MAPs は、微小管だけでなく他の細胞内構造体とも結合し、それによって両者を結び付け、細胞内に高次な構造を構築する。脳は非常に多くの微小管を含む器官であり、そのため微小管や MAPs についての研究は、主に哺乳類の脳を用いて行われてきた。脳の主要な MAPs は MAP1、MAP2、および tau の三種類に分類される。MAP1 は、見かけの分子量が約 350 kDa で、MAP1A, 1B, 1C の三種類のポリペプチドの総称である。MAP2 は、見かけの分子量が約 300 kDa で、MAP2a, 2b の二種類のポリペプチドを含み、tau は見かけの分子量 50 kDa から 65 kDa の数種類のポリペプチドの総称である。神経系では、MAP1 と tau はともにニューロンおよびグリア細胞に、MAP2 はニューロンにのみ存在する。ニューロン中では、tau は軸索に多く、MAP2 は細胞体に多い [Matus *et al.*, 1981]。MAPs はいずれも柔軟な紐状構造を持ち、分子の長さは、MAP1A が約 150 nm、MAP1B が約 180 nm、MAP2 が約 100 nm、tau が約 60 nm である [Dustin, 1984]。チューブリンと MAPs から重合した微小管には、管壁から突き出した紐状の突起が存在し、チューブリンのみから重合した微小管には突起が観察されない [Vallee *et al.*, 1981; Aizawa *et al.*, 1987]。このことから、MAPs は微小管に結合する領域 (微小管結合領域) と微小管から突き出して存在する領域 (突起領域) とから成ることがわかる。この微小管結合領域は、塩基性アミノ酸を多数含んでおり、微小管の酸性ア

ミノ酸と結合することにより微小管の重合を促進する働きがあると考えられている [Littauer *et al.*, 1986; Aizawa *et al.*, 1987; Melki *et al.*, 1991]。

<微小管の動的不安定性>

生きている細胞の内部において微小管は細胞分裂時には紡錘糸を形作り、染色体の移動をつかさどり、その後いったん脱重合してから再び重合して細胞骨格としての微小管となる。さらに細胞分裂時でなくとも微小管は活発に重合・脱重合を繰り返していることが知られている [Cassimeris *et al.*, 1988; Sammak & Borisy, 1988]。ただしそれらの制御機構についてはまだ十分解明されてはいない。顕微鏡下で個々の微小管を観察していると、同一の溶液条件であるにも拘らず、大多数のゆっくりと伸長する微小管と、少量の急激に短縮する微小管が共存するという現象が見られる。これは一本の微小管が一定の環境条件下でも、独自に重合と脱重合を交互に繰り返すことにより起こっている現象である [Mitchison & Kirschner, 1984; Horio & Hotani, 1986; Walker *et al.*, 1988]。これは動的不安定性 (dynamic instability) とよばれている。MAPs は重合相から脱重合相への変換の頻度を減少させるなどの方法により、この動的不安定性を制御していると考えられている [Hotani & Horio, 1988; Pryer *et al.*, 1992; Kowalski & Williams, 1993; Itoh & Hotani, 1994]。

<微小管と脂質の相互作用>

酸性リン脂質は微小管の重合を阻害することがわかっている [Reaven & Azhar, 1981; Yamauchi & Purich, 1987; Surridge & Burns, 1992]。この阻害はリン脂質の極性部分と MAPs との静電的な相互作用によるものであると考えられている。Surridge と Burns は酸性リン脂質が MAP2 と tau のカルボキシル末端側の微小管結合領域と相互作用することにより微小管の重合を阻害していると報告している [Surridge & Burns, 1994]。このように MAPs は微小管重合におけるリポソームの形態変化において重要な役割を担っていると考えられる。

<アクチン線維と中間径線維>

アクチン線維を構成する主要なサブユニットタンパク質は分子量約 43 kDa のアクチンである。アクチンもまた自己集合の機能を持ち、試験管内で重合・脱重合を繰り返し起こすことができる。アクチン線維の場合は 2 本のプロトフィラメントの二重らせん構造となり、微小管と比較してはるかに柔らかい。

中間径線維についてもその構成タンパク質および重合、脱重合の機構について研究が進められている [Inagaki *et al.*, 1988; Tokutake, 1990] が、微小管やアクチン線維と比較して構成タンパク質の種類が多く、また細胞の種類により多様であるなど複雑である。さらに、微小管やアクチンほど簡単な条件の変動で容易に重合、脱重合の平衡を制御することはできず、その分子機構もまだよくはわかっていない。そこで、これらの細胞骨格のなかで微小管をリボソーム内で重合、成長させる系を探索し、形態形成のモデルシステムとして形態の再構築を行った。

3. 細胞モデルの再構築

<細胞モデルとしてのリボソーム>

リボソームの膜の厚さは約 5 nm で、光学顕微鏡の分解能の限界とされる 200 nm よりもはるかに薄い。そのためリボソームの形状を観察するには電子顕微鏡が用いられてきたが、リボソームの形態変化や微小管の動的構造を観察するためには不適切である。しかし、暗視野顕微鏡を用いれば時間を追って直接観察することが可能になる [Hotani, 1984]。宮田と宝谷はアクチンをリボソーム内に組み込むことに成功した [Miyata & Hotani, 1992]。その結果、アクチン重合によりリボソームはディスク状やダンベル状になることを発見した。また、宝谷と宮本はチューブリンをリボソーム内に閉じ込めた後、微小管を重合成長させることによってリボソームの形態を制御することに成功した [Hotani & Miyamoto, 1990]。その結果、リボソームは微小管の成長により両方向に突起を伸ばすことがわかった。しかし、宮本と宝谷によって組み込まれた微小管は MAPs 粗画分を含む C3X チューブリン

であったため、微小管は安定でありダイナミックではなかった。そこで MAPs を除去した DEAE チューブリンを使うことにより、より動的な微小管でのリボソームの形態変化や、MAPs の役割を明らかにするため、暗視野顕微鏡法を用いてリボソームの観察を行った。

<多極性リボソーム>

微小管をリボソーム内で重合させるとリボソームは二極性または一極性リボソームに形態変化する。しかし、このような形態は培養した好塩基性白血球でしか見られない特殊な形態である [Nakato *et al.*, 1992; Horikoshi *et al.*, 1994]。一般的な培養細胞は色々な方向に突起を伸ばし様々な形態をしている。このような多数の突起を出すような形態をリボソームと微小管の系で再現するには微小管をリボソームの膜に固定する必要がある。確かに、微小管をスライドガラス上に固定してリボソームを変形させると、多数の突起が出るということが知られている [Hotani & Miyamoto, 1990]。しかし、溶液中に浮いているリボソームでは、微小管の重合によって多数の突起を形成するリボソームは形成されなかった。溶液中に浮いているリボソームを多極型に変形させるには、リボソームの膜に微小管を積極的に繋ぎ留めるようなタンパク質を組み込む必要があると推察される。

<微小管と膜の相互作用>

細胞骨格タンパク質と膜との相互作用はアクチンでよく調べられていて、タリンやスペクトリン、band 4.1 などアクチンと細胞膜を結合するタンパク質が単離され、その性質も調べられている。例えば、リボソームとタリンを混合するとリボソームはカップ型になり、最後にはシート状の一枚の膜になってしまうことがわかっている [Saitoh *et al.*, 1998]。しかし、同じ細胞骨格タンパク質でも微小管は細胞膜との相互作用についてはあまり調べられていない。微小管には極性があり伸長速度の速いプラス端と遅いマイナス端がある。細胞内でマイナス端は中心体と呼ばれる微小管の種になる構造と結合しており、構造的に安定している。一方、プラス端は細胞の周辺部にまで達し、一部は細胞膜の近辺にまで存在する。細胞

膜周辺の微小管は細胞膜と微小管の側面で結合していると考えられていて、微小管のプラス端と細胞膜が垂直に結合しているのは、マウス内耳のうずまき管の上皮細胞などのきわめて限られたものでしか見つかっていない [Henderson *et al.*, 1994]。しかし、細胞内膜小器官と微小管の結合はよく調べられていて、ゴルジ体や小胞体は微小管に沿って伸びることが知られている [Vale & Hotani, 1988]。

微小管に結合するタンパク質の研究は主に MAP2 や MAP4、tau などの構造的な MAPs と dynein や kinesin などの微小管上を移動する分子モーターで行われている。最近では、MAP2 [SurrIDGE & Burns, 1994] や MAP1B [Yamauchi *et al.*, 1997] が酸性リン脂質と相互作用するという結果も報告されているが、構造的な MAPs と膜との結合は静電的な結合であり、微小管を膜に繋ぎ留めておくことはできないと考えられる。もう一つの微小管結合タンパク質としては、微小管上を走る分子モーターである dynein や kinesin のファミリーが知られている [Vale, 1993; Vallee, 1993]。しかし、これらのモータータンパク質が様々なオルガネラや膜小胞と結合するにはその他の付加的なタンパク質が必要となる。たとえば、細胞質 dynein には dynactin 複合体が必要である [Gill *et al.*, 1991; Schroer *et al.*, 1991]。このように、モータータンパク質には様々な膜小胞を選択的に輸送するための複雑な複合体が存在しているために、これらを同定してリボソーム内に組み込むことは現在の手法では困難である。将来的には、これらの複合体とモータータンパク質の選択性がリボソームを使った実験で解明できると考えている。

その他の微小管結合タンパク質では、微小管とオルガネラを結合するタンパク質として cytoplasmic linker proteins (CLIPs) が同定されている [Pierre *et al.*, 1992]。このタンパク質群の一つである CLIP-170 は、微小管に結合するタンパク質として HeLa 細胞から単離されている [Rickard *et al.*, 1990]。しかし、このタンパク質も微小管と膜を繋ぐために他のタンパク質を必要とし、それ自身ではリボソームの膜に微小管を繋ぎ留めることはできないと考えられる。

また、脳の神経細胞に主に存在する MAPs は MAP1, MAP2, tau である。今回の実験で MAP1 はリボソームと直接結合するが、MAP2 と tau は結合しないことがわかった。しかし、これら MAPs をチューブリンと共にリボソーム内に封入した

としても、微小管の重合により変形するリボソームは一つの直線上に並んだ一本の突起（一極性）または両端に伸びた突起（二極性）を持つリボソームしか生じて来ない。このことから、リボソームに静電的に結合するような MAPs では微小管をリボソームに繋ぎ留めて、リボソームを多極型に変形させることはできないと思われる。そこで、微小管に結合する膜タンパク質なら微小管をリボソームに繋ぎ留めることができると考えた。しかし、微小管に結合する膜タンパク質は現在まで単離されておらず、新たに単離する必要があった。

<界面活性剤>

膜タンパク質を単離するには界面活性剤を使用するのが一般的な方法である。界面活性剤は陽イオン性、陰イオン性、両性、非イオン性の4種類に分類される。それぞれの界面活性剤は用途に応じて使い分けられているが、膜タンパク質を可溶化するために最適な界面活性剤は膜タンパク質ごとに異なっていて、経験的に用いられていることが多い。

そこで、膜貫通型の膜タンパク質を選択的に可溶化する性質を持つことが知られている Cetyl Pyridinium Chloride (CPC) と呼ばれる陽イオン性の界面活性剤 [Wu *et al.*, 1993] を使うことによりウシ脳から膜タンパク質を可溶化した。その膜タンパク質の中から微小管に結合するタンパク質のみを単離した。この画分には 100 kDa を主成分とする微小管結合膜タンパク質が含まれていた。この画分と C3X チューブリンをリボソームに封入し、微小管を重合させることにより、多方向に突起を出した多極性リボソームを形成させることに成功した。

材料と方法

<試薬>

リン脂質：ジミリスチルホスファチジルコリン (dimyristoyl phosphatidyl choline : DMPC)、ホスファチジルコリン (phosphatidyl choline : PC)、ホスファチジルエタノールアミン (phosphatidyl ethanolamine : PE)、ホスファチジルグリセロール (phosphatidyl glycerol : PG)

界面活性剤：Cetyl Pyridinium Chloride (CPC)

以上はすべて sigma 社、その他は reagent grade を使用した。

<微小管の調製>

ウシの脳の微小管タンパク質は Karr らの方法 [Karr *et al.*, 1979] に基づいて若干の改良を加えた方法により単離した。ウシの脳より脳膜および血管を除いた後、これを PBS (10 mM Na-Pi (pH 7.0), 0.15 M NaCl) で洗って血液を除いた。これに脳の質量の 0.7 倍の体積の Buffer A (0.52 M Sucrose, 1 mM EGTA, 1 mM GTP, 1 mM PMSF, 3 μ g/ml Leupeptin, 3 μ g/ml Pepstatin A, (pH 7.0)) を加えて、ミキサーで懸濁した。これを 12,000 g、20 分、4 °C で遠心 (8,000 rpm : Hitachi RPR9-2) した。この上清に 4 °C の Buffer B (1 M MES (pH 6.8), 10 mM EGTA, 5 mM MgSO₄, 1 mM GTP) を 1/9 量加え、80,000 g、30 分、4 °C で遠心 (30,000 rpm : Hitachi RP30-2) した。上清に 1/3 量のグリセロールを加え、37 °C で 30 分保温し、微小管を重合させた。これを 80,000 g、90 分、34 °C で遠心し、微小管を沈殿として回収した。沈殿に 4 °C の Buffer C (0.1 M MES (pH 6.8), 1 mM EGTA, 0.5 mM MgSO₄, 1 mM GTP, 0.2 mM PMSF, 3 μ g/ml Leupeptin, 3 μ g/ml Pepstatin A) を加え、4 °C で懸濁し、氷中に 30 分おいて微小管を脱重合させ、80,000 g、90 分、4 °C で遠心して変性タンパク質を沈殿させた。その上清に 1/3 量のグリセロールを加え、37 °C で 30 分保温し、微小管を重合させた。これらを 80,000 g、90 分、34 °C で遠心し、微小管を沈殿として回収した。この沈殿を二つに分け、一方には 4 °C の Buffer C を加えて C3X チューブリン用とし、他

方には 4 °C の CS buffer (20 mM PIPES (pH 6.9), 80 mM NaCl, 0.5 mM MgSO₄, 1 mM GTP, 0.2 mM PMSF, 3 μg/ml Leupeptin, 3 μg/ml Pepstatin A) を加えて DEAE チューブリンの分画用とし、それぞれ別々に 4 °C で懸濁した。どちらも 80,000 g、90 分、4 °C で遠心して変性タンパク質を沈殿させた。Buffer C を加えた試料の上清は上記のような重合、脱重合のサイクルをさらにもう 1 回繰り返す、その際最後に懸濁する Buffer を PM buffer (100 mM PIPES (pH 6.9), 1 mM EGTA, 0.5 mM MgSO₄) とした。上清に微小管タンパク質画分を得、これを C3X チューブリンとして GTP を 1 mM になるように加え、-80 °C で保存した。CS Buffer を加えた試料の上清は村田らの方法 [Murata *et al.*, 1992] により DEAE カラムクロマトグラフィーで MAPs とチューブリン (DEAE チューブリン) に精製した。

< DEAE チューブリンと MAPs の調製 >

チューブリンは FPLC システム (Pharmacia) を使って、CS Buffer で平衡化した DEAE - Sepharose カラム (26 mm × 25 cm) によって精製した。MAPs 画分は 0.3 M NaCl を含む CS Buffer で、チューブリン画分は 0.7 M NaCl を含む CS Buffer でカラムから溶出した。MAPs 画分は高分子吸水剤 (みずぶとりくん(アトー)) で濃縮した後、PM buffer で透析し、-80 °C で保存した。チューブリン画分は透析 buffer (100 mM PIPES (pH 6.9), 1 mM EGTA, 0.5 mM MgSO₄, 4 M Glycerol, 0.2 mM GTP, 0.3 mM PMSF) で 6 ~ 7 時間、4 °C で透析し、その後 GTP を 1 mM になるように加え、37 °C で 30 分保温し、微小管を重合させた。これを 100,000 g、90 分、34 °C で遠心 (40,000 rpm : Hitachi RP40) し、微小管を沈殿として回収した。沈殿に 37 °C の PM buffer を加え、沈殿上部に残留したグリセロールを洗い流し、4 °C の PM buffer を加えて懸濁し、4 °C で 30 分静置して微小管を脱重合させ、66,000 g、20 分、4 °C で遠心 (40,000 rpm : Beckman TLA100-3) して変性タンパク質を沈殿させた。上清としてチューブリン画分を得、これを DEAE チューブリンとした。この画分に GTP を 1 mM になるように加え -80 °C で保存した。

< MAP2 と tau の精製 >

MAP2 と tau の精製は、この両タンパク質が熱に対して耐性であることを利用して、村田らの方法 [Murata *et al.*, 1992] に若干の変更を加えて行った。MAPs 画分を解凍してから、75 % 硫酸アンモニウムで塩析し、9,000 g、30 分、4 °C で遠心 (10,000 rpm : Hitachi RPR20-2) し、沈殿をチューブリンを精製した時の DEAE-Sepharose カラム素通し画分で懸濁し、高分子吸水剤 (みずぶとりくん (アトー)) で濃縮した。それに 1 M NaCl、80 mM β -メルカプトエタノールを加え、5 分間煮沸し、10 分間氷上で冷却した後、100,000 g、60 分、4 °C で遠心した。この上清をゲル濾過 (Hiload Column Superdex200, Pharmacia 26 mm \times 65 cm) にかけて、MAP2 画分と tau 画分に分離した。各画分は紫外吸収と SDS-PAGE により MAP2 と tau の有無及び、他成分の混入のないことを確認し、高分子吸水剤 (みずぶとりくん (アトー)) で濃縮してから、PM buffer で透析し、-80 °C で保存した。

< 微小管結合膜タンパク質の単離 >

膜画分は微小管の調製において最初の 80,000 g の遠心で得られた沈殿を使用した。この画分を 5 倍量の Buffer D (50 mM PIPES (pH 6.9), 1 mM PMSF, 3 μ g/ml Leupeptin, 3 μ g/ml Pepstatin A) で懸濁し 30 分放置した後、80,000 g で遠心 (30,000 rpm : Hitachi RP30-2) し膜成分のみを沈殿させ、上清を除去することにより水溶性の成分を除去した。この操作を 3 回繰り返し、最初の 2 回は 4 °C で 3 回目は室温で行った。この膜画分に陽イオン性の界面活性剤である Cetyl Pyridinium Chloride (CPC) を含む Buffer D を最終濃度 0.1 % CPC になるように加えて懸濁し上記と同様に遠心し、上清に CPC で可溶化した膜タンパク質を得た。この可溶化の操作を 2 ~ 3 回行い、SDS-PAGE により CPC で可溶化した膜タンパク質を確認した。

この膜タンパク質画分 (通常可溶化操作 2、3 回目の画分) に 10 μ M taxol を加えたものと 4 mg/ml DEAE チューブリンを 8 % dimethyl sulfoxide (DMSO) 存在下で 37 °C で 30 分重合させた後 10 μ M taxol で安定化した微小管を 9 : 1 で混合し 37

℃で30分静置した。100,000 g、30分、34℃で遠心(55,000 rpm : Beckman TLA100-2)し、沈殿に微小管と微小管に結合する膜タンパク質を得た。微小管に結合したタンパク質を微小管から解離するために0.3 M NaClと10 μM taxolを含むBuffer Dを加え懸濁し37℃で30分静置し、上記と同様に遠心した。この上清をPM bufferで一晩透析することにより、微小管結合膜タンパク質(MAMPs)を得た。

<リボソームの作成>

DMPC、PC、PE、PGを有機溶媒(クロロホルム:メタノール=98:2(vol/vol))に溶かし、それぞれの10 mM溶液を作成した。試験管中で脂質を混合し、窒素気流下で有機溶媒を蒸発させフィルム状に乾固した脂質を得た。これをさらに真空デシケーターで10時間以上乾燥させ、完全に有機溶媒を除去した。任意の溶液を加え、室温で時々手で攪拌しながら30分間、静置した。

<リボソームへのチューブリンの封入法>

8~10℃に冷却しながら、フィルム状に乾固した脂質の入った試験管に、脂質濃度が5 mMになるようにチューブリン溶液を加えた。また、MAPsやMAMPsなどを添加する実験では、あらかじめMAPsやMAMPsとチューブリンを任意の濃度で混合した試料を作成しておき、これを加えた。溶液を加えた後、時々攪拌しながら30分間10℃以下に保った。この間にリボソーム中にチューブリンが組み込まれる。次にリボソームの外でチューブリンが重合しないように、PM bufferで10倍に希釈した。そして、温度を37℃に上げることによってリボソーム内のチューブリンを重合させ、変形の様子を暗視野光学顕微鏡で観察した。

<リボソームの観察>

スライドガラスはコンタミノンN、1 N HClで洗浄した後、エタノール中に保存し、使用直前にキムワイプでエタノールをふき取って使用した。カバーガラスはメタノール中に保存し、同様にキムワイプでメタノールをふき取って使用した。

スライドガラスに試料を 5 μ l のせ、暗視野顕微鏡 (BHF (Olympus)、コンデンサー：高倍率対物レンズ用油浸暗視野コンデンサー (Olympus, DC. NA=1.2~1.33)、対物レンズ：40 \times HiApo (Olympus)) で観察した。コンデンサーとスライドガラスの間、カバーガラスと対物レンズの間を油浸した。観察結果はビデオ映像 (ビデオカメラ：高感度SITカメラ C-2400-08 (Hamamatsu-Photonics)、ビデオデッキ：ビデオカセットレコーダー HR-S7700 (Victor)) として計測時間とともに S-VHS ビデオテープに記録した [Itoh & Hotani, 1994]。

<リボソームの突起の長さの測定>

ビデオテープに記録されたリボソームの突起の長さの変化は画像解析装置 (IBAS (Zeiss)) により、全長、突起部の長さ、球状部の直径を測定した。

<微小管のリボソームへの結合能の測定>

結合実験は村田らの方法 [Murata *et al.*, 1992] に若干の変更を加えて行なった。リボソームは PC と PG を混合した試験管に 10 μ M taxol を含んだ PM buffer を脂質濃度が 1 mM になるように加え、強く攪拌して 37 $^{\circ}$ C で 30 分放置して形成させた。MAPs を結合した微小管の方は、4.5 mg/ml C3X チューブリンを 37 $^{\circ}$ C で 30 分重合させ 10 μ M taxol で安定化し、10 μ M taxol を含んだ PM buffer で 5 倍に希釈した。MAPs を結合していない微小管の方は、4 mg/ml DEAE チューブリンを 8% DMSO 存在下で 37 $^{\circ}$ C で 30 分重合させ 10 μ M taxol で安定化し、10 μ M taxol を含んだ PM buffer で 5 倍に希釈した。これらの微小管を 1:1 でリボソームと混合し、37 $^{\circ}$ C で 30 分放置した。また、コントロールとしてリボソームの代わりに 10 μ M taxol を含んだ PM buffer を 1:1 で微小管と混合した。これらの混合液を 1.2 M Sucrose を含む PM buffer の上に重層し、100,000 g、30 分、34 $^{\circ}$ C で遠心 (55,000 rpm : Beckman TLA100-2) した。全体を三等分すると、上層にはリボソームにも微小管にも結合しなかったタンパク質が、中層には Sucrose 層の上に堆積したリボソームと結合したタンパク質が、下層にはリボソームと結合しなかった微小管が存在する。各層を採取し SDS-PAGE (7.5%) により解析した。

<MAPsのリポソームへの結合能の測定>

結合実験は Li らの方法 [Li *et al.*, 1994] に若干の変更を加えて行なった。PC と PG を混合した試験管に PM buffer を脂質濃度が 1 mM になるように加え、強く攪拌し、リポソームを形成させた。1 時間後、0.8 mg/ml MAPs または 0.26 mg/ml MAP2, 0.2 mg/ml tau を混合し、軽く攪拌し 30 分室温で静置した。これを 100,000 g、20 分、24 °C で遠心 (55,000 rpm : Beckman TLA100-2) してリポソームを沈殿させた。上清を採取し、沈殿を PM buffer で懸濁し、上清とともに SDS-PAGE (7.5 %) にかけて、MAPs のバンドの濃度でリポソームとの結合を調べた。

<MAMPs の微小管重合への影響>

重合しないように水中で保存してある 4.5 mg/ml DEAE チューブリンと 0.01 mg/ml 100kDa タンパク質 (MAMP-100) を含む MAMPs を混合し、37 °C に温度を上げることにより、微小管の重合を開始させた。微小管の重合量は分子蛍光光度計 (F-3000, Hitachi) を用いて波長 450 nm の散乱光を測定することにより求めた。また、対照実験として MAMPs を最後に透析した外液 (PM buffer) を用いて同様の実験を行った。

<MAMP-100 に対する抗体の作成とイムノプロット>

MAMPs を SDS-PAGE で分離し、PVDF 膜 (バイオラッド社) 上にセミドライ (200 mA, 5 h; 0.1 M Tris-HCl, 0.192 M glycine, 0.05% SDS, 10 % methanol) にてプロットした。PVDF 膜上の MAMP-100 を切り出し、PBS 中で超音波処理および DMSO によって抽出し、等量のプロイント完全アジュバントを加えてエマルジョンにし、マウス (Balb / 雌、3 週齢) の腹腔内に注射した。追加免疫は 2 週間毎に 3 回行った。その後、脾臓細胞を採取し、パートナー細胞 (Ag 8.653 細胞) と融合させ、ハイブリドーマを作製した。軟寒天培地法によるクローニングを行い、ELISA およびイムノプロット法によりスクリーニングを行った。

このように得られたモノクローナル抗体を用いて、イムノプロットを行い、この抗体が MAMP-100 を認識することを確認した。MAMPs を SDS-PAGE で分離し、

PVDF膜上にセミドライにてプロットした。このPVDF膜を3%スキムミルクを含むTBS (10mM Tris-HCl (pH 7.4), 0.15 M NaCl) で30分ブロッキングした。次いで、得られた抗MAMP-100モノクローナル抗体を5%スキムミルクを含むTBSで50倍に希釈し一次抗体として使用し、4°Cで一晩放置した。翌日、1%スキムミルクを含むTBSで3回洗浄し、ペルオキシダーゼ (HRP) 標識抗マウスIgMを5%スキムミルクを含むTBSで500倍希釈したものを二次抗体として使用し、37°Cで1.5時間放置した。1%スキムミルクを含むTBSで3回洗浄後、ジアミノベンチジンにより染色した。

<免疫組織化学>

ウシ大脳と小脳を4%パラホルムアルデヒドで固定化し常法に従って脱水、脱脂し、パラフィンで包埋して薄切し標本とした。MAMP-100の酵素組織化学は正常ヤギ血清、過酸化水素でブロッキングした後、抗MAMP-100抗体 (抗血清を1%BSAを含むPBSで1/4に希釈したもの) を加えて4°Cで一晩放置した。翌日、ペルオキシダーゼ標識抗ウサギ免疫グロブリン抗体とともに37°Cで1時間放置し、過酸化水素を加えてジアミノベンチジンで褐色に発色させた。チューブリンの方はDAKO社製のLSAB(R)kitを用いて染色した。標本はMAMP-100の場合と同様にブロッキングし、抗チューブリンモノクローナル抗体 (1%BSAを含むPBSで1/200に希釈したもの) を加えて4°Cで一晩放置した。翌日、二次抗体を加えて37°Cで1時間放置し、基質とAEC色原体を加えて赤色に発色させた。

<SDS-PAGE とタンパク質定量>

SDS-PAGE (7.5% or 10% Acrylamide-Gel) はLaemmliの方法 [Laemmli, 1970] により行ない、Coomassie Brilliant Blue Rで染色した。

精製したチューブリン、MAPs、MAP2、tauはLowryらの方法 [Lowry *et al.*, 1951] によりBSAを標準試料としてタンパク質濃度を定量した。MAMPsはSDS-PAGEで分離されたMAMP-100のバンドの濃さにより、BSAを標準試料としてタンパク質濃度を定量した。

結果

1. 微小管重合によるリボソームの形態変化

<チューブリン試料と脂質の性質>

ウシ脳由来の微小管と生体から単離された脂質を用いて、リボソームの形態変化に対する脂質組成の影響を暗視野顕微鏡法により詳細に検討した。今回使用したチューブリンは微小管結合タンパク質 (microtubule associated proteins : MAPs) を含む C3X チューブリンと MAPs を含まない DEAE チューブリンである。これらの精製段階での純度を SDS-PAGE により確認した (図 1)。C3X チューブリン (図 1-レーン 4) はチューブリンの重合脱重合サイクルを三回繰り返した画分で、分子量 50 kDa 付近にチューブリンモノマー、その他に MAPs として分子量 350 kDa 付近に MAP1、300 kDa 付近に MAP2、45~60 kDa に tau などが含まれている。DEAE チューブリン (図 1-レーン 5) はチューブリンの重合脱重合サイクルを二回繰り返した画分を DEAE-Sepharose カラムクロマトグラフィーにより精製した画分で、チューブリンのみを含み、MAPs は含まれていない。

脂質は DMPC、PC、PE、PG の 4 種類を使用した。DMPC は極性部分の塩基がコリン基で非極性部分の脂肪酸が炭素数 14 の飽和脂肪酸であるミリスチン酸が結合しているリン脂質である。PC は DMPC と同じく極性部分の塩基はコリン基であるが、非極性部分の脂肪酸鎖の長さが一定ではなく様々な長さの脂肪酸鎖が混在し、不飽和脂肪酸も含んでいる天然由来のリン脂質である。PE と PG は PC の極性部分の塩基をそれぞれエタノールアミンとグリセロールに置換したもので、PC と同じく非極性部分の脂肪酸鎖の長さは不揃いで不飽和脂肪酸も含んでいるリン脂質である。脂質の極性部分の正味の電荷が 0 である DMPC や PC、PE のみ、あるいはそれらを混合した脂質組成では PM buffer (100 mM PIPES (pH 6.9), 1 mM EGTA, 0.5 mM MgSO₄) 中でリボソームは形成されなかった。よって、脂質の極性部分の正味の電荷が -1 である PG と正味の電荷が 0 である DMPC や PC、PE をモル比 1:1 で混合したリボソームについて実験することとした。

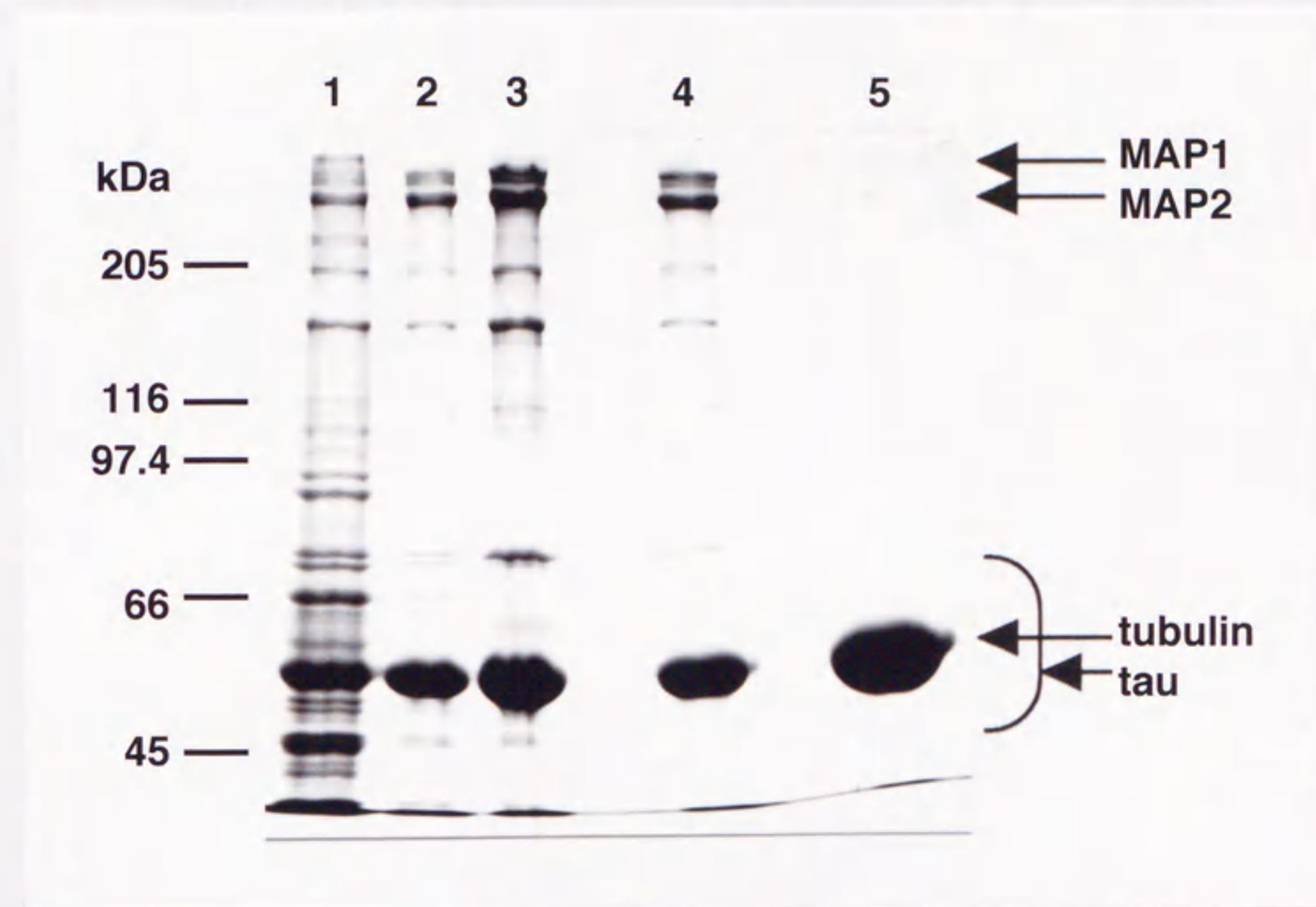


図1. チューブリンの精製段階における SDS-PAGE

ウシの脳からチューブリンを精製するときの、各段階におけるタンパク質の組成を SDS-PAGE (7.5%) で確認した。

1. 最初の上清 (C0S) 2. 重合脱重合サイクルを一回繰り返した後の上清 (C1S)
 3. 重合脱重合サイクルを二回繰り返した後の上清 (C2S) 4. 重合脱重合サイ
 クルを三回繰り返した後の上清 (C3X) 5. DEAE チューブリン

<脂質組成の相違による二極性リボソームの形成能>

従来、C3X チューブリンを重合させた微小管によるリボソームの形態変化は、脂質組成 DMPC:PG = 1:1 (モル比) のリボソーム (DMPC-PG リボソーム) を使用して研究されてきた。しかし、この脂質組成では変形するリボソームの割合が少なく、MAPs を含まない DEAE チューブリンでは変形しないことが予想されたので、より変形しやすいリボソームの脂質組成を探索した。

今回、新しく試みた脂質は PC、PE の二種類で、それぞれ PC:PG = 1:1 (PC-PG リボソーム)、PE:PG = 1:1 (PE-PG リボソーム) に混合したものを使用した。これらの脂質に C3X チューブリンを加えて、時々攪拌しながら 10 °C で 30 分放置し、チューブリンを封入したリボソームを形成させた。リボソームの外側でチューブリンが重合しないように PM buffer で 10 倍に希釈し、温度を 37 °C に上げるによりチューブリンを重合させた。重合開始から 10 ~ 30 分後のリボソームの形態変化の様子を暗視野顕微鏡で観察した (図 2)。その結果、7 mg/ml の C3X チューブリンを組み込んだリボソームでは、中央の球形の部分から両方向に突起が出ているリボソーム (二極性リボソーム) が観察された。二極性リボソームは溶液中では 2 時間後も二極性リボソームのままであり、突起が三本以上出るものは観察されなかった。しかし、突起が球形の部分から一本しか出ていないリボソーム (一極性リボソーム) は観察された。この一極性リボソームの割合は変形したリボソームの約 20 %であった。一方、変形していないリボソームに対する二極性リボソームの割合は従来の DMPC-PG リボソームに比べて、今回新しく試みた PC-PG リボソーム、PE-PG リボソームの方が高く、効率よく変形していることがわかった。この二つのリボソームを比較すると PC-PG リボソームの方は突起部の短いものが多かったのに対し、PE-PG リボソームの方は突起部の長いものが多かった。

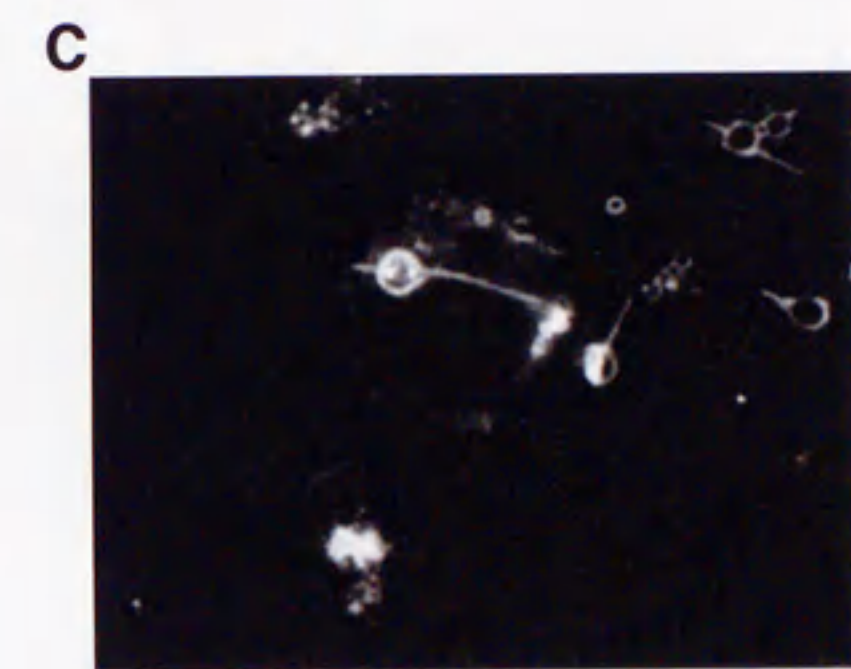
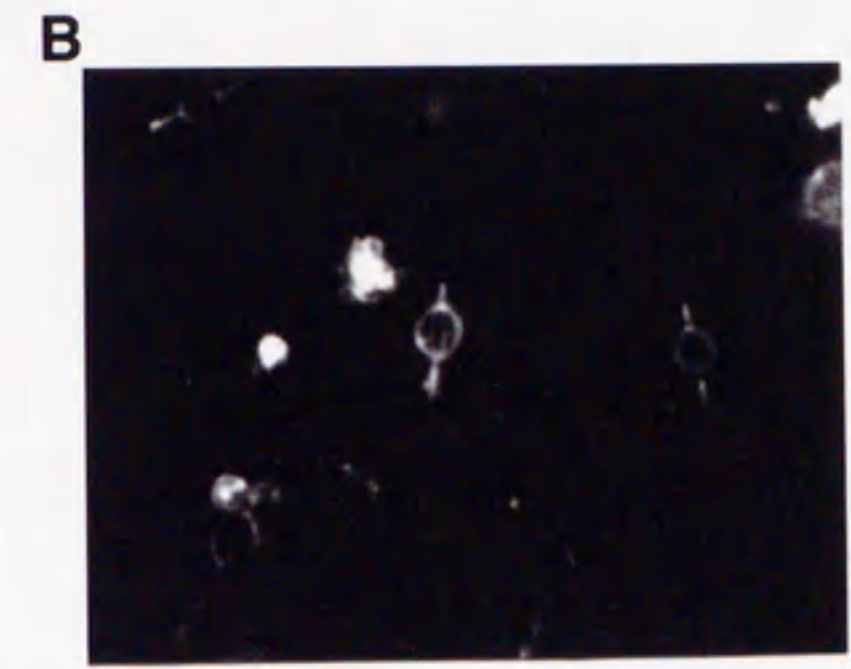
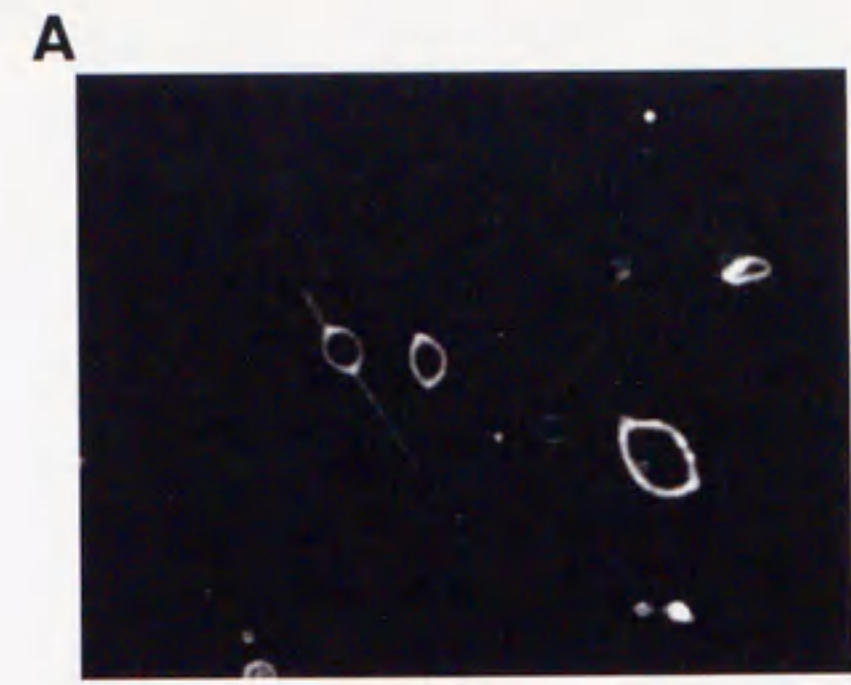


