魚類筋肉構成たんぱく質に関する研究—VII.

コイ筋肉ミオシンの DEAE-Sephadex A-50
によるクロマトグラフィー*

高 士 令 二

(1971 年 8 月 28 日受理)

Studies on Muscular Proteins of Fish—VII.

Chromatography of Carp Myosin on Diethylaminoethyl-
Sephadex A-50

Reiji TAKASHI**

The chromatography of carp myosin prepared by the method described previously was carried out on DEAE-Sephadex A-50 according to the procedure of RICHARDS *et al.* (1967).

The elution profiles of carp myosin at 280 m μ were very similar to those of myosins obtained from rabbit, chicken, and tuna already reported. It was therefore confirmed that carp myosin was found to consist mainly of monomeric myosin.

The specific ATP-ase activity of the main peak was approximately 50~90% higher than that of the original myosin and the absorbance ratio at 280 m μ to that at 260 m μ also increased from 1.25 of the original to 1.95 of the chromatographed myosin.

No adenylic deaminase activity was found in the main myosin peak.

It was clear that considerable purification of carp myosin was achieved by this procedure.

カラムクロマトグラフィーによつてミオシンを精製しようとする試みは今まで数多くの研究者達によつて行なわれてきた。

とくに家兎骨格筋ミオシンについては、BRAHMS¹⁾、およびこれとは別に PERRY²⁾ が pH 7.5, 0.2 M KCl による DEAE-cellulose カラムでミオシンの精製を試みたことにはじまる。その後、BRAHMS と BREZNER³⁾ は中性付近でのミオシンの溶解性について研究を行ない、低イオン強度でもミオシンはポリリン酸塩に可溶性になるということを理論化した。このアイディアに基づき、ASAI⁴⁾ は ATP 緩衝液, KCl gradient, および DEAE-cellulose によるカラムクロマトグラフィーを行ない、完全にミオシンを吸着させ、そこで溶出されたものは、ATP-ase 活性をもつた典型的な単量体ミオシンであると報じている。同じことが、DEAE-cellulose とピロリン酸システムでも確かめられた。

SMOLLER と FINEBERG⁵⁾ は Sephadex G-200 によるゲル濾過で、マウス筋肉ミオシンの ATP-ase 活性が増加することを見ている。さらに最近、HARRIS と SUELTER⁶⁾ は cellulose phosphate と DEAE-cellulose を交互に使うことによつて、家兎ミオシンから adenylic deaminase が除去され、しかも ATP-ase 活性は最初のミオシンの活性に比べて 20~80% 増加したと報告している。また RICHARDS⁷⁾ らは家兎ミオシン、ニワトリのミオシン、およびマグロ等のミオシンを使用して DEAE-Sephadex A-50、ピロリン酸または

* 本研究は昭和 45 年 10 月日本水産学会秋季大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)

りん酸緩衝液と KCl-gradient system を組合わせて、凝集変性した ミオシン、未知たんぱく質、および RNA などから単量体ミオシンを分離するのに成功している。さらに、ミオシンピークでの ATP-ase 活性の増加、および adenylic deaminase 活性の減少を報告している。

魚類筋肉ミオシンに関するクロマトグラフィーの報告はこの RICHARDS⁷⁾, CHUNG⁸⁾ らによるもの以外は、ほとんど見られないのが現状である。そこで著者はすでにその調製法と性質について報告したコイ筋肉ミオシンの純度の検討および精製を目的として DEAE-Sephadex A-50 によるイオン交換クロマトグラフィーを行なった。そこで得られた各ピークについて主に ATP-ase 活性などを比較検討した。

実験方法

コイ筋肉からミオシンを調製する方法については、すでに報じたとおり、5 mM ATP, 1 mM MgCl₂ を含む 0.45 M KCl, pH 6.4 りん酸緩衝液で抽出を行ない、次に 14 倍容量の冷水によつて希釈沈澱するたんぱく質を 0.6 M KCl, pH 6.8 に溶解して得た⁹⁾。

ATP-ase 活性の測定は、0.5 M KCl, 5 mM CaCl₂, 25 mM Tris-maleate buffer pH 7.0, ミオシン, 0.1~0.2 mg/ml, 1 mM ATP を 25°C で反応させ、1/2 容量の 15% TCA で反応を中止後ろ過し、ろ液の一定量について遊離生成した無機りんを比色定量した¹⁰⁾。

