

〔総 説〕

細胞運動におけるチューブリン・ダイニン系 I

Tubulin-dynein System in Cell Motility I

毛 利 秀 雄

HIDEO MOHRI

153 目黒区 東京大学教養学部生物学教室

1976年1月30日受領

細胞運動は生物が生きていることの‘あかし’の1つであり、古くから多くの研究者たちの興味をひきつけてきた。中でも筋肉の収縮運動はその代表格で、今日ではその機構が分子レベルで可成りの程度まで解明されている。その教えるところによれば、筋収縮は、少くとも横紋筋では、主にアクチンよりなる thin filament とミオシンよりなる thick filament との間の滑り合いが基本になっており、さらにトロポミオシンやトロポニンなどが調節作用を営んでいる。最近になってこのようなアクチン・ミオシン系の存在が筋肉以外の細胞でも次々に明らかにされ、原形質流動、細胞分裂（特に細胞質分裂）、神経伝導、細胞表面における各種レセプターの動きなどにおけるその関与が云々されるようになった。しかし一方において、細胞運動の中にはアクチン・ミオシン系によらないか、またはアクチン・ミオシン系と他の系との間の協同作用によるものがあるという証拠も得られるようになってきた。バクテリアの鞭毛がフラジリンよりなることは古くから知られているが、真核生物の鞭毛や繊毛の運動にはチューブリン・ダイニン系が主要な役割を演じていると考えられる。この系は細胞分裂における染色体の移動にも働いていると思われ、また神経の軸索流や色素細胞における色素果粒の移動、さらには分泌現象などにもその関与が推測されている。また最近の研究によると、ツリガネムシの柄の収縮に与っているのはスパスミン (spasmin) と名付けられた Ca と反応する特殊なタンパク質であるという。これら以外にも細胞運動に関与する系が、特に下等な動植物にまだ存在しているかも知れない。本稿ではこれらの中でチューブリン・ダイニン系を取り上げ、その果す役割について鞭毛・繊毛運動を中心に述べてみたい。

I. チューブリン

まず最初にこの系を構成する二つのタンパク質、チューブリンとダイニンの物理化学的諸性質について述べることにする。チューブリンは真核生物の細胞にきわめて普遍的に存在している微小管 (microtubule) を構成するタンパク質であり (Mohri, 1968), 一方ダイニンは鞭毛や繊毛の主要な ATPase タンパク質として最初に記載された (Gibbons, 1963)。

1. 微小管の微細構造

微小管は直径 24 ± 2 nm の中空の管で、長さは中心粒におけるように $0.5 \mu\text{m}$ 以下から、ある種の精子の鞭毛やクシクラゲのくし板の複合繊毛におけるように mm のオーダーにまでおよんでいる。Ledbetter and Porter (1964) は、微小管は横断面で見ると直径 5 nm の基本単位（つまりチューブリン分子）が 13 個集ってその壁を形作っていることを観察した。見方を変えていえば、微小管は直径 5 nm の 13 本の protofilament よりなるともいえる。この数についてはその後も 11~13 本と色々のことが云われたが、Mizuhira (Mizuhira and Futaesaku, 1971; Futaesaku *et al.*, 1972) による新しい固定法（タンニン酸とグルタルアルデヒドを用いる）の導入により、やはり 13 本であることが確かめられた (Tilney *et al.*, 1973; Mizuhira and Futaesaku, 1974)。しかし同じ固定法により、12 本または 15 本の protofilament よりなる微小管も確かに存在することが観察されている (Nagano and Suzuki, 1975; Burton *et al.*, 1975)。

ここで話の都合上、鞭毛や繊毛の微細構造についてふれておきたい。図 1 は鞭毛や繊毛の横断面の模式図である。まず中心の 2 本の微小管（以下随時中心対または中心小管と呼ぶ）とこれを囲む周辺の 9

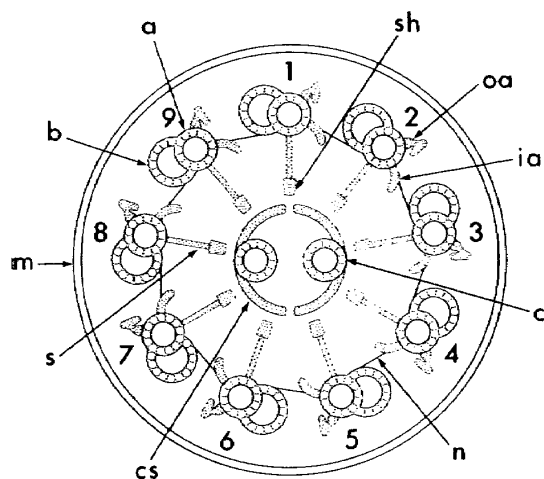


図 1. 鞭・纖毛の横断面の模式図

a. A小管 b. B小管 c. 中心小管 cs. 中心軸
ia. 腕 (内側) oa. 腕 (外側) m. 膜
n. ネクシン s. スポーク sh. スポーク・ヘッド

対の微小管 (以下 doublet 微小管と呼ぶ) がいわゆる “9+2” 構造を形成している。Doublet 微小管の一方からは一対の腕と呼ばれる突起が出ているが、この腕のついている方をA小管、ついていない方をB小管という。腕は後述するようにダイニンよりなる。腕は一方方向にのみ出ているので、これと中心および doublet 微小管の位置関係から、図のように doublet 微小管に1から9まで番号をつけることができる。各 doublet 微小管はネクシン (nexin または inter-doublet link) と呼ばれる構造で結ばれており、また各A小管からは中心対に向けてスポークと呼ばれる突起が出ている。スポークの求心端には鞭・纖毛の長軸方向に沿った桿状の付属物があり、従って一本のスポークは丁度ハンマーのような形に見える。中心対の微小管は中心軸によって囲まれているが、この中心軸は図に示したようにむしろ各中心小管の両側に突き出た多数の突起からなっているようである。これらの構造を一括して axoneme と呼び (本来は 9+2 微小管群のみを指したと思われる)、全体が細胞膜 (鞭・纖毛膜) で包まれている。

話を元に戻して、従来から中心小管およびA小管は他の多くの微小管同様13本の protofilament よりなる完全な管であるが、B小管の方は10本よりなる不完全な管で、A小管の壁の中の3本を共有していると考えられてきた (Ringó, 1967)。しかし上記の新固定法を用いた観察によると、B小管はどうも

11本の protofilament よりなりたっているらしい (Tilney *et al.*, 1973; Mizuhira and Futaesaku, 1974)。中心粒の場合には、中心対が無い代りに、周辺の微小管が triplet になっており、A, B両小管にさらにC小管が加わっているが、このC小管も同様に11本よりなっている。

さて微小管を側面から見ると、各 protofilament は長軸方向で 4 nm、短軸方向で 5 nm のチューブリン分子 (分子量 5~6 万) が縦に連なったものである。光回折による解析結果でも 4×5 nm の表面格子が認められており (Grimstone and Klug, 1966; Chasey, 1972; Erickson, 1974)、またX線回折でもそのような大きさの周期性が得られている (Forslind *et al.*, 1968; Cohen *et al.*, 1971, 1975; Yamaguchi *et al.*, 1972)。しかし隣り合った protofilament 上のチューブリン分子の間にはずれが見られ、微小管は protofilament が縦に並んでその壁を形作っているというよりは、チューブリン分子がらせん状に配列したものと考えられる (もっとも両方の配列の仕方があって条件次第で変化するという観察もある。たとえば Thomas, 1970)。この辺は微小管の再構成、すなわちチューブリン分子の自己集合とも関連してまだ問題がある。らせんに関してもいくつかの説があり、チューブリンの単量体を基準にした場合に 6-start らせん (Stephens, 1974)、4-start らせん (Chasey, 1972) および 3-start らせん (Amos and Klug, 1974; Erickson, 1974) が考えられている。これらのらせんの展開図 (図 2) における傾斜度はそれぞれ20度以上、13—14度および10度となる。筆者らがウニ精子鞭毛の doublet 微小管の光回折像からえた結果は10数度であった。なおこのらせんは左巻きである (Erickson, 1974; Chasey, 1974; Linck and Amos, 1974)。

ところでチューブリンの生理的な単位は後述するように二量体 (分子量約 11 万) で、 α および β チューブリンよりなるヘテロダイマーと考えられている (Bryan and Wilson, 1971)。実際電顕像やその光回折像では、微小管の長軸方向に沿ってしばしば 8 nm の周期が認められ (Grimstone and Klug, 1966; Thomas and Henley, 1971 など)、単量体が対をなしていることを示唆している。一方最近の高分解能電顕像や光回折像によると、4×5 nm の単位はさらに左右二つの単位に分れているように見える (Erickson, 1974; Warner and Meza, 1974)。つまり 8 nm のもの (二量体) を一単位と

考える場合には8の字型に見える。このような像は筆者らも観察しており(村上・長谷川・毛利, 未発表), ここにみられる最小単位(4×2.5 nm)は微小管をグアニジン塩酸などで長時間処理した時に得られる分子量約3万のもの(Mohri and Shimomura, 1973)に相当するのではないかと考えている。

