

002による微分算第長方向の逆転

樋口陽子



①

報告番号 甲第 4249 号

学位論文

GDPによる微小管伸長方向の逆転

名古屋大学大学院 理学研究科 分子生物学専攻

瀧口 陽子

1999年2月

【本論文で用いた略号】

GTP : guanosine 5'-triphosphate

GDP : guanosine 5'-diphosphate

NEM : N-ethylmaleimide

PMSF : phenylmethylsulfonyl fluoride

DTT : dithiothreitol

GMPPNP : guanosine 5'- (β , γ - imido) triphosphate

GMPPCP : guanosine 5'- (β , γ - methylene) triphosphate

GMPCPP : guanosine 5'- (α , β - methylene) triphosphate

GRS : GTP regenerating system

【目次】

〈要旨〉	1
〈序論〉	2
〈材料と方法〉	15
〈結果〉	22
チューブリン試料中の遊離のヌクレオチドの除去	22
微小管の重合核としてのaxonemeの使用	22
GDPの微小管伸長形態への影響	23
灌流実験による微小管の極性の決定	26
微小管伸長方向の逆転	30
GDPによるマグネシウムのキレートの影響	35
〈考察〉	36
〈謝辞〉	43
〈参考文献〉	44

【要旨】

微小管は、重合と脱重合を交互に繰り返す動的不安定性 (dynamic instability) と呼ばれる特有の性質を示す。この動的不安定性にはGTPとGDPが深く関与している。また、微小管は極性をもつ線維状重合体である。この極性は染色体の分離、細胞内輸送などの様々な細胞の機能に重要な役割を果たしている。そこで、GDPが微小管の伸長方向に及ぼす影響を調べた。GTPのみの存在下またはGTPとGDP共存下でウニまたは精子鞭毛のaxonemeから微小管を重合させ、それを暗視野顕微鏡で観察した。どちらの条件下においてもaxonemeの片方の端からのみ微小管が伸長するチューブリン濃度が存在した。axonemeの片方の端からのみ伸長した微小管の伸長方向を、灌流装置を用いた観察系とN-ethylmaleimideで修飾したチューブリン (NEM-チューブリン) を組み合わせて決定した。その結果、GTPのみの存在するときは、axonemeのプラス端から微小管が伸長していた。一方、GTPとGDPが共存するときは、マイナス端から微小管が伸長していた。さらに、同様の実験系でGTPのみを含む溶液をGTPとGDPの両方を含む溶液に交換することにより、同じaxonemeで微小管の伸長方向がプラス端からマイナス端に変わるのを直接観察した。以上の結果より、GDPが微小管のプラス端の伸長を阻害すること、それによって微小管の伸長方向をプラス端からマイナス端へ逆転させるということが明らかになった。

【序論】

〔細胞骨格とは〕

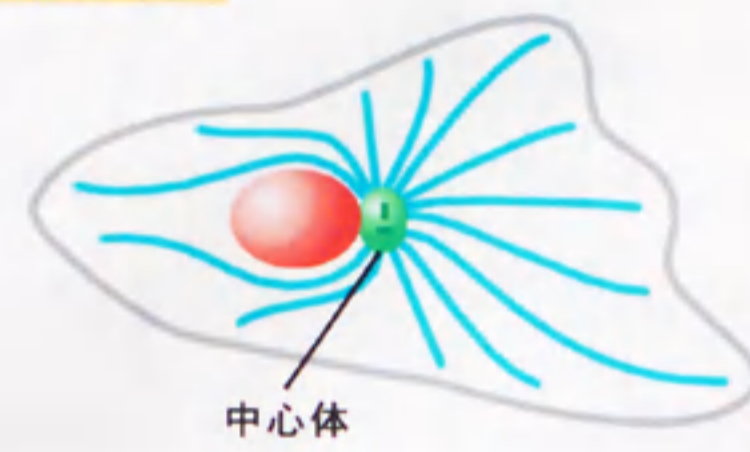
真核細胞が様々な形をとり、統一のとれた方向性のある運動をするのは、細胞質全体に張りめぐらされたタンパク質線維の複雑な網目構造による。この構造を細胞骨格と呼ぶ。細胞骨格は、細胞が形を変えたり分裂したり、また外界に対して反応する際にすみやかに解体・形成される非常に動的な構造である。細胞骨格には、アクチンフィラメント、微小管、中間系フィラメントの3種類のタンパク線維がある。各線維はそれぞれ異なるタンパクサブユニットからできており、アクチンフィラメントはアクチン、微小管はチューブリン、中間系フィラメントはビメンチンやラミンなどが重合したものである。これらのタンパク線維は多様な結合タンパク質と結合して、細胞の異なる場所で異なる機能を果たす。

〔細胞内における微小管の働き〕

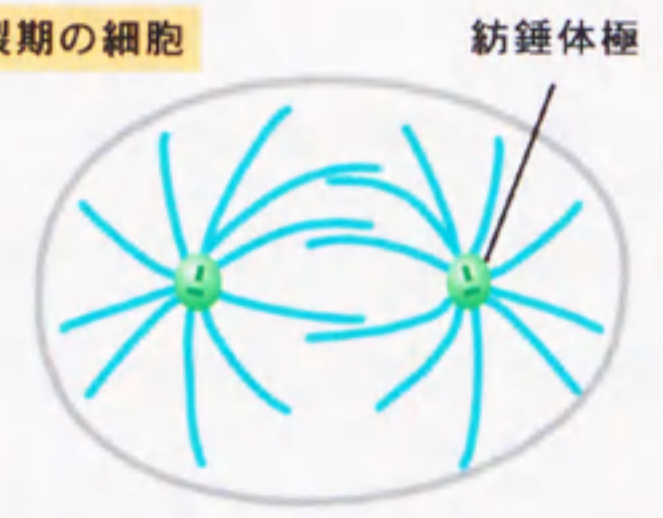
細胞骨格の1つである微小管は、単細胞生物からヒトに至る真核生物に普遍的に存在し、その働きはきわめて多岐にわたる(図1)(Dustin, 1978; Hyman & Lloyd, 1994)。例えば、細胞分裂時には紡錘体の主要構成成分として染色体の分配に関与している。細胞周期の間期においては中心体(centrosome)から放射状に伸びて細胞骨格を形成し、物質の細胞内輸送のレールとして機能している。神経細胞では軸索の形態や機能の維持に不可欠な役目を果たしている。また、真核細胞に共通な運動器官である鞭毛や繊毛においては、その主要な構成成分となり鞭毛運動を担っている。

細胞内一器官としての微小管の最大の特徴は、きわめてダイナミックな特性をもっているということである。微小管は細胞周期や細胞の生理的条件下に応じて常に形成・解体を繰り返している(Kirschner & Mitchison, 1986)。細胞は微小管が必要になったときには、チューブリンを重合させて微小管を形成する。一方、生理的条件下が変化して不必要になると、微小管をすばやく脱重合させて再び個々のチューブリンにす

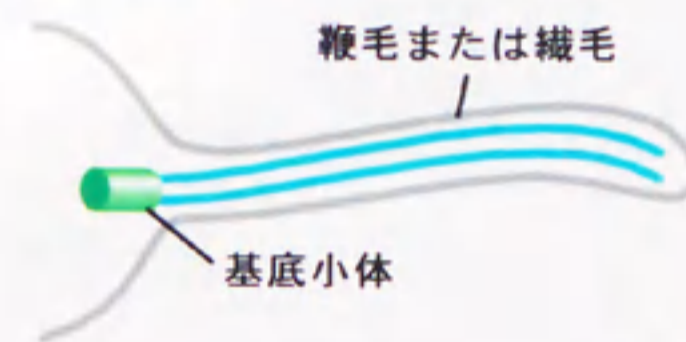
間期の細胞



分裂期の細胞



鞭毛のある細胞



神経細胞

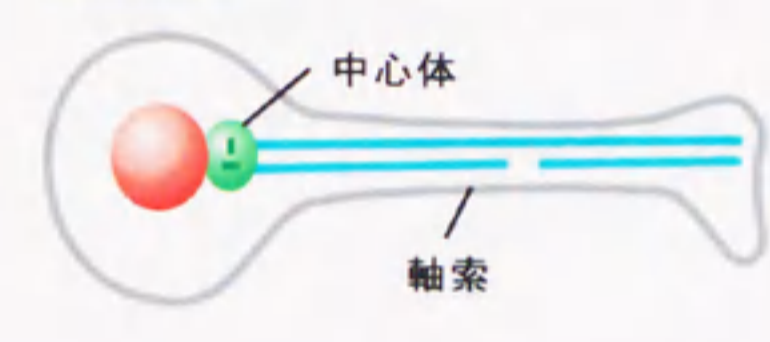


図1 細胞内での微小管の分布

る。脱重合したチューブリンはアミノ酸にまで分解されるのではなく、次の微小管形成の際の構成要素として利用される。

[微小管の構造]

微小管は、チューブリンから構成された外径約 25 nmの細長い管状構造体である(図2)。チューブリンはヘテロダイマーであり、各サブユニットは α サブユニット、 β サブユニットと呼ばれている。 α サブユニットと β サブユニットは互いによく似ており、ともに分子量約 50,000である(Burns, 1991)。微小管をネガティブ染色し電子顕微鏡で観察すると、数本の素線維を識別することができる(図3)。この素線維をプロトフィラメントと呼び、チューブリンが一直線上に連なった構造をしている(Amos & Klug, 1974)。現在知られている微小管のプロトフィラメント数は、10~15本と多様性に富んでいる。*in vitro*でチューブリンのみから重合した微小管のプロトフィラメントは条件にもよるが一般的に14本のもが多く、中心体や鞭毛の一部であるaxonemeから重合した微小管のプロトフィラメント数は13本である(Evans *et al.*, 1985)。

チューブリンの α サブユニットと β サブユニットは、プロトフィラメント上を長さ方向に交互に並んでいる(Amos & Klug, 1974)。そのため、微小管には長さ方向に極性があり、 α サブユニットが露出している端と β サブユニットが露出している端が存在する。微小管の2つの端は重合速度の違いで区別され、重合速度が速い方をプラス端、遅い方をマイナス端と呼ぶ(Allen & Borisy, 1974)。細胞内では微小管の極性はそろっており、中心体や基底体(basal body)などの微小管形成中心(microtubule organizing center)に結合している方がマイナス端である(McIntosh & Euteneuer, 1984)。

[微小管の重合]

1972年Weisenbergは微小管の*in vitro*再構成に成功し、そのとき微小管の重合にカル

A



B



図2 微小管の構造
A. プロトフィラメントが13本でB-latticeの場合のチューブリンの配置を示す。B. Aの微小管を上から見た図

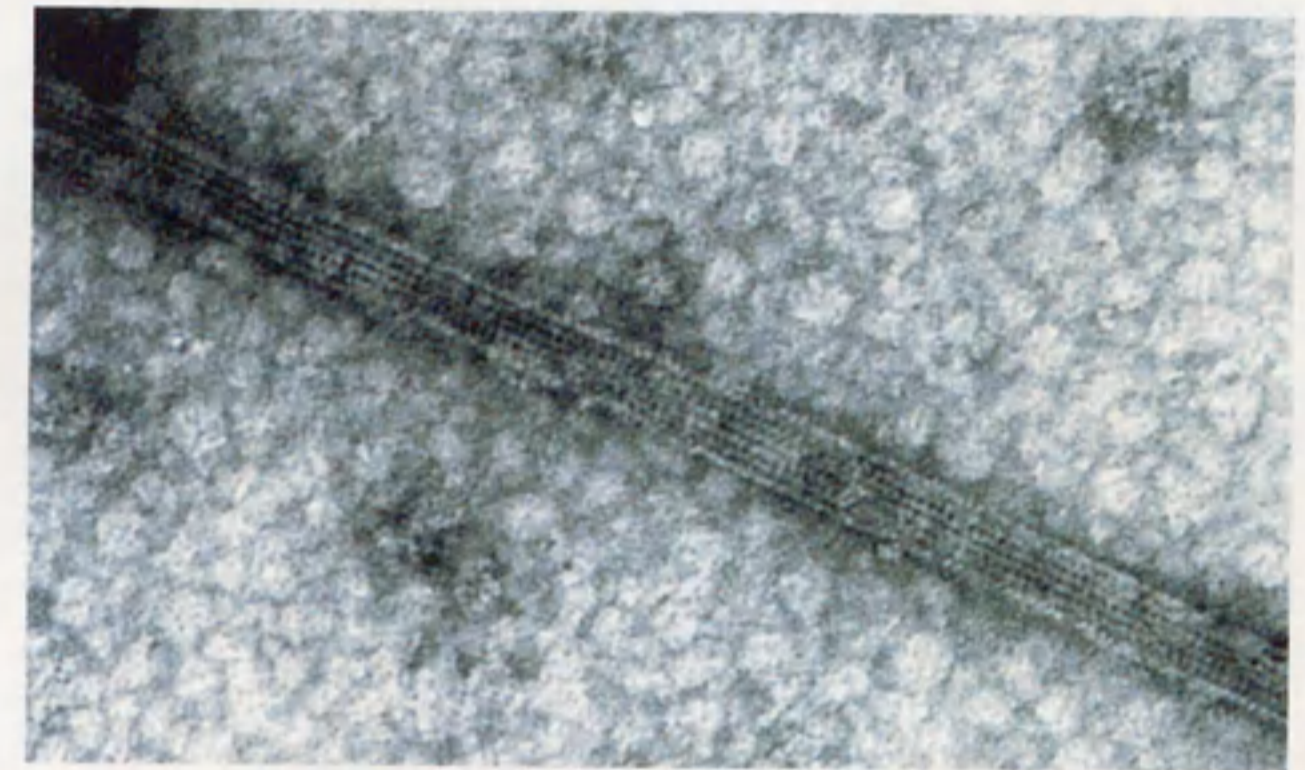
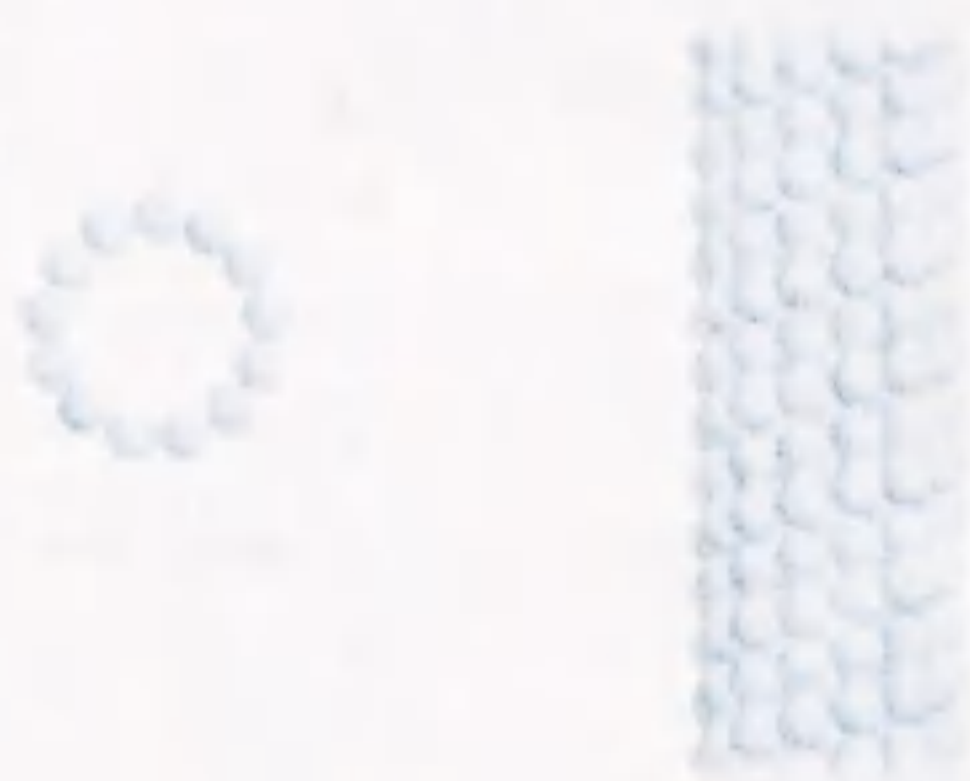


