

ホタテガイ閉殻筋横紋部からアクチンの調製とその生化学的性質について

誌名	日本水産學會誌
ISSN	00215392
著者名	西田,清義
発行元	日本水産學會
巻/号	43巻7号
掲載ページ	p. 805-812
発行年月	1977年7月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



ホタテガイ閉殻筋横紋部からアクチンの調製と その生化学的性質について

西 田 清 義

(1977年1月6日受理)

Preparation and Biochemical Properties of Actin from Striated Adductor Muscle of Scallop

Kiyoyoshi NISHITA*

An attempt was successively made to prepare G-actin from scallop striated adductor muscle by using the original method of STRAUB.

1) Crude G-actin was extracted from the acetone dried muscle powder of scallop striated adductor muscle in the same yield as from fish dorsal and rabbit skeletal muscles. This G-actin preparation was found to be contaminated with a subunit corresponding to tropomyosin and one or two other unknown proteins on SDS-gel electrophoresis.

2) It was found that ultracentrifugation of crude F-actin in 0.6 M KCl-1 mM $MgCl_2$ at 100,000 g for 120 minutes effectively eliminates the contaminants, while the ordinary reversible polymerization performed in the presence of 0.1 M KCl-1 mM $MgCl_2$ and gel filtration were ineffective.

3) The purified G-actin retains virtually the same ability to polymerize into F-actin as fish dorsal and rabbit skeletal G-actins upon the addition of 0.1 M KCl or 0.1 M KCl plus 1 mM $MgCl_2$.

4) F-actin, obtained in such a way was shown to complex with rabbit skeletal myosin by the fact that reconstituted actomyosin had the identical characteristics of natural actomyosin, that is, positive superprecipitation, high ATP-sensitivity, activation of Mg^{2+} -ATPase activity, and stabilization of Ca^{2+} -ATPase activity against heat.

5) From these results, it was concluded that the biological activities of scallop striated adductor actin are essentially the same as those of fish dorsal and rabbit skeletal actins.

著者らは水棲無脊椎動物、特に貝類の筋肉構造たん白質の特異性を明らかにするために、すでに数種の貝類から収縮系たん白質であるアクトミオシンおよびミオシンを調製して、その生化学的性質について研究し¹⁻⁴⁾、報告して来た。一方、水棲動物筋肉中のもう一つの収縮系たん白質であるアクチンに関しては、魚類背筋⁵⁻⁷⁾について比較的詳細な研究報告があるにもかかわらず、貝類筋肉に関する研究例は従来あまり見られない。しかも、貝類閉殻筋構造たん白質の特性を今後一層明らかにしていくためには、アクチンに関する研究をより深く進めることが急務であると考え。そこで、本研究においては、ホタテガイ閉殻筋から先ずアクチンを調製する方法および精製法を検討し、さらに生化学的性質、たとえば G-アクチンから F-アクチンへの重合能やミオシンとの結合能など生物学的活性を検討しようとした。

* 北海道大学水産学部高分子化学講座 (Laboratory of Biopolymer, Faculty of Fisheries, Hokkaido University, Hakodate, Japan).

Striated adductor muscle

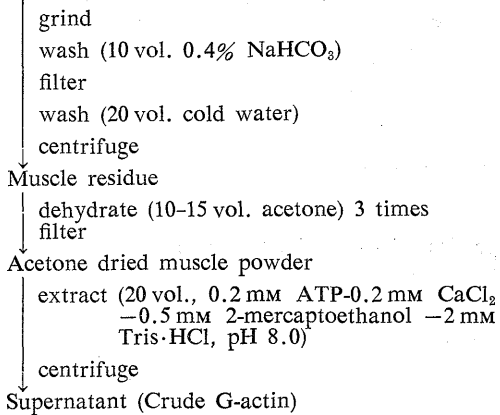


Fig. 1. Preparative methods of G-actin from the striated adductor muscle of scallop.