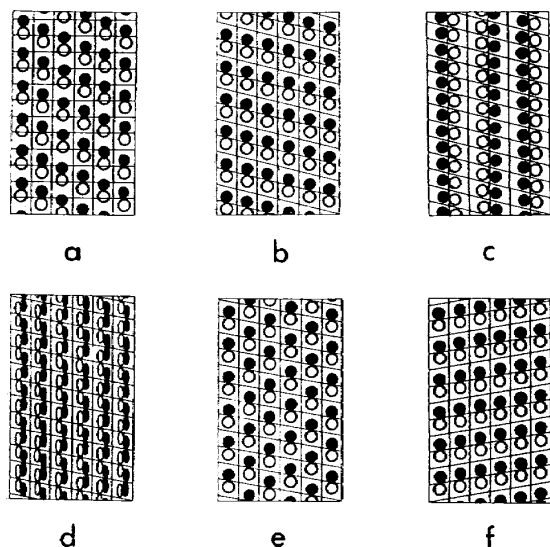


図2. 微小管におけるチューブリン二量体の配列様式(黒丸と白丸はそれぞれ α および β チューブリンを表わす)。

a. 6-startらせん(Stephens, 1974)。2 nmずつのずれを示すため特に直角で交わる格子が示してある。b. 4-startらせん(Chasey, 1972)。c. 対になった α および β protofilamentが交互に並んだもの(Witman *et al.*, 1972)。d. protofilamentがさらに2本のsubfilamentより成る場合に考えられる一つの配列様式(Erickson, 1974)。e. 3-startらせん(Erickson, 1974; Amos and Klug, 1974), 両チューブリンは前後-左右共交互に並んでいる。f. 3-startらせん(Amos and Klug, 1974), B小管を内側から見た場合で二量体が斜めに並んでいる。

微小管中で α および β チューブリンがどのような配列をとっているかについては、まだ定説は無い。8 nmの周期から、傾斜度の違いはともかく、 α , β が縦に交互に並んでいるとする考えや(Stephens, 1974), doublet微小管を順次溶かしていった場合のSDSゲル電気泳動パターンから各protofilamentが α または β チューブリンのみよりなる, いいかえれば α と β が横に並んで対をなしていることを示唆するような結果(Witman *et*

al., 1972), あるいは 4×5 nmの単位がさらに二つに分れる, すなわち各protofilamentが二本のsubfilamentより成るとする場合には, その各subfilamentが α または β のいずれかよりなるとする考え(Erickson, 1974)などが提出されている。Amos and Klug (1974)の解析によれば, doublet微小管の中のA小管では α と β が前後左右とも交互に配置されており, B小管では縦方向のみ交互に並んでいるという。これらについても図2を参照されたい。

2. チューブリンの物理化学的性質

a) α チューブリンと β チューブリン

チューブリンは水溶液中では約6Sの二量体として存在し, そのほとんどは $\alpha\beta$ のヘテロダイマーよりなると考えられている(Bryan and Wilson, 1971; Luduena *et al.*, 1974)。8M尿素や5Mグアニジン塩酸あるいはアルカリ処理では約3Sの単量体となり, また条件次第ではさらに分子量3万のものを生ずる(Shelanski and Taylor, 1968; Weisenberg *et al.*, 1968; Miki-Noumura and Mohri, 1972; Mohri and Shimomura, 1973)。Sakai (1966)はウニ卵の分裂装置より3.5S(分子量約6万9千)のCa不溶性タンパク質を分離し, これがジチオスレイトールなどにより2.5S(分子量約3万5千)のものになると報告しているが, これらとチューブリンの単量体, 半量体との関係は明らかでない。SDSゲル電気泳動により決められた α および β チューブリンの分子量は, それぞれ5万4千~5万9千と4万6千~5万4千である(Feit *et al.*, 1971b; Olmsted *et al.*, 1971; Raff and Kaumeyer, 1973; Sakai and Kuriyama, 1974; Ohtsubo *et al.*, 1975)。両者はアミノ酸組成を異にし(Luduena and Woodward, 1973), 前者の方が僅かばかり塩基性アミノ酸が多いようである。 β チューブリンに対する抗血清は α チューブリンとは反応しない(Piperno and Luck, 1975)。また後で述べるように, いくつかの酵素に対する態度にも両者の間で違いがみられる。

b) チューブリンの異質性

α および β の違いの他に, 異なる微小管を構成するチューブリンの間には僅かではあるが差が認められる。Behnke and Forer (1967)はガガンボの精細胞にみられるいろいろな微小管を熱やタンパク分解酵素などで処理し, その結果からA小管, B小管, 中心小管と付随小管および細胞質微小管の4群を区別した。このような物理化学的処理に対して

は、同一個体からえられた鞭毛と繊毛のB小管同士の間でも差がみられるし、また中心対の2本の間でさえも違いがみられ、これによってC₁小管とC₂小管を区別することができる(Linck, 1973)。免疫学的にも、たとえば doublet 微小管、中心小管、分裂装置の微小管などの間に明らかな差がみられる(Fulton *et al.*, 1971; Yanagisawa *et al.*, 1973)。さらに *Chlamydomonas* の doublet チューブリンの isoelectric focusing の結果では5本のバンドがえられている(Witman *et al.*, 1972)。A小管とB小管を構成するチューブリン間にはアミノ酸組成その他に差があるので(Stephens, 1970; Mohri and Shimomura, 1973)、これらの中の4本はそれぞれA, B小管の α および β チューブリンに相当するのかも知れない。しかし未成熟マウスの脳のチューブリンも isoelectric focusing で4本に分かれるという(Feit *et al.*, 1971b)。また最近ハイドロキシアパタイト・カラムにより、3種類のチューブリン、 α_1 , α_2 , β の分離が報ぜられている(Lu and Elzinga, 1975)。われわれの研究室で得られた結果でも鞭毛の doublet 微小管はカラムで α , β それぞれ2つずつのピークに分離するようである(小林, 未発表)。

このようなチューブリン間の差は何によるものであろうか。二枚貝の鰓の繊毛と精子の鞭毛の各微小管の α チューブリン同士または β チューブリン同士の間には、ペプチド・マップに差がみられ(Safer, 1973)、またニワトリ脳とウニ精子鞭毛の β チューブリンの比較では、N末端より25個のアミノ酸の中に1個のアミノ酸の違いが認められた(Luduena and Woodward, 1973)。しかしこのようなタンパク質部分の一次構造の違いのみでなく、これに結合している糖、脂質、ヌクレオチドまたはリン酸などが関係していることも十分考えられる。また微小管と細胞質中の他の構造との結びつきが、各微小管の安定性の違いをひき起しているのかも知れない。このようなチューブリン間の僅かな違いが各微小管の間の機能の違いに反映しているのであろうか。

c) チューブリンとアクチン

チューブリンはアクチンとはいろいろな点で異なっている。ウニ精子チューブリンと筋肉ミオシンとの反応では、低イオン強度でのATPによる超沈殿現象のみがみられ、低イオン強度でのミオシンMg-ATPaseの活性化や、高イオン強度でのATPによる粘度低下は認められない(Mohri *et al.*,

1967a; Mohri, 1968; Mohri and Shimomura, 1973; Mohri and Ogawa, 1975)。Tetrahymenaの繊毛のチューブリンはpH 6.5でミオシンのMg-ATPase活性を高めると報告されているが、しかしその程度は2倍ほどに過ぎない(Alicea and Renaud, 1975)。ヘビメロミオシンは微小管とは矢じり状構造を作らず(Ishikawa *et al.*, 1969)、反対にダイニンとF-アクチンとの結合は微小管との結合に比べて弱い(Mohri and Ogawa, 1975; Ogawa *et al.*, 1975)。また分子量もアクチンは4万5千程度でチューブリンよりも小さい(Sakakibara and Yagi, 1970; Mohri and Shimomura, 1973)。初期の研究ではむしろその類似性が強調されたアミノ酸組成においても両者は統計的に異なっており(Stephens and Linck, 1969; Stephens, 1970, 1971; Mohri and Shimomura, 1973)、したがって両者のペプチド・マップにも明らかな違いがみられる。さらにチューブリンとアクチンの間には免疫的な共通性も認められない(Fulton *et al.*, 1971; Yanagisawa *et al.*, 1973)。アクチンに結合しているヌクレオチドはATPかADPであるが、チューブリンにはGTPとGDPが結合している(毛利・柳沢, 1967; Yanagisawa *et al.*, 1968; Stephens *et al.*, 1967)。最後に細胞分裂の阻害剤の中、ビンブラスチンはチューブリンのみでなくアクチンをも沈殿させるが(Wilson *et al.*, 1970)、コルヒチンとチューブリンの結合はほぼ特異的といえよう(Borisov and Taylor, 1967a, b)。これらをまとめると表1のようになり、両者はおそらく共通の祖先を持つものであろうが、現在では互いに異なるタンパク質であると云える。

d) 結合ヌクレオチド

ウニのグリセリン処理精子でわれわれが測定したところでは微小管にはGTPとGDPがほぼ1:1に含まれていた(Yanagisawa *et al.*, 1968)。哺乳類精子におけるGTPとGDPの含量の比も矢張り1:1である(Brooks, 1970)。さらに最近の研究によれば、完成した微小管中では必ずGTPとGDPが1:1に含まれているという(Kobayashi, 1975)。Weisenberg *et al.* (1968)によれば、チューブリンには二量体当たり二個のヌクレオチド結合部位があり、その一つ(E-site)には外から加えたGTPと容易に交換するようなゆるく結合したグアノシン・ヌクレオチドが、他の一つ(N-site)には固く結合して交換不能なヌクレオチドがついている。さらに後述するようなGTPaseやGDPキナーゼの作

表 1. チューブリンとアクチンの比較

	チューブリン	アクチン
集合体の型態	微小管	繊維 (F-アクチン)
生理的単位	二量体 ($\alpha\beta$ ヘテロダイマー)	単量体 (G-アクチン)
分子量	5万~5万8千	4万3千~4万7千
結合スクレオチド	GDP, GTP	ADP, ATP
コルヒチン結合能	+	-
ビンブラスチンによる沈殿	+	+
ダイニンとの結合	+	±
ミオシンとの反応		
{ 超沈殿	+	+
{ Mg-ATPase の活性化	-または±	+
{ ATP による粘度低下	-	+

