薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
101 (9) 848-851 (1981)

ミオシンとチューブリンの相互作用における ATP の影響

大木幸介,* 熊坂実千代, 近藤慶之, 藤井敏弘

信州大学繊維学部機能高分子学科

Effects of ATP on the Interaction of Myosin with Tubulin

KOSUKE OHKI,* MICHIO KUMASAKA, YOSHIYUKI KONDO, and TOSHIHIRO FUJII

Department of Functional Polymer Science, Faculty of Textile Science
and Technology, Shinshu University, Ueda 386, Japan

(Received February 26, 1981)

In regard to the interaction between myosin and tubulin, it has become apparent that ATP reduced the binding amount of tubulin to myosin when myosin was preincubated with ATP as reported by Hayashi *et al.*¹⁾ The effect of this decrease on both the turbidity change of actomyosin by ATP and actin-activated myosin Mg-ATPase activity was investigated by the addition of ATP; These inhibitions caused by tubulin were smaller in the case of preincubation of myosin with ATP than that with tubulin. Tubulin inhibited the actin-activated myosin Mg-ATPase activity when myosin, actin, and ATP were mixed after the incubation. Actin provided a better protection than ATP against the inhibition by tubulin. The addition of actin and ATP after myosin was bound to tubulin resulted in no change in either inhibition level. These results suggest that ATP has an important role in the interaction between myosin and tubulin.

Keywords—myosin; actomyosin; tubulin; interaction; ATP

緒 言

細胞骨格タンパクのアクトミオシンと微小管は細胞分裂, 軸索輸送, 分泌, 膜タンパクの可動性等多くの機能に関係している。これらの複雑な機能を果たすために主成分のアクチン, ミオシン, チューブリン以外に多くの調節タンパク, 結合タンパクが知られつつある。²⁻⁴⁾ 微小管とアクトミオシンが直接結合する可能性が蛍光抗体法を使用して Fujiwara and Pollard により示唆された。⁵⁾ またモデル実験として, 脳微小管タンパクとウサギ骨格筋アクトミオシンを使用しいくつかの研究が行なわれており, 脳微小管付随タンパクが骨格筋アクチンと結合することが Griffith and Pollard によって示されている。⁶⁾ さらに, Fujii and Tanaka はミオシンとチューブリン間にも相互作用があり, チューブリンがアクトミオシン Mg-ATPase 活性とそれに伴う濁度変化を阻害することをみだし,⁷⁾ またミオシンが微小管を脱重合させることが Hayashi により報告された。⁸⁾

ヌクレオチドは GTP として微小管重合に,⁹⁾ また, ATP としてアクトミオシンのエネルギー源に重要な役割をもっている。今回, 我々は ATP がチューブリン存在下でのアクトミオシンに与える影響について実験した。

実 験 の 部

試料溶液の調製 微小管はラット (Wistar 系, 雄) 脳から Shelanski らの方法⁹⁾ を少し変えて, 重合-脱重合を 2 回繰り返して調製した。チューブリンは前報⁷⁾ に従って微小管から Phosphocellulose (Whatman P II) カラムクロマトグラフィーにより精製し,⁷⁾ 100 mM 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid (MES)-KOH (pH 6.5), 25% グリセリンに透析後, -80°C で保存した。

ミオシンはウサギの骨格筋から Perry の方法¹⁰⁾ により, アクチン (F-アクチン) は Spudich and Watt の方法¹¹⁾ により調製した。ミオシンの分子量は 470000 として計算,¹²⁾ タンパク量は Lowry らの方法¹³⁾ に従って求めた。

ATPase 活性の測定 反応溶液 (0.4 ml) は 50 mM MES-KOH (pH 6.5), 2 mM Mg (CH₃COO)₂, 5% グリセリンを含み, ミオシン 40 μg, アクチン 20 μg, チューブリン 40 μg を加えたものに 20 mM ATP 0.04 ml を加えて反応を始めた。反応は 37°C で 3—5 分間行ない, 20% トリクロロ酢酸溶液 0.4 ml を加えることにより終

