

1Dp-1

ヒャクニチソウ葉肉細胞培養系におけるチューブリン量調節機構
—チューブリン分子の分解—

福田裕穂 (阪大・理・生物)

光合成細胞として分化したヒャクニチソウ葉肉細胞は、オーキシンとサイトカイニンの存在下、暗黒で培養すると、分裂及びtracheary element 分化を開始する。この過程で、チューブリンの合成が活性化され、チューブリン量の増加、それに伴う微小管の増加がおこる (H. Fukuda, PCP, 1987, in press)。今回は、チューブリン量調節の重要な要素である分解活性について、微小管の重合・脱重合状態との関連において研究した。

in vivo でのチューブリンの分解活性は、放射性メチオニンでパルスチェイス後、チューブリン分子へのラベルの取り込みを測定し求めた。チューブリンの同定は、二次元電気泳動法により行ない、チューブリンに相当するスポットを切り出しラベルを測定した。

まず、チューブリンの分解活性が微小管の重合状態と関連しているかどうかを調べた。チェイス時に、微小管破壊剤であるコルヒチンを加えておくと、チューブリンの分解が促進された。チェイス後9時間目に、対照ではチューブリンの分解がほとんど見られないのに対し、コルヒチン処理した細胞では、 α 、 β チューブリンとも、その75%が分解した。このコルヒチンによる分解は、チューブリンに特異的であり、他のタンパクのラベル量は変化しなかった。次に、このコルヒチンの作用が微小管破壊によるものであることを確かめた。コルヒチン(100 μ M)の他に、微小管破壊剤として知られているアミプロホスメチル(1 μ M)、プロピズアミド(100 μ M)、クレマート(1 μ M)で処理したところ、いずれもチューブリンの分解を促進した。そして、微小管の破壊をチューブリン抗体を用いた間接蛍光抗体法により調べたところ、薬剤による微小管破壊の程度とチューブリン分解の程度の間に強い相関がみられた。これらの結果は、微小管の破壊がチューブリン分子の不安定化を生み出すことを示している。

チェイス時にコルヒチンと同時にシクロヘキシミドを存在させると、チューブリンの分解が抑制された。間接蛍光抗体法で調べたところ、シクロヘキシミド存在化でも微小管は壊れていた。したがって、シクロヘキシミド処理は微小管を安定化するのでなく、遊離したチューブリンの分解を妨げているのだと考えられる。この薬剤はタンパク合成阻害剤であることから、遊離チューブリンを分解する因子が継続的に合成されており、シクロヘキシミドはその合成を抑えることによりチューブリンを安定に保つと思われる。

次に、培養過程におけるチューブリンの安定性を調べた(図1)。培養段階に応じて安定性が大きく変化した。1日目目の細胞ではチューブリンは非常に安定である。2日目にはかなり不安定になる。4日目にはちょうど中間の安定性を示した。チューブリンが最も不安定だったのは、微小管が量においても配列においても最もダイナミックに変化する時期であった。そして、この不安定化もシクロヘキシミドは抑制した。また、微小管破壊剤によるチューブリンの分解促進は最も安定なチューブリンをもつ1日目目の細胞において顕著であった。これらの結果は、チューブリンの安定性はde novo で変化しており、微小管がダイナミックに変動する時には、チューブリンは遊離する機会が増え、分解され易くなることを示唆している。そして、de novo のチューブリン分解にも継続的に合成されるタンパク性の因子が関連していると思われる。

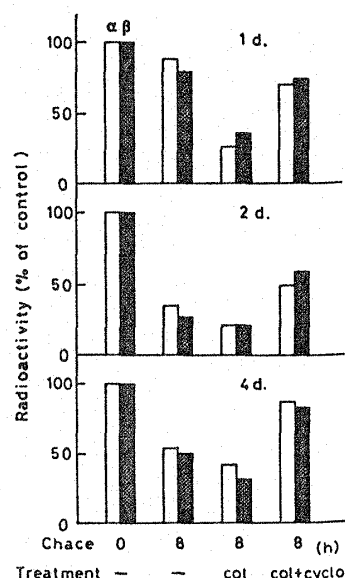


図1・培養過程における
チューブリンの安定性