(-20°C) で 30 分, さらに 10 倍容量の常温のアセトンで約 1 時間処理し, 同じく減圧ろ過した後, 室温で風乾した。通常, 100 g の閉殻筋から約 8~10 g のアセトン粉末が得られた。

アクチンの抽出法 アセトン粉末 5g に対し, 100 ml の 0.2 mM ATP-0.2 mM CaCl_2 -0.5 mM 2-メルカプトエタノール-2 mM Tris-HCl, pH 8.0⁹⁾ を加え, 0°C で 20 分間抽出した。つづいて 20,000 \times g で 15 分遠心分離し, 上澄として粗 G-アクチンを得た。5g のアセトン粉末から, たん白質量約 300 mg の粗 G-アクチンが得られた。以上述べたアセトン粉末調製法並びに G-アクチンの抽出法は Fig. 1 にその概略を示した。

ミオシンの調製 ウサギ骨格筋ミオシンは江橋らの方法⁸⁾ によつて調製した。この方法で調製したウサギのミオシンの ATP 感度は 1~5 であり, Ca^{2+} -ATPase 活性は 60 mM KCl, 5 mM CaCl_2 , 1 mM ATP, 0.1~0.2 mg ミオシン, 25 mM Tris-maleate pH 7.0 の存在のもとに 25°C で生成する無機りんを測定した結果, 0.9~1.4 $\mu\text{mol Pi}/\text{min}\cdot\text{mg}$ ミオシンであつた。

G-アクチンから F-アクチンへの重合の測定 魚類アクチンに関する北尾らの報告⁶⁾ にならつて測定した。すなわち, たん白質濃度が 2~4 mg/ml の G-アクチンの溶液を作り, その 1.9 ml をオストワルド粘度計にとり, 25°C に保持して粘度を測定する。次に 2 M KCl 0.1 ml を加え混和した後, 時間経過にともなう粘度の変化を測定した。粘度計は溶媒 (2 ml) の流過速度が 30 秒前後のものを使用した。

Sephadex G-200 によるゲルろ過 0.2 mM ATP-0.2 mM CaCl_2 -0.5 mM 2-メルカプトエタノール-2 mM Tris-HCl, pH 8.0 で十分に洗浄して平衡化した Sephadex G-200 のカラム (2.6 \times 93 cm) に粗 G-アクチン 50~60 mg (5 ml) を供試し, 同溶液で G-アクチンを溶出した。溶出液は 5 ml ずつ分取し, ミクロビレット法でたん白濃度を測定した。

再構成アクトミオシンの ATPase 活性測定, Ca^{2+} -ATPase の温度安定性の判定および SDS-ポリアクリルアミド電気泳動法については前報⁹⁾ において述べた通り行なつた。超沈澱の観察および ATP 感度の測定は新井らが行つた魚肉構成たん白質への応用例¹⁰⁻¹¹⁾ にならつて行なつた。

実験結果

STRAUB 法に準じて調製したホタテガイ閉殻筋の G-アクチンは F-アクチンへの重合能およびミオシンとの結合能など, 重要な生物学的活性を保持していることが確かめられる (後述)。しかし, その純度についてはまだ充分な標品ではないことが SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法によつてわかる。すなわち, その結果を Fig. 2 に示すが, 明らかにトロポミオシンに由来すると思われるバンドとその他に推定不能のバ

実験方法

アセトン粉末の調製 ホタテガイ (*Patinopecten yessoensis*) 閉殻筋から STRAUB の方法⁸⁾ に準じてアセトン粉末を調製した。すなわち, Fig. 1 に示したように, 新鮮なホタテガイ閉殻筋横紋部を乳鉢で磨砕した後, 10 倍容量の 0.4% NaHCO_3 を加え 15°C 以下で 30 分攪拌して洗浄し, 二層のガーゼでろ過した。この洗浄を合計 3 回繰返したのち, 20 倍容量の冷水 (4°C) を加えて洗い, 遠心分離 (10,000 \times g, 15 min) して得られる筋肉残渣に 10~15 倍容量のアセトン (-20°C) を強く攪拌しながら速やかに加え, 約 30 分後に東洋ろ紙 No. 5c を使用して減圧ろ過した。次に, 筋肉残渣を約 10 倍容量の冷アセトン

