原 著

順天堂医学 38 (2)
P. 220~228 (1992)

ラット脳ダイナミンの新しい精製法と その酵素活性及び微小管との結合様式の検討

The new methods of purification of the rat brain dynamin and its
biochemical and ultrastructural analyse of the interaction with microtubules

前 田 国 見*

KUNIMI MAEDA, M.D.

ダイナミンはキネシン, cytoplasmic dynein (MAP 1 C) に次いで ATPase 活性をもち、第 3 の微小管上のモーター蛋白として発見された。その後、明らかにされた塩基配列により GPT 結合蛋白のコンセンサスシーケンスをもつことがわかり、全く新しい G 蛋白として注目を集めた。著者は新しい方法を用いて、ラット脳より高純度のダイナミンを効率良く大量に精製し、これが今まで報告されていたダイナミンであることを同定した。

微小管存在下において、微小管が存在しない場合より約 4 倍に促進される ATPase 活性 (K_m 値 = 1.0) と、170 倍に促進される GTPase 活性 (K_m 値 = 0.07) をもつことを示した。さらに急速凍結デープエッチ法を用いてダイナミンと微小管の結合の様式を電顕にて詳細に観察し、ダイナミンが螺旋状に微小管を装飾することを明らかにした。

索 引 用 語 : ダイナミン, GTP 結合蛋白, GTPase 活性, 微小管, 急速凍結デープエッチ法

Key words : dynamin, GTP-binding proteins, GTPase activity, microtubules,
quick-freeze deepetching method

緒 言

細胞には細胞骨格と呼ばれる蛋白質繊維 (アクチンフィラメント・微小管・中間系フィラメント) の骨組みが存在する¹⁾。その中の微小管は、主成分のチューブリンと微小管関連蛋白 (microtubule associated proteins ; MAPs) とから構成され、形態形式や物質の輸送に深くかかわっていることが知られている¹⁾。現在までにほ乳類においては、MAP 1・MAP 2・TAU といったフィラメント状の MAPs に関する研究が進められている。

これらの MAPs は、微小管同士や微小管とニューロフィラメントの間に架橋構造を作っていて形態形成に大きな役割を果たしている^{2)~5)}。微小管は膜小器官の輸送にとっても基本的な構造であり、そのモーターとなる分子として、ATPase 活性をもつキネシン⁶⁾・MAP 1 C (cytoplasmic dynein) が同定されてきた⁷⁾。

1989年 Shpetner らが、微小管束を形成し物質輸送のモーターの候補と思われる第 3 の蛋白質ダイナミンを発見した。ダイナミンは当初、補因子の存在下で ATPase 活性をもち、微小管同士のスライディングを引き起こすことが認められた⁸⁾。最近になりラットのダイナミンの塩基配列が明らかにになり、GTP 結合蛋白に見られるコンセンサスシーケンスを有することがわかった⁹⁾¹⁰⁾。更にこのダイナミンの遺伝子がマウス Mx1 遺伝子 (インフルエンザウイルスの感染防御機構を担う

* 順天堂大学医学部内科学教室腎臓内科学講座

Division of Nephrology, Department of Internal Medicine, Juntendo University School of Medicine, Tokyo, Japan

(Oct. 18, 1991 原稿受領) (Mar. 5, 1992 掲載決定)

蛋白を発現)¹¹⁾や、酵母 VPS1 遺伝子 (液胞蛋白のソーティングを司る遺伝子)¹²⁾¹³⁾などに比較的高い相同性をもつことがわかった。最近、ショウジョウバエの温度感受性変異株におけるエンドサイトーシス機構に深くかかわっている遺伝子産物も、このダイナミンに高い相同性をもつことがわかり¹⁴⁾¹⁵⁾、これまで知られていない新しい GTP 結合蛋白のファミリーを形成することが示唆された。

