

*Amoeba proteus*からのアクチンゲル化タンパク質の精製と解析

西上 幸範, 谷口 篤史, 新免 輝男, 園部 誠司 (兵庫県大・院・生命理学)

Purification and characterization of actin gelation protein of *Amoeba proteus*

Yukinori NISHIGAMI, Atsushi TANIGUCHI, Teruo SHIMMEN and Seiji SONOBE
(Graduate Sch. Life Science, Univ. Hyogo)

SUMMARY

In the cytoplasm of the free living amoeba, *Amoeba proteus*, there are gel and sol layers, and gel-sol transformation is a dynamic and an interesting phenomenon. To help understand the mechanism of gel-sol transformation, we purified an actin gelation protein from *Amoeba proteus* and characterized it. After being suspended in extraction buffer, cells were ruptured using a Teflon homogenizer. The homogenate was centrifuged, and EGTA was added to the supernatant. The mixture was centrifuged and the precipitate was washed with a washing buffer, and suspended in a solution of higher Ca^{2+} concentration. After centrifugation, the supernatant was collected. Hereafter the supernatant thus prepared is called crude extract. Actin gelation activity of the crude extract was measured by the falling ball assay. To purify the actin gelation protein, the crude extract was successively separated by an anion exchange column, a hydroxyapatite column and a gel filtration column. Finally we obtained a 150-kDa protein that showed actin gelation and F-actin binding activity in a Ca^{2+} -independent manner. However, the crude extract showed these activities only at low Ca^{2+} concentrations. It is speculated that the crude extract contained an actin severing factor(s) and/or an actin depolymerization factor(s). Alterna-

tively, the crude extract could contain a factor(s) that inhibits actin gelation activity of the 150-kDa protein at high concentrations of Ca^{2+} .

【目的】 *Amoeba proteus*の細胞質中には、活発に流動が起こるゾル層と流動があまり起こらないゲル層がある。このゾル層とゲル層は細胞の状況に応じて刻々と変化する(Komnick et al., 1973)。細胞内におけるゲルとゾルの局在や変換がどのような機構によるのかは明らかになっていない。この機構を明らかにするため、*A. proteus*から、F-actinに結合しゲル化を起こすタンパク質の精製と解析を行った。

【材料と方法】 *A. proteus*はKCM溶液(0.7 mg/l KCl, 0.8 mg/l CaCl_2 , 0.8 mg/ml $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)中で培養し、餌として*Tetrahymena pyriformis*を週に二回与えた。2日間飢餓状態にした*A. proteus*を遠心して集め、これに等量の破碎緩衝液(20 mM PIPES (pH7.0), 2 mM MgCl_2 , 1 mM CaCl_2 , 1 mM DTT, 2 mM PMSF, 40 $\mu\text{g/ml}$ leupeptin, 40 $\mu\text{g/ml}$ pepstatinA)を混合しテフロンホモジェナイザーで破碎した。破碎液を遠心(400,000 g, 20分:以下同条件)し、上清にEGTAを2 mMとなるよう加えた。その後、遠心し生じた沈殿を2 mM EGTAを加えた破碎緩衝液で洗った。さらに CaCl_2 濃度を1 mMにした破碎緩衝液で沈殿を懸濁し、遠心して得られた上清を粗抽出液とした。

粗抽出液のゲル化活性を落下球法(MacLean-Fletcher, S. D., and Pollard, T. D.)で測定した(以下この方法でゲル化活性を追った)。次に粗抽出液をAE-A緩衝液(20 mM PIPES (pH7.0), 1 mM DTT)で平衡化したイオン交換カラム(DEAE Sephacel, GEヘルスケア)に吸着させ、0–1 M NaClで溶出し、各フラクションのゲル化活性を調べた。次にゲル化活性がみられたフラクションをHA-A緩衝液(20 mMリン酸カリウム緩衝液(pH 7.0), 1 mM DTT)で平衡化したハイドロキシアパタイトカラム(Hydrixyapatite bio-gel HTP gel, バイオラッド)に吸着させ、0–400 mMリン酸カリウム緩衝液(pH 7.0)で溶出し、ゲル化活性を測定した。活性が確認されたフラクションを選び、G緩衝液(30 mM PIPES (pH7), 30 mM KCl, 2 mM MgCl_2 , 0.1 mM ATP, 1 mM DTT, 1 mM EGTA)で平衡化したゲルろ過カラム(Sephacryl S-300, GEヘルスケア)にかけ、各フラクションのゲル化活性を測定した。

【結果】 *A. proteus*から粗抽出液を得、この溶液のアクチンゲル化活性を測定したところ低濃度の Ca^{2+} 条件下でのみゲル化活性がみられた。

続いて粗抽出液をアクチンのゲル化活性を追いながら各種クロマトグラフィーで処理し、得られたアクチンゲル化活性を持つフラクションは Ca^{2+} 濃度に関係なくゲル化活性があった。このフラクションには150 kDa付近にCBB染色で確認できる1本のバンドが確認された。

次に150 kDaタンパク質のF-アクチンとの結合性の Ca^{2+} 濃度依存性を共沈殿法で調べた。その結果、150 kDaタンパク質は Ca^{2+} 濃度非依存的にF-アクチンと結合することが分かった。

【考察】 粗精製液調製過程でのF-アクチンとゲル化タンパク質の解離は Ca^{2+} 濃度を上昇させることで行った。また粗精製液のアクチンゲル化活性が低濃度 Ca^{2+} 条件下でみられるのに対し、高濃度 Ca^{2+} 条件下では見られない。これらのことから粗精製液中のゲル化タンパク質が低濃度 Ca^{2+} 条件下でF-アクチンを架橋し、高濃度 Ca^{2+} 条件下ではF-アクチンを架橋しないと考えられる。しかし精製した150 kDaタンパク質は Ca^{2+} 濃度非依存的なアクチンゲル化活性があった。また、F-アクチンとの結合も Ca^{2+} 濃度非依存的であった。これらのことから150 kDaタンパク質は Ca^{2+} 濃度に関わらずアクチンを架橋すると考えられる。では粗精製液中でみられる Ca^{2+} 感受性は何に由来するのだろうか。可能性として粗精製液中に150 kDaタンパク質以外の高 Ca^{2+} 濃度条件下で活性を持つ切断因子または脱重合因子が含まれていたことが考えられる。あるいは150 kDaタンパク質に Ca^{2+} 感受性を与える調節因子などが含まれていた可能性もある。今後はこれらの可能性を検討したい。

【文献】

- Komnick, H., Stockem, W., and Wohlfarth-Bottermann, K.E., (1973) *Int Rev Cytol*, 34, 169 - 249
 MacLean-Fletcher, S. D., and Pollard, T. D., (1980) *J Cell Biol*, 85, 414 - 28