ティラピア背筋のアクチンとミオシンの結合について

新井 健一・北 尾 勝・関 伸 夫

(1973 年 9 月 28 日受理)

On the Binding of Actin with Myosin from Dorsal Muscle of Tilapia

Ken-ichi ARAI*, Masaru KITAO*, and Nobuo SEKI*

Actin and myosin were prepared separately from the dorsal muscle of tilapia (*Tilapia mossambica*) and actomyosin was reconstituted at various ratios of actin to myosin by weight.

It was found that the reconstitution of actomyosin restored the identical characteristics of natural actomyosin; that is, anomalous viscosity with respect to protein concentration and reversible dissociation into actin and myosin by ATP at high ionic strength, which resulted in high ATP-sensitivity, positive superprecipitation upon the addition of ATP at low ionic strength, and the enhancement of Mg^{2+} dependent ATPase activity.

These results support the conclusion that the biological activities of fish actin are essentially the same as those of rabbit.

著者らは、先に、魚類筋肉から重合能力を保持している G-アクチンを抽出する方法を明らかにし、重合に関する基礎的な条件について検討を加えた¹⁾。そして、さらに、ライラピア筋肉アクチンについて、それらを精製純化する方法を研究し、ディスク電気泳動的に単一成分で、しかも、 Ca^{2+} に対して脱感作された F-アクチンを調製できることを報告した²⁾。

本研究では、魚類筋肉から抽出、重合させた F-アクチンの生物学的活性について検討した。すなわち、筋肉細胞内におけるアクチンの生物学的役割は、先ず第一に、生理的条件下で重合して F-アクチンとなり、thin-filament を構成すること、そして第二に thick-filament を構成するミオシンとの間に、ATP の関与の下で、特異な相互反応を示すことにある。第一の性質についてはすでに報告したので、第二の性質を証明するために、別々に調製したアクチンとミオシンからアクトミオシンを再構成し、その粘性、ATP を加えたとき起るアクチンとミオシンへの可逆的解離 (ATP 感度の増加)、超沈澱性 (収縮力) の回復、および Mg^{2+} -ATPase の活性化などを検討することにした。

魚肉から調製したアクチンの生物学的活性について研究をした例は非常に少なく、従来 CONNELL が cod のアクチンとミオシンから再構成したアクトミオシンの固有粘度、ATP 感度、超遠心による沈降速度などを測定した例が見られるだけである³⁾。

実 験 方 法

アクチンの調製 魚肉からアクチンの調製法については先に報告した¹⁾。すなわち、魚肉を細切り、0.4% $NaHCO_3$, H_2O で洗滌した後、アセトンで脱水して筋肉の乾燥粉末とした。このアセトン乾燥粉末から 0.5 mM ATP, pH 7.0 水溶液により低温で 20 分間抽出すると、粗 G-アクチンが得られる。次に、KCl を終濃度 0.1 M になるように加え、室温で 1 時間くらい放置した後、0.6 M KCl または 0.1 M KCl (いずれも 5 mM Tris-maleate buffer, pH 6.8 を含む) に透析し、遠心分離して F-アクチン溶液を得た。

* 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).

ミオシンの調製 魚肉からミオシンの調製法についても先に報告した⁹⁾。すなわち、あらびきした魚肉を低イオン強度りん酸 buffer, pH 7.5 で洗滌し、次に、5 mM ATP と 1 mM $MgCl_2$ を含む 0.45 M KCl-りん酸 buffer, pH 6.4 溶液で短時間 (ティラピアの場合は 10 分間) 抽出し、希釈沈澱を行なつて集めた後、0.6 M KCl (5 mM Tris-maleate buffer, pH 6.8 を含む) に溶解、一夜透析し、遠心分離して得た。

アクトミオシンの再構成と ATP 感度の測定 従来、兎に関する研究において、アクトンとミオシンは 1:3.7-4 の重量比で結合してアクトミオシンを構成しているといわれる⁹⁾。しかし、アクトンまたはミオシンが純粋でない場合は、アクトミオシンを再構成するとき、その比率が見掛け上変化してくることは当然である。そこで、あらかじめアクトンとミオシンの混合比を変えて粘度を測定し、ATP 感度を求めた⁹⁾。すなわち、たんぱく質濃度が約 4 mg/ml のアクトンとミオシンを調製し、たんぱく質濃度が一定になるように保持しながら、アクトンとミオシンの重量がいろいろの比率になるように混合した (実験結果の Fig. 2 を参照されたい)。このようにして、アクトンとミオシンの重量比が 1:0, 1:0.2, 1:0.5, 1:1, 1:2, 1:5, 0:1 の混合液が得られる。これらをたんぱく質濃度が 2-3 mg/ml になるように希釈した後粘度を測定し、次に ATP を添加して粘度の変化から ATP 感度を算出した。そして、ATP 感度が最高値を示すときのアクトンとミオシンの重量比を求めた。

