

0.01% β -メルカプトエタノール (pH 8.2) に対して透析し、可溶分画 (Fr I); と不溶分画 (Fr II) を得た。Fr I と Fr II の成分について検討した。Fr I をシロ糖密度勾配超遠心すると、30 S ダイニン、14 S ダイニン、4 S タンパクに分画される。30 S ダイニン分画に強い ATP : AMP-phosphotransferase 活性 (以後、ミオキナーゼと略) がみられた。この活性は、14 S と 4 S の間の分画にもわずかにみられた。GDP キナーゼ活性は、14 S と 4 S の間にのみみられ、これらのことから 14 S ダイニンは、ミオキナーゼ、GDP キナーゼを含んでいない。Fr I をハイドロキシアパタイトを用いて分画する (リン酸緩衝液 0.1M から 0.6M, pH 7.5) と、ATPase 活性は、リン酸濃度 0.32M で液出されてくる。これをシロ糖密度勾配超遠心すると、30 S にのみタンパクピークおよび酵素活性ピークがあった。14 S ダイニンが 30 S に移行したと思われるが検討中である。ミオキナーゼはリン酸濃度 0.2M でわずかに、0.32 M で大部分 (90%以上) が溶出されてきた。ハイドロキシアパタイトを用いて ATPase は約 4 倍と濃縮されたが、ミオキナーゼを除くことは成功していない。Fr II は、強い GDP キナーゼおよびミオキナーゼ活性を示した。ミオキナーゼの約 90% は、Fr II を 0.6M KCl で処理することにより抽出された。このミオキナーゼは、Fr I のミオキナーゼと同じ 2 つの大きさを持っているが、ハイドロキシアパタイトによる分画では、0.2M リン酸濃度で約 7 割が、0.32 M で 3 割が溶出されてきた。この Fr I との差異を検討中である。タンパク、ATPase、ミオキナーゼ、GDP キナーゼの分布は、Fr I / Fr II で、それぞれ、57.5%/42.5%, 94.5%/5.5%, 78.4%/21.6%, 15.5%/84.5% であった。1 mM Tris-HCl (pH 8.2) 下で、14 S および 30 S ダイニンに Ca^{++} , Mg^{++} を加えると、5 mM ~ 7 mM で 4 割から 6 割が沈澱し、さらにイオン濃度を上げると再び可溶化して、50 mM で 7 ~ 8 割が上清にきた。

ウニ卵表層の ATPase

馬淵一誠 (東京大学理学部生物化学教室)

ウニ卵表層の KCl 可溶性分画に、細胞分裂周期に伴ない活性の変動する ATPase が存在することが

三木により報告されている。この変動は表層タンパク (CP) の SH 量の変動と全く平行しておこるので、表層の ATPase の性質を調べ、更に CP との相互作用を調べた。

単離したウニ卵 (中期) 表層の低イオン強度不溶分画を 0.6M KCl 510 mM Tris (pH 8.2) で抽出し、抽出物を 10 万 g, 90 分遠心して上清をとる。この上清には全表層 ATPase 活性の 50 ~ 60% が含まれる。これを更に 55% 硫酸飽和として沈澱する分画をとり、5 ~ 20% 蔗糖密度勾配 (0.6M KCl を含む) にのせて 6 万 9 千 g, 30 時間遠心し、活性のピークをとる。こうして得られた ATPase 分画は比活性 0.08 ~ 0.15 $\mu\text{mols Pi/mg/min}$ であり、表層から 10 倍以上に精製された。

表層 ATPase は、上記遠心により沈降定数 12.2 S であった。 Mg^{2+} , Ca^{2+} により同様に 50 mM で最大活性化を受ける (Mg^{2+} が Ca^{2+} よりやや有効で、10 mM での活性の比は $\text{Ca/Mg} = 0.86$)。また 1 mM EDTA により完全に失活する。至適 pH は 7.0 と 10.0, 至適イオン強度は 0.3 付近にある。基質としては ATP に非常に特異的であり、他の NTP は ATP に比し 3 ~ 16% しか分解されない。フォスファターゼ活性は全く見られず、ミオキナーゼ活性も殆んどない。また ATP に対する K_m は $5 \times 10^{-5} \text{M}$ であった。また、0.85 moles/mg protein の PCMB により 37% の活性化、それ以上では急激な阻害がみられた。この ATPase に CP を加えると 30% 程度の活性の上昇がみられた。還元した CP はよく活性化 (30 ~ 40%) し、酸化した CP は若干阻害した。また、低イオン強度で CP と ATPase の結合がみられ、この結合は Ca^{2+} , Mg^{2+} , KCl により促進された。