結させ、酸可溶性画分の無機リンを Martin and Doty の方法で測定した。¹⁴⁾

濁度の測定 濁度の測定は 350 nm における吸光度の変化を日本分光 UVIDEC-410 型分光光度計を用いて前報の方法で測定した。⁷⁾

結合量の測定 ミオシンとチューブリンとの結合はミオシンが低イオン強度下で不溶性になり、チューブリンは不溶性にならないので、その性質を利用して測定した。反応溶液組成は ATP ase 活性測定と同じで、2200×g 20 分遠心後、沈査のタンパク組成を Sodium dodecyl sulfate-電気泳動により¹⁵⁾ 分析した。

結 果 と 考 察

ATP はチューブリンとミオシン間の結合に影響を与えないと報告されている。⁷⁾ ミオシンとチューブリンをインキュベートしてから、ATP を加えた場合のチューブリンのミオシンへの結合量は、ATP を加えないときに等しい (Fig. 1a, b). しかし、Fig. 1c に示すようにミオシンと ATP をあらかじめインキュベートしておくと、チューブリン (tubulin) のミオシン (heavy chain) への結合量は減少する。このことは Hayashi などの報告¹⁾ と一致している。また、微小管付随タンパクとアクチンの結合も ATP のようなヌクレオチドで阻害されるから、⁶⁾ スクレオチドは微小管とアクチンミオシン間の結合に重要な役割を演じると考えられる。

ミオシンとチューブリンの結合は ATP による濁度変化 (超沈殿) とアクチンミオシン Mg-ATP ase 活性に関係している。⁷⁾ このため ATP を加える順番が、これらの活性にどのように影響を与えるかを調べた。アクチンミオシンの ATP による濁度上昇はチューブリンにより阻害され、ミオシン、アクチン、チューブリン、ATP の加える順番により阻害の程度は変化した。ミオシンとチューブリンをインキュベート後にアクチン、ATP を加えた時、最大阻害を示し吸光度の上昇は少なかった (Fig. 2b). すでに報告しているが、⁷⁾ ミオシンとアクチンをインキュベート後にチューブリン、ATP を加えるとチューブリンによる濁度上昇阻害は弱められた (Fig. 2c). 一方、ミオシンと ATP をあらかじめインキュベートした後にアクチン、ATP を加えても同様な効果があった (Fig. 2d). しかしこの時の効果は Fig. 2c と比べて弱かった。

以上のべた結合量の変化が、アクチンミオシン Mg-ATP ase 活性へ与える影響を Table I に示す。この場合、ミオシンとチューブリンをあらかじめインキュベートしておくと、ATP 分解活性を 72% 阻害し、それが、ミオシンと ATP 混合後、チューブリンを加えた場合、58% に減少した。なお、ミオシン-アクチン-ATP 混合後、すなわち超沈殿が起こっているときでも、チューブリンは ATP ase を 34% 阻害している。これら ATP ase 活性阻害は前にのべた濁度上昇阻害へのチューブリンの影響と同じ傾向を示している。

ミオシンのチューブリンへの結合がミオシンとアクチンの結合量に密接な関係があることを前の論文で報告した。⁷⁾ 今回の報告では ATP の添加がミオシンとチューブリンの結合量を変化させることを示した。このことは、2つの可能性がある。そのひとつは ATP のミオシンへの結合部位に直接チューブリンが結合することである。い

Fig. 1. Densitometry of Polyacrylamide Gel Electrophoresis in the Presence of Sodium Dodecylsulfate of Precipitates obtained after Mixing in Various Orders

(a), Gel pattern of the precipitate after mixing of myosin with tubulin; (b), the pattern of the precipitate when ATP was added after preincubation of myosin and tubulin; (c), the pattern of the precipitate obtained by tubulin after preincubation of myosin and ATP.