(-20°C) で 30 分, さらに 10 倍容量の常温のアセトンで約 1 時間処理し, 同じく減圧ろ過した後, 室温で風乾した。通常, 100 g の閉殻筋から約 8~10 g のアセトン粉末が得られた。

ンドが混在している。

G-アクチンの精製 そこでこの粗 G-アクチン標品から不純物を除去することを目的とし、まず Sephadex G-200 によるゲル濾過を行った。すなわち、Sephadex G-200 の 2.6×93 cm カラムに粗 G-アクチン 50~60 mg を供試し、ゲル濾過を行った結果を Fig. 3 に示す。この図に示された G-アクチンの溶出パターンはウサギや魚類の筋肉のアクチンの場合の溶出パターンとよく類似しており、主に二つのピークに分画されるが、たん白質組成を推定するために、図中に示した a~d の 4 画分を凍結乾燥して SDS-ポリアクリルアミド電気泳動に供試した。その結果を Fig. 3 の図中の右部にあわせて示した。これによると粗 G-アクチンに混在するトロポミオシンと思われるたん白質成分は初めの小さなピークとして溶出され (a), アクチンに相当する第 2 の大きなピーク (c, d) には認められない。しかし、他に 2 つの微量バンドがまだ夾雑していることがわかる。したがって、粗 G-アクチン中の不純物はゲル濾過によつて除去することが出来ないということになる。そこで次に、G-アクチンの重合-脱重合による精製法の応用を試みた。すなわち、粗 G-アクチンを $0.1 \text{ M KCl}-1 \text{ mM MgCl}_2$ の条件下で、約 1 時間室温で放置して F-アクチンに重合させた後、 $100,000 \text{ g}$ で 2 時間遠心分離して F-アクチンのペレットを集める。次にペレットを $0.2 \text{ mM ATP}-0.2 \text{ mM CaCl}_2-0.5 \text{ mM 2-メルカプトエタノール}-2 \text{ mM Tris-HCl}$, pH 8.0 に 3 日間攪拌透析することによつて脱重合させ、上澄に G-アクチンを集めた。この操作を一回行つた G-アクチン標品の SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動によると、この方法によつてもなお、夾雑たん白質を完全に除去することが出来ないことを知つた。

そこでさらに、SPUDICH らの方法¹²⁾を採用して G-アクチンの精製を行なおうと試みた。すなわち、粗 G-アクチンを $0.05 \text{ M KCl}-1 \text{ mM MgCl}_2$ の条件下で室温で重合させたのち、溶液の KCl 濃度を 0.6 M に調整して、ゆつくり静かに 1 時間攪拌した。その後、 $100,000 \text{ g}$ で 2 時間遠心分離して F-アクチンのペレットを集め、上述と同様の方法で $0.2 \text{ mM ATP}-0.2 \text{ mM CaCl}_2-0.5 \text{ mM 2-メルカプトエタノール}-2 \text{ mM Tris-HCl}$, pH 8.0 に対

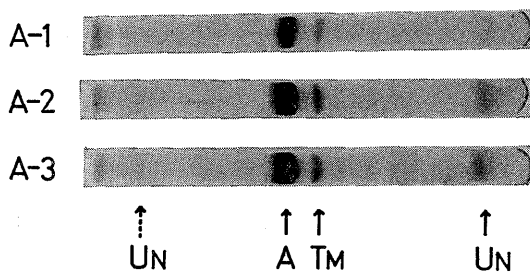


Fig. 2. SDS-polyacrylamide gel electrophoretic patterns of crude scallop actins.

Proteins (approx. $25 \mu\text{g}$) were applied to 8% polyacrylamide gel and electrophoresed at 8 mA per tube.

A-1, A-2, and A-3, Crude actin preparations 1, 2, and 3; TM, Tropomyosin; UN, Unknown protein.