図2. リポソームに封入された C3X チューブリンを重合させた時のリポソームの形態変化

7 mg/ml C3X チューブリンを DMPC-PG リポソーム、PC-PG リポソーム、PE-PG リポソームに封入し、重合させたときのリポソームの暗視野顕微鏡像。

(bar = 10 μ m)

A. DMPC-PG リポソーム B. PC-PG リポソーム C. PE-PG リポソーム

<脂質組成の相違によるリボソームの変形能の差異>

上述した脂質組成の違いによる変形リボソームの割合の変化の原因としては、以下の可能性が考えられる。すなわち、1) 微小管の重合量が異なり、その結果として変形するリボソームの量が増える可能性、2) リボソーム自身の柔らかさの違いにより、変形しやすさが影響される可能性の二点である。

まず、1) の可能性を検討するために、脂質組成の違いによる微小管の重合の程度を暗視野顕微鏡観察によって調べた。脂質のない条件下では、C3X チューブリン濃度 1.6 mg/ml で一視野あたり約 50 本の微小管が観察されるが、脂質存在下では数本しか観察できなかった。したがって、微小管の重合は脂質存在下で阻害されることがわかった。しかし、DMPC-PG、PE-PG どちらの組成の脂質存在下でも、観察される微小管の平均本数にほとんど差がないことから、微小管の重合阻害は同程度であるといえるので、1) の可能性は考えにくい。

次に 2) の可能性、すなわち脂質組成の違いによりリボソームの柔らかさに違いが生じるのかを検討するため、チューブリンのない PM buffer だけでリボソームを作成し、暗視野顕微鏡で観察した(図3)。DMPC-PG リボソームよりも、PC-PG リボソームや PE-PG リボソームの方が形成能がよく、しかも柔らかいものも多く見られた。また、PE-PG リボソームは PC-PG リボソームよりも紐状のものが多く、管状になりやすい性質を持っている(図3-C)。つまり、PE-PG リボソームはそれ自身が突起になりやすい性質を持っていると考えられる。このことが、変形した PE-PG リボソームで突起部が長くなる原因であると思われる。このようにチューブリンを封入したリボソームの変形効率は、脂質の性質によるリボソームの形態の違いに起因している。

PE-PG リボソームは紐状のリボソームが多く、微小管重合によって変形した管状のリボソームとそうでないものとの区別がしにくく、変形能を調べるには適していない。そこで、PE-PG リボソームと同様の変形効率を示した PC-PG リボソームを DEAE チューブリンを組み込む実験に使用した。

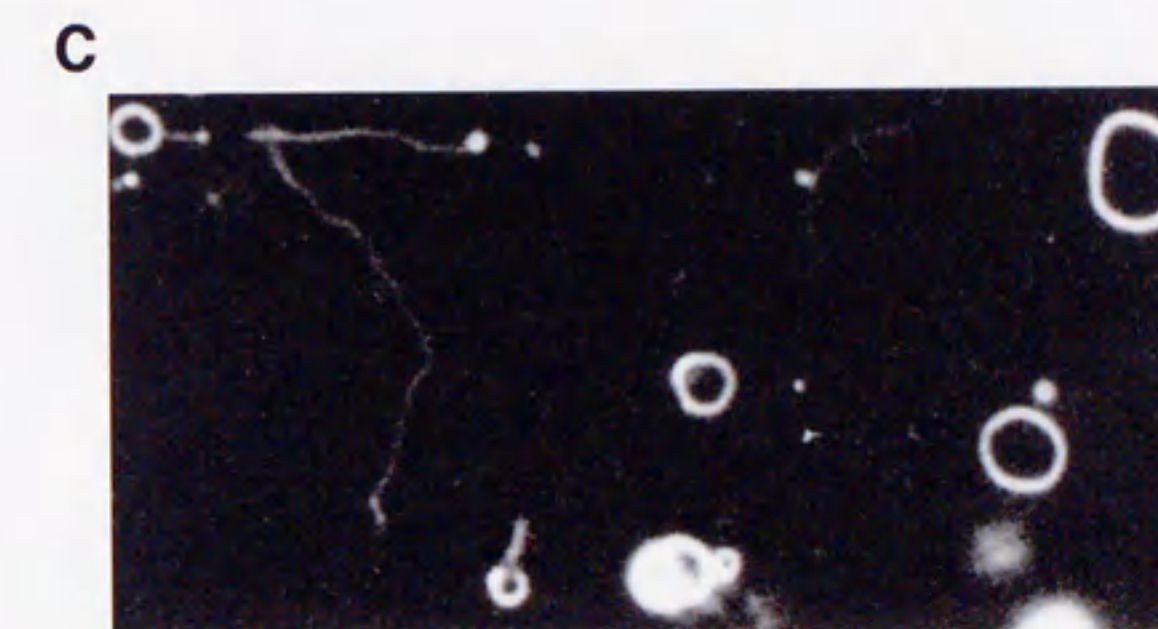
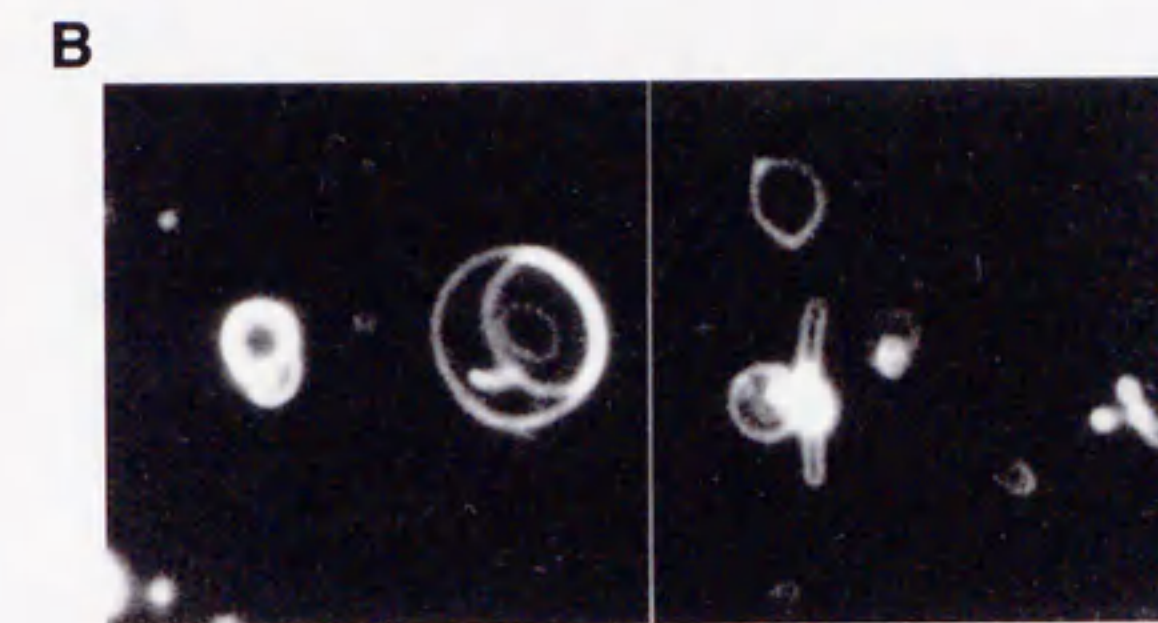
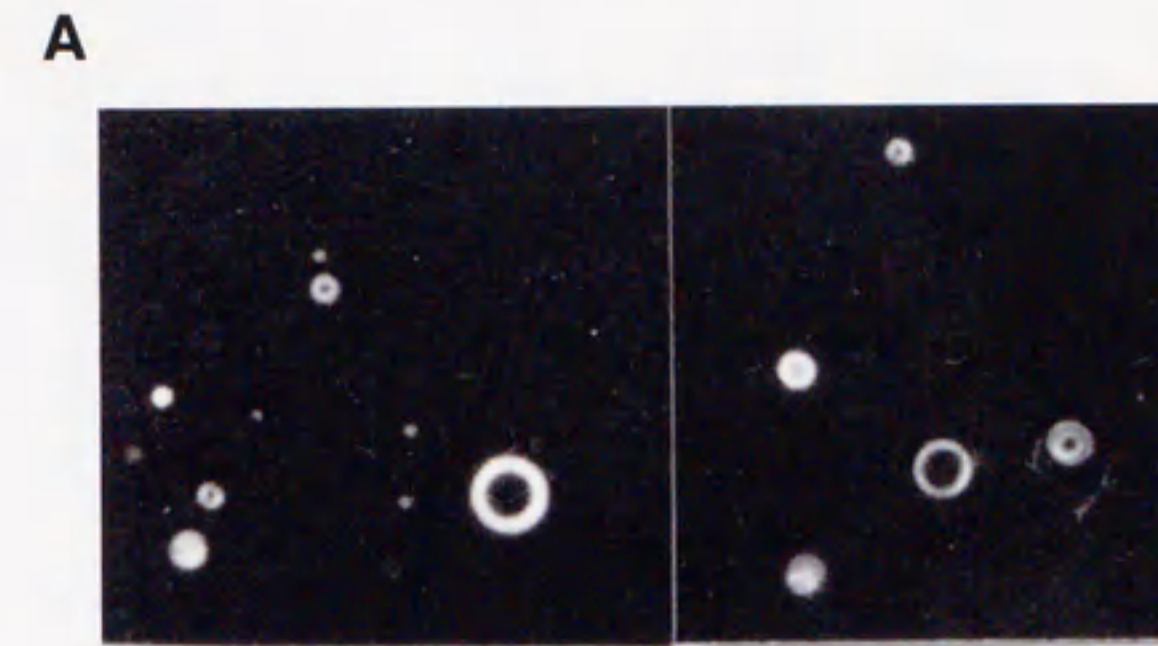


図3. 脂質組成の違いによるリボソームの柔らかさの相違
 PM buffer で DMPC-PG リボソーム、PC-PG リボソーム、PE-PG リボソームを
 成したときのリボソームの形態の暗視野顕微鏡像。(bar = 10 μ m)
 A. DMPC-PG リボソーム B. PC-PG リボソーム C. PE-PG リボソーム

<DEAE チューブリンでのリボソームの形態変化>

微小管重合によるリボソームの形態変化の実験には、すべて MAPs を含んだ C3X チューブリンが使用されてきた。しかし、今回、リボソームの変形効率を上げたことにより、C3X チューブリンから MAPs を除いた、より動的な DEAE チューブリンでも変形することが期待された。そこで、DEAE チューブリンをリボソームに組み込む実験を行った (図 4)。

C3X チューブリンは 7 mg/ml、DEAE チューブリンは MAPs がなく重合しにくい ため 10 mg/ml の濃度の試料を用いた。その結果、PC-PG リボソームに、C3X チューブリンを組み込んだ場合 (図 4-A) と DEAE チューブリンを組み込んだ場合 (図 4-B) とで形態変化に違いがあった。C3X チューブリンでは、両方向から突起が出ているリボソーム (二極性リボソーム) の割合が約 80 % であったのに対し、DEAE チューブリンでは、片方向にしか突起が出ないリボソーム (一極性リボソーム) の割合が 90 % 以上であった。

また、DEAE チューブリンを組み込んだリボソームの方が C3X チューブリンを組み込んだリボソームよりもチューブリンを重合させた時の突起の長さが長いように思えた。しかし、DEAE チューブリンの方がチューブリン量が多いため直接比較できないので、チューブリン量を一定にし、そこに MAPs を加えて重合させてリボソームの突起の全長を比較することにした。そこで、10 mg/ml の DEAE チューブリンをリボソームに組み込んだ場合と 10 mg/ml DEAE チューブリンに 2 mg/ml MAPs を加えたものをリボソームに組み込んだ場合とで、チューブリンを重合させた時の変形したリボソームの突起の全長の平均を調べた。MAPs を加えなかった方は $17 \pm 4.9 \mu\text{m}$ ($n = 22$) で、MAPs を加えた方は $8.9 \pm 2.6 \mu\text{m}$ ($n = 23$) であった。MAPs を加えた方が微小管の重合量は多いはずであるが、実際にはリボソームの突起は短くなっていた。これは、MAPs を加えることにより微小管の核形成が促進され [Sloboda *et al.*, 1976; Murphy *et al.*, 1977]、短い微小管が多数形成されたことが原因であると思われる。

また、DEAE チューブリンを組み込んだリボソームでは、重合開始時よりも時間の経過と共に一極性リボソームの割合が多くなっていく傾向があった。これは、

微小管を重合させた時よりも、観察している時の方が温度低下など微小管を安定にするための条件が悪くなることにより、微小管が脱重合していく傾向になるためであろうと考えられる。しかも、DEAE チューブリンでは MAPs がないため、微小管は不安定で脱重合しやすくなっている。微小管の脱重合により片方の端が短縮すると、微小管に支えられていたリボソームの突起が元に戻り、その結果、二極性リボソームが一極性リボソームになってしまう。このことが一極性リボソームの割合が時間と共に多くなる原因であると考えられる。

確かに、DEAE チューブリンを組み込んだリボソームでも二極性リボソームが存在し、その突起が伸縮を繰り返す現象を観察した。これは、微小管の動的不安定性 (dynamic instability) によりリボソーム内の個々の微小管が重合相と脱重合相の交換を独自に繰り返すために起きている。しかし、リボソームの突起の内部には複数の微小管が存在し、これらの微小管の独立した重合・脱重合の差し引きが突起の正味の長さ変化としてあらわれるために、脂質を含まない溶液中の微小管と比べて、伸縮の速さはかなり遅い。





図4. DEAE チューブリンを組み込んだリボソームの形態変化
 PC-PG リボソームに、C3X チューブリンまたは DEAE チューブリンを組み込んだときのリボソームの暗視野顕微鏡像。(bar = 5 μ m)
 A. C3X チューブリンの濃度は 7 mg/ml
 B. DEAE チューブリンの濃度は 10 mg/ml

<リボソームの突起部の移動>

リボソームの突起部で起こる長さの変化には、微小管の動的不安定性による伸縮以外に、次のような現象が観察された。図5は、PC-PG リボソームに 10 mg/ml DEAE チューブリンを組み込んで重合させた時に、変形したリボソームの球状部分の一部がスライドガラス上に固定された状態のリボソームを時間を追って観察したものである。リボソームの長軸の長さはほとんど一定のまま、突起部分のみが左右に動いているのがわかる。そして、一度片方の突起が元に戻ると、再び突起を出すことはなかった。この様子を突起の全長と左の突起部の長さ、中央の球状部の直径、右の突起部の長さを時間ごとに計測してまとめたものが図6である。突起部のみが左右に動いていることがよくわかる。長軸方向の全体の長さは、初めは微かに短くなっているが、その後は全体の長さは変わらず、左右の突起の長さだけが変化していることがわかる。相対的にみると、リボソームを固定すると微小管が左右に動いているといえるし、微小管を固定するとリボソームの突起部と球状部の変換が起きて、球状部が動いているともいえる。この現象は微小管の動的不安定性では説明できない現象である。なぜなら、動的不安定性では微小管の片端が伸びるのに対応して、同時に反対側の端がまったく同じ長さだけ縮むということは考えられないからである。

このことから、微小管はリボソーム内を自由に動くことができるといえる。しかし、MAPs を結合した微小管ではこのような現象は観察されていないので、何らかの作用により微小管がリボソーム内で動けない様になっていると考えられる。

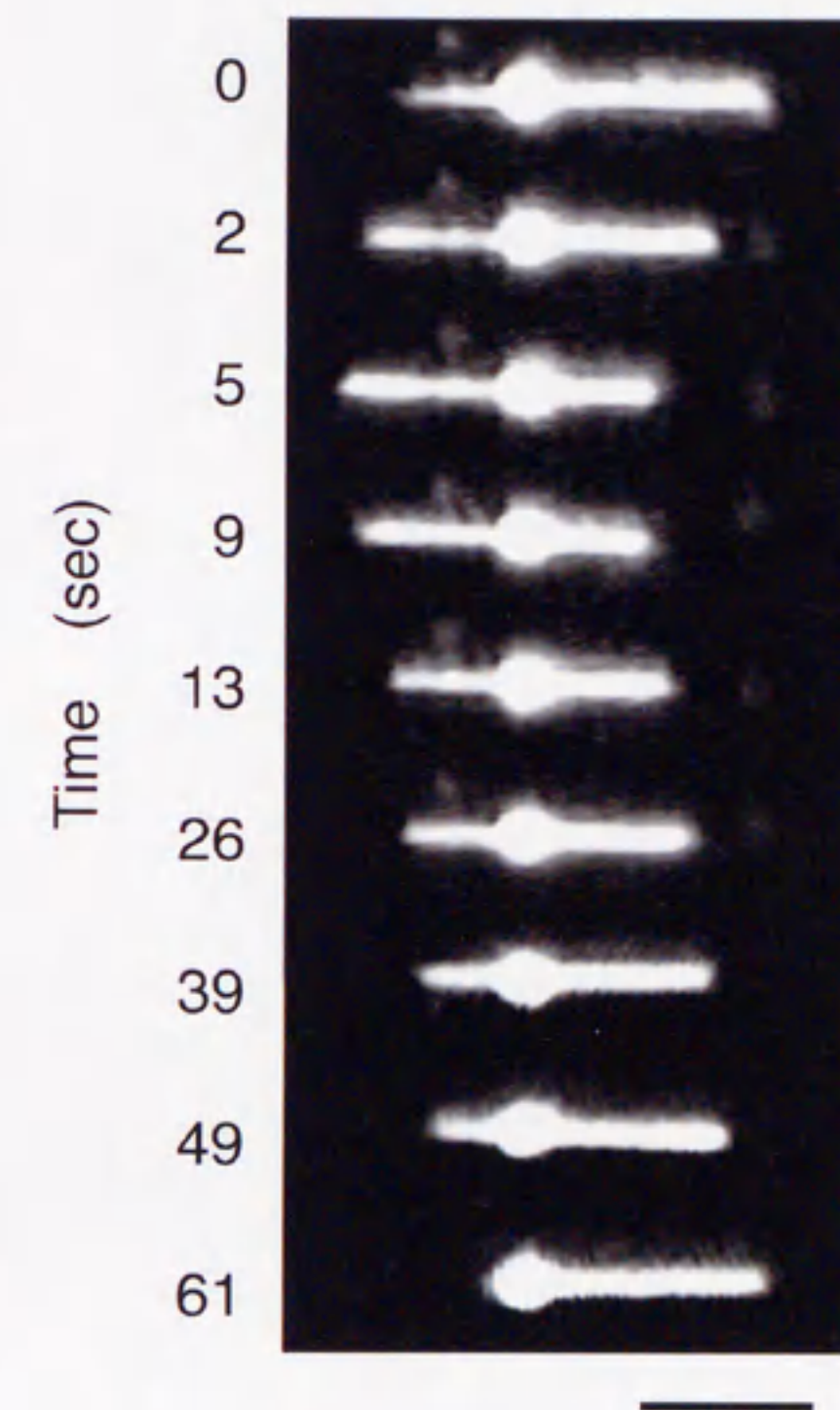


図5. 突起の移動経過 (連続写真)

10 mg/ml DEAE チューブリンを組み込んだ PC-PG リボソームの暗視野顕微鏡像。二極性リボソームの突起部のみが移動して一極性リボソームになる様子。リボソームは球状部の一部分でスライドグラス上に固定されている。左は時間経過 (秒) を示している。(bar = 5 μ m)

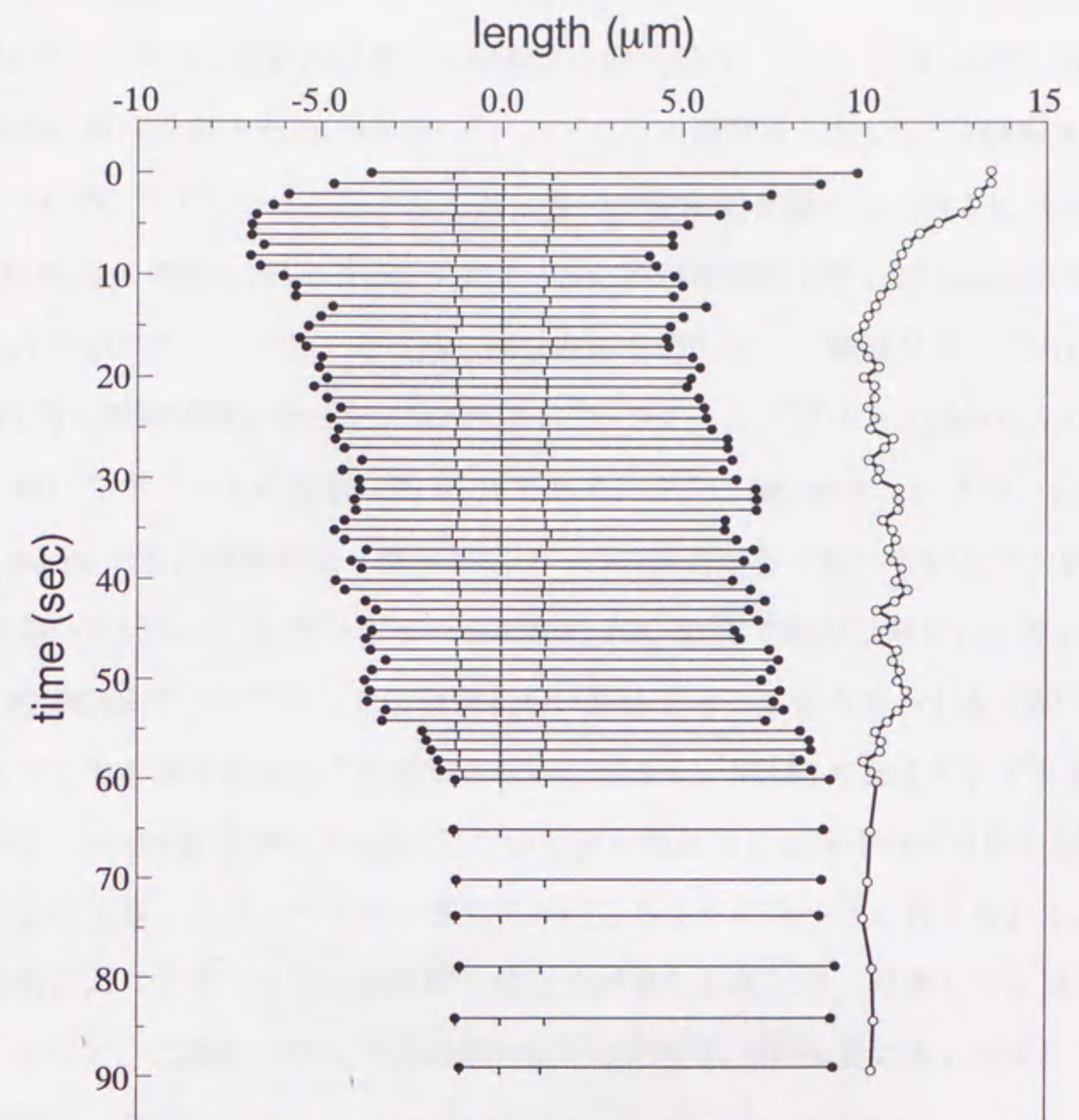


図6. 突起の移動経過の測定

図5のリボソームの突起の長さの変化を画像解析装置 (IBAS (Zeiss)) により、全長、突起部の長さ、球状部の直径を測定。

縦軸が時間経過 (秒) で、横軸が球状部の中心を0としたときの、中心からの距離。(○) が全長の変化、(●) が突起部の先端、(TT) が球状部の直径を示している。

<MAPs 添加による二極性リボソームの割合の変化>

DEAE チューブリンを組み込ませた場合に片側突起のリボソーム（一極性リボソーム）が多い原因を探るため、DEAE チューブリンの濃度を一定にし、MAPs の量を変えて PC-PG リボソームに組み込んだときの形態変化を調べた。図 7 に示すように、MAPs 量の増加に伴い二極性リボソームの割合が増加した。10 mg/ml と 5 mg/ml の DEAE チューブリンでは同じ様な曲線を描いて、二極性リボソームの割合が約 80 % で飽和状態になった。MAPs を含む C3X チューブリンを組み込んだときも、二極性リボソームの割合は約 80 % である。また、DEAE チューブリンの濃度が 2.5 mg/ml でも、全体的に一極性リボソームの割合が多くなっているが、同様の曲線を描いていて、二極性リボソームの割合が約 60 % で飽和状態になった。2.5 mg/ml の DEAE チューブリンでは脂質のない条件でも、あまり重合しないのでリボソーム内で力を発生させることはできない。しかし、MAPs を加えていくと重合能が上昇し、MAPs 濃度が 0.5 mg/ml になると微小管重合による十分大きな力が発生することにより、リボソームの形態変化が起こるようになったと考えられる。微小管重合によりリボソームの変形に十分な力が発生したとき、リボソームは変形する。そして、二極性リボソームの割合は、その時の MAPs 量に応じて変化することがわかった。

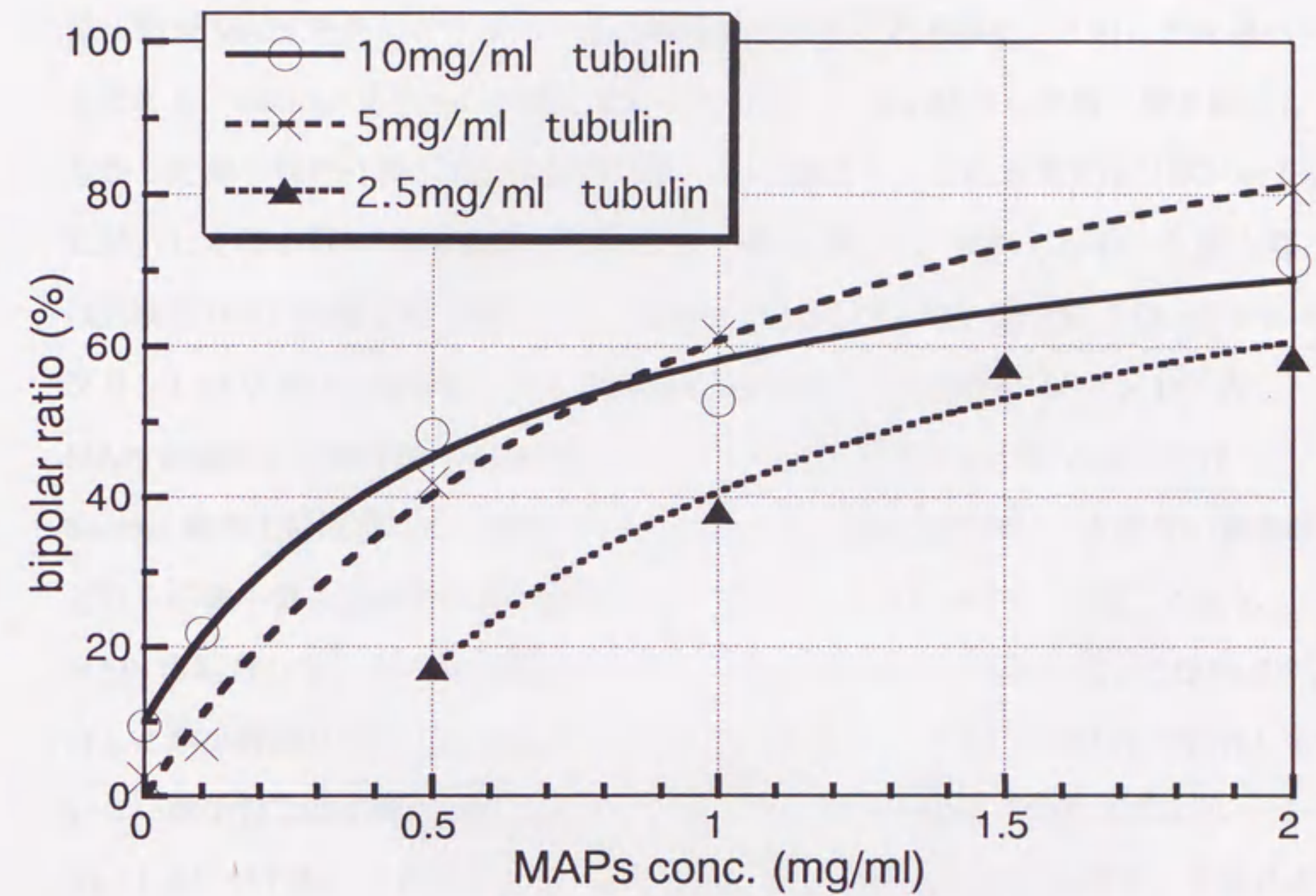
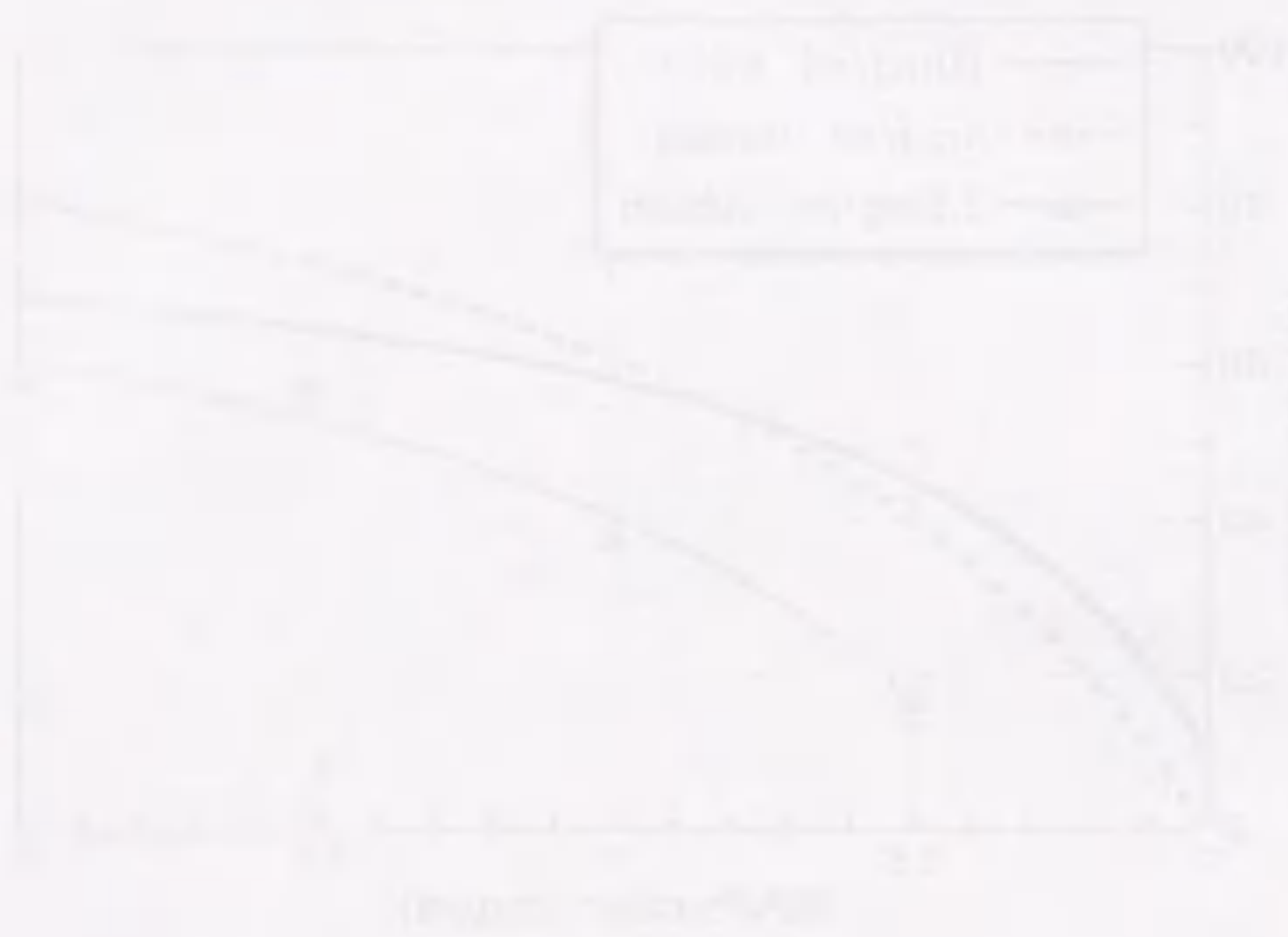


図7. MAPs 量に依存した二極性リボソームの割合

DEAE チューブリンの濃度を 10 mg/ml、5 mg/ml、2.5 mg/ml に固定し、MAPs の量を 2 mg/ml、1.5 mg/ml、1 mg/ml、0.5 mg/ml、0.1 mg/ml、0 mg/ml と変えて PC-PG リボソームに組み込んだときの二極性リボソームの割合。縦軸が二極性リボソームの割合 (%) で、横軸が MAPs の濃度 (mg/ml) を示している。



<微小管とリボソームの結合>

リボソームの突起の出し方の違いには MAPs が関係していることがわかった。それでは、MAPs がどのように関係しているのだろうか？ まず考えられることは、微小管が MAPs を介してリボソームと直接結合することである。このことを調べるために、Sucrose 層を用いた遠心法によりリボソームに結合した微小管と結合しなかった微小管を分離し SDS-PAGE を行った (図 8)。この方法ではリボソームに結合した微小管は Sucrose 層の上に堆積 (図 8-M) し、結合しなかった微小管は試験管の底に沈殿する (図 8-P)。MAPs の結合していない微小管 (DEAE チューブリン) はリボソームがあっても試験管の底に沈殿した (図 8-レーン 12) が、MAPs の結合した微小管 (C3X チューブリン) はリボソームがある場合だけ Sucrose 層の上に堆積した (図 8-レーン 3)。もちろん、リボソームがない場合はどちらの微小管も試験管の底に沈殿した (図 8-レーン 8, 16)。このことから、MAPs の結合していない微小管はリボソームと結合できないのに対し、MAPs の結合した微小管はリボソームと結合できることがわかった。また、MAPs の結合していない微小管では上層と中層にチューブリンのバンドが確認できる (図 8-レーン 10, 11, 14, 15) が、これはリボソームの有無に拘らず存在しているので、未重合のチューブリンであると思われる。

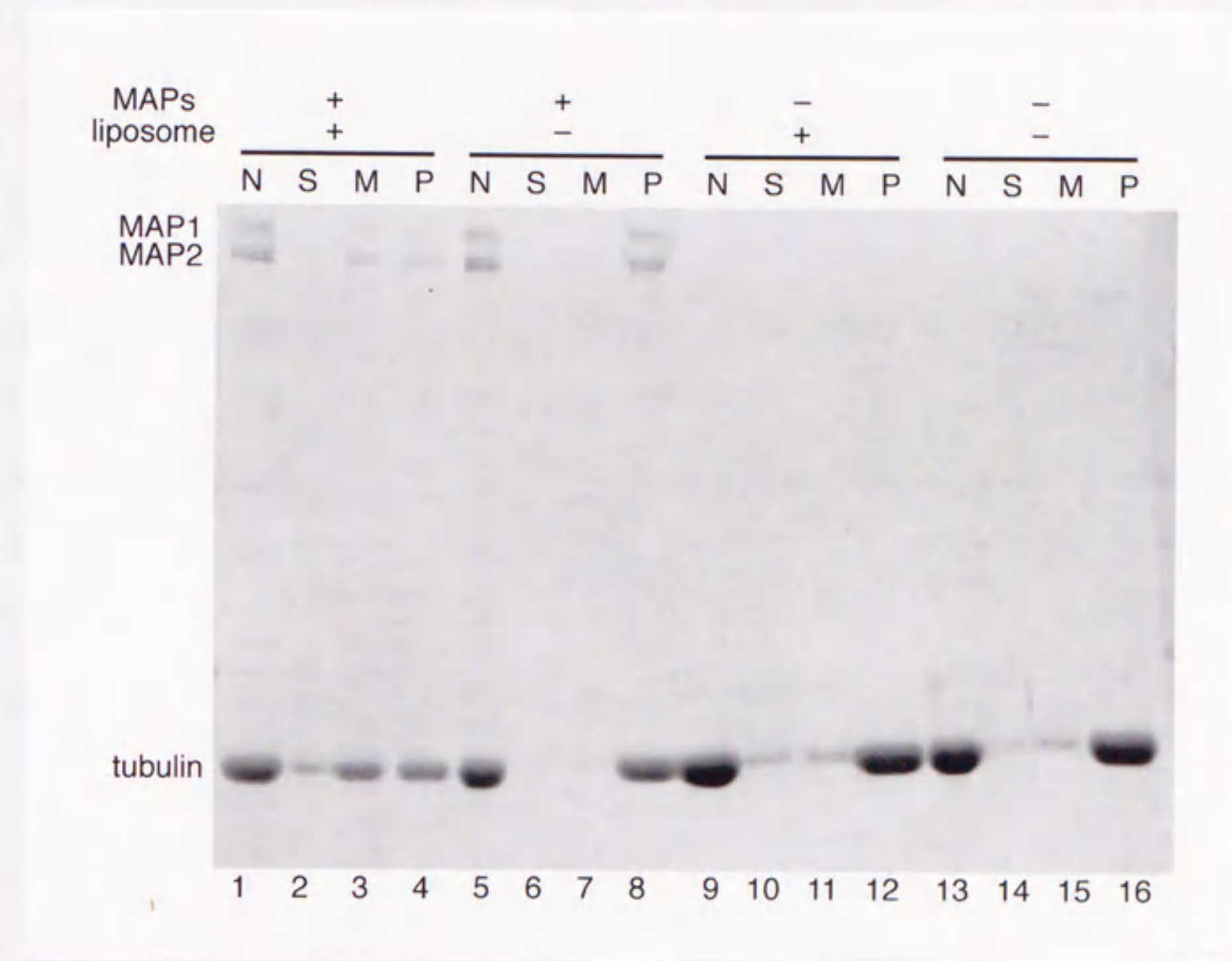


図8. 微小管とリボソームの結合能検定

MAPs を結合した微小管と MAPs を結合していない微小管をそれぞれ 10 μ M taxol で安定化し、PC-PG リボソームと混合した。対照実験としては、リボソームを含まない PM buffer を使用した。1.2 M Sucrose 層の上にサンプルを加え、超遠心することによりリボソームに結合したタンパク質のみを Sucrose 層の上に堆積させた。遠心後、サンプルを上から三等分し、SDS-PAGE (7.5%) により解析した。N, S, M, P はそれぞれ遠心前のサンプル (N)、遠心後の上清 (S)、Sucrose 層の境界を含む遠心後の中層 (M)、遠心後の沈殿 (P) を示している。