図3 微小管の電子顕微鏡像

15 μ M チューブリンを1 mM GTP存在下で、27°Cで20分間重合させた。微小管重合の核として *Tetrahymena* の axoneme を用いた。伸長した微小管を2% 酢酸ウランでネガティブ染色し、電子顕微鏡で観察した。

Bar = 50 nm

シウムのキレート剤とマグネシウムとGTPが必要であることを報告した (Weisenberg, 1972)。また、微小管は温度の上昇とともに重合量が増加し37℃で最大となるが、低温条件下におくと速やかに脱重合する。チューブリンの精製は、この性質を利用して行われている。

チューブリンを重合させるとき、チューブリン濃度がある閾値以下の場合には重合がまったく起こらないが、この濃度を超えると平衡状態ではそれを超えた分が重合体として存在するようになる (Oosawa & Asakura, 1975)。この濃度を臨界濃度 (critical concentration) と呼ぶ。微小管の両端で臨界濃度は異なっており、プラス端よりマイナス端の方が高い (図4) (Bergen & Borisy, 1980)。また、微小管の重合過程では、まず遅い核形成反応が起こりそれに続いて速い伸長反応が起こる (Carlier & Pantaloni, 1978) (図5)。つまり、微小管の重合には、チューブリンどうしの結合による核形成が必要である。微小管の断片などの重合核をあらかじめ加えておくと、臨界濃度が下がる。つまり、より低い濃度で微小管が重合することができる。

[微小管の重合とGTPの加水分解]

チューブリンの α サブユニットと β サブユニットはそれぞれ1分子のグアニンヌクレオチドを結合する。 α サブユニットのGTP結合部位をN-site (nonexchangeable site) と呼び、ここに結合したGTPは遊離のGTPと交換されず、加水分解もされないのが通常は無視される。一方、 β サブユニットのGTP結合部位をE-site (exchangeable site) と呼び、ここに結合したGTPは溶液中のGTPと交換可能である (Weisenberg *et al.*, 1968; Berry & Shelanski, 1972)。ただし、チューブリンが微小管内に組み込まれているとき、このGTPは溶液中のGTPとは交換できない (Jacobs *et al.*, 1974)。また、E-siteに結合したGTPはチューブリンが重合した後に加水分解されてGDPになる (Weisenberg *et al.*, 1976)。

微小管重合におけるGTP加水分解の役割は、加水分解されないGTP analogueであるGMPPCP, GMPPNP, GMPCPPの使用により明らかにされた (Mejillano *et al.*, 1990;

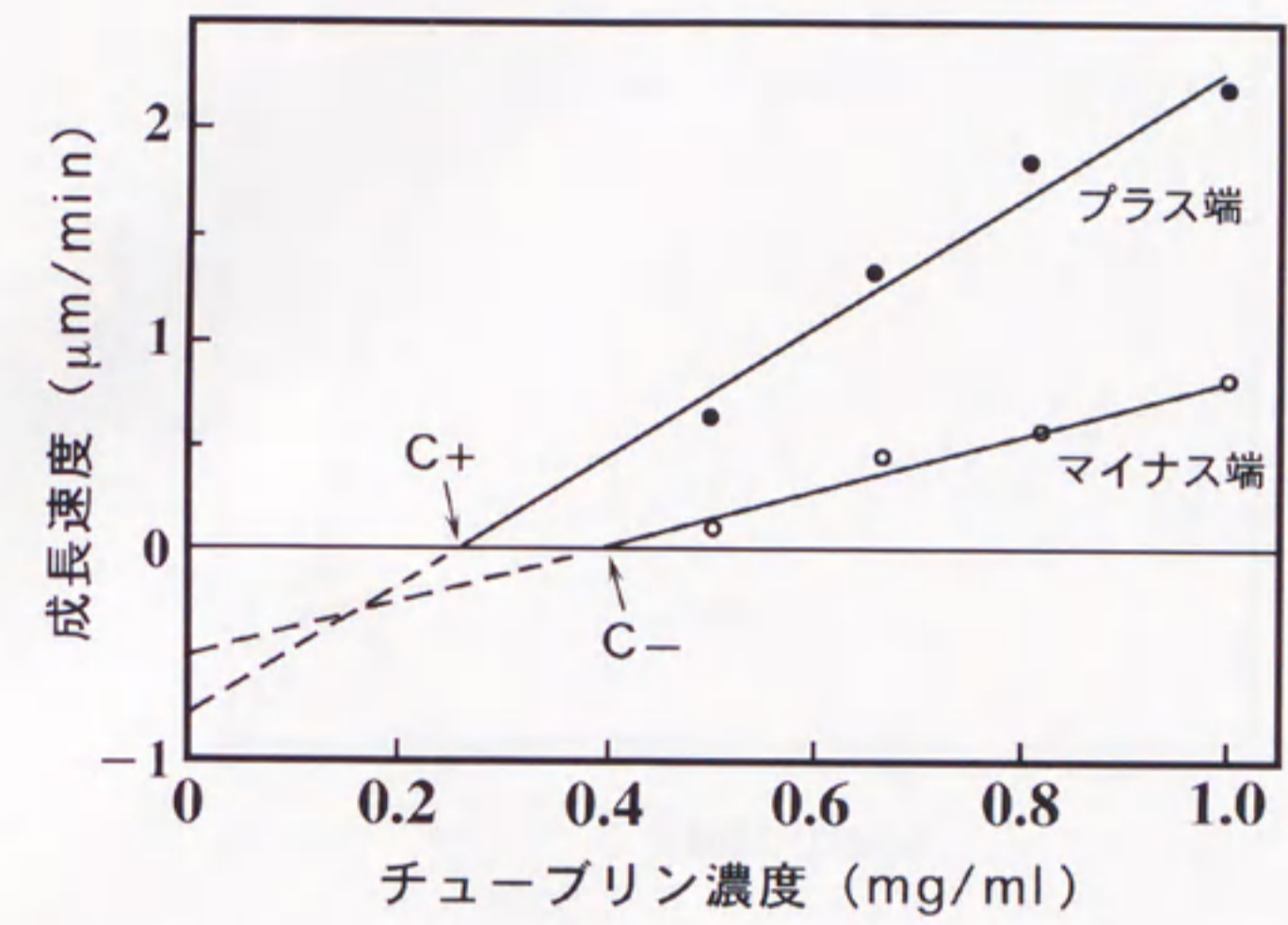


図4 微小管のプラス・マイナス両端の成長速度とチューブリン濃度の関係 C+はプラス端の臨界濃度、C-はマイナス端の臨界濃度を示す。(Bergen & Borisy, 1980)

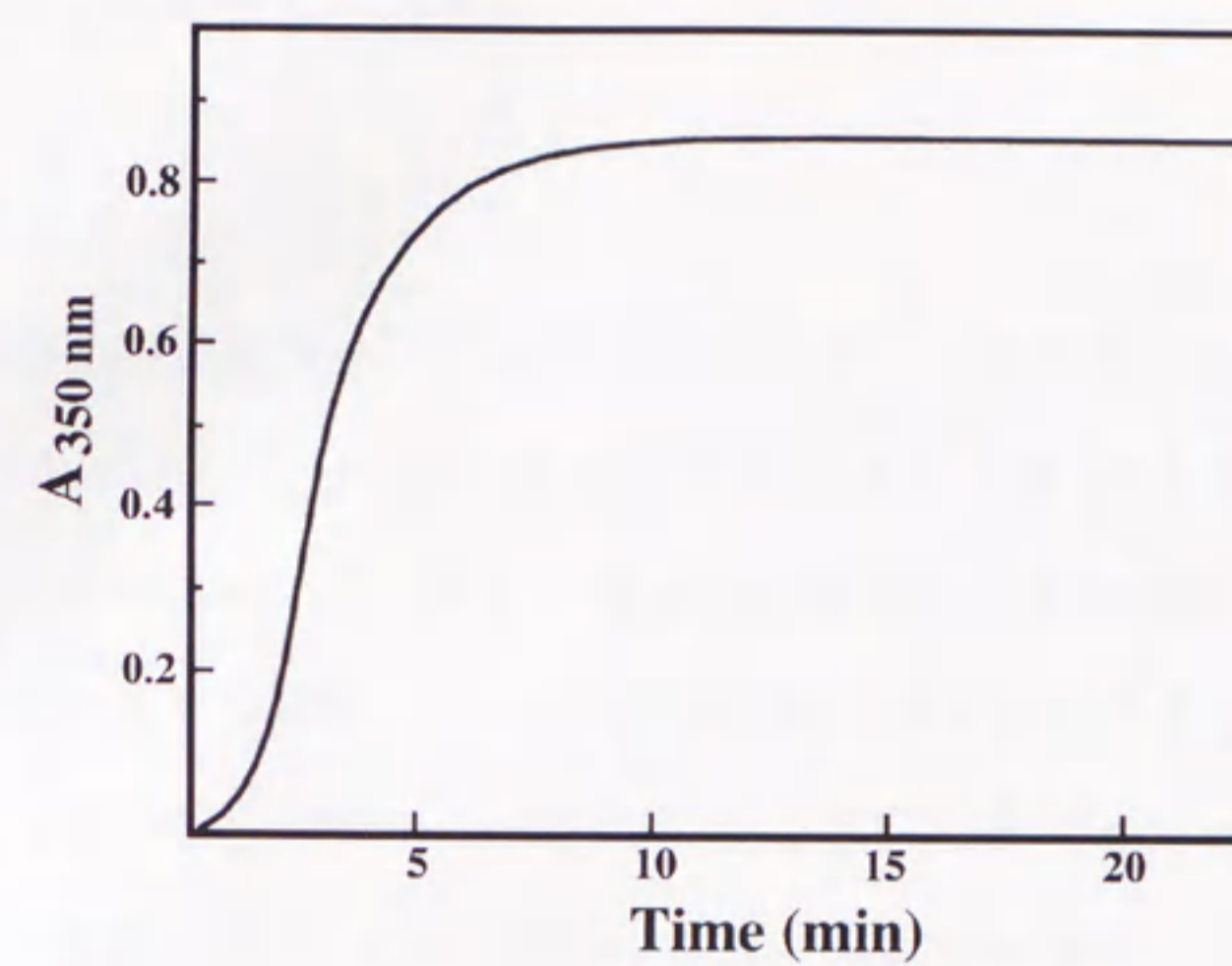


図5 微小管重合過程における濁度変化
25 μ M チューブリンを0.3 mM GTP、3.4M glycerol 中で37°Cで
重合させた。glycerol には微小管の重合を促進する効果がある。
(O'Brien & Erickson, 1989)

Seckler *et al.*, 1990; Sandoval *et al.*, 1977)。これらの非加水分解性のGTP analogue を結合したチューブリンは正常な微小管を形成した。この結果は、微小管の重合にはヌクレオチドの結合が必要だが、加水分解は必要でないことを示している。また、これらの微小管は異常に安定で脱重合しなかった。したがって、GTPの加水分解の役割は、微小管を形成しているチューブリンどうしの結合を弱めて微小管を脱重合しやすくすることだと考えられる。

[動的不安定性の発見]

微小管は動的不安定性という特有の性質を持つことがよく知られている。この現象は、1984年に固定した微小管の長さ分布の解析からその存在が予言された (Mitchison & Kirschner, 1984a,b)。微小管の重合量は重合開始から増加していき、最後には平衡に達する (図5)。このときの微小管を観察すると、全体的には平衡状態であるにもかかわらず個々の微小管がそれぞれ独立に重合と脱重合を繰り返していることがわかる (図6)。この現象を動的不安定性と呼び、暗視野顕微鏡や微分干渉顕微鏡で微小管の1本1本をリアルタイムで観察することにより確認された (Horio & Hotani, 1986; Walker *et al.*, 1988)。その結果、動的不安定性は、重合速度、脱重合速度、脱重合頻度 (重合相から脱重合相へ転移する頻度)、重合頻度 (脱重合相から重合相へ転移する頻度) の4つのパラメーターで示されることがわかった。このパラメーターは、プラス端とマイナス端でその値が異なっている (Walker *et al.*, 1988)。その後、動的不安定性は *in vivo* でも起こっていることが確認された (Wordeman & Mitchison, 1994)。

[GTPキャップモデル]

動的不安定性の起こるメカニズムとしてGTPキャップモデルが提唱された (図7) (Mitchison & Kirschner, 1984a)。微小管の重合には、チューブリンのE-siteにGTPが結合していることが必要である。そして、このGTPは重合した後加水分解されて