Adenylic deaminase 活性の測定は前報どおり行なった¹¹⁾。

超沈澱¹²⁾はたんぱく濃度 0.8~1.0 mg/ml になるように 0.1 M KCl, pH 6.8 (Tris-maleate buffer) 溶液に懸濁し、これに最終濃度 1 mM になるよう ATP を添加し、攪拌後静置して沈澱の生成を観察した。

クロマトグラフィー操作は、RICHARDS⁷⁾ らの方法に準じて行ない、ミオシン溶液を 0.04 M ピロりん酸緩衝液 (pH 7.5) に一晚透析し、あらかじめ NaOH, HCl および H₂O でよく洗浄した後、同緩衝液で十分洗浄した DEAE-Sephadex A-50 カラムに吸着させる。なおこの時、たんぱく濃度が 1.5% 以上になると流速が非常に遅くなることがあるので、1.0% 前後で使用した。等容量の 0.04 M ピロりん酸緩衝液と 0.5 M KCl-0.04 M ピロりん酸緩衝液、またミオシン中に混在している adenylic deaminase 活性を測定することを主な目的としたクロマトグラフィーを行なう場合には、ピロりん酸緩衝液の代りに 0.15 M りん酸緩衝液と 0.5 M KCl-0.15 M りん酸緩衝液 pH 7.5 を使用し、KCl の linear gradient で溶出した。えられた各画分について、280 mμ, たんぱく濃度、ATP-ase 活性などを測定した。なお各画分に溶出されたミオシンおよびアクトミオシンの ATP-ase 活性、adenylic deaminase 活性を測定する前に 0.6 M KCl, 5 mM Tris-maleate buffer pH 6.8 に透析してピロりん酸塩およびりん酸塩を除去した。

たんぱく質濃度の測定はビューレット法³⁾、または、ローリー法^{14,15)}によつて比色定量し、KJELDAHL 法によつて補正した。

ミオシン溶液を濃縮する必要が生じたときは、溶出された各画分のミオシン溶液をすべて集め、水を加えて希釈沈澱させ、沈澱を遠心分離で集めた後、0.6 M KCl, pH 6.8 になるように溶解し、さらに同液に透析して性質の検討に供した。

実験結果

コイ筋肉から調製したミオシンを RICHARDS⁷⁾ らの方法に準じてイオン交換クロマトグラフィーを行なった。その結果を示す溶出図を Fig. 1 に示した。この溶出図は RICHARDS および、CHUNG らの行なった家兎骨格筋ミオシン、キハダマグロ、カツオ類筋肉ミオシンの溶出図^{7,8)} とよく類似しており、著者が調製したコイ筋肉ミオシンは、その主成分が明らかに単量体のミオシンであると考えられる。さらに KCl 溶出液の濃度が、ほぼ 0.13 M KCl 付近から 0.25 M KCl にいたるまで ATP-ase 活性をもつたミオシンの溶出が行なわれたと言う事実も、家兎骨格筋ミオシンで行なった ASAI⁴⁾ の報告および RICHARDS⁷⁾ らの報告とよく一致した。なお、第一図のクロマトグラフィーでえられた各画分の ATP-ase 活性を測定しその結果を Table 1 に示した。Table 1 の結果によると単量体ミオシンと考えられるピークの ATP-ase 活性が、も

Fig. 1. Chromatography of carp myosin on DEAE-Sephadex A-50.

Myosin solution (15 ml of 1.4%) was applied to a 2.2×24 cm column and eluted with a linear gradient of KCl (500 ml each of 0.04 M pyrophosphate and 0.04 M pyrophosphate-0.5 M KCl, pH 7.5) at 20 ml/hr; 15 ml fractions were collected. 0.5 N NaOH was applied at arrow.

---, KCl concentration in eluate.

Table 1. Specific ATP-ase activity of chromatographed carp myosin.

Preparation	ATP-ase activity* (μ moles Pi produced/min./mg of protein)				
	Original	Chromatographed**			
		0	1	2	3
1	0.112			0.211	0.215
2	0.157	0.075	0.291	0.293	0.311

* Reaction mixture; 0.5 M KCl, 25 mM Tris-maleate (pH 6.8), 5 mM CaCl_2 , 1 mM ATP, 0.1~0.2 mg of protein/ml at 25°C.