<リボソームに結合する MAPs の種類>

MAPs の結合した微小管がリボソームと結合することはわかったが、今回使用した MAPs には MAP1, MAP2, tau 等が含まれている。そこで、いかなる MAPs がリボソームと結合するのかを調べるため、MAPs とリボソームの共沈実験を行った (図9)。本実験により、MAPs に含まれている MAP1 はリボソームと強く結合した。MAP2 もリボソームと僅かに結合したが、tau はまったく結合しなかった (図9-レーン1, 2)。これらの結果から、もしリボソームとの直接的な結合がリボソームの形態変化に影響しているならば、MAP1 か MAP2 が寄与している可能性が大きい。また、チューブリンのバンドが確認できる (図9-レーン2, 3, 4) が、これは MAP1 と挙動を共にしていることから、MAP1 に結合しているチューブリンであると思われる。リボソームの非存在下において、沈殿に少量の MAP1, MAP2, チューブリンが存在した (図9-レーン4) のは、MAPs とチューブリンからなるリング構造 [Pantaloni *et al.*, 1981] が沈殿したものであると思われる。

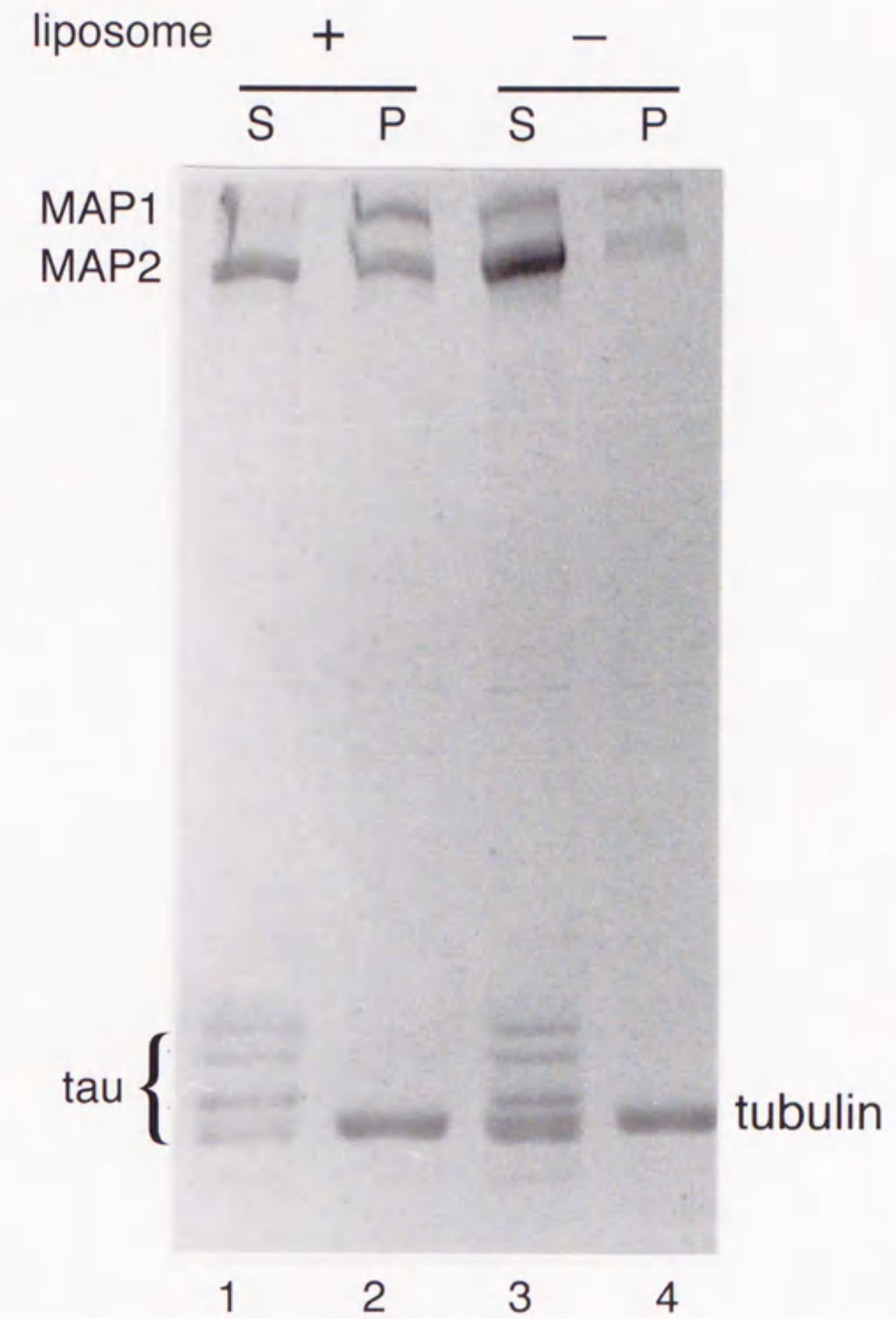


図9. MAPs とリボソームの結合能検定

PC と PG を混合した試験管に脂質濃度が 1 mM になるように PM buffer を加えてリボソームを形成させる。このリボソームを加えたもの (+) と、加えないもの (-) に MAPs (0.8 mg/ml) を混合し、室温で 30 分放置し、超遠心してリボソームを沈殿させた。上清を採取し、沈殿 (P) を PM buffer で懸濁し、上清 (S) とともに SDS-PAGE (7.5 %) により解析した。

<精製 MAP2 と tau のリボソームへの結合能>

MAPs 成分中の構造タンパク質であり、比較的容易に単離できる成分である MAP2 と tau におけるリボソームとの結合能を、共沈実験により調べた (図 10)。MAP2 と tau は共に熱耐性であることを利用して単離した。MAPs 混合画分を用いたときには僅かに結合した MAP2 が、単離精製するとほとんど結合しなくなった (図 10 - レーン 2)。tau については、高濃度の tau でも沈殿にバンドがみられない (図 10 - レーン 8) ことから、tau はリボソームと結合しないことがより明らかになった。MAP2 がリボソームに結合しなくなった原因として、第一に、精製段階における煮沸が考えられる。煮沸により MAP2 のリボソーム結合部位が失活したか、または MAP2 とリボソームを結合させる MAP2 以外のタンパク質が失活したためであると考えられる。第二に、MAP2 は初めからリボソームに結合する性質を持っていなかったと考えられる。MAPs 混合画分を用いてリボソームとの共沈実験を行ったときに、沈殿成分に検出されたのは、MAP2 が MAP1 に結合しているチューブリンに結合していたためであると考えられる。いずれにしても、単離精製した MAP2 も tau もリボソームと結合しないことがわかった。

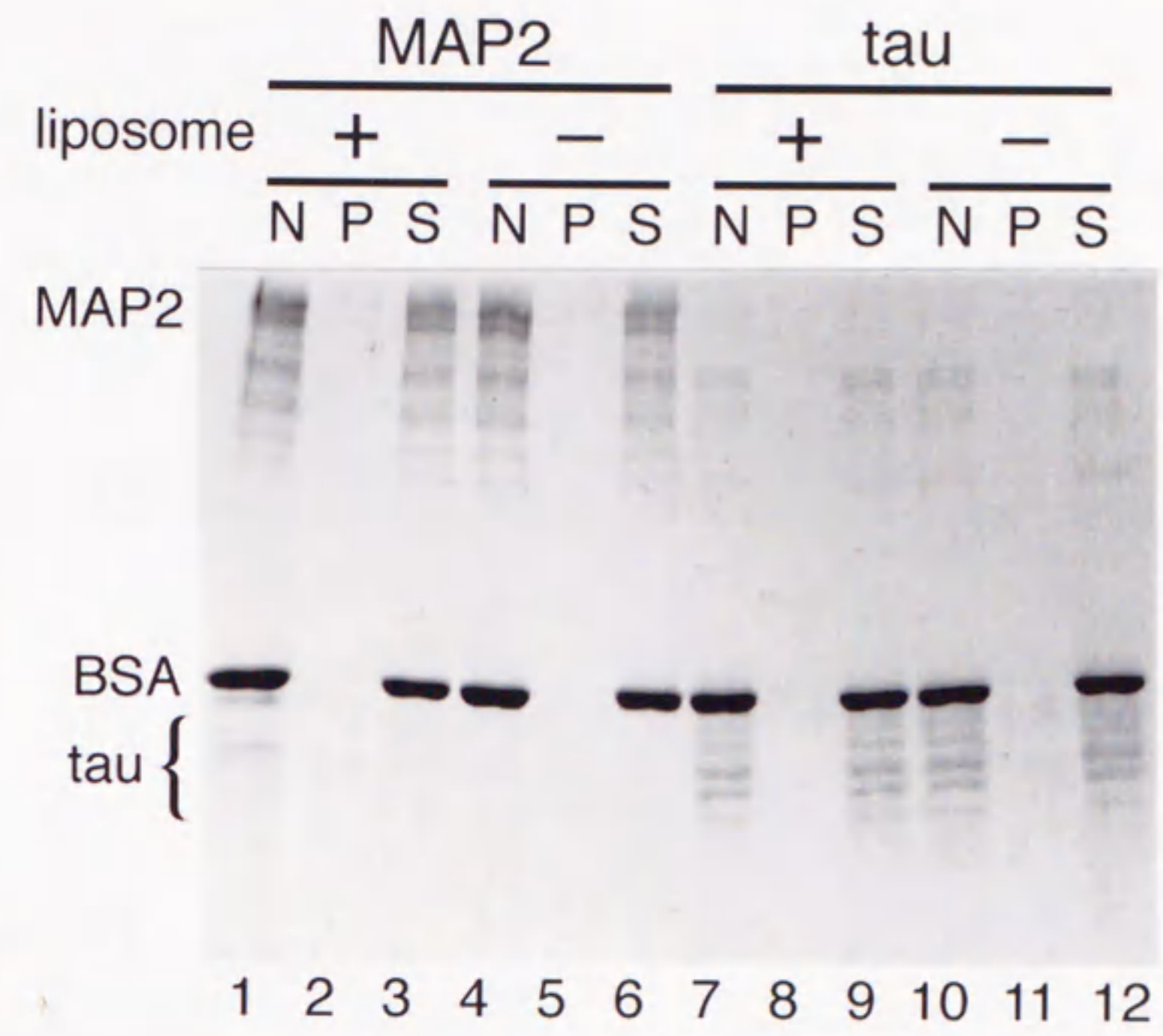


図10. 精製 MAP2、tau とリポソームの結合能検定

PC と PG を混合した試験管に PM buffer を脂質濃度が 1 mM になるように加えてリポソームを形成させる。このリポソームを加えたもの (+) と、加えないもの (-) に MAP2 (0.26 mg/ml) と、tau (0.2 mg/ml) を混合し、コントロールとしての BSA (0.2 mg/ml) 存在下において室温で 30 分放置し、超遠心してリポソームを沈殿させた。上清を採取し、沈殿 (P) を PM buffer で懸濁し、上清 (S) と遠心前のサンプル (N) とともに SDS-PAGE (7.5 %) により解析した。

<リボソームの形態変化における MAP2 と tau の影響>

リボソームと結合することが二極性リボソームの安定化に寄与しているならば、リボソームに結合しない MAP2 や tau では、二極性リボソームを安定にする能力がないことから、一極性リボソームになるであろう。そこで、直接的な結合がリボソームの形態変化に影響しているのか否かを調べるために、それぞれ精製した MAP2 または tau を DEAE チューブリンに封入してリボソーム内で重合させた時のリボソームの形態変化を調べた (図 11)。その結果、MAPs を加えた場合と同様に、加えた MAP2 や tau の量に依存して二極性リボソームの割合が多くなった。tau は二極性リボソームの割合が 50 % まで回復した。MAP2 は図の濃度範囲では 60 % までしか回復しなかったが、さらに濃度を上げると二極性リボソームの割合は増加する傾向を示した。このように、リボソームに結合しない MAP2 や tau でも二極性リボソームを安定化させることがわかった。

これまで、MAPs のリボソームへの直接的な結合が二極性リボソームの形態の安定化に寄与していると考えてきたが、リボソームに結合しない MAP2 や tau でも二極性リボソームの形態を安定にできたことから、リボソームとの直接的な結合は、リボソームの突起の出し方に関係がないことがわかった。よって、MAP2 や tau が微小管を安定にし、微小管の脱重合を減少させることにより、リボソームの突起の短縮する確率を下げていると考えられる。しかし、MAP2 や tau を加えたチューブリンを重合させた二極性リボソームでは、リボソーム内での微小管の移動は観察されなかったことから、リボソームに結合しない MAP2 や tau にもリボソーム内の微小管の移動を制限する能力があると考えられる。しかも、tau よりも MAP2 の方が二極性リボソームを安定にする能力が高い。このことは MAP2 の方が微小管を安定にする能力が高い、または MAP2 の方が微小管の移動を制限する能力が高いことを示唆している。

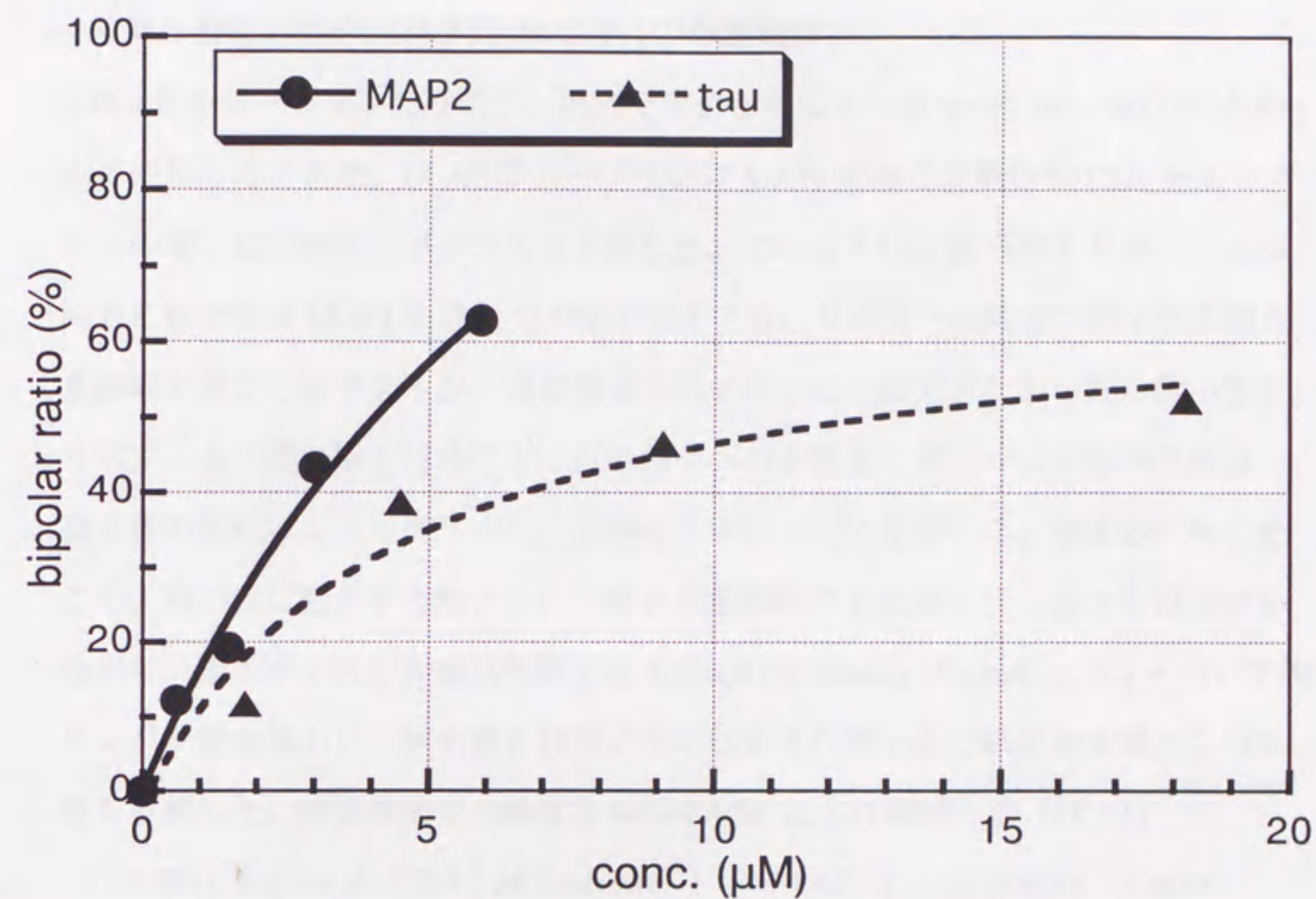


図 11. MAP2 または tau の量に依存した二極性リボソームの割合

DEAE チューブリンの濃度を 6.5 mg/ml に固定し、MAP2 (1.3 mg/ml、0.65 mg/ml、0.325 mg/ml、0.13 mg/ml、0 mg/ml)、tau (1.0 mg/ml、0.5 mg/ml、0.25 mg/ml、0.1 mg/ml、0 mg/ml) の量を変化させて PC-PG リボソームに組み込んだときに生じる二極性リボソームの割合。縦軸は二極性リボソームの割合 (%)、横軸は MAP2 および tau の濃度を MAP2 の分子量を 220 kDa、tau の分子量を 55 kDa として計算した時のモル濃度 (μM) で示した。

2. 微小管結合膜タンパク質 (MAMPs) による多極性リボソームの形成

<微小管結合膜タンパク質 (MAMPs) の単離精製>

DEAE チューブリンをリボソーム内で重合させるとリボソームは一極性リボソームに変形した。また、DEAE チューブリンに MAPs を加えた場合や C3X チューブリンの場合は二極性リボソームに変形した。このように、微小管とリボソームの両方に結合する MAP1 を含む MAPs を加えても、リボソーム内での微小管の動きを制限することはできるが、膜に繋ぎ留めておくことはできなかった。微小管をリボソームの膜に繋ぎ留めておくためのタンパク質をリボソームに組み込めば、微小管の重合によりリボソームは多極性リボソームに変形すると考えられる。そこで、微小管に結合する膜タンパク質を単離精製するためにウシ脳から膜画分を抽出し、陽イオン性の界面活性剤である Cetyl Pyridinium Chloride (CPC) を用いて膜タンパク質を抽出し、微小管と共沈することにより微小管と結合する膜タンパク質を単離した。精製段階での純度を SDS-PAGE により確認した (図 12)。

ウシ脳は Buffer A (0.52 M Sucrose, 1 mM EGTA, 1 mM GTP, 1 mM PMSF, 3 μ g/ml Leupeptin, 3 μ g/ml Pepstatin A, (pH 7.0)) を加えてミキサーで細胞を破碎し低速遠心にて未破碎細胞や不要物を沈殿させた。この上清に Buffer B (1 M MES (pH 6.8), 10 mM EGTA, 5 mM MgSO₄, 1 mM GTP) を 1/9 量加え、超遠心することによって膜画分を沈殿させた。この膜画分に Buffer D (50 mM PIPES (pH 6.9), 1 mM PMSF, 3 μ g/ml Leupeptin, 3 μ g/ml Pepstatin A) を加えホモゲナイザーで懸濁し、再び超遠心により膜画分を沈殿させた。同様の操作を三回繰り返す (図 12 - レーン W1 - W3)、三回目のみ室温で行い、その他の操作は 4°C で行った。このように洗浄した膜画分に陽イオン性の界面活性剤である CPC を最終濃度 0.1% になるように加え、ホモゲナイザーで懸濁し、30分間室温に放置した。これを超遠心により分画し上清に抽出成分 (図 12 - レーン Ex) を得た。その沈殿に再度 0.1% CPC を加えて、同様の操作をして上清に再抽出成分 (図 12 - レーン Re) を得た。これらに 4 mg/ml の DEAE チューブ

リンを重合させた後 10 μ M taxol で安定化させた微小管を加え 37 °C で 30 分静置した。これを超遠心することにより微小管とそれに結合するタンパク質を沈殿させた。その結果、抽出成分 (Ex) には特に微小管に結合する顕著なタンパク質は得られなかったが、再抽出成分 (Re) には見かけの分子量が 100 kDa のタンパク質 (MAMP-100) を主成分とする微小管結合タンパク質が得られた (図 12 - レーン MT (ppt))。このタンパク質を微小管から解離させるために NaCl を用いた。0 M, 0.1 M, 0.3 M, 0.5 M NaCl を含む PIPES buffer で微小管とその結合タンパク質からなる沈殿を懸濁し超遠心した。0.3 M NaCl 以上で MAMP-100 がほぼ 100 % 解離した (図 13) ので、以降 0.3 M NaCl を含む PIPES buffer で懸濁し、微小管結合タンパク質を微小管から解離させた (図 12 - レーン 0.3 M NaCl (sup))。この上清を PM buffer で透析して微小管結合膜タンパク質 (MAMPs) として以下の実験に使用した。

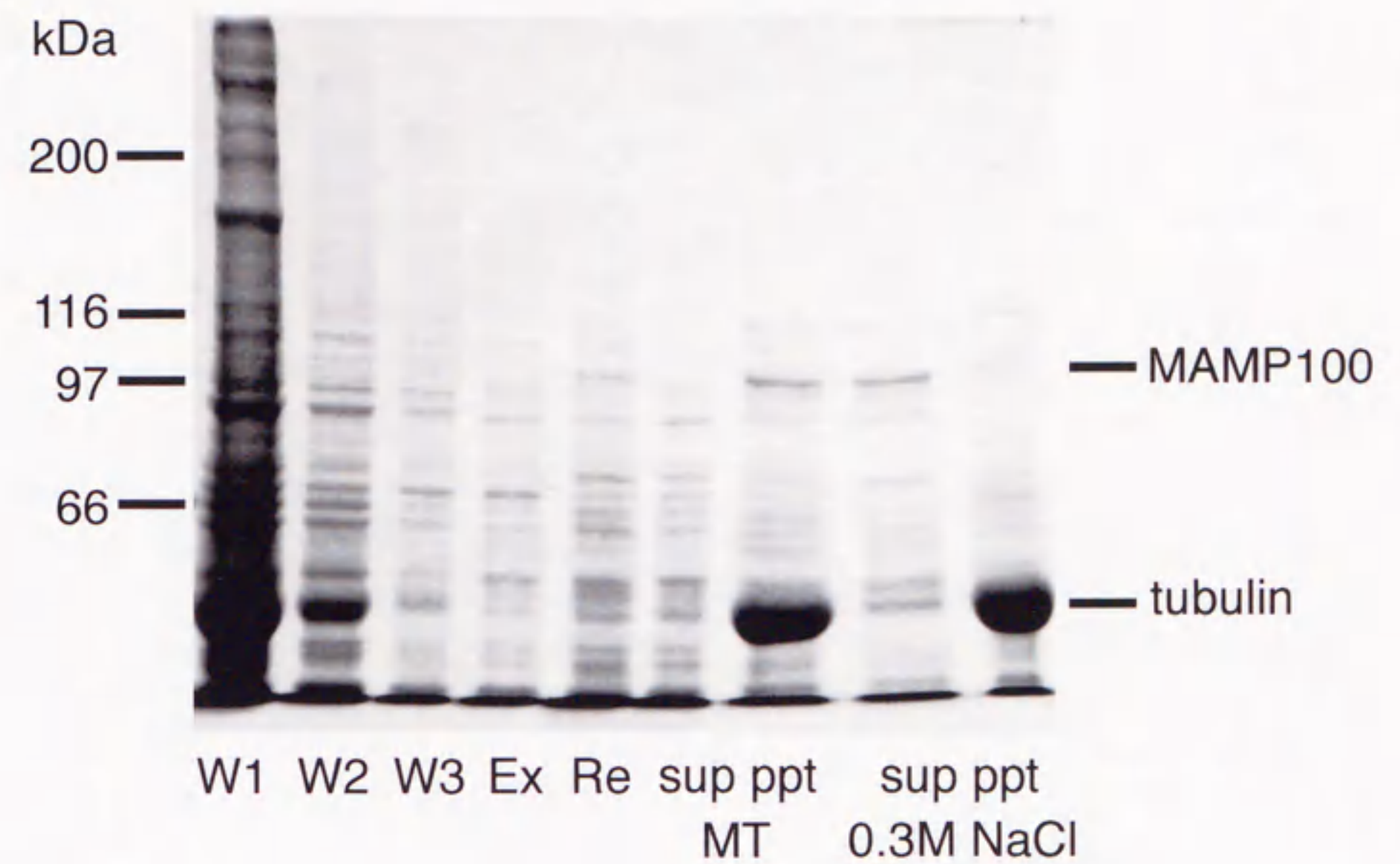


図 12. 微小管結合膜タンパク質 (MAMPs) の精製段階
 ウシの脳から MAMPs を精製するときの、各段階におけるタンパク質の組成を SDS-PAGE (7.5%) で確認した。

W1 --- 脳の膜画分を buffer D で懸濁し、超遠心した上清
 W2 --- W1 の沈澱をさらに buffer D で懸濁し、超遠心した上清
 W3 --- W2 の沈澱をさらに buffer D で懸濁し、超遠心した上清
 Ex --- W3 の沈澱に 0.1 % CPC を加え膜タンパク質を抽出し、超遠心した上清
 Re --- Ex の沈澱に 0.1 % CPC を加え膜タンパク質を抽出し、超遠心した上清
 MT --- Re と DEAE チューブリン を共沈させた上清 (sup) と沈澱 (ppt)
 0.3 M NaCl --- MT (ppt) に 0.3 M NaCl の入った buffer を加え超遠心した上清 (sup) と沈澱 (ppt)

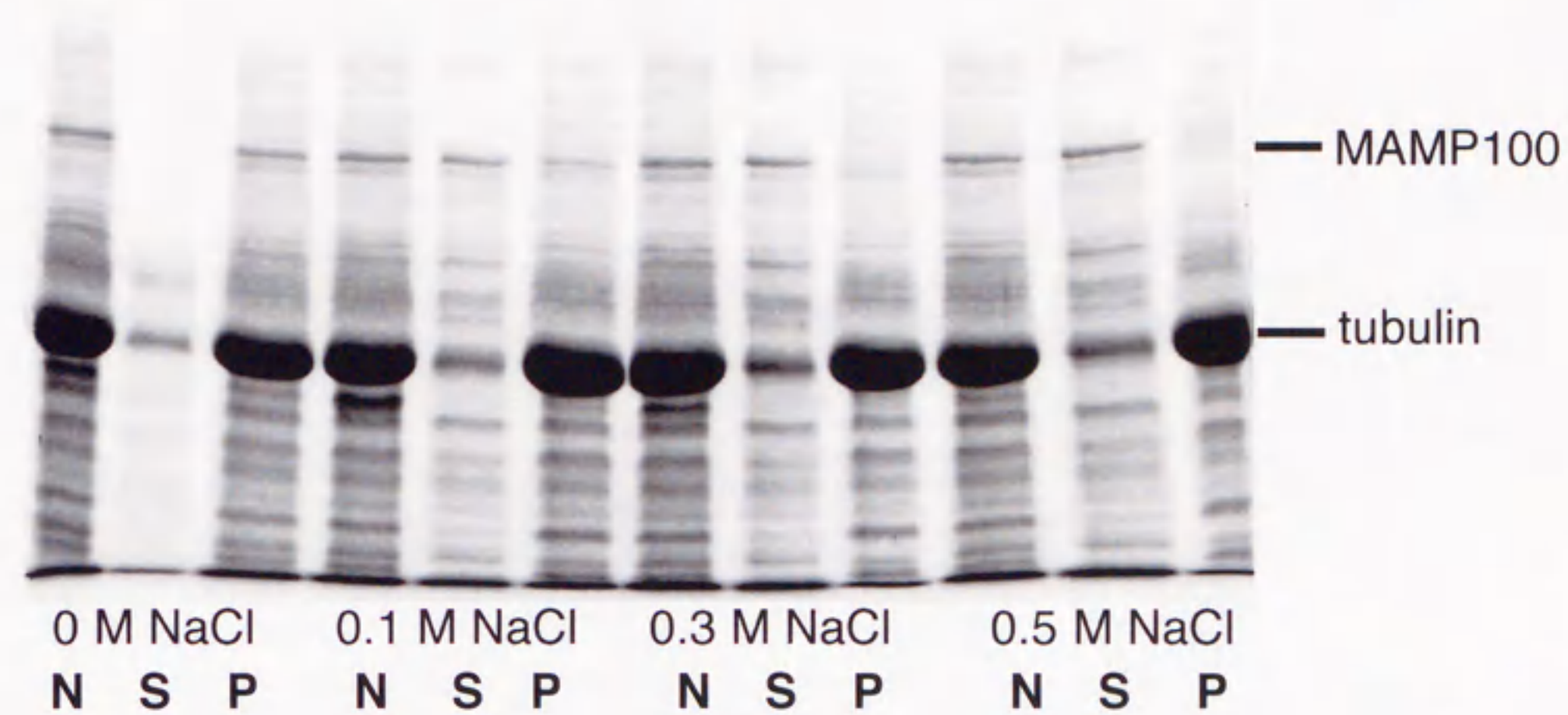


図 13. MAMPsの微小管からの解離における塩強度依存性

4 mg/ml DEAE チューブリンを重合させ 10 μ M taxol で安定化した微小管に、CPC により再抽出した膜タンパク質 (Re) を混合し 37 $^{\circ}$ C で 30 分間放置し、超遠心した沈澱に 0 M, 0.1 M, 0.3 M, 0.5 M NaCl の入った PIPES buffer を加えて懸濁し、同様に超遠心した。上清を採取し、沈殿 (P) を PIPES buffer で懸濁し、上清 (S) と遠心前のサンプル (N) とともに SDS-PAGE (10%) により解析した。

<MAMPsによる多極性リボソームの形成>

MAMPs (0.03 mg/ml MAMP-100) とC3X チューブリン (10 mg/ml) を1:1で混合してから PC:PG = 1:1 (モル比) の脂質フィルムに加えて 10 °C で懸濁することによりリボソームを作成した。このリボソームはリボソーム内にチューブリンを含み、リボソーム中 (膜内) に MAMPs を含むものとして作成した。しかし、全てのリボソームに MAMPs が膜内に取り込まれ、チューブリンも同時にリボソーム内に取り込まれる可能性は低い。C3X チューブリンを取り込ませたリボソームは二極性リボソームになる (図2) が、MAMPs のみを取り込ませたリボソームや何も取り込まれなかったリボソームは変形しない。MAMPs と微小管を混合したものを取り込ませたリボソームでも、ほとんどのリボソームは何も変化しないか、二極性リボソームになるかのどちらかであった。しかし、中には微小管の重合のみでは見られない多極型を示す特異的な形状 (多極性リボソーム) をしたものが観察された (図14)。このリボソームは様々な方向に突起を出し不定型をしているが、その中でも三角錐状の形がもっとも多く観察された。突起の長さは様々で二極性リボソームに比べて短いものが多かった。

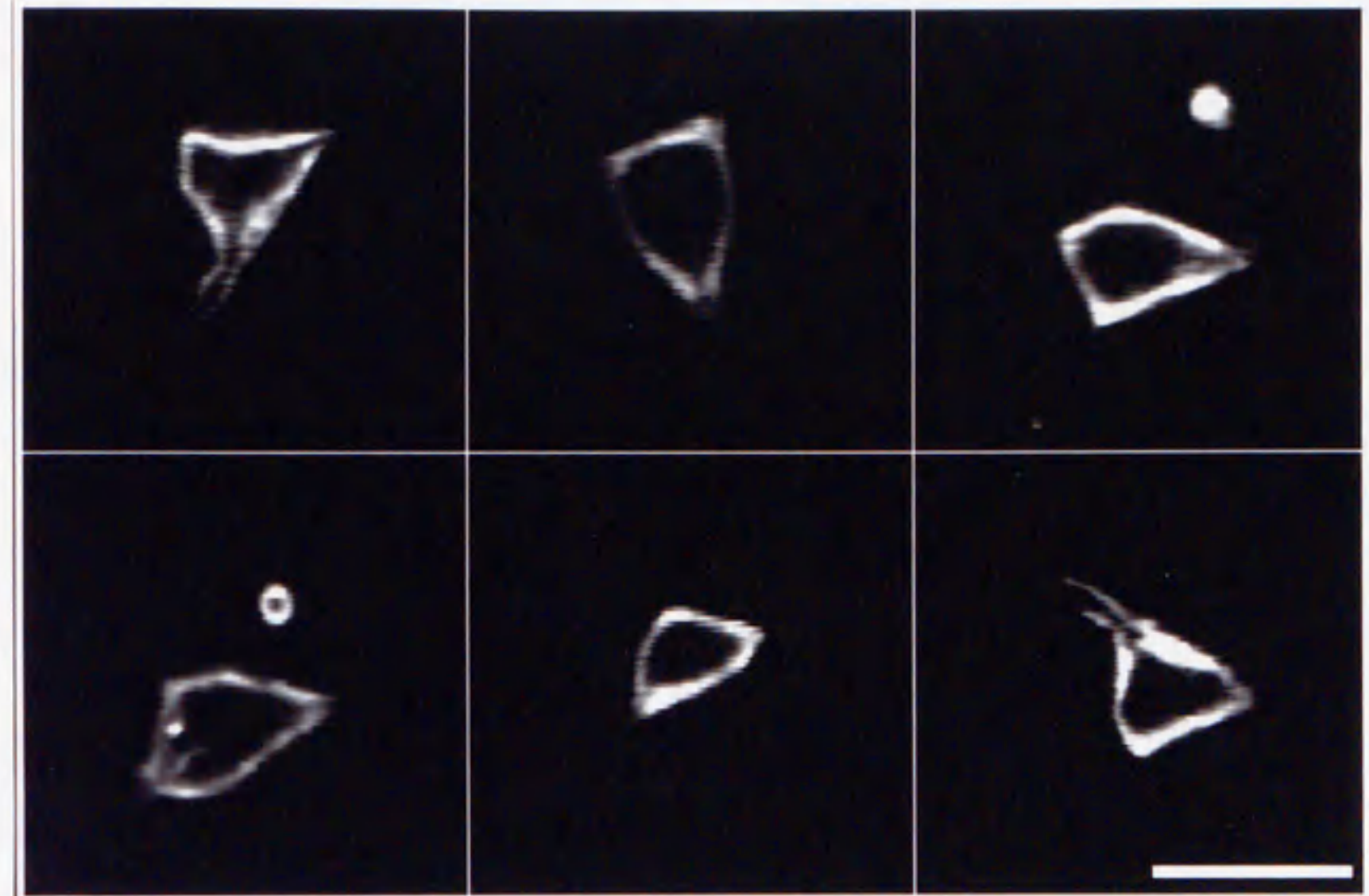


図 14. 多極性リボソーム

10 mg/ml C3X チューブリンと MAMPs (0.03 mg/ml MAMP-100) を 1 : 1 で混合し、PC : PG = 1 : 1 (モル比) の脂質フィルムに加え、30 分以上 10 °C 以下で攪拌しリボソームを作成した。リボソーム外液を PM buffer により希釈し、37 °C でリボソーム内の微小管を重合させて、リボソームの変形の様子を暗視野顕微鏡で観察した。その結果、リボソームは C3X チューブリンのみで変形させたときの二極性リボソームとは違い、様々な方向に突起を伸ばした多極性リボソームとなった。

(bar = 5 μm)

<MAMPsの微小管重合特性>

多極型に変形したリボソームの突起が短いのは、MAMPsが微小管の重合を阻害しているためなのか、それとも微小管の核形成を促進して短い微小管を多数形成するためなのかを調べるために、MAMPsとDEAEチューブリンを低温で混合し37°Cに温度を上げてからの微小管重合量を光散乱法により測定した(図15)。その結果、MAMPsを含む微小管の方がPM bufferのみを加えたコントロールに比べて重合量が増えた。しかも、微小管重合の初期段階において、その増加量が顕著であった。0分から20分までの増加量はMAMPsを含むほうが600(a.u.)で、含まないほうが300(a.u.)であり、微小管の増加量が2倍になっていることがわかる。このことから、MAMPsは微小管の重合を促進し、特にその作用は微小管重合の初期段階(核形成)において働いていることがわかった。よって、多極性リボソームの突起が短かったのは、MAMPsが微小管の重合を阻害しているのではなく、MAMPsが微小管の核形成を促進し、短い微小管が多数形成されたためであると考えられる。

