微小管成長方向のスイッチング

名古屋大学大学院理学研究科生命理学専攻 瀧口陽子, 伊藤知彦, 宝谷紘一

To examine the relationship between the growth polarity of microtubules and guanine nucleotide dependence, we polymerized microtubules from axonemes either with GTP or with GTP and GDP, and observed individual microtubules by dark-field microscopy. We used a perfusion chamber to monitor the growth polarity of microtubules from the same axoneme. Exchanging a solution containing only GTP for one containing GTP and GDP elicited a switch in the growth polarity of microtubules from the plus ends to the minus ends. These results suggest that GDP directly affects microtubule polymerization and inverts growth polarity, probably by inhibiting growth at the plus ends.

microtubule / GDP / dark-field microscopy / growth polarity / dynamic instability

1. はじめに

細胞骨格の1つである微小管は、細胞内では真核生物の鞭毛、繊毛、分裂装置、神経軸索などに存在し、細胞内輸送や細胞運動の方向性決定に重要な役割を担っている。また、微小管は細胞分裂の前後でダイナミックに解体・再構築を行う¹⁾。このとき微小管結合タンパク質が大きな役割を果たしているが、基本的には微小管自身の重合・脱重合の性質が基盤になっている。この微小管に特有の性質を、動的不安定性 (dynamic instability) と呼ぶ。この動的不安定性のメカニズムを解く研究は10年ほど前から多く行われてきた。我々が今回紹介する研究結果も、動的不安定性のメカニズムを解き明かす一端になると信じている。

2. 微小管の構造と動的不安定性

微小管の構成成分であるチューブリンは、 α サブユニットと β サブユニットからなるヘテロダイマーである。微小管は13本のプロトフィラメントから成る管状の構造をしており、 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²⁾。そのため、微小管には長さ方向に極性がある。微小管は細胞内では主として中心体の周辺から伸びており、中心体から遠い方の端がプラス端、近い方の端がマイナス端と呼ばれている³⁾。in vitro でこの極性は重合速度に

よって容易に区別することができ、速く成長する方がプラス端に、ゆっくり成長する方がマイナス端に対応する。また、臨界濃度 (重合を開始するのに必要な最低の濃度) はマイナス端よりプラス端の方が低いことがわかっている⁴⁾。

チューブリンの各サブユニットは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と呼び、ここに結合したGTPは外部のGTPと交換されないのが通常は無視してよい。一方、 β サブユニットのGTP結合部位をE-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。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⁵⁾。

はじめに触れたが、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⁶⁾ (図1)。微小管の重合量は重合開始から増加していき、あるところで平衡に達する。このときの微小管を観察すると、平衡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。この現象を動的不安定性と呼び、暗視野顕微鏡などの光学顕微鏡で微小管の1本1本をリアルタイムで観察することによりはじめて確認された^{7)~9)}。この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ている⁶⁾ (図2)。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

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

Yohko TANAKA-TAKIGUCHI, Tomohiko J. ITOH and Hirokazu HOTANI

Division of Molecular Biology, Graduate School of Science, Nagoya University

図1 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, 1 mM GTP を PM 緩衝液中で 27 で 20 分間重合させた。微小管重合の核としてウニの軸系を用いた。その後、成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、横軸は観察開始後からの時間を示す。

図2 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(上段)。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 GTP を結合したチューブリンが先端に露出すると(中段)、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(下段)。

た後に加水分解されて GDP になる¹⁰⁾。つまり、成長中の微小管は、GDP を結合しているチューブリンで構成された微小管の先端を、GTP を結合しているチューブリンがキャップしているという構造になっており、これを GTP キャップと呼ぶ。現在、この GTP キャップの大きさはチューブリン 13 個程度(微小管のプロトフィラメントは 13 本なので、1 層程の大きさ)であると考えられている¹¹⁾。加水分解が進行して、GDP を結合したチューブリンが微小管の先端に露出し GTP キャップが失われると、微小管が不安定になり脱重合すると考えられている⁶⁾。

3. GDP による微小管重合の抑制

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^{12)~14)}。また、光学顕微鏡を用いた観察により GDP が微小管の脱重合頻度を増加させることも報告されていたが、その研究ではプラス端とマイナス端がはっきりと区別されていなかった^{15)~16)}。我々は GDP の微小管重合への影響を詳しく調べるために、GDP 存在下での微小管の挙動を暗視野顕微鏡で観察した。以下のすべての重合実験には、PM 緩衝液 (0.1 M PIPES (pH6.9), 1 mM EGTA, 0.5 mM MgSO_4) を用いた。まず、GDP の微小管重合への抑制効果を確認した。微小管の重合の核としてウニの軸系を用いた。1 mM GTP のみが存在する通常のコア重合条件ではチューブリン濃度が 20 μM のとき、軸系の両端から、つまりプラス端とマイナス端の両端から微小管が成長した(図 3a)しかし、チューブリン濃度を 10 μM に下げた場合には、微小管の重合量が減少し、軸系の片方の端から成長した微小管だけが観察された(図 3b)一方、20 μM チューブリンに 1 mM GTP と 1 mM GDP を加えると、1 mM GTP のみを加えた場合に比べて微小管の重合量が減少し、軸系の片端から成長した微小管のみが観察された(図 3c)。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 の存在下では微小管の重合はみられなかった(図 3d)。