以上のことから、表層 ATPase は dynein に似た性質を持っているといえる。また、分裂周期に伴う ATPase 活性の変動は CP の SH 量の変動によってひきおこされているものと考えられる。

ウニ精子のべん毛 ATPase III. べん毛 ATPase のトリプシン分解

小川和男 (東京都立大学理学部生物学教室)

ウニ精子のべん毛 ATPase は ATP を分解する酵素的性質と微小管と結合する構造たんぱく質的性質

質をもっている。(Ogawa and Mohri, B. B. A., 256 (1972) 142—155)。べん毛 ATPase の粗抽出液にトリプシンを作用させると元の ATPase より大きさが小さなたんぱく質が得られた。このたんぱく質は fragment-A と呼ぶことにする。2回の Sepharose 4B カラムクロマトグラフィーで得られた fragment-A はディスク電気泳動で main band が 1 つ得られ、これは ATPase 活性で示された band と一致した。ディスク電気泳動, Sepharose 4B カラムクロマトグラフィーで fragment-A は元の ATPase と比較して大きさが小さいことが判明した。蔗糖密度勾配遠心では両者は同一の沈降定数 10.8 S をもっていた。こうした結果は、べん毛 ATPase および fragment-A が球状たんぱく質ではないことを示していると推定される。

Fragment-A を微小管と一緒に二価イオンを加えたが、fragment-A は微小管と再結合しなかった。同じバッチの微小管を使って、トリプシン処理していないべん毛 ATPase と混ぜると、ATPase は再結合した。したがって微小管は再結合能力という点では活性があるので、fragment-A は再結合能力がないと結論された。

Fragment-A は微小管たんぱく質によって ATPase 活性が増加した。B-チューブリンと A-チューブリンに分けた場合、前者の方が活性化能力が高かった。

これらの実験結果をもとにして、べん毛 ATPase がアームに相当すると考えた場合、アームの先端部分に ATPase 活性をもった部分が存在すると推定した。

ウニのチューブリンとアクチン

毛利秀雄 (東京大学教養学部生物学教室)

微小管を構成するタンパク質であるチューブリンは、いくつかの性質がアクチンと似ているので、現在でもアクチンの 1 種ではないかとする考えが根強く残っている。これに反論するには、両者を同じ動物からとって比較することが必要である。そこでウニの口部筋肉よりアクチンを分離し、ウニの精子鞭毛のチューブリンと比較した。

まずチューブリンの分子量は、超遠心法・SDS ゲル電気泳動法いずれによっても 5～6 万であり、

アクチンの 4 万 5 千より大きい。アクチンとの類似が強調されたアミノ酸組成でも、チューブリン同志 (outer fiber の A 小管・B 小管よりえた A・B・両チューブリン) では数種のアミノ酸が異なるにすぎないが、チューブリンとアクチンではほとんどのアミノ酸にわたり数%以上の差がみられる。統計的方法によっても、チューブリンとアクチンの間には有意な差があった。さらに両タンパク質をトリプシンまたはプロナーゼで消化したもののペプチドマップはあきらかな違いをみせた。ところであるタンパク質をアクチンと同定するには、ミオシンとまぜて、低塩濃度での ATP による超沈澱や Mg-ATP アーゼの活性化、高塩濃度での ATP による粘度降下をみるのがふつうである。チューブリンは変性アクチンではないかという疑いを消すために、表面活性剤や EDTA などを使わないように、グリセリン処理鞭毛を 0.6M KCl で処理するという方法で微小管を分離し、これを材料に用いた。こうして調製したチューブリンは、超沈澱様の現象は示したが、他の反応は示さなかった。鞭毛のアセトン粉末より ATP とシステインで抽出したタンパク質 (チューブリンに他ならない) も同様であった。このほか抗チューブリン血清はアクチンと反応しないことなど、いろいろな証拠から、チューブリンはアクチンと似てはいるが異なるタンパク質であるということが確かめられた。

金属イオンによる精子ベン毛タンパクの構造変化

森沢正昭 (東京大学教養学部生物学教室)

ウニ精子ベン毛の axoneme 懸濁液に 0.05 mM Zn または Cd を加えると、濁度が減衰しながら周期的に変化する。一度減衰消失したこの変化は同濃度の ATP の存在下で回復する。この変化は熱処理、音波処理、尿素処理によって消えてゆくことから生理的意味をもつと考えられる。そこで、円偏光二色性によって、Zn, Ca, Mg およびヌクレオチドによるベン毛タンパクの二次構造変化をしらべた。

Axoneme, 微小管はおおの、25%, 15%, 前後の α -helix を含む。これらの試料に Zn, Cd, Hg. を加えると α -helix は減少するが、さらに ATP を加えると回復する。しかし他の重金属ではこのような変