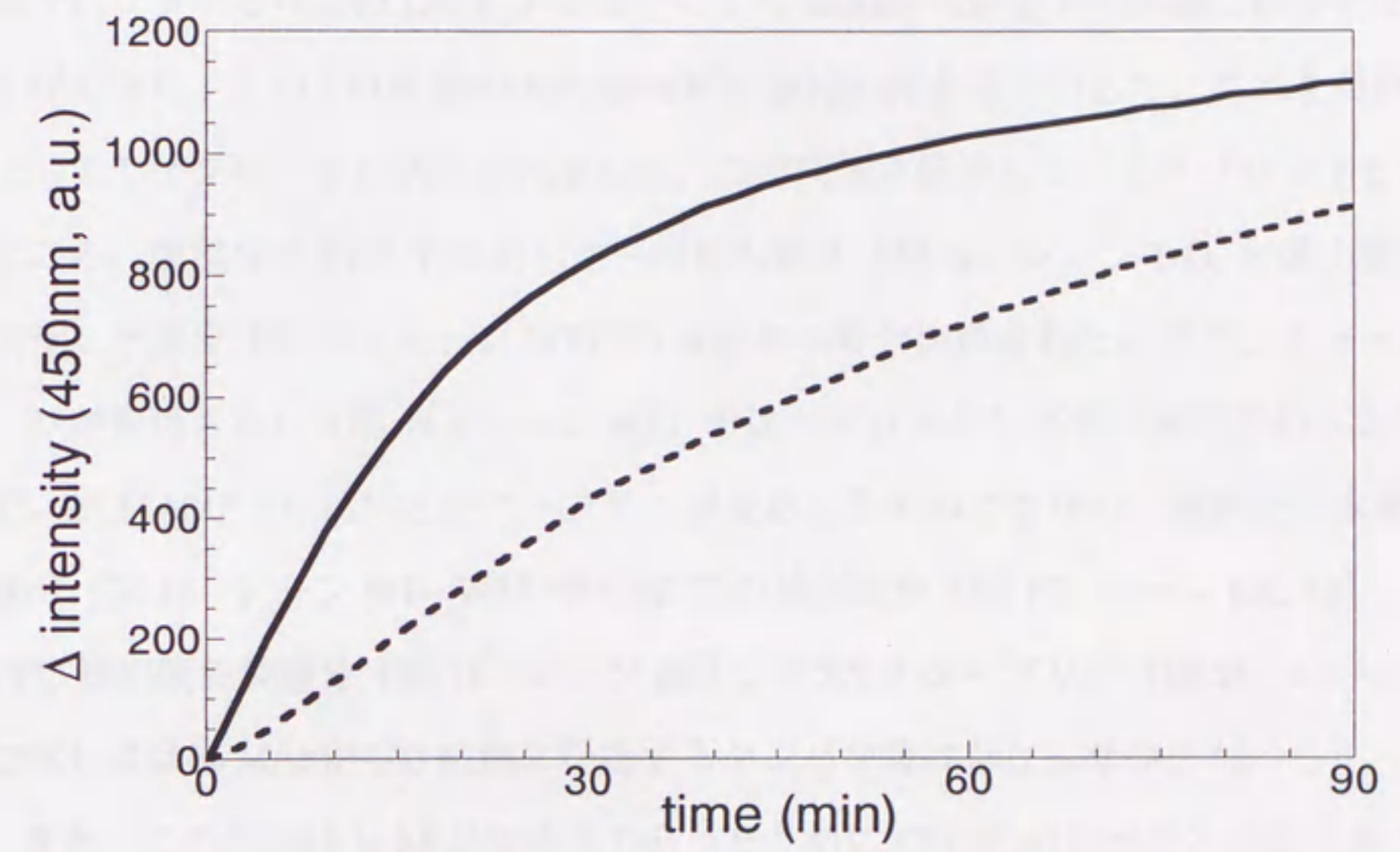


図 15. MAMPs の微小管重合活性

4.5 mg/ml DEAE チューブリンの重合過程を光散乱法によって測定した。実線は MAMPs (0.01 mg/ml MAMP-100) を加えたときで、点線は PM buffer のみを加えたときの微小管の重合の様子である。

<MAMP-100 の抗体作成とイムノプロット>

MAMPs を SDS-PAGE で泳動すると MAMP-100 を主成分とする様々な分子量のタンパク質に分離される。このタンパク質群を PVDF 膜上に転写すると、MAMP-100 以外は常用の手法で容易に転写されるのに対し、MAMP-100 のみは転写されにくく、ゲル上に残存してしまう。プロット溶液に SDS を加えたり、長時間プロットするなどの工夫をすることにより MAMP-100 を PVDF 膜に転写することができた。この PVDF 膜の MAMP-100 の部位のみを切り出して、これを免疫原としてモノクローナル抗体を作成した。この抗体を使用してイムノプロットしたところ、膜画分を CPC で抽出した三回目の画分 (図 16 - レーン Tri) と微小管と共沈した画分 (図 16 - レーン MT) の MAMP-100 が染色された。また、チューブリンが染色された (図 16 - レーン MT) ののは、ブロッキングが不適切であったため、抗 MAMP-100 抗体とチューブリンが反応したものではない。膜画分の水溶性成分 (図 16 - レーン W1 - W3) や CPC での抽出成分 (図 16 - レーン Ex, Re)、CPC 抽出後の膜画分 (図 16 - レーン ppt)、C3X チューブリン (図 16 - レーン C3X) には抗 MAMP-100 抗体に反応するタンパク質は存在しなかった。

また、この抗体は Ig M が主成分であったために CPC 再抽出成分と混合することにより容易に MAMP-100 を免疫沈降させることができ、MAMP-100 のみを大量に単離精製することができるようになった。しかし、MAMP-100 を生理的活性のある状態で抗体から単離することはできていない。そこで、このタンパク質をアミノ酸配列を決定するために用いているが、アミノ末端がブロックされているために決定が遅れており現在も進行中である。

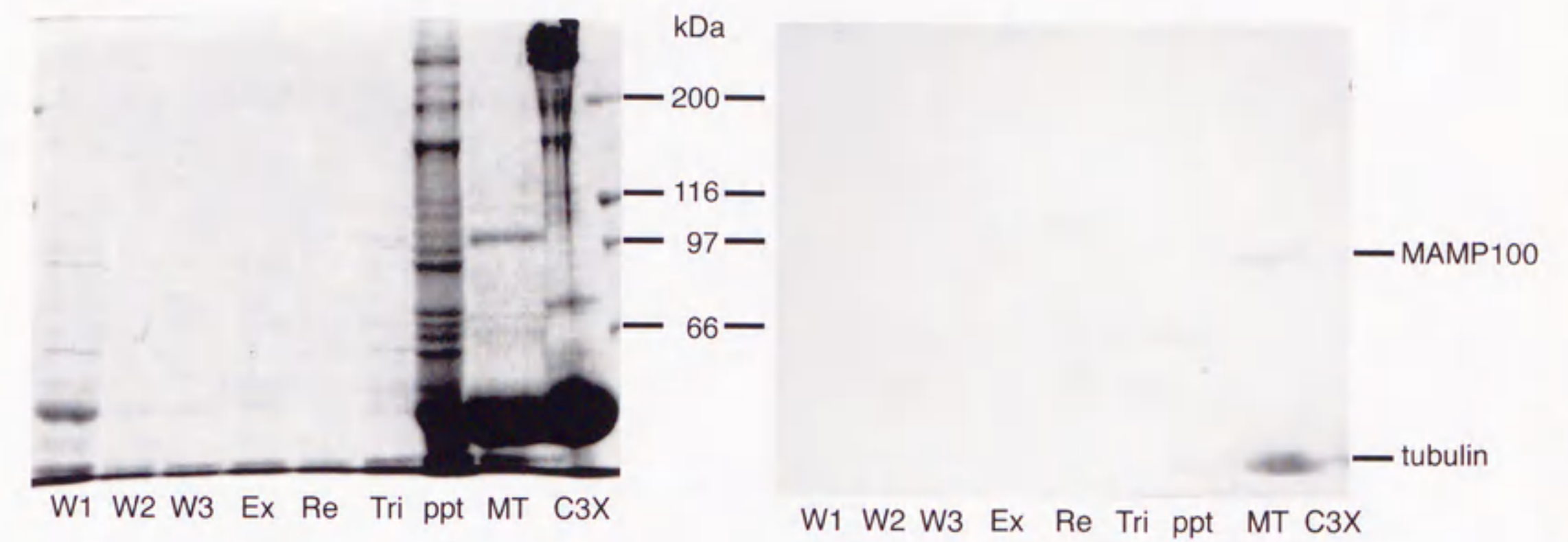


図 16. 抗 MAMP-100 モノクローナル抗体によるイムノプロット

W1 --- 脳の膜画分を buffer D で懸濁し、超遠心した上清

W2 --- W1 の沈澱をさらに buffer D で懸濁し、超遠心した上清

W3 --- W2 の沈澱をさらに buffer D で懸濁し、超遠心した上清

Ex --- W3 の沈澱に 0.1 % CPC を加え膜タンパク質を抽出し、超遠心した上清

Re --- Ex の沈澱に 0.1 % CPC を加え膜タンパク質を抽出し、超遠心した上清

Tri --- Re の沈澱に 0.1 % CPC を加え膜タンパク質を抽出し、超遠心した上清

ppt --- Tri の沈澱

MT --- Tri と DEAE チューブリン を共沈した沈澱

C3X --- C3X チューブリン

<MAMP-100 の免疫組織化学>

MAMP-100 の抗体を用いてウシ脳の免疫組織化学を行った (図 17)。抗 MAMP-100 抗体は、ウシ大脳のグリア細胞と脈絡叢 (図 17-C) と小脳のプルキンエ細胞 (図 17-D) において染色された。これに対し、チューブリン抗体を用いた対照実験では大脳の神経細胞 (図 17-A) と小脳のプルキンエ細胞 (図 17-B) が染色された。

微小管は神経細胞に多く存在していることが知られている。小脳のプルキンエ細胞も神経細胞のひとつであり、細胞内に微小管が多量に存在する。微小管に結合する膜タンパク質として単離された MAMP-100 がプルキンエ細胞内で微小管に結合している可能性は高い。しかし、グリア細胞には神経細胞ほど微小管が多量に存在していることは報告されていないにもかかわらず、微小管結合膜タンパク質である MAMP-100 が存在することは大変興味深い。このことは MAMP-100 が微小管に結合すること以外にも何らかの機能を有する可能性が高いことを示唆している。MAMP-100 が細胞内の微小管と結合しているのか、それとも他の構造に結合しているのか、細胞膜と細胞内膜小胞のどちらに存在しているのか、等については、この実験では明らかにできなかった。培養神経細胞等の免疫染色により、MAMP-100 の細胞内局在について更に詳細な解析が必要である。

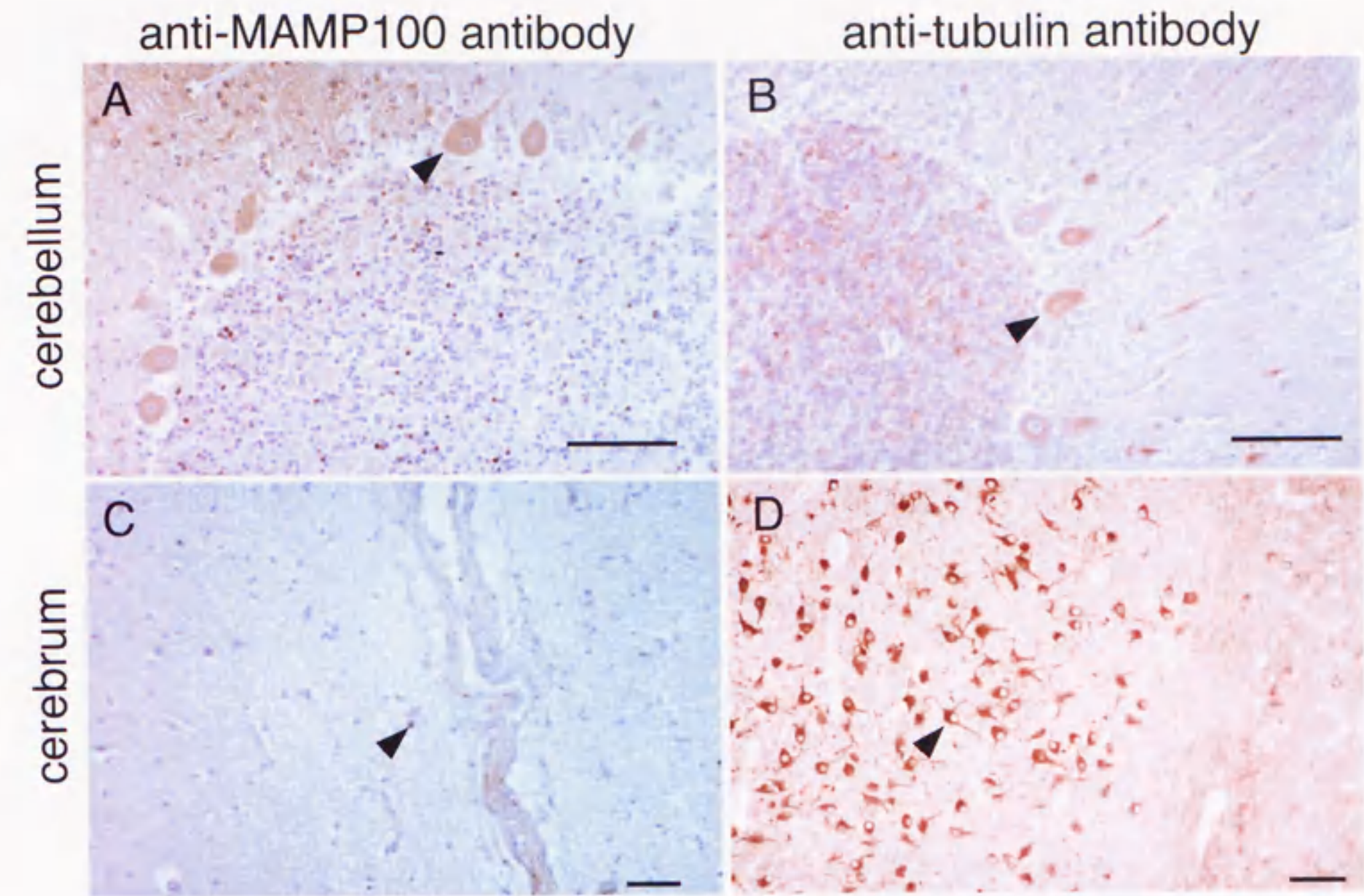


図 17. MAMP-100 モノクローナル抗体による免疫組織化学

ウシ大脳と小脳を 4%パラホルムアルデヒドで固定化し常法に従って脱水、脱脂し、パラフィンで包埋して薄切し標本とした。MAMP-100 はジアミノベンチジンで褐色に発色させ、チューブリンの方は DAKO 社製の LSAB (R) キットを用いて赤色に発色させた。

A は小脳 (cerebellum) を抗 MAMP-100 抗体で染色したもので、矢尻はプルキンエ細胞が染まっている所を示している。B は小脳 (cerebellum) を抗チューブリン抗体で染色したもので、矢尻はプルキンエ細胞が染まっている所を示している。C は大脳 (cerebrum) を抗 MAMP-100 抗体で染色したもので、矢尻はグリア細胞が染まっている所を示している。D は大脳 (cerebrum) を抗チューブリン抗体で染色したもので、矢尻は神経細胞が染まっている所を示している。(bar=100 μ m)

考察

<リボソームの形態変化>

リボソームの形は従来、球状であると考えられてきた。しかし、リボソームは様々な形をとることが最近になってわかってきた [Hotani, 1984]。しかも、その形は時間と共に変化していくことも示された。ここで問題になるのは溶液条件と脂質の組成とリボソームを作成するときの温度である。微小管をリボソーム内に組み込ませるとき、溶液条件としては PM buffer を使用し、温度は微小管が重合しないように低温 (0 ~ 10 °C) で行わなければならない。よって、様々なリン脂質を用いてリボソームが効率よくできる脂質組成を探索する必要がある。そこで、脂質の極性部分の異なる PC, PE, PG と、非極性部分の脂肪酸鎖の異なる DMPC, PC を用いて 10 °C の PM buffer 中でのリボソームの形成能を調べた。その結果、リン脂質の極性部分と非極性部分の脂肪酸鎖でリボソームを形成する上での働きに違いがあることがわかった。DMPC より PC の方がリボソームの形成能が高いことから、リン脂質の非極性部分の脂肪酸鎖はリボソームの形成能に関わっていると考えられる。これは、脂質の脂肪酸鎖の長さが一定であるよりも、不揃いの方がリボソームの流動性が増すためであると推察される。また、リン脂質の極性部分はリボソームの形態を決めていると思われる。たとえば、PC は球状のリボソームになりやすく、PE は管状のリボソームになりやすいことなどである。しかし、PC や PE だけでは PM buffer 中でリボソームを作る能力はない。リボソームをつくるには、PG が必要である。これは、リン脂質の極性部分の正味の電荷が関係していると思われる。PG は -1 で、PC や PE は 0 である。塩溶液中では電荷を持った脂質の方がリボソームを形成しやすい。しかし、電荷を持った脂質だけでは小さいリボソームが多くなってしまふ。そのため PC-PG、PE-PG という混合脂質の方が、リボソームの形成能がよかったのであろう。その他のリン脂質のリボソーム形成能についても今後明らかにしていく必要がある。例えば、Phosphatidyl inositol (PI) と MAP2 が結合するという結果 [SurrIDGE & Burns, 1994] もあるので、PI を含んだリボソーム内で C3X チューブリンを重合させるとき、リボソームがどのような形態になる

のかは、興味のあるところである。

リボソーム内における微小管の重合・伸長により突起が形成されリボソームが変形することは、微小管の重合そのものが力学的力を発生し、内部応力として働いているものと考えられる。球状のリボソームが形態を維持するのに要する力は基本的に二種類あると考えられている。一つには、均一な曲率をもつ球に比べて複雑な突起を出した形状を保つことは不安定で、そのため球状に戻ろうとする復元力が絶えず働いている [Canham, 1970]。もう一つは、突起成長に伴う体積減少がリボソーム内の浸透圧増加をもたらすため、突起を縮め体積を増加させる方向へ復元力として働いている [Umeda *et al.*, 1998]。微小管はこれらの力に抗して伸長する。また、これらの復元力により、微小管が脱重合すると突起が短縮するのである。

微小管は一本でも重合による伸長でリボソームを変形させることができると考えている。それでは、なぜ多数の微小管が存在するのに、多方向に突起がでないであろうか。それは、もっとも長い微小管がリボソームをレモン形に変形させると、他の微小管はリボソームを変形させるよりも長軸方向に並んだ方が外力に抗する仕事エネルギーが小さくてすむからだと思われる。その後、長軸方向に数本並んだ微小管により小さな突起ができ、微小管の成長によりさらに突起が伸長すると思われる (図 18)。一方、スライドガラスに付着したリボソームについては多方向に突起を出したものが観察されている [Hotani & Miyamoto, 1990]。これは、微小管が固定されリボソーム内を自由に移動・方向変化できなくなったために、それぞれの場所でリボソームを変形させて、突起を出したものであると思われる。このことから、微小管は一本でリボソームを変形させることができると推察される。

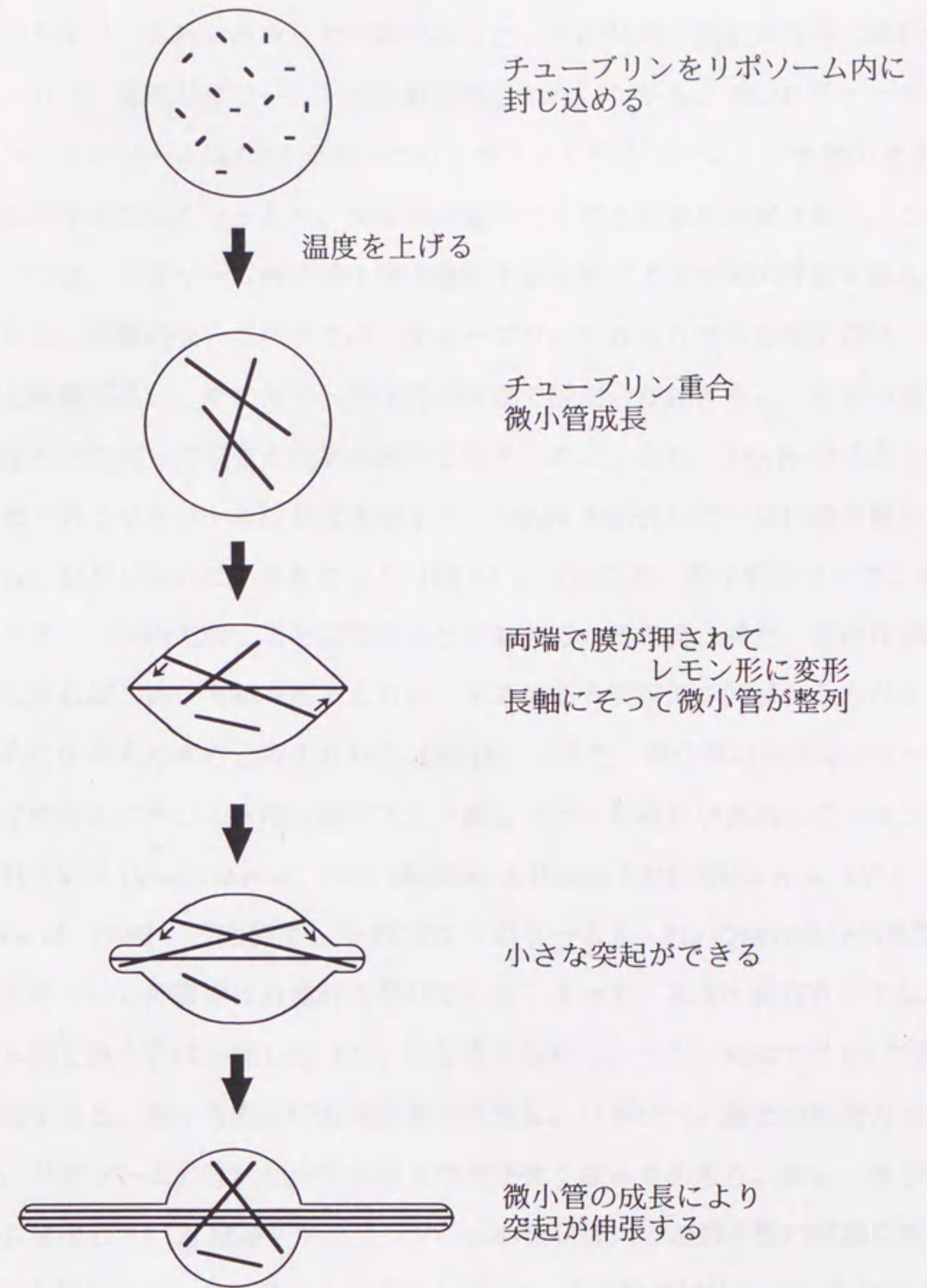


図 18. 微小管重合によるリボソームの形態変化のモデル

＜二極性から一極性リボソームへの変換メカニズム＞

MAPsの影響を排除するために、C3X チューブリンから MAPs を除いた DEAE チューブリンをリボソーム内に組み込む実験を行った。その結果、突起が片方に伸びたリボソーム（一極性リボソーム）が多数観察された。しかも、DEAE チューブリンが入ったリボソームは C3X チューブリンが入ったリボソームよりも動的変化に富み、突起が急に短くなったり、突起部が動いたりする現象も観察された。この原因の一つは、リボソーム内の微小管の動的不安定性による突起の伸縮であると考えている。脂質のない条件下では、チューブリンのみからできた微小管は一回の脱重合距離が長い。そのため、微小管の片端で脱重合が起きると、片方の突起部が短縮し元に戻ってしまう確率が高いと考えられる。また、MAPs の結合していない微小管とリボソームの共沈実験から、MAPs の結合していない微小管はリボソームと結合しないこともわかった（図 8）。そのため、微小管はブラウン運動によりリボソーム内で動くことができると思われる。その時、偶然、突起が短縮して元に戻れば、再び突起を出すよりも、すでにある突起部を伸ばした方がエネルギー的に小さくてすむと考えられる（図 19）。また、微小管の表面はチューブリン分子のカルボキシル末端の酸性アミノ酸によって負電荷が露出していることが知られている [Maccioni *et al.*, 1988; Mejillano & Himes, 1991; Wiche *et al.*, 1991; Nogales *et al.*, 1998]。今回使用した PC-PG リボソームも、PG の極性部分の負電荷によりリボソームの表面は負電荷を帯びている。よって、MAPs 非存在下ではリボソーム膜と微小管は反発し合っていると考えられる。一方、MAP2 や tau が微小管に結合すると、微小管表面の負電荷を中性化し、リボソーム膜との反発力がなくなり、リボソームの管状部内での相互作用が強くなるであろう。また、微小管表面から突出している MAP2 が、リボソームの管状部内での微小管の移動に際して物理的な抵抗になっているとも考えられる。tau の突起領域は MAP2 の突起領域よりも短いので、二極性リボソームを安定にする能力が低いと思われる。

<リボソームの形態変化における MAPs の役割>

リボソームの外液に MAPs が結合した微小管を加えて暗視野顕微鏡で観察すると、微小管にリボソームが付着しているものがあった。これは微小管に結合した状態の MAPs がリボソームと結合する可能性があることを示している。MAPs とリボソームとの共沈実験で MAP1 が強く結合し、MAP2 が僅かに結合し、tau が結合しなかったことから、MAP1 と MAP2 がリボソームと微小管を結合させていると思われる。MAP1 のうち MAP1C は細胞質 dynein の重鎖である [Paschal & Vallee, 1987]。この細胞質 dynein は膜輸送に関わっているモータータンパク質であり、最近になって酸性リン脂質と結合することが明らかになってきた [Lacey & Haimo, 1994]。また、アクチンのモータータンパク質である myosin 1 も同じく膜輸送に関わっていて、しかも脂質と直接結合することが知られている [Adams & Pollard, 1989]。これらのことから、MAP1C も脂質と直接結合していると考えられる。また、MAP1B も酸性リン脂質と相互作用することが知られている [Yamauchi *et al.*, 1997]。

しかし、精製した MAP2 ではリボソームと結合しなかった。その結合しなくなった MAP2 でも、DEAE チューブリンと混合してリボソーム内に組み込むと、二極性リボソームの割合を増加させた。また、tau もリボソームと結合しないにも拘らず、二極性リボソームの割合を増加させた。これらのことから、リボソームの形態変化の違いは脂質分子と MAPs の直接的な結合によるものではないと考えられる。どのような仕組みで形態変化に違いが出るのかについては、以下の可能性が考えられる。(1) 微小管の重合能が高いほど二極性リボソームを形成しやすく、低いほど一極性リボソームに成りやすいことから、微小管の重合能がリボソームの突起の出し方を決定している。MAPs が微小管を安定にし、より大きな力を発生させ、しかも脱重合を減らすため、突起の短縮が少なくなることが原因である。(2) 分子の形として MAP2 は tau よりも突起領域が長く [Chen *et al.*, 1992]、チューブリンに等モル混合したとき MAP2 の方が tau よりも二極性リボソームの割合を多くすることから、MAPs の突起領域が微小管と膜の間の物理的障害になっている。結合はしないが何らかの相互作用があり、微小管が膜に対して動きにくくなることが原

因である。(3) MAPs が脂質の相転位を妨げる。球状部から突起部、突起部から球状部への変換が円滑にいかなくなるのが原因である。しかし、MAP2 も tau も微小管と結合するとリボソームと結合できるようになるのかもしれない。したがって、微小管に結合した状態でリボソームとの結合を調べる必要がある。

MAPs とリボソームの共沈実験の場合は MAP2 がリボソームと結合したのに対し、MAP2 とリボソームの共沈実験では結合しなかった原因として、(1) MAP2 がチューブリンと結合するとリボソームとも結合できるように構造変化する、(2) MAP2 のリボソームとの結合能が熱処理した際に失われた、(3) MAP2 が MAP1 を介してリボソームと結合する、(4) MAP2 とリボソームを結合させる MAP2 以外のタンパク質が熱処理した際に失活した、等の可能性が考えられる。(1) であれば、チューブリンと MAP2 を混合してリボソームと共沈実験をすればわかる。(2) であれば、熱処理しない方法で MAP2 を精製して、リボソームとの共沈実験で結合を調べる。(3) であれば、MAP1 を精製して MAP2 と共にリボソームと共沈実験をすればわかることである。上記の三つの可能性が否定された場合、MAP2 とリボソームを結合させるタンパク質を単離精製する。以上の点を今後の研究課題とし、MAPs と脂質の関係をさらに詳細に追求していきたい。

<微小管結合膜タンパク質 (MAMPs) の単離>

界面活性剤は大きく分けて、非イオン性、両性、陰イオン性、陽イオン性の四つに分類される。しかし、界面活性剤の性質や特徴には未だに不明な点が多く、経験的に使用されることが多い。今回、陽イオン性の界面活性剤のひとつである Cetyl Pyridinium Chloride (CPC) を選択した理由は、膜貫通型の膜タンパク質を選択的に可溶化することがわかっていた [Wu *et al.*, 1993] ためである。その他の界面活性剤、例えば両性の界面活性剤のひとつである 3-[(3-Cholamidopropyl) dimethylammonium] -1- propanesulfonate (CHAPS) を使用した場合には、様々な膜タンパク質が可溶化されたが、その中で微小管に結合するものは抽出されなかった。一方、陽イオン性の界面活性剤は、一般的にタンパク質を変性させる作用が強いという問題がある。こうした作用が、生理的条件下では微小管に結合しないタンパク質の微小管に結合しやすい部位を露出させ、微小管と結合した可能性は否定できない。今後は、タンパク質の変性作用の少ないマイルドな界面活性剤を用いて、微小管に結合する膜タンパク質を抽出する等の検討が必要となろう。

膜タンパク質を抽出するうえで重要なことは、界面活性剤の選択の他にも生物種や組織の選択があげられる。ウシ脳の膜画分から微小管に結合する膜タンパク質を精製した理由は以下の通りである。1) 脳は微小管を多量に含む器官であり、それだけ微小管に結合するタンパク質も多量に含んでいる。2) 脳は神経細胞などの細長い細胞が多く、それだけ同じ体積の他の細胞に比べて細胞膜の面積が広い。3) 神経細胞は細胞内膜輸送が他の細胞と比較して活発なため、微小管と結合する膜小胞を多量に含んでいる。4) 様々な動物種の中でもウシは、実験に使用可能な動物の中で比較的脳が大きいことから、一度に大量の試料精製が可能である。5) 微小管を精製するのにウシ脳を使用していることから、比較的試料の入手が容易である。以上のように、微小管結合膜タンパク質の単離には、ウシ脳膜画分が最適であると考えられる。しかし、他の生物試料を用いることにより MAMP-100 とは異なる微小管結合膜タンパク質を単離できる可能性があるため、今後は培養細胞等を用いて微小管結合膜タンパク質を単離していきたい。

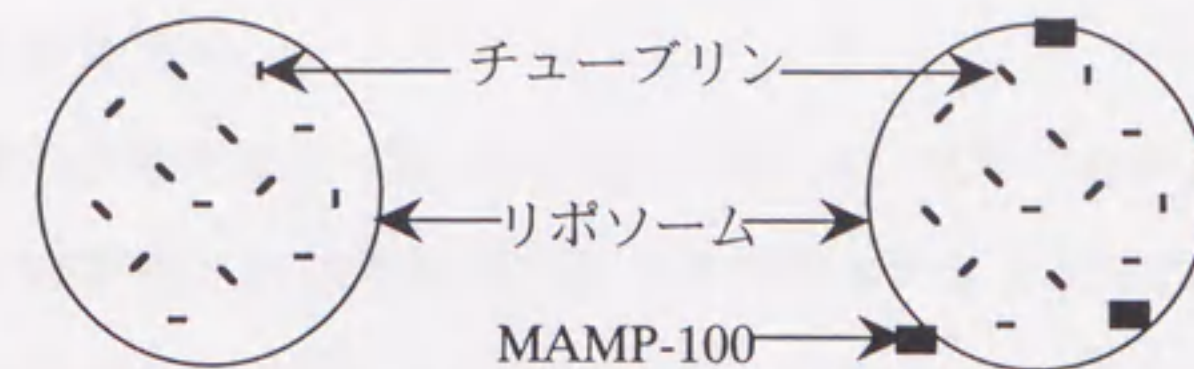
<リボソームの形態変化に及ぼす MAMPs の影響>

リボソーム内で微小管を重合させると、微小管の重合力によりリボソームに突起が形成される。その突起は微小管が重合するに従って伸長する。その結果、球状のリボソームから両極に突起を伸ばし、球状の部分と管状の部分に形態が分化した二極性リボソームになる。今回、MAMPs をリボソームに組み込んでから微小管を重合させたところ、様々な方向へ突起を出した多極性リボソームとなった。この理由としては、MAMPs が微小管の核形成を促進することと、膜に結合することがあげられる。MAMPs の微小管核形成促進能は、DEAE チューブリンと混合したときに微小管重合の初期段階での重合促進がみられた (図 15) ことから明らかである。膜結合性については、MAMPs が界面活性剤で抽出された画分であり、界面活性剤の存在下または高塩濃度の状態でなければ可溶化しないこと、それらを取り除くと凝固してしまうことから、このタンパク質は疎水性の部分を多く持っていることが考えられ、リボソーム膜の疎水性領域に存在する可能性が高い。また、MAMPs をリボソームに組み込んだものを MAMP-100 の抗体で免疫染色するとリボソームの表面が染まったことから、リボソームに MAMPs が結合していることがわかる。これらのことから MAMPs はリボソームの膜内または膜上に存在し、微小管重合の核となっている可能性が高い。よって、MAMPs から微小管が伸長し、反対側の微小管の先端でリボソーム膜を押していると考えられる (図 20)。しかし、膜タンパク質は一般的に膜内を自由に動くことができると考えられている [Singer & Nicolson, 1972] ことから、微小管が結合した MAMPs も膜内を自由に動くことができると推察される。よって、MAMPs に結合した微小管も伸長に伴って長軸方向に揃ってくると考えられる。確かに、MAMPs を組み込んだリボソームでも二極性リボソームの割合は高かった。したがって、多極性リボソームになるのはある特殊な条件でのみ生じる現象ではないかと思われる。例えば、MAMPs から伸長した微小管の反対側の先端が別の MAMPs と結合した場合には、微小管の動きが MAMPs により制限され、変形したリボソームの長軸方向に移動することができずに取り残されてしまうであろう。さらに、MAMPs がリボソーム膜に何らかの影響

C3Xチューブリンのみ

C3Xチューブリン+MAMPs

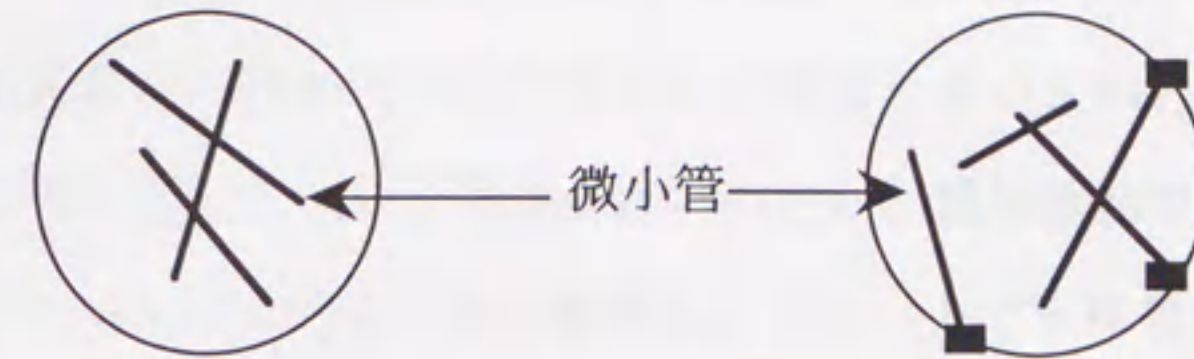
チューブリンを
リポソーム内に
封じ込める



チューブリンと
MAMPsをリポ
ソーム内に封じ
込める

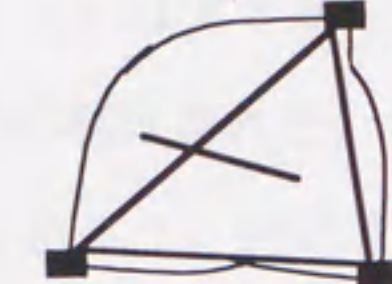
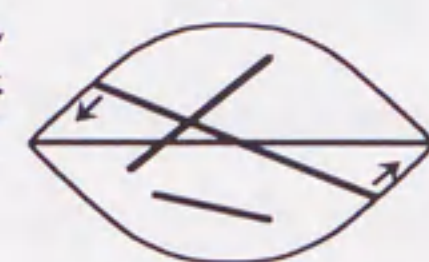
温度を上げる

チューブリン重合
微小管成長



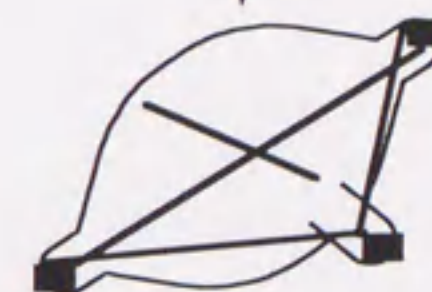
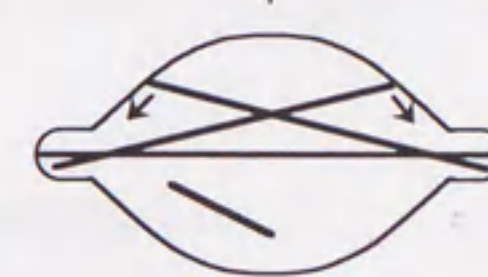
MAMPsが膜に
入り込み、そ
こから、微小
管が重合する

両端で膜が押され
てレモン形に変形
し、長軸にそって
微小管が整列



微小管の成長に
伴って膜が押さ
れてリポソーム
が変形する

小さな突起が
できる



微小管の先端
で突起が形成
される

微小管の
成長により突起が
伸長し、二極性リ
ポソームになる



微小管の
成長により膜が伸
ばされて、硬い
多極性リ
ポソーム
になる

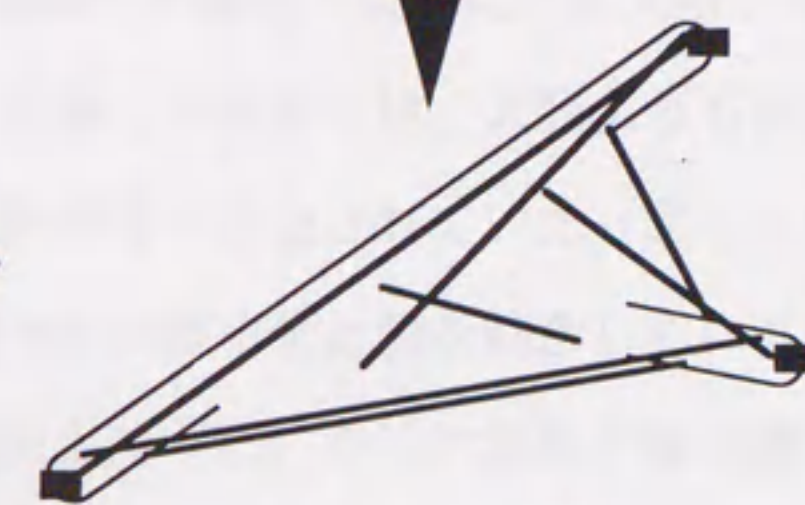


図 20. C3X チューブリンと MAMPs によるリポソームの形態変化のモデル

<MAMP-100 の特異性>

MAMP-100 を電気泳動すると 100 kDa のところにバンドがくるが、それをイムノブロットすると PVDF 膜に転写されずにポリアクリルアミドゲルの中に残る。他のタンパク質が全てゲルから出ても、MAMP-100 は 80 % 以上ゲルの中に残る。MAMP-100 を転写するには、ブロット液に SDS を加えて 5 時間以上ブロットしなければならず、それでも 50 % 以上ゲルの中に残る。この理由としては、MAMP-100 の電気泳動での移動度が他のタンパク質よりも小さいという可能性がある。MAMP-100 は実はもっと分子量が小さいのだが、電気泳動での移動度が小さいために見かけ上 100 kDa のところに移動し、ブロットでも移動度が小さいために他のタンパク質が移動しても MAMP-100 はゲル中に残るのではないかと考えられる。しかし、MAMP-100 の移動度が小さいだけなら、100 kDa よりも移動度の小さい、分子量の大きいタンパク質の方が転写されにくいはずである。実際には、100 kDa よりも大きい分子の方が MAMP-100 より先に転写された。このことから、MAMP-100 に特異的な何らかの性質を想定すべきであろう。例えば、電気泳動で MAMP-100 を流して止めると、その場所のゲルと何らかの結合をして、次にブロットしても流れなくなることが考えられる。このような MAMP-100 に特異的な性質は、今後詳細に検討すべき問題である。

