魚類筋肉構成たんぱく質に関する研究—Ⅳ.

コイ筋肉アクトミオシンおよびミオシンの
ATP 感度の測定について

新井健一・高士令二・斎藤恒行

(1969 年 11 月 4 日受理)

Studies on Muscular Proteins of Fish—IV.
On the ATP-sensitivity of Actomyosin and Myosin
Obtained from Carp MuscleKen-ichi ARAI, Reiji TAKASHI, and
Tsuneyuki SAITO**

Fundamental studies on the viscosity of carp muscular proteins were made to evaluate their ATP-sensitivity.

Although the viscosity of carp actomyosin and myosin in 0.6 M KCl, pH 6.8, varied slightly from preparation to preparation, it was found that there was a proportionality between the protein concentration (C) and the logarithms of relative viscosity ($\log \eta_r$) before and after the addition of ATP and MgCl_2 .

Because the viscosity numbers ($\log \eta_r/C$), with and without ATP, were independent of their protein concentrations, namely a constant independent of concentration, the ATP-sensitivity was evaluated.

It was, therefore, recognized that the characterization of actomyosin and myosin by means of the ATP-sensitivity test can successfully be applied to carp muscle.

The ATP-sensitivity is defined as $\frac{Z\eta_r - Z\eta_{r, \text{ATP}}}{Z\eta_{r, \text{ATP}}} \times 100$ by PORTZEHL *et al.* where $Z\eta_r$ and $Z\eta_{r, \text{ATP}}$ are the viscosity numbers before and after the addition of ATP respectively.

著者らは前報において、コイ筋肉からミオシンおよびアクトミオシンを調製する方法について検討した結果を報告した^{1,2)}。これらの実験でえられたミオシンおよびアクトミオシンは、調製の際の条件を変えればそれぞれ生物学的活性の異なる性質のものになることが認められた。したがって、魚類筋肉構成たんぱく質の研究をさらに進めるにあたって、アクトミオシンおよびミオシンの性質、特に生物学的活性を示す特性について基礎的な検討を加える必要があるように思われる。

魚類筋肉構成たんぱく質の生物学的活性に関する研究の内、PORTZEHL らによつて提唱された ATP-sensitivity (ATP-感度)³⁾ については、タラのミオシンについて CONNELL らが⁴⁾、また、コイ、セイゴ、ブリなどについて鈴木らの報告が見られる⁵⁾。

著者らは、前報において述べた調製法によつてえたミオシンとアクトミオシンの ATP 感度を測定するための基礎的条件を確立するために、本研究を行なつた。

* 本報告は昭和 44 年 4 月、日本水産学会年会において講演発表した。

** 北海道大学水産学部生物化学教室 (Laboratory of Biochemistry, Faculty of Fisheries, Hokkaido University, Hakodate, Japan)

実験方法

1) コイ筋肉からアクトミオシンとミオシンの調製 コイ筋肉からのアクトミオシンおよびミオシンの調製については前報^{1,2)}で述べたとおり行ない、両たんぱく質共に 0.6 M KCl, pH 6.8 (*Tris-maleate* buffer で調節した) 溶液として粘性の測定に供した。

2) アクトミオシンおよびミオシンの粘度測定 両たんぱく質の粘性の測定にあたって二種のオストワルド型粘度計を使用した。その一つは試料溶液 5 ml を必要とし、溶媒の流過速度が 42.5 秒で、たんぱく質濃度 0.4~0.8 mg/ml の溶液に適していた。また、他の一つは試料溶液 2 ml で、溶媒の流過速度は 125.5 秒であり、たんぱく質濃度 0.10~0.35 mg/ml の測定に適當であつた。この濃度以外の測定はこれら二種の粘度計では再現性がえられず測定不可能であつた。