用も加わって、チューブリンは条件によって二量体当り GDP が一個だけついたものから GTP が二個ついたものまでみられる (Weisenberg *et al.*, 1968; Berry and Shelanski, 1972; Jacobs *et al.*, 1974; Kobayashi, 1974, 1975; Arai *et al.*, 1975)。GTP のチューブリンへの結合には Mg^{2+} と遊離の -SH 基とを必要とする (Arai *et al.*, 1975)。またその結合部位はコルヒチンの結合部位とは異なる (Weisenberg *et al.*, 1968; Bryan, 1972)。一方ビンブラスチンは E-site のスクレオチドの交換性を抑えるが、N-site に対してどう働くかには異論がある (Berry and Shelanski, 1972; Bryan, 1972)。その他 GTP はチューブリンのコルヒチン結合能、GTP 結合能および分子変形などに保護的な働きを示す (Wilson, 1971; Ventilla *et al.*, 1972; Arai *et al.*, 1975)。

e) 細胞分裂阻害剤との結合

チューブリンに対しては、いくつかの細胞分裂阻害剤が結合することが知られている。Boris and Taylor (1967a, b) は、いろいろな細胞の 6S タンパク質 (すなわちチューブリン二量体) がコルヒチンと特異的に結合することを 3H ラベルのコルヒチンを用いて明らかにした。この事実はカラムクロマトグラフィーでチューブリンを分画する際に広く利用されており、また最近ではアフィニティー・クロマトグラフィーにも応用されている (Hinman *et al.*, 1973)。コルヒチンの結合部位はチューブリンの二量体当り一個であり (Shelanski and Taylor, 1967; Weisenberg *et al.*, 1968; Bryan, 1972), 結合と共に 430 nm の蛍光が増大

する (新井・奥山, 1973)。コルヒチンは doublet 微小管などには結合せず、これを熱や音波処理によってチューブリンの二量体にするとはじめて結合するようになる (Wilson and Meza, 1973; 栗山, 1976)。ただし次に述べるビンブラスチンによって生ずるバラクリスタルはコルヒチンと結合しうる (Krishan and Hsu, 1971; Bryan, 1972)。チューブリンのコルヒチン結合能は失われ易いが、前述のような GTP によって、また高濃度のショ糖やグリセリンを加えることにより安定化される (Frigon and Lee, 1972; Solomon *et al.*, 1973; Arai *et al.*, 1975)。ビンブラスチンもコルヒチン結合能を安定化するので、両者の結合部位は異なると考えられる (Krishan and Hsu, 1971; Wilson, 1971; Bryan, 1972)。

ビンブラスチンやピンクリスチンもチューブリンの二量体一個当り一個の割合で結合する (Berry and Shelanski, 1972; Bryan, 1972)。これらの物質は細胞内の微小管構造をこわして、太さ 5~10 nm の繊維や大きなバラクリスタルに変える (Wisniewski *et al.*, 1968; Bensch and Malawista, 1969; Nagayama and Dales, 1970; Olmsted *et al.*, 1970; Krishan and Hsu, 1971 など)。同じようなチューブリンのバラクリスタルはらせん状の繊維やリング状の構造と共に, *in vitro* でも脳, L細胞, ウニ卵などの可溶性分画にビンブラスチンを加えることによって得られている (Bensch *et al.*, 1969; Marantz and Shelanski, 1969; Marantz *et al.*, 1969; Bryan, 1972; Warfield and Bouck, 1974 など)。そこでこの方

法もチューブリンの分離精製に用いられる。ただしビンブラスチンはチューブリンのみでなく Ca によって沈殿するようないくつかのタンパク質をも沈殿させるので (Wilson *et al.*, 1970), この点留意する必要がある。チューブリンはまたクロールプロマジンによっても選択的に沈殿させられるという (McGuire *et al.*, 1974)。

やはり細胞分裂の阻害剤であるポドフィロトキシンはチューブリンへのコルヒチンの結合を抑える (Wilson, 1971; Wilson and Meza, 1973)。またコルセミドやロテノンなどもコルヒチンと同じ部位に結合するらしい (Bryan, 1972; Brinkley *et al.*, 1974)。しかしグリセオフルビンはチューブリンには結合しないことが観察されている (Grisham *et al.*, 1973)。

f) その他

われわれはウニ精子鞭毛の doublet 微小管分画がかなりの脂質を含むことをみいだした (Mohri *et al.*, 1967b)。その量は凍結乾燥重量のおよそ 10% に当り、ホスファチジルコリン、ホスファチジリエタノラミン、コレステロール、それにウニ配偶子に特異的なスルホリピドを含む糖脂質などが検出された。もっともこの分画がチューブリンのみより成っているとは確言できない。しかし最近 ^{32}P を含む無機リン酸とインキュベートしたニワトリ胚の脳や Hela 細胞より分離した微小管から、ラベルされたリン脂質が抽出されており (Daleo *et al.*, 1974), また脳の可溶性分画をホスホリパーゼの A や C で処理すると微小管の再構成が妨げられることが明らかにされた (Bryan, 1975)。したがってチューブリンがリポタンパク質である可能性は高い。

一方哺乳類脳のチューブリンには 1% 前後の中性糖やアミノ糖も含まれている (Falxa and Gill, 1969; Feit *et al.*, 1971a; Soifer *et al.*, 1972)。この結果は一度否定されかけたが (Eipper, 1972), しかし最近になって ^{14}C でラベルしたグルコサミンが *in vivo* で脳チューブリン中にグルコサミンやガラクトサミンとして取り込まれることが明らかにされた (Feit and Shelanski, 1975)。またわれわれもヒト精子鞭毛のチューブリンが糖を含むと思われる結果を得ている (小林, 未発表)。

このようなチューブリンのタンパク部分と脂質または糖質との結合は、すべてのチューブリンにおいて同様というわけではなく、おそらく条件次第または異なるチューブリン分子種間で異なっており、それが微小管の機能または安定性における多様性につ

ながっている可能性も考えられる。

なおウニ精子鞭毛の doublet 微小管やウニ卵の分裂装置にはある程度の Zn が含まれている (Morisawa and Mohri, 1972)。またブタ脳のチューブリンや *Entamoeba invadens* のシストから得られたチューブリン様タンパク質にも相当量の Zn がみいだされた (Morgan, 私信)。この金属が細胞運動に何らかの働きをしている可能性はあるが (Morisawa and Mohri, 1974), チューブリンが Zn タンパク質であるかどうかはまだ確かでない。

3. チューブリンに関連のある諸酵素

これまでにチューブリンと密接に結びついているか、あるいはチューブリンを基質として用いる酵素がいくつか知られている。しかしチューブリンの同定に用いられるような、チューブリンそのものの特殊な酵素作用というものはみつかっていない。

a) プロテインキナーゼ

Goodman *et al.*, (1970) は Weisenberg *et al.*, (1968) の方法で調製した脳チューブリンが cAMP 依存のプロテインキナーゼの基質になること、およびこのチューブリン分画自体がプロテインキナーゼ活性をもつことをみいだした。その後他の研究者たちも Weisenberg タイプのチューブリンが cAMP 依存または非依存のプロテインキナーゼを含むと報告している (Lagnado *et al.*, 1971; Soifer *et al.*, 1972)。また重合・脱重合を繰返すことによって精製されるいわゆる Shelanski タイプのチューブリン (Shelanski *et al.*, 1973) も cAMP 依存のプロテインキナーゼをもつことが報告された (Leterrier *et al.*, 1974; Sloboda *et al.*, 1975; Soifer, 1975)。

しかしいずれの場合にも、プロテインキナーゼ活性はカラムクロマトグラフィーなどによりチューブリンそのものとは分離できることが明らかにされた (Eipper 1974; Piras and Piras, 1974; Rappaport *et al.*, 1975; Soifer, 1975; Shigekawa and Olsen, 1975)。これとは別に *Tetrahymena* の axoneme または doublet 微小管分画の KCl 抽出物のハイドロキシアパタイト・カラムクロマトグラフィーでは 3 つのプロテインキナーゼのピークが得られるが (その主なものは cAMP 依存), やはりチューブリンとは区別される (加治, 1973; Murofushi, 1973)。同様な酵素はウニ精子の axoneme から得られている (室伏, 1975)。

チューブリンのリン酸化は *in vitro* だけでなく *in vivo* でも起ることが、 ^{32}P ラベルの無機リン酸を与えた実験から明らかにされている (Eipper, 1972, 1974; Piras and Piras, 1974; Piperno and Luck, 1974)。*In vivo* ではチューブリン二量体もリン酸化されるが、*in vitro* ではある程度集合したもののみがリン酸化されるようである (Eipper, 1974; Weisenberg, 1974)。リン酸化はチューブリンのセリン残基でおこり (Goodman *et al.*, 1970; Eipper, 1972; Piras and Piras, 1974), またリン酸化には ATP 同様 GTP も有効である (Murray and Froscio, 1971; Soifer *et al.*, 1972; Piras and Piras, 1974)。脳チューブリンでは β チューブリンのみがリン酸化を受けると報告されたが (Lagnado *et al.*, 1971; Eipper, 1972, 1974), より最近の結果では α チューブリンもリン酸化されている (Ohtsubo *et al.*, 1975; Lagnado *et al.*, 1975; Rappaport *et al.*, 1975)。一方 ^{32}P 無機リン酸を含む溶液中で成長した *Chlamydomonas* の鞭毛では, doublet 微小管の α チューブリンのみがリン酸化されるという (Piperno and Luck, 1974)。この点も微小管の機能の多様性やチューブリン間の異質性などからんでさらに検討を要する。