以上の結果から、GDP に微小管の重合を抑制する効果があることが確認された。この結果の最も簡単な解釈は、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。しかし、我々の実験結果から GDP の微小管に対する影響がこれだけではなく、微小管のプラス端の成長を積極的に阻害していることがわかったので、次にその実験を紹介する。

微小管成長方向のスイッチング

図3 チューブリン濃度の低下とGDP添加の微小管重合への影響

各条件下でウニの軸系から重合させた微小管の暗視野顕微鏡像。すべての微小管は、PM緩衝液中で27℃で20分間重合させた。(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. Bar = 10 μ m

図4 微小管の成長方向の逆転

(a-f) 各条件下でウニの軸系から重合させた微小管の暗視野顕微鏡像。すべての微小管は、PM緩衝液中で27℃で20分間重合させた。(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. 縦の列は一連の灌流実験を示す。写真は左側がプラス端になるように配置した。矢尻は、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 (g) 上記の灌流実験における微小管の成長方向の変換パターン。1 mM GTPを含むチューブリン溶液(a, d)を1 mM GTPと1 mM GDPを含む溶液(b, e)に変えたときに、重合した微小管の成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%がどちらの条件下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%がどちらの条件下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。

4. GDPによる微小管成長方向のスイッチング

我々は、前述の実験で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の条件下では軸系の片方の端から成長した微小管だけが観察されることを報告した。そこで、各条件下で成長した微小管が軸系のどちらの端から成長している

のかを灌流装置を用いて調べた。灌流装置はカバーガラスの両端をスパーサーで固定して作成した。まず、10 μ M チューブリン, 1 mM GTPを灌流し、軸系の片端から微小管を重合させた(図4a, d)そして、PM緩衝液で灌流して、この微小管を完全に脱重合させた。次に20 μ M チューブリン, 1 mM GTP, 1 mM GDPを灌流し、微小管を重合させた。その結果驚くべきことに、今度は微

小管が同じ軸系の反対の端から成長した(図4b, e) この結果は、灌流中に軸系が移動して軸系の方向が逆転したためではない。つまり、GDPによって微小管の優先的成長方向が切り換わったのである。

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、それぞれの場合の微小管の成長端がプラス端かマイナス端か同定しなければならぬ。過去の研究では微小管の極性を重合速度やキネシンビーズの移動方向¹⁵⁾などで決定していた。今回の実験では微小管の極性を決定するために、もう一度同じ軸系に対して灌流実験を行った。N-ethylmaleimide (NEM) で処理したチューブリンを未処理のチューブリンと混合すると、微小管がプラス端からのみ成長することが以前から知られている¹⁷⁾。そこで、もう一度PM緩衝液で灌流して微小管を脱重合させ、次にNEM-チューブリンを含む溶液を灌流して再度重合させた(図4c, f)。この灌流法とNEM-チューブリンの使用を組み合わせた極性決定法は我々が開発したものである。その結果、10 μM チューブリン、1 mM GTPを含む溶液を20 μM チューブリン、1 mM GTP、1 mM GDPを含む溶液に交換したとき、微小管の75%がその成長方向をプラス端からマイナス端に変えたことがわかった(図4g) こうして、GDPが共存するとき微小管のマイナス端からのみの重合成長が観察された¹⁸⁾。

5. GDPによるプラス端成長阻害のメカニズム

我々はGDP存在下で微小管がマイナス端から成長したのは、マイナス端の成長が促進された結果ではなく、プラス端の成長が抑制された結果であると考えている。20 μM チューブリン、1 mM GTP、1 mM GDP存在下において、マイナス端からの成長が観察されたのは先述述べたとおりである。以前の研究でGTPのチューブリンへの結合定数がGDPの2倍以上であることが報告されている¹⁹⁾。ここで仮に、GTPのチューブリンへの結合定数がGDPの2倍であるとする、20 μM チューブリンのうち13.3 μM がGTPを、6.7 μM がGDPを結合していることになる。チューブリン濃度が13.3 μM のとき、GTPだけの存在下では微小管は軸系の両端から成長する。したがって、GDPはプラス端からの成長を阻害していると推測される。

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ヌクレオチドは、溶液中のヌクレオチドと交換されることはない。しかし最近、微小管のプラス端に存在するチューブリンにおいてのみ溶液中のヌクレオチドとの交換が起こることが報告された²⁰⁾。我々はこの報告に基づいて、GDPによるプラス端成長の阻害のメカニズムを2つ考えた。