しかし、これまでの精製方法では極少量のダイナミンしか得ることができなかったため、その生化学的な蛋白の性質や GTPase としての性質は全く調べられていなかった。今回、著者はダイナミンの新しい精製方法を確立し、ラット脳より大量のダイナミンをその生物活性を損なうことなく分離精製することに成功した。そしてこれが今までに報告されているダイナミンと同一のものであり、微小管存在下で促進される GTPase 活性・ATPase 活性をもつことを確認した。さらに *in vitro* で微小管と結合させ、急速凍結デュープエッチング法の手技を用いて電顕的に観察した。

実験材料と実験方法

1. ダイナミンの精製

20匹のラット (Wistar 5 週齢) の脳 (20g) に 4℃ 30ml の A 液 [10mM リン酸ナトリウム (pH 6.9)・70mM グルタミン酸ナトリウム・2mM MgSO₄・2mM EGTA・1mM PMSF・10 μg/ml leupeptin・1 μg/ml pepstatin A・1mM DTT] を加えたものでホモジェナイズを行う。12,000g, 4℃ 10分間の遠心を行い、その上澄みをさらに 300,000g 4℃ で45分間遠心する。得られた粗抽出液 (S₁) をあらかじめ A 液で平衡化してある DEAE-セファロースカラム (DE-52 Whatmann) にかけて、通り抜け分画 (S₁') を集めた。ブタ脳より調整した PC チュブリン 10mg に、20 μM になるように taxol を加えて 37℃ 30分加温し微小管を重合させる。これに通り抜け分画を加えて室温にて15分間緩やかに攪拌したのち、20% ショ糖を加えた A 液の上に重層し、200,000g 4℃ 30分間

遠心して沈澱を得る。この沈澱を 2.5mM GTP・5mM AMP-PNP を加えた 800 μl の A 液にて懸濁させ、37℃ の恒温槽にて15分間加温する。再び 100,000g 4℃ 30分間の遠心を行い、得られた沈澱を 800 μl の 10mM GTP を加えた A 液にて懸濁し、37℃ 20分間加温、100,000g 4℃ 30分間遠心して上澄 (S₂) を得る。この上澄からチュブリンを除くために再び A 液で平衡化した DE-52 カラムを通し、通り抜け分画を集める (S₂')。この時点ですでにダイナミンはかなり高い純度をもつが、さらに純度を上げるために 5%~20% ショ糖 B 液 [10mM Tris-HCl (pH 7.0)・30mM グルタミン酸ナトリウム・2mM EGTA・2mM MgSO₄] を用いて、ショ糖密度勾配遠心を 30,000rpm 4℃ 20 時間の条件の下で行い、各分画を集めた。

2. イムノブロッティング

われわれは Vallee らの方法でダイナミンを精製し、その部分アミノ酸配列を決定し、すでにダイナミン遺伝子をクローニングしている¹⁰⁾。これは Obar らの発表したダイナミン遺伝子と一致した⁹⁾。この部分アミノ酸配列をもとに合成ペプチドを作りウサギに免疫をし、ポリクローン抗体を作成した。この抗体を用いて得られた蛋白がダイナミンであることを確認するために、Towbin ら (1979) の方法¹⁶⁾でウェスタンブロットを施行した。Laemmli (1970) の方法¹⁷⁾で、SDS-PAGE を行ったあとのアクリルアミドゲルを PVDF 膜にトランスファー (120mA 3時間) し、1次抗体にウサギに作らせた抗ダイナミン抗体・2次抗体に抗ウサギ IgG を反応させた。

3. ATPase 活性・GTPase 活性の測定

90 μl の試料 (B 液) に 10 μl の 10mM ATP (γ-³²P ATP) を氷上で加え 25℃ で反応を開始し、60分間放置後 10 μl 10% SDS を加えて反応を停止させた。遊離してきたリン酸は ³²P-ATP と区別するため、100 μl のリン酸試薬 (10NH₄SO₄ ; 10% モリブデン酸アンモニウム ; 0.1M けいタンゲステン酸 = 2 : 2 : 1) を加えてリンモリブデン酸複合体を形成させた。反応液に 1 ml のキシレン ; イソブタノール混合液 (65 : 35 v/v) を加え 20