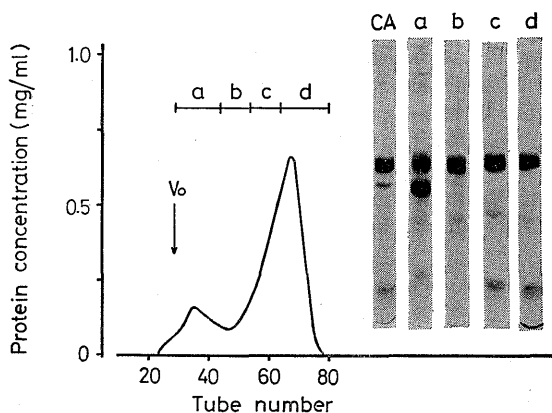


Fig. 3. Gel filtration of crude scallop G-actin on Sephadex G-200 and SDS-polyacrylamide gel electrophoretic patterns of chromatographed actin.

Fifty mg protein was applied to a column (2.6×93 cm) and eluted with $0.2 \text{ mM ATP}-0.2 \text{ mM CaCl}_2-0.5 \text{ mM 2-mercaptoethanol}-2 \text{ mM Tris-HCl}$, pH 8.0 at a flow rate of 12 ml per hour. The protein concentration was determined by microbiuret method.

Electrophoretic conditions are the same as in Fig. 2.

The inserted figures of a, b, c, and d are the SDS-polyacrylamide gel electrophoretic patterns of the fractions a, b, c, and d respectively. (CA, crude actin).

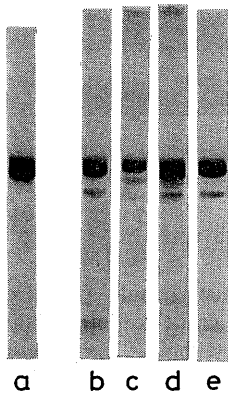


Fig. 4. SDS-polyacrylamide gel electrophoretic patterns of scallop and rabbit actins.

- a, Purified scallop actin (30 μg) by SPUDICH method
 b, Crude scallop actin (25 μg)
 c, Crude rabbit actin (25 μg)
 d, Scallop actin (25 μg) + rabbit actin (25 μg)
 e, Scallop actin (10 μg) + rabbit actin (10 μg)

Electrophoretic conditions are the same as in Fig. 2.

して透析して脱重合し、G-アクチンを集めた。この方法によつて得たG-アクチンのSDS-ゲル電気泳動図をFig. 4aに示したが、この操作によつてアクチンは高度に精製され、すべての夾雑たん白質は完全に除去されたことが確かめられる。

なお、ホタテガイの粗G-アクチンとウサギの粗G-アクチンを等量混合してSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行つた結果をFig. 4dおよびeに示すが、主成分はまったく同じ易動度の単一バンドとなるので、両者の分子量はきわめてよく似ていると思われる。

以後の実験には、Fig. 1の方法に従つて調製した粗アクチンおよびSPUDICHらの方法によつて精製したアクチンを使用して、その諸性質の比較検討を行なつた。

G-アクチンの重合能 まず、粗G-アクチンおよび精製G-アクチンの25°Cにおける重合能を粘性の変化から測定した。はじめに粗G-アクチンの重合の場合をFig. 5A)に示す。

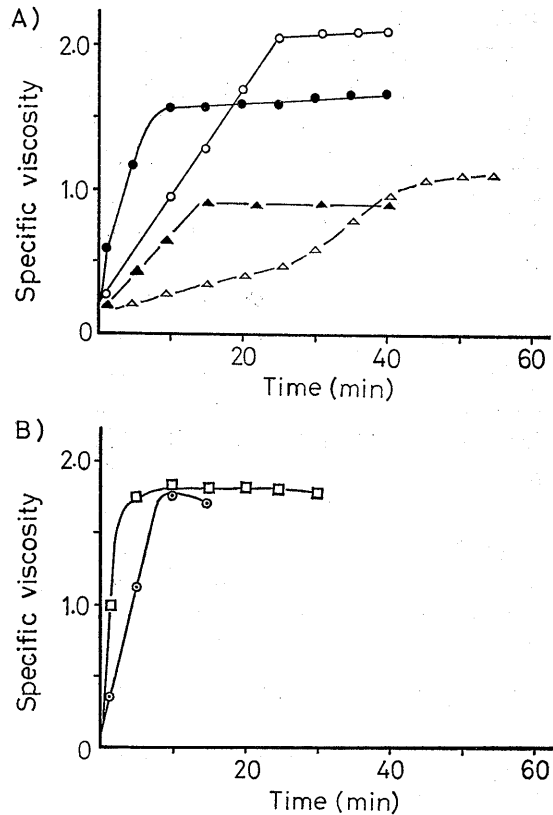


Fig. 5. Effect of salts on the polymerization of G-actin.