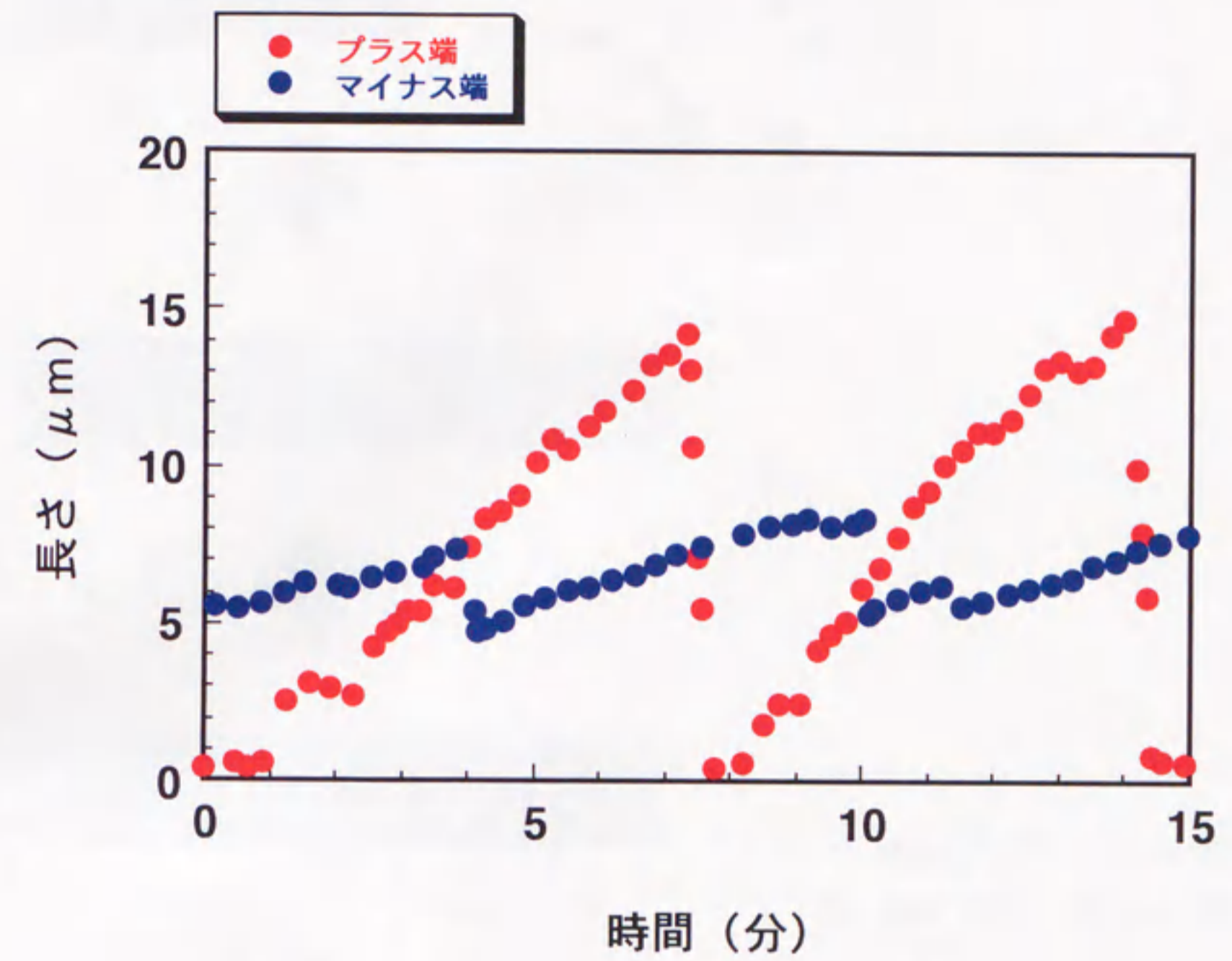
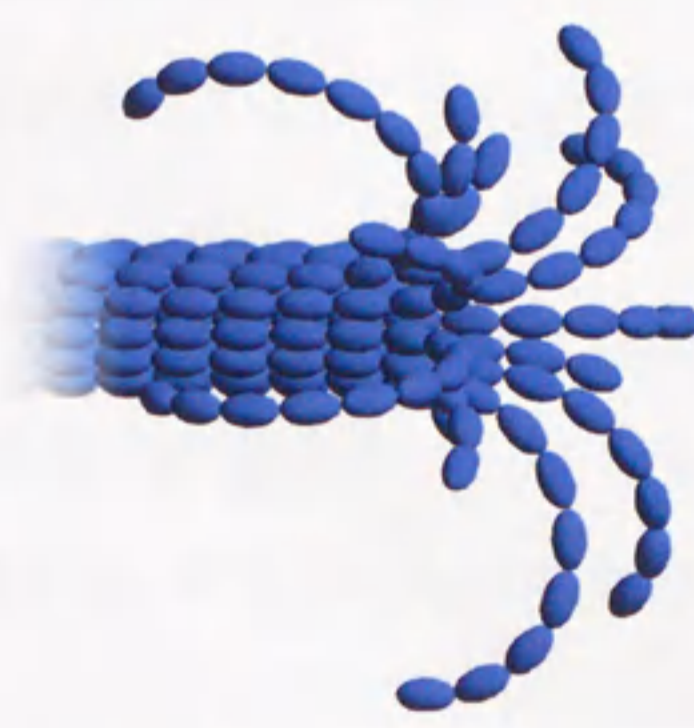
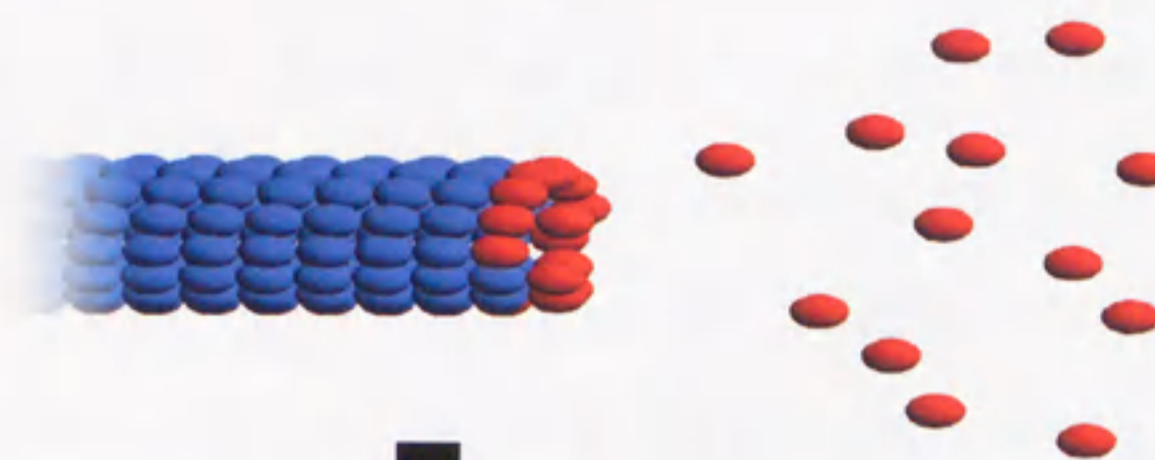


図6 動的不安定性における微小管の長さ変化
 15 μM チューブリンを1 mM GTP存在下、27°Cで20分間重合させた。微小管重合の核としてウニのaxonemeを用いた。その後、伸長した微小管を暗視野顕微鏡下で15分間観察した。縦軸は微小管の長さ、横軸は観察開始からの時間を示す。



● GTP-チューブリン
● GDP-チューブリン

図7 GTPキャップモデル

微小管の先端にGTPを結合したチューブリン (GTP-チューブリン) が重合してGTPキャップを形成している間は、微小管は成長し続ける (1、2段目)。チューブリンの重合後、GTPは加水分解される。この加水分解が微小管の先端に追いついてGDPを結合したチューブリン (GDP-チューブリン) が先端に露出すると (3段目)、GTPキャップを失った微小管は不安定になり脱重合すると考えられている (4段目)。

GDPになる。つまり、チューブリンの重合とGTP加水分解の間には遅れがあると考えられた (Caplow & Pantaloni, 1981)。微小管の伸長が速いとき、微小管の端に存在するチューブリンのもつGTPが加水分解されるより速くGTPをもつ新たなチューブリンが次々とそこに結合するので、微小管の端にGTPをもつチューブリンから成る部分ができる。これを、GTPキャップと呼ぶ (Mitchison & Kirschner, 1984a)。現在、このGTPキャップの大きさはチューブリン10~13個程度、つまり微小管のプロトフィラメントは13本なので微小管の1層分程度の大きさであると考えられている (Stewart *et al.*, 1990; Erickson & O'Brien, 1992; Drechsel & Kirschner, 1994; Caplow & Shanks 1996)。GTPをもつチューブリンどうしはGDPをもつものよりも親和性が強いので、GTPキャップが存在する限り次々と結合が起こり微小管は伸び続ける。一方、いったんGTPキャップが失われると、微小管はその端から脱重合すると考えられている。

細胞は微小管の動的不安定性を目的に合うように変化させている (Kirschner *et al.*, 1986)。たとえば、分裂期の細胞では微小管が形成したり壊れたりする速さが著しく増加し、紡錘体の形成・解体や変形を容易にしている。逆に細胞が分化し決まった形になると、微小管の動的不安定性は微小管結合タンパク質 (MAPs) によって抑制される。微小管ネットワークを特定の形に安定化させる能力は、細胞がその細胞質を組織化するのに重要な機構である。

[GDPの微小管重合への影響]

GTPとGDPのチューブリンや微小管に対する性質・影響がこれまでに数多く報告されている。GTPのチューブリンに対する結合定数は、マグネシウム濃度に依存する (Zeeberg & Caplow, 1979; Correia *et al.*, 1987)。一方、GDPのチューブリンに対する結合定数は、マグネシウム濃度に依存しない。また、マグネシウムが存在しないときのGTPの結合定数はGDPの1/10だが、マグネシウムが存在するとGTPの結合定数はGDPの2.1~6倍になる (Zeeberg & Caplow, 1979; Fishback & Yarbrough, 1984; Correia *et al.*, 1987)。

GDPが微小管の重合速度と重合量を減少させることと、あらかじめ重合させておいた微小管にGDPを加えると部分的に微小管の脱重合が引き起こされることが、濁度による微小管重合量の測定から報告されている (Carlier & Pantaloni, 1978; Zackroff *et al.*, 1980; Jameson & Caplow, 1980)。また、GDPをもつチューブリンの重合の臨界濃度は非常に高く、微小管はほとんど重合しない (Jameson & Caplow, 1980; Engelborghs & Van Houtte, 1981)。最近、2つの研究グループにより微小管の動態へのGDPの影響が光学顕微鏡下で観察された。1つのグループはGDPの濃度が増加すると微小管の伸長の一時的な停止や重合速度のゆらぎが増加すると報告している (Vandecandelaere *et al.*, 1994)。もう一方のグループはGDPの濃度が増加すると微小管の端のチューブリンがGDPをもつかグアニンヌクレオチドを何ももたない状態になり、微小管の脱重合頻度が増加すると主張している (Caplow & Shanks, 1995)。どちらの研究においても微小管の極性は、重合速度や脱重合頻度などの動的不安定性のパラメーターで決定していた。

しかし、これらの微小管の極性の決定法は、調べた物質が微小管の動態に影響を与えるものだった場合は結論を誤る可能性がある。そこで、GDPが微小管の伸長方向に与える影響を調べるために、暗視野顕微鏡を用いて個々の微小管を観察した。特に動的不安定性のパラメーターによらない灌流装置とNEM-チューブリンを組み合わせた方法によって微小管の極性を決定した。それによって、GDPがプラス端の伸長を阻害し、その結果、微小管の伸長方向がプラス端からマイナス端へと逆転することを明らかにした。

【材料と方法】

【材料】

GTPとGDPは、生化学工業 (Tokyo, Japan) から購入した。NEMと acetyl phosphate は、Sigma (St. Louis, MO) から購入した。Acetate kinaseは、Boehringer Mannheim (Mannheim, Germany) から購入した。ウシの脳は、市内の食肉公社より当日屠殺された個体のものを購入し、チューブリンの精製に使用した。

【チューブリンの精製】

チューブリンの精製は、村田らの方法に従った (Murata *et al.*, 1992)。

得たウシの脳は、なるべく早く氷で冷却して実験室に持ち帰った。最初の処理は必ず2時間以内に始めた。ウシの脳より脳膜および血管を除き、さらにPBS (10 mM Na-Pi (pH 7.0-7.2), 0.15 M NaCl)で洗って血液を除いた。これに脳の質量の0.7倍の容積の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, (pH7.0))を加えて、ミキサーで3分間破碎した。これを10,000 \times g、20分、4 $^{\circ}$ Cで遠心し、その上清に4 $^{\circ}$ CのBuffer B (1 M MES (pH6.8), 10 mM EGTA, 5 mM MgSO₄)を1/9量加え、さらに80,000 \times g、30分、4 $^{\circ}$ Cで遠心した。この上清に1/3量のglycerolと1 mM GTPを加え、37 $^{\circ}$ Cで30分保温し微小管を重合させた。これを80,000 \times g、90分、34 $^{\circ}$ Cで遠心し、微小管を沈殿として回収した。沈殿に4 $^{\circ}$ CのBuffer C (0.1 M MES (pH6.8), 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)を加え懸濁した。氷上で30分放置して微小管を脱重合させた後、80,000 \times g、30分、4 $^{\circ}$ Cで遠心して変性タンパク質を沈殿させ、上清にチューブリンを含む画分を得た。そして、上記の重合・脱重合のサイクルをもう一回繰り返して、上清に微小管タンパク質画分(C2S)を得た。ただし、2回目のサイクルでは、Buffer Cのかわりに、CS Buffer (20 mM PIPES (pH6.9), 80 mM NaCl, 0.5 mM MgSO₄, 0.2 mM PMSF, 3 μ g/ml leupeptin, 3 μ g/ml pepstatin A)を用いた。さらに、得た試料

(C2S)をDEAE Sepharoseカラムを用いてMAPs画分とチューブリン画分に分画した。カラム操作はすべてPharmacia FPLCシステム (Pharmacia, Uppsala, Sweden) を用いて行なった。CS Bufferで平衡化したカラムにC2Sをかけて吸着させ洗った後、0.3M NaClを含むCS BufferでMAPsを溶出した。次に、0.3Mから0.8MへのNaClの直線的濃度勾配によりチューブリン画分を溶出した。チューブリン画分を、4°Cで約6時間、0.1 M PIPES (pH6.9), 1 mM EGTA, 0.5 mM MgSO₄, 4 M glycerol, 0.2 mM GTP, 0.3 mM PMSFに対して透析した後、1 mM GTPを加えて37°Cで30分保温し微小管を重合させた。これを、100,000×g、60分、34°Cで遠心し、沈殿した微小管をPM Buffer (0.1 M PIPES (pH6.9), 1 mM EGTA, 0.5 mM MgSO₄)で懸濁した。氷上で30分置いて脱重合させた後、100,000×g、20分、4°Cで遠心した。上清に1 mM GTPを加え、これをチューブリン試料として50 μlずつ分注して-80°Cで保存した。

[*Tetrahymena* 繊毛のaxonemeの精製]

Tetrahymena の繊毛のaxonemeの精製は、Johnsonらの方法に従った (Johnson, 1986) 。300 mlのStarter Culture (2 mg/ml yeast extract , 20 mg/ml bacto pepton, 1.6 mg/ml glucose) に、*Tetrahymena*を入れ30°Cで約3日間振とう培養した後、3 lのLarge Culture (20 mg/ml yeast extract, 2 mg/ml bacto pepton, 1.6 mg/ml glucose)に移し約4日間振とう培養した。暗視野顕微鏡で*Tetrahymena*が泳いでいることと細胞の密度が充分量あることを確認した後、1,000×g、6分、25°Cで遠心して*Tetrahymena*を集めた。集めた*Tetrahymena*に1~10 mM dibucaineを加えて、細胞から繊毛を抜いた。暗視野顕微鏡で繊毛が抜けたのを確認した後、直ちに4°CのHEPES/0.1 M NaCl Buffer (10 mM HEPES (pH 7.4), 0.1 M NaCl, 4 mM MgCl₂, 0.1 mM EGTA, 0.4 mM PMSF)と1 mM EGTAを加えて反応を止め、800×g、6分、4°Cで2回遠心して繊毛の抜けた細胞体を沈殿させ取り除いた。次に、上清を13,500×g、15分、4°Cで遠心し、繊毛を沈殿として得た。沈殿を洗うためにHEPES/0.1 M NaCl Bufferで懸濁した後、また13,500×g、15分、4°Cで遠心した。これを沈殿の色が白くなるまで3回以上繰り返した。繊毛の膜成分を取り除くため、

沈殿を0.25 % NP-40を含むHEPES / 0.1 M NaCl Bufferで懸濁して氷上で30分放置した後、18,500×g、20分、4°Cで遠心した。沈殿をNP-40を含まないHEPES / 0.1 M NaCl Bufferで懸濁して、18,500×g、20分、4°Cで遠心した。これをNP-40による泡がなくなるまで5回以上繰り返した。沈殿をHEPES / 0.1 M NaCl Bufferとglycerolの1:1の混合液で懸濁し、これをaxoneme試料として-20°Cで保存した。

[ウニ鞭毛のaxonemeの精製]

