



Title	Isolation of microtubule-associated proteins from tobacco BY-2 cells.
Author(s)	姜, 昌杰
Citation	大阪大学, 1992, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/38075
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	姜 昌 杰
博士の専攻分野の名称	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	第 1 0 4 2 2 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 4 年 9 月 28 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当 理学研究科 生理学専攻
学 位 論 文 名	Isolation of microtubule-associated proteins from tobacco BY-2 cells. (タバコ培養細胞BY-2の微小管結合タンパク質の単離)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 柴 岡 弘 郎 (副査) 教 授 永 井 玲 子 教 授 浅 野 朗

論 文 内 容 の 要 旨

細胞内に於ける微小管のダイナミックスを理解するためには微小管を構成している蛋白質を単離同定する必要があるが、植物細胞においては細胞体積の大部分を占めており、プロテアーゼなど有害物質を多く含む液胞の存在などの原因で微小管蛋白質の単離は非常に困難であった。

本研究ではタバコ培養細胞BY-2より単離した細胞壁と液胞を含まないミニプロトプラストを用いて細胞抽出液を調製することにより、このような問題を解決することができた。

(1) 細胞抽出液中での微小管の重合

BY-2ミニプロトプラストを抽出用緩衝液に懸濁してホモゲナイズし、超遠心を行い上清から細胞抽出液を得た。この抽出液を30℃で40分間インキュベートした後、抗チューブリン抗体を用いる間接蛍光抗体法により観察をおこなったところ、多くの微小管が重合し太くて長い束を形成していることが明らかとなった。微小管安定剤の非存在下で、植物の粗抽出液中で微小管の重合に成功した例はいまだ報告されておらず、今回が初めてである。この成功は抽出液を調製する前に液胞を除去したことにより、抽出液中のチューブリン及び微小管の重合に必要な因子がよく保存されたことによるものと考えられる。電顕観察では隣接する微小管の間に二種類の長さの異なる架橋構造が観察された。長い架橋構造の長さは約20-25nmで、短い方は約12-15nmであった。

(2) 微小管蛋白質の単離

多量の微小管蛋白質を得る目的で、微小管のタキソール存在下での重合(30℃20分)とCa²⁺、NaCl存在下低温処理(0℃, 40分)による脱重合を繰り返した。重合・脱重合を三回繰り返して得た微小管蛋白質をSDS-PAGEで解析したところ、チューブリン・バンドの他に分子量が約120, 110, 65kDaの三つの蛋白質のバンドが見出された。これらの蛋白質は3サイクルの重合・脱重合を通してチューブリンと共重合すること、また重合・脱重合のサイクルが進むにつれ濃縮されることから高等植物細胞の微小管結合蛋白質(MAP)であると考えられる。

(3) 微小管束化因子の精製

陰イオン交換クロマトグラフィー(MonoQ カラム)により微小管蛋白質を分画し、それぞれのフラクションを in

vitro で重合させた微小管と共にインキュベートする方法により微小管束化活性を調べた。微小管束化活性を持つフラクションを SDS-PAGE でアッセイしたところ 65kDa-MAP のみが検出された。このことは 65kDa-MAP が微小管束化因子であることを示唆している。精製された 65kDa-MAP は in vitro で隣接する微小管の間に架橋構造を形成した。チューブリンも同じカラムで精製され、タキソール存在下で重合することがわかった。120kDa-MAP 及び 110kDa-MAP は微小管の束化活性を示さなかった。

(4) 抗 65kDa-MAP 抗体による観察

65kDa-MAP に対するポリクローン抗体を作製した。この抗体は 65kDa-MAP に特異的であった。間接蛍光抗体法により細胞内分布を観察したところ 65kDa-MAP は細胞周期を通して微小管と同じ位置に分布していた。細胞膜ゴーストを作製し、免疫電顕法による観察を行った。金粒子は主に微小管に沿って分布していた。

このような結果から、ミニプロトプラストより調製した細胞抽出液は植物細胞骨格の研究のみならず、植物蛋白質の生化学的研究にとっても非常に有用な実験材料になり得ると考えられる。また、本研究で確立された植物微小管蛋白質の単離法は植物細胞の微小管系細胞骨格の研究において大いに役立つものと考えられる。

論文審査の結果の要旨

姜君はタバコ BY-2 細胞を用い、細胞より液胞を取り除いた後抽出液を調整するという方法で従来困難であった植物微小管蛋白質の単離に成功し、更に微小管の束化因子 65kDa-MAP を精製しその性質を明らかにした。姜君の開発した方法は今後植物細胞からの蛋白質の単離に新たな道を開くものである。よって、本論文は博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと認める。