Weisenberg タイプのチューブリンの場合は確かにチューブリンがリン酸化されるが、このタイプは微小管への集合能がなく変性していると考えられる (Rappaport *et al.*, 1975)。ところが Shelanski タイプのチューブリンの場合には、共存している分子量 30 万および 35 万前後の高分子のポリペプチド (HMW) が特異的にリン酸化される (Sloboda *et al.*, 1975)。この HMW は後に述べるようにダイニンに似たポリペプチドで、神経細胞の微小管についている繊維状突起を形成し、また微小管の再構成にも重要な役割を果していると考えられている。するとチューブリン分画にみいだされるプロテインキナーゼは、むしろダイニン様のタンパク質をリン酸化し、鞭・繊毛運動や軸索輸送に関係していると云う可能性もでてくる。実際たとえば分裂中のウニ卵ではチューブリンのリン酸化がおこらない (Ohtsubo *et al.*, 1975)。ただし精製されたチューブリンには二量体一分子当り 0.34~0.80 分子のリン酸が結合しているので (Eipper, 1972; Lagnado *et al.*, 1975), Shelanski タイプのチューブリンはさらにリン酸化される余地がないのかも知れない。

ウニ精子の鞭毛や *Tetrahymena* の繊毛には axoneme に結びついているもの以外にも、Triton X-100 などで抽出される cAMP または cGMP 依存性のプロテインキナーゼがいくつか存在する (Lee and Iverson, 1972; Murofushi, 1974; 室伏, 1975)。これらの酵素はチューブリンと結びついているものとは異なるようであるが、その働きは明らかでない。

最近 cAMP と精子の運動性や代謝との関係が盛んに調べられており (Garber *et al.*, 1971; Hoskins, 1973; Tash and Mann, 1973; Morton *et al.*, 1974), アデニルシクラーゼやグアニルシクラーゼなども精子中にみいだされている (Gray *et al.*, 1970, 1971; Morton and Albagli, 1973; Garber *et al.*, 1975)。これらがプロテインキナーゼと共に解糖系に働いていることも考えられるが、むしろチューブリンやダイニンのリン酸化を通して、運動機構により直接的に組み込まれているのではなからうか。

b) ATPase・GTPase・アデニレートキナーゼ・GDP キナーゼ

チューブリンとの関連が考えられる ATPase の中 axoneme の腕に相当するダイニンについては後で述べる。L細胞やニワトリ胚の筋肉細胞よりビンブラスチンによって生じたバラクリスタルには ATPase 活性が存在すると報告されている (Nagayama and Dales, 1970; Piras and Piras, 1974)。しかしこの活性がチューブリンそのものにあるかどうかは確かでなく、ダイニンや他の ATPase の共沈による可能性が強い。前述のように脳からえられた Shelanski タイプのチューブリンには HMW が混在しており、その分子量はダイニンに近い。これらを α ダイニン、 β ダイニンと呼ぶ研究者もいるが適当な名称ではない (Burns and Pollard, 1974; Gaskin *et al.*, 1974b 参照)。また精製が十分でないと膜の混在による高い Mg-ATPase 活性がみられる。

Chlamydomonas の鞭毛にはダイニンの他に低分子量 (3S) の Ca-ATPase が存在する (Watanabe and Flavín, 1973)。この ATPase は主に中心管に由来するチューブリン分画の中に含まれるが、おそらくチューブリンとは異なるものであろう。ウニ卵の分裂装置にも分裂のサイクルにともなって変動する Ca-ATPase のあることが報告されている (Petzelt, 1972)。なお細胞化学的手法により鞭毛の中心鞘の近くにも ATPase の存在することが報

告されているが (たとえば Eurlon, 1973), この ATPase もダイニンなのかあるいは Ca-ATPase なのかまだ明らかでない。

アクチンは $G \rightleftharpoons F$ 転換において一種の ATPase として働くことが知られているが, チューブリンの微小管への集合に際しても結合 GTP の加水分解が起こり, 一種の GTPase の働きを現わすことが報告されている (Rosenfeld *et al.*, 1973; Jacobs *et al.*, 1974; Kobayashi, 1975)。加水分解を受けない GMPPCP や GMPPNP が微小管への集合を誘導しえないという結果や (Olmsted and Borisy, 1973; Gaskin *et al.*, 1975; Borisy *et al.*, 1975), 再構成された微小管中には GTP と GDP が 1:1 で含まれ (Kobayashi, 1975), しかも GTP の非存在下では前述の N-site および E-site 共 GTP と結合した二量体でないと微小管になり得ないという事実は (小林, 1976), 加水分解が確かに起こることを示唆している。しかし GMPPCP がある濃度では GTP の代りに微小管を誘導し得るという結果から, 集合には加水分解は必要でなく GTP はチューブリン分子にアロステリックな変化を促すという考えもだされている (Lockwood *et al.*, 1975)。

鞭毛や繊毛の axoneme にはアデニレートキナーゼが存在する。たとえば *Tetrahymena* の繊毛の粗ダイニン分画は ATP の約 1/3 の速度で ADP を分解するが, これは混在するアデニレートキナーゼの働きによる (Gibbons, 1966)。Chlamydomonas 鞭毛のトリス-EDTA 抽出液 (ダイニンが抽出される) にはこの酵素のピークが二つみいだされるが, 少なくともその一つはチューブリンと区別される (Watanabe and Flavin, 1973)。また *Tetrahymena* 繊毛の doublet 微小管分画の KCl 抽出液中にもこの酵素が含まれているが, 三つの活性ピークの中二つははっきりチューブリンと異なっている (加治, 1973)。このような axoneme に存在するものの他に, ジギトニンや Triton で抽出される分画にも相当量の活性がみられる (音川, 1974; 毛利, 未発表)。Axoneme のアデニレートキナーゼ活性は ATPase 活性と比べても可成り高く, 鞭, 繊毛の軸に沿って ATP 濃度を維持するのに役立っていると考えられる (Brokaw and Gibbons, 1973; Otokawa, 1974)。

ATP のリン酸を GDP に移すヌクレオシドジリン酸キナーゼ (GDP キナーゼと略す) はウニ精子鞭毛の axoneme にみいだされた (Yanagisawa *et al.*, 1968)。Tetrahymena 繊毛の doublet 微小

管分画からはこの酵素の二つのピークが得られたが, いずれもチューブリンとは区別される (加治, 1973)。われわれは以前にウニ精子のグリセリンモデルに ATP を加えて運動を誘起した場合に微小管に結合している GDP が GTP になるという結果を得て, ATP の分解をとまらう GDP-チューブリン $\rightleftharpoons$ GTP-チューブリンのサイクリックな変化が鞭毛運動の分子機構に含まれるという考えを提出した (Yanagisawa *et al.*, 1968)。しかしながらその後の実験結果はこの考えを支持しなかった。しかし後述のように ATP が GTP 同様にチューブリンからの微小管の再構成に有効であるという事実は, その際に GTP キナーゼが働くことを示唆している。実際に脳チューブリンではこの二量体の N-site (Berry and Shelanski, 1972; Jacobs *et al.*, 1974) あるいは E-site (小林, 1976) の GDP に ATP からのリン酸が転移される。E-site の GTP から N-site の GDP にはリン酸転移は起こらないので, おそらく GDP キナーゼにより両 site 共 GTP になった“活性化された”チューブリンが微小管に集合し得るようになるのであろう。先のわれわれの結論とは異なり, この酵素は微小管に組み込まれたチューブリンには働かないようである。

c) その他の酵素

二, 三の脂質代謝に含まれる酵素もチューブリンと関係のあることが報告されている。まずホスファチジルイノシトールを特異的に分解するホスホリパーゼ C がネズミ脳のチューブリン分画にみいだされている (Quinn, 1973)。ただしこの場合には脳の可溶性分画をコルヒチンで処理した時にそのようなことが起こるので, このことからある酵素が条件次第で一時的にチューブリンと結合し特定の働きを現わす可能性が考えられる。ホスホリパーゼ C は予め cAMP と ATP で処理された β チューブリンと結合するという。さらにチューブリンを [γ - 32 P] ATP と共に *in vitro* でインキュベートするとラベルされたホスファチジン酸を生じ, しかもそれがジグリセリドを加えると促進されることから, チューブリンとジグリセリドキナーゼとの結びつきが示唆されている (Daleo *et al.*, 1974)。この他ホスホジエステラーゼと微小管との結びつきを示す結果も報告されている (Vande Berg, 1975)。

これらとは別にチューブリンが, 二つのタンパク質間での $SH \rightleftharpoons SS$ 交換を触媒するトランスヒドロゲナーゼの基質になることが知られている (Sa-

kai, 1966; Mabuchi and Sakai 1972; Kimura, 1973)。この酵素は最初 Sakai (1965) により、ウニ卵表層のタンパク質 (未同定) と分裂装置の Ca 不溶性タンパク質との間の反応を触媒するものとして記載された。現在の知識からして後者はおそらくチューブリンであろう。この酵素の働きはまだよくわからないが、やはり微小管である星糸が卵表層にまで達しており、それによって卵割溝の入る位置が決まると考えられているので、このような仕組みに必要なのかも知れない。あるいは微小管の形成にはチューブリンのSH基が必要であるので (Kuriyama and Sakai, 1974b), 分裂装置の生成消滅に当ってチューブリンと他の細胞質タンパク質との間のSH $\rightleftharpoons$ SS交換を行っている可能性もある。