～30秒振とう後、1000rpm 1分間遠心して有機層を500 μ l とり、液体シンチレーションカウンターで 32 P を測定した。GTPase 活性についても同様に測定した。Km の測定については、加える ATP・GTP の濃度を変えて同様の反応を10分間行い、遊離したリン酸を測定した。

4. ダイナミンと微小管の結合

100 μ g/ml のダイナミン300 μ l と20 μ M taxol にてあらかじめ37°C 30分間重合させた500 μ g/ml のチューブリンを30 μ l 加えて室温で10分間放置した。

5. ネガティブ染色

上記のダイナミンと微小管を室温で10分間おいた後に、1%酢酸ウラン（30秒間）でネガティブ染色を行い電顕にて観察した。

5. 急速凍結デーパーエッチング

ダイナミンと微小管とを *in vitro* で結合させ（上記条件）たものを100,000g 20°Cで30分間の遠心を行い、その沈澱を試料とした。アルミニウムディスクの上にクッションの役割を果たすホルマリン固定したラットの肺切片をのせ、そのうえに試料をのせる。試料上の余剰な水分はできるだけ吸い取っておく、表面を金属磨きで鏡面仕上げをした純銅ブロックを、急速凍結装置に装着し液体ヘリウムで急冷する。銅ブロックの温度が平衡状態になった時点で、純銅ブロック表面に試料を圧着させ急速凍結させる。凍結試料を凍結破断装置（Balzers BAF 400）にセットし高真空下に超低温（-196°C）で凍結割断し、その後-95°Cにまで温度を上昇させ7分間エッチングを行う。試料を回転（2～3回/秒）させながら白金と炭素で蒸着させレプリカを作る。試料をクロム硫酸に一晩浸し肺や試料を溶かし、レプリカのみにして100メッシュのグリッドに拾い、透過型電顕（JEOL 1200 EX）にて観察した¹⁸⁾¹⁹⁾。

結 果

1. ダイナミン精製

ラット20匹の脳から得られる粗抽出液（S₁）

は約18ml とれ、DE-52の通り抜け分画（S₁'；図1-A lane 1）20ml を得ることができる。表-1に精製の各段階における蛋白濃度・ダイナミン濃度

図-1 ダイナミン精製過程における SDS ポリアクリルアミド電気泳動

(A)；粗抽出液～S₂'分画。lane 1：通り抜け分画。lane 2, 3：通り抜け分画にチューブリンを加え遠心後の上澄み (2), 沈澱 (3)。lane 4, 5：AMP-PNP, GTP 使用によるステップの上澄み (4), 沈澱 (5)。lane 6, 7：GTP 使用によるステップの上澄み (6), 沈澱 (7)。lane 8-11：lane 6 を DE-52にかけ、集められた分画

(B)；5%～20%ショ糖密度勾配遠心法の各分画。
濃縮ゲル：4%，展開ゲル：7.5%

表-1 ダイナミン精製各過程における蛋白濃度

過程	容量(ml)	蛋白濃度(mg/ml)	総蛋白量(mg)	%ダイナミン
S ₁	18	8.62	155.15	3.4
S ₁ '	20	4.03	88.66	7.4
S ₂	0.8	2.2	1.76	44.8
S ₂ '	1.5	1.01	1.51	56.1
SDGC	2.4	0.20	0.48	97.6

SDGC：ショ糖密度勾配遠心分画

を示した。また図-1では各段階の SDS-ポリアクリルアミド電気泳動を示した。陰イオン交換カラムである DE-52を通すことによって高分子 MAPs を含む大部分の蛋白が除去され、すでにダイナミンのバンドが同定される (図-1-A lane 1 矢印)。集められた通り抜け分画は、チューブリンも DE-52 に吸着し内在性のチューブリンが欠如している。そのため、外から taxol で重合させたブタ脳のチューブリンを通り抜け分画に加え、ダイナミンと結合させ沈澱を形成させた。