** 0-fraction at void volume, 1-leading edge, 2-middle, 3-trailing edge of myosin peak.

た溶出図を示した。そこで、非吸着区分およびミオシンピーク区分の性質を検討し、その結果を Table 2 に示した。この表に示されるように、非吸着区分での ATP 感度は約 50 で、明らかに超沈澱を起したが、ミオシンピーク区分では、超沈澱はおこらず、ATP 感度はほとんど 0 に近くなっていることがわかった。しかも両区分ともに ATP-ase 活性を示すことから、少なくとも、この非吸着区分にはアクトミオシンが混在していることが確かめられた。このことから、ATP 感度がやや高め (20~30) のミオシンの場合には、このイオン交換法で混在する少量のアクトンを除去できるのでこのようなミオシンの精製手段にも使用できることがわかった。

また、ミオシンに堅く結合していると考えられる adenylic deaminase の活性のゆくえを検討するためには、上にのべたクロマトグラフィーにおいてピロリン酸の代りにりん酸緩衝液を使用して多量のミオシンを吸着させイオン交換クロマトグラフィーを行なった。その結果を Fig. 4 に示す。この場合に得られたそれ

つとも高い値を示した。この活性はクロマトグラフィー処理前の粗ミオシン ATP-ase 活性の約 1.5~2 倍近くに増加しており明らかにミオシンの精製効果が認められた。非吸着区分のミオシン活性はミオシンの主ピークおよび、クロマトグラフィー処理前の粗ミオシン ATP-ase 活性に比べてかなり低い値を示した。RICHARDS らの報告^{7,8)}にもあるように、これは、おそらく凝集したミオシンと考えられる。また 280 mμ と 260 mμ の紫外吸収スペクトルを測定し、その比率 (280 mμ/260 mμ) をみると、クロマトグラフィー前の粗ミオシンが、1.25 であったのに反し、Fig. 2 に示したようにクロマトグラフィー後のミオシンピークでの値は 1.95 付近を示し、核酸夾雑物の大部分が除去されていることがわかった。またその大部分は 0.5 N NaOH で最後に溶出された。

一方、比較するために行なつたコイ筋肉アクトミオシンのイオン交換クロマトグラフィー上の挙動結果を Fig. 3 に示した。ミオシンの場合と同様、一晚、0.04 M ピロリン酸緩衝液に透析した後、DEAE-Sephadex A-50 カラムに添加し、同じ溶媒系で溶出した。すなわちミオシンの溶出図とは全く異なりアクトミオシンのほとんどが吸着されなかつた。アクトミオシンのイオン交換クロマトグラフィーがこの条件では不可能であり、かつ、この条件下ではアクトミオシンはアクトンとミオシンに解離しないことがわかった。また、ATP 感度が 20~30 を示す少量のアクトンが混じているようなミオシン試料をクロマトグラフィーする場合には、Fig. 5 に類似し

Fig. 2. Chromatography of carp myosin.

Experimental conditions were the same as in Fig. 1. Absorbance ratio of 280 mμ to 260 mμ (280 mμ/260 mμ) of original myosin before applying to column was 1.25.

—, absorbance at 280 mμ.

----, KCl concentration of eluate.

Fig. 3. Chromatography of carp actomyosin on DEAE-Sephadex A-50.

Actomyosin solution (10 ml of 1.1%) was dialysed against 0.04 M pyrophosphate, pH 7.5 overnight and applied to a 2.2×25 cm column. A linear gradient (500 ml each of 0.04 M sodium pyrophosphate, and 0.04 M sodium pyrophosphate-0.5 M KCl) was employed at 15 ml/hr and 15 ml fractions were collected. Symbols are the same as in Fig. 2.