<MAMP-100 の局在>

MAMP-100 の局在を調べるために、MAMP-100 のモノクローナル抗体を作成してウシ大脳と小脳の組織を免疫染色した。MAMPs の精製では主にウシ大脳から抽出してきたが、MAMP-100 のモノクローナル抗体との反応性は、大脳よりも小脳の方に高かった。特に、小脳のプルキンエ細胞が強く染色されていた (図 17-A)。プルキンエ細胞には微小管が多く、MAMP-100 が微小管と膜を結合している可能性は高い。しかし、大脳では神経細胞とは反応せずに、グリア細胞と脈絡叢に反応した (図 17-C)。グリア細胞や脈絡叢には神経細胞ほど多くの微小管は存在しないが、MAMP-100 が微小管に結合すること以外にも何らかの機能を持っている可能性はある。また、試料の固定方法を変えると、大脳の神経細胞の軸索が染色

される場合があった。固定法により抗体との反応部位が失われてしまう可能性もあるので、今後は様々な固定法を行った上で染色することにより MAMP-100 の局在を調べる必要がある。

MAMP-100 の細胞内局在を調べるために、ラットの初代培養の神経細胞とグリア細胞で抗 MAMP-100 モノクローナル抗体を用いた免疫染色を試みた。しかし、MAMP-100 が特異的に染色される部位は見つからなかった。この原因として、ウシとラットで MAMP-100 のモノクローナル抗体に対する反応性が異なる可能性、あるいは胎児のラットでは MAMP-100 が発現していない可能性等が考えられる。今後は、MAMP-100 のポリクローナル抗体を作製し、ラットとの反応性を調べた上で培養神経細胞での MAMP-100 の細胞内局在を検討する必要がある。

<微小管と MAMP-100>

微小管の表面は負に帯電し、MAPs などの微小管に結合するタンパク質の微小管結合部位は正に帯電しており、お互いが電気的に中和することによって微小管の結合がより強くなると考えられている[Littauer *et al.*, 1986; Aizawa *et al.*, 1987; Melki *et al.*, 1991]。同様に MAMP-100 も微小管との結合部位は正に帯電していると考えられる。しかし、CPC は正に帯電した部位を持つ陽イオン性の界面活性剤であり、微小管結合部位とは反発する可能性が高い。逆に、CPC が MAMP-100 の負に帯電した部分と結合して CPC 非存在下では隠れていた正に帯電した部分を露出させる可能性がある。この場合、細胞内では微小管に結合していなかったタンパク質が、正に帯電した部分を露出させることにより微小管と結合できるようになる。他の種類の界面活性剤では抽出できなかった微小管結合膜タンパク質が、陽イオン性の界面活性剤によってのみ抽出できたのはそのためなのかもしれない。しかし、今回使用した CPC がそのような性質をもっているのか否かは不明であり、今後 MAMP-100 の特性とともに検討すべき問題である。

膜画分に CPC を加えて膜タンパク質を可溶化したとき (図 12-Ex) には、MAMP-100 が抽出されなかった。MAMP-100 が他のタンパク質と相互作用していて、そのタンパク質が可溶化されないと MAMP-100 が可溶化されないのかもしれ

ない。今後、CPCで可溶化した後、異なる界面活性剤で可溶化する等の手法を用いて、より効率の良いMAMP-100の可溶化を試みていきたい。これにより多量のMAMPsが単離できるであろうし、MAMPsがリボソームへ取り込まれる確率も上昇し、多極性リボソームの割合が増えることが期待される。

以上のように、微小管や微小管に結合する膜タンパク質によって、リボソームの形態が修飾を受けるという新たな事実は、膜タンパク質の特性、ひいてはその生理学的意義を解明するうえで有用な手段となり得るものと考えられる。

謝辞

本研究を進めるに当たり、親切かつ適切な指導及び助言、提言をしてくださった名古屋大学大学院理学研究科 宝谷紘一教授に心より感謝いたします。研究上いろいろと相談にのっていただいた名古屋大学大学院理学研究科 伊藤知彦講師、滝口金吾博士にも深く感謝いたします。新規の微小管結合膜タンパク質の精製において、いろいろと助言して下さった中外製薬株式会社創薬開発研究所 吉森孝行博士に感謝いたします。また、いろいろとお世話になった分子生物第三講座のみなさまに感謝いたします。

参考文献

- Adams, R. J. & Pollard, T. D. (1989). "Binding of myosin I to membrane lipids." *Nature* **340**(6234): 565-568.
- Aizawa, H., Murofushi, H., Kotani, S., Hisanaga, S., Hirokawa, N. & Sakai, H. (1987). "Limited chymotryptic digestion of bovine adrenal 190,000-Mr microtubule-associated protein and preparation of a 27,000-Mr fragment which stimulates microtubule assembly." *J Biol Chem* **262**(8): 3782-3787.
- Bangham, A. D. (1995). "Surrogate cells or Trojan horses. The discovery of liposomes." *Bioessays* **17**(12): 1081-1088.
- Bayley, P. M., Scharma, K. K. & Martin, S. R. (1994). Microtubule dynamics *in vitro*. In *Microtubules*. New York, Wiley-Liss Inc. 111-137.
- Branton, D. (1966). "Fracture faces of frozen membranes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **55**(5): 1048-1056.
- Canham, P. B. (1970). "The minimum energy of bending as a possible explanation of the biconcave shape of the human red blood cell." *J Theor Biol* **26**(1): 61-81.
- Carrier, M. F. (1989). "Role of nucleotide hydrolysis in the dynamics of actin filaments and microtubules." *Int Rev Cytol* **115**: 139-170.
- Cassimeris, L., Pryer, N. K. & Salmon, E. D. (1988). "Real-time observations of microtubule dynamic instability in living cells." *J Cell Biol* **107**(6 Pt 1): 2223-2231.
- Chen, J., Kanai, Y., Cowan, N. J. & Hirokawa, N. (1992). "Projection domains of MAP2 and tau determine spacings between microtubules in dendrites and axons." *Nature* **360**(6405): 674-677.
- Dustin, P. (1984). *Microtubules*, 2nd edition, Springer-Verlag
- Erickson, H. P. & O'Brien, E. T. (1992). "Microtubule dynamic instability and GTP hydrolysis." *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **21**: 145-166.

- Gill, S. R., Schroer, T. A., Szilak, I., Steuer, E. R., Sheetz, M. P. & Cleveland, D. W. (1991). "Dynactin, a conserved, ubiquitously expressed component of an activator of vesicle motility mediated by cytoplasmic dynein." *J Cell Biol* **115**(6): 1639-1650.
- Henderson, C. G., Tucker, J. B., Chaplin, M. A., Mackie, J. B., Maidment, S. N., Mogensen, M. M. & Paton, C. C. (1994). "Reorganization of the centrosome and associated microtubules during the morphogenesis of a mouse cochlear epithelial cell." *J Cell Sci* **107**(Pt 2): 589-600.
- Horikoshi, Y., Furuno, T., Teshima, R., Sawada, J. & Nakanishi, M. (1994). "Thapsigargin-induced nuclear calcium signals in rat basophilic leukaemia cells." *Biochem J* **304**(Pt 1): 57-60.
- Horio, T. & Hotani, H. (1986). "Visualization of the dynamic instability of individual microtubules by dark-field microscopy." *Nature* **321**(6070): 605-607.
- Hotani, H. (1984). "Transformation pathways of liposomes." *J Mol Biol* **178**(1): 113-120.
- Hotani, H. & Horio, T. (1988). "Dynamics of microtubules visualized by darkfield microscopy: treadmilling and dynamic instability." *Cell Motil Cytoskeleton* **10**(1-2): 229-236.
- Hotani, H. & Miyamoto, H. (1990). "Dynamic features of microtubules as visualized by dark-field microscopy." *Adv Biophys* **26**: 135-156.
- Inagaki, M., Gonda, Y., Matsuyama, M., Nishizawa, K., Nishi, Y. & Sato, C. (1988). "Intermediate filament reconstitution in vitro. The role of phosphorylation on the assembly-disassembly of desmin." *J Biol Chem* **263**(12): 5970-5978.
- Itoh, T. J. & Hotani, H. (1994). "Microtubule-stabilizing activity of microtubule-associated proteins (MAPs) is due to increase in frequency of rescue in dynamic instability: shortening length decreases with binding of MAPs onto microtubules." *Cell Struct Funct* **19**(5): 279-290.
- Karr, T. L., White, H. D. & Purich, D. L. (1979). "Characterization of brain microtubule proteins prepared by selective removal of mitochondrial and synaptosomal components." *J Biol Chem* **254**(13): 6107-6111.
- Kim, H., Binder, L. I. & Rosenbaum, J. L. (1979). "The periodic association of MAP2 with brain microtubules in vitro." *J Cell Biol* **80**(2): 266-276.

- Kowalski, R. J. & Williams, R., Jr. (1993). "Microtubule-associated protein 2 alters the dynamic properties of microtubule assembly and disassembly." *J Biol Chem* **268**(13): 9847-9855.
- Lacey, M. L. & Haimo, L. T. (1994). "Cytoplasmic dynein binds to phospholipid vesicles." *Cell Motil Cytoskeleton* **28**(3): 205-212.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* **227**(259): 680-685.
- Lasic, D. D. (1995). Structure and Dynamics of Membranes. In *Handbook of Biological Physics*. Amsterdam, Elsevier Science B. V. 493-498.
- Li, D., Miller, M. & Chantler, P. D. (1994). "Association of a cellular myosin II with anionic phospholipids and the neuronal plasma membrane." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(3): 853-857.
- Littauer, U. Z., Giveon, D., Thierauf, M., Ginzburg, I. & Ponstingl, H. (1986). "Common and distinct tubulin binding sites for microtubule-associated proteins." *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**(19): 7162-7166.
- Lowry, O. H., Rosenbrough, N. Y., Farr, A. L. & Randall, R. J. (1951). "Protein measurement with the folin phenol reagent." *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
- Maccioni, R. B., Rivas, C. I. & Vera, J. C. (1988). "Differential interaction of synthetic peptides from the carboxyl-terminal regulatory domain of tubulin with microtubule-associated proteins." *Embo J* **7**(7): 1957-1963.
- Matus, A., Bernhardt, R. & Hugh-Jones, T. (1981). "High molecular weight microtubule-associated proteins are preferentially associated with dendritic microtubules in brain." *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**(5): 3010-3014.
- Mejillano, M. R. & Himes, R. H. (1991). "Assembly properties of tubulin after carboxyl group modification." *J Biol Chem* **266**(1): 657-664.
- Melki, R., Kerjan, P., Waller, J. P., Carrier, M. F. & Pantaloni, D. (1991). "Interaction of microtubule-associated proteins with microtubules: yeast lysyl- and valyl-tRNA synthetases and tau 218-235 synthetic peptide as model systems." *Biochemistry* **30**(49): 11536-11545.
- Mitchison, T. & Kirschner, M. (1984). "Dynamic instability of microtubule growth." *Nature* **312**(5991): 237-242.

- Miyata, H. & Hotani, H. (1992). "Morphological changes in liposomes caused by polymerization of encapsulated actin and spontaneous formation of actin bundles." *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(23): 11547-11551.
- Murata, M., Itoh, T. J., Kagiwada, S., Hishida, R., Hotani, H. & Ohnishi, S. (1992). "Interaction of the Golgi membranes isolated from rabbit liver with microtubules in vitro." *Biol Cell* **75**(2): 127-134.
- Murphy, D. B., Johnson, K. A. & Borisy, G. G. (1977). "Role of tubulin-associated proteins in microtubule nucleation and elongation." *J Mol Biol* **117**(1): 33-52.
- Nakato, K., Furuno, T., Inagaki, K., Teshima, R., Terao, T. & Nakanishi, M. (1992). "Cytosolic and intranuclear calcium signals in rat basophilic leukemia cells as revealed by a confocal fluorescence microscope." *Eur J Biochem* **209**(2): 745-9.
- Nogales, E., Wolf, S. G. & Downing, K. H. (1998). "Structure of the alphabeta tubulin dimer by electron crystallography [see comments]." *Nature* **391**(6663): 199-203.
- Pantaloni, D., Carrier, M. F., Simon, C. & Batelier, G. (1981). "Mechanism of tubulin assembly: role of rings in the nucleation process and of associated proteins in the stabilization of microtubules." *Biochemistry* **20**(16): 4709-4716.
- Paschal, B. M. & Vallee, R. B. (1987). "Retrograde transport by the microtubule-associated protein MAP 1C." *Nature* **330**(6144): 181-183.
- Pierre, P., Scheel, J., Rickard, J. E. & Kreis, T. E. (1992). "CLIP-170 links endocytic vesicles to microtubules." *Cell* **70**(6): 887-900.
- Ponstingl, H., Krauhs, E. & Little, M. (1983). "Tubulin amino acid sequence and consequences." *J Submicrosc Cytol* **15**(1): 359-362.
- Pryer, N. K., Walker, R. A., Skeen, V. P., Bourns, B. D., Soboeiro, M. F. & Salmon, E. D. (1992). "Brain microtubule-associated proteins modulate microtubule dynamic instability in vitro. Real-time observations using video microscopy." *J Cell Sci* **103**(Pt 4): 965-976.
- Reaven, E. & Azhar, S. (1981). "Effect of various hepatic membrane fractions on microtubule assembly-with special emphasis on the role of membrane phospholipids." *J Cell Biol* **89**(2): 300-308.

- Rickard, J. E. & Kreis, T. E. (1990). "Identification of a novel nucleotide-sensitive microtubule-binding protein in HeLa cells." *J Cell Biol* **110**(5): 1623-1633.
- Sackett, D. L., Bhattacharyya, B. & Wolff, J. (1985). "Tubulin subunit carboxyl termini determine polymerization efficiency." *J Biol Chem* **260**(1): 43-45.
- Saitoh, A., Takiguchi, K., Tanaka, Y. & Hotani, H. (1998). "Opening-up of liposomal membranes by talin." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(3): 1026-1031.
- Sammak, P. J. & Borisy, G. G. (1988). "Direct observation of microtubule dynamics in living cells." *Nature* **332**(6166): 724-726.
- Schroer, T. A. & Sheetz, M. P. (1991). "Two activators of microtubule-based vesicle transport." *J Cell Biol* **115**(5): 1309-1318.
- Singer, S. J. & Nicolson, G. L. (1972). "The fluid mosaic model of the structure of cell membranes." *Science* **175**(23): 720-731.
- Sloboda, R. D., Dentler, W. L. & Rosenbaum, J. L. (1976). "Microtubule-associated proteins and the stimulation of tubulin assembly in vitro." *Biochemistry* **15**(20): 4497-4505.
- Surridge, C. D. & Burns, R. G. (1992). "Phosphatidylinositol inhibits microtubule assembly by binding to microtubule-associated protein 2 at a single, specific, high-affinity site." *Biochemistry* **31**(26): 6140-6144.
- Surridge, C. D. & Burns, R. G. (1994). "The difference in the binding of phosphatidylinositol distinguishes MAP2 from MAP2C and Tau." *Biochemistry* **33**(26): 8051-8057.
- Tokutake, S. (1990). "On the assembly mechanism of neurofilaments." *Int J Biochem* **22**(1): 1-6.
- Umeda, T., Nakajima, H. & Hotani, H. (1998). "Theoretical analysis of shape transformations of liposomes caused by microtubule assembly." *J. Phys. Soc. Japan* **67**: 682-688.
- Vale, R. D. (1993). Motor proteins. In *Guidebook to the Cytoskeletal and Motor proteins*. Oxford, UK, Oxford University Press. 175-212.
- Vale, R. D. & Hotani, H. (1988). "Formation of membrane networks in vitro by kinesin-driven microtubule movement." *J Cell Biol* **107**(6 Pt 1): 2233-2241.

- Vallee, R. (1993). "Molecular analysis of the microtubule motor dynein." *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(19): 8769-8772.
- Vallee, R. B., DiBartolomeis, M. J. & Theurkauf, W. E. (1981). "A protein kinase bound to the projection portion of MAP 2 (microtubule-associated protein 2)." *J Cell Biol* **90**(3): 568-576.
- Voter, W. A. & Erickson, H. P. (1982). "Electron microscopy of MAP 2 (microtubule-associated protein 2)." *J Ultrastruct Res* **80**(3): 374-382.
- Walker, R. A., O'Brien, E. T., Pryer, N. K., Soboeiro, M. F., Voter, W. A., Erickson, H. P. & Salmon, E. D. (1988). "Dynamic instability of individual microtubules analyzed by video light microscopy: rate constants and transition frequencies." *J Cell Biol* **107**(4): 1437-1448.
- Weber, K. & Osborn, M. (1985). "The molecules of the cell matrix." *Sci Am* **253**(4): 110-120.
- Wiche, G., Oberkanins, C. & Himmler, A. (1991). "Molecular structure and function of microtubule-associated proteins." *Int Rev Cytol* **124**: 217-273.
- Wu, L. N., Yoshimori, T., Genge, B. R., Sauer, G. R., Kirsch, T., Ishikawa, Y. & Wuthier, R. E. (1993). "Characterization of the nucleational core complex responsible for mineral induction by growth plate cartilage matrix vesicles." *J Biol Chem* **268**(33): 25084-25094.
- Yamauchi, E., Titani, K. & Taniguchi, H. (1997). "Specific binding of acidic phospholipids to microtubule-associated protein MAP1B regulates its interaction with tubulin." *J Biol Chem* **272**(36): 22948-22953.
- Yamauchi, P. S. & Purich, D. L. (1987). "Modulation of microtubule assembly and stability by phosphatidylinositol action on microtubule-associated protein-2." *J Biol Chem* **262**(7): 3369-3375.

Morphological Transformation of Liposomes Caused by Assembly of Encapsulated Tubulin and Determination of Shape by Microtubule-associated Proteins (MAPs)

Tomoyuki Kaneko, Tomohiko J. Itoh and Hirokazu Hotani*

Department of Molecular Biology, Graduate School of Science, Nagoya University Furo-cho, Chikusa-ku, Nagoya 464-8602, Japan

To examine the role of cytoskeletons in cellular morphogenesis, we generated liposomes encapsulating tubulin, with or without microtubule-associated proteins (MAPs), and observed their transformation using dark-field microscopy. When tubulin was polymerized with MAPs in liposomes, liposomes were transformed into a "bipolar" shape with a central sphere and two tubular membrane protrusions that aligned in a straight line. On the other hand, when pure tubulin was polymerized in liposomes without MAPs, they initially transformed into a bipolar shape but subsequently re-transformed into a "monopolar" shape, i.e. a sphere with only one straight tubular portion. This re-transformation occurred in two ways: first, by shortening of one of the tubular portions due to microtubule disassembly; or second, by fluctuation of the central sphere toward one of the ends without shortening of the tube portion. MAPs prevented this re-transformation, and their role in stabilizing the shape of transformed liposomes was studied by the co-sedimentation method. The results show that MAPs, particularly MAP1 and MAP2, mediate binding between microtubules and the liposomal membrane. However, MAP2 by itself did not bind to liposomes, but was able to stabilize bipolar liposomes. This stabilization is caused not only by direct links between microtubules and liposomes, but also by prevention of Brownian motion of microtubules through an increase in friction.

© 1998 Academic Press

Keywords: liposome; microtubule; MAPs; shape change; dark-field microscopy

*Corresponding author

Introduction

Every living cell possesses its own specific shape, which has a close relationship with its function. For instance, nerve cells have dendritic and axonal projections necessary to make neuronal networks, epithelial cells have columnar shape and form sheet structures, erythrocytes have a concave disk form, and cardiac cells are spindle shaped. In addition, cells change their morphologies in response to environmental conditions or to their internal stage, such as in the cell cycle or in development.

Abbreviations used: MAP, microtubule-associated protein; PC, phosphatidylcholine; PG, phosphatidylglycerol.

E-mail address of the corresponding author: hotani@bunshi1.bio.nagoya-u.ac.jp

The morphology of each cell is considered to be determined mainly by the cytoskeleton which consists of microtubules, microfilaments and intermediate filaments. Among those, microtubules have been well studied, especially with respect to their dynamic behavior during polymerization and depolymerization (Carlier, 1989; Erickson & O'Brien, 1992; Bayley *et al.*, 1994). Microtubules are cylindrical polymers which consist of α and β tubulin heterodimers and a variety of other components, called microtubule-associated proteins (MAPs), which bind to their outer surface (Kim *et al.*, 1979; Votor & Erickson, 1982). Individual microtubules repeat alternating phases of polymerization and depolymerization, both *in vitro* and in living cells, a process known as "dynamic instability" (Mitchison & Kirschner, 1984; Horio & Hotani, 1986; Walker *et al.*, 1988; Cassimeris *et al.*, 1988; Sammak & Borisy, 1988).

In cell-free systems, MAPs have been shown to regulate dynamic instability especially by decreasing the frequency of transition probability from the polymerization to the depolymerization phase (Hotani & Horio, 1988; Pryer *et al.*, 1992; Kowalski & Williams, 1993; Itoh & Hotani, 1994). Tubulin is an acidic protein with a high anionic charge excess at C termini of both the α and β monomers (Ponstingl *et al.*, 1983; Sackett *et al.*, 1985). Both MAP2 and tau, which are major components of neuronal MAPs, are well characterized and possess common structural properties. They are fibrous molecules made up of relatively short C-terminal microtubule-binding domains and long N-terminal "tails", or projection domains, which extend freely from the microtubule surface (Kim *et al.*, 1979; Vallee *et al.*, 1981).

Liposomes are closed vesicles of lipid bilayer membranes (Bangham, 1995), and their characteristics have been well studied as a simplified model of biological membranes (Lasic, 1995). Liposomes are also useful to study interactions between cellular components and membranes because various molecules can be encapsulated within them by swelling dried phospholipid mixtures in solutions containing cellular components. In order to elucidate the role of the cytoskeleton in cellular morphogenesis, model systems using liposomes encapsulating cytoskeletal proteins have been developed using tubulin (Hotani & Miyamoto, 1990) or actin (Miyata & Hotani, 1992). Upon polymerization of the cytoskeleton, liposomes are transformed into characteristic shapes, which depend on the types of encapsulated cytoskeletal proteins. In the case of actin polymerization, liposomes were transformed into stable disk or dumbbell-shapes. In contrast, two tubular projections developed from antipodal positions on spherical liposomes when microtubules polymerized. Both projections were straight, rigid, uniform in diameter and elongated in opposite directions. These observations indicate that the cytoskeleton can generate mechanical forces capable of transforming the phospholipid membrane. Characteristics of this force depended on the type of cytoskeleton, since transformed shapes of liposomes differed between actin-dependent and microtubule-dependent transformations. Our model systems consist of only a few components, liposomes and cytoskeletal proteins, so that they are quite useful in analyzing the roles of various cytoskeletal components in cellular morphogenesis.

Negatively charged phospholipids have been reported to inhibit microtubule assembly (Reaven & Azhar, 1981; Yamauchi & Purich, 1987; SurrIDGE & Burns, 1992), which is inhibited to a greater degree as the negative charge of the phospholipid increases, suggesting that electrostatic interactions between the head group of the phospholipid and components of the microtubule are responsible for the inhibition. Indeed, SurrIDGE & Burns (1994) reported that anionic phospholipids were able to interact with MAP2 and tau at their cationic C-

terminal domains, which are responsible for the promotion of tubulin polymerization (Littauer *et al.*, 1986; Aizawa *et al.*, 1987; Melki *et al.*, 1991). Therefore, MAPs can play an important role in the morphogenesis of liposomes caused by microtubule polymerization, and detailed characterization of the effects of MAPs on liposome transformation are required.

Here we describe the roles of MAPs in the microtubule-dependent transformation of liposomes, as visualized with high-intensity dark-field microscopy. Among the various types of microscopy, dark-field microscopy is the best method to observe the intact three-dimensional morphology of liposomes. It gives high contrast images of unilamellar liposomes in solution in real time without requiring image processing. When microtubules are polymerized in liposomes in the presence of MAPs, they transform into "bipolar liposomes," which consist of two tubular portions projecting from a central spherical portion. In the absence of MAPs, however, liposomes transform into "monopolar liposomes," which consist of one tubular projection and one spherical portion. We show that these shape differences arise from the suppression of internal movement of microtubules by MAPs.

Results

Morphological changes of liposomes caused by microtubule assembly

Liposomes made from phosphatidylcholine (PC) or phosphatidylglycerol (PG) took a spherical shape in PM-buffer (0.1 M Pipes (pH 6.9), 0.5 mM $MgSO_4$, 1 mM EGTA, 1 mM GTP), and fluctuated slightly in shape. In a previous study (Hotani & Miyamoto, 1990), transformation of liposomes was attempted by encapsulating a crude tubulin fraction, that contained MAPs, into liposomes. As the encapsulated tubulin was polymerized in liposomes by raising the temperature to 37°C, spherical liposomes began to elongate and transform into "lemon" shapes. Tubular membrane structures then developed from both tips of these lemon-shaped liposomes and grew steadily longer; both tubes were straight, rigid, uniform in diameter and were aligned in a straight line. Figure 1 shows that two tubes on an individual liposome possess a constant diameter except at their very distal ends. However, the value of the diameter on each liposome varied one by one. In the case of a thick tube, it gives an image of parallel lines under a dark-field microscope, so that we can obtain an exact diameter of a tube from the center-to-center distance of the parallel lines. It reaches 0.5 μm in the thickest tube.

Finally, liposomes which originally had a spherical shape transformed into a "bipolar" shape, which consisted of two kinds of morphologically different portions: a central sphere and straight tubes. Our current study (Figure 1(a)) confirmed



Figure 1. Transformed liposomes caused by microtubule assembly. Liposome transformations were initiated by raising the temperature to 37°C, and observed by dark-field microscopy. (a) Bipolar-shaped liposomes transformed by polymerization of 7 mg/ml encapsulated crude tubulin containing MAPs. (b) Monopolar-shaped liposomes transformed by polymerization of 10 mg/ml encapsulated pure tubulin. The scale bar represents 5 μm .

those findings. The diameter of the central sphere usually decreased by 10 ~ 20 % as tubes elongated, suggesting that the total membrane area of a liposome was kept constant during the transformation. Approximately 80% of transformed liposomes had the bipolar shape, while the remaining 20% possessed only one tubular portion that projected from the spherical portion. We call this latter type of liposome a "monopolar" liposome. Both types of transformed liposomes were stable during the 30 minute observation period, indicating that these morphologies were the final states of microtubule dependent transformation.

Polymerization of the encapsulated tubulin is responsible for the transformation of liposomes. When bovine serum albumin (BSA) was used instead of tubulin, no transformation occurred,

even if the temperature was raised to 37°C. This transformation of liposomes indicates that microtubule polymerization can generate mechanical forces strong enough to deform membrane vesicles.

On the other hand, when pure tubulin was encapsulated, almost all liposomes transformed into monopolar shapes (Figure 1(b)). Although some bipolar liposomes appeared a few minutes after raising the temperature, most of them assumed the monopolar shape within 15 minutes. Monopolar liposomes transformed by the polymerization of pure tubulin took longer to form tubular portions than did bipolar liposomes transformed by the polymerization of tubulin and MAPs. When bipolar liposomes were formed using 10 mg/ml tubulin together with 2 mg/ml

MAPs, the average total length was $8.9(\pm 2.6) \mu\text{m}$ ($n = 23$). In contrast, monopolar liposomes transformed using 10 mg/ml tubulin without MAPs had an average total length of $17(\pm 4.9) \mu\text{m}$ ($n = 22$).

How are bipolar liposomes re-transformed into monopolar ones? One can assume that the shortening of one tubular portion of a bipolar liposome causes the bipolar-to-monopolar transformation. Since microtubules are quite unstable in the absence of MAPs (Pryer *et al.*, 1992; Itoh & Hotani, 1994), the tubular portion might shorten due to depolymerization of the microtubule. Indeed, we observed that tubular portions of bipolar liposomes shortened as the bipolar shape re-transformed into the monopolar type.

Surprisingly, however, some bipolar liposomes altered their shapes without any change in the total length of tubular portions. This type of morphological change was clearly observed when bipolar liposomes were attached to a glass surface at their spherical portion. As shown in Figure 2, tubular portions of bipolar liposomes

could fluctuate in position without changing the length of its major axis. During such fluctuation, the end of either tubular portion would occasionally move to reach the spherical portion, resulting in conversion into a monopolar liposome. Once a bipolar liposome transformed into a monopolar one, it never reverted to the original bipolar form.

Stabilization of bipolar liposomes by MAPs

As described above, liposomes which encapsulated tubulin only transformed into monopolar shapes (Figure 1(b)), whereas liposomes which encapsulated tubulin together with MAPs transformed into bipolar shapes (Figure 1(a)). Therefore, MAPs might be responsible for determining the shape of transformed liposomes. To confirm this possibility, we examined liposome shapes as a function of MAPs concentrations. Various concentrations of MAPs were encapsulated into liposomes at 5 mg/ml or 10 mg/ml tubulin, and were incubated at 37°C for 30 minutes. As shown in Figure 3, the percentage of bipolar-shaped liposomes in the total number of transformed liposomes depended on MAPs concentrations. The percentage increased with increasing MAPs concentrations, but did not depend on the concentration of pure tubulin. The effect of MAPs was saturated at approximately 80% bipolar liposomes, since about 20% of monopolar liposomes remained even at the highest concentration of MAPs. These values are comparable to those obtained during transformation with crude tubulin. The positional fluctuation of spherical portions relative to tubular portions was prevented in a manner which depended on the added MAPs concentration. These results support the

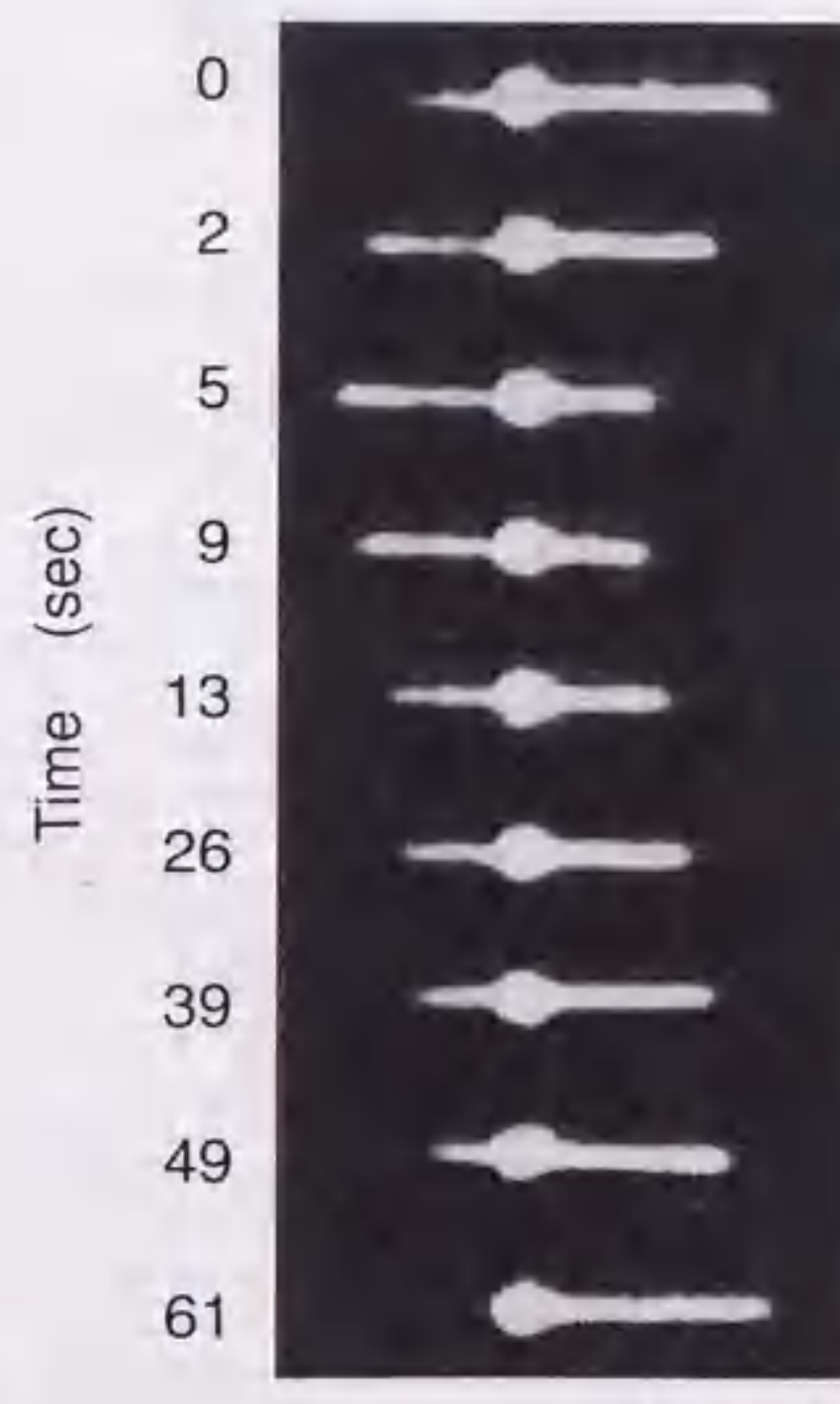


Figure 2. Conversion of a bipolar liposome into a monopolar liposome by fluctuation of the tubular portion. A sequence of photographs shows the one-dimensional fluctuation of the tubular portion of a bipolar-shaped liposome that was made by polymerization of pure tubulin. The liposome is attached to a glass surface at its spherical portion. The scale bar represents 5 μm .

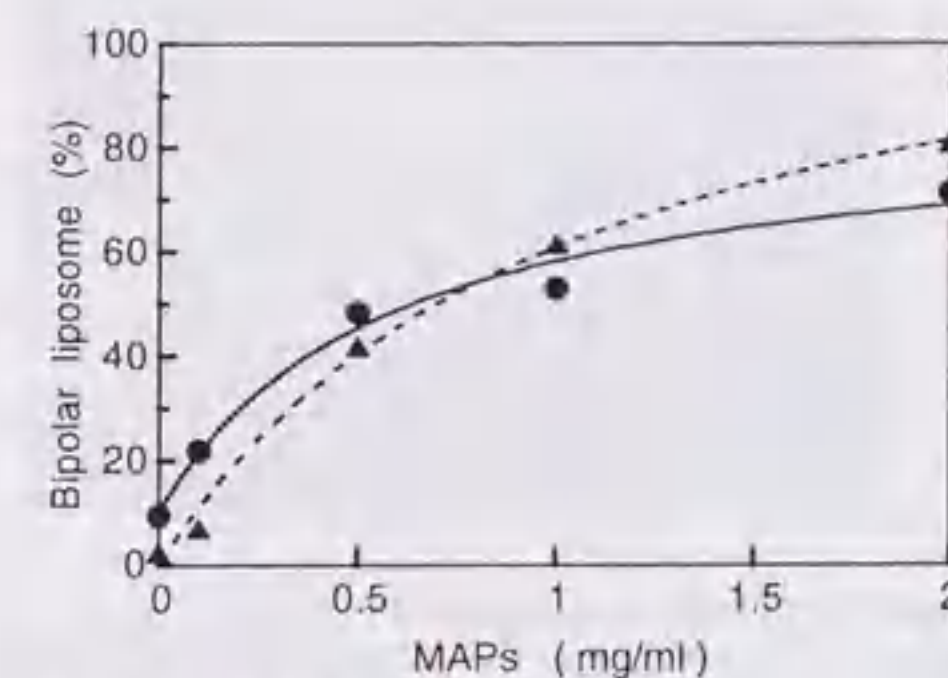


Figure 3. Effects of MAPs on the morphology of transformed liposomes. The percentage of bipolar-shaped liposomes in the total transformed liposome population was plotted against the concentration of co-encapsulated MAPs. Tubulin concentration was fixed at 50 μM (continuous line) or 100 μM (broken line). The samples were observed 30 minutes after raising the temperature to 37°C, and more than 100 transformed liposomes were observed at each data point.

hypothesis that MAPs play a crucial role in stabilizing the shape of bipolar liposomes.

Binding between microtubules and liposomes in the presence of MAPs

We examined the ability of microtubules to bind to liposomes by centrifugation in stepwise sucrose density gradients. This method allows us to distinguish microtubules bound to liposomes from free microtubules (Murata *et al.*, 1992). Liposomes do not migrate downwards through the sucrose layer due to their buoyancy, but rather they accumulate on top of the sucrose layer. If microtubules bind to liposomes, they will be detected in the middle fraction (M) obtained from the top of the sucrose layer. In the absence of liposomes, all microtubules sedimented to the bottom of the gradient (Figure 4, lanes 8 and 16), and in the absence of MAPs, microtubules were not detected in the M fraction (Figure 4, lanes 11 and 15). The weak tubulin band detected in these lanes might be due to free tubulin, since the supernatant (S) fraction showed almost the same intensity of the tubulin band (Figure 4, lanes 10 and 14). These results indicate that microtubules alone could not bind to liposomes. Only when tubulin was combined with MAPs and liposomes, was the tubulin band significantly detectable in the M fraction where liposomes accumulated (Figure 4, lane 3). This indicates that microtubules can bind liposomes in the presence of MAPs.



Figure 4. MAPs-mediated binding of microtubules to liposomes. The MAPs-mediated binding ability of microtubules to liposomes was investigated using co-sedimentation. Taxol-stabilized microtubules were incubated in the presence or absence of liposomes, with or without MAPs, then layered on a 1.2 M sucrose layer, centrifuged at 100,000 g for 30 minutes, and then analyzed with SDS-7.5% PAGE. (+) or (-) Incubation with or without each component, respectively. N, S, M or P shows the sample before centrifugation (N), from the supernatant (S), from the middle zone (M) of the sucrose layer, or from the pellet (P).