粘度の測定 ATP 感度の測定はたんぱく質濃度が 2-3 mg/ml において行なわれるので、溶媒の流過時間が 30-40 秒で、容量が 2 ml のオストワルド型粘度計が適当であつた。他に、F-アクトン、ミオシン、アクトミオシンのたんぱく質濃度と粘度の関係を検討する実験において、特に粘度が低い場合は、溶媒の流過時間が 120-130 秒で、容量が 2 ml のオストワルド型粘度計を使用した。なお、粘度の測定は $10 \pm 0.1^\circ C$ で行なつた。

ATPase の測定 ミオシンおよび再構成アクトミオシン中のミオシン部分の示す ATPase を測定するために、高塩濃度下で Ca^{2+} で活性化される ATPase 活性を、そして、アクトミオシンに特徴的な ATPase として、低塩濃度下で Mg^{2+} で活性化される ATPase 活性を測定した。すなわち、 Ca^{2+} -ATPase 活性は 0.5 M KCl, 5 mM $CaCl_2$, 25 mM Tris-maleate buffer, pH 7.0, 1 mM ATP, たんぱく質約 0.3 mg/ml の反応混液で、また、 Mg^{2+} -ATPase 活性は 15 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$, 0.5 mM EGTA, 25 mM Tris-maleate buffer, pH 7.0, 1 mM ATP, たんぱく質約 0.3 mg/ml の反応混液で生成する無機りん酸量を経時的に比色定量し、一次反応式に従つて比活性を求めた。反応温度はいずれも $25^\circ C$ である。

超沈澱 アクトミオシンの特性の 1 として知られる超沈澱性⁷⁾は、0.1 M KCl 溶液中にアクトミオシンが 1 mg/ml になるように懸濁した後、ATP を 1 mM になるように加え、試験管内において栓状沈澱の形成を観察した。

実験結果

再構成アクトミオシンの粘性について ティラピア筋肉から別々に調製した F-アクトン、ミオシンおよびアクトンとミオシンを 1:2 の重量比で混合して再構成したアクトミオシンについて、たんぱく

Fig. 1. Concentration dependence of the reduced viscosity of F-actin, myosin, and reconstituted actomyosin.

All solutions are 0.6 M KCl containing 5 mM Tris-maleate, pH 6.8.

The viscosity was measured at $10^\circ C$ in the Ostwald type viscosimeter with the out-flow time of 35 seconds or 130 seconds, in a total volume of 2 ml.

●—●, Actomyosin reconstituted at an actin to myosin ratio of 1:2 (W/W).

△—△, F-actin.

○—○, Myosin.

質濃度が 0.05–0.3 g/dl の範囲の粘度を測定した。たんぱく質濃度と還元粘度との関係を Fig. 1 に示す。この結果によると、F-アクチンとミオシンにおいてはたんぱく質濃度 (0.3 g/dl まで) と還元粘度との関係は直線的になり、再構成アクトミオシンでは直線関係が認められず、異常粘性を示すことがわかる。この事実は天然アクトミオシンの特性の1として知られている⁹⁾。また、F-アクチンとミオシンそれぞれの粘性に比べると、両者を混合したものの粘性は全体に高くなっており、結合して新しい複合たんぱく質、アクトミオシンが構成されたことを立証している。なお、この結果から求められた固有粘度は、F-アクチンが 2.30, ミオシンが 2.10, 再構成アクトミオシンが 2.60 g/dl^{-1} であった。F-アクチンの固有粘度は、従来、cod について報告されている値と類似している^{8,9)}。

再構成アクトミオシンの ATP 感度について

ティラピア筋肉から調製した F-アクチンとミオシンをいろいろの重量比で混合し、アクトミオシンを再構成して ATP 感度を測定した。結果の一例を Fig. 2 に示した。この実験では F-アクチン (4.33 mg/ml) とミオシン (3.88 mg/ml) を横軸に示したような割合で混合