

チューブリンとミオシンの相互作用

下岡正志, 林正男, 渡辺良雄 (筑波大・生物科学)

Interaction between tubulin and myosin

TADASHI SHIMOOKA, MASAO HAYASHI, YOSHIO WATANABE

細胞運動におけるアクチン-ミオシン系と微小管系の関連を調べる目的で, まずミオシンとチューブリンの相互作用を *in vitro* で検討した。材料としてウサギ骨格筋よりアクチンとミオシンを調製し, ウシ脳よりチューブリンを調製した。ミオシンとチューブリンの結合性を調べる方法は, 両者を混ぜ, イオン強度を下げ (50mM KCl-5mM imidazole buffer), 30°C でインキュベート後, 遠心を行ない, ミオシンと結合して落ちてくるチューブリンの量を SDS-ゲル電気泳動のクーマジーブルーによる染色バンドのデンストメトリーにより求めた。その結果ミオシン1モルに対してチューブリンダイマー約2モルが結合する事実を明らかにすることができた。この結合性は pH 6.2 ~ 7.2 にかけてほぼ一定であり, コルヒチン 200 μ M, CaCl₂ 2mM, Mg-ATP 4mM までの添加で影響を受けなかった。次にこの結合性に対する F-アクチンの効果を調べた。三者を混ぜる順序として, (i)ミオシンとチューブリンを結合させた後に F-アクチンを加える, (ii)チューブリンと F-アクチンの共存するところにミオシンを加える, (iii)ミオシンと F-アクチンでアクトミオンを作らせた後にチューブリンを加える, の3通りを行なった。その結果, F-アクチンは(i)では結合チューブリンに影響を与えず, (ii), (iii)ではミオシンのチューブリン結合能に影響を及ぼし, 2個のチューブリン結合能のうち1個のみを阻害した。以上のようにより, ミオシン分子内に存在する2個のチューブリン結合部位の性質の差を区別することができた。即ち一方は F-アクチン結合部位とは全く独立的であり, もう一方はアクチンとの競合状態から判断して F-アクチン結合部位の近傍にあることが想像された。

ウニ未受精卵表層の Tubulin 重合阻害因子について

成瀬英典, 酒井彦一 (東大・理・生化)

Inhibitory factor of tubulin assembly from sea urchin egg cortex

HIDENORI NARUSE, HIKOICHI SAKAI

ムラサキウニ未受精卵表層の 0.4MKCl 抽出分画 (CE; Crude Extract) には, *in vitro* における微小管の再構成を阻害し, 再構成された微小管を脱重合させる因子が含まれる。阻害活性の測定はブタ脳から Shelanski 法によって精製した微小管蛋白質 (MTPs) を用い, 粘度計によって行なった。CE を 20mM KCl に対し透析し, 生じた沈澱を 0.4M KCl に Suspend すると阻害因子は再び可溶化される。その分画 (CIF; Crude Inhibitory Fraction) を硫酸分画すると, 30~60%飽和分画 (SAS 60) に阻害活性が見出された。さらに SAS 60を DEAE-Sephadex-A 50 を用いて Column chromatography を行なうと, 阻害因子は 0.5~0.6M KCl で溶出された (PPIF; Partially Purified Inhibitory Fraction)。この PPIF はMTPs の 1.3% の蛋白量で完全な阻害効果を示した。この値は CIF の約 1/10であった。また PPIF は100°C, 10分の熱処理による失活はわずかであったが, Trypsin 処理によってほぼ完全に阻害活性を失ったので, この阻害因子は蛋白性であろうと考えられた。

一方, SAS 60 を Hydroxyapatite で column chromatography を行なうと, 阻害活性は未吸着分画 (I) (0.2M K-Phosphate) と 0.25~0.3M K-Phosphate 溶出分画 (II) のそれぞれに見出された。しかし I は重合の初速度と最終の重合率を低下させるのに対し, II は初速度はあまり抑えないが, 加温して約10分以後徐々に脱重合させる作用をもつ。また, I と II を同時に加えると Tubulin 重合は完全に阻害された。これらのことはウニ卵表層の Tubulin 重合阻害因子が, 重合の Initiation 及び Elongation を阻害する因子と微小管の脱重合を促進する因子とから構成されていることを示唆する。