Fig. 2. Effects on Turbidity Change of Mixing Order of Myosin, Actin, Tubulin, and ATP

TABLE I. Effects of Addition Order on ATPase Activity of Mixture Comprising Myosin, Actin, Tubulin, and ATP

Combination	ATPase activity (%)
(Myosin+Actin) ^{b)} +ATP	100 ^{a)}
[(Myosin+Actin)+ATP] ^{c)} +Tubulin	66
[(Myosin+ATP)+Actin]+Tubulin	66
[(Myosin+Actin)+Tubulin]+ATP	62
[(Myosin+ATP)+Tubulin]+Actin	42
[(Myosin+Tubulin)+ATP]+Actin	28
[(Myosin+Tubulin)+Actin]+ATP	28

The ATPase activity was calculated as the reaction was started by addition of the last substrate.

a) The activity of actomyosin ATPase was 130–200 mol Pi/min/mol of myosin in the absence of the added proteins and set as 100%.

b,c) Parentheses and brackets indicated that the materials enclosed were preincubated together before the addition of the remainders.

ま一つはミオシンとチュブリンまたはアクチンをあらかじめインキュベートしたため、ミオシンにコンホメーション変化が起こり、アクチンまたはチュブリンのミオシンへの結合に変化を与えたということである。濁度上昇と ATPase の阻害がどちらの原因で起こっているか、現在まだわかっていない。なお、電子顕微鏡によって、チュブリンがミオシン線維を会合させることが観察されており、¹⁾ 今後、高分解能の観察が行なわれれば、以上の結合様式も判明するであろう。

今後はアクトミオシンとチュブリンを主成分とした微小管タンパク間の相互作用が、同一細胞内で起こるかどうかが検討が必要であろう。近年、アクトミオシン様タンパクが多くの非筋肉細胞において見出されている。^{16,17)} 中でも脳の場合、アクトミオシン様タンパクが骨格筋アクトミオシンと類似しており、^{18,19)} しかも、シナプスにおける神経伝達などに関係している。¹⁹⁻²²⁾ 一方、チュブリンもこの部位に同定されており、^{21,22)} これら両者の相互作用が、神経伝達において重要な機能を果たすことが期待される。

引用文献および注

- 1) M. Hayashi, K. Ohnishi, K. Hayashi, *J. Biochem.*, **87**, 1347 (1980).
- 2) J.B. Olmsted, G.G. Borisy, *Ann. Rev. Biochem.*, **42**, 507 (1973).
- 3) M. Clarke, J.A. Spudich, *Ann. Rev. Biochem.*, **46**, 797 (1977).
- 4) K. Fujiwara, T.D. Pollard, *J. Cell. Biol.*, **71**, 848 (1976).
- 5) K. Fujiwara, T.D. Pollard, *J. Cell. Biol.*, **77**, 182 (1978).
- 6) L.M. Griffith, T.D. Pollard, *J. Cell. Biol.*, **78**, 958 (1978).
- 7) T. Fujii, R. Tanaka, *Life. Sci.*, **24**, 1683 (1979).
- 8) M. Hayashi, *J. Biochem.*, **85**, 691 (1979).
- 9) M.L. Shelanski, F. Gaskin, C.R. Cantor, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **70**, 765 (1973).
- 10) S. Perry, "Methods in Enzymology," Vol. 2, ed. by S.P. Colowick and N.O. Kaplan, Academic Press, Inc., New York, 1955, pp. 582—588.
- 11) J.A. Spudich, S. Watt, *J. Biol. Chem.*, **246**, 4866 (1971).
- 12) P. Dreizen, L.C. Gershman, P.P. Trotta, A. Stracher, *J. Gen. Physiol.*, **50**, 85 (1967).
- 13) O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951).
- 14) J.B. Martin, D.M. Doty, *Anal. Chem.*, **21**, 965 (1949).
- 15) K. Weber, M. Osborn, *J. Biol. Chem.*, **244**, 4406 (1969).
- 16) T.D. Pollard, R.R. Weihing, *CRC Crit. Rev. Biochem.*, **2**, 1 (1974).
- 17) E.D. Korn, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **75**, 588 (1978).
- 18) S. Puszkin, S. Berl, *Biochim. Biophys. Acta.*, **256**, 695 (1972).
- 19) S. Puszkin, S. Kochwa, *J. Biol. Chem.*, **249**, 7711 (1974).
- 20) S. Berl, S. Puszkin, W.J. Nicklas, *Science*, **179**, 441 (1973).
- 21) A.L. Blitz, R.E. Fine, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **71**, 4472 (1974).
- 22) P.T. Kelly, C.W. Cotman, *J. Cell. Biol.*, **79**, 173 (1978).