A) At zero time, a salt solution (KCl and Mg) was added to various concentration of crude scallop G-actin in 0.2 mM ATP -0.2 mM CaCl₂-0.5 mM 2-mercaptoethanol-2 mM Tris-HCl, pH 8.0.

- 0.1 M KCl, G-actin concentration 4.3 mg/ml
 ●-● 0.1 M KCl plus 1 mM MgCl₂, G-actin concentration 4.3 mg/ml
 △-△ 0.1 M KCl, G-actin concentration 2.6 mg/ml
 ▲-▲ 0.1 M KCl plus 1 mM MgCl₂, G-actin concentration 2.6 mg/ml

B) At zero time, 0.1 M KCl was added to purified scallop G-actin.

G-actin was purified by the method of SPUDICH *et al.*

- Scallop G-actin, 2.0 mg/ml
 ⊙-⊙ Rabbit G-actin, 2.0 mg/ml

Viscosity was measured at 25±0.1°C using a 2 ml Ostwald type viscosimeter (out-flow time, 30 seconds for water).

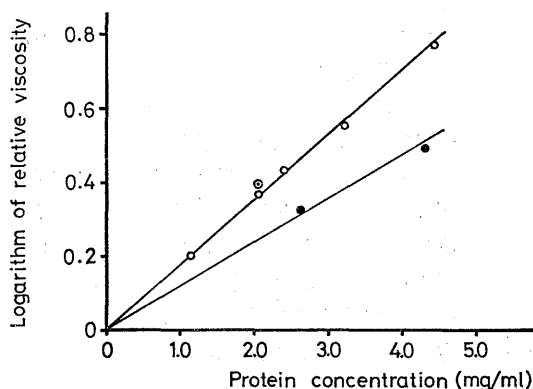


Fig. 6. Plots of logarithm of relative viscosity of polymerized actin versus protein concentrations.

Experimental conditions were the same as in Fig. 4.

Maximum values of relative viscosity reached after addition of KCl, were plotted with different protein concentrations at 25°C.

- Scallop purified actin
- Scallop crude actin
- Rabbit skeletal actin

その結果によれば、ホタテガイ閉殻筋の粗 G-アクチンは、ウサギ骨格筋や魚類背筋のアクチンと同じように、0.1 M KCl または 0.1 M KCl-1 mm MgCl₂ の条件下で著しく重合することがわかる。また、MgCl₂ が存在する時は存在しない時と比べて重合反応は速く進行する傾向も同じである。次に、精製 G-アクチンの重合の場合を Fig. 5B) に示す。これによると精製 G-アクチンは粗 G-アクチンの場合よりもかなり速やかに重合し、また、高い粘性に達することがわかる。そこで F-アクチンのたん白質濃度と到達した最高の相対粘度の対数值 (log η_r) の関係をプロットしてみた。その結果を Fig. 6 に示す。この結果から明らかのように、ホタテガイの G-アクチンから得られる F-アクチンはその log η_r とたん白質濃度とは比例関係があり、また、その濃度依存性は粗アクチンよりも精製アクチンの方が大きく、その上、精製アクチンの場合はウサギの F-アクチンの場合と同程度であつた。粗製アクチンにおいてはトロポミオン等の夾雑たん白質の影響があるものと考えられる。

ミオシンとの結合能 次に、ホタテガイ閉殻筋の F-アクチンとウサギ骨格筋のミオシンとの結合能を、超沈澱能の変化、ATP 感度の変化、Mg²⁺-ATPase の活性化および Ca²⁺-ATPase の温度安定性の変化を指標として検討した。