なお脳の抽出物中にはチューブリンのC末端にチロシンを付加する酵素が含まれており (Barra *et al.*, 1974; Raybin and Flavín, 1975), チューブリンの二量体はその基質になることが明らかにされている。

4. チューブリンの分子集合

微小管の多様な働きを理解するためには、その生成消滅機構を明らかにする必要がある。細胞運動に関しても、Inoué (1964); Inoué and Sato (1967) によって細胞分裂における染色体の移動にチューブリン $\rightleftharpoons$ 微小管の間の動的平衡が重要であるという考えが提出されている。この分野は近年急速に発展しており、従って論文の数も多くしかもまだ不確かな点が多い。ここでは *in vitro* での最近の知見に限ってできるだけ簡単に述べることにしたい。

a) 微小管の再構成

微小管の *in vitro* での再構成は、Stephens (1968, 1969) がウニ精子鞭毛の doublet 微小管を Sarkosyl で溶かし、これを塩溶液で薄めることにより最初に成功した。この結果は直ちにわれわれにより確かめられたが (毛利ほか, 1968), 電子顕微鏡による観察の結果では完全な管状のものは少く、C字型のものやシート状のものが多かった (毛利・三木, 1973)。また一般の微小管と異なり低温やコルヒチンに対する感受性もみられなかった (もっとも鞭毛の微小管は低温でも安定である)。このような性質を持つ微小管の再構成は、Weisenberg (1972) および Borisý and Olmsted (1972) により、脳の可溶性分画を GTP, Mg, および EGTA (Ca 濃度を下げる) を含む溶液中で 37°C に加温することにより始めて達成された。

チューブリンが微小管に集合していく過程は、

電子顕微鏡による観察ばかりでなく、粘度測定 (Olmsted and Borisý, 1973; Kuriyama and Sakai, 1974a, b; Kuriyama, 1975 など), 濁度測定 (Gaskin *et al.*, 1974a; Lee *et al.*, 1974; Houston *et al.*, 1974; Rosenfeld and Weisenberg, 1974), 流動複屈折 (Haga *et al.*, 1974), さらに最近では銀染色をしたものの位相差顕微鏡による観察 (Kuriyama and Miki-Noumura, 1975) や、暗視野顕微鏡による直接観察 (Kuriyama and Miki-Noumura, 1975; Summers *et al.*, 1975) などにより追われている。

In vitro で微小管への集合を促すための溶液はいろいろ工夫されているが、一例をあげれば 5mM MES 緩衝液, pH 6.5, 50 mM KCl, 0.5 mM Mg-SO₄, 1 mM EGTA, 1 mM ATP (GTP の代りをする 3. b) 参照) が有効である (Kuriyama, 1975)。ただし二枚貝の *Spisula* 卵の抽出液より紡錘体や星状体を *in vitro* で生じさせるためには、海水に近いイオン強度 (0.5) が必要である (Weisenberg, 1974; Weisenberg and Rosenfeld, 1975 a, b)。1M ショ糖や 4M グリセリンの添加は微小管の形成を促進し、かつ低温やコルヒチンによる微小管の脱重合を抑える (Shelanski *et al.*, 1973)。微小管の再構成はふつう温度を低温から 26~37°C に上げることによって起こるが、脳の可溶性分画中には 0°C で微小管を生ずるチューブリンも含まれている (Grisham and Wilson, 1975)。なおアクチンや TMV タンパク質の自己集合の場合のように、二量体 $\rightleftharpoons$ 微小管の変換はあるチューブリン濃度 (0.2~1.0 mg/ml) で急激に起こる (Olmsted and Borisý, 1973; Gaskin *et al.*, 1974a)。

上記の溶液の組成からもわかるように微小管の再構成には Mg が必要であり (Olmsted and Borisý, 1973; Lee *et al.*, 1974; Rosenfeld and Weisenberg, 1974; Haga *et al.*, 1974 など), 反対に Ca は条件によっては 1 μ M で重合を抑制したり微小管の脱重合を促したりする (Weisenberg, 1972; Borisý and Olmsted, 1972; Kuriyama and Sakai, 1974a; Lee *et al.*, 1974; Haga *et al.*, 1974 など)。しかし Ca に対する感受性は共存する Mg によって変わり、Mg 濃度が低い場合 (0.1~0.5 mM) には比較的高濃度 (mM) の Ca ではじめて抑制効果がみられる (Rosenfeld and Weisenberg, 1974)。Ca は脱重合したチューブリンとよりよく結合する (Hayashi and Matsumura, 1975)。GTP は特に重合・脱重合の繰り返しやゲ

ル化によって精製されたチューブリンを用いた場合に必要である (Weisenberg, 1972; Borisy and Olmsted, 1972; Olmsted and Borisy, 1973; Kuriyama and Sakai, 1974a, b; Lee *et al.*, 1974; Rosenfeld and Weisenberg, 1974 など)。ATP が GTP に代わりを得るのは混在する GDP キナーゼの働きによるものと思われる。これらの点については既に述べた。

コルヒチンは $1 \mu\text{M}$ のような低濃度で微小管の再構成を妨げ、またより高濃度を必要とするが微小管の脱重合も引き起こす (Olmsted and Borisy, 1973; Kuriyama and Sakai, 1974a; Haga *et al.*, 1974 など)。チューブリンの微小管への集合能とコルヒチン結合能との間には相関関係が認められる。しかし前者がチューブリン単量体に含まれる約 7 個の SH 基の中 2 個を PCMPS で塞がれると消失するのに対し、後者の消失には 4 個の SH 基が塞がれる必要がある (Kuriyama and Sakai, 1974b)。

b) 微小管形成のしくみ

粗チューブリン分画や微小管を低温や Ca で脱重合させたものの中には、6S のチューブリン二量体の他にやはり α および β チューブリンより成る 20~36S の成分がみいだされる (Kirschner *et al.*, 1974; Weingarten *et al.*, 1974; Marcum and Borisy, 1974; Kuriyama, 1975 など)。後者の中には外径が 42~49 nm, 内径が 27~29 nm ほどの二重のリング状構造が多数含まれている (Kirschner *et al.*, 1974; Frigon *et al.*, 1974; Weisenberg, 1974; Weingarten *et al.*, 1974; Marcum and Borisy, 1974; Erickson, 1974, 1975a; Olmsted *et al.*, 1974 など)。遠心やゲルろ化によってこの重い成分を除いてしまうと重合が抑えられるという結果は (Borisy and Olmsted, 1972; Shelanski *et al.*, 1973; Weingarten *et al.*, 1974; Kuriyama, 1975; Haga and Kurokawa, 1975), あたかもリングが重合中心になることを示しているかのようにみえる。ただしタンパク量を増せばこの成分を加えなくても重合が起こるが、この場合には重合の開始までに時間がかかり、おそらくその間に重合中心(?) が形成されているものと思われる (Borisy *et al.*, 1974)。実際ある条件下ではタンパク濃度が薄くても二量体からのリングの形成が起こる (Erickson, 1974; Rosenfeld and Weisenberg, 1974)。

ではリングの果たす役割は何であろうか。形成さ

れつつある微小管の成長端や、脱重合過程ではつれつつある微小管には巻き毛状の構造が観察される (Borisy and Olmsted, 1972; Kirschner *et al.*, 1974; Erickson, 1974)。さらに分離したリングのみでも微小管を形成することや、微小管形成時には中間生成物としてシート状の構造がみられることから、Erickson (1974, 1975a) はリングがほどけて protofilament になり、protofilament が並んでシートを形成し、最後にシートが閉じて微小管になるという仮説を提出している。しかし微小管形成の早い時期にこのようなしくみを示す像はそれ程多くないようで (Olmsted *et al.*, 1974), また出来たての微小管は固定の影響によりシート状に開き易い可能性もある。さらに形成過程の超遠心による解折は、一度より小さな集合体に分解してから微小管になることを示唆している (Weisenberg, 1974)。どうもリングは微小管形成の中間体ではなく、両者は条件の違い (たとえば 0°C と 37°C) によって生ずる二つの異なる集合形態であるらしい。

最近リングおよび微小管の形成には、チューブリンと共重合する HMW が関与するという証拠が集積してきた (Keates and Hall, 1975; Murphy and Borisy, 1975; Borisy *et al.*, 1975; Dentler *et al.*, 1975)。この HMW は前述のようにダイニンと似たポリペプチドで、6S 分画には含まれず 20~36S 分画と共存している。つまりリングに結合していることになる。脳チューブリンでは HMW が無くても微小管を生ずるがその程度は低く、また HMW を加えたものには *in situ* の微小管にみられるような細い突起が管の表面に多数付着している (Murphy and Borisy, 1975; Dentler *et al.*, 1975)。こうなると少なくとも *in vivo* での微小管形成には HMW やダイニンが必要であるという可能性がでてくる。最近おそらく HMW を含む polycation が微小管の再構成を促し、RNA などを含む polyanion はこれを抑制するという結果がいくつかの研究室から出されてきた (Bryan *et al.*, 1975; Erickson, 1975b; Nagle and Bryan, 1975)。

一方細菌鞭毛の再構成は鞭毛の断片にフラグリン分子が付け加わって起こるが、微小管の場合にも鞭・繊毛の微小管断片や基粒体、あるいは脳微小管の断片を“種”にして、これに同種または異種の (脳またはウニ卵) 6S チューブリンが加わることによってその形成 (成長) が起こる (Borisy *et al.*, 1974; Snell *et al.*, 1974; Binder *et al.*, 1975; Allen and Borisy, 1974; Burns and Star-

ling, 1974; Weisenberg and Rosenfeld, 1975a; Rosenbaum *et al.*, 1975)。鞭毛の doublet 微小管断片を“種”に同じ doublet より得たチューブリンで微小管を再構成するという長年かなえられなかった夢も、ごく最近 doublet の超音波処理によって得られる二量体を用いることにより成功した(栗山, 1976)。ただこれまでの所成長はA小管(または中心小管)に起こり易く、元通りに安定なしかも完全な doublet の再構成には何らかの成分(たとえばダイニン)が必要と思われる。なお染色体の動原体を元にしての微小管群の *in vitro* での形成も行なわれている(Telzer *et al.*, 1975)。