この時点で100kDのダイナミンは、チューブリンと共沈する蛋白の中で最も多いものとなっている (図-1-A lane 3)。この沈澱からダイナミンを

5 mM AMP-PNP・2.5 mM GTP を用い懸濁させ遠心後、得られた沈澱を10 mM GTP にて抽出した (この2回のステップ中でのそれぞれの上澄みと沈澱の電気泳動が、図-1-A lane 4, 5, 6, 7 に相当する)。抽出された S_2 (図-1-A lane 6) からあとで加えたチューブリンを除くために、2回目の DE-52を通して S_2' を得た (図-1-A lane 9・図-1-B lane 1)。 S_2' の時点で総蛋白量のほぼ56%にまでダイナミンが精製された。しかし、少量混在する120kD キネシン・70kD 蛋白・48kD 蛋白を除き、より高い純度のダイナミンを得るために S_2' を次のステップである5%~20%ショ糖密度勾配遠心にかけた。その各分画の SDS-PAGE

図-2 : ダイナミンの同定

(A) ; 抗ダイナミン抗体によるウェスタンブロッティング, lane; a, b, e = S_1' , lane; c, d, f = 精製ダイナミン,

CBB 染色 = lane a, c,

1次抗体に抗ダイナミン抗体を使用 = lane b, d,

1次抗体に抗ウサギ IgG を使用 = lane e, f,

(B) ; ネガティブ染色によるダイナミンと微小管との結合

Bar : 100nm

が図-1-Bであり、ここで97.6%の高い純度のダイナミンを得ることができた(図-1-B lane 6). 表-1に示したとおり、20gのラット脳より0.4 μ g のダイナミンを分離精製することができた。

2. ダイナミンの同定

1) イムノブロッティング

今回精製したダイナミンが、Shpetner (1989)らの報告したダイナミンと同一のものであることを示すため、われわれの作成したウサギ抗ダイナミン抗体をもちいてウェスタンブロッティングを行った。この抗体は、われわれや Obar らの報告したダイナミンのアミノ酸配列をもとに合成ペプチドに対する抗体で、脳の粗抽出液中で特異的にダイナミンを検出することをすでに確かめてある¹⁰⁾。図-2-Aに示すように、得られた蛋白は抗ダイナミン抗体にてはっきりと染色された。

2) ダイナミンによる微小管の束化 (bundling) の電顕的観察

ダイナミンが微小管の束化をする能力をもつかを、ネガティブ染色法を用いて電顕的に観察した(図-2-B-1,2)。図-2-B-1には、ダイナミンを加えていない微小管のみのネガティブ染色を示した。ダイナミンを微小管に加えると微小管は著明な束を形成し、ダイナミンは非常に規則正しくチューブリンに結合し(間隔11nm)、微小管の周囲をきれいに取り囲んでいる様子が観察された。微小管と微小管との距離は12nmであった。

3) ATP-ase 活性・GTP-ase 活性の測定

ダイナミンの最大の特長のひとつでもある ATPase 活性・GTPase 活性についても検討を行った。その結果を表-2に示す。微小管が存在しない状態での ATPase 活性・GTPase 活性は、それぞれ 5.3 ± 1.5 n moles/min/mg, 1.6 ± 0.8 n moles/min/mg である。一方、微小管が存在する状態ではそれぞれ 20.6 ± 4.5 n moles/min/mg・ 275.5 ± 53.5 n moles/min/mg となった。微小管存在下で ATPase 活性は約4倍に、GTPase 活性は約170倍に促進された。

以上の結果より、今回精製した100kD 蛋白はヌクレオチド依存性に微小管を束化する能力をもち、

表-2 ダイナミンの ATPase 活性・GTPase 活性の比較

	ATPase活性	GTPase活性
微小管(-)	5.3 ± 1.5	1.6 ± 0.8
微小管(+)	20.6 ± 4.5	275.5 ± 53.5

(n moles/min/mg)