まず、ホタテガイの F-アクチンとウサギのミオンを重量比で 1:1 に混合し、4°C で一晩放置した後、超沈澱能を観察した。結果を Fig. 7 に示すが、ATP 添加後 2 分以内に栓状沈澱を形成しており、アクトミオンが構成されていることがわかる。

次に、ホタテガイの F-アクチンとウサギのミオンを、KCl 濃度を 0.6 M に保ちつつ、異なる重量比で混合し、40°C で一夜放置した後 ATP 感度を測定した結果を Fig. 8 に示す。すなわち、使用したウサ

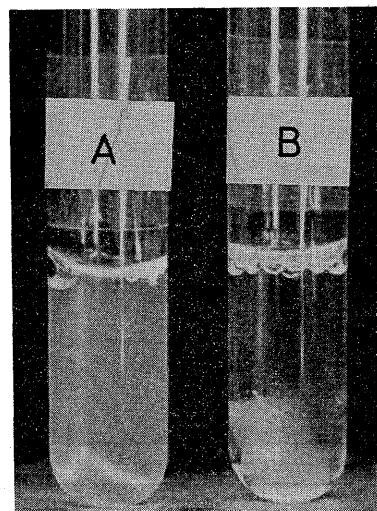


Fig. 7. Superprecipitation of reconstituted actomyosin.

Observation of superprecipitation was made at protein concentration of 1.0 mg/ml in 0.1 M KCl, pH 7.0 by addition of ATP to a final concentration of 1 mm.

Actomyosin was reconstituted with rabbit myosin and purified scallop actin at a ratio of 1:1 (w/w).

A, Rabbit myosin alone

B, Reconstituted actomyosin

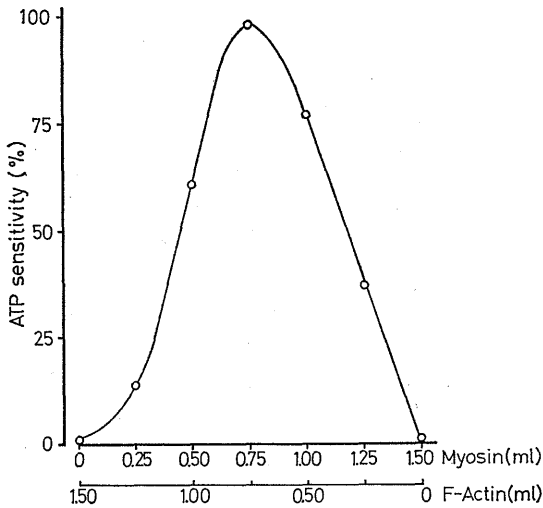


Fig. 8. ATP sensitivity of reconstituted actomyosin from rabbit myosin and purified scallop actin.

F-actin (5.0 mg/ml) and myosin (5.0 mg/ml) in 0.6M KCl containing 50mM Tris-maleate, at pH 7.0 were mixed at various weight ratios as cited on abscissa. Viscosity was measured at 10°C.

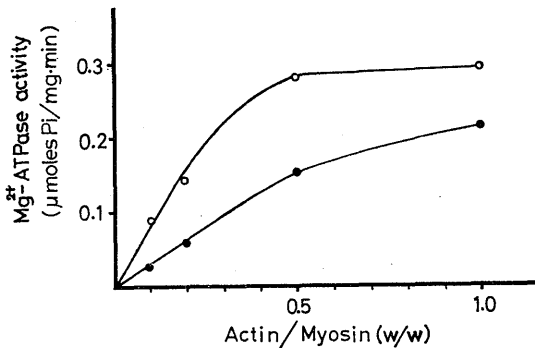


Fig. 9. Activation effect of scallop actin on Mg²⁺-ATPase activity of rabbit myosin.

The ATPase assay were performed at 25°C in the reaction mixture of 1mM MgCl₂, 12mM KCl, 0.5mM EGTA, 25mM Tris-maleate, pH 7.0 and protein, 0.1 mg/ml. Mg²⁺-ATPase activity was shown as μmoles Pi liberation per minute per mg of myosin.

