魚類筋肉構成たんぱく質に関する研究—V.

コイ筋肉アクトミオシンの超沈澱について*

新井健一・高士令二・斎藤恒行

(1970 年 1 月 16 日受理)

Studies on the Muscular Proteins of Fish—V.
On the Superprecipitation of Actomyosin from Carp Muscle

Ken-ichi ARAI, Reiji TAKASHI, and Tsuneyuki SAITO**

It is a well-known characteristic of actomyosin, the contractile muscle protein, to undergo superprecipitation at low ionic strength when a low concentration of ATP is added.

Attempts on superprecipitation to discriminate the actomyosin from the myosin, prepared from carp dorsal muscle in the laboratory, were successful while both actomyosin and myosin retained their active ATP hydrolyzing activity.

Observation of superprecipitation was made at protein concentrations of 0.8~1.0 mg/ml in 0.10 M KCl by the addition of ATP to a final concentration of 1 mM.

著者らは先にコイ筋肉からミオシンとアクトミオシンを調製する方法について検討し報告した^{1,2)}。また、調製したアクトミオシンとミオシンの性質を特徴づける生物活性の一つとして、ATP 感度の測定法について検討を加えた³⁾。これらのたんぱく質の特徴をあらわす他の性質としては、SZENT-GYÖRGYI によつて述べられた超沈澱現象がある⁴⁾。すなわち、アクトミオシンの浮遊液に ATP を加えると柔い透明なゲルが水分の少ない固い沈澱になる(試験管内における筋肉収縮モデル)現象は、アクトミオシンにだけ観察されるのであってミオシンとの性質の判別のためには便利である。

魚肉アクトミオシンの超沈澱現象については、すでに鈴木らが江橋によつて考案された濁度法を採用して、ヒラメ、カツオのアクトミオシンの場合を検討し報じている⁵⁾。

著者らはアクトミオシンの特徴的な栓状沈澱を試験管内において観察する方法が、操作が非常に簡便であるので検討を加えた。

実験方法

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は、すでに報じたようにひき肉をミオシンでは 5 mM ATP-MgCl₂ を含む 0.47 M KCl, pH 6.4 磷酸緩衝液で、またアクトミオシンでは 0.45 M KCl, pH 7.5 磷酸緩衝液でそれぞれ必要時間抽出を行ない、次に 10 倍量の冷水によって稀釈し沈澱するたんぱく質を 0.6 M KCl, pH 6.8 に溶解してえた^{1,2)}。

超沈澱の観察はアクトミオシンおよびミオシンを 0.8~1.0 mg/ml 濃度になるように 0.1 M KCl, pH 6.8 (Tris 緩衝液で調節した) 溶液に懸濁し、これに ATP を最終濃度が 1 mM になるように添加、攪拌後静置して沈澱の生成を観察した。

たんぱく濃度の定量は牛血清 albumin fraction V を標準としビューレット法により比色定量した。

* 本研究は昭和 44 年 10 月、日本水産学会秋季大会で講演発表した。

** 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)

実験結果

まず、コイ筋肉のアクトミオシンの超沈澱の生成について、添加する ATP 濃度の影響を検討し観察結果を Fig. 1 に示した。Fig. 1 の中に示されている (A) とは ATP を添加しない場合であり、(B) は ATP の添加が最終濃度 1 mM の場合、(C) は 0.2 mM の場合である。Fig. 1 の上列から下列へ ATP を添加する前の状態、ATP 添加 2 分および 4 分経過後の状態である。この結果によると、コイ筋肉アクトミオシンの超沈澱においては添加 ATP 量が最終濃度 0.2 mM のときは 1 mM の場合に比べると、沈澱の生成速度が遅く 4 分以上経過後もなお収縮は強くないことがわかる。鈴木らによって報じられた濁度法による超沈澱の観察においては⁵⁾、1 mM よりも 0.2 mM の場合が良い結果をえているが、本方法のように試験管内における同現象の観察の場合は 1 mM がより良いことが認められた。すなわち 4 分後に典型的な栓状の超沈澱がみられる。

次に、コイ筋肉アクトミオシンとミオシンの両たんぱく質について超沈澱現象を比較し、その結果を Fig. 2 に示した。Fig. 2 において (A) はミオシン、(C) はアクトミオシンの ATP を添加しない場合 (対照) であり、そして (B) および (D) はそれぞれミオシンおよびアクトミオシンに ATP を 1 mM 添加した場合である。また、上列から下列へむかつて ATP 添加前、ATP 添加 2 分後 (中列) および 4 分後 (下列) の状態である。ここで使用しているミオシンとアクトミオシンはそれぞれ充分な ATP-ase 活性を保持していることが前報において認められているが^{1,2)}、ミオシンは超沈澱を生成しないのに対して、アクトミオシンは顕著な栓状の超沈澱を生じ ATP による収縮が確められる。この現象はアクトミオシンとしての特性であ

Fig. 1. Superprecipitation of actomyosin prepared from carp dorsal muscle with different concentration of ATP.