それぞれのピークについて adenylic deaminase 活性を比較した結果を Table 3 に示した。非吸着区分にみられる二つのピークに adenylic deaminase 活性があり、ミオシンの主成分ピークには活性はほとんどなく、家兎などで確かめられているように^{7,16)}, KCl 濃度 0.13~0.25 M で溶出されるミオシンは adenylic deaminase と完全に分離しており、この点に関しても、明らかにコイ筋肉ミオシンは精製されたといえる。

考 察

DEAE-Sephadex A-50 クロマトグラフィーによつて、コイ筋肉ミオシンについても、家兎⁷⁾、ニワトリ¹⁷⁾の場合と非常によく似た溶出図をうることができた。すでに、家兎⁷⁾、ニワトリ、^{7,17)}マダモ^{7,8)}の場合では、超遠心分析、ATP-ase 活性などから確かめられているように、クロマトグラフィーでえたミオシンピークはそれぞれかなり精製された単量体であり、また、ATP-ase 活性の強さには種によつて多少の差があるとしても、沈降定数、分子量、アミノ酸組成などはほとんどかわらないと報告されている。おそらくコイ筋肉ミオシンの場合もクロマトグラフィー溶出図と ATP-ase 活性の結果を比較してみる限りでは、明らかに単量体が主成分であると断定してよいと思われる。このミオシンピークのたんばく量は全体の約 70% に相当していた。

また、核酸成分の混入の可能性を、280 mμ/260 mμ の紫外外部吸収スペクトルの比率によつて検討してみると、クロマトグラフィー前

Table 2. Properties of chromatographed carp myosin.

	ATP-ase activity*	ATP-sensitivity**	Super-precipitation
Before chromatography			
Original myosin	0.101	15	
After chromatography			
Fraction at void volume	0.136	50	+
Fraction at main peak	0.198	2	-

* μmoles Pi produced/min./mg of protein.

** $\log \eta_{rel.} - \log \eta_{rel.}, ATP / \log \eta_{rel.}, ATP \times 100$.

Fig. 4. Chromatography of carp myosin on DEAE-Sephadex A-50.

Myosin solution (95 ml of 0.91%) was applied to a 2.5×90 cm column. A linear gradient (1 l. each of 0.15 M potassium phosphate and 0.15 M potassium phosphate-0.5 M KCl, pH 7.5) was employed at 20 ml/hr and 15 ml of fractions were collected. Symbols are the same as in Fig. 2.

Table 3. Adenylic deaminase activity in chromatographed carp myosin.

	Adenylic deaminase activity -ΔO.D. at 265 mμ/min./ mg of protein
Before chromatography	
Original	0.387
After chromatography	
Tubes 10-19 combined (at void volume)	0.121
Tube 39	1.542
Tubes 94-105 combined (at main peak)	0.000

の粗ミオシン溶液の値が約 1.25 であつたのに対し、クロマトグラフィー後のミオシンピークでは 1.95 と増大し、先に行なつた希釈沈澱精製だけでは除去できない核酸成分が顕著に減少したものと思われる。とくに KCl-gradient 終了後に、0.5 N NaOH, pH 13 で溶出される小さなピークは 260 mμ の吸収が 280 mμ に比べて増大している。これは RICHARDS ら⁷⁾, BARIL ら¹⁸⁾ の報ずるところによれば RNA 成分である。

アクトミオシンが DEAE-Sephadex A-50 (本方法のイオン交換の条件では) に吸着されなかつたという結果からみると、吸着されずに通過してくる成分は、CHUNG ら⁸⁾ の報ずる変性したミオシンのほかに混在しているアクトミオシンも吸着されずに同時に溶出される可能性を考えなければならない。

ピロりん酸緩衝液とりん酸緩衝液とのクロマトグラフィーを比べてみると、りん酸緩衝液を使用した時の方が Fig. 5 に示すように、コイ筋肉ミオシンの溶出図が複雑になり、主成分ピークが少なくとも二つのピークからなることがしばしば認められた。これは、CHUNG ら⁸⁾ の報告中で確かめられているように、leading 部分は dimer (二量体) が主成分であり、trailing 部分は monomer (単量体) が主成分であろうと思われる。したがってりん酸緩衝液でコイ筋肉ミオシンは透析中、あるいは、クロマトグラフィー操作中に変性を起す可能性が考えられる。

この DEAE-Sephadex A-50 によるミオシンのイオン交換クロマトグラフィー法では、先に述べたミオシンの単量体のほかに、dimer (二量体) および, trimer (三量体) 以上の oligomer (多量体) を大まかにではあるが分画できることが知られている⁸⁾。した

Fig. 5. Chromatography of carp myosin on DEAE-Sephadex A-50.

Myosin solution (54 ml of 0.81%) was applied to a 2.5×87 cm column. Other experimental conditions were the same as in Fig. 4. Symbols are also the same as in Fig. 4.