- , Purified F-actin
- , Crude F-actin

ギ骨格筋のミオシンの ATP 感度は 3 であるが、ホタテガイの F-アクチンと結合して最高値で 92 に達していることが示されている。この場合、粗 F-アクチンを用いたときも、再構成アクトミオシンの ATP 感度は 85 となり、ほぼ同値に達していた。

さらに、ATP 感度の場合と同じ操作法によつてアクチンとミオシンを混合した後、その Mg²⁺-ATPase 活性を測定した。その結果を Fig. 9 に示す。それによると、ホタテガイの F-アクチンはウサギのミオシンと結合し、Mg²⁺-ATPase を著しく活性化するが、粗アクチンによる活性化は精製アクチンの場合よりも劣っていた。ただし、図には示さないが粗アクチンの場合は、アクチン量がミオシンの 2 倍量に達するまで徐々にではあるが活性化をつづけており、一方、精製アクチンの場合はミオシンの 1/2 量添加したとき、最高の活性となり一定値に達していた。この両者の相違はアクチンの純度に起因するものであろう。

なお最後にホタテガイの精製 F-アクチンとウサギのミオシンを 1:1 の重量比で混合し再構成したアクトミオシンと、ウサギのミオシンの Ca²⁺-ATPase の 40°C における温度安定性を比較検討した。すなわち、ミオシン Ca²⁺-ATPase はアクチンと結合すると、著しく安定化されるという事実¹⁰⁾を利用して結合能を確かめようと試みた。この実験結果を Fig. 10 に示す。また Ca²⁺-ATPase の一次反応による失活速度も計算した。結果もあわせて図中に示す。この結果では、40°C におけるウサギのミオシン Ca²⁺-ATPase の失活速度恒数 (Kd) は 216 × 10⁻⁵ (sec⁻¹)、再構成アクトミオシンのそれは 6.9 × 10⁻⁵ (sec⁻¹) となり、その Ca²⁺-ATPase 活性が約 30 倍安定化されたことから、ホタテガイの精製 F-アクチンがウサギのミオシンとよく結合したことが確かめられる。

考 察

ホタテガイ閉殻筋横紋部を STRAUB 法によつてアセトン粉末とし、G-アクチンを調製すると、この標品は従来ウサギ骨格筋および魚背筋 (ティラピア) で報じられた G-アクチンと本質的

に同じ生物学的活性を保持するものであることが、本研究の成果から知られた。この調製法において 0.4% NaHCO_3 で筋肉を洗うとき、温度をあまり高くしない方が、アクチン抽出時に肉がよく膨潤してアクチンの収量がよいことを経験として知つたので著者は 15°C 以下で洗浄する方法を採用している。

ホタテガイの G-アクチンが F-アクチンへ重合する能力は、その重合速度と到達する粘度からみると、ウサギ G-アクチンの場合とほぼ同程度かやや高いくらいであるが、たん白質濃度が低いときは、重合速度が特に遅くなるような異常な傾向が見られる。しかし、精製 G-アクチンではそのような傾向は認められないので、おそらく不純たん白質成分の影響のせいであろうと思われる。実際に、粗 G-アクチン標品の SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動によると、トロポミオシンを含む微量の 2~3 成分の夾雑が認められている。G-アクチンの重合の核になるオリゴマーの生成を遅らせる γ -アクチン¹⁴⁾などの混在の程度も今後の研究課題になると思われる。

ホタテガイの G-アクチンの精製法としては SPUDICH らの方法が最良であることがわかり、高度に純粋なアクチンが調製出来る。SDS-ゲル電気泳動によれば、この G-アクチン標品はアクチンに由来する以外のたん白質成分を含まず、これから得た F-アクチンはミオシンと結合させた後、 Ca^{2+} -感受性を保持していないことも別な予備の実験で確めた。すでに KENDRICK-JONES や SZENT-GYÖRGYI によれば、ホタテガイ閉殻筋収縮性たん白質の Ca 制御は脊椎動物骨格筋などの場合と異なり、ミオシンの Light chain に局在すると報告されているが¹⁵⁻¹⁷⁾、この問題についても現在、本方法で調製したアクチンを使用して研究を進めている。