ダイナミンの部分アミノ酸配列に対する抗体と反応することから、ラット脳ダイナミンであることが同定された。さらにこの方法で精製したダイナミンは、微小管の存在下にて強く活性化される GTPase 活性・ATPase 活性を保持することが分かった。

3. ダイナミンの性質の検討

1) Km 値

実験方法で述べたような³²P の測定系を用いて、基質として加える ATP・GTP の濃度を変えて10分間の反応時間でデータをとった。図-3-A に ATPase 活性、図-3-C に GTPase 活性を示し、各々の逆数をプロットし(図-3-B,D,) Km 値をグラフ上より求めた。ATPase・GTPase の Km 値はそれぞれ $1.0 \cdot 0.07$ となった。

2) 微小管との結合

ネガティブ染色において、確認した微小管とダイナミンとの結合の様式を更に詳しく観察するために、急速凍結デープエッチング法にて試料を観察した(図-4-A,B)。図-4-A はチューブリンのみの急速凍結像、図-4-B にはダイナミンとチューブリンを結合させた急速凍結像を示す。ダイナミンは微小管に対して規則正しくネガティブ染色と対応する約11nmの間隔をもって結合している。微小管に対して縄を巻いたように螺旋状に装飾しているように観察された。

図-3 ダイナミンの ATPase 活性と GTPase 活性

図-4 急速凍結ディープエッチング法によるダイナミンと微小管との結合 Bar : 100nm

考 察

1989年 Shpetner によって初めて報告されたダイナミンは ATPase 活性をもち、今まで知られている MAP1C・キネシンなどととも、第3のモーター蛋白として注目を集めた。彼らは仔牛の脳を材料として精製しているが、日本ではなかなか材料を良い条件で実験に用いることが難しい。また、大量の taxol を必要としなければならないという欠点があった。さらに収量も少なかった。著者はラットの脳を用い、しかも今までと全く違う方法で効率良く、大量にダイナミンを精製することに成功した。この方法で得られた100kD 蛋白は、既にクローニングされたダイナミンの部分アミノ酸配列をもとにして、われわれが生成した抗ダイナミン抗体に特異的に反応し、*in vitro*での微小管束化能力を有していることより、Shpetnerらの発見したダイナミンそのものであることを確認した。

この方法は、従来の方法に比べて以下の点で優れている。① taxol を殆ど使わない。②大量のダイナミンが非常に簡単に効率的に取れる。③ Shpetner (1989) や Scaife (1990) ら²⁰⁾の方法よりも簡単で、しかも少ない taxol 使用量でよい。④大量に取れてくるために、さらなる精製を用いて微量に混在している他の蛋白をほとんど除くことができた。⑤精製の過程においてダイナミンの生物活性を損わない。ダイナミンは微小管の存在によって促進される ATPase 活性をもっていることが言われている。ATPase 活性は微小管の存在により4倍に促進された。しかし、その1次構造から GTP 結合蛋白のコンセンサスシーケンスをもっていることが分かり、GTPase 活性をもつ可能性が示唆されていた。そこで GTPase 活性を測定した。微小管の存在により GTPase 活性は170倍に促進された。その Km 値は ATP の場合に比べて1/14倍と小さく、生体内の ATP と GTP の存在の割合を考慮 (ATP : GTP = 10 : 1) してみても、ATP より GTP のほうがより良い基質となっていることが分かった。このことは、ダイナ

ミンが GTPase としての性質をもっていることを蛋白レベルで初めて明らかにした。GTP 結合蛋白としても、このように微小管の存在下で強く活性化されるものはこれまでに報告がなく、極めて注目に値する。さらにこの GTP 結合蛋白としての性質や特徴を、詳しく調べるために現在実験を行っている。