Figure 5. Binding of MAPs to liposomes. The ability of MAPs to bind to liposomes was evaluated using co-sedimentation. MAPs (0.8 mg/ml) were incubated at room temperature for 30 minutes with (+) or without (-) 1 mM liposomes. After centrifugation at 100,000 g for 30 minutes, supernatants (S) and pellets (P) were analyzed by SDS-7.5% PAGE.

By using this co-sedimentation method, we also examined whether MAPs can bind directly to liposomes. In this experiment, no sucrose layer was used, hence liposomes sedimented in the pellet following ultracentrifugation. As shown in Figure 5, the majority of MAP1, and approximately 50% of MAP2, sedimented together with liposomes. On the other hand, no tau was recovered in the pellet despite the presence of liposomes there. These results strongly suggest that MAP1 and/or MAP2 mediate the binding between microtubules and liposomes. It should be noted here that tubulin bands (Figure 5, lanes 2, 3 and 4) probably resulted from contaminating tubulin bound to MAP1. When microtubules bind to liposomes, this linkage prevents the fluctuating movement of the tubular portion of bipolar liposomes, and thereby might stabilize the liposomal shape.

The effects of purified MAP2 and tau on the transformation of liposomes

The MAPs used in the above study contained at least three components: MAP1, MAP2 and tau,



Figure 6. Lack of binding of MAP2 or tau to liposomes. Binding activities of MAP2 and tau to liposomes were determined using co-sedimentation. MAP2 or tau was incubated at room temperature for 30 minutes with 0.2 mg/ml BSA in the presence (+) or absence (-) of 0.5 mM liposomes. BSA was used for a control as a soluble protein that cannot be sedimented. After centrifugation at 100,000 g for 30 minutes, supernatants (S) and pellets (P) were analyzed by SDS-7.5% PAGE. Samples before centrifugation (N) are also shown.

and it remained to be determined which of those components is responsible for microtubule binding to liposomes. Since only MAP2 and tau can be purified easily, we examined their binding ability to liposomes by co-sedimentation. As shown in Figure 6 (lane 2), purified MAP2 did not co-sediment with liposomes, and as this result suggests, purified MAP2 was also unable to mediate binding between microtubules and liposomes (data not shown). In this relation, in the above experiment on binding activities of crude MAPs, MAP2 was recovered in the pellet (Figure 5, lane 2). This might not result from direct binding of MAP2 to liposomes, because pure MAP2 has no binding activity to liposomes. Indeed, MAP2 has been reported not to bind to liposomes made of phosphatidylcholine (SurrIDGE & Burns, 1992). Tau was also unable to bind to liposomes (Figure 6, lane 8). These results suggest that MAP1 is responsible for the linking between microtubules and liposomes. In this connection, MAP1 consists of subunits MAP1A, MAP1B and MAP1C. MAP1C is the heavy chain of brain cytoplasmic dynein (Paschal & Vallee, 1987), and brain dynein has been shown to specifically interact with PS or phosphatidylglycerol (PG) vesicles at high affinity ($K_d = 80$ nM; Lacey & Haimo, 1994). In addition, MAP1B was also recently demonstrated to interact with phospholipid vesicles (Yamauchi *et al.*, 1997).

If direct linkage between microtubules and liposomes is the prime source for stabilizing bipolar-shaped liposomes, the above findings raise the

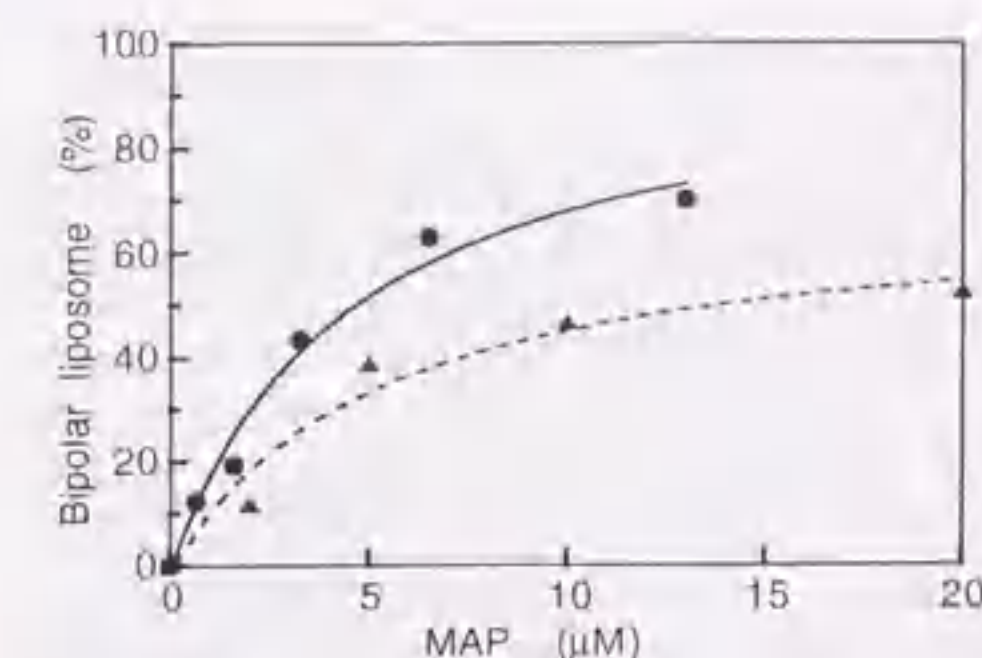


Figure 7. Effects of purified MAP2 or tau on the morphology of transformed liposomes. The percentage of bipolar-shaped liposomes in the total transformed liposome population was plotted against the concentration of co-encapsulated MAP2 (continuous line) or tau (broken line). The tubulin concentration was fixed at 65 μ M. Samples were observed 30 minutes after raising the temperature to 37°C, and more than 100 transformed liposomes were observed at each data point.

possibility that the majority of transformed liposomes would possess monopolar shapes in the presence of purified MAP2 or purified tau. To test this possibility, we examined the transformation of liposomes encapsulated with 65 μ M tubulin with various concentrations of purified MAP2 or tau. However, the majority of transformed liposomes had bipolar shapes, and the percentage of bipolar shapes increased with increasing concentrations of purified MAP2 or tau (Figure 7). Although the final morphologies of transformed liposomes did not depend on the species of MAP molecules, there was a slight difference in the concentration dependence of the ratio of bipolar-to-monopolar liposomes. In the case of MAP2, the percentage of bipolar liposomes increased and was saturated at approximately 80% with increasing MAP2 concentration (Figure 7); this value was comparable to that obtained in the transformation with crude MAPs. In contrast, the percentage of bipolar liposomes was saturated at about 60% in the case of purified tau, and in addition, the ratio of bipolar liposomes was always higher in the presence of MAP2 than in the presence of tau (when compared at the same molarity). In conclusion, the stabilizing effect of bipolar-shaped liposomes was independent of the binding ability of MAPs to liposomes. These results further indicate that MAP2 was more capable of stabilizing bipolar liposomes than tau.

Discussion

Morphological changes of liposomes

Here, we investigated the characteristic morphologies of liposomes in which stable shapes were acquired as a result of internal polymerization of microtubules. Free liposomes that encapsu-

lated no cytoskeletal proteins have been shown to transform into various shapes, and these transformations are driven by osmotic pressure differences between the outside and inside of the liposome (Hotani, 1984). Those liposomes never possess a rigid structure and their shapes are more or less fluctuating. When actin filaments were polymerized within liposomes, liposomes became rigid and their shapes were stabilized in either disk or dumbbell shapes (Miyata & Hotani, 1992). As reported in preliminary studies (Hotani & Miyamoto, 1990), liposomes encapsulated with tubulin also transformed into rigid and stable shapes. In contrast to actin polymerization, however, liposomes developed by tubulin polymerization possessed more characteristic shapes (Figure 1), differing remarkably both in shape and rigidity from those shaped by differences in osmotic pressure. Polymerization, i.e. elongation of microtubules, caused morphological changes of liposomes, indicating that the self-assembly of microtubules can generate sufficient mechanical force to deform membranes.

One of the most characteristic features of microtubule-dependent transformation of liposomes is the development of tubular membrane structures. To develop tubular portions, microtubules must overcome the mechanical stress caused from bending of lipid membranes (Canham, 1970), and as a consequence, the tubular portions shorten when microtubules depolymerize. The bending energy of membranes depends on the second power of the membrane curvature. Hence, the bending energy in the tubular portion is greater than in the central spherical portion, because the curvature of the former is larger than the latter. The increase in the bending energy due to transformation must be supplied from the mechanical work generated by microtubule polymerization. The elongation of tubular membrane structures is probably achieved by the translocation of lipid molecules in the bilayer from the central spherical portion to the tubular portion, since the total surface area of a liposome does not change throughout its transformation (Hotani, 1984).

Tubular portions of liposomes develop more easily in the presence of MAPs than in MAP-free conditions. Since MAPs promote the polymerization of microtubules, the enhanced formation of tubular portions in the presence of MAPs probably results from the enhancement of microtubule polymerization due to MAPs. It is likely that increased amounts of polymerizing microtubules generate stronger mechanical forces to transform liposomes. MAPs also promote the nucleation of tubulin (Sloboda *et al.*, 1976; Murphy *et al.*, 1977), so that greater numbers of microtubules polymerize in the presence of MAPs compared to MAP-free conditions. If the amount of tubulin is constant, the average length of microtubules within liposomes must be shorter in the presence of MAPs than in its absence. In actuality, however, tubular portions of transformed liposomes are shorter with MAPs

than without MAPs, indicating that the length of the tubular portion depends highly on the state of internal microtubules.

Considering the concentration of encapsulated tubulin (7 mg/ml) and the length of tubular portions, ~100 microtubules should exist within each transformed liposome. However, the critical concentration for the tubulin polymerization increased remarkably in lipid solutions, and GTP necessary for the microtubule growth is consumed rapidly in a micro compartment such as a liposome. So that, as judged from the brightness of a tube in a dark-field microscopy, several microtubules could presumably be aligned in the tubular portion. This raises the question of why such multiple numbers of microtubules do not form many projections in various directions. Indeed, our transformed liposomes are either bipolar or monopolar (Figure 1); no liposomes are found with more than two projections, and as discussed below, formation of multipolar liposomes may be quite difficult. As the most rapidly growing microtubule begins to push and to deform the liposomal membrane at the earliest stage of transformation, other microtubules tend to align along the long axis, probably because microtubule growth resulting in membrane deformation requires a large mechanical force; however, alignment of microtubules would greatly reduce this mechanical stress on each microtubule. Once the direction of the tubular portion is established, the bundle of aligned microtubules would enhance further growth of the tubular portion. The irreversible conversion from bipolar to monopolar liposomes (Figure 2) also supports this concept. In this case, once one tubular portion of a bipolar liposome returns to the spherical shape, either by microtubule depolymerization or fluctuating movement, it never re-transforms into a tubular portion. It has been shown theoretically that the elongation of a tubular portion requires less force than the formation of a new projection on a spherical portion (Umeda *et al.*, 1998).

Hotani & Miyamoto (1990) have shown that multiple numbers of projections develop from liposomes which are fixed on the surface of a glass slide prior to microtubule polymerization. In that case, it is possible that translocation of microtubules within liposomes is prevented by interaction with the glass surface, and thereby individual microtubules are forced to develop projections in their initial directions. Therefore, it is likely that a single microtubule can provide sufficient force to transform the lipid membrane.

Mechanism of transformation from bipolar to monopolar liposomes

Here, we have shown that the final morphologies of transformed liposomes depend on the existence of MAPs in the encapsulated tubulin. That is, liposomes transform into bipolar shapes in the presence of MAPs, while they transform into monopolar shapes with tubulin only (Figure 1).

Although bipolar liposomes form at an earlier stage of transformation even in the absence of MAPs, those bipolar liposomes re-transform into monopolar ones (Figure 2). No inverse re-transformation is found, indicating that the bipolar-to-monopolar transformation of liposomes is an irreversible process. The majority of monopolar liposomes must result from the re-transformation, and the basic mechanisms of the initial transformation steps are almost the same regardless of the absence or presence of MAPs. The difference in the final morphology depends on whether re-transformation occurs or not. The percentage of bipolar liposomes in the total transformed population increases with increasing concentrations of crude MAPs, purified MAP2 or tau (Figures 3 and 7). In addition, no re-transformation occurs in the presence of higher concentrations of MAPs, indicating that MAPs suppress re-transformation in a concentration dependent manner.

Two types of re-transformation processes from bipolar to monopolar liposomes are actually observed in the absence of MAPs. One is accompanied by the occasional shortening of one of the two tubular projections of a bipolar liposome. This might be caused by depolymerization of microtubules in the tubular portion. An earlier study on dynamic instability has shown that shortening of a microtubule is difficult to stop in the absence of MAPs. Therefore, the possibility of the long-length depolymerization of microtubules without MAPs must be higher than in the presence of MAPs. When the shortening is long enough to abolish the tubular portion, the bipolar liposome re-transforms into a monopolar one. The length of the depolymerization phase of individual microtubules depends inversely on the increase in MAPs concentration (Itoh & Hotani, 1994). Thus, it is conceivable that the decrease in the percentage of monopolar liposomes associated with an increase in MAPs concentration (Figure 3) is due to the MAP-dependent decrease in shortening lengths.

The other type of re-transformation is due to the one-dimensional fluctuation of tubular portions relative to spherical portions (Figure 2). In this case, depolymerization of microtubules is not coupled with this fluctuation since the re-transformation occurs without an obvious change in the total length of the tubular portion. Instead, this fluctuation probably results from the one-dimensional Brownian motion of microtubules within the tubular portions. In Figure 2, the spherical portion is stuck to a glass slide, thereby the fluctuation can be monitored. The surface area of the tubular portions is not negligible compared with that of a spherical one. Therefore, the lipid molecules located in the tubular portions might flow through the spherical portion during the fluctuation. In this connection, the following should be noted. The patch of lipid bilayer stuck to a glass slide might be small, because the tubular portions freely pivoted on the sphere (not shown in Figure 2).

These liposomes contain 50% PG, which possesses a negative electric charge, so that the negative charges are distributed on the liposomal surface. Negative charges are also exposed on the outer surface of bare microtubules due to clusters of anionic amino acid residues at the C termini of both α and β tubulin molecules (Maccioni *et al.*, 1988; Mejillano & Himes, 1991; Nogales *et al.*, 1997). This exerts an electrical repulsive force between liposome and microtubule surfaces, and friction between these two surfaces should decrease. It is highly possible that microtubules polymerized from pure tubulin cannot attach to the inner surface of liposomes, and float freely in their internal matrix. Indeed, no interaction between microtubules and liposomes can be shown in the absence of MAPs (Figure 4), and freely floating microtubules readily move along the long axis of liposomes. This fluctuation movement may be initiated by various external stimuli, such as rapid changes of the fluid flow.

Some monopolar liposomes are observed even at higher concentrations of MAPs, and the percentage of bipolar liposomes in the total transformed population is saturated at 80% (Figure 3). Monopolar liposomes at higher concentrations of MAPs can be explained if liposomes re-transform at an early stage of morphogenesis. At the beginning of the transformation, the tubular portion of a lemon-shaped liposome is short. Thereby, either a short distance fluctuation or a short length depolymerization of microtubules could revert a short projection into a spherical portion. Once re-transformation occurs, microtubules tend to grow exclusively in the established tubular portion.

The role of MAPs in stabilizing bipolar-shaped liposomes

The microtubule stabilizing property of MAPs must contribute to maintain bipolar-shaped liposomes. In other words, when microtubules are stabilized by bound MAPs, shortening of tubular portions on bipolar liposomes must be suppressed. When MAPs are encapsulated together with pure tubulin, shortening of the tubular portion does not occur in bipolar liposomes, which indicates that the microtubule-stabilizing ability of MAPs contributes to maintain bipolar-shaped liposomes against re-transformation.

The other process of re-transformation, that is, fluctuation of the tubular portion of bipolar liposomes, is also suppressed by MAPs. This suppression can be easily understood if microtubules are linked to the inner surface of liposomes; MAPs may mediate the linkage, and hence restrict the free movement of microtubules within liposomes. Indeed, microtubules bind liposomes only in the presence of crude MAPs (Figure 4), suggesting that this binding contributes to the stabilization of bipolar liposomes. Among MAPs, MAP1 must be the major cross-linker between liposome and microtubules, because we could not find any binding of

purified MAP2 or purified tau to our liposomes, which consisted of PC and PG. It is likely that the MAP1-mediated-linkage is responsible for the co-sedimentation of microtubules with liposomes in the presence of crude MAPs. The co-sedimentation of MAP2 was probably indirect both in the absence (Figure 5) and in the presence of microtubules (Figure 4). In the former case, the ring complex made of tubulin and MAPs (Pantaloni *et al.*, 1981) might bind liposomes through MAP1, and a small amount of contaminating tubulin in the crude MAPs might result from this ring complex (Figure 5, lanes 2, 3 and 4).

Despite the lack of ability to bind to liposomes, MAP2 and tau suppress the fluctuation of the tubular portion and thereby affect the percentage of bipolar liposomes which increases with increasing concentration (Figure 7). These results indicate that some mechanism other than direct linkage causes the stabilization of bipolar liposomes. Presumably, MAP2 or tau decreases the electrical repulsive force exerted between liposomes and bare microtubules. Both MAP2 and tau interact with the anionic region of the C terminus of tubulin upon binding to microtubules (Maccioni *et al.*, 1988; Wiche *et al.*, 1991). The binding of MAP2 or tau neutralizes the negative charges of the microtubule surface, and thereby reduces the repulsive force between the liposome and the microtubule surface. When the repulsive force is reduced, microtubules can attach to the inner surface of liposomes, which generates friction between these surfaces, and which prevents the fluctuating movement of microtubules within tubular portions.

Both MAP2 and tau are fibrous molecules, and their N-terminal domains make up fibrous protrusions upon binding to microtubules (Wiche *et al.*, 1991). Thus, microtubules decorated by them possess a number of fibrous protrusions. Although the stiffness of the protrusion domain of MAP2 or tau has not yet been determined, huge numbers of such protrusions must cause mechanical friction inhibiting free movement of microtubules. We found that the ability of tau to stabilize bipolar-shaped liposomes was less than that of MAP2 (Figure 7). Further, the percentage of bipolar liposomes is saturated at 60%, even at increased tau concentrations, while it is saturated at 80% in the case of MAP2. These observations might result from differences in the degree of mechanical friction. Actually, the projection domain of the tau molecule is much shorter than that of the MAP2 molecule (Chen *et al.*, 1992), so that microtubules decorated by tau may move more easily than those decorated by MAP2.

Here we demonstrate that the mechanical force derived from microtubule polymerization is strong enough to transform liposomal membranes. We also show that microtubules themselves cannot maintain the transformed morphologies of liposomes, and that MAPs can stabilize them. This stabilizing activity of MAP2 or tau is probably exerted through their physical properties, such as

neutralization of repulsive forces or mechanical friction. Investigation of the stabilizing activity of MAP1 must still be assessed, and further study will be necessary to identify specific component(s) which mediate interactions between microtubules and cellular membranes. We believe that our methodological strategy of microscopic monitoring of encapsulated liposomes will be a useful approach to search for such factor(s).

Materials and Methods

Reagents

The phosphatidylcholine (PC) used in this study is L- α -phosphatidylcholine derived from egg yolk. The phosphatidylglycerol (PG) used is the sodium salt of L- α -phosphatidyl-DL-glycerol prepared from egg yolk L- α -phosphatidylcholine by treatment with cabbage phospholipase D in the presence of glycerol. These phospholipids were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, USA). All other chemicals are reagent grade.

Protein preparation

Microtubule proteins were prepared from bovine brain by three cycles of temperature-dependent polymerization and depolymerization, as described by Karr *et al.* (1979). Tubulin and MAPs were further purified from microtubule proteins by DEAE-Sepharose column chromatography using EPLC (Pharmacia, Sweden) as described (Murata *et al.*, 1992). MAPs were eluted from the DEAE-Sepharose column with 0.3 M NaCl, and pure tubulin was then eluted with a NaCl concentration gradient from 0.3 M to 0.8 M. MAP2 and tau were purified from crude microtubule proteins by boiling for three minutes in the presence of 0.8 M NaCl and 50 mM β -mercaptoethanol, followed by Superdex 200 gel filtration (Pharmacia, Sweden). All protein preparations were stored at -80°C until use.

The purity of protein preparations was checked with SDS-PAGE, performed as described by Laemmli (1970), with minor changes. Protein bands were detected by Coomassie brilliant blue R staining. Protein concentrations were determined by the method of Lowry *et al.* (1951), using bovine serum albumin as the standard.

Preparation of liposomes

Liposomes were prepared as described (Hotani, 1984; Saitoh *et al.*, 1998). Lipid films were generated by dissolving phospholipids in a chloroform/methanol solution, 98:2 (v/v): 10 μl each of 10 mM PC and PG were mixed, then the organic solvent was evaporated under a flow of nitrogen gas, and the lipids were further dried *in vacuo* for more than 90 minutes. Then, 200 μl of PM-buffer (0.1 M Pipes (pH 6.9), 0.5 mM MgSO_4 , 1 mM EGTA, 1 mM GTP) was added to the dried lipid film at 25°C . Upon buffer addition, the lipid film immediately started swelling to form liposomes, and swelling was facilitated by agitating the test tube occasionally by hand.

Preparation of encapsulated liposomes

To prepare liposomes encapsulating proteins, 40 μl of crude tubulin, pure tubulin, or pure tubulin with MAPs, were added to the dried lipid film described above, in

PM-buffer as the solvent, and incubated for 30 minutes at 10°C . During the incubation, tubulin-encapsulated liposomes were formed whereas tubulin itself did not polymerize due to the low temperature. To prevent polymerization of tubulin outside liposomes, the liposome suspension was diluted tenfold with PM-buffer containing no GTP, and encapsulated tubulin was polymerized into microtubules in liposomes by raising the temperature to 37°C . The concentration of liposomes was 0.5 mM, expressed as the concentration of phospholipids.

Microscopic observation and video recording

Liposomes were observed under dark-field microscopy (BEF, Olympus, Japan) using an oil-immersion dark-field condenser (Olympus DC, numerical aperture of 1.2-1.33) and a 40 \times HiApo objective lens with an iris (Olympus) at room temperature ($24\sim 26^{\circ}\text{C}$). The illumination source was a 200W high-pressure mercury lamp (Osram, GmbH, Germany). The images obtained by microscopy were recorded onto a S-VHS video tape using a SIT video camera (C-2400-08, Hamamatsu Photonics, Japan) and a videocassette recorder (HR-S7700, Victor, Japan). These images were further processed with a digital image analyzer (IBAS, Zeiss, Germany) to enhance contrast and to determine the dimensions of liposomes.

Binding assay of microtubules to liposomes

The association between microtubules and liposomal membranes was analyzed by the co-sedimentation assay. Microtubules were prepared as follows. For MAPs bound to microtubules, 4.5 mg/ml of crude tubulin was incubated at 37°C for 30 minutes and then stabilized by 10 μM taxol; it was then diluted five times with PM-buffer containing 10 μM taxol. For MAP-free microtubules, 4 mg/ml of pure tubulin was incubated in the presence of 8% (v/v) dimethyl sulfoxide at 37°C for 30 minutes, and then stabilized by 10 μM taxol; it was then diluted five times with PM-buffer containing 10 μM taxol. These microtubules were mixed with liposomes (1 mM PC and PG) or PM-buffer containing 10 μM taxol. These mixtures (300 μl) were incubated for 30 minutes at 37°C and layered on 300 μl of 1.2 M sucrose in PM-buffer. They were then centrifuged at 100,000 g for 30 minutes at 34°C . Under these conditions, the upper 200 μl of the gradient contained free, unbound proteins. Microtubule-liposome complexes stayed on top of the sucrose layer and were recovered in the middle 200 μl of the gradient. Microtubules free from liposomes were sedimented to the bottom 200 μl of the gradient. The amount of microtubules in each fraction was determined using SDS-7.5% (w/v) PAGE. After protein bands were stained, gel images were incorporated into a Power Macintosh as a TIFF file using an image scanner (Scan Jet 4c/T, Hewlett Packard, USA), then band concentrations were determined by using the NIH-image program.

Binding assay of MAPs to liposomes

The capacity of MAPs to bind to liposomal membranes was examined as follows. Liposomes were homogenized in PM-buffer by vigorous agitation using a vortex mixer. One mmol of homogenized liposomes was mixed with 0.8 mg/ml MAPs, 0.26 mg/ml MAP2 or 0.2 mg/ml tau, and incubated at room temperature for

30 minutes. After centrifugation at 100,000 g for 20 minutes, MAPs that co-sedimented with liposomes in pellets were re-suspended in PM-buffer. Protein compositions of pellets and supernatants were determined by SDS-7.5% PAGE, as described above.

References

- Aizawa, H., Murofushi, H., Kotani, S., Hisanaga, S., Hirokawa, N. & Sakai, H. (1987). Limited chymotryptic digestion of bovine adrenal 190,000-M, microtubule-associated protein and preparation of 27,000-M, fragment which stimulates microtubule assembly. *J. Biol. Chem.* **262**, 3782-3787.
- Bangham, A. D. (1995). Surrogate cells or Trojan horses: The discovery of liposomes. *BioEssays*, **17**, 1081-1088.
- Bayley, P. M., Scharma, K. K. & Martin, S. R. (1994). Microtubule dynamics *in vitro*. In *Microtubules* (Hyams, J. S. & Lloyd, C. W., eds), pp. 111-137. Wiley-Liss Inc., New York.
- Canham, P. B. (1970). The minimum energy of bending as a possible explanation of the biconcave shape of the human red blood cell. *J. Theoret. Biol.* **26**, 61-81.
- Carlier, M.-F. (1989). Role of nucleotide hydrolysis in the dynamics of actin filaments and microtubules. *Int. Rev. Cytol.* **115**, 139-170.
- Cassimeris, L., Pryer, N. K. & Salmon, E. D. (1988). Real-time observations of microtubule dynamic instability in living cells. *J. Cell Biol.* **107**, 2223-2231.
- Chen, J., Kanai, Y., Cowan, N. J. & Hirokawa, N. (1992). Projection domains of MAP2 and tau determine spacings between microtubules in dendrites and axons. *Nature*, **360**, 674-677.
- Erickson, H. P. & O'Brien, E. T. (1992). Microtubule dynamic instability and GTP hydrolysis. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **21**, 145-166.
- Horio, T. & Hotani, H. (1986). Visualization of the dynamic instability of individual microtubules by dark field microscopy. *Nature*, **321**, 605-607.
- Hotani, H. (1984). Transformation pathways of liposomes. *J. Mol. Biol.* **178**, 113-120.
- Hotani, H. & Horio, T. (1988). Dynamics of microtubules visualized by darkfield microscopy: treadmilling and dynamic instability. *Cell Motil. Cytoskel.* **10**, 229-236.
- Hotani, H. & Miyamoto, H. (1990). Dynamic features of microtubules as visualized by dark-field microscopy. *Advan. Biophys.* **26**, 135-156.
- Itoh, T. I. & Hotani, H. (1994). Microtubule-stabilizing activity of microtubule-associated proteins (MAPs) is due to increase in frequency of rescue in dynamic instability: shortening length decreases with binding of MAPs onto microtubules. *Cell Struct. Funct.* **19**, 279-290.
- Karr, T. L., White, H. D. & Purich, D. L. (1979). Characterization of brain microtubule proteins prepared by selective removal of mitochondrial and synaptosomal components. *J. Biol. Chem.* **254**, 6107-6111.
- Kim, H., Binder, I. I. & Rosenbaum, J. L. (1979). The periodic association of map2 with brain microtubules *in vitro*. *J. Cell Biol.* **80**, 266-276.
- Kowalski, R. J. & Williams, R. C., Jr (1993). Microtubule-associated protein 2 alters the dynamic properties of microtubule assembly and disassembly. *J. Biol. Chem.* **268**, 9847-9855.

- Lacey, M. L. & Haimo, L. T. (1994). Cytoplasmic dynein binds to phospholipid vesicles. *Cell Motil. Cytoskel.* **28**, 205–212.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680–685.
- Lasic, D. D. (1995). Structure and Dynamics of Membranes. In *Handbook of Biological Physics* (Lipowsky, R. & Sackmann, E., eds), vol. 1, pp. 493–498. Elsevier Science B. V., Amsterdam.
- Littauer, U. Z., Giveon, D., Thierauf, M., Ginzburg, I. & Ponstingl, H. (1986). Common and distinct tubulin binding sites for microtubule associated proteins. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **83**, 7162–7166.
- Lowry, O. H., Rosenbrough, N. Y., Farr, A. L. & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265–275.
- Maccioni, R. B., Rivas, C. I. & Vera, J. C. (1988). Differential interaction of synthetic peptides from the carboxyl-terminal regulatory domain of tubulin with microtubule associated proteins. *EMBO J.* **7**, 1957–1963.
- Mejillano, M. R. & Himes, R. H. (1991). Assembly properties of tubulin after carboxyl group modification. *J. Biol. Chem.* **266**, 657–664.
- Melki, R., Kerjan, P., Waller, J. P., Carlier, M. F. & Pantaloni, D. (1991). Interaction of microtubule-associated proteins with microtubules: yeast lysyl- and valyl-tRNA synthetases and tau 218–235 synthetic peptide as model systems. *Biochemistry*, **30**, 11536–11545.
- Mitchison, T. J. & Kirschner, M. W. (1984). Dynamic instability of microtubule growth. *Nature*, **312**, 237–242.
- Miyata, H. & Hotani, H. (1992). Morphological changes in liposomes caused by polymerization of encapsulated actin and spontaneous formation of actin bundles. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **89**, 11547–11551.
- Murata, M., Itoh, J. T., Kagiwada, S., Hishida, R., Hotani, H. & Ohnishi, S. (1992). Interaction of the Golgi membranes isolated from rabbit liver with microtubules *in vitro*. *Biol. Cell.* **75**, 127–134.
- Murphy, D. B., Johnson, K. A. & Borisy, G. G. (1977). Role of tubulin-associated proteins in microtubule nucleation and elongation. *J. Mol. Biol.* **117**, 33–52.
- Nogales, E., Wolf, S. G. & Downing, K. H. (1997). Structure of the $\alpha\beta$ -tubulin dimer by electron crystallography. *Nature*, **391**, 199–203.
- Pantaloni, D., Carlier, M. F., Simon, C. & Batelier, G. (1981). Mechanism of tubulin assembly: role of rings in the nucleation process and of associated proteins in the stabilization of microtubules. *Biochemistry*, **4**, 4709–4716.
- Paschal, B. M. & Vallee, R. B. (1987). Retrograde transport by the microtubule associated protein MAP1C. *Nature*, **330**, 181–183.
- Ponstingl, H., Krauhs, E. & Little, M. (1983). Tubulin amino acid sequence and consequences. *J. Submicrosc. Cytol.* **15**, 359–362.
- Pryer, N. K., Walker, R. A., Skeen, V. P., Bourns, B. D., Soboeiro, M. F. & Salmon, E. D. (1992). Brain microtubule-associated proteins modulate microtubule dynamic instability *in vitro*. Real-time observations using video microscopy. *J. Cell Sci.* **103**, 965–976.
- Reaven, E. & Azhar, S. (1981). Effect of various hepatic membrane fractions on microtubule assembly with special emphasis on the role of membrane phospholipids. *J. Cell Biol.* **89**, 300–308.
- Sackett, D. L., Bhattacharyya, B. & Wolff, J. (1985). Tubulin subunit carboxyl termini determine polymerization efficiency. *J. Biol. Chem.* **260**, 43–45.
- Saitoh, A., Takiguchi, K., Tanaka, Y. & Hotani, H. (1998). Opening-up of liposomal membranes by talin. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **95**, 1026–1031.
- Sammak, P. J. & Borisy, G. G. (1988). Direct observation of microtubule dynamics in living cells. *Nature*, **332**, 724–726.
- Sloboda, R. D., Dentler, W. L. & Rosenbaum, J. L. (1976). Microtubule-associated proteins and the stimulation of tubulin assembly *in vitro*. *Biochemistry*, **15**, 4497–4505.
- Surridge, C. D. & Burns, R. G. (1992). Phosphatidylinositol inhibits microtubule assembly by binding to microtubule-associated protein 2 at a single, specific, high-affinity site. *Biochemistry*, **31**, 6140–6144.
- Surridge, C. D. & Burns, R. G. (1994). The difference in the binding of phosphatidylinositol distinguishes MAP2 from MAP2C and tau. *Biochemistry*, **33**, 8051–8057.
- Umeda, T., Nakajima, H. & Hotani, H. (1998). Theoretical analysis of shape transformations of liposomes caused by microtubule assembly. *J. Phys. Soc. Japan*, **67**, 682–688.
- Vallee, R. B., DiBartolomeis, M. J. & Theurkauf, W. E. (1981). A protein kinase bound to the projection portion of MAP2 (microtubule-associated protein 2). *J. Cell Biol.* **90**, 568–576.
- Voter, W. A. & Erickson, H. P. (1982). Electron microscopy of MAP2 (microtubule-associated protein 2). *J. Ultrastruct. Res.* **80**, 374–382.
- Walker, R. A., O'Brien, E. T., Pryer, N. K., Soboeiro, M. F., Voter, W. A., Erickson, H. P. & Salmon, E. D. (1988). Dynamic instability of individual MAP-free microtubules analysed by video light microscopy: Rate constants and transition frequencies. *J. Cell Biol.* **107**, 1437–1448.
- Wiche, G., Oberkanins, C. & Himmler, A. (1991). Molecular structure and function of microtubule-associated proteins. *Int. Rev. Cytol.* **124**, 217–273.
- Yamauchi, P. S. & Purich, D. L. (1987). Modulation of microtubule assembly and stability by phosphatidylinositol action on microtubule-associated protein-2. *J. Biol. Chem.* **262**, 3369–3375.
- Yamauchi, E., Titani, K. & Taniguchi, H. (1997). Specific binding of acidic phospholipids to microtubule-associated protein MAP1B regulates its interaction with tubulin. *J. Biol. Chem.* **272**, 22948–22953.