なお、本方法に従って最近アカザラガイ閉殻筋横紋部からも生物学的活性を有するアクチンを調製出来ることを確認した。

本研究の遂行にあたり御指導と御助言をいただいた北海道大学水産学部の新井健一助教授ならびに石原義雄教授に深謝申し上げます。

文 献

- 1) 西田清義: 本誌, **41**, 1003-1008 (1975).
- 2) 西田清義・福山龍次・石原義雄: 同誌, **43**, 229-235 (1977).
- 3) 西田清義: 同誌, **43**, 335-341 (1977).
- 4) 西田清義: 同誌, **43**, 553-557 (1977).
- 5) 関 伸夫・北尾 勝・今野久仁彦・新井健一: 同誌, **39**, 1211-1219 (1973).
- 6) 北尾 勝・関 伸夫・新井健一: 同誌, **39**, 1263-1269 (1973).
- 7) 新井健一・北尾 勝・関 伸夫: 同誌, **40**, 105-110 (1974).
- 8) 江橋節郎ら: 細胞生物物理研究法, Vol. 2, 吉岡書店, 東京, 1969, pp. 247-303.
- 9) M.K. REES and M. YOUNG: *J. Biol. Chem.* **242**, 4449-4458 (1967).

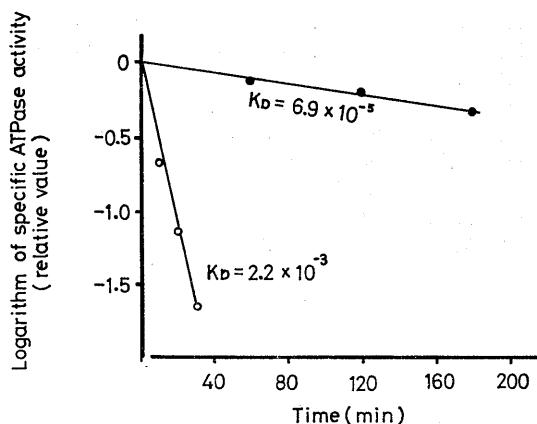


Fig. 10. Logarithm of Ca^{2+} -ATPase activities of reconstituted actomyosin and rabbit myosin at 40°C as a function of time.

Actomyosin was reconstituted by mixing the purified scallop actin and rabbit myosin at a ratio of 1:1 (w/w).

Incubation of reconstituted actomyosin (4.0 mg/ml) and rabbit myosin (3.9 mg/ml) was performed at pH 7.0 in 0.6 M KCl-0.05 M Tris-maleate and at 40°C. Ca^{2+} -ATPase activity was measured in a medium of 50 mM Tris-maleate, pH 7.0, 5 mM CaCl_2 , 1 mM ATP and protein, 0.2 mg/ml at 25°C.

○—○, Rabbit myosin

●—●, Reconstituted actomyosin

- 10) 新井健一・高士令二・齋藤恒行: 本誌, **36**, 237-240 (1970).
- 11) 新井健一・高士令二・齋藤恒行: 同誌, **36**, 487-490 (1970).
- 12) J.A. SPUDICH and S. WATT: *J. Biol. Chem.*, **246**, 4866-4871 (1971).
- 13) 室塚剛志・高士令二・新井健一: 本誌, **42**, 57-63 (1976).
- 14) M. KURODA and K. MARUYAMA: *J. Biochem.*, **80**, 315-322 (1976).
- 15) A.G. SZENT-GYÖRGYI, E.M. SZENTKIRALYI, and J. KENDRICK-JONES: *J. Mol. Biol.*, **74**, 179-203 (1973).
- 16) J. KENDRICK-JONES: *Nature*, **249**, 631-634 (1974).
- 17) W. LEHMAN and A.G. SZENT-GYÖRGYI: *J. Gen. Physiol.*, **66**, 1-30 (1975).