ウニの鞭毛のaxonemeの精製は、Gibbonsらの方法に従った (Gibbons, 1979)。ウニはアカウニ(*Pseudocentrotus depressus*)を使用した。雄のウニの口を取り除いて体腔液を捨て、0.5 M KClを体内に加えて精子を放出させた。ウニの精子を集め、Ca欠如海水に懸濁し、2,300×g、5分、室温で遠心して精子を洗った。これを2回以上行なった。この沈殿を20 % sucrose, 0.5 mM DTT, 0.1 mM PMSF, 5 mM imidazole (pH 7.2)に懸濁し、浸透圧ショックによって鞭毛の脱膜を行なった。次に、精子懸濁液をホモゲナイズし、精子から鞭毛を取った。このとき、適時暗視野顕微鏡で観察して、精子からの鞭毛の取れ具合を確認した。このホモジネートを2,300×g、5分、4°Cで遠心し、精子の頭部を沈殿させた。次に上清を27,000×g、20分、4°Cで遠心して、鞭毛を沈殿させた。この沈殿をimidazole / 0.1 M NaCl Buffer (0.1 M NaCl, 4 mM MgSO₄, 0.5 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 0.1 mM PMSF, 10 mM imidazole (pH 7.2))で懸濁した後、1,500×g、5分、4°Cで遠心し、その上清を13,000×g、10分、4°Cで遠心した。この沈殿の色が白くなるまで、上記の2回の遠心のサイクルを3回以上繰り返した。次に洗浄した沈殿をimidazole / 0.6 M NaCl Buffer (0.6 M NaCl, 4 mM MgSO₄, 0.5 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.1 mM PMSF, 10 mM imidazole (pH 7.2))で懸濁し、氷上で30分放置し鞭毛からダイニンを取り除いた。この懸濁液を13,000×g、10分、4°Cで遠心し、axonemeを沈殿として回収した。必要に応じて、沈殿を10 % Triton-X100を含むimidazole / 0.1 M NaCl Bufferに懸濁して、残っている膜成分を取り除いた。最後に沈殿をimidazole / 0.1 M NaCl Bufferとglycerolの1:1の混合液で懸濁し、axoneme試料として-20°Cで保

存した。

保存した *Tetrahymena* またはウニの axoneme は、PM Buffer に懸濁し、 $18,500 \times g$ 、20分、 4°C で2回遠心して glycerol を取り除いた後、実験に使用した。

[微小管の重合]

-80°C で保存した チューブリン 試料は使用する直前に溶かし、チューブリン溶液中の遊離のヌクレオチドを取り除くためゲル濾過（樹脂は G-25, Pharmacia, Uppsala, Sweden。カラムは Promega Wizard Minipreps DNA Purification System, Promega, Madison, WI）にかけた。まず、2つのカラムに樹脂を詰め、 $740 \times g$ 、1分、 4°C で遠心した。各カラムに PM Buffer を $50 \mu\text{l}$ ずつのせこの遠心をもう1回繰り返した後、1つのカラムにチューブリン試料を $50 \mu\text{l}$ のせ、 $740 \times g$ 、1分、 4°C で遠心した。下に素通りして出てきた溶液をもう1つのカラムにのせ、 $740 \times g$ 、1分、 4°C で遠心した。ここで下に素通りして出てきた溶液を、遊離のヌクレオチドを含まないチューブリン溶液とし、すべての微小管重合実験ではこの溶液を用いた。ヌクレオチドとタンパク質を分離するための上記の操作における遠心の条件は、GTP とチューブリンの代わりに ATP と BSA を用いた実験によって決めた。ATP と BSA の濃度は 235, 260, 280nm での吸光度から、また BSA の濃度は BCA 法（BCA タンパク定量試薬, PIERCE, Rockford, IL）によっても測定した。

GTP 再生系 (GTP regenerating system, GRS) として、20 mM acetyl phosphate と 3 units/ml acetate kinase を用いた (McNeal *et al.*, 1977)。GTP 再生系は、GTP のみが存在する条件での重合実験のときに加えた。

[顕微鏡観察]

チューブリン、axoneme、GTP または GDP を PM Buffer 中で混合し、氷上で20分以上放置した。その後、スライドガラスに試料を $5 \mu\text{l}$ のせ、カバーガラスで覆いその周囲を VALAP (beeswax, lanolin, petrolatum を 1:1:1 で混合したもの) で封じて、暗視野顕

微鏡にセットした。室温は、27°Cに設定した。重合開始後20~60分間に1画面を20分間固定してaxonemeから伸長した微小管を観察した。

微小管は暗視野顕微鏡 (Olympus BH2, コンデンサー: 高倍率対物レンズ用暗視野コンデンサー (Olympus, DCW, NA=1.2~1.4)、対物レンズ: 40×SPlan (Olympus, Tokyo, Japan)) で観察した。微小管の長さ変化はS-VHSビデオテープに記録した (ビデオカメラ: 高感度SITカメラ CTC-9000 (ITC, Tokyo, Japan)、リレーレンズ: NFK 20×, NFK 6.7×LD (Olympus, Tokyo, Japan)、ビデオデッキ: S-VHSビデオカセットレコーダー NV-SX10 (Panasonic, Osaka, Japan))。

[NEM-チューブリンの調製]

NEM-チューブリンの調製は、Hymanらの方法に従った (Hyman *et al.*, 1991)。150~250 μ Mチューブリン 50 μ lに最終濃度が1 mMになるようにNEMを加え、氷上で10分間放置した。次に、最終濃度が8 mMになるように β -mercaptoethanolを加え、氷上で10分間放置し反応を止めた。

[灌流実験]

灌流装置は、カバーガラスの上にスペーサーとして細長く切った両面テープを2本平行に貼り、それをスライドガラスの上のせて作成した。溶液の交換は、右端からピペティングにより溶液を流し込みながら、左端から濾紙で灌流装置内の溶液を吸い取るという方法で行った。

まず、axonemeのみを含む溶液を灌流し、ガラス表面にaxonemeを付着させた。その後PM Bufferを灌流し、付着していないaxonemeを除去した。次に、10 μ M チューブリン, 1 mM GTP、または20 μ M チューブリン, 1 mM GTP, 1 mM GDPを含む溶液を灌流し、20分間 axonemeから微小管を重合させた。axonemeの片端からのみ伸長した微小管を観察・記録した後、4°CのPM bufferを灌流しaxonemeから伸長した微小管をいったん脱重合させた。そこに、20 μ M チューブリン, 10 μ M NEM-チューブリン, 1 mM

GTPを含む溶液を灌流し、再び同じaxonemeから微小管を伸長させ、微小管が伸長した端をプラス端とした。NEM-チューブリン存在下で微小管を伸長させたとき、観察していたaxonemeから微小管が伸長しない、あるいは両端から微小管が伸長した場合は計測例から除外した。40回の灌流実験を行って、GTPのみの存在下では126個、GTPとGDPの共存下では155個のaxonemeを観察した。

伸長方向の逆転を示すための灌流実験では、axonemeをガラス表面に付着させた後、はじめに10 μ M チューブリン、1 mM GTPを含む溶液を灌流し20分間微小管を重合させた。axonemeの片端からのみ伸長した微小管を観察・記録した後、4°CのPM bufferを灌流しaxonemeから伸長した微小管を脱重合させた。次に、20 μ M チューブリン、1 mM GTP、1 mM GDPを含む溶液を灌流し、20分間微小管を重合させた。このとき前の段階で観察していたaxonemeから微小管が伸長しない、あるいは両端から微小管が伸長した場合は除外した。axonemeの片端から微小管が伸長していた場合、これを記録した後4°CのPM bufferを灌流しaxonemeから伸長した微小管を再び脱重合させた。最後に20 μ M チューブリン、10 μ M NEM-チューブリン、1 mM GTPを含む溶液を灌流し、axonemeから微小管を伸長させ、微小管が伸長した方向をプラス端とした。このときも観察していたaxonemeから微小管が伸長しない、あるいは両端から微小管が伸長した場合は除外した。12回の灌流実験を行い、71個のaxonemeを観察した。

GDPによるマグネシウムのキレート効果を調べる灌流実験では、2 mM $MgSO_4$ を含むPM buffer中で20 μ M チューブリン、1 mM GTP、1 mM GDPを混合した。axonemeをガラス表面に付着させた後、この溶液を灌流しaxonemeから微小管を重合させた。axonemeの片端からのみ伸長した微小管を観察・記録した後、4°CのPM bufferを灌流し微小管を脱重合させた。次に20 μ M チューブリン、10 μ M NEM-チューブリン、1 mM GTPを含む溶液を灌流し、axonemeから微小管を伸長させ、微小管が伸長した方向をプラス端とした。このとき観察していたaxonemeから微小管が伸長しない、あるいは両端から微小管が伸長した場合は除外した。9回の灌流実験を行い、21個のaxonemeを観察した。

[タンパク定量]

タンパク定量はBCAタンパク定量試薬 (PIERCE, Rockford, IL) を用い、BSAを標準タンパクとして行った。得られた濃度からチューブリンダイマーの分子量を100 kDaとしてモル濃度に換算した。

【結果】

〔チューブリン試料中の遊離のヌクレオチドの除去〕

チューブリン試料は、チューブリンの変性を防ぐため精製後1 mM GTPが加えられてから -80°C で保存されている。微小管重合に対するヌクレオチドの影響を調べるためには、重合実験に使用する前にチューブリン溶液から遊離のヌクレオチドを除く必要がある。そのために、ミニゲル濾過カラムを使用した。ミニゲル濾過カラムの有効性を調べるために、GTPとチューブリンの代わりにATPとBSAを用いて予備実験を行なった。その結果、1 mM ATPと150 μM BSAの混合溶液をミニゲル濾過カラムに2回かけたところ、0.1 mM以下のATPと約100 μM BSAを含む溶液が得られた。実際に重合実験に用いるチューブリン濃度は最大20 μM なので、カラムにかけた後の溶液を最低5倍に希釈して使うことになり、このとき遊離のヌクレオチドの濃度は0.02 mM以下になる。重合実験では1 mM以上のグアニンヌクレオチドを加えるため、この遊離のヌクレオチドは無視してよいと考えた。また、チューブリンダイマーは1つの交換可能なグアニンヌクレオチドを結合しており、この方法では取り除くことができない。しかし、この濃度はチューブリン濃度と同じであり重合実験使用時には20 μM 以下であるので同じ理由で無視した。

〔微小管の重合核としてのaxonemeの使用〕

チューブリンの重合時には、まずチューブリンによる核形成が起こり、続いてその核にチューブリンが重合し微小管が伸長する。この核形成は、微小管の重合と同様に様々な要因の影響を受ける。また、チューブリンの重合によってできる核は、微小管の伸長段階で微小管の一部となり、微小管の脱重合時には一緒に脱重合してしまう。そこで、微小管重合の実験には、よく核として真核生物のaxoneme (*Tetrahymena*, *Chlamidomonas*, ウニのものがよく使われる) やEGS (ethylene glycol bis) で架橋した微小管断片などがよく使われている (Walker *et al.*, 1988; Koshland *et*

al., 1988)。これらの人工の核には、微小管脱重合時に一緒に脱重合しないでそのまま残る、核の数を一定に調節することができる、チューブリン重合の臨界濃度を下げるなどの利点がある。これらの人工核のうち現在最も多く使われているのが axoneme であり、キネシンやダイニンの motility assay などにも使用されている (scholey, 1993)。axoneme とは、鞭毛を脱膜して得られる直径 $0.2 \mu\text{m}$ の管状のタンパク質複合体である。axoneme は 9 本の二連微小管 (doublet) を含んでおり、この微小管が重合核として働く (図 8)。axoneme が微小管の重合核として多く用いられる理由として、以下が挙げられる。(1) axoneme はその単離と保存が容易である。(2) axoneme は微小管に比べてはるかに太く、容易に区別することができる。(3) axoneme からチューブリンがよく重合する条件下で微小管を伸長させるとプラス端から伸びた微小管の方が長くなるため、微小管のプラス端とマイナス端を区別することができる。今回、すべての微小管重合実験において、長さが $3 \sim 10 \mu\text{m}$ の *Tetrahymena* またはウニの axoneme を核として使用した。暗視野顕微鏡で微小管を観察するために光源の輝度を上げると、axoneme の太さが実際の太さよりかなり増大され楕円形に見える (図 9A)。しかし、光源の輝度を下げると、微小管は見ることができなくなるが axoneme が実際は細長い構造をしていることがわかる (図 9B)。光源の輝度を上げた場合、axoneme の長さ方向が判別できないことが心配されたが、観察により全く問題ないことがわかった。

[GDP の微小管伸長形態への影響]

以前から、GDP が微小管の重合を抑制することは報告されていた (Carrier & Pantaloni, 1978; Zackroff *et al.*, 1980; Jameson & Caplow, 1980)。今回、GDP の微小管重合への影響をより詳しく調べるために、まず GDP の微小管重合への抑制効果を確認した。各濃度のチューブリンとグアニンヌクレオチドを混合し、スライドガラス上で 20 分間重合させた後、その様子を暗視野顕微鏡で観察した。その結果、 $20 \mu\text{M}$ チューブリン、 1mM GTP が存在する条件では伸長した微小管をもつ axoneme のうち 91% が

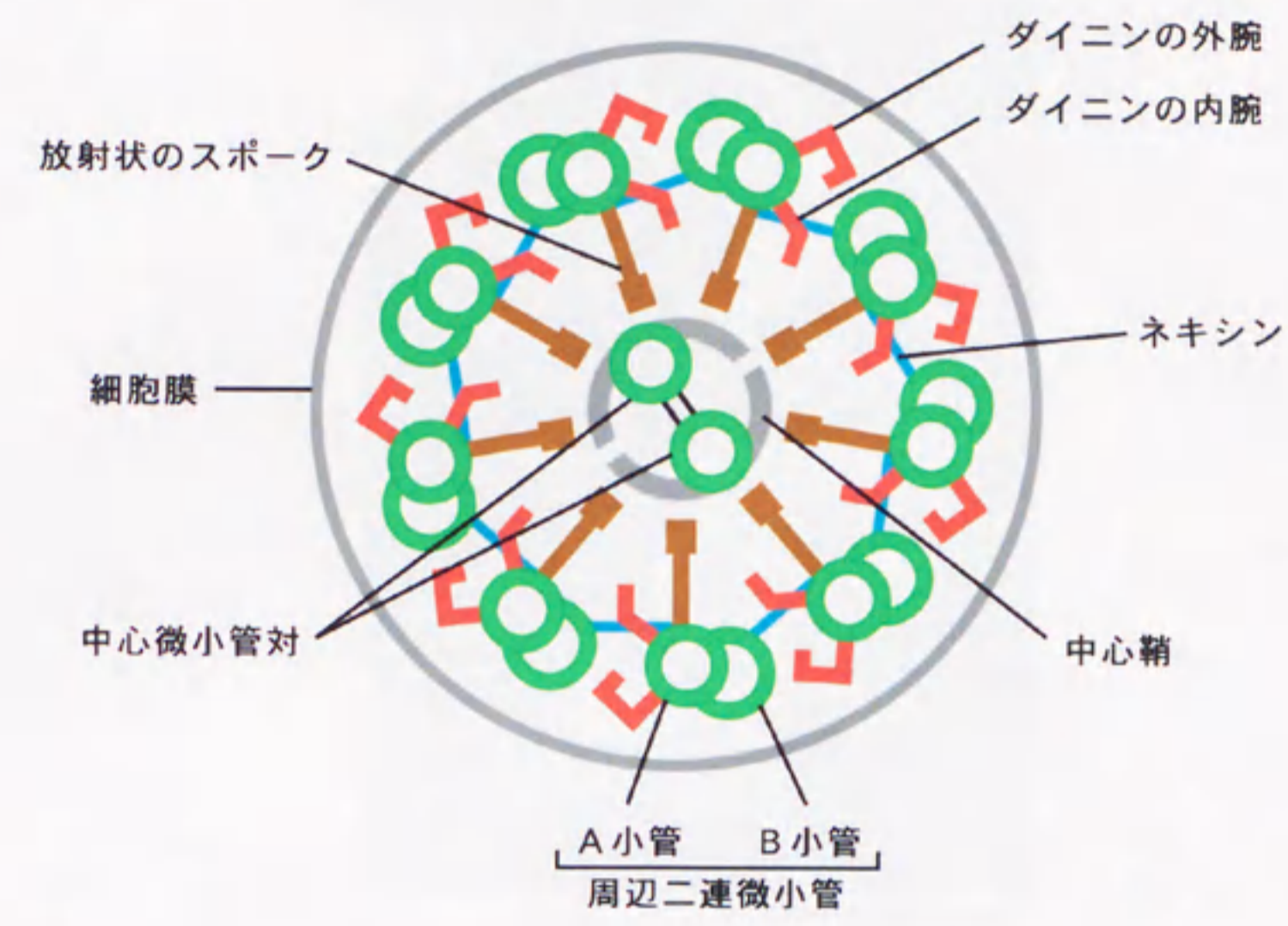


図8 鞭毛・繊毛の断面図

axonemeとは鞭毛・繊毛を構成している特徴的な配列の微小管のことで、中央の中心微小管対と周辺に一定の間隔で規則正しく配列する9対の二連微小管から成る。二連微小管のA小管が、微小管重合の核として働く。