上述の二つのしくみの中いずれが実際に生体内で働いているかは尚不明である。リングまたはそれから生ずる集合体は微小管形成の開始に必要であり、それ以後はこれを“種”に成長が起こることも十分考えられる。*Spisula* 卵の抽出物から紡錘体や星状体が生ずる場合には、中心粒の周囲に微小管形成中心(microtubule organizing center, MTOC)が現われるが(Weisenberg, 1974; Weisenberg and Rosenfeld, 1975a, b), リングのようなものが集まっているのであろうか。中心粒や基粒体自身も triplet 群よりなるきわめて薄い盤状の前中心粒より形成されてくる(Gould, 1975)。図3にこれま

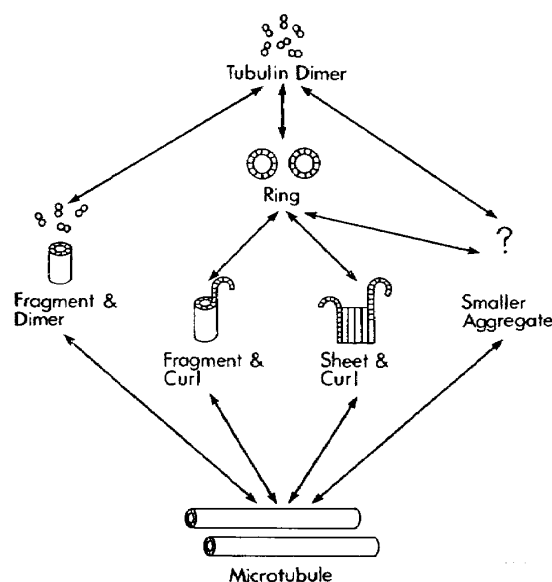


図3. 微小管形成のしくみに関するいろいろな仮説

での諸説をまとめてみた。

なお微小管に集合し得るチューブリン二量体はある種の“活性化された”状態にあると考えられ

る。これがGTPで飽和された二量体であるのか、あるいはリン酸化されたものであるのかは不明である。Kirschnerのグループは重合しうるYチューブリンとそれのみでは重合し得ないXチューブリンとを仮定し、後者は微小管形成の際 protofilament 間の結合を強固にするのに役立つという考えを提出している(Kirschner *et al.*, 1974; 1975; Lockwood *et al.*, 1975)。最近重合能のないチューブリンに重合能を与えるものとして α タンパク質が分離された(Weingarten *et al.*, 1975; Cleveland *et al.*, 1975)。このタンパク質は分子量が小さく、HMWとは異なるものである。

c) 微小管の極性

微小管の機能に関連してその極性、いいかえれば形成時の方向性が問題になる。初期の *in vivo* の光学顕微鏡による観察結果はサブユニットが伸長しつつある鞭毛の先端に付け加わることを示唆した(Tamm, 1967; Rosenbaum and Child, 1967)。この結果は電顕レベルでのオートラジオグラフィによって確かめられている(Witman, 1975)。さらに *in vitro* の系においても, *Chlamydomonas* の axoneme にブタ脳チューブリンを加えた場合に、成長は先端で起こることが明らかにされた(Binder *et al.*, 1975)。この場合に腕がA小管の長軸方向にある角度をなして付着していることが指標とされた。微小管断片や基粒体を“種”に用いた場合にも一方向成長がみられるが、タンパク量や、インキュベーションの時間や温度を増すと反対側からも成長が起こる(Borisy *et al.*, 1974; Snell *et al.*, 1974; Rosenbaum *et al.*, 1975)。一方向成長は、基粒体のようなものと結びついていない脳微小管の場合にも確かめられているので(Dentler *et al.*, 1974), チューブリン分子の固有の性質(極性)によると思われる。これにさらに周囲の環境や他の構造の影響が加わるのであろう。分裂装置においては両極間のいわゆる continuous 微小管は極より、染色体微小管(動原体微小管)は動原体からそれぞれの極に向かって成長し、これに基く極性が染色体の移動に役かっていると考えられる(McIntosh *et al.*, 1969)。

なお同じような一方向成長は、細菌の鞭毛でも(Asakura *et al.*, 1968), Fアクチンでも(大沢・近藤, 1974)観察されている。

d) 微小管以外の集合体

チューブリンの集合体とる形態は上述のリングと微小管に限らない。その一つとして直径34~

40 nm のいわゆる microtubule があり、ニワトリの精子形成時 (McIntosh and Porter, 1967), タイヨウチュウ軸足の消滅時 (Tilney and Porter, 1967), あるいはビンブラステンによって処理した場合 (Warfield and Bouck, 1974) などに出現する。その生成は微小管を形成していたチューブリン分子がよじれて新しい相手と結合し直すため (Tilney and Porter, 1967), あるいは二本の protofilament より成るらせんがその長軸方向に密に重なり合うため (Warfield and Bouck, 1974) と考えられている。ビンブラステンでチューブリンの大きなパラクリスタルを生ずることは既に述べたが、このパラクリスタルは microtubule が束になったようなもので、らせん状の構造が特にその崩壊過程ではっきり観察される (Bensch *et al.*, 1969; Marantz and Shelanski, 1969; Warfield and Bouck, 1974 など)。

ごく最近 polycation を加えてチューブリンを重ねさせると、直径 36~39 nm ほどの二重の壁よりなる微小管が生ずることが観察された (Behnke, 1975)。これと同じものはグリセリンとジメチルスルホキシド (DMSO) を含む溶液でその構造を保ったまま分離された微小管の中にもみいだされている。その存在意義や他の型の集合体との関係の究明は今後の課題である。

この他脳の中には直径 7~8 nm で、明らかに neurofilament (チューブリンとは異なるタンパク質より成る) とは異なる細い繊維が存在するが、この繊維もやはり α および β チューブリンより成り立っている (Johnson and Sinex, 1974)。おそらく *in vitro* のある条件下で生ずるチューブリンの線状集合体に相当するものであろう (Wisniewski *et al.*, 1968; Miki-Noumura and Mohri, 1972)。

文 献

- ALICEA, H. A. AND F. L. RENAUD (1975) *Nature* 257: 601-602.
- ALLEN, C. AND G. G. BORISY (1974) *J. Mol. Biol.* 90: 381-402.
- AMOS, L. A. AND A. KLUG (1974) *J. Cell Sci.* 14: 523-549.
- 新井孝夫・奥山典生 (1973) 生化学 45: 19-29.
- ARAI, T., Y. IHARA, K. ARAI AND Y. KAZIRO (1975) *J. Biochem.* 77: 647-658.
- ASAKURA, S., G. EGUCHI AND T. IINO (1968) *J. Mol. Biol.* 35: 227-236.
- BARRA, H. S., C. A. ARCE, J. A. RODRIGUEZ AND R. CAPUTTO (1974) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 60: 1384-1390.
- BEHNKE, O. (1975) *Nature* 257: 709-710.
- AND A. FORER (1967) *J. Cell Sci.* 2: 169-192.
- BENSCH, K. G. AND S. E. MALAWISTA (1969) *J. Cell. Biol.* 40: 95-107.
- , R. MARANTZ, H. WISNIEWSKI AND M. L. SHELANSKI (1969) *Science* 165: 495-496.
- BERRY, R. W. AND M. L. SHELANSKI (1972) *J. Mol. Biol.* 71: 71-80.
- BINDER, L. I., W. L. DENTLER AND J. L. ROSENBAUM (1975) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* 72: 1122-1126.
- BORISY, G. G., J. M. MARCUM, J. B. OLMSTED, D. B. MURPHY AND K. A. JOHNSON (1975) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 253: 107-132.
- AND J. B. OLMSTED (1972) *Science* 177: 1196-1197.
- , ———, J. M. MARCUM AND C. ALLEN (1974) *Fed. Proc.* 33: 167-174.
- AND E. W. TAYLOR (1967a) *J. Cell Biol.* 34: 525-533.
- AND ——— (1967b) *J. Cell Biol.* 34: 535-548.
- BRINKLEY, B. R., S. S. BARHAM, S. C. BARRANCO AND G. M. FULLER (1974) *Exptl. Cell Res.* 85: 41-46.
- BROKAW, C. J. AND I. R. GIBBONS (1973) *J. Cell Sci.* 13: 1-10.
- BROOKS, D. E. (1970) *Biochem. J.* 118: 851-857.
- BRYAN, J. (1972) *Biochemistry* 11: 2611-2616.
- (1975) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 253: 247-259.
- , B. W. NAGLE AND K. H. DOENGES (1975) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* 72: 3570-3574.
- AND L. WILSON (1971) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* 68: 1762-1766.
- BURNS, R. G. AND T. D. POLLARD (1974) *FEBS Letters* 40: 274-280.
- AND D. STARLING (1974) *J. Cell Sci.* 14: 411-419.
- BURTON, P. R. (1973) *J. Morphol.* 140: 185-196.
- , R. E. HINKLEY AND G. B. PIERSON (1975) *J. Cell Biol.* 65: 227-233.
- CHASEY, D. (1972) *Exptl. Cell Res.* 74: 140-146.