(A) without added ATP, (B) with added ATP to 1 mM, (C) with added ATP to 0.2 mM at room temperature.

Upper series, before addition of ATP, middle series, 2 minutes after addition of ATP, lower series, 4 minutes after addition of ATP.

Fig. 2. Comparisons on superprecipitation of actomyosin and myosin prepared from carp dorsal muscle.

(A) myosin without added ATP, (B) myosin with added ATP to 1 mM, (C) actomyosin without added ATP, (D) actomyosin with added ATP to 1 mM.

Upper series, before addition of ATP, middle series, 2 minutes after addition of ATP, lower series, 4 minutes after addition of ATP at room temperature.

(A) (B) (C) (D) (E) (F) (G)

Fig. 3. Superprecipitation of contractile protein (mixture of actomyosin and myosin) with various weight ratio of myosin and actin.

The ratio of actomyosin and myosin mixed were (A) 0:6, (B) 1:5, (C) 2:4, (D) 3:3, (E) 4:2, (F) 5:1, (G) 6:0 in weight (mg).

Upper series, before addition of ATP, middle series, 2 minutes after addition of ATP, lower series, 4 minutes after addition of ATP at room temperature.

ある。その研究はとりもなおさず魚類筋肉が哺乳動物特に良く知られている家兎筋肉に比べてどのような特異性をもっているかを検討することをも意味することになる。

超沈殿現象はアクトミオシン試料中のアクチン含量を予知することができる鋭敏な方法であることは、本実験の結果からも明らかである。仮に、本実験において使用したミオシンとアクトミオシンが充分な純度のものであり、また、アクトミオシンの構成がミオシン：アクチン＝4:1（家兎アクトミオシンで認められている²⁾）とすれば、本報告における Fig. 3 の結果において、ATP 添加4分後に沈殿形成が認められるのはミオシンに対してアクチン量が1/16以上含まれる場合であり、栓状の超沈殿が認められるのはミオシンに対してアクチンが1/6.5以上含まれる場合であつた。今回使用されたミオシンとアクトミオシンの純度を考えれば、アクトミオシン中のアクチン量はより少ない場合でも超沈殿が生成される可能性がある。

なお、変性アクトミオシンの超沈殿は調製したばかりのアクトミオシンに比べると収縮性が弱まつており、沈殿としてはあらい絮状物を生成するようになるので、古くなつたアクトミオシンの観察には注意を要する。

るために、前報で報じた ATP 感度³⁾と共に、アクトミオシンの存在を確かめる有力な手段であることを示している。

コイ筋肉からミオシンとアクトミオシンを調製し、両たんぱく質を各種の割合で混合し、超沈殿の生成を観察して結果を Fig. 3 に示した。Fig. 3 では (A) はミオシンだけ、(G) はアクトミオシンだけの場合を示し、(B), (C), (D), (E), (F) はミオシンに対してアクトミオシンを 5:1, 4:2, 3:3, 2:4, 1:5 の重量比で混合した試料の場合を示している。なお、試料液のたんぱく質濃度は一定 (1 mg/ml) になっている。この結果によると、Fig. 2 の場合と同様にミオシンだけでは超沈殿はみられず、ミオシンに対するアクトミオシン（すなわち、アクチン）の混合割合が増加するにしたがつて超沈殿するようになることがわかる。アクチン量が特に増加すると（例えば (E), (F), (G) の場合）典型的な栓状の超沈殿が観察される。これらの事実は超沈殿現象が調製したミオシン中へのアクチンの混入の可否を判定する簡便な手段であることを示している。

考 察

本研究で使用したミオシンおよびアクトミオシンは前報で述べたように、イオン強度を低下させることによる沈殿精製を一回行なつただけであるのでその純度についてはまだ検討の余地が残されている。したがつて、超沈殿現象に影響をあたえる native tropomyosin⁶⁾ などさらに Mg^{++} や Ca^{++} の存在について考慮をはらわなければならない。これらの因子の超沈殿現象における働きを詳細に検討するためには、アクトミオシンの精製をすすめる必要が

要 約

筋肉を構成する収縮性たんぱく質アクトミオシンは、その生物活性の一特性として、低イオン強度で低濃度の ATP を添加すると超沈澱現象をおこす。

著者らがコイ背筋肉から調製したアクトミオシンとミオシンは、いずれも強い ATP-ase 活性を示しているが、この超沈澱現象によつて判別することができる。

超沈澱の観察は、0.8~1.0 mg/ml のたんぱく質 0.10 M KCl 溶液に対して、ATP を最終濃度が 1 mM になるように添加して行なつた。

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) 新井健一・高士令二・斎藤恒行：本誌，**36**，237~240 (1970).
- 4) A. SZENT-GYÖRGYI: *Chemistry of Muscular Contraction*, Academic Press (1947).
- 5) 鈴木たね子・神名孝一：本誌，**32**，590~599 (1966).
- 6) S. EBASHI and F. EBASHI: *J. Biochem.*, **55**, 604~613 (1964).
- 7) S. V. PERRY: *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, **17**p., 361 (1967).