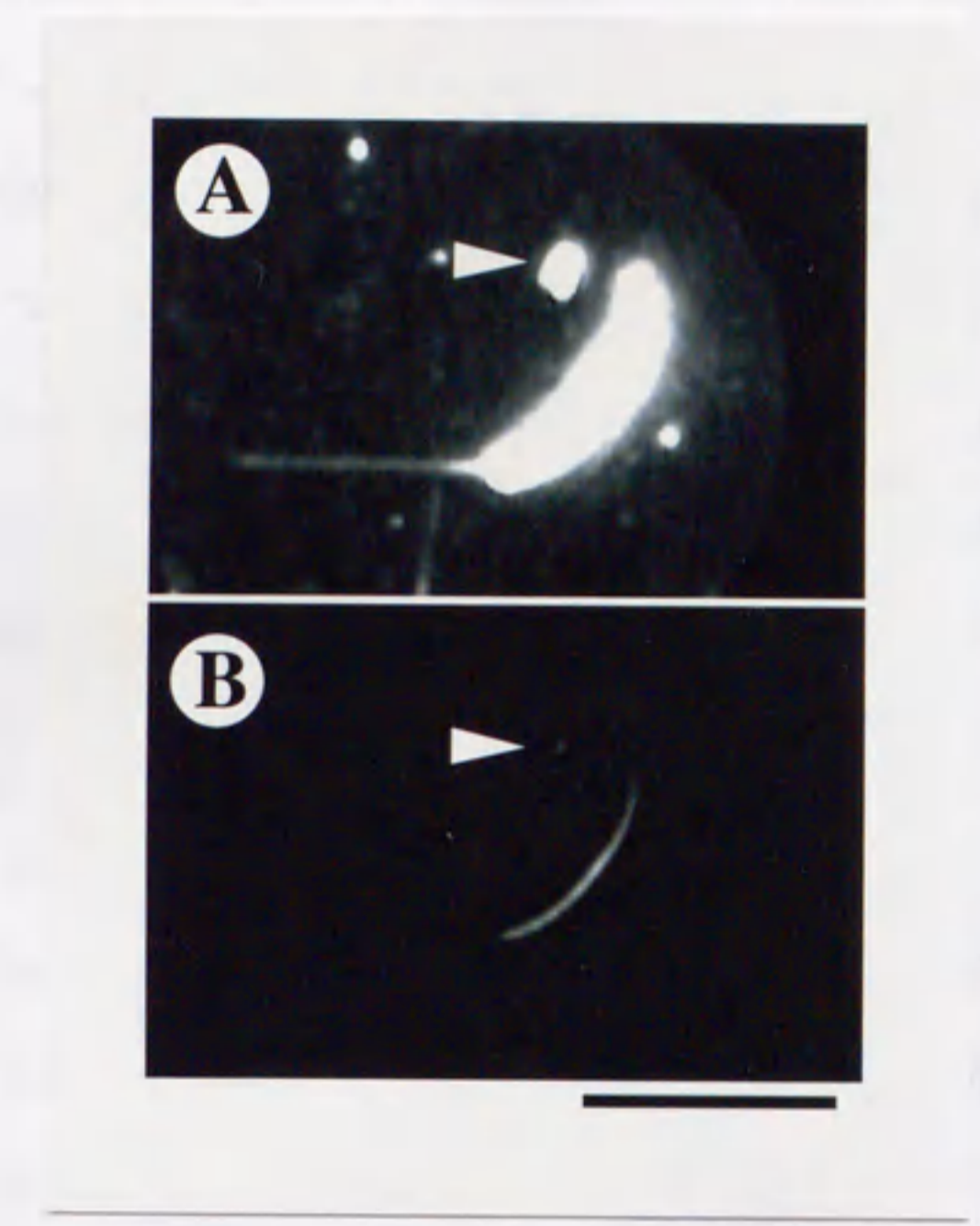


図9 axonemeから伸長した微小管の暗視野顕微鏡像
10 μ M チューブリンを1 mM GTP存在下で、27 $^{\circ}$ Cで20分間、
ウニのaxonemeから重合させた。(A) 微小管がみえるよう
に光源の輝度を上げると、axonemeの太さが増幅される。
(B) 光源の輝度を下げると微小管は見えなくなるが、
axonemeが実際は細長い形状をしているのがわかる。矢尻
は、位置標識として用いたガラス上に付着した塵を示す。
Bar = 10 μ m

その両端から、つまりプラス端とマイナス端の両端から微小管が伸長していた（図10A）。チューブリン濃度を10 μM に下げると、チューブリン濃度が20 μM のときに比べて微小管の重合量が減少した。さらに、伸長した微小管をもつaxonemeのうち70%がその片方の端からだけ微小管が伸長していた（図10B）。

一方、20 μM チューブリンに1 mM GTPと1 mM GDPを加えると、20 μM チューブリン、1 mM GTPで重合させた場合に比べて微小管の重合量が減少した。そして、伸長した微小管をもつaxonemeのうち87%がその片方の端からだけ微小管が伸長していた（図10C）。また、チューブリン濃度が20 μM であっても、1 mM GTPと2 mM GDP共存下では微小管の重合はみられなかった（図10D）。以上の結果より、微小管の重合がGDPによって抑制されることが確認された（図11）。

[灌流実験による微小管の極性の決定]

上記の実験から、10 μM チューブリン、1 mM GTPまたは20 μM チューブリン、1 mM GTP、1 mM GDPのどちらの条件下においても、axonemeの片方の端だけから伸長した微小管が多く観察されることがわかった。この結果のもっとも簡単な解釈は、GDPがGTPと競合的にチューブリンに結合した結果、GDPを結合したチューブリンが重合能を喪失し、そのため重合可能なチューブリンの総量が減少したというものである。GTPとGDPのチューブリンへの結合定数の比較から、GDPがGTPのチューブリンへの結合を競合的に阻害していることは確実である。GDPの影響がこれだけであるのか、それとも積極的に微小管の性質にも影響を与えているのかを調べるために、axonemeの片方の端からのみ伸長した微小管がプラス端とマイナス端のどちらの端から伸長しているのかを灌流装置を用いて調べた（図12）。もし、前者の仮定が正しければ、各条件下で重合した微小管が伸長した端の比率は同じであると推測される。微小管の極性の決定には、NEM-チューブリンを使用した。NEM-チューブリンは、チューブリンをN-ethylmaleimideで修飾したもので、未処理のチューブリンと混合して重合させると微小管がプラス端からのみ伸長することが知られている（Hyman *et*

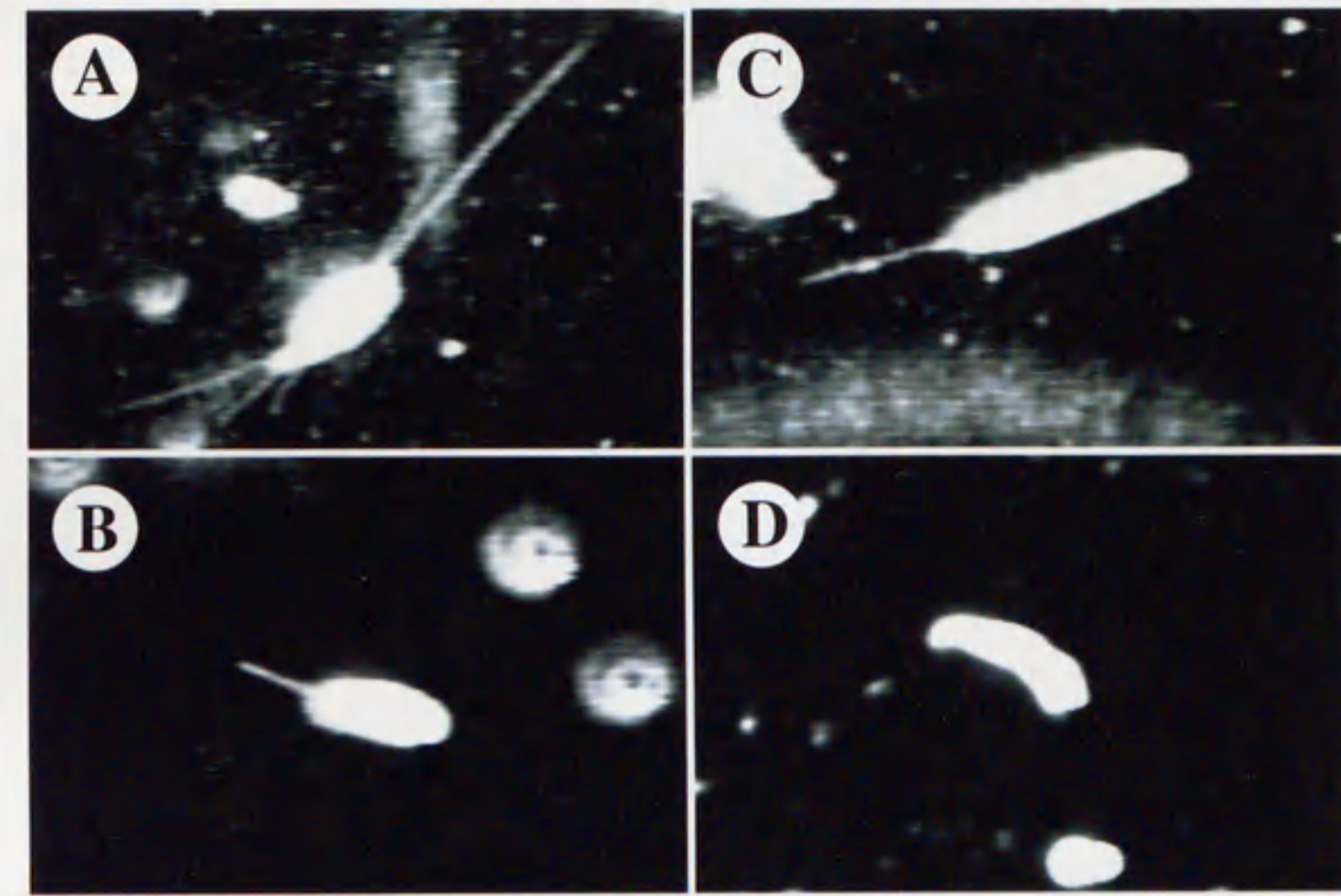


図10 低チューブリン濃度またはGDP共存下で伸長した微小管
 (A-D) 各条件下でウニのaxonemeから重合させた微小管の暗視野顕微鏡像
 (A) 20 μ M チューブリン, 1 mM GTP (B) 10 μ M チューブリン, 1 mM GTP
 (C) 20 μ M チューブリン, 1 mM GTP, 1 mM GDP (D) 20 μ M チューブリン,
 1 mM GTP, 2 mM GDP GTPのみの存在下でチューブリン濃度が高い場
 合は、axonemeの両端から伸長する微小管が多く観察された(A)。一方、
 GTPのみでチューブリン濃度が低い、あるいはチューブリン濃度が高く
 てGDPが共存する場合は、微小管量の減少と同時に、axonemeの片方
 の端からのみ伸長する微小管が多く観察されるようになった(B, C)。チュー
 ブリン濃度が高くてGDPの濃度が1.5 mM以上になると、微小管の伸長
 はみられなくなった(D)。Bar = 10 μ m

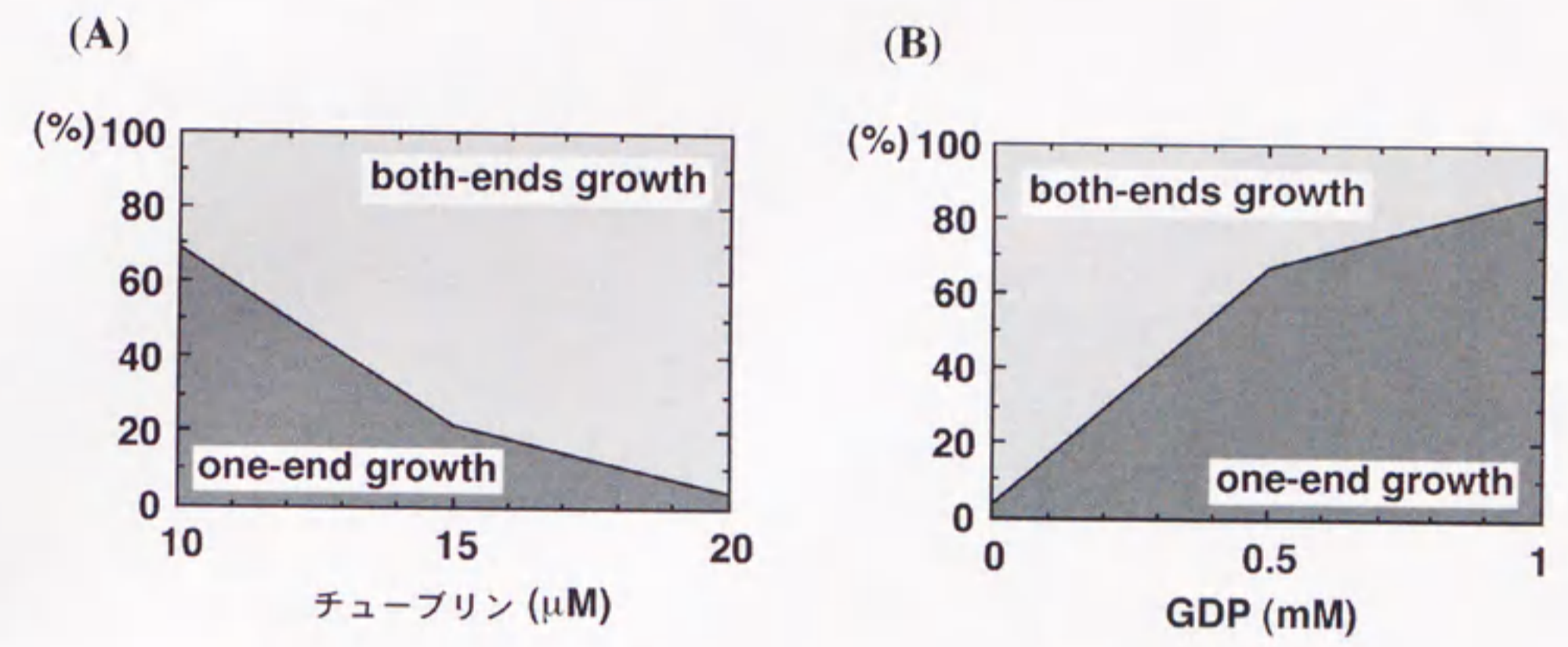


図11 微小管伸長形態のチューブリンまたはGDP濃度への依存性

(A) チューブリン濃度に対して、片方の端からのみ微小管が伸長したaxonemeの割合をプロットした。GTP濃度は1 mMに固定した。(B) GDP濃度に対して、片方の端からのみ微小管が伸長したaxonemeの割合をプロットした。チューブリンとGTPの濃度は、それぞれ20 μMと1 mMに固定した。各チューブリンまたはGDP濃度で90個以上のaxonemeを観察した。both-ends growth: 両端から微小管が伸長したaxoneme one-end growth: 片方の端からのみ微小管が伸長したaxoneme