ダイナミンは微小管と結合し束化を促すが、これまでネガティブ染色や通常の超薄切片法により、クロスブリッジ様の構造をダイナミンがとると思われてきた⁸⁾。今回、分子や分子間の結合の3次元構築を見るのに現在最も適した方法である¹⁸⁾¹⁹⁾急速凍結ディープエッチング法を用いて、ダイナミンと微小管との結合の様子をより詳細に観察した。その結果、*in vitro*においてダイナミンは、微小管に対し縄目状に規則的かつ密に結合し、これまでの方法から考えられていたクロスブリッジ様のダイナミンの構造の予想が全く違っていたことが明らかになった。今後、ダイナミンの微小管への結合様式について、他の MAPs との相互作用や結合部位の同定などの検討が必要であり、現在その解明のために実験を継続している。また、ダイナミンの単分子の形態をも併せて観察を試みている。

ダイナミンは全く新しいG蛋白であり、その機能の解明が期待される。今回著者の開発した新しい精製方法により大量のダイナミンが高純度でとれ、今後のこの分野の研究に大きく貢献すると考える。

結 語

1. ラット脳より新しい方法を用いてダイナミンを効率良く極めて高い純度で取することに成功した。
2. 得られたダイナミンは、今まで報告されていたダイナミンの抗体と特異的に反応し、同一のものと思われた。
3. 得られたダイナミンは、*in vitro*で微小管を束化させる能力をもっている。
4. 得られたダイナミンは、微小管存在下で促進

されるATPase活性・GTPase活性をもっている。

5. GTP のほうが ATP よりダイナミンにとってより良い基質であり、クローニングより得られた GTP 結合蛋白にみられるコンセンサスシーケンスを保有する事実と一致し、生体内では GTPase として働いていると考えられる。

6. ダイナミンは微小管にたいして表面を装飾するように縄状に結合している。

稿を終えるにあたり、ご懇篤なご指導を賜った廣川信隆東京大学医学部解剖学教授、中田隆夫同助手、およびご校閲を頂いた小出輝順天堂大学腎臓内科教授に深く感謝すると共に、教室の諸兄に心からお礼申し上げます。

文 献

- 1) Hirokawa, N.: Molecular architecture and dynamics of the neuronal cytoskeleton. In the Neuronal Cytoskeleton. Weilly-Liss Inc., 5~74, 1991
- 2) Hirokawa, N., Bloom, G.S., Vallee, R.B.: Cytoskeletal architecture and immunocytochemical localization of microtubule-associated proteins in regions of axons associated with rapid axonal transport. J. Cell. Biol., **101**: 227~239, 1985
- 3) Sato, Y.R., Hirokawa, N.: Microtubule-associated protein 1B: Molecular structure, localization and phosphorylation-dependent expression in developing neurons. Neuron, **3**: 229~238, 1989
- 4) Hirokawa, N., Shiomura, Y.: Tau proteins: The molecular structure and mode of binding on microtubules. J. Cell. Biol., **107**: 1449~1461, 1988
- 5) Binder, L.I., Frankfurter, A., Rebhum, L.I.: The distribution of Tau in the mammalian central nervous system. J. Cell. Biol. **101**: 1371~1378, 1985
- 6) Vale, R.D., Reese, T.S., Sheetz, M.P.: Identification of a novel force-generating protein, kinesin, involved in microtubule-based motility. Cell, **42**: 39~50, 1985
- 7) Paschal, B.M., Shpetner, H.S., Vallee, R.B.: MAPIC is a microtubule-activated ATPase which translocates microtubules *in vitro* and has dynein-like properties. J. Cell. Biol. **105**: 1273~1282, 1987
- 8) Shpetner, H.S., Vallee, R.B.: Identification of Dynamin, a novel mechanochemical enzyme that mediates interactions between microtubules. Cell, **59**: 421~432, 1989
- 9) Obar, R.A., Colloins, C.A., Hammarback, J.A., Shpetner, H.S., Vallee, R.B.: Molecular cloning of the microtubule-associated mechanochemical enzyme dynamin reveals homology with a new family of GTP-binding proteins. Nature, **347**: 256~261, 1990
- 10) Nakata, T., Iwamoto, A., Noda, Y., Take-mura, R., Yoshikura, H., Hirokawa, N.: Predominant and developmentally regulated expression of dynamin in neurons. Neuron, **7**: 1~20, 1991
- 11) Arnheiter, H., Skuntz, S., Noteborn, M., Chang, S., Meier, E.: Transgenic mice with intracellular immunity to influenza virus. Cell, **62**: 51~61, 1990
- 12) Rothman, J.H., Raymond, C.K., Gilbert, T., O'hara, P.J., Stevens, H.T.: A putative GTP binding proteins an essential function in the yeast protein sorting. Cell, **61**: 1063~1074, 1990
- 13) Yeh, E., Driscoll, R., Coltera, M., Olins, A., Bloom, K.: A dynamin-like protein encoded by the yeast sporulation gene SPO15. Nature, **349**: 713~715, 1991
- 14) van der Bliek, A.H., Meyerowitz, E.M.: Dynamin-like protein encoded by Drosophila Shbire gene associated with vesicular traffic. Nature, **351**: 411~414, 1991
- 15) Chen, M.S., Obar, R.A., Schroeder, C.C., Austin, T.W., Poodry, C.A., Wwamds-worth, S.C., Vallee, R.B.: Multiple forms of dynamin are encoded by shbire, a Drosophila gene involved in endocytosis. Nature, **351**: 583~586, 1991
- 16) Towbin, H., Staehelin, H., Gordon, J.: Electrophoretic transfer of proteins from polyacryla-