Edited by M. F. Moody

(Received 5 May 1998; received in revised form 23 September 1998; accepted 27 September 1998)

微小管と膜小胞の挙動

金子智行・田中陽子・宝谷絢一

暗視野光顕では、太さ25 nmの微小管や厚さ5 nmの脂質膜の挙動を目のあたりにできる。この手法による2つのトピックスを紹介する。①膜小胞の形態形成のモデルとして、リボソーム中で微小管を重合させた。生じた2極性リボソームは特異的な形態揺動を示し、その揺動はMAPsの膜結合能によって安定化されることがわかった。②ガラス表面に吸着させた単一の軸糸を重合核として、灌流法により溶液条件を変えて、微小管の成長方向に対する影響を調べたところ、GDPによって成長方向がプラス端からマイナス端へ切り変わった。

Key words 【微小管】【リボソーム】【暗視野法】【細胞骨格】

はじめに——光学顕微鏡でこそ見えてくる現象 見ることの目的には構造を知ること、挙動を知ることがある。分子レベルでの生体構造を知るためにはさまざまな電子顕微鏡技術がある。そして、生体構造は一般に溶液中でのみ本来の構造を保持し機能することができるので、できるだけ溶液環境で見ることが望ましい。そのために、急速凍結、氷包埋、無染色などの方法が開発されている。変形する前に瞬間的にその構造を固定して、あとから見るのである。一方、挙動観察のためには、瞬間像からだけでは刻々と変化してゆく様子を組み立てて、再現することはむずかしい。とくに、柔らかい膜構造や細胞骨格のようにみるみるうちに形を変えるようなものは、その変貌の様子を連続的に観察する手段が必須である。さらに、予期できないような新しい挙動を見つけるためには、個々の対象を時間的に追随観察することが不可欠である。そのためには光学顕微鏡による観察が最も有力な手段になる。太さ20 nmの超分子や厚さ5 nmの膜小胞を可視化できる高輝度暗視野顕微鏡法によって、最近明らかになってきた

トピックスを紹介する。

1. なぜ細胞骨格と膜小胞か

生細胞の基本的な特徴は、システムとして常に動的なことである。細胞がその動的特性を維持するためには同時に多種類の生化学反応の継続が必要である。このためには、エネルギー消費は必然であるが、さらに空間的不均一性が必須である。細胞はその内部に多様なコンパートメント（膜小胞）を異常なまでに発達させて、空間的な不均一性をつくり出している。各膜小胞内は特異的な環境が保たれ、重要な反応の多くが膜系と関連して効率よく遂行されている。そしてこれらの諸反応が巧妙に相互作用しあってこそ生命活動が保てるのである。そのために膜小胞は常時ダイナミックに変化している。これらの構造変化を制御している装置が、微小管やアクチン線維からなるネットワークであり、細胞骨格とよばれている。

細胞自体もその働きに応じて特異的な形態を示す。た

Tomoyuki Kaneko, Yoko Tanaka, Hirokazu Hotani, 名古屋大学大学院理学研究科生命理学専攻 (〒464-01 名古屋市千種区不老町) [Department of Molecular Biology, School of Science, Nagoya University, Furocho, Nagoya 464-01, Japan]
Visualized Dynamics of Microtubules and Liposomes

たとえば、神経細胞はたいへん細長い軸索や樹状突起を発達させている。小腸上皮の細胞は物質の吸収効率を上げるために、管状の絨毛が細胞表面から多数突出している。もちろん、各細胞内器官の形も特異的である。たとえば分泌性蛋白質が合成される小胞体は、分泌作用に便利のように枝分かれした膜管のネットワークになっている。このように細胞の生命活動を支えているハードウェアの主役は膜小胞と細胞骨格なのである。

II. 細胞骨格による膜小胞の形態変化

膜小胞のモデルとしてリボソームを用いることにした。脂質分子は、溶液中で疎水基どうしを内側にし、親水基を両側つまり溶液に露出することによって自動的に集合して脂質二重層膜を形成する。その膜は自然に閉じて閉鎖空間つまりリボソームになる¹⁾。そしてこの膜は基本的に生体膜と同様の物理的性質をもっている。細胞や膜小胞の形態形成や変形の機構を知るために、細胞骨格蛋白質とリボソームからなる細胞のモデルシステムの構築を試みた。すなわち、チューブリンをリボソーム内に閉じ込めてから微小管を形成させた。その結果、意外なことに球と管状部分からなる2極性リボソームが形成された(図1)²⁾。

具体的にはまず、微小管のサブユニット蛋白質であるチューブリンが重合可能な環境条件下で、なおかつ比較的大きなリボソームを形成させる脂質組成を探索した。その結果、ジミリスチルホスファチジルコリン(DMPC)にホスファチジルグリセロール(PG)またはカルジオリピン(CL)を混ぜた系が適切であることがわかった。チューブリンを内部に取り込んだリボソームをつくるために、乾燥混合脂質にチューブリン溶液を加えてリボソームのみを形成させた。このとき、リボソームが形成される以前にチューブリンが重合して微小管になることを避けるために、チューブリンが重合不能である10°C以下の低温でリボソームを形成させた。リボソーム外部のチューブリンは希釈して重合を抑制しておき、その後温度を30°C以上にするこ

によってリボソーム内部でのみ微小管を成長させた。微小管の成長に伴って球形リボソームはレモン型に変形する(図1)。その際、しばしば中心軸に沿って微小管の存在が確認できる。次にレモン型の両端から直線状に膜管が突出し、時間とともに管部が成長し、中心部はレモン型から球状へと変化する³⁾。この結果は、微小管の重合反応がリボソームの形態変化を起こすの



図1 2極性リボソームの暗視野光顕像
リボソーム中での微小管の重合成長によって形成された。

に十分な物理的力を発生していることを示している。

III. 微小管を膜に結合する蛋白質

細胞内で細胞骨格が安定なネットワークを構築するためには、細胞膜との間に何らかの結合や相互作用が働いていると思われる。事実、アクチン線維の場合には、膜に結合させるためのさまざまな蛋白質が同定されている。一方、微小管の場合にはどのような蛋白質が膜との結合に介在しているかはいまだに明らかではない。

ところで、前述の2極性リボソーム形成の際に用いたチューブリンにはMAPsとよばれる微小管結合蛋白質が含まれている(3Xチューブリン)。そこで膜小胞の形態形成におけるMAPsの働きを探るために、DEAEカラムクロマトグラフィーによってMAPsを除いた純粋のチューブリン(DEAEチューブリン)⁴⁾を用いて、2極性リボソームを形成させた。意外なことに、この2極性リボソームの球状部は、管状部に沿って移動する揺らぎ運動を示した(図2)⁵⁾。このとき、球状部の移動にもかかわらず2つの管状部を総計した全長も球部

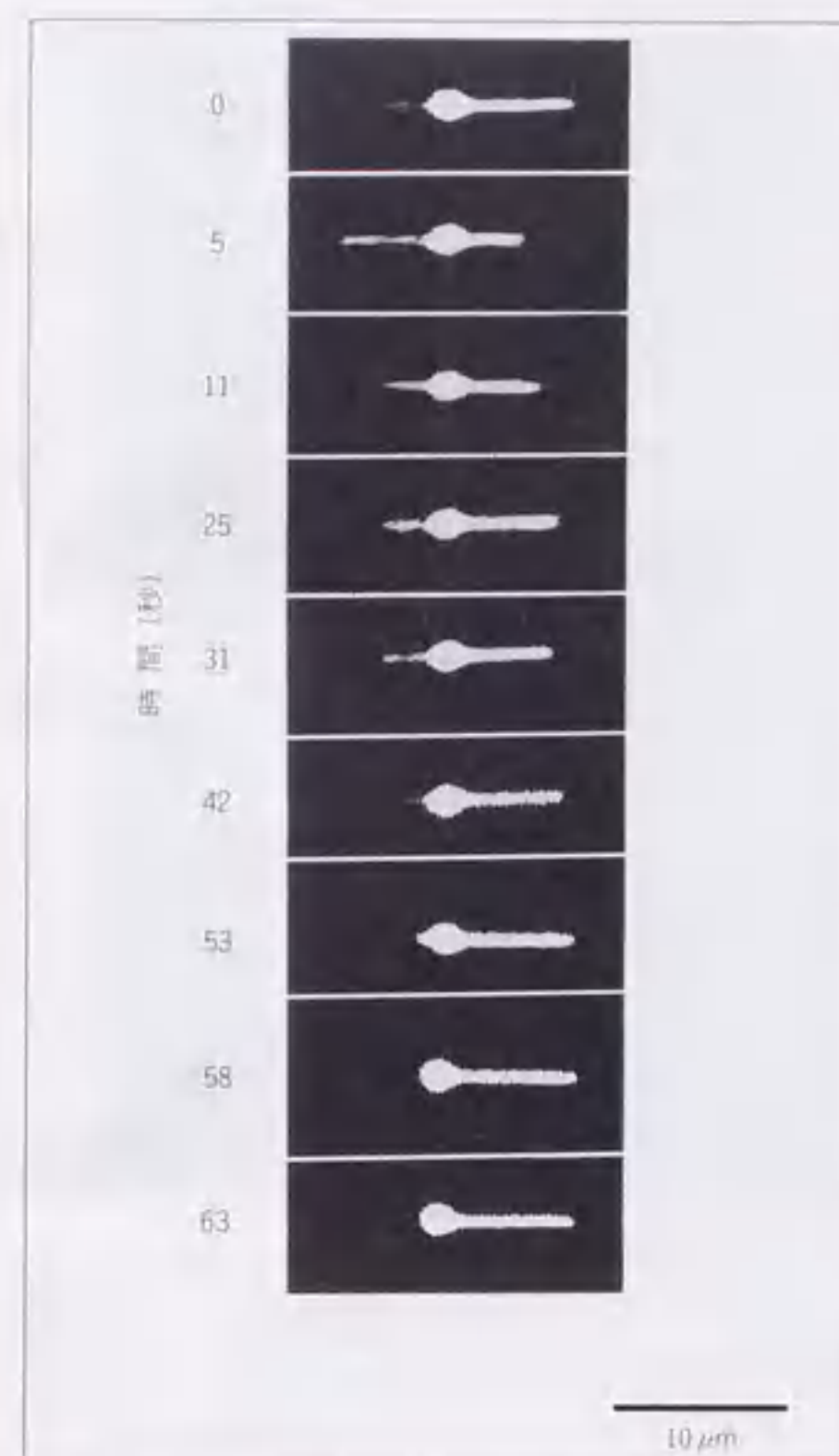


図2 2極性リボソームの形態的揺らぎ
球状部の相対的位置が管状部に沿って揺動している。暗視野光顕ビデオ像。

の大きさも一定に保たれたままであった。つまり、リボソーム膜は球状と管状の形態を自在に相互変換する能力をもっているのである。そして、球状部が揺動して管状部の一端にまで達すると、移動は停止し安定化する。その結果2極性リボソームは、片方にしか管状部をもたない1極性リボソームとして安定することになる。つまり、膜小胞に管状部と球状部がすでに共存していれば、その両者間の形態転換は容易に起こるが、球状部から、管状部を新しく生じさせるためには大きな物理的力があるのである。さらに興味深いことには、リボソーム膜が境界のはっきりとした2つの部分に形態分化する能力をもつことである。このような形態分化能は、2次元液晶膜であることと内圧の存在によって生じる特性であることが、理論的な解析によって示された⁶⁾。もちろん、この範疇に入る生体膜も同様の性質

をもつことが実験的に明らかになっている⁷⁾。膜胞もつこの特異的な形態分化能は各種細胞の形態形成に大きな役割を果たしているものと考えられる。

しかし、3Xチューブリンを用いたときには、2極性リボソームは安定していて、球状部が移動するようなことはない。つまり、3Xチューブリンに含まれているMAPsを介して微小管と膜が強く相互作用するために、2極性の形が安定しているものと思われる(図3)。これを確かめるためにDEAEチューブリンにさまざまな濃度のMAPsを加えてから、2極性リボソームを形成させて、その安定性を調べた。一定時間後も2極性の形にとどまっている割合は、MAPs濃度の上昇とともに増加した。つまり、球状部の移動はMAPsによって抑制されることがわかった(図4)。

この抑制は、MAPsが介在して微小管と膜を結合させることが原因であると思われる。この結合能を確かめるために、MAPs存在下で微小管とリボソームを超速心して、両者が共沈殿するかどうか調べた。1.2Mのショ糖層の上に試料をのせて 4×10^4 gで30分間超速心した。この超速心で、リボソームと結合した微小管はショ糖層の上面にとどまるのに対して、結合しない微小管はショ糖層の底まで沈殿する。この共沈殿実験によって、MAPsが微小管と膜を結合する能力をもち、MAPsの成分のなかでもとくにMAP1が重要であるこ

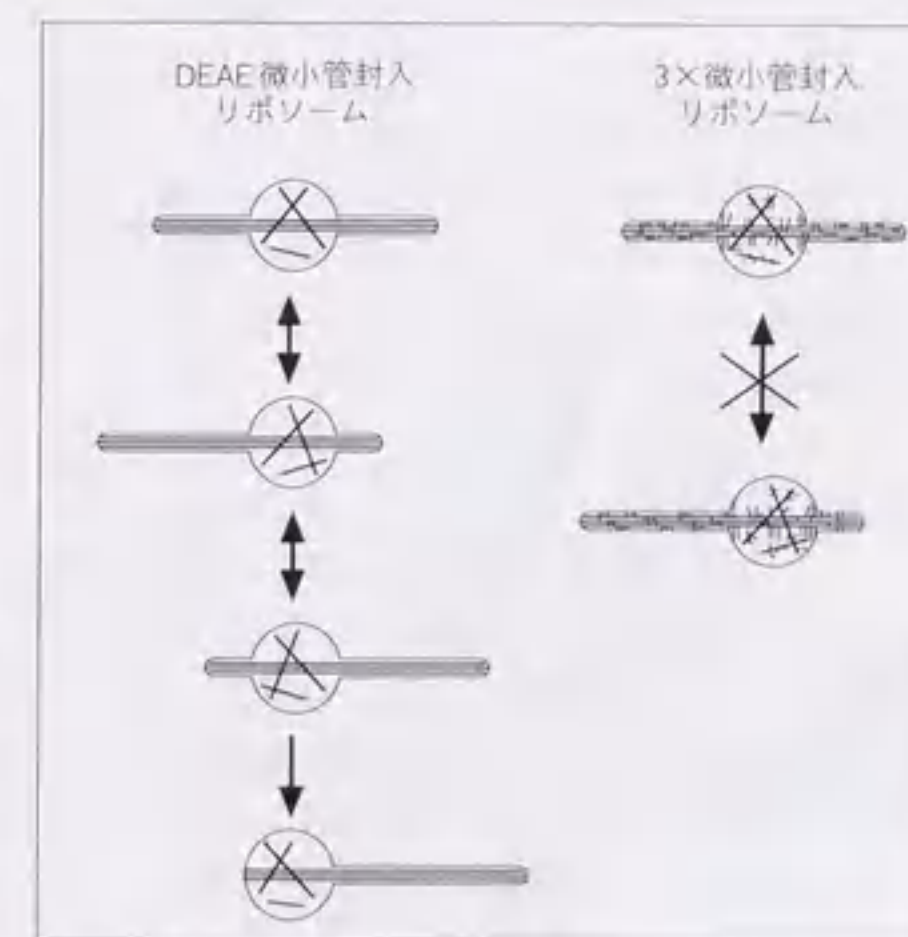


図3 2極性リボソーム安定化のモデル
DEAE微小管にはMAPsが存在しないので、球状部は自由に揺動する。3X微小管にはMAPsが付着しているので膜と結合する。その結果揺動は不能になり、形態的に安定化した。

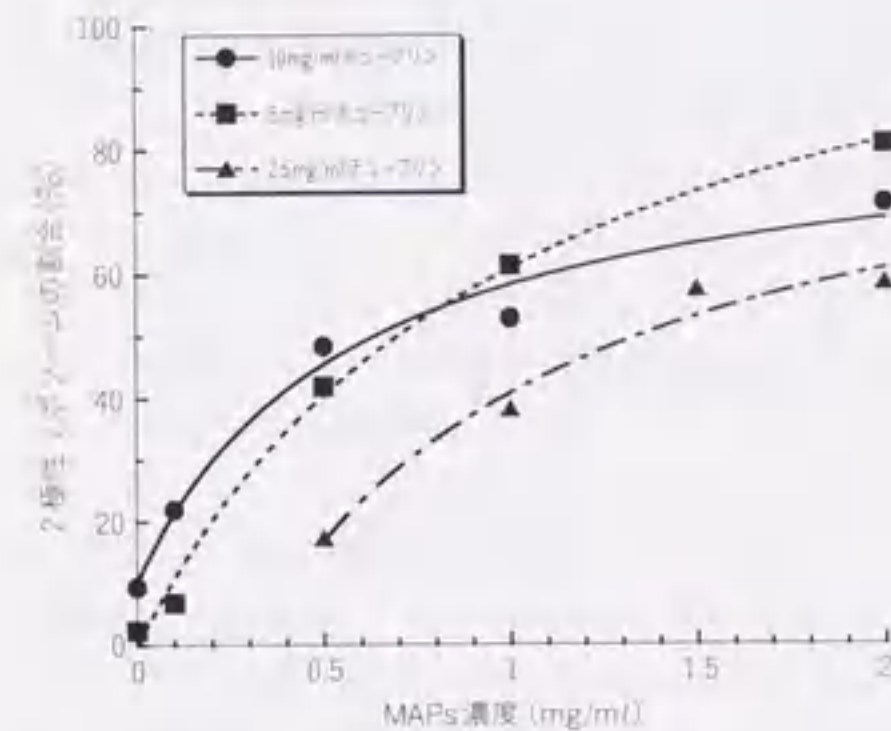


図4 MAPsによる2極性リボソームの安定化
DEAEチューブリンにMAPsを加えてから2極性リボソームを形成させた。2極性と1極性のリボソームの割合をMAPs濃度の関数として調べた。

とがわかった⁹⁾。

IV. 微小管成長方向のスイッチング

1. 微小管重合の方向性

可視化することによって最近明らかになった微小管の新しいダイナミクスに主題を移す。微小管のおもな機能は、細胞内で膜小胞や生体物質を方向性をもって輸送することである。そして微小管ネットワークは、細胞周期や生理的条件下に応じて組み換えられる。必然的に、その構築と解体の制御方式は高度に発達している。最近、紡錘体のような複雑な構造の形成さえも、微小管の巧妙な重合制御の結果として説明されようとしている⁹⁾。

微小管の典型的な特性として、動的不安定性 (dynamic instability)¹⁰⁾ やトレッドミリングがよく知られている。これらの実証のためには、個々の微小管の挙動の可視化がほとんど唯一の手段であった^{10,11)}。ここでは最近、やはり可視化によって初めて明らかになった微小管の成長方向の切り換え現象を紹介する。

微小管の重合ユニットはヘテロダイマーであり、 α と β の2種のチューブリンが軸方向に交互に配置している。このため微小管の構造自身にははっきりとした方向性がある。重合能をもつ遊離のチューブリン濃度が十分に高いときには、両端の重合成長速度には3倍程度の差があり、速いほうをプラス端、遅いほうをマイナス端

とよぶ。また、チューブリンが重合するためには、そのチューブリンにGTPが結合していなければならない (GTPチューブリン)¹²⁾。そして重合したのちしばらくして、そのGTPは加水分解される。その結果、微小管に組み込まれた大部分のチューブリンはGDPチューブリンに変わる。

このようにチューブリンにはGTPが結合しているが、一方アクチンにはATPが結合していて、両者ともに重合体形成に伴ってこれらのスクレオチドは加水分解されるという共通性をもつ。したがって細胞骨格の形成・解体過程をダイナミックにさせている機構が、これらの加水分解反応と深くかかわっていることは容易に想像がつく。事実、GDP微小管の構造は不安定であり、これが動的不安定性の原因になっている¹³⁾。

ところでチューブリンの濃度が下がってくると、微小管はプラス端からのみ重合成長するようになる。これは、マイナス端での重合に必要なチューブリンの臨界濃度がプラス端より高いためである。ところが最近、この成長方向の優先性がGDPの存在によって、プラス端からマイナス端へ切り換わるという意外な事実を、可視化することによって証明したので紹介する。生体には微小管のほかにも線維状超分子は多数存在するが、その成長方向が生理的物質によって切り換わるのが明確になった初めての例である。

2. 成長方向切り換えの映像化

微小管の成長方向の切り換えを実証するためには、個々の微小管の成長過程を可視化し、その同じ微小管を観察しながら環境条件を変えるのが一番確実であり、しかもほとんど唯一の実証方法である。微小管の成長方向を知るためには、まず既存の微小管の部分(重合核)とその端に新しく重合成長した部分を明確に区別して可視化する必要がある。筆者らは重合核としてウニ精子鞭毛の断片(軸糸; axoneme)を用いることにした。軸糸は太いので微小管とは容易に区別することができ、しかも軸糸中の微小管の方向性は完全にそろっている。この場合さらに重要なことは、軸糸は遊離チューブリン濃度がゼロになっても脱重合しないことである。また、軸糸は比較的容易にスライドガラス表面に吸着し、吸着後も両端ともに重合能を保持している。同一試料を顕微鏡観察しながら溶液を交換するために灌流法を採用した。カバーガラスの上下2方向をスパーサーで固定し、カバーガラスの右端に液滴を置き、左端から濾紙で吸水するという簡便な方法で灌流した。

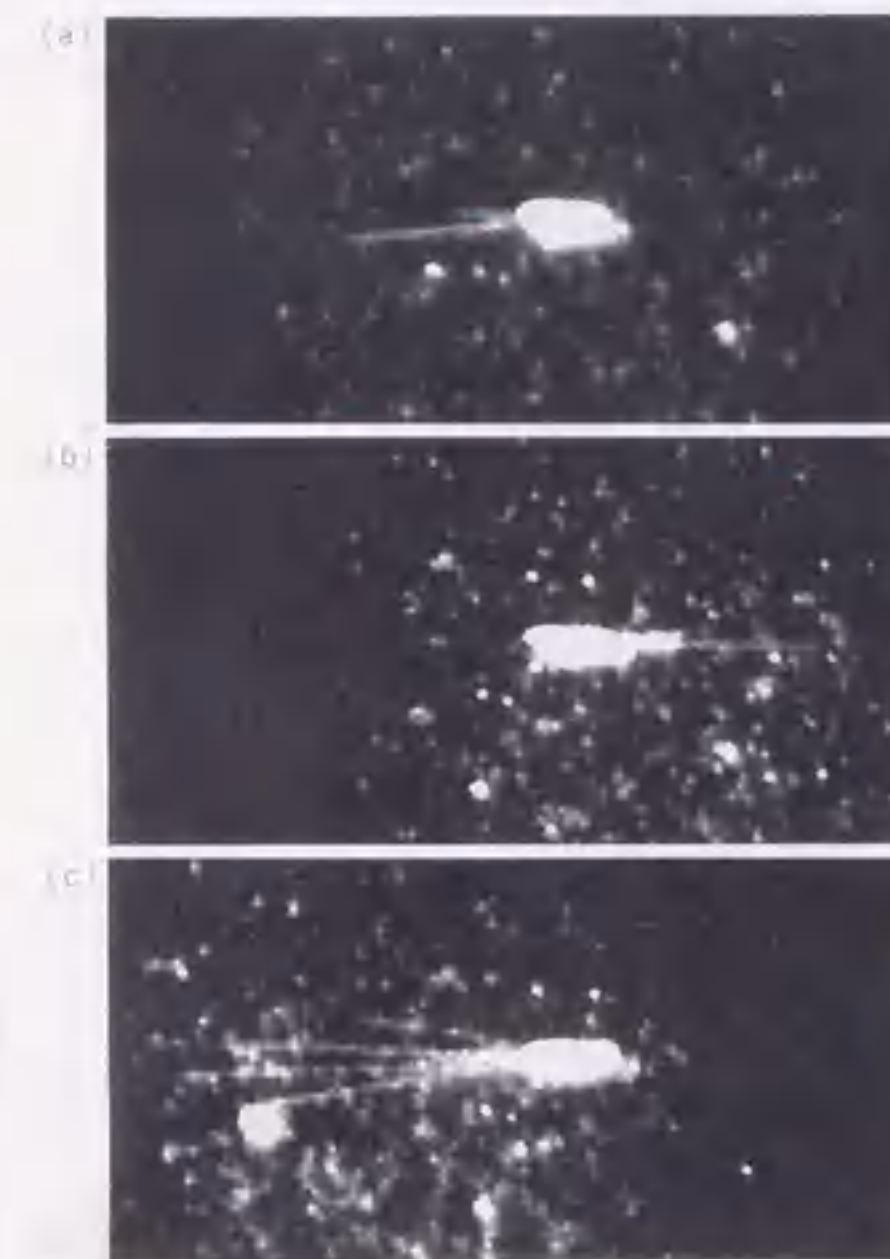


図5 微小管成長方向の切り換え
同一の軸糸から成長した微小管の顕視野光顕像。(a) 通常の溶液条件下でのプラス端成長。(b) GDP存在下でのマイナス端成長。(c) NEMチューブリンによるプラス端成長。

チューブリンの重合は通例のように、PM緩衝液 [0.1 M PIPES (pH6.9), 1 mM EGTA, 0.5 mM MgSO₄, 1 mM GTP] を用いた。つまり、重合にはGTPが不可欠なので、GTP濃度を1 mMに固定した条件下でのGDPの影響を調べた。通常の重合条件であるPM緩衝液ではチューブリン濃度が十数 μ Mを超えると、軸糸の両端から微小管が重合成長するので、軸糸の方向性を決めることがむずかしい。そこで、まず一端のみ微小管が重合する条件を探索した。その結果、10 μ Mのチューブリン濃度では一端でしか重合しないことがわかった (図5a)。したがって図5では、重合している左端がプラス端ということになる。そして、この同じ軸糸を観察しながらPM緩衝液で灌流して、重合成長した部分を完全に脱重合させた。次にPM緩衝液に1 mM GDPを加えた溶液条件下でチューブリンを灌流した。その結果驚くべきことに、今度は同じ軸糸の反対の端から微小管が一方方向成長した (図5b)。この結果は、灌流中に軸糸が移動して軸糸の方向が逆転したた

めではない。この可能性は、連続ビデオ記録と、視野に存在するゴミと軸糸の相対的位置により否定された。つまり、GDPによって微小管の優先的成長方向が、実際にプラス端からマイナス端へと切り換わったのである。ただし、GDPが存在すると一般的に重合能が落ちるので、この場合はチューブリン濃度を20 μ Mに濃くした。

このようにGDPの存在によって成長方向が切り換わることは明らかになったが、この切り換わった端がマイナス端であることをより確かにするために、もう一度同じ軸糸に対して灌流実験を行なった。チューブリンをN-エチルmaleimide (N-ethylmaleimide; NEM) 処理すると微小管のプラス端でのみしか重合しなくなることが以前より知られている¹⁴⁾。そこで、図5bの軸糸をもう一度PM緩衝液で灌流して、成長した部分を脱重合させた。ついでNEMチューブリンで灌流して再度重合成長させた。その結果、図5cで明らかなように左端のみで重合した。つまり左端がプラス端であることが確かめられた。この結果は図5aの結果と一致する。こうして、GDP存在下では実際にマイナス端から重合成長することが確かめられた。

おわりに 本稿で示したように微小管の重合方向切り換え能は、紡錘体における染色体移動や細胞骨格の代謝などのメカニズムを考えるうえで必須のコンセプトになるものと思われる。

文 献

- 1) Bangham, A. D.: *Bio. Essays*, **17**, 1081-1088 (1995)
- 2) Hotani, H., Miyamoto, H.: *Adv. Biophys.*, **26**, 135-156 (1990)
- 3) 宝谷敏一: 生体膜——生命の基本形を形づくるもの (葛西・田中編), pp. 153-161, 吉岡書店 (1996)
- 4) Roh, T. J., Hotani, H.: *Cell Struct. Func.*, **19**, 279-290 (1994)
- 5) 金子智行・伊藤知彦・宝谷敏一: *生物物理*, **35**, s30 (1995)
- 6) 梅田民樹・中島久男・宝谷敏一: *生物物理*, **35**, s30 (1995)
- 7) Hotani, H.: *J. Mol. Biol.*, **178**, 113-120 (1984)
- 8) Heald, R., Hyman, A., Karsenti, E. et al.: *Nature*, **382**, 420-425 (1996)
- 9) Mitchison, T., Kirschner, M.: *Nature*, **312**, 237-242 (1984)
- 10) Horio, T., Hotani, H.: *Nature*, **321**, 605-607

- (1986)
- 11) Hotani, H., Horio, T. : *Cell Motil. Cytoskel.*, **10**, 229-236 (1988)
- 12) Dustin, P. : *in* Microtubules, Springer-Verlag, Berlin (1984)
- 13) Hyman, A., Mitchison, T. *et al.* : *Methods in Enzymol.*, **196**, 482-483 (1991)

細胞骨格とリソソームによる細胞モデル形成*

金子 智行, 龍口 金吾, 宝谷 絃一*

細胞骨格とリポソームによる細胞モデル形成*

金子 智行, 龍口 金吾, 宝谷 紘一*

1. はじめに

細胞とは、相互に関係した多くの生化学反応を秩序正しく行なうために巧妙に構築された膜で囲まれた小空間であるともいえる。しかもこの構築物は一瞬たりとも停止することのない動的構造をしている。この動的特性を担っているのが細胞骨格である。人工脂質膜小胞(リポソーム)内部に実際に細胞骨格ネットワークを再構築させて細胞モデルを作る試みを紹介する。

2. 細胞は常時動的である

2.1 ネットワークとコンパートメント

生細胞の基本的な特徴は、システムとして常に動的であることである。その動的特性が失われ、システムとしての平衡状態になることは死を意味し、それは不可逆で二度と生細胞にもどることはない。細胞はその動的特性を維持するために多くの巧妙な仕掛けを積みだしてきたが、とりもあえず生化学反応の継続が必須である。このためには、エネルギー消費と共に空間的不均一性が必要である。細胞はその内部に多様なコンパートメント(膜小胞)を構築し、空間的な不均一性を作り出している(図1)。各膜小胞内は特異的な環境が保たれ、各反応が効率よく遂行されている。そしてこれらの諸反応が各々独立に進行するのではなく、巧妙に相互作用し合ってこそ生命活動が保てるのである。そのために細胞内の諸構造は常時ダイナミックに変化している。これらの構造変化を具体化させている装置が、微小管やアクチン線維から成るネットワークであ

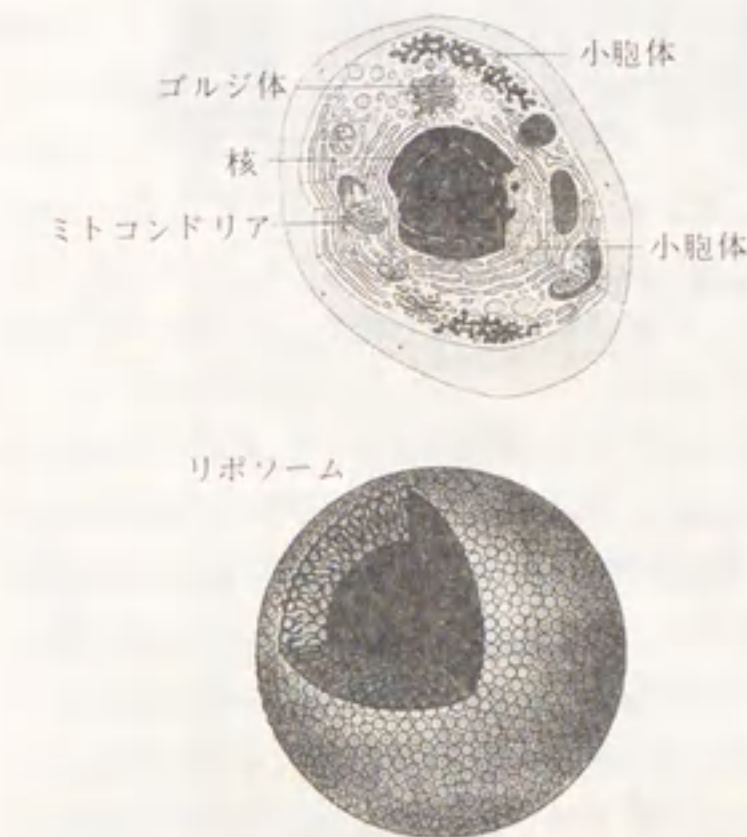


図1 細胞とリポソームの模式図

り、細胞骨格と呼ばれている。このネットワーク上をさまざまなモータータンパク質が走りまわり、その結果膜小胞は移動し、変形し、分裂したり、融合したりしている。

細胞自身も閉じた膜胞であるが、その役目に応じて特異的な形をしている。例えば、神経細胞は通信ケーブルの働きをする大変細長い膜管である軸索や樹状突起を発達させている。小腸上皮の細胞は栄養物質の吸収効率を上げるために、筒状膜突起であるじゅう毛が細胞表面から多数突出している。

細胞内器官の形も特異的である。例えば、プロトンの濃度勾配を利用して、生体エネルギーの基本物質であるATPを合成するミトコンドリアでは、プロトンを貯めるために、2重の膜構造になっている。しかも膜表面でのATP合成酵素の数を増やすために内膜は複雑に折りたたまれている。分泌性タンパク質が合成される小胞体は、分泌作用に便利のように枝分かれした膜管のネットワークになっている。

さらに、細胞の形はその生理的条件下に応じて変形す

* A cell model made of cytoskeletons and liposome
* Tomoyuki KANEKO, Kingo TAKIGUCHI, Hirokazu HOTANI,
名古屋大学大学院理学研究科生命理学専攻
Department of Molecular Biology, School of Science,
Nagoya University.
(〒464-01 名古屋市千種区不老町)
Key words: Cell model, Cytoskeleton, Liposome, Talin,
Microtubule.

る。時には方向性のある変形をくり返すことにより細胞は移動することもできる。そこで、細胞の形態形成や変形の機構を知るために、細胞骨格蛋白質とリポソームから成る細胞のモデルシステムの構築を試みた¹⁾。

2.2 細胞骨格のリサイクル

細胞骨格蛋白質としては微小管、中間径繊維、アクチン繊維が知られている。この3者のうち、中間径繊維は極めて安定な繊維であり、細胞の静的な構造維持に働いているものと思われる。これに対して微小管、アクチン繊維は非常に動的な繊維である。そこで本稿で取りあげる細胞骨格は微小管とアクチン繊維に限ることとする。この両者は細胞内で常時、重合と脱重合反応を行って、形成と解体をくり返している。つまり、細胞骨格は細胞内でリサイクルしているのである。このような動的特性をもつ構造が細胞モデル作成には不可欠である。

細胞内には多くの小器官があり、その多くはタンパク質分子や脂質分子の自己集合によって形成される。生命活動に関与しているこれらの器官が静的に安定であるわけではなく、多かれ少なかれ変化し、新陳代謝している。しかしながら、細胞器官の中には特別にダイナミックに形成・解体を繰り返しているものがある。それが微小管とアクチン繊維である。これらの場合には形成・解体過程そのものが生理機能であり、役割になっている。単なる代謝とは意味が異なっているのである。アクチン繊維の形成・解体による細胞の移動運動などはその典型である。そしてチューブリンにはGTP、アクチンにはATPが結合していて、両者共に重合体形成にともなってこれらのヌクレオチドは加水分解されるといふ特性をもつ。したがって形成・解体過程をダイナミックにさせている機構が、これらの加水分解反応と深く関わっていることは容易に想像がつく。

微小管は細胞周期や細胞の生理的条件下で常に形成・解体を繰り返している。細胞は微小管が必要になった時には、サブユニットであるチューブリンを集合させて微小管を形成する。一方、生理的条件が変化して不必要になると、その微小管を素早く脱重合させて再び個々のチューブリンにする。脱重合したチューブリンは、つぎの微小管形成の際の構成要素として利用される。

3. 膜モデルとしてのリポソーム^{2,3)}

脂質分子は、溶液中で疎水基同士を内側にし、親水

基を両表面つまり溶液に露出することによって自動的に集合して脂質二重層膜を形成する。その膜は自然に閉じて閉鎖空間つまりリポソームになる(図1)。そしてこの膜は基本的に生体膜と同様の物理的性質を持っている。このシートは2次元液晶であり、脂質分子はシート内を自由に移動することが出来る。この脂質分子の液晶の中に様々なタンパク分子が浮遊しているのである。もちろん、これらのタンパク分子が勝手に動きまわったのでは十分な機能を発揮できない。そこで微小管やマイクロフィラメントなどの繊維状の細胞骨格が細胞内にあり、それらが、膜タンパク質の動きを制御し、細胞自体の形態を維持する働きをしている。

3.1 リポソーム中での細胞骨格形成

リポソームは一般に球形であるが、我々は細胞骨格を用いてリポソームの形態を制御することに成功した。即ち、チューブリンをリポソーム内に閉じ込めてから微小管を形成させた。その結果、球と管状部分からなる二極性リポソームや多方向に伸展した多極性リポソームを形成することが出来た。特に多極性リポソームの形は生細胞と区別がつかないほど類似していた。

3.2 ダイナミックなリポソームの映像化

光学顕微鏡では観察が不可能と考えられていた小さな生体分子集合体(超分子)も、高輝度光源を用いた暗視野法によって観察可能になることが近年わかってきた。太さ24nmの微小管や⁴⁾、厚さ5nmの脂質二分子層膜からなるリポソーム等の動的な構造が溶液中でははっきりと見えるようになってきている⁵⁾。最も“生”状態の超分子を観察できる暗視野光顕法には次のような利点がある。(1)高いコントラスト像が得られる。(2)光の波長よりずっと小さなものが見える。(3)前処理なしで生の試料を見れる。超分子をはじめとする生体試料は、できるだけ生理的環境下で、染色や固定などの前処理なしで試料を観察できれば理想的である。(4)環境変化の影響を直接観察できる。(5)超分子の運動や形態変換を動的に観察できる。

このような利点を考慮して、以下の研究では暗視野光学顕微鏡法をリポソームの観察に用いた。

3.3 微小管重合による二極性リポソームの形成

リポソームの形成は通常の方法によった。すなわち、クロロホルム：メタノール=98:2(体積比)の有機溶媒に溶かした混合脂質を窒素ガス流によって溶媒を蒸発させ、さらに真空中で完全に乾燥させた後、その脂質フィルムに任意の水溶液を加えてリポソームを形成させた。

まず、微小管のサブユニット蛋白質であるチューブリンが重合可能な環境条件下で、なおかつ比較的大きなリポソームを形成させうる脂質組成を探索した。その結果、ジミリスチルフォスファチジルコリン(DMPC)にホスファチジルグリセロール(PG)またはカルジオリピン(CL)を混ぜた系が適切であることが分かった。チューブリンを内部に取り込んだリポソームを作るために、乾燥混合物脂質にチューブリン溶液を加えてリポソームを形成させた。この時、リポソームが形成される以前にチューブリンが重合して微小管になることを避けるために、チューブリンが重合不能である10°C以下の低温でリポソームのみを形成させた。リポソーム外部のチューブリンは希釈して重合を抑制しておき、その後温度を30°C以上にすることによってリポソーム内部でのみ微小管を成長させた¹⁾。

微小管の成長に伴って球形リポソームはレモン型に変形する(図2)。その際、しばしば中心軸に沿って微小管の存在が確認できる。次にレモン型の両端から直線状に膜管が突出し、時間と共に管部が成長し、中心部はレモン型から球状へと変化する。これらは、微小管が同一方向に成長し、二極性のリポソーム(図3)が形成された例であるが、この結果は微小管の重合反応がリポソームの形態変化を起こすのに十分な物理的力を発生していることを示している。なお、このリポソームに含まれているのはチューブリンのみであり、エネルギー物質や運動性蛋白質は存在しない。したがってこの場合、微小管同士のすべり運動によるリポソ

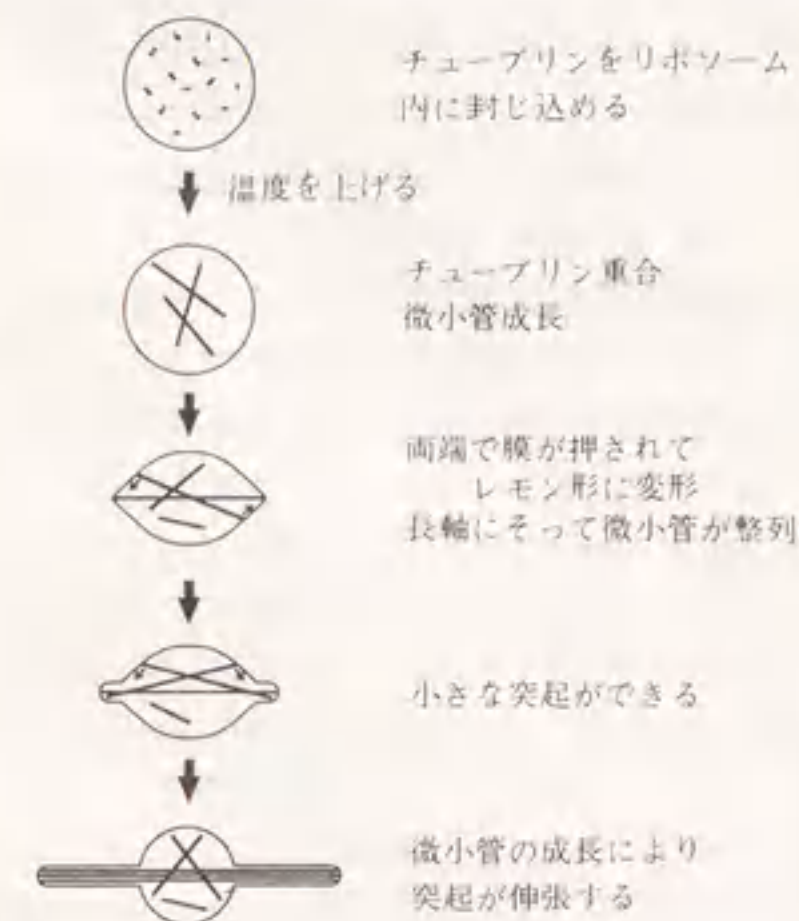


図2 二極性リポソームの形成過程模式図。リポソーム中での微小管の重合成長によって形成される。



図3 二極性リポソームの暗視野光顕像。縮尺:10μm。

ムの変形の可能性はない。

脂質膜が力によって、明確に区別できる管状部と球部に自律的に形態分化できる性質をもっていることも注目される。ゴムのような通常物質の膜ではこのような形態分化は不可能である。

管状部の長さを計測すると、成長と短縮を繰り返している例が多く見られる。この挙動は、微小管一本で見られる動的不安定性の動きときわめて類似している。すなわち、短縮速度は成長速度に比べて速く、短縮相の時間は短い。この結果は、リポソーム管状部の長さが微小管によって規定され、微小管の長さが変化することによって、膜の形態が同時的に追従変化するを示している。

3.4 微小管を膜に結合するタンパク質

細胞内で細胞骨格が安定なネットワークを構築するためには、細胞膜との間に何らかの結合や相互作用が働いていると思われる。事実、アクチン繊維の場合には、膜に結合させるための様々なタンパク質が同定されている。一方、微小管の場合にはどのようなタンパク質が膜との結合に介在しているかは未だに明らかではない。

ところで、上述の二極性リポソーム形成の際に用いたチューブリンにはMAPsとよばれる微小管結合タンパク質が含まれている(3Xチューブリン)。そこで膜小胞の形態形成におけるMAPsの働きを探るために、DEAEカラムクロマトグラフィーによってMAPsを除いた純粋のチューブリン(DEAEチューブリン)を用いて、二極性リポソームを形成させた。意外なことに、この二極性リポソームの球状部は、管状部に沿っ



