



Title	牛副腎髓質より、アクチン纖維を切斷する、80kDa Ca2+－依存性アクチン調節蛋白質の精製
Author(s)	蘆野, 伸彦
Citation	大阪大学, 1988, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/36639
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、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏名・(本籍)	あし 蘆	のぶ 野	ひこ 伸	彦
学位の種類	医	学	博	士
学位記番号	第	8258	号	
学位授与の日付	昭和	63年	6月	9日
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当			
学位論文題目	牛副腎髓質より、アクチン繊維を切断する、80kDa Ca ²⁺ —依存性アクチン調節蛋白質の精製			
論文審査委員	(主査) 教 授 蔡内 百治			
	(副査) 教 授 祖父江憲治 教 授 藤田 尚男			

論文内容の要旨

〔目的〕

副腎髓質のカテコールアミン分泌にはCa²⁺やATPが必須である。最近、分泌現象の基盤としての細胞骨格が注目されており、Ca²⁺やATPの役割の一端は細胞骨格の制御にあると考えられている。副腎髓質における細胞骨格系のCa²⁺依存性制御機作の研究が行われ、アクトミオシン系の制御機作の解析が進んでいるものの、その他の系のCa²⁺依存性制御機作は明かではない。本研究は、副腎髓質での細胞骨格系のCa²⁺依存性制御系を検索する一環として、牛副腎髓質より分子量80kDaのCa²⁺依存性アクチン調節蛋白質を精製し、その性質・機能を検討することを目的とした。

〔方法〕

1. 80kDa蛋白質の精製：牛副腎を氷冷生理食塩水で灌流し、血液成分を充分に除去した後、髓質を取り出した。これを0.3M KClを含む緩衝液中でホモジナイズし、超遠心で得られた抽出液を60%飽和硫酸安で濃縮し、続いてセファロース6B・DEAE-セファロースCL-6B・セファクリルS-300の各カラムクロマトグラフィーを行った。さらに、DNase I-アクチン-セファロースカラムを用いて、Ca²⁺依存性にアクチンと結合する蛋白質を精製した。この分画は、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)上、分子量80kDaの蛋白質が主であり、他に微量のアクチンが混在する。アクチンはセファクリルS-200カラムクロマトグラフィーにより容易に分離でき、80kDaの蛋白質がSDS-PAGE上98%の純度で精製された。(以下、この蛋白質を80kDa蛋白質と呼ぶ。)
2. その他：アクチンはウサギ骨格筋、トロボミオシンはニワトリ砂囊平滑筋より精製した。蛋白濃度測定はLowry法、SDS-PAGEはLaemmliの方法に従った。アクチンフィラメント(F-アクチ

ン) 溶液の粘度測定は落下球法により、電子顕微鏡観察は酢酸ウラン陰性染色により行った。free Ca^{2+} 濃度は、 Ca^{2+} -EGTA緩衝系で調節した。

[結果]

1. 80kDa 蛋白質とG-アクチンとの結合：セファクリルS-300カラムクロマトグラフィーから計算される分子量は約70kDa であり、80kDa 蛋白質は単量体として存在すると推定される。80kDa 蛋白質はDNase I-アクチン-セファロースに Ca^{2+} 依存性に結合することから、アクチンモノマー（G-アクチン）と結合すると考えられる。そこで、 Ca^{2+} 存在下あるいは非存在下で、80kDa 蛋白質に対しモル比で10倍のG-アクチンを混合した後、各サンプルをセファデックスG-100カラムクロマトグラフィーで分析した。 Ca^{2+} 存在下では、80kDa 蛋白質はG-アクチンと複合体を形成して、void volume付近に溶出される。そのSDS-PAGE像から、80kDa 蛋白質はG-アクチンと1:1のモル比で結合していることが明らかになった。いっぽう、 Ca^{2+} 非存在下では、80kDa 蛋白質はG-アクチンと結合しなかった。
2. 80kDa 蛋白質のF-アクチン切断作用：各精製過程において、80kDa 蛋白質のカラム溶出パターンと一致して、F-アクチン粘度を減少させる活性が認められた。 Ca^{2+} 存在下で、80kDa 蛋白質は濃度依存性にF-アクチンの粘度減少をきたし、電子顕微鏡観察でも、 Ca^{2+} 存在下においてのみF-アクチンの切断を認めた。従って、80kDa 蛋白質は Ca^{2+} 依存性にF-アクチンを切断すると考えられる。F-アクチンに飽和量のトロポミオシンを添加しておくと、80kDa 蛋白質によるF-アクチンの粘度減少が一部阻害された。
3. 80kDa 蛋白質の Ca^{2+} 感受性：80kDa 蛋白質の添加量を一定にして、種々の Ca^{2+} 濃度下でのF-アクチンの粘度を測定すると、 10^{-6}M 以上の Ca^{2+} 濃度で著明な粘度低下を示した。変性剤を用いないPAGEを行うと、 Ca^{2+} 存在下よりも非存在下のほうが80kDa 蛋白質の易動度が大きかった。これは、 Ca^{2+} の有無により80kDa 蛋白質の構造が変化するため、易動度に差が生じたものと考えられる。以上のことから、80kDa 蛋白質に Ca^{2+} 結合能があると推測される。

[総括]

牛副腎髓質より、各種ゲルクロマトグラフィー・イオン交換ゲルおよびDNase I-アクチン-セファロースを用いて、 Ca^{2+} 依存性にアクチンと結合する80kDa 蛋白質を分離精製した。この蛋白質は単量体として存在し、 Ca^{2+} 依存性にG-アクチンとモル比で1:1に結合する。粘度測定と電子顕微鏡観察から、この蛋白質は Ca^{2+} 依存性にF-アクチンを切断すること、トロポミオシンはこの切断作用を一部阻害することが明らかになった。変性剤を用いないPAGEでの易動度が Ca^{2+} の有無により異なることから、80kDa 蛋白質は Ca^{2+} 結合蛋白質であることが示唆された。以上の結果は、80kDa 蛋白質がゲルゾリン類似のアクチン調節機能を持つことを示すものである。

論文の審査結果の要旨

副腎髓質のカテコールアミン分泌には Ca^{2+} やATPが必須である。最近、分泌現象の基盤としての細胞骨格が注目されており、 Ca^{2+} やATPの役割の一端は細胞骨格の制御にあると考えられている。副腎髓質においては、アクトミオシン系に関する Ca^{2+} 依存性制御機作の解析が進んではいるものの、他の細胞骨格系の Ca^{2+} 依存性制御機作については明かでない。本研究は、牛副腎髓質より分子量80kDaの Ca^{2+} 依存性アクチン調節蛋白質を精製し、以下の性質・機能を明らかにしたものである。

- 1) Ca^{2+} 依存性にG-アクチンと1:1のモル比で結合する。
- 2) Ca^{2+} 依存性にアクチン纖維を切断し、トロポミオシンはその切断作用を一部阻害する。
- 3) Ca^{2+} 感受性を持ち、1), 2) の Ca^{2+} 依存性は生理的濃度の Ca^{2+} ($10^{-7} \sim 10^{-6}$ M) で発揮される。

この成果は、副腎髓質の細胞骨格系における新しい Ca^{2+} 依存性制御機作を解明した点で高く評価されており、よって本論文は学位論文に値すると考えられる。