- (1974) *Nature* **248**: 611-612.
- CLEVELAND, D.W., S.Y. HWO, M.D. WEINGARTEN, G.B. WITMAN AND M.W. KIRSCHNER (1975) *J. Cell Biol.* **67**: 72a.
- COHEN, C., D. DEROSIER, S.C. HARRISON, R. E. STEPHENS AND J. THOMAS (1975) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **253**: 53-59.
- , S.C. HARRISON AND R.E. STEPHENS (1971) *J. Mol. Biol.* **59**: 375-380.
- DALEO, G.R., M.M. PIRAS AND R. PIRAS (1974) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **61**: 1043-1050.
- DENTLER, W.L., S. GRANETT AND J.L. ROSENBAUM (1975) *J. Cell Biol.* **65**: 237-241.
- , ———, G.B. WITMAN AND J.L. ROSENBAUM (1974) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* **71**: 1710-1714.
- EIPPER, B.A. (1972) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* **69**: 2283-2287.
- (1974) *J. Biol. Chem.* **249**: 1398-1406.
- ERICKSON, H.P. (1974) *J. Supramol. Struct.* **2**: 393-411.
- (1975a) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **253**: 60-77.
- (1975b) Abst. Cold Spring Harbor Symposium on Cell Motility, New York, p. 45.
- FALXA, M.L. AND T.J. GILL (1969) *Arch. Biochem. Biophys.* **135**: 194-200.
- FEIT, H., G.R. DUTTON, S.H. BARONDES AND M.L. SHELANSKI (1971a) *J. Cell Biol.* **51**: 138-147.
- AND M.L. SHELANSKI (1975) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **66**: 920-927.
- , L. SLUSAREK AND M.L. SHELANSKI, (1971b) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* **68**: 2028-2031.
- FORSLIND, B., G. SWANBECK AND H. MOHRI (1968) *Exptl. Cell Res.* **53**: 678-680.
- FRIGON, R.P. AND J.C. LEE (1972) *Arch. Biochem. Biophys.* **153**: 587-589.
- , M.S. VALENZUELA AND S.N. TIMASHEFF (1974) *Arch. Biochem. Biophys.* **165**: 442-443.
- FULTON C., R.E. KANE AND R.E. STEPHENS (1971) *J. Cell Biol.* **50**: 762-773.
- FUTAESAKU, Y., V. MIZUHIRA AND H. NAKAMURA (1972) *Histochemistry and Cytochemistry* (edited by T. Takeuchi, K. Ogawa and S. Fujita), Nakanishi Printing Co., Kyoto pp.155-156.
- GARBERS, D.L., E.L. DYER AND J.G. HARDMAN (1975) *J. Biol. Chem.* **250**: 382-387.
- , W.D. LUST, N.L. FIRST AND H.A. LARDY (1971) *Biochemistry* **10**: 1825-1831.
- GASKIN, F., C.R. CANTOR AND M.L. SHELANSKI (1974a) *J. Mol. Biol.* **89**: 737-758.
- , ——— AND ——— (1975) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **253**: 133-146.
- , S.B. KRAMER, C.R. CANTOR, R. ADELSTEIN AND M.L. SHELANSKI (1974b) *FEBS Letters* **40**: 281-286.
- GIBBONS, I.R. (1963) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* **50**: 1002-1010.
- (1966) *J. Biol. Chem.* **241**: 5590-5596.
- GOODMAN, D.B.P., H. RASMUSSEN, F. DiBELLA AND C.E. GUTHROW, JR. (1970) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* **67**: 652-659.
- GOULD, R.R. (1975) *J. Cell Biol.* **65**: 65-74.
- GRAY, J.P., J.G. HARDMAN, T. BIBRING AND E.W. SUTHERLAND (1970) *Fed. Proc.* **29**: 608.
- , ———, J.L. HAMMER, R.T. HOOS AND E.W. SUTHERLAND (1971) *Fed. Proc.* **30**: 1267.
- GRIMSTONE, A.V. AND A. KLUG (1966) *J. Cell Sci.* **1**: 351-362.
- GRISHAM, L.M., K.G. BENSCH AND L. WILSON (1973) *J. Cell Biol.* **59**: 125a.
- AND L. WILSON (1975) *J. Cell Biol.* **67**: 146a.
- HAGA, T., T. ABE AND M. KUROKAWA (1974) *FEBS Letters* **39**: 291-295.
- AND M. KUROKAWA (1975) *Biochim. Biophys. Acta* **392**: 335-345.
- HAYASHI, M. AND F. MATSUMURA (1975) *FEBS Letters* **58**: 222-225.
- HINMAN, N.D., J.L. MORGAN, N.W. SEEDS AND J.R. CANN (1973) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **52**: 752-758.
- HOSKINS, D.D. (1973) *J. Biol. Chem.* **248**: 1135-1140.
- HOUSTON, L.L., J. ODELL, Y.C. LEE AND R. H. HIMES (1974) *J. Mol. Biol.* **87**: 141-146.
- INOUE, S. (1964) *Primitive Motile Systems in Cell Biology* (edited by R.D. Allen and N. Kamiya), Academic Press. New York pp. 549-598.
- AND H. SATO (1967) *J. Gen. Physiol.* **50**: 259-292.
- ISHIKAWA, H., R. BISCHOFF AND H. HOLTZER (1969) *J. Cell Biol.* **43**: 312-328.
- JACOBS, M., H. SMITH AND E.W. TAYLOR (1974) *J. Mol. Biol.* **89**: 455-468.

- JOHNSON, L.S. AND F.M. SINEX (1974) *J. Neurochem.* 22: 321-326.
- 加治和彦 (1973) 東京大学博士論文.
- KEATES, R.A.B. AND R.H. HALL (1975) *Nature* 257: 418-420.
- KIMURA, I. (1973) *Exptl. Cell Res.* 79: 445-446.
- KIRSCHNER, M.W., R.C. WILLIAMS M. WEINGARTEN AND J.C. GERHART (1974) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 71: 1159-1163.
- , M. SUTER, M. WEINGARTEN AND D. LITTMAN (1975) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 253: 90-106.
- KOBAYASHI, T. (1974) *J. Biochem.* 76: 201-204.
- (1975) *J. Biochem.* 77: 1193-1197.
- 小林孝彰 (1976) 東京大学博士論文.
- KRISHAN, A. AND D. HSU (1971) *J. Cell Biol.* 48: 407-410.
- KURIYAMA, R. (1975) *J. Biochem.* 77: 23-31.
- 栗山了子 (1976) 東京大学博士論文.
- KURIYAMA, R. AND T. MIKI-NOUMURA (1975) *J. Cell Sci.* 19: 607-620.
- AND H. SAKAI (1974a) *J. Biochem.* 75: 463-471.
- AND ——— (1974b) *J. Biochem.* 76: 651-654.
- LAGNADO, J.R., C. LYONS AND G. WICKREMASINGHE (1971) *FEBS Letters* 15: 254-258.
- , L. P. TAN AND M. REDDINGTON (1975) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 253: 577-597.
- LEDBETTER, M.C. AND K.R. PORTER (1964) *Science* 144: 872-874.
- LEE, M.Y.W. AND R.M. IVERSON (1972) *Exptl. Cell Res.* 75: 300-304.
- LEE, Y.C., F.E. SAMON, JR., L.L. HOUSTON AND R.H. HIMES (1974) *J. Neurobiol.* 5: 317-330.
- LETERRIER, J.F., L. RAPPAPORT AND J. NUÑEZ (1974) *FEBS Letters* 46: 285-288.
- LINCK, R.W. (1973) *J. Cell Sci.* 12: 951-981.
- AND L.A. AMOS (1974) *J. Cell Sci.* 14: 551-559.
- LOCKWOOD, A.H., S.M. PENNINGROTH AND M.W. KIRSCHNER (1975) *Fed. Proc.* 34: 540.
- LU, R.C. AND M. ELZINGA (1975) *Fed. Proc.* 34: 223.
- LUDUENA, R.F. AND D.O. WOODWARD (1973) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 70: 3594-3598.
- , L. WILSON AND E.M. SHOOTER (1974) *J. Cell Biol.* 63: 202a.
- MABUCHI, I. AND H. SAKAI (1972) *Develop. Growth Differ.* 14: 247-261.
- MARANTZ, R. AND M.L. SHELANSKI (1969) *J. Cell Biol.* 44: 234-238.
- , M. VENTILLA AND M.L. SHELANSKI (1969) *Science* 165: 498-499.
- MARCUM, J.M. AND G.G. BORISY (1974) *J. Cell Biol.* 63: 206a.
- MCGUIRE, J., P. QUINN AND S. KNUTTON (1974) *J. Cell Biol.* 63: 217a.
- MCINTOSH, J.R. AND K.R. PORTER (1967) *J. Cell Biol.* 35: 153-173.
- , P.K. HEPLER AND D.G. VAN WIE (1969) *Nature* 224: 659-663.
- MIKI-NOUMURA, T. AND H. MOHRI (1972) *J. Mechanochem. Cell Motility* 1: 175-188.
- MIZUHIRA, V. AND Y. FUTAESAKU (1971) 29th Ann. Proc. Electron Microscop. Soc. Amer. (edited by C.J. Arceneaux), Cleitor's Publishing Division, Baton Rouge, La. pp.494-495.
- AND ——— (1974) 8th Intern. Congr. Electron Microscop., Canberra, Vol. II pp.340-341.
- MOHRI, H. (1968) *Nature* 217: 1053-1054.
- 毛利秀雄・長谷川さかえ・丸山工作 (1968) 動物学雑誌 77: 399-401.
- 毛利秀雄・三木堆子 (1973) 蚕白質 核酸 酵素 18: 558-566.
- MOHRI, H., S. MURAKAMI AND K. MARUYAMA (1967a) *J. Biochem.* 61: 518-519.
- , ——— AND ——— (1967b) Abst. 7th Internat. Congr. Biochem. Tokyo. I-13.
- AND K. OGAWA (1975) *The Functional Anatomy of the Spermatozoon* (edited by B.A. Afzelius), Pergamon Press, Oxford pp.161-167.
- AND M. SHIMOMURA (1973) *J. Biochem.* 74: 209-220.
- 毛利秀雄・柳沢富雄 (1967) 動物学雑誌 76: 276-278.
- MORISAWA, M. AND H. MOHRI (1972) *Exptl. Cell Res.* 70: 311-316.
- AND ——— (1974) *Exptl. Cell Res.* 83: 87-94.
- MORTON, B. AND L. ALBAGLI (1973) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 50: 697-703.
- , J. HARRIGAN-LUM, L. ALBAGLI AND T. JOOSS (1974) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 56: 372-379.