図4 二極性リボソームの形態的揺らぎ。球状部の相対的位置が管状部に沿って揺動している。暗視野顕微鏡像。

て移動する揺らぎ運動を示した(図4)。この時、球状部の移動にもかかわらず2つの管状部を総計した全長も球部の大きさも一定に保たれたままであった。つまり、リボソーム膜は球状と管状の形態を自在に相互変換する能力を持っているのである。そして、球状部が揺動して管状部の一端にまで達すると、移動は停止し安定化する。その結果二極性リボソームは、片方にしか管状部をもたない一極性リボソームとして安定することになる¹⁾。つまり、膜小胞に管状部と球状部がすでに共存していれば、その両者間の形態転換は容易に起こるが、球状部から、管状部を新しく生じさせるためには大きな物理的力が要るのである。さらに興味深いことには、リボソーム膜が境界のはっきりとした2つの部分に形態分化する能力を持つことである。このような形態分化能は、2次元液晶膜であることと内圧によって生じる特性であることが、理論的な解析によって示された¹⁾。もちろん、この範疇に入る生体膜も同様の性質を持つことが実験的に明らかになっている²⁾。膜胞が持つこの特異的な形態分化能力は各種細胞の形態形成に大きな役割を果たしているものと考えられる。

しかし、3Xチューブリンを用いた時には、2極性リボソームは安定していて、球状部が移動するようなことはない。つまり、3Xチューブリンに含まれているMAPsを介して微小管と膜が強く相互作用するために、2極性の形が安定しているものと思われる(図5)。これを確かめるためにDEAEチューブリンに様々の濃

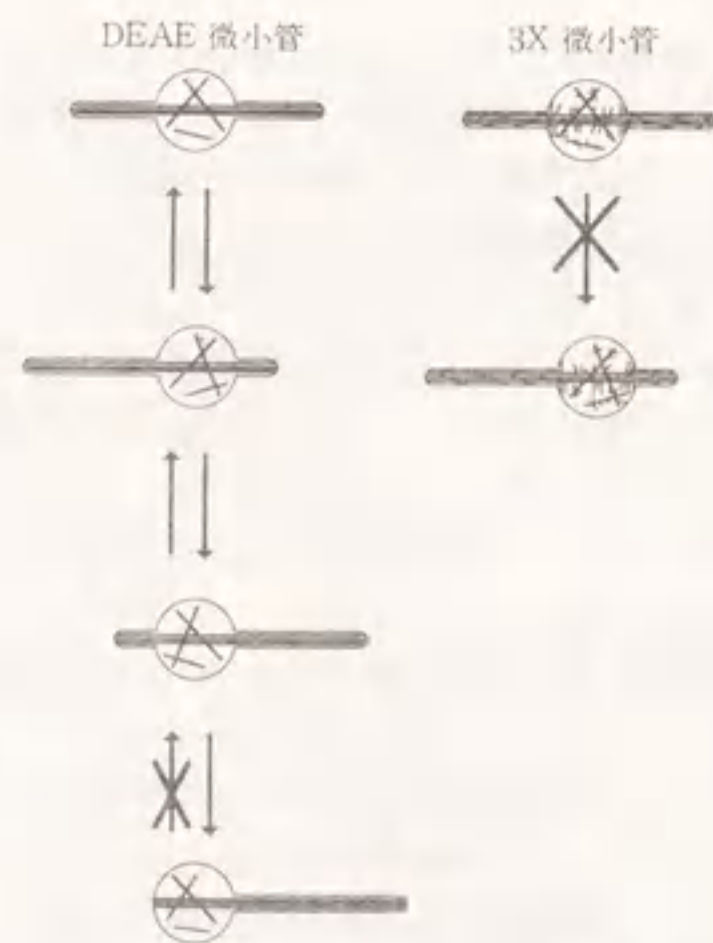


図5 二極性リボソーム安定化モデル。DEAE微小管にはMAPsが存在しないので、球状部は自由に揺動する。3X微小管にはMAPsが付着しているためと結合する。その結果揺動は不能になり、形態的に安定化する。

度のMAPsを加えてから、2極性リボソームを形成させて、その安定性を調べた。一定時間後も2極性の形に留まっている割合は、MAPs濃度の上昇と共に増加した。つまり、球状部の移動はMAPsによって抑制されることが分かった。

この抑制は、MAPsが介在して微小管と膜を結合させることが原因であると思われる。この結合能を確かめるために、MAPs存在下で微小管とリボソームを超速心して、両者が共沈殿するかどうか調べた。1.2Mのショ糖層の上に試料をのせて4万g×30分間超速心した。この超速心で、リボソームと結合した微小管はショ糖層の上面に留まるのに対して、結合しない微小管はショ糖層の低まで沈殿する。この共沈実験によって、MAPsが微小管と膜を結合する能力を持ち、MAPsの成分の中でも特にMAP1が重要であることが解った³⁾。

3.5 多極性リボソームの形成

しかしながら、これら2極性リボソームの形は普通の細胞の形からはほど遠い。この原因は内部の微小管が同一方向にそろって成長するためである。浮遊しているリボソームの中では各微小管は自由に方向を変えられるので、成長の易しい長軸方向に自然に向く。そこで、微小管の重合開始前にリボソームをガラス表面に吸着させて、内部の微小管の移動を押さえながら成長させてみた。予想どおり各微小管は別々の方向へ成長



図6 微小管成長によって形成された多極性リボソーム。暗視野光学顕微鏡像。

し、それらのリボソームは培養細胞と区別のつかないぐらい似た形になった(図6)。実際に、ガン細胞などの特殊な細胞を除けば、通常の生細胞の成長にはシヤレー等の物理的の表面が必要である。その原因はこの細胞モデルと類似の物理的の要因かもしれない。

4. アクチン重合によるリボソームの変形

アクチン繊維は微小管とは異なり、きわめて細く(約7nm)、したがって柔らかい。実際に蛍光顕微鏡による観察では、微小管は常に直線状で固いが、アクチン繊維は常時激しく不規則な曲げ変形をおこなっている。このような柔らかい繊維が単独で、リボソームを変形させ得るとは考えにくい。事実、細胞内では多数のアクチン繊維が束になりストレスファイバーとよばれる構造を作ることによって細胞骨格の役割を果たしている。我々は研究の第一段階として濃厚アクチン溶液中でリボソームを形成させ、外部のアクチン溶液を希釈した後、リボソーム内部のアクチンのみを温度上昇によって重合させた。その結果、微小管の場合のように突起を形成することはなかったが、リボソームの形は円盤型もしくはダンベル型へと変形した⁴⁾。

暗視野顕微鏡像に加えて蛍光顕微鏡法や偏光顕微鏡法を使うことによって、それらの変形したリボソーム内部ではアクチン繊維が自立的に整列し、束を形成していることが明らかになった。そして、円盤形やダンベル型は、これらの自然に形成されたアクチン繊維束の曲げエネルギーを最小にする形として説明することが出来る。

最近、アクチンタンパク質に、アクチン繊維束化因子である α アクチニン⁵⁾やファシジン⁶⁾をあらかじめ加えた系でリボソームを変形させたところ、予想どおり2極性リボソームが形成された。これは柔らかいアクチン繊維でも始めから束になっていれば、微小管の場合と同じように重合成長によって物理的の力を発生でき

ることを示している。

5. リボソームを穿孔する細胞骨格関連タンパク質

細胞モデルを構築する際、リボソームに様々な生体分子を封入する技術の確立が肝要である。リボソームの形成時に封入する方法については既に述べた。しかし、一旦形成されたリボソームに新たに超分子を挿入する方法は未だ確立していない。リボソームは物理的に極めて柔らかく、安定に穿孔する方法が無いからである。電気穿孔のような技法を用いて瞬間的に小さな穴を開けても、瞬時に修復されてしまう。そもそも、疎水基を水から遮へいさせるために脂質2重層膜が自然に形成され、しかもそれが閉じられるぐらいだから、疎水基が水に曝されることになる穴など安定に存在するはずはないのである。しかし意外なところからこの問題の突破口が開かれた。

最近我々は、生体膜と細胞骨格を結合させるために働いていると考えられているタンパク質タリンや赤血球膜骨格タンパク質であるバンド4.1がリボソーム膜を穿孔し、脂質2重層膜の開放端を形成してそれを安定化する能力を持つことを発見した¹¹⁾。

5.1 細胞骨格結合タンパク質タリン

細胞の外側にある細胞外マトリクスと内側にあるアクチン繊維の間の結合は、細胞膜にある膜貫通型タンパク質、インテグリンを介してなされている。アクチン繊維とインテグリンは直接結合することはできないが、タリンがこの間を架橋している。タリンは、分子量225-235kDaのタンパク質で、リン脂質膜と直接結合する能力も持つ。タリンによって引き起こされるリボソームの形態変化を、暗視野顕微鏡を用いて観察した。

5.2 タリンによるリボソームの変形

ニワトリの砂囊から抽出したタリンを用いて、リボソームの形態変化を調べた。2種類の脂質から成るリボソーム、ホスファチジルエタノールアミン(PE):ホスファチジルグリセロール(PG)=1:1(モル比)にタリンを加えると、球形リボソームがU字型に見えるリボソームに変形した。暗視野顕微鏡では、集点面における輪郭だけが光って見えて、このU型に見えるリボソームは、実は3次元的にはカップ型であることが分かった。またこのカップ型リボソームの開口部から、小さなリボソームが入り出すことも観察され、実際に穴になっていることが確かめられている¹¹⁾。

タリン濃度の上昇に伴ってカップ型のリボソームの

ほかに、シート状に変形したものが見つかった。シート状のもの以外にもカップの開口部が2つ、または3つ開いたものも観察された。

5.3 タリンの灌流によるリボソームの形態変化
球型のリボソームがカップ型やシート状に、どのような過程によって変形するのかを知るために、顕微鏡下でタリンの溶液の灌流を行った。タリン濃度の上昇に従って、はじめ球型のリボソームに一つの大きな穴が開いてカップ型となり、しだいに開口部が広がってゆき、最終的にシートに変形する過程が映像記録により明らかになった(図7)。また、多重膜のリボソームで、外側のリボソームに穴が開いてカップ型に変形し、中のリボソームが外部に出てくることも観察された。これは、シートが自由端を持つ一枚の脂質二重層膜であることを示している。

5.4 タリンによる変形は可逆的である
上記と同様の方法で、タリンによってカップ型やシート状に変形したリボソームに対して、緩衝液で灌流を行い、徐々にタリン濃度を下げていったところ、シートは次第にカップ型となり、カップの開口部はさらに縮小し、ついには球型のリボソームへと変形復帰した。つまり、タリンによるリボソームの変形は可逆的であった(図8)。タリン濃度の希釈によって、この変形が可逆的に行われたのは、タリンが縁の部分から解離して縁の長さが短くなり、シートからカップ、カップから元の球型リボソームへと変化したと考えられる。

5.5 脂質二重層膜の縁にタリンは局在する
タリンとの結合により、縁のある脂質二重層膜が水性溶液中で安定に存在できることが分かった。おそらく脂質二重層膜の縁にタリンが結合し、疎水性部分を覆い隠しているものと考えられる。そこでタリンの局在を調べる実験を、蛍光色素を結合させたタリンを用いて行ったところ、予想通りの結果が得られた(図9)。

タリン濃度の上昇に従い、上述したようにカップ型

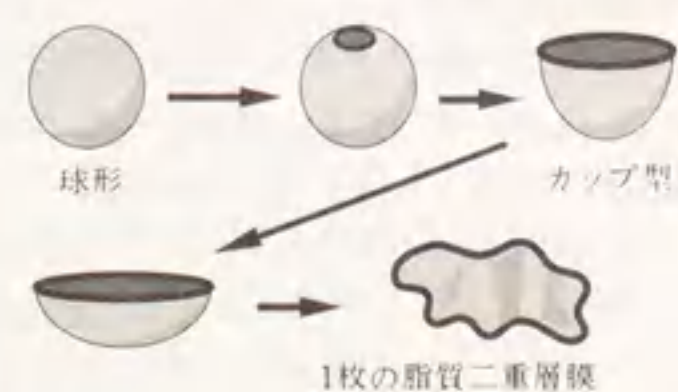


図7 球形リボソームからシート状膜への変形過程。太線は、タリンが局在している部分を示す。

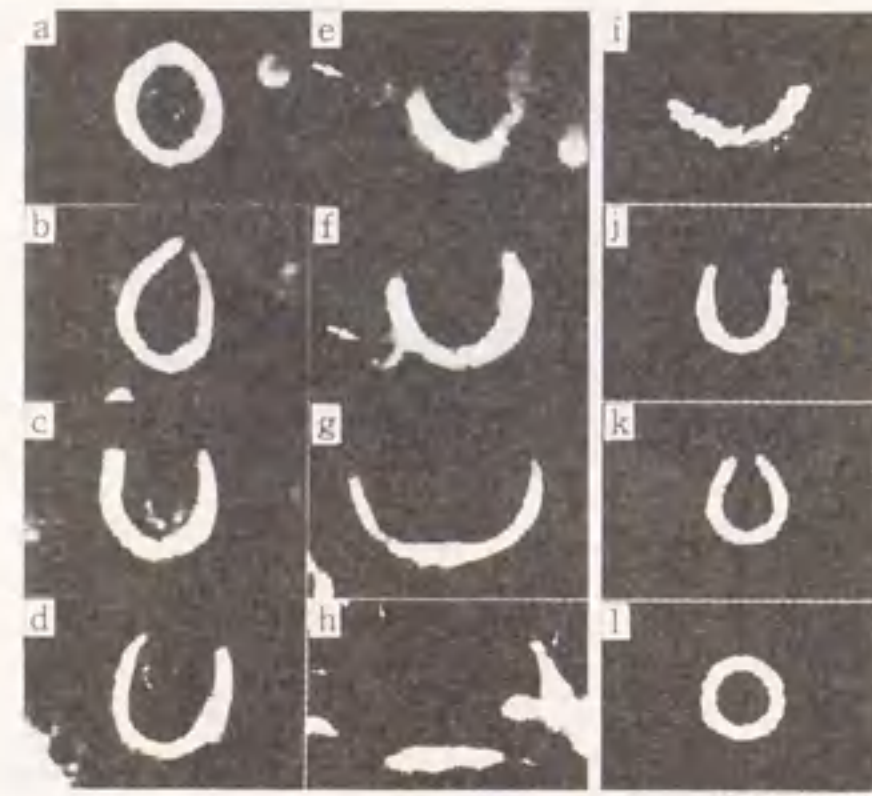


図8 リボソームの可逆的形態変化(暗視野光学顕微鏡像)。タリン濃度を時間的に上昇させた時の形態変化(a-h)。タリン濃度を時間的に希釈した時の形態変化(i-l)。縮尺: 5 μ m。



図9 開孔リボソーム上のタリンの局在。上段: 暗視野光学顕微鏡像。中段: 蛍光顕微鏡像。下段: タリンの局在(黒太線)。縮尺: 5 μ m。

リボソームがシート状へと変形するが、これは、カップの開口部の縁にさらにタリンが結合し、リボソームの表面積は変わらずに、縁の長さだけが伸長した結果であると考えられる。シートの状態にさらにタリンが結合した場合、縁の長さだけが伸長し、縁の入り組んだ形になることが予想される。実際、高濃度のタリン中では、断片化したシートが多数観察された。これは、縁の入り組んだシートから、端が分断されていった結果であると考えられる。以上の結果により、タリンの濃度を調節することによってリボソームに任意の大きさの穴をあけることが可能になった。単に細胞骨格を入れるためだけではなく、リボソームにさまざま

な超分子などを封入する技術として、医学方面の応用を含めてこの系は将来有用になるものと思われる。

6. 細胞モデルの将来

生体細胞は状況の変化に即応して生き残り、増殖することを使命としている。そのために極めて多種類のセンサーとその情報処理システムを持っている。さらに環境の激変に備えて多くの非常時反応系も用意している。そして重要な諸機能には、故障時に備えて何重ものバイパスシステムが備わっている。またこれらの系を発現させる膨大な遺伝子情報とタンパク質合成系が用意されている。これらのシステムを働かせるためには高効率のエネルギー獲得システムとエネルギー変換系も必要である。

これらの諸機能がバランス良く働いてこそ、細胞システム全体としての増殖率を上げることができる。このため多くの場合、単一生体機能の極限化はシステムのバランスを壊し、増殖系全体としての効率を下げ、むしろ有害なケースが多い。

もし、人工的に安定な環境とエネルギー物質を用意し、増殖能も不要ということになれば、極限化された単機能細胞を創製することはあながち夢ではない。生体において実際にこの方針に従っている例の一つが赤血球である。酵素運搬という単機能のためにヘモグロビンのみを超高濃度に詰め込み、他の機能を犠牲に

し、ついには増殖能までも喪失している。極限化された単機能人工細胞は、生体外での高率タンパク質合成系やニューロシステム、あるいは生体内においても赤血球や白血球の役割をはたす人工細胞などさまざまな応用が考えられる。リボソームを用いた細胞モデルは人工細胞をめざした研究の第一歩になろうとしているところだ。

参考文献

- 1) H. Hotani, H. Miyamoto, *Advan. Biophys.*, 26, 135(1990)
- 2) A. D. Bangham, *Bio Essays*, 17, 1081(1995)
- 3) 宝谷統一, 生体膜—生命の基本形を形づくるもの—(葛西・田中編), 153頁, 吉岡書店(1996)
- 4) T. Horio, H. Hotani, *Nature*, 321, 605(1986)
- 5) H. Hotani, *J. Mol. Biol.*, 178, 113(1984)
- 6) 金子智行, 伊藤知彦, 宝谷統一, *生物物理*, 35, s30(1995)
- 7) 梅田民樹, 中島久男, 宝谷統一, *生物物理*, 35, s30(1995)
- 8) H. Miyata, H. Hotani, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 11547(1992)
- 9) 本田誠, 龍口金吾, 宝谷統一, *生物物理*, 35, s31(1995)
- 10) 本田誠, 龍口金吾, 宝谷統一, *生物物理*, 36, s96(1996)
- 11) 齊藤彰彦, 龍口金吾, 宝谷統一, *生物物理*, 36, s34(1996)

Faint, illegible text on the left page, possibly bleed-through from the reverse side. The text is arranged in several paragraphs and includes some faint markings that could be initials or small diagrams.

Faint, illegible text on the right page, possibly bleed-through from the reverse side. The text is arranged in several paragraphs and includes some faint markings that could be initials or small diagrams.



細胞骨格による人工膜小胞の形態制御

名古屋大学大学院理学研究科生命理学専攻
本田 誠, 瀧口金吾, 金子智行, 宝谷紘一

To study the morphogenesis of cells caused by the organization of their internal cytoskeletal network, we characterized the transformation of liposomes encapsulating actin and its crosslinking proteins, or tubulin and microtubule associated proteins (MAPs), using high-intensity dark-field microscopy. With increasing temperature, the encapsulated G-actin polymerized into actin filaments and formed bundles or gels, depending on the type of actin-crosslinking protein that was co-encapsulated, causing various morphological changes of liposomes. When tubulin was polymerized with MAPs in liposomes, liposomes were transformed into a "bipolar" shape. This shape was stabilized only when MAPs were co-encapsulated.

1. 形あつての膜器官

膜の基本的な役目は空間を区切ることであり、その機能はうめこまれたタンパク質が担っている。その形は大切でなさそうに思える。ところが、その膜小胞がどの種類の器官であるかは、その形を見ればわかる。つまり膜器官はそれぞれ独自の機能に応じた独特の形があつてはじめて有効にその機能を十二分に発揮できるのである。形の重要さは、細胞内器官に限ったことではない。細胞自体の形も細胞の機能とより密接に関係している。

我々は膜小胞の形態形成の要因を探るために、人工膜小胞(リボソーム)¹⁾を使った構造的な研究を進めてきた²⁾⁻³⁾。その結果、次のような事実が明らかになった。水溶液中のリボソームは決して不定形ではなく、多様ではあるが幾何学的対称性の高い形をしている。その形は安定したものではなく変化する。その変化は順次的に進行し、数種類の主要なる形態変換パスウェイがある。リボソーム自身が形態を形成し制御する能力を持っているのである。順次的多形変換能は生体膜を含めた極めて広範な脂質2重層膜の本質的特性である。この形態変換の駆動力は浸透圧差によるリボソームの体積変化である。細胞内膜器官の多くの形はリボソームで見られる形を組み合わせることによって造り出せる。つまり細胞内膜器官は、脂質自身もつ形態形成能を取捨選択しながらフルに利用しているのである。

2. 細胞骨格によるリボソームの変形

上述したように細胞内器官の場合は、膜小胞の自律的な形態形成能によって造形可能である。しかし細胞本体になると、その大きさや複雑さからして、骨格が必要になってくる。細胞骨格の働きを探るために、リボソーム中で細胞骨格を形成させた⁴⁾。微小管の成長に伴って球形リボソームは、まずレモン型に変形する(図1)。次にレモン型の両端から膜管が突出し、中心球と2つの管から成る二極性のリボソームへと変形する。この結果はチューブリンの重合反応が脂質2重層膜の形態変化を起こすのに十分な大きさの物理的力を発生していることを示している。また、脂質膜が力によって、明確に

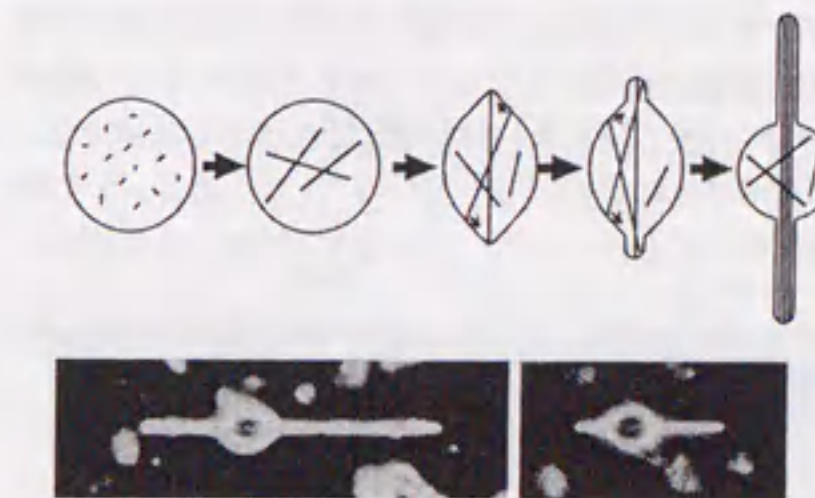


図1 微小管の重合成長による二極性リボソームの形成過程模式図(上段)とその暗視野光顕像(下段)。

Morphological Transformation of Liposomes Caused by Assembly of Encapsulated Tubulin or Actin with Associated Proteins

Makoto HONDA, Kingo TAKIGUCHI, Tomoyuki KANEKO, and Hirokazu HOTANI
Department of Molecular Biology, Graduate School of Science, Nagoya University

区別できる管状部と球部に自律的に形態分化できる性質をもっていることも注目に値する。ゴムのような通常物質の膜ではこのような形態分化は不可能である。

しかしながら、これらの形は普通の細胞の形からはほど遠い。この原因は内部の微小管が同一方向にそろって成長するためである。浮遊しているリボソームの中では各微小管は自由に方向を変えられるので、成長の易しい長軸方向に自然に向くのである。そこで、微小管の重合開始前にリボソームをガラス表面に吸着させて、内部の微小管の移動を押さえてから成長させてみた。予想どおり各微小管は別々の方向へ成長し、それらのリボソームは培養細胞と区別つかないぐらい似た形になった⁹⁾。実際に、生細胞の成長にはシャーレー等の表面が必要である。その原因はこれと類似の物理的な要因かもしれない。

3. 形態形成のシミュレーション

膜は2次元液晶とみなせるので、ずり変形に対する弾性はゼロであるが、曲げ弾性のエネルギーは蓄積することができる⁶⁾。そこで、与えられた体積と表面積の下で、小胞全表面の曲げ弾性エネルギーを最小にする形を計算機によって求めた。その結果、各バスケイでそれぞれの多角板状で真ん中の凹んだ形の安定性が示された⁷⁾。

細胞骨格による二極性リボソームの場合も、両端の2点に内部から押す力を与え、曲げ弾性とつり合わせ、リボソーム全体の曲げ弾性エネルギー最小の形を計算機で求めた(図2)⁸⁾。その結果、レモン型や球部を持つ二極性リボソームを作らせるためには、リボソームの内圧が不可欠であることが解った。内圧があれば管部と膨張部に形態分化するのであろうか。内圧存在下では、体積を減らすことは仕事をするを意味するの

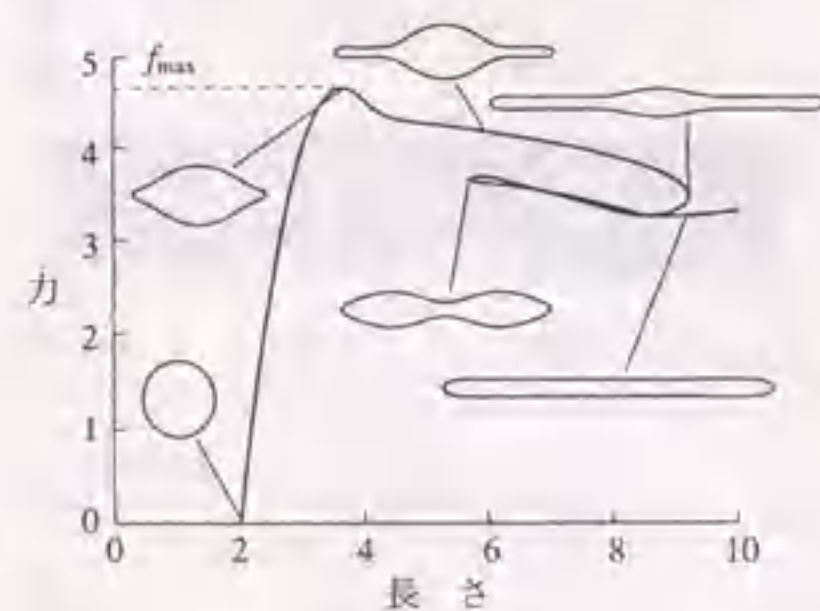


図2 二極性リボソーム形成のシミュレーション。

で、できるだけ体積を減少させないようにしながら、両端距離を伸ばす必要がある。つまり、球部で体積を稼ぎながら、管部で長さを稼いでいるのである。

4. 二極性リボソーム上での球状部の揺動

細胞内で細胞骨格が安定なネットワークを構築するために、細胞膜との相互作用が働いており、アクチン線維の場合には膜に結合させるためのさまざまなタンパク質が同定されている。一方、微小管の場合にはどのようなタンパク質が膜との結合に介在しているかはいまだに明らかではない。

通常、微小管の再構成には3Xチューブリンが用いられ、上記の二極性リボソーム形成にも3Xチューブリンが用いられた。しかし、3Xチューブリンには微小管結合タンパク質(MAPs)が含まれている。そこで、形態形成における各々の作用をより詳しく知るために、MAPsを除いた純粋なチューブリンを用いて二極性リボソームを形成させた⁹⁾。意外なことに、この二極性リボソームの球状部は、管状部に沿って移動するゆらぎ運動(揺動)を示した(図3)。この時、球状部の移動にもかかわらず2つの管状部を総計した全長も球部の大きさも一定に保たれたままであった。そして、揺動によって球状部が一端にまで達し、1個の球部と1本の管部の形(一極性リボソーム)になると、揺動は止まり、再び二極性リボソームに形態復帰することはなかった。復帰できない理由は、球部と管部の既存の境界を移動させるのに必要な力は、熱運動程度で充分であるが、境界を新たに造るためには大きな力が必要になるためだと推察される。このことは先のシミュレーションで、レモン形から管部が突出する際に最大の力が要ることによっても支持されている。

揺動の事実はさらに、膜小胞の形は全体の総和エネルギーによって決定されることを示唆している。二極性リボソームの場合、両管部の全長と球部の形が一定であれば、球部の位置は何処であっても全エネルギー

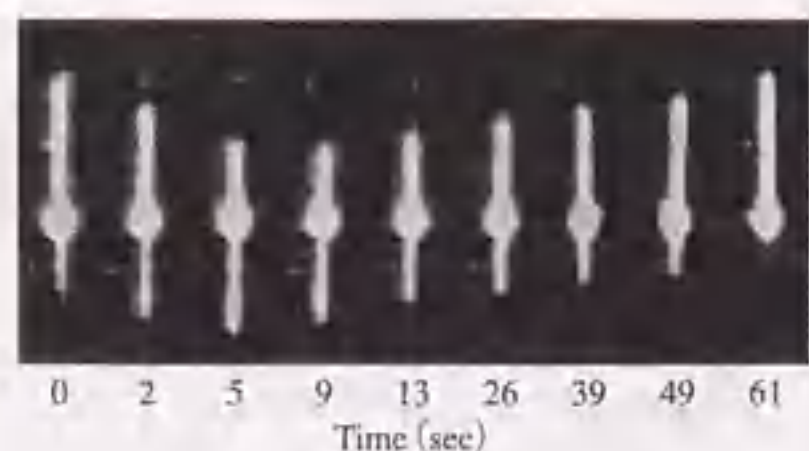


図3 二極性リボソームの形態的ゆらぎ。

はほとんど変わらないのである。また、同じ脂質分子からできている膜が管状にも球状にも自在に相互変換できることをも示している。つまり膜小胞の場合は、構成要素は形を決めるための主因ではないのである。この点では、同じ自己集合原理によって形成されるとはいえ、タンパク質超分子とは大きく異なる。

5. MAPsによる揺動の抑制

球状部の揺動の結果、二極性リボソームは時間とともに一極性リボソームに変化する。微小管成長開始30分後には、3Xチューブリンの場合には形態変化したリボソームの80%以上が二極性であるが、純粋チューブリンの場合には100%近くが一極性になっている。そこで、MAPsのリボソーム形態の安定化能を確かめるために、純粋チューブリンにMAPsを加えて、リボソームの中で微小管を形成させた。その結果、加えるMAPsの濃度の上昇に伴って、予想通り二極性リボソームの割合が増加した。つまり、MAPsが球部の移動を抑制する作用を持っているのである。

では、どのようなメカニズムで抑制されるのであろうか? MAPsは繊維状のタンパク質で、微小管の表面に結合し、突起を出している。そこで、MAPsの共沈能によってMAPsの膜に対する結合能を検定した。ところで、MAPsは数種類の微小管結合タンパク質の混合物である。検定の結果、その中で十分な膜結合能を持っていたのはMAP1で、MAP2は弱い結合能を示し、 τ (タウ)は結合しなかった。そこで、精製したMAP2と τ を各々加えて二極性リボソームの安定率を測ったところ、予想に反して、MAP2は十分に強い抑制能を持ち、まったく膜に結合しない τ も50%近い抑制能を持っていた。つまり二極性リボソームの形態の安定化には、かならずしもMAPが膜に直接結合する必要はないのである。

この間接的な抑制に対して、次ぎのようなメカニズムが考えられる。今回使用したリボソームは負電荷を帯びている。そして、純粋の微小管も強い負電荷を持っているので、MAPs非存在下では、膜と微小管は反発し合っている。しかし、MAP2も τ も、結合することによって微小管の負電荷を中性化することが知られている。こうして反発力がなくなり、管状部内での相互作用が強くなる。また、微小管表面から突出しているMAP2が管内での微小管の移動に物理的な抵抗となっていることも容易に想像できる。 τ の突出部はMAP2のそれよりかなり小さいので、揺動抑制能が半分は落ちる要因になっているのかもしれない。

6. アクチン重合によるリボソームの変形

微小管とともに、細胞の動的性質を担っているもう一つの細胞骨格であるアクチン繊維はきわめて細く(約7 nm)、したがって柔らかい。このような柔らかい繊維が単独で、リボソームを変形させ得るとは考えにくい。事実、細胞内では多数のアクチン繊維が束になりストレスファイバとよばれる構造を作ることによって細胞骨格の役割を果たしている。リボソーム内部でアクチンのみを重合させた時には、リボソームの形は円盤型もしくは両杓子型へと変形した⁴⁾。それらのリボソーム内部ではアクチン繊維が自立的に並んでいることが判った。そして、円盤形や両杓子型は、これらのアクチン繊維束の曲げ弾性エネルギーを最小にする形として説明できる。

7. 膜小胞形態形成におけるアクチン結合タンパク質の役割

数種の代表的なアクチン結合タンパク質を加えた系でアクチンを重合成長させて、リボソームの形態形成を観察した。まず、強い東化因子であるファッシンをあらかじめアクチンに加えた系でリボソームを変形させたところ、予想どおり二極性リボソームが形成された(図4、図5)¹⁰⁾。これは柔らかいアクチン繊維でも密な束になれば、微小管の場合と同じように重合成長によって物理的な押力を発生できることを示している。また、ファッシンは膜と結合しないことが判ったので、リボソームの変形はファッシンのアクチン東化因子としての特性に起因していることは確かである。さらに、5mM MgCl₂存在下では、突起が多方向に成長することも明らかになった。

この研究に付随して大変興味ある事実が見つかった¹⁰⁾。微小管によるリボソーム変形の場合には、微小管が膜を突き破ることは決してない。しかし、ファッシンの場合

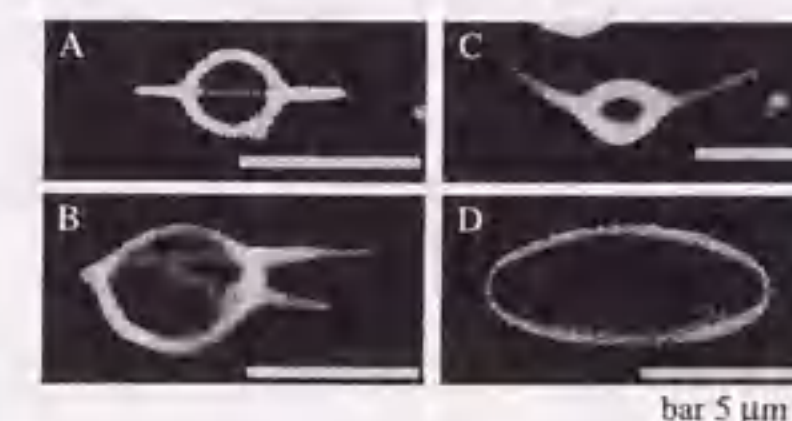


図4 アクチン結合タンパク質存在下での、アクチン重合によるリボソームの形態形成。ファッシン (A)、ファッシン+Mg (B)、 α アクチニン (C)、フィラミン (D)。

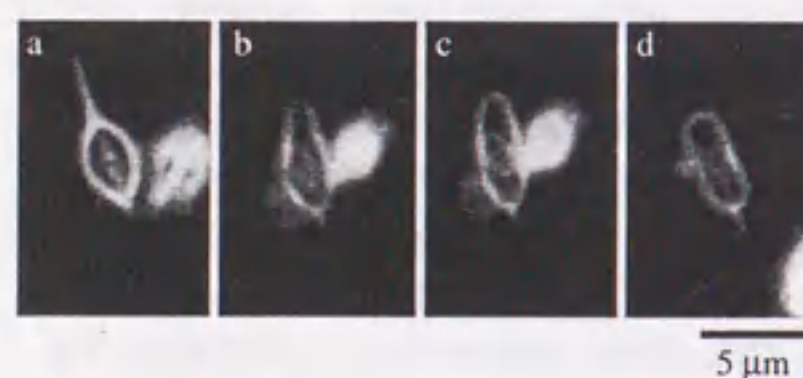


図5 アクチン束によるリボソームの穿孔と形態変化。二極性リボソームの下端に穴が開き、アクチン束の一部が放出され、内圧の減少によってピーナツ型に変形する課程。

は時々二極性リボソームの管部の先端で穴が開き、アクチン繊維束が飛び出すのである。穴が開くとアクチン繊維束が外に出てくるだけでなく、即時にリボソームの形が二極性型からピーナツ型に変換する(図5)。この事実は、先のシミュレーションによって示されたように、二極性型は内部圧力があるはじめて維持される形であることを強く示唆している。さらに、内圧消失と同時に、管部と球部に形態分化する特性も失われる。

ストレスファイバ形成に働いている α -アクチニンには比較的ルーズなアクチン繊維束を作ることが知られている。 α -アクチニンを加えたりボソーム内でアクチンを重成長させたところ、変化したリボソームの大部分は円盤型や両杓子型であり、アクチン単独の場合と同様であった。ごくまれに二極性リボソームも形成されたが、その時でも2つの管状部は、一直線ではなく折れているケースが多く、全体の形も脆弱であった(図4)。つまり、ルーズなアクチン繊維束では物理的強さが不足であり、十分な押力が発揮できないのである。

アクチン結合タンパク質の中には束化作用ではなく、立体的なネットワークを形成するものがあり、その代表がフィラミンである。フィラミンを加えた場合はその大部分はナッツ型になり(図4)、その形は極めて固く安定になる。内部にはアクチン繊維のネットワークが一様に分布していた。

8. 細胞骨格の架橋様式とリボソームの形態

アクチン繊維に対する架橋様式がリボソームの形を決めている。すなわち、ファッシンは55 KDの単量体としてアクチン繊維を架橋するために、極めて密着した繊維束を形成する。約100 KDの α -アクチニンは二量体となり、約40 nmの細長い分子としてアクチン繊維を架橋するので、ファッシンの場合よりもルーズな束を作る。約250 KDのフィラミンも二量体とし、約160 nmもの伸びた柔らかい繊維状分子としてアクチン繊維を多方向に架橋する。

リボソームの形態形成には多くの種類の力が働いていることが明らかになった。タンパク質の重合によって発生する伸長力は繊維の固さが十分であれば押力として働き、突起を形成する。この押力を多方向に固定すれば細胞型が形成される。繊維が柔らかい場合でも繊維が並べば、できるだけ曲げを小さくするための側方は発揮できる。また三次元ネットワーク形成も立体的形態形成に働く。将来、これらの力の定量的測定が可能になったときに、細胞骨格の働きはより詳しく明らかになるであろう。

文 献

- 1) Bangham, A.D. (1995) *Bio Essays* 17, 1081-1088.
- 2) Hotani, H. (1984) *J. Mol. Biol.* 178, 113-120.
- 3) Hotani, H., Miyamoto, H. (1990) *Advan. Biophys.* 26, 135-156.
- 4) Miyata, H., Hotani, H. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 11547-11551.
- 5) Saitoh, A., Takiguchi, K., Tanaka, Y., Hotani, H. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 1026-1031.
- 6) Canham, B. (1970) *J. Theor. Biol.* 26, 61-81.
- 7) Sekimura, T., Hotani, H. (1991) *J. Theor. Biol.* 149, 325-337.
- 8) Umeda, T., Nakajima, H., Hotani, H. (1998) *J. Phys. Soc. Jap.* 67, 682-688.
- 9) 金子智行, 瀧口金吾, 宝谷絏一 (1997) 表面, 35, 191-197.
- 10) 本田 誠, 瀧口金吾, 宝谷絏一 (1996) 生物物理 36, s96.