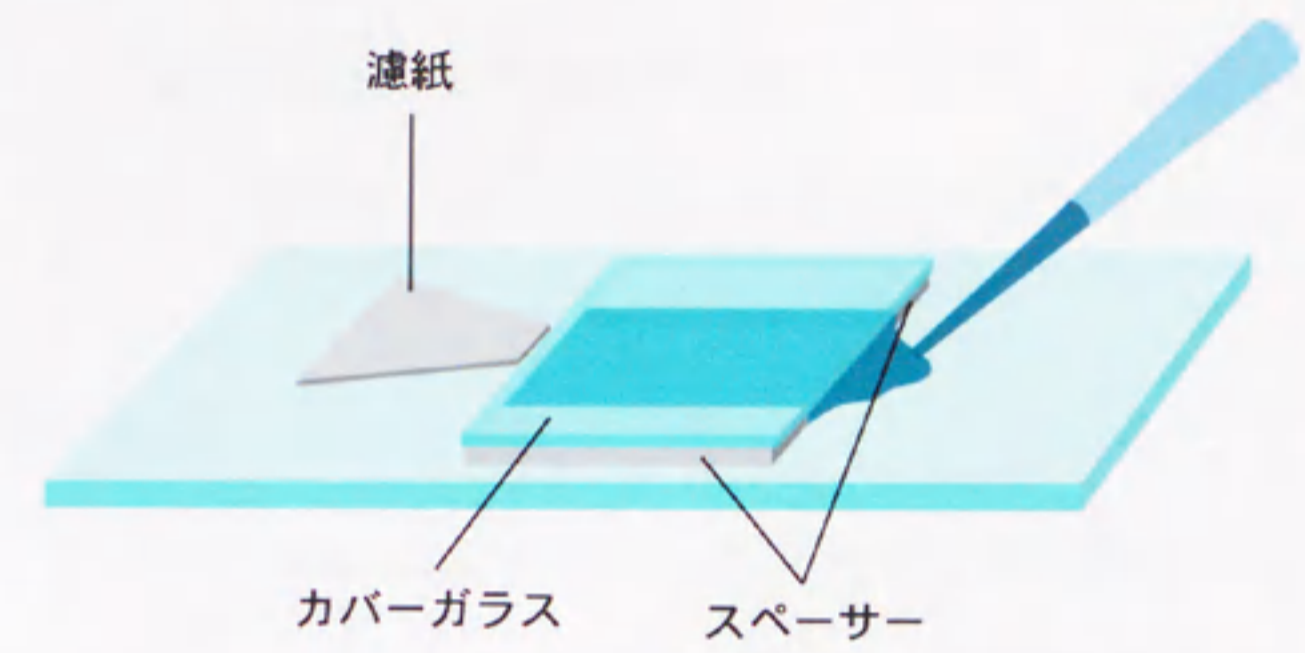


図12 灌流装置

al., 1991)。NEM-チューブリン存在下での微小管の伸長から、各axonemeの極性を決定することができる。はじめに、10 μ M チューブリン、1 mM GTPまたは20 μ M チューブリン、1 mM GTP、1 mM GDPのどちらかの混合液を灌流し、axonemeの片端から微小管を重合させた(図13A, C)。観察後PM Bufferを灌流して、この微小管を完全に脱重合させた。次にNEM-チューブリンを含むチューブリン溶液を灌流し、同じaxonemeから微小管を重合させた(図13B, D)。その結果、GTPのみの存在下では、伸長した微小管のうち84% (106/126)がプラス端から伸長していた。一方、GTPとGDPの共存下では、伸長した微小管のうち95% (147/155)がマイナス端から伸長していた(図14)。この結果は、GDPがGTPのチューブリンへの結合を競合的に阻害しているだけでなく、微小管の伸長極性に積極的に作用していることを示している。

[微小管伸長方向の逆転]

さらに、同一のaxonemeでの微小管の伸長方向の逆転を灌流装置を用いて試みた。はじめに、10 μ M チューブリン、1 mM GTPを灌流し微小管を重合させた(図15A, D)。微小管がaxonemeのどちらの端から伸長しているのかを確認した後、PM Bufferを灌流して微小管を脱重合させた。次に20 μ M チューブリン、1 mM GTP、1 mM GDPを灌流し、同じaxonemeから微小管を重合させた。その結果驚くべきことに、今度は微小管が同じaxonemeの反対の端から伸長した(図15B, E)。この結果は、灌流中にaxonemeが移動や回転してその方向が逆転したために生じたものではない。つまり、GDPによって微小管の優先的伸長方向が切り変わったのである。この微小管を再び脱重合させた後、NEM-チューブリンを含む溶液を灌流してaxonemeの極性を決定した(図15C, F)。その結果、10 μ M チューブリン、1 mM GTPを含む溶液を20 μ M チューブリン、1 mM GTP、1 mM GDPを含む溶液に交換したとき、75% (53/71)が微小管の伸長方向をプラス端からマイナス端に逆転させた。残りのうち24% (17/71)が、どちらの条件でも微小管がマイナス端から伸長したもの、1% (1/71)がどちらの条件でもプラス端から伸長したものだった(図16)。

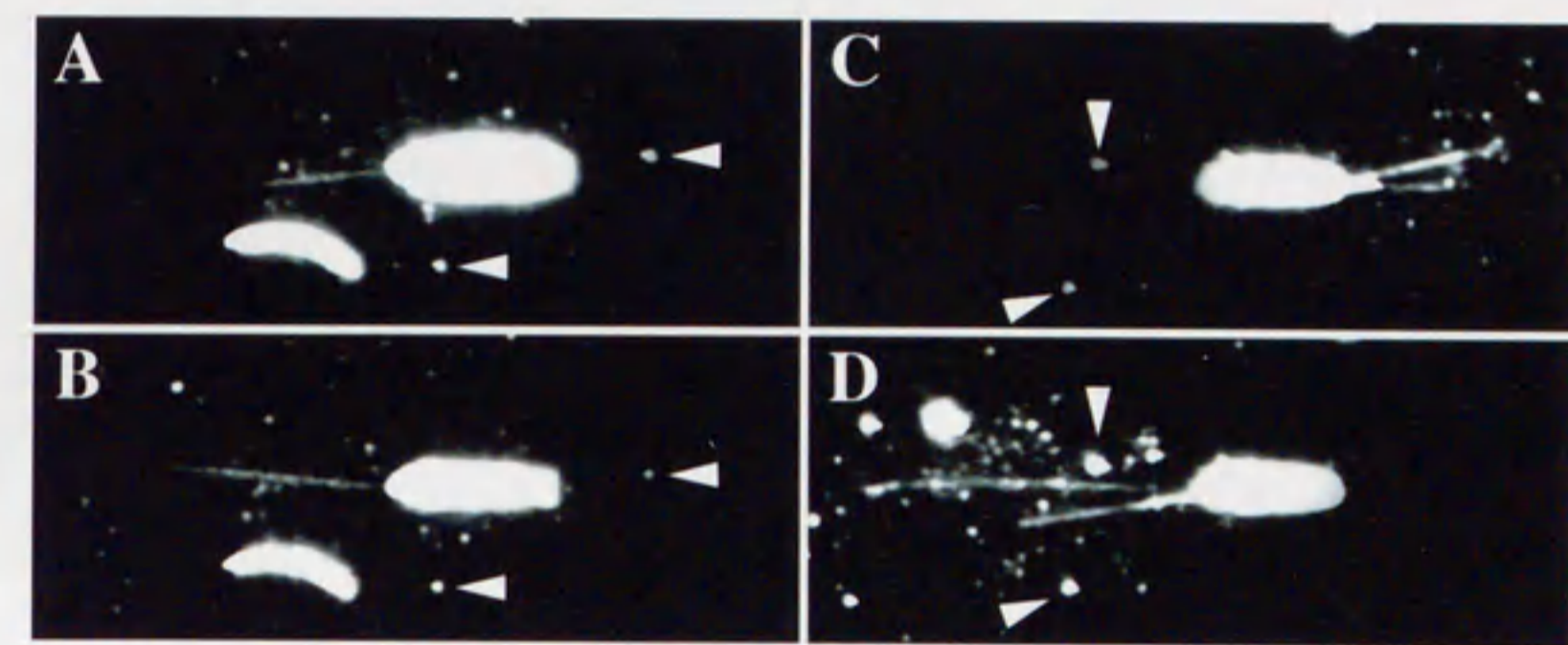


図13 axonemeの片方の端からのみ伸長した微小管

(A-D) 各条件下でウニのaxonemeから重合させた微小管の暗視野顕微鏡像 (A) 10 μ M チューブリン, 1 mM GTP (C) 20 μ M チューブリン, 1 mM GTP, 1 mM GDP (B, D) 20 μ M NEM-チューブリン, 10 μ M チューブリン, 1 mM GTP 縦の列は1連の灌流実験を示す。NEM-チューブリン存在下で重合させた微小管はプラス端からのみ伸長するので、(B)(D)ともにaxonemeの左側がプラス端である。よって、(A)では微小管はプラス端から、(C)ではマイナス端から伸長していることがわかる。写真は左側がプラス端になるように配置した。矢尻は、位置標識として用いたガラス上に付着した塵を示す。Bar = 10 μ m

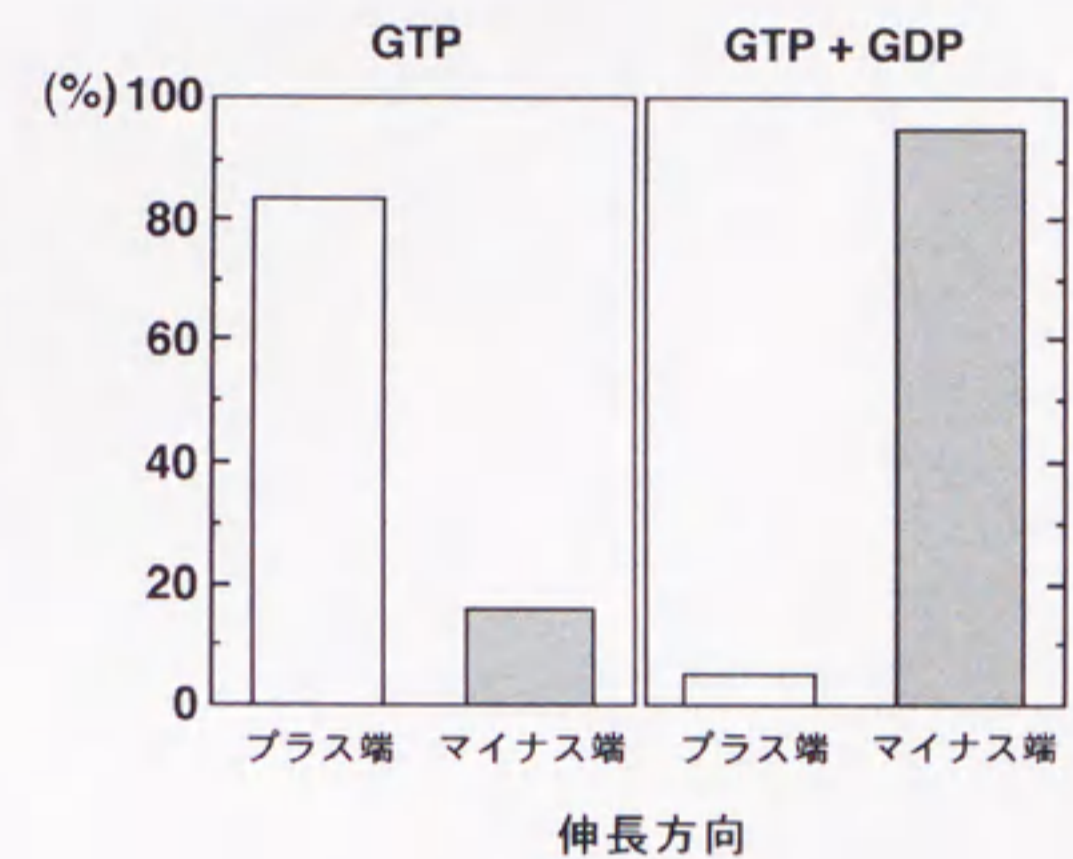


図14 GTPのみまたはGDP共存下での微小管の伸長方向
 図13で示した灌流実験の結果。プラス端：axonemeのプラス端からのみ伸長した微小管。マイナス端：axonemeのマイナス端からのみ伸長した微小管。GTPのみの存在下では84%の微小管がプラス端から伸長したのに対して、GDP共存下では95%がマイナス端から伸長した。40回の灌流実験を行って、GTPのみの存在下では126個、GTPとGDPの共存下では155個のaxonemeを観察した。

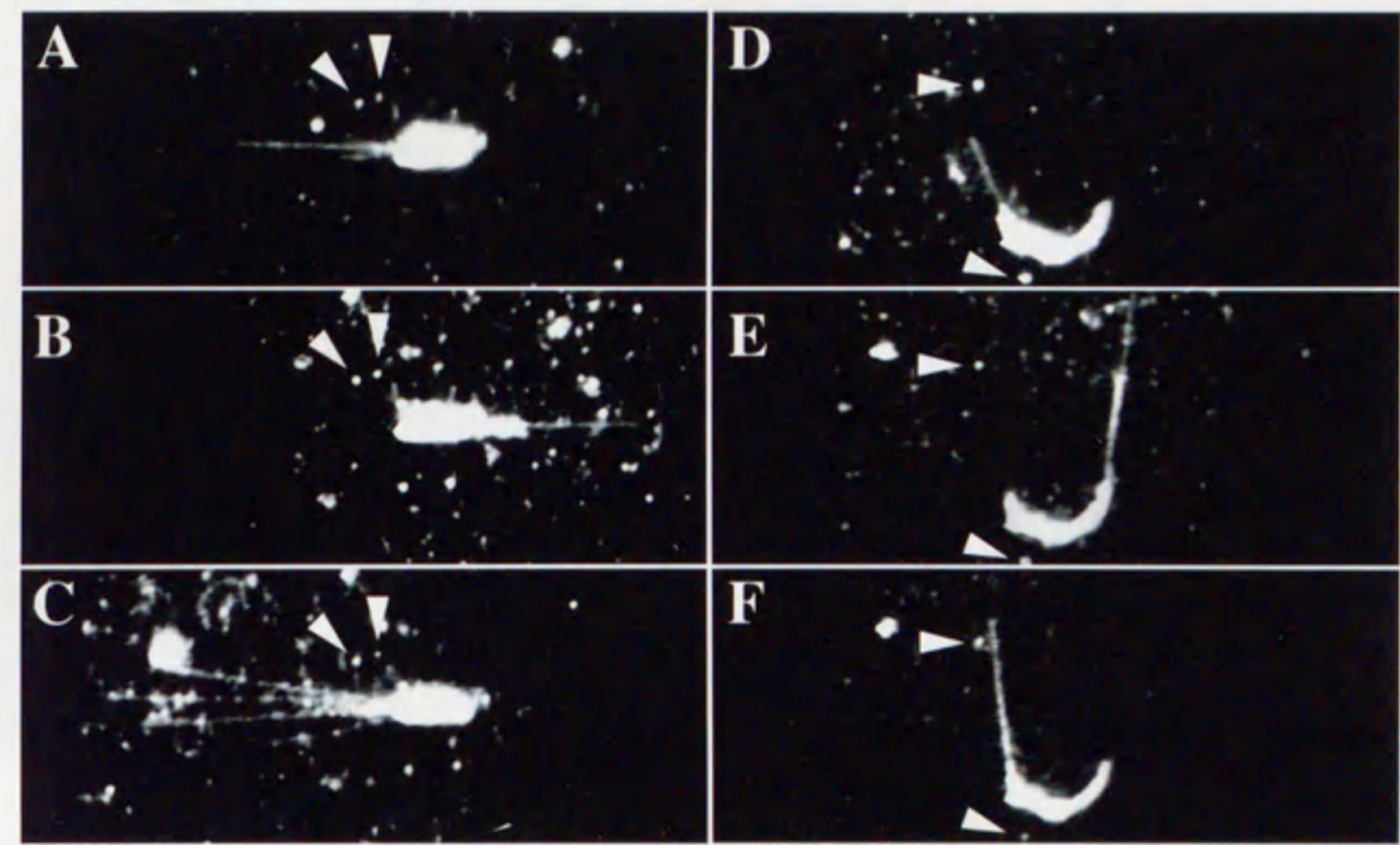


図15 微小管の成長方向の逆転

(A - F) 各条件下でウニのaxonemeから重合させた微小管の暗視野顕微鏡像 (A, D) 10 μ M チューブリン, 1 mM GTP (B, E) 20 μ M チューブリン, 1 mM GTP, 1 mM GDP (C, F) 10 μ M NEM-チューブリン, 20 μ M チューブリン, 1 mM GTP 縦の列は1連の灌流実験に相当し、この図では2例の実験結果を示す。写真は左側がプラス端になるように配置した。矢尻は、位置標識として用いたガラス上に付着した塵を示す。Bar = 10 μ m

