



Title	牛副腎髄質より，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
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、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・(本籍)	あし 蘆	の 野	のぶ 伸	ひこ 彦
学位の種類	医	学	博	士
学位記番号	第	8 2 5 8	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	牛副腎髄質より, 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 藪内 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〕

副腎髄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。副腎髄質における細胞骨格系の Ca^{2+} 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 Ca^{2+} 依存性制御機作は明かではない。本研究は, 副腎髄質での細胞骨格系の Ca^{2+} 依存性制御系を検索する一環として, 牛副腎髄質より分子量 80kDa の Ca^{2+} 依存性アクチン調節蛋白質を精製し, 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, 血液成分を十分に除去した後, 髄質を取り出した。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, Ca^{2+} 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, トロポ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、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]

牛副腎髄質より、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 蛋白質がゲルポ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

副腎髄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。副腎髄質においては、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いるものの、そ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、牛副腎髄質より分子量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+} 依存性にアクチン繊維を切断し、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+} ($10^{-7} \sim 10^{-6} \text{M}$) で発揮される。

この成果は、副腎髄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価すると考えられる。