● GTPを結合しているチューブリン
● GDPを結合しているチューブリン

図5 GDPによる微小管のプラス端成長阻害の2つのモデル (a) 微小管の先端にGTPキャップがある間は、微小管は成長し続ける。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) 微小管成長の核として用いた軸系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、そこから微小管が成長することができる。しかし、外液中にGDPが存在するとそのチューブリンにGDPが結合してしまい、GTPキャップが形成できず微小管も成長しないことが考えられる。

ルを2つ考えた。

1つめの可能性は、GDPが微小管のプラス端の脱重合頻度を増加させるというものである(図5a) 微小管が成長しているとき、そのプラス端にはGTPキャップが存在する。そのGTPキャップ中のチューブリンに結合しているGTPが遊離のGDPと交換したために、GTPキャップが失われ脱重合したことが考えられる。このモデルでは微小管はプラス端から成長できるが、すぐに脱重合してしまうため観察することができない。

もう一方の可能性は、軸系のプラス端へのチューブリンの結合がGDPによって阻害されているというものである(図5b) 調製後の軸系内のチューブリンは、GDPを結合しているか、あるいはヌクレオチドを結合していないと考えられる(軸系の調製に使われる緩衝液には、GTPが含まれていない) 軸系のプラス端に露

出しているチューブリンすべてが溶液中のGTPを結合してGTPキャップが形成されれば、そこにチューブリンが結合できるようになり微小管が成長するが、溶液中にGDPが存在してGDPが結合するとGTPキャップが形成できず、そこへのチューブリンの重合が妨げられることが考えられる(図5b)。

6. おわりに

これまでに、微小管の各端の重合速度に影響を与えるタンパク質やヌクレオチドはたくさん知られているが、プラス端とマイナス端の重合の臨界濃度を逆転させるものは報告されていない。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成長を阻害する作用があることが示唆された。細胞内にはさまざまな微小管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は細胞内では直接微小管の動態に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みると非常に興味深いテーマである。今回の結果は、微小管の動的不安定性にGDPが関与していることを示している。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。

文 献

- 1) Kirschner, M. and Mitchison, T. (1986) *Cell* **45**, 329-342.
- 2) Amos, L. A. and Klug, A. (1974) *J. Cell Sci.* **14**, 523-549.
- 3) McIntosh, J. R. and Euteneuer, U. (1984) *J. Cell Biol.* **98**, 525-553.
- 4) Bergen, L. G. and Borisy, G. G. (1980) *J. Cell Biol.* **84**, 141-150.
- 5) Jacobs, M., Smith, H., and Taylor, E. W. (1974) *J. Mol. Biol.* **89**, 455-486.
- 6) Mitchison, T. and Kirschner, M. (1984) *Nature* **312**, 237-242.
- 7) Horio, T. and Hotani, H. (1986) *Nature* **321**, 605-607.
- 8) Walker, R. A., O'Brien, E. T., Pryer, M. T., Soboeiro, M. F., Voter, W. A., Erickson, H. P. and Salmon, E. D. (1988) *J. Cell Biol.* **107**, 1437-1448.
- 9) Gelfand, V. I. and Bershadsky, A. D. (1991) *Annu. Rev. Cell Biol.* **7**, 93-116.
- 10) Carlier, M.-F. and Pantaloni, D. (1981) *Biochemistry* **20**, 1918-1924.
- 11) Drechsel, D. N. and Kirschner, M. W. (1994) *Current Biology* **4**, 1053-1061.
- 12) Jameson, L. and Caplow, M. (1980) *J. Biol. Chem.* **255**, 2284-2292.
- 13) Carlier, M.-F., Didry, D. and Pantaloni, D. (1987) *Biochemistry* **26**, 4428-4437.
- 14) Zuckroff, R. V., Weisenberg, R. C. and Deery, W. J. (1980) *J. Mol. Biol.* **139**, 641-677.
- 15) Caplow, M. and Shank, J. (1995) *Biochemistry* **34**, 15732-15741.
- 16) Vandecandelaere, A., Martin, S. R. and Bayley, P. M. (1995) *Biochemistry* **34**, 1332-1343.
- 17) Hyman, A., Drechsel, D., Kellogg, D., Salser, S., Sawin, K., Steffen, P., Wordeman, L. and Mitchison, T. (1991) *Methods in Enzymology* **196**, 482-483.
- 18) Tanaka-Takiguchi, Y., Itoh, T.J. and Hotani, H. (1998) *J. Mol. Biol.* **280**, 365-373.
- 19) Correia, J. J., Baty, L. T. and Williams, Jr., R. C. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 17278-17284.
- 20) Mitchison, T. J. (1993) *Science* **261**, 1044-1047.