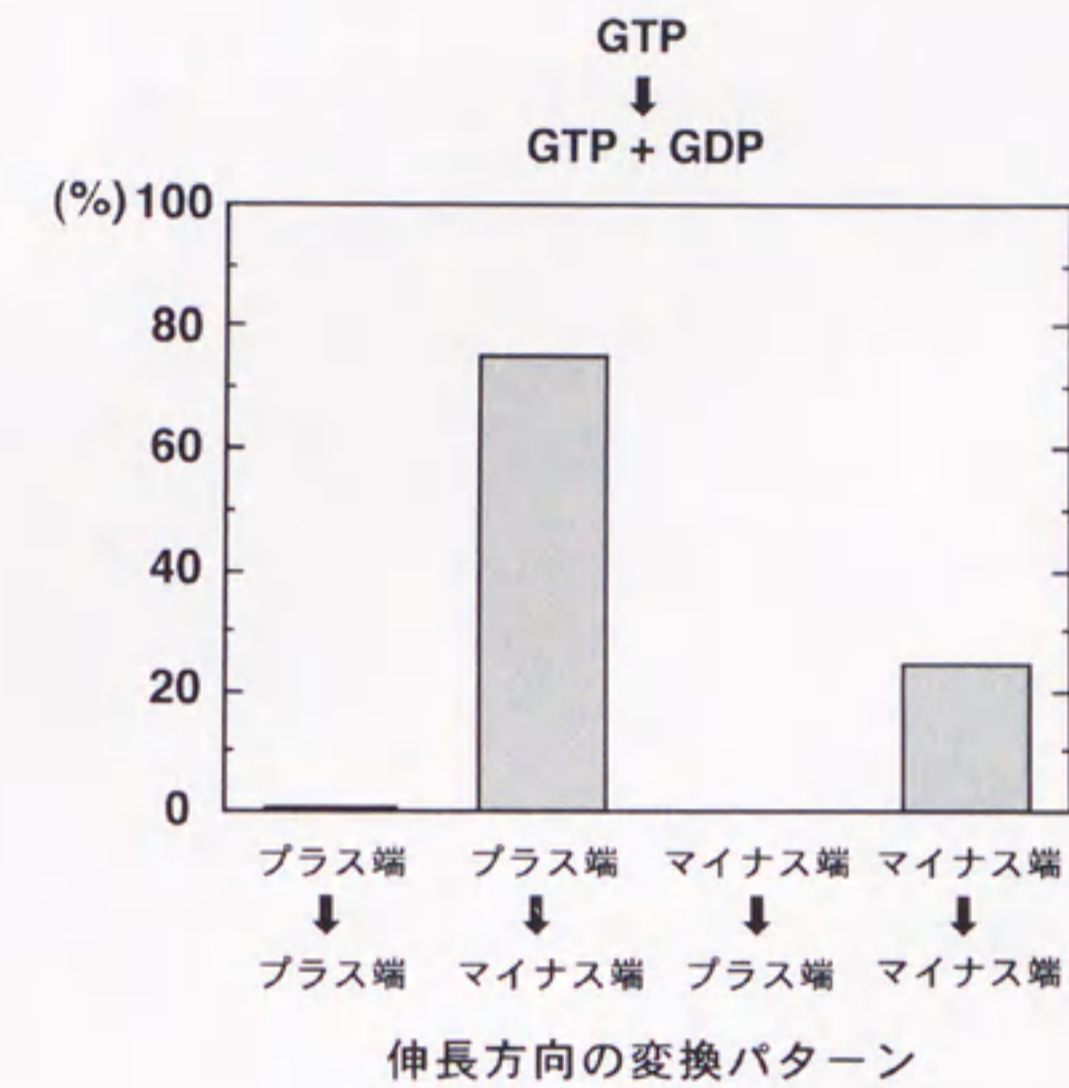


図16 灌流実験における微小管の伸長方向の変換パターン
 10 μ M チューブリン, 1 mM GTPを含む溶液を20 μ M チューブリン, 1 mM GTP, 1 mM GDPを含む溶液に交換したときに, 重合した微小管の伸長方向がどのように変化したかを示す。観察した微小管中1%がどちらの条件でもプラス端だったもの, 75%がプラス端からマイナス端に変化したもの, 残りの24%がどちらの条件でもマイナス端のものだった。マイナス端からプラス端に変化したものは観察されなかった。12回の灌流実験を行い, 71個のaxonemeを観察した。

[GDPによるマグネシウムのキレートの影響]

微小管の重合にはマグネシウムが必要である。それは、GTPがマグネシウムと1:1で結合した状態でチューブリンに結合するためである (Jemiolo & Grisham, 1982)。本研究で微小管の重合に用いたPM Bufferは、0.5 mM MgSO₄を含む。一方、今回の重合実験におけるヌクレオチドの総濃度は、GTPのみの場合は1 mMだがGTPとGDPが共存する場合は2 mMであり、一定ではなかった。GTPにもGDPにもマグネシウムは結合する。そのため、GDPが共存してヌクレオチドの総濃度が増加すると、遊離のマグネシウム濃度が減少し、それが微小管の伸長方向に影響を与えた可能性も考えられた。この可能性を取り除くために、20 μM チューブリン、1 mM GTP、1 mM GDPを0.5 mM または2 mM MgSO₄を含むPM Buffer 中で重合させた。その結果、MgSO₄の濃度が0.5 mMから2 mMに増加すると、微小管の重合量が少し増加した。そして、片方の端からのみ微小管が伸長したaxonemeの割合が少し減少した。2 mM MgSO₄存在下でaxonemeの片方の端からのみ伸長した微小管の伸長方向を灌流装置を用いて調べたところ、100% (21/21) がマイナス端だった。0.5 mM MgSO₄存在下で微小管を伸長させたときは95%がマイナス端だったことから、GDPによるマグネシウムのキレートは微小管の伸長方向に影響を与えていないことが確認された。

【考察】

[GDPによる微小管のマイナス端伸長]

本研究により axoneme の片方の端からのみ微小管が伸長してくる場合、GTP のみの存在下では微小管がプラス端から伸長するが、GDP 共存下ではマイナス端から伸長することが示された (図17)。微小管の場合、重合の臨界濃度はマイナス端よりプラス端の方が低い (Bergen & Borisy, 1980)。つまり、チューブリン濃度がプラス端の臨界濃度より高くマイナス端の臨界濃度より低い場合は、プラス端からのみ微小管の伸長が観察される。このように臨界濃度だけを考慮した場合、マイナス端からだけ微小管が伸長することはありえない。GDP の共存下で微小管のマイナス端からのみの伸長がみられたということは、GDP が見かけ上プラス端とマイナス端の臨界濃度の高低を逆転させたことを意味する。

このGDP共存下での微小管のマイナス端伸長のメカニズムとして、2つの可能性が考えられる。1つめの可能性はGDPによってマイナス端の伸長が促進されたというものであり、2つめの可能性はプラス端の伸長が抑制された結果であるというものである。どちらの可能性であるかを、以下のように推測した。本研究の結果は、20 μM チューブリン、1 mM GTP、1 mM GDP存在条件下では微小管がマイナス端からだけ伸長することを示した。また、以前の研究から、GDPのチューブリンへの結合定数が様々な条件下で求められている (Zeeberg & Caplow, 1979; Fishback & Yarbrough, 1984; Correia *et al.*, 1987)。それらの結果を総合すると、GDPのチューブリンへの結合定数はGTPのチューブリンへの結合定数の1/2以下である。そこで、GDPのチューブリンへの結合定数がGTPの結合定数の1/2であると仮定した。この仮定に基づくと、20 μM チューブリン、1 mM GTP、1 mM GDPが共存するときの各グアニンヌクレオチドを結合しているチューブリン濃度は、20 μM のチューブリンのうち13 μM がGTPを、7 μM がGDPを結合していることになる。チューブリン濃度が13 μM のとき、GTPだけの存在下では伸長した微小管をもつaxonemeのうち約70%がaxonemeの両端から微小

管を伸長させていた(図11)。この結果から、GDPがマイナス端の伸長を促進したとは考えにくい。つまり、微小管のマイナス端伸長はGDPがプラス端からの伸長を阻害した結果であると考えられる。

[GDPによる微小管のプラス端伸長阻害のメカニズム]

基本的に微小管に重合したチューブリンに結合しているグアニンヌクレオチドは、溶液中のグアニンヌクレオチドと交換されることはない(Jacobs *et al.*, 1974)。しかし最近、微小管のプラス端に存在するチューブリンだけは例外的に溶液中のグアニンヌクレオチドとの交換が起こることが報告された(Mitchison, 1993)。この報告に基づいて、GDPによる微小管のプラス端伸長の阻害のモデルを2つ考えた。1つめは、GDPによってプラス端から伸長した微小管の脱重合頻度が増加したという考えである(図18A)。そして、2つめは、GDPによってaxonemeのプラス端からの微小管の伸長そのものが抑制されたという考えである(図18B, C)。以下でこのモデルを検証する。

GTPキャップモデルによれば、微小管が伸長しているとき微小管の内部はGDPを結合したチューブリンによって構成されているが、微小管の端にはまだ加水分解されていないGTPをもつチューブリンで構成されているGTPキャップが存在する(Mitchison & Kirschner, 1984a)。このGTPはすぐに加水分解されるが、それに先立って新たにGTPをもつチューブリンが微小管の端に重合すると、GTPキャップは維持されて微小管は重合し続ける。しかし、GTPをもつチューブリンが結合しなかった場合は、そこでGTPキャップが失われGDPをもつチューブリンが露出し、微小管が脱重合すると考えられている。先に述べた1つめのモデルは、微小管のプラス端に存在するGTPキャップ内のチューブリンのもつGTPが溶液中のGDPと交換されることによりGTPキャップが失われ、脱重合頻度が増加したというものである(図18A)。このモデルではプラス端から微小管が伸長するが、すぐに脱重合してしまう。このとき伸長した微小管が短く、暗視野顕微鏡では観察できなかったことが推測される。

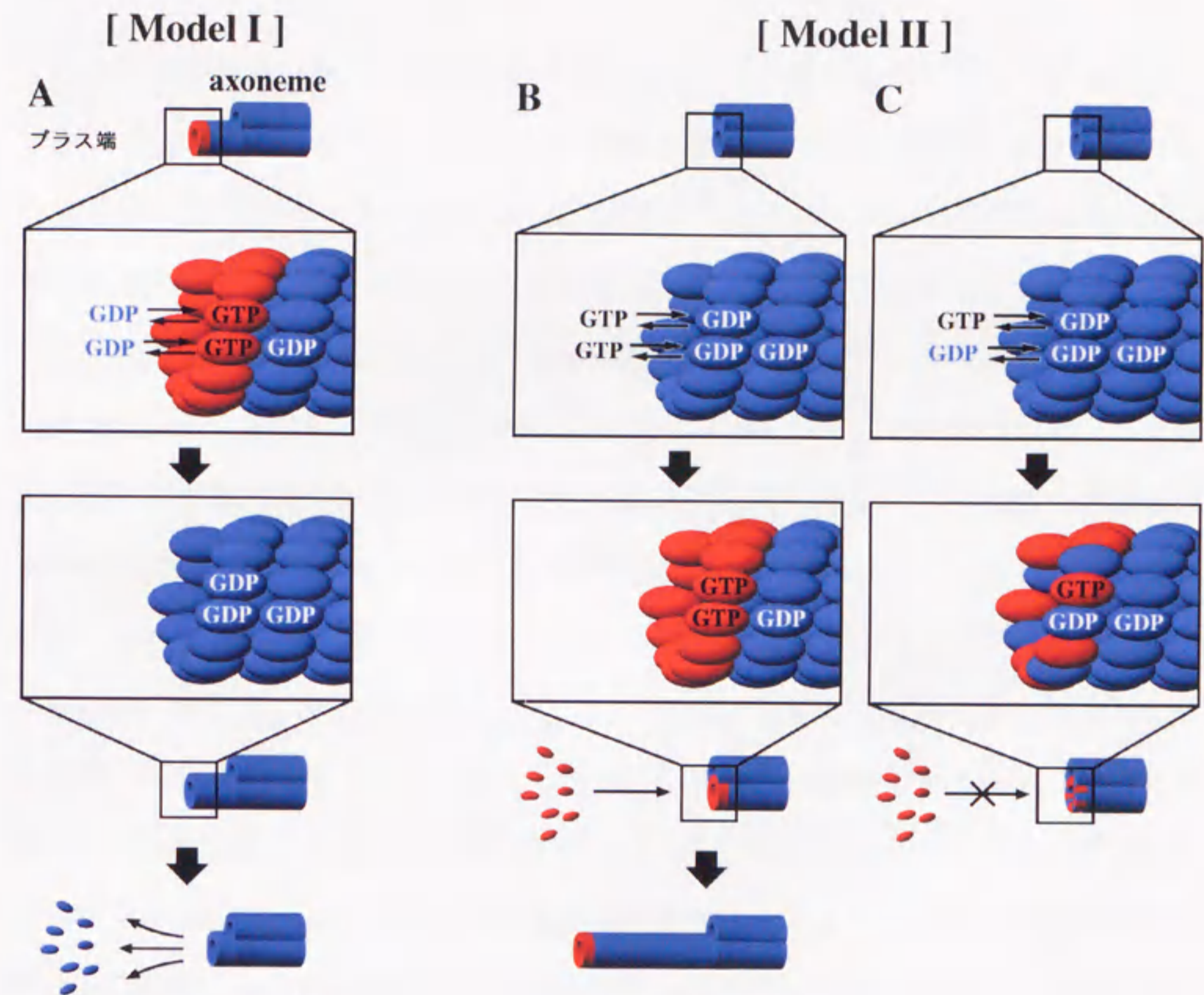


図18 GDPによる微小管のプラス端伸長阻害の2つのモデル

(A) モデル I : 微小管の先端にGTPキャップがある間は、微小管は伸長し続ける。しかし、外液中にGDPがあるとGTPキャップ中のGTPがGDPと交換されて、GTPキャップが失われる。その結果、微小管は不安定になり脱重合すると考えられる。

(B, C) モデル II : 微小管重合の核として用いたaxonemeのプラス端に露出しているすべてのチューブリンにGTPが結合してGTPキャップを形成すれば、そこから微小管が伸長することができる(B)。しかし、外液中にGDPが存在すると露出しているチューブリンの一部にGDPが結合してしまい、GTPキャップが形成できず微小管も伸長しないことが考えられる(C)。