- MUROFUSHI, H. (1973) *Biochim. Biophys. Acta* 327: 354-364.
- (1974) *Biochim. Biophys. Acta* 370: 130-139.
- 室伏 祐 (1975) 東京大学博士論文.
- MURPHY, D. B. AND G. G. BORISY (1975) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 72: 2696-2700.
- MURRAY, A. W. AND M. FROSCIO (1971) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 44: 1089-1095.
- NAGANO, T. AND F. SUZUKI (1975) *J. Cell Biol.* 64: 242-245.
- NAGAYAMA, A. AND S. DALES (1970) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 66: 464-471.
- NAGLE, B. W. AND J. BRYAN (1975) Abst. Cold Spring Harbor Symposium on Cell Motility, New York p. 52.
- OHTSUBO, K., H. SAKAI, H. MUROFUSHI AND R. KURIYAMA (1975) *J. Biochem.* 77: 17-21.
- OGAWA, K., K. OKUNO AND H. MOHRI (1975) *J. Biochem.* 78: 729-737.
- OLMSTED, J. B. AND G. G. BORISY (1973) *Biochemistry* 12: 4282-4289.
- , K. CARLSON, R. KLEBE, F. RUDDLE AND J. L. ROSENBAUM (1970) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 65: 129-136.
- , J. M. MARCUM, K. A. JOHNSON, C. ALLEN AND G. G. BORISY (1974) *J. Supramol. Struct.* 2: 429-450.
- , G. B. WITMAN, K. CARLSON AND J. L. ROSENBAUM (1971) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 68: 2273-2277.
- 大沢文夫・近藤博司 (1974) 高分子 23: 440-441.
- OTOKAWA, M. (1974) *J. Biochem.* 76: 335-340.
- 音川 実 (1974) 動物学雑誌 83: 385.
- PETZELT, C. (1972) *Exptl. Cell Res.* 70: 333-339.
- PIPERNO, G. AND J. D. LUCK (1974) *J. Cell Biol.* 63: 271a.
- AND ——— (1975) *J. Cell Biol.* 67: 337a.
- PIRAS, M. M. AND R. PIRAS (1974) *Eur. J. Biochem.* 47: 443-452.
- QUINN, P. J. (1973) *Biochem. J.* 133: 273-281.
- RAFF, R. A. AND J. F. KAUMEYER (1973) *Develop. Biol.* 32: 309-320.
- RAPPAPORT, L., J. F. LETERRIER AND J. NUNEZ (1975) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 253: 611-629.
- RAYBIN, D. AND M. FLAVIN (1975) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 65: 1088-1095.
- RINGO, D. (1967) *J. Ultrastructure Res.* 17: 266-277.
- ROSENBAUM, J. L. AND F. M. CHILD (1967) *J. Cell Biol.* 34: 345-364.
- , L. I. BINDER, S. GRANETT, W. L. DENTLER, W. SNELL, R. SLOBODA AND L. HAIMO (1975) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 253: 147-177.
- ROSENFELD, A. C., R. ZACKROFF AND R. C. WEISENBERG (1973) *J. Cell Biol.* 59: 290a.
- AND R. C. WEISENBERG (1974) *J. Cell Biol.* 63: 289a.
- SAFER, D. (1973) *J. Cell Biol.* 59: 299a.
- SAKAI, H. (1965) *Biochim. Biophys. Acta* 102: 235-248.
- (1966) *Biochim. Biophys. Acta* 112: 132-145.
- AND R. KURIYAMA (1974) *Develop. Growth Differ.* 16: 123-134.
- SAKAKIBARA, I. AND K. YAGI (1970) *Biochim. Biophys. Acta* 207: 178-183.
- SHELANSKI, M. L., F. GASKIN AND C. R. CANTOR (1973) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 70: 765-768.
- AND E. W. TAYLOR (1967) *J. Cell Biol.* 34: 549-554.
- AND ——— (1968) *J. Cell Biol.* 38: 304-315.
- SHIGEKAWA, B. L. AND R. W. OLSEN (1975) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 63: 455-462.
- SLOBODA, R. D., S. A. RUDOLPH, J. L. ROSENBAUM AND P. GREENGARD (1975) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 72: 177-181.
- SNELL, W. J., W. L. DENTLER, L. T. HAIMO, L. I. BINDER AND J. L. ROSENBAUM (1974) *Science* 185: 357-360.
- SOIFER, D. (1975) *J. Cell Biol.* 67: 121a.
- , A. H. LASZLO AND J. M. SCOTTO (1972) *Biochim. Biophys. Acta* 271: 182-192.
- SOLOMON, F., D. MONARD AND M. RENTSCH (1973) *J. Mol. Biol.* 78: 569-573.
- STEPHENS, R. E. (1968) *J. Mol. Biol.* 33: 517-519.
- (1969) *Quart. Rev. Biophys.* 1: 377-390.
- (1970) *J. Mol. Biol.* 47: 353-363.
- (1971) *Biological Macromolecules* (edited by S. N. Timasheff and G. D. Fasman), Vol. 4, M. Dekker, New York pp. 355-391.
- (1974) *Cilia and Flagella* (edited by M. A. Sleight), Academic Press, New York

- pp. 39-76.
- AND R. W. LINCK (1969) *J. Mol. Biol.* 40: 497-501.
- , F. L. RENAUD AND I. R. GIBBONS (1967) *Science* 156: 1606-1608.
- SUMMERS, K., D. RAYBIN AND M. FLAVIN (1975) *J. Cell Biol.* 67: 422a.
- TAMM, S. (1967) *J. Exp. Zool.* 164: 163-186.
- TASH, J. S. AND T. MANN (1973) *Proc. Roy. Soc. Lond. B* 184: 109-114.
- TELZER, B. R., M. J. MOSES AND J. L. ROSENBAUM (1975) *J. Cell Biol.* 67: 429a.
- THOMAS, M. B. (1970) *Biol. Bull.* 138: 219-234.
- AND C. HENLEY (1971) *Biol. Bull.* 141: 592-601.
- TILNEY, L. G., J. BRYAN, D. J. BUSH, K. FUJIWARA, M. S. MOOSEKER, D. B. MURPHY AND D. H. SNYDER (1973) *J. Cell Biol.* 59: 267-275.
- AND K. R. PORTER (1967) *J. Cell Biol.* 34: 327-343.
- VANDE BERG, J. S. (1975) *J. Insect. Physiol.* 21: 455-461.
- VENTILLA, M., C. R. CANTOR AND M. L. SHELSKI (1972) *Biochemistry* 11: 1554-1561.
- WARFIELD, R. K. N. AND G. B. BOUCK (1974) *Science* 186: 1219-1221.
- WARNER, F. D. AND I. MEZA (1974) *J. Cell Sci.* 15: 495-511.
- WATANABE, T. AND M. FLAVIN (1973) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 52: 195-201.
- WEISENBERG, R. C. (1972) *Science* 177: 1104-1105.
- (1974) *J. Supramol. Struct.* 2: 451-465.
- , G. G. BORISY AND E. W. TAYLOR (1968) *Biochemistry* 7: 4468-4479.
- AND A. C. ROSENFELD (1975a) *J. Cell Biol.* 64: 146-158.
- AND ——— (1975b) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 253: 78-89.
- WEINGARTEN, M. D., M. M. SUTER, D. R. LITTMAN AND M. W. KIRSCHNER (1974) *Biochemistry* 13: 5529-5537.
- , A. H. LOCKWOOD, S. Y. HWO AND M. W. KIRSCHNER (1975) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 72: 1858-1862.
- WILSON, L. (1971) *Biochemistry* 9: 4999-5007.
- , J. BRYAN, A. RUBY AND D. MAZIA (1970) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 66: 807-814.
- AND I. MEZA (1973) *J. Cell Biol.* 58: 709-719.
- WISNIEWSKI, H., M. L. SHELSKI AND R. D. TERRY (1968) *J. Cell Biol.* 38: 224-229.
- WITMAN, G. B. (1975) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 253: 178-191.
- , K. CARLSON AND J. L. ROSENBAUM (1972) *J. Cell Biol.* 54: 540-555.
- YAMAGUCHI, T., M. HAYASHI, K. WAKABAYASHI AND S. HIGASHI-FUJIME (1972) *Biochim. Biophys. Acta* 257: 30-36.
- YANAGISAWA, T., S. HASEGAWA AND H. MOHRI (1968) *Exptl. Cell Res.* 52: 86-100.
- , I. YAZAKI AND H. MOHRI (1973) *Sci. Pap. Coll. Gen. Educ. Univ. Tokyo* 23: 155-158.