Fig. 6. The different chromatographic profiles of carp myosins by denaturation.

Myosin solution (15 ml of 1.39%) was applied to a 2.2×25 cm column. Other experimental conditions and symbols used were the same as in Fig. 1.

—; myosin heated for 45 min. at 30°C in the presence of sorbitol (20 times weight of protein).

-----; myosin heated for 45 min. at 30°C in the absence of sorbitol.

ン ATP-ase 活性に比べて 1.5~2 倍近くに比活性が増加し, 280 mμ/260 mμ の吸光比率も, 1.25 から 1.95 に増加し, しかも, adenylic deaminase 活性が検出されないことから, 本方法によるコイ筋肉ミオシンの精製効果が明らかに認められた。

本研究の遂行にあたり終始御懇切な御指導を賜わった斎藤恒行教授, ならびに新井健一博士に深謝いたします。

文 献

- 1) J. BRAHMS: *J. Am. Chem. Soc.*, **81**, 4997 (1959).
- 2) S. V. PERRY: *Biochem. J.*, **74**, 94~101 (1960).
- 3) J. BRAHMS and J. BREZNER: *Arch. Biochem. Biophys.*, **95**, 219~228 (1961).
- 4) H. ASAI: *Biochemistry*, **2**, 458~461 (1963).
- 5) M. SMOLLER and R. A. FINEBERG: *Biochem. Biophys. Acta.*, **86**, 187~189 (1964).
- 6) M. HARRIS and C. H. SUELTER: *ibid.*, **133**, 393~398 (1967).
- 7) E. G. RICHARDS, C. S. CHUNG, D. B. MENZEL and H. S. OLCOTT: *Biochemistry*, **6**, 528~540 (1967).
- 8) C. S. CHUNG, E. G. RICHARDS and H. S. OLCOTT, *ibid.*, **6**, 3154~3161 (1967).
- 9) 高士令二・新井健一・斎藤恒行: 本誌, **36**, 165~168 (1970).
- 10) C. H. FISKE and Y. SUBBAROW: *J. Biol. Chem.*, **66**, 375~400 (1925).
- 11) S. P. COLOWICK: *Methods in Enzymol.* **2**, 598~604 (1955).
- 12) A. SZENT-GYÖRGYI: *Chemistry of Muscular Contraction*, 2nd ed., p. 154, Academic Press, New York (1951).
- 13) A. G. GORNALL, C. S. BARDAWILL and M. M. DAVID: *J. Biol. Chem.*, **177**, 751~766 (1949).

がつて, 本法を応用してミオシンの各種条件下における貯蔵中の変性の早さや機構を追究することができると思われる。事実, 著者らは, 加熱 (30°C, 45 分間) によつてミオン単量体に変性して ATP-ase 活性の低下をきたすとき, 二量体およびそれ以上の多量体に変化してゆくこと, および, ソルビトール, シュクロースのような糖アルコール, または糖がこの変性をかなり抑制し, 単量体を保持する効果を観察している¹⁹⁾。その一例を Fig. 6 に示すが, 詳細については次報にゆずる。

要 約

DEAE-Sephadex A-50 により, コイ筋肉ミオシンのイオン交換クロマトグラフィーを RICHARDS らの方法に準じて行なつた。その結果, 先に報告した方法で調製したコイ筋肉ミオシンの溶出図は家兎, ニワトリ, マグロなどのミオンと酷似し, そのほとんどが単量体からなる高純度のミオン調製品であることがわかつた。

ここでえられたミオンは未処理のミオン

- 14) O.H. LOWRY, N.J. ROSEBROUGH, A.L. FARR and R.J. RANDALL: *ibid.*, **193**, 265. 275 (1951).
- 15) C.G. VALLEJO and R. LAGUNAS: *Anal. Biochem.*, **36**, 207~212 (1970).
- 16) J.E. GODFREY and W.F. HARRINGTON: *Biochemistry.*, **9**, 894~908 (1970).
- 17) C.S. CHUNG: *ibid.*, **8**, 39~48 (1969).
- 18) E.F. BARIL, D.S. LOVE and H. HERRMANN: *J. Biol. Chem.*, **241**, 822~830 (1966).
- 19) 新井健一・高士令二・斎藤恒行: 日本水産学会秋季大会発表 (1970).