最近、このモデルを支持する結果がCaplowらによって報告された (Caplow & Shank, 1995)。

Walkerらはaxonemeからの微小管の伸長をseeded nucleationと名付け、プラス端とマイナス端の各端でのseeded nucleationの頻度のチューブリン濃度依存性を調べた (Walker *et al.*, 1988)。その結果、微小管重合のための核があらかじめ加えられているにもかかわらずseeded nucleationは核形成と同じく協同的な過程によって起こるということを見つけた。彼らは、seeded nucleationはチューブリンのoligomerがaxonemeに結合するか、またはある程度の数のチューブリンが一度にaxonemeに結合したときだけ起こると推測している。GDPのプラス端伸長阻害を説明する2つめのモデルは、axonemeのプラス端でのseeded nucleationがGDPによって阻害されているというものである (図18B,C)。axonemeの調製にはグアニンヌクレオチドを含む溶液を全く使わないため、調製後のaxoneme内のチューブリンはGDPを結合しているか、何も結合していないかのどちらかであると考えられる。この場合、当然axonemeの端にもGTPを結合していないチューブリンが露出していることが考えられる。そこで、プラス端におけるseeded nucleationが、露出しているいくつかのチューブリンに同時にGTPが結合しGTPキャップが形成されたときに起こると仮定した。この場合、GTPのみが存在する条件下ではプラス端に露出したチューブリンに溶液中のGTPが結合しGTPキャップを形成できるので、そこから微小管が伸長することができる。しかし、GDPが共存しているとプラス端に露出しているチューブリンにGTPとGDPが確率的に結合する。GDPを結合した場合、GTPキャップが形成されず、そこへのチューブリンの重合が妨げられると考えられる。

[微小管の切断とマイナス端伸長]

マイナス端に存在するチューブリンにおいては、すでに結合しているグアニンヌクレオチドと溶液中のグアニンヌクレオチドの交換が起こる確率は、プラス端に比べて非常に低いことが示されている (Mitchison, 1993)。そのため、axonemeのマイ

ナス端のチューブリンはGTPを結合していないと考えられる。しかし、GDP共存下では微小管がマイナス端から伸長した。この結果をプラス端伸長阻害の2つめのモデルに当てはめると、プラス端と異なりマイナス端では重合前にGTPキャップが形成されなくてもそこにチューブリンが重合できることが推測される。この仮定によって、以前報告されたUVビームまたはmicroneedleで切断した微小管が示した現象を説明することができる (Walker *et al.*, 1989; Tran *et al.*, 1997)。微小管を切断すると、新たに生じたプラス端はすぐに脱重合するがマイナス端はゆっくりと伸長を続けた。微小管の内部はGDPをもつチューブリンのみで構成されているため、切断された微小管はその切断面でGDPをもつチューブリンを露出していると考えられる。プラス端では、そのチューブリンがもつGDPが溶液中のGTPと交換されGTPキャップが形成される前に脱重合が起こっているのかもしれない。また、マイナス端はGDPが溶液中のGTPと交換されなくてもチューブリンが結合できると考えると、脱重合を開始せずに微小管が伸長し続けることを説明することができる。

[微小管重合に影響を与える他の要因との比較]

細胞骨格の1つであるアクチン線維には、ゲルゾリンやキャップZなどのプラス端に結合してプラス端の伸長を阻害するタンパク質が多く知られている (Weeds & Maciver, 1993)。一方、微小管でも重合速度や重合頻度などの動的不安定性のパラメータに影響を与える微小管結合タンパク質やヌクレオチドが多く知られている。特に、Xenopusの卵から発見された微小管結合タンパク質であるXMAPは、プラス端の重合速度だけを特異的に増加させることが報告されている (Gard & Kirschner, 1987; Vasquez *et al.*, 1994)。しかし、それ以外のタンパク質やヌクレオチドが、プラス端とマイナス端のどちらかだけに特異的に働くということは報告されていない。したがって、プラス端とマイナス端の臨界濃度の高低を逆転させるような物質ももちろん報告されておらず、本研究におけるGDPがはじめての例である。

【最後に】

今回の研究では、GDPという微小管の重合において必ず生じるヌクレオチドに微小管のプラス端の伸長を阻害し、優先的伸長方向を逆転させる作用があることが示された。私はこの研究結果から今後の微小管の動態の研究において、GDPの存在と微小管の極性を考慮する必要性を強く主張したい。一方、細胞内においては様々な微小管結合タンパク質が存在し微小管の重合・脱重合を調節しているので、GDPは直接微小管の動態には関わっていないかもしれない。しかし、微小管に特有の性質である動的不安定性のメカニズムは生物物理の立場から見ると非常に興味深いテーマであり、まだ解明されていない部分も多い。今後、GDPの存在を考慮した動的不安定性のシミュレーションなどが行われることが期待される。

【謝辞】

本研究を進めるにあたり、いろいろと御指導して下さいました宝谷紘一教授、伊藤知彦博士に感謝いたします。また、さまざまな御助力を下さった滝口金吾博士をはじめとした名古屋大学理学部生命理学科超分子機能学講座の皆様に感謝いたします。

【参考文献】

- Allen, C. & Borisy, G. G. (1974). Structural polarity and directional growth of microtubules of *Chlamydomonas* flagella. *J. Mol. Biol.* **90**, 381-402
- Amos, L. A. & Klug, A. (1974). Arrangement of subunits in flagellar microtubules. *J. Cell Sci.* **14**, 523-549.
- Bergen, L. G. & Borisy, G. G. (1980). Head-to-tail polymerization of microtubules in vitro. *J. Cell Biol.* **84**, 141-150
- Berry, R. W. & Shelanski, M. L. (1972). Interactions of tubulin with vinblastine and guanosine triphosphate. *J. Mol. Biol.* **71**, 71-81
- Burns, R. G. (1991). Alpha-, beta-, and gamma-tubulins: sequence comparisons and structural constraints. *Cell Motil. Cytoskelet.* **20**, 181-189
- Caplow, M. & Shanks, J. (1995). Induction of microtubule catastrophe by formation of tubulin-GDP and apotubulin subunits at microtubule ends. *Biochemistry* **34**, 15732-15741.
- Caplow, M. & Shanks, J. (1996). Evidence that a single monolayer tubulin-GTP cap is both necessary and sufficient to stabilize microtubules. *Mol. Biol. Cell* **7**, 663-675
- Carrier, M.-F. & Pantaloni, D. (1978). Kinetic analysis of cooperatively in tubulin polymerization in the presence of guanosine di- or triphosphate nucleotides. *Biochemistry* **17**, 1908-1915.
- Carrier, M.-F. & Pantaloni, D. (1981). Kinetic analysis of guanosine-5'-triphosphate hydrolysis associated with tubulin polymerization. *Biochemistry* **20**, 1918-1924.
- Correia, J. J., Baty, L. T. & Williams, Jr., R. C. (1987). Mg²⁺ dependence of guanine nucleotide binding to tubulin. *J. Biol. Chem.* **262**, 17278-17284.
- Drechsel, D. N. & Kirschner, M. W. (1994). The minimum GTP cap required to stabilize microtubules. *Curr. Biol.* **4**, 1053-1061
- Dustin, P. (1978). *Microtubule*. Springer-Verlag, Berlin

- Engelborghs, Y. & Van Houtte, A. (1981). Temperature jump relaxation study of microtubule elongation in the presence of GTP/GDP mixtures. *Biophys. Chem.* **14**, 195-202
- Erickson, H. P. & O'Brien, E. T. (1992). Microtubule dynamics instability and GTP hydrolysis. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **21**, 145-166
- Evans, L., Mitchison, T. J. & Kirschner, M. (1985). Influence of the centrosome on the structure of nucleated microtubules. *J. Cell Biol.* **100**, 1185-1191
- Fishback, J. L. & Yarbrough, L. R. (1984). Interaction of 6-mercapto-GTP with bovine brain tubulin. *J. Biol. Chem.* **259**, 1968-1973.
- Gard, D. L. & Kirschner, M. W. (1987). microtubule-associated protein from *Xenopus* eggs that specifically promotes assembly at the plus-end. *J. Cell Biol.* **105**, 2203-2215
- Gelfand, V. I. & Bershadsky, A. D. (1991). Microtubule dynamics: mechanism, regulation, and function. *Annu. Rev. Cell Biol.* **7**, 93-116.
- Gibbons, I. R. & Fronk, E. (1979). A latent adenosine triphosphatase form of dynein 1 from sea urchin sperm flagella. *J. Biol. Cell* **254**, 187-196.
- Horio, T. & Hotani, H. (1986). Visualization of the dynamic instability of individual microtubules by dark-field microscopy. *Nature* **321**, 605-607.
- Hyman, A., Drechsel, D., Kellogg, D., Salser, S., Sawin, K., Steffen, P., Wordeman, L. & Mitchison, T. J. (1991). Preparation of Modified Tubulins. *Methods in enzymology* **196**, 482-483.
- Hyman, J. S. & Lloyd, C., Eds. (1994). *Microtubules*. Wiley-Liss, New York
- Jacobs, M., Smith, H. & Taylor, E. W. (1974). Tubulin: nucleotide binding and enzymic activity. *J. Mol. Biol.* **89**, 455-486.
- Jameson, L. & Caplow, M. (1980). Effect of guanosine diphosphate on microtubule assembly and stability. *J. Biol. Chem.* **255**, 2284-2292.

- Jemiolo, D. K. & Grisham, C. M. (1982). Divalent cation-nucleotide complex at the exchangeable nucleotide binding site of tubulin. *J. Biol. Chem.* **257**, 8148-8152.
- Johnson, K. A. (1986). Preparation and Properties of Dynein from Tetrahymena Cilia. *Methods in Enzymology* **134**, 306-317.
- Kirschner, M. & Mitchison, T. J. (1986). Beyond self-assembly: from microtubules to morphogenesis. *Cell* **45**, 329-342.
- Koshland, D. E., Mitchison, T. J. & Kirschner, M. W. (1988). Polewards chromosome movement driven by microtubule depolymerization *in vitro*. *Nature* **331**, 499-504
- McIntosh, J. R. & Euteneuer, U. (1984). Tubulin hooks as probes for microtubule polarity: an analysis of the method and an evaluation of data on microtubule polarity in the mitotic spindle. *J. Cell Biol.* **98**, 525-553.
- McNeal, R. K., Webb, B. C. & Purich, D. L. (1977). Neurotubule assembly at substoichiometric nucleotide levels using a GTP regenerating system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **74**, 440-447.
- Mejillano, M. R., Barton, J. S., Nath, J. P. & Himes, R. H. (1990). GTP analogues interact with the tubulin exchangeable site during assembly and upon binding. *Biochemistry* **29**, 1208-1216
- Mitchison, T. J. (1993). Localization of exchangeable GTP binding site at the plus end of microtubules. *Science* **261**, 1044-1047.
- Mitchison, T. J. & Kirschner, M. (1984a). Dynamic instability of microtubule growth. *Nature* **312**, 237-242.
- Mitchison, T. J. & Kirschner, M. (1984b). Microtubule assembly nucleated by isolated centrosomes. *Nature* **312**, 232-237
- Murata, M., Itoh, T. J., Kagiwada, S., Hishida, R., Hotani, H. & Ohnishi, S.-I. (1992). Interaction of Golgi membranes isolated from rabbit liver with microtubules *in vitro*. *Biol. Cell* **75**, 127-134.

- O'Brien, E. T. & Erickson, H. P. (1989). Assembly of pure tubulin in the absence of free GTP: Effect of magnesium, glycerol, ATP, and the nonhydrolyzable GTP analogues. *Biochemistry* **28**, 1413-1422
- Oosawa, F. & Asakura, S. (1975). *Thermodynamics of the Polymerization of Protein*. Academic Press, New York.
- Sandoval, I. V., MacDonald, E., Jameson, J. L. & Cuatrecasas, P. (1977). Role of nucleotides in tubulin polymerization: effect of guanylyl 5'-methylendiphosphate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 4881-4885
- Schilstra, M. J., Martin, S. R. & Bayley, P. M. (1987). On the relationship between nucleotide hydrolysis and microtubule assembly: studies with a GTP-regenerating system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **147**, 588-595
- Scholey, J. M., Ed. (1993). *Motility assays for motor proteins*. Academic Press, California
- Seckler, R., Wu, G. -M. & Timasheff, S. N. (1990). Interactions of tubulin with guanylyl-(β - τ -methylene)diphosphate. *J. Biol. Chem.* **265**, 7655-7661
- Stewart, R. J., Farrell, K. W. & Wilson, L. (1990). Role of GTP hydrolysis in microtubule polymerization: evidence for a coupled hydrolysis mechanism. *Biochemistry* **29**, 6489-6498
- Tran, P. T., Walker, R. A. & Salmon, E. D. (1997). A metastable intermediate state of microtubule dynamic instability that differs significantly between plus and minus ends. *J. Cell Biol.* **138**, 105-117.
- Vandecandelaere, A., Martin, S. R. & Bayley, P. M. (1995). Regulation of microtubule dynamic instability by tubulin-GDP. *Biochemistry* **34**, 1332-1343.
- Vasquez, R. J., Gard, D. L. & Cassimeris, L. (1994). XMAP from *Xenopus* eggs promotes rapid plus end assembly of microtubules and rapid microtubule polymer turnover. *J. Cell Biol.* **127**, 985-993
- Walker, R. A., Inoue, S. & Salmon, E. D. (1989). Asymmetric behavior of severed microtubule ends after ultraviolet-microbeam irradiation of individual microtubules in vitro. *J. Cell Biol.* **108**, 931-937.

- Walker, R. A., O'Brien, E. T., Pryer, M. T., 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**, 1437-1448.
- Warner, F. D. & Satir, P. (1974). The structural basis of ciliary bend formation. Radial spoke positional changes accompanying microtubule sliding. *J. Cell Biol.* **63**, 35-63.
- Weeds, A. & Maciver, S. (1993). F-actin capping protein. *Curr. Opin. Cell Biol.* **5**, 63-69.
- Weisenberg, R. C. (1972). Microtubule formation in vitro in solutions containing low calcium concentrations. *Science* **177**, 1104-1105
- Weisenberg, R. C., Borisy, G. G. & Taylor, E. W. (1968). The colchicine-binding protein of mammalian brain and its relation to microtubules. *Biochemistry* **7**, 4466-4478
- Weisenberg, R. C., Deery, W. J. & Dickinson, P. J. (1976). Tubulin-nucleotide interactions during the polymerization and depolymerization of microtubules. *Biochemistry* **15**, 4248-4254
- Wordeman, L. & Mitchison, T. J. (1994). Microtubule dynamics *in vivo*. See Hymans & Lloyd, pp 287-301
- Zackroff, R. V., Weisenberg, R. C. & Deery, W. J. (1980). Equilibrium and kinetic analysis of microtubule assembly in the presence of guanosine diphosphate. *J. Mol. Biol.* **139**, 641-677.
- Zeeberg, B. & Caplow, M. (1979). Determination of free and bound microtubular protein and guanine nucleotide under equilibrium conditions. *Biochemistry* **18**, 3880-3886.

副論文

Visualization of the GDP-dependent Switching in the Growth Polarity of Microtubules.

Visualization of the GDP-dependent Switching in the Growth Polarity of Microtubules.

Yoshi Tanaka-Takiguchi, Torayuki J. Itoh and Jun-ichi Hotani

Tanaka-Takiguchi, Y., Itoh, T. J. & Hotani, H.

J. Mol. Biol. 280, 365-373 (1998)