- mid gels to nitrocellulose sheets procedure and some application. *Proc. Acad. Sci. USA.*, **76**: 4350~4354, 1979
- 17) Laemmli, U.K.: Cleavage of structural proteins during assembly the head of bacteriophage T₄. *Nature.*, **227**: 680~685, 1970
- 18) Heuser, J.E., Sallpeter, S.R.: Organization of acetylcholine receptors in quick-frozen deep-etched, and rotary replicated Torpedo postsynaptic membrane. *J. Cell. Biol.*, **82**: 150~173, 1979
- 19) Hirokawa, N., Heuser, J.E.: Quick-freeze, deep-etch visualization of the cytoskeleton beneath surface differentiation of epithelial cells. *J. Cell. Biol.*, **91**: 339~409, 1981
- 20) Scaife, R., Margolis, R.L.: Biochemical and immunochemical analysis of rat brain dynamin interaction with microtubules and organelles in vivo and in vitro. *J. Cell. Biol.*, **111**: 3023~3033, 1990

Original paper

Summary

The New methods of purification of the rat brain dynamin and its biochemical and ultrastructural analyse of the interaction with microtubules

Dynamin was discovered in calf brain tissue as a nucleotide-sensitive microtubule-binding protein with a molecular mass of 100,000. Cross-linked microtubules into bundles and generated force to slide microtubules in vitro. Therefore, it was thought to be a third mechanochemical enzyme, following MAP 1C and kinesin. Cloning and sequencing of rat brain dynamin complementary DNA revealed that it contained the consensus sequences of GTP-binding proteins.

Studies on dynamin have been difficult because only a small amount of dynamin could be obtained from the brain. I developed a new purification method of dynamin using a small amount of rat brain tissue. It was a highly efficient and very simple procedure, and enabled a further purification step to obtain pure dynamin. I measured both ATPase and GTPase activities. In the presence of microtubules, ATPase activity was activated 4 times that in their absence (K_m 1.0). GTPase activity was activated 170 times (K_m 0.07). This suggests that dynamin plays a greater role as GTPase in vivo than as ATPase. The binding manner of Dynamin to microtubules using a quick-freeze deep-etching technique, revealed that dynamin tightly binds to microtubules and decorates the surface of microtubule helically.

KUNIMI MAEDA, M. D.

*Division of Nephrology, Department of Internal Medicine,
Juntendo University School of Medicine, Tokyo, Japan*