3) ATP 感度の算出 上記の方法によつてアクトミオシンとミオシンの相対粘度を 25°C で測定し、続いてこの試料液に対して極少容量の ATP および MgCl₂ を最終濃度がそれぞれ 1 mM になるように添加し、再び相対粘度を測定する。この条件ではアクトミオシンは ATP によつて粘度の減少をひきおこし、少なくとも 10 分間はそのまゝに保たれる。Portzehl らの提唱した ATP 感度は次式によつて算出される³⁾。

$$\frac{Z\eta_r - Z\eta_{r,ATP}}{Z\eta_{r,ATP}} \times 100, \quad Z\eta_r = \frac{\ln \eta_r}{C}$$

実際には、

$$\frac{\log \eta_r - \log \eta_{r,ATP}}{\log \eta_{r,ATP}} \times 100$$

ここで、 $\log \eta_r$ とは、ATP を添加する前のたんぱく質溶液の相対粘度の対数値、 $\log \eta_{r,ATP}$ は ATP を添加した後の同溶液の相対粘度の対数値をあらわす。

4) たんぱく質の定量 アクトミオシンおよびミオシンの定量は *Biuret* 反応による比色定量により⁶⁾、牛血清 *Albumin fraction V* を標準とした。また、*micro-Kjeldahl* 法によつて補正を加えた。

Fig. 1. Variation of viscosity (logarithms of relative viscosity, $\log \eta_r$) before and after addition of ATP with concentration of carp actomyosin.

Two different preparations of actomyosin (-1 and -2) are shown.

実験結果

コイ筋肉から調製したミオシンおよびアクトミオシンの濃度と相対粘度または還元粘度との関係については、すでに前報で報告した^{1,2)}。これらの結果から相対粘度の対数値とたんぱく質濃度の関係を示すと Fig. 1 のようになる。Fig. 1 にはアクトミオシンの二種の試料について示されているが、いずれの試料の場合もたんぱく質濃度 (C) と相対粘度の対数値 ($\log \eta_r$) の関係は比例的であつて ($\log \eta_r = K \cdot C$) 直接関係が成立した。したがつて、 $\log \eta_r / C$ の値はアクトミオシン濃度には依存しない一定値となることが次の Fig. 2 に示されている。それゆゑ、ATP 添加前後の $\log \eta_r / C$ から算出した ATP 感度もまた濃度依存性を示さないで一定値となつている。また、この図から *Viscosity number* ($Z\eta = 2,303 \log \eta_r / C$) を計算すると、二試料について 0.22 および 0.24 がえられた。(C は g/l の単位で計算した)。

次にミオシンの場合について相対粘度の対数値とた

Fig. 2. ATP-sensitivity and $\log \eta_r/C$ with concentration of carp actomyosin.

(A)....actomyosin-1, ATP-sensitivity = 132

(B)....actomyosin-2, ATP-sensitivity = 126

Fig. 3. Variation of viscosity (logarithms of relative viscosity, $\log \eta_r$ and $\log \eta_r/C$) with concentration of carp myosin. Three different preparations of myosin (-1, -2, and -3) are shown.

Fig. 4. ATP-sensitivity with concentration of carp myosin.

ATP-sensitivity = 13

んばく質濃度の関係を Fig. 3 に示した。Fig. 3 にはミオシンの三試料の例が示されているが、アクトミオシンの場合同様に、調製する試料ごとにやや異なる粘性を示した。しかし、 $\log \eta_r$ と C の関係は例外なく比例的で $\log \eta_r = K \cdot C$ が成り立つことがわかる。なお、ATP 感度の算出のために別に行な

つた実験結果を Fig. 4 に示した。ここでは測定値に少しのぶれがみられたが、ATP 感度はたんばく質濃度に依存しない一定値となつた。また、Fig. 3 の結果から *Viscosity number* を求めるとそれぞれ 0.20, 0.17, 0.16 であつた。なお、0.20 を示した試料は例外的で、大多数のミオシン試料は 0.16~0.17 であつた。

以上の結果が示しているように、著者らの調製したアクトミオシンとミオシンについて本方法で ATP 感度を測定すると、その値は家兎筋肉のアクトミオシンで認められているように、たんばく質濃度に依存しない一定値となり、コイ筋肉構成たんばく質アクトミオシンおよびミオシンの特徴を示す適当な性質の一つとして使用できることがわかつた。

考 察

コイ筋肉からミオシンおよびアクトミオシンを調製すると、その試料ごとに多少粘性の異なつたものができることをすでに述べたが、この事実は特にミオシンを調製する際に、方法を少し変えたと非常に顕著に観察された¹⁾。*Viscosity number* でみると、アクトミオシンについては 0.22~0.24 の内、低い値を示す試料ができる頻度はかなり高く、一方、ミオシンの *Viscosity number* は 0.16~0.20 の内、0.16~0.17 の値を示す試料が多かつた。これらの粘度測定は 25°C で行なつた上、両たんばく質は 0.6 M KCl, pH 6.8 溶液としたので、従来報じられている結果⁴⁾と比較するわけにはゆかない。2°C で行なつた例によると、アクトミオシンは 0.30 またミオシンでは 0.18 であつて前者が特に高かつたが、この 0.30 は家兎アクトミオシンについて報じられた値⁷⁾の中では低い方に属する。一般に、魚類筋肉からえられたアクトミオシンの示す粘性は低いようであるが、この事実は魚類筋肉アクトミオシンの本質的特性であるのか、または調製法などの改良によつて家兎についてえられた値に接近してくるものであるのか現在のところ不明である。著者らはこの問題の解決についての研究を続けている。

ATP 感度の測定にあつては、アクトミオシンまたはミオシンの溶液に各 1 mM の ATP と Mg^{++} を添加するのであるが、このとき Mg^{++} の作用は ATP-ase 活性を阻害し ATP の消失を阻止することによつてアクトミオシンの解離を完全にする⁸⁾と報じられている。著者らの経験においても、 Mg^{++} を添加せずに ATP だけの場合はアクトミオシンの解離は完全ではなく、粘度低下は不安定で、ATP の分解消失のために極めて短時間の中に粘度の増加回復が観察された。 Mg^{++} を添加しないときは、より多量の ATP を添加する必要がある。

要 約

コイ筋肉のアクトミオシンおよびミオシンについて ATP 感度を測定するために、粘性に関する基礎的研究を行なつた。アクトミオシンおよびミオシンの 0.6 M KCl, pH 6.8 溶液について粘度を測ると、調製する試料ごとにその粘性はやや異なるが、いずれの試料においてもそのたんばく質濃度 (C) と相対粘度の対数値 ($\log \eta_r$) との関係は比例し、したがつて、たんばく質濃度に依存しない一定の *Viscosity number* ($\log \eta_r/C$) がえられる。さらに、ATP と Mg^{++} を 1 mM ずつ添加した後の *Viscosity number* も一定値となるために、えられる ATP 感度もたんばく質濃度に依存しない一定値となる。それゆゑ、家兎筋肉アクトミオシンで報じられているように、コイ筋肉構成たんばく質アクトミオシンとミオシンについても ATP 感度はそれらの性質を示す尺度として応用できる。

文 献

- 1) 高士令二・新井健一・斎藤恒行: 本誌, **36**, 165~168 (1970).
- 2) 高士令二・新井健一・斎藤恒行: 本誌, **36**, 169~172 (1970).
- 3) H. PORTZEHL and H. H. WEBER: *Advance in Protein Chemistry*, **7**, p. 236 (1952).
- 4) J. J. CONNELL: *J. Sci. Food Agric.*, **13**, 607~617 (1962).
- 5) 鈴木たね子: 本誌, **29**, 161~167 (1963).
- 6) A. G. GORNALL, C. S. BARDAWILL, and M. M. DAVID: *J. Biol. Chem.*, **177**, 751~766 (1949).
- 7) H. PORTZEHL and H. H. WEBER: *Advance in Protein Chemistry*, **7**, p. 215 (1952).
- 8) H. PORTZEHL and H. H. WEBER: *ibid.*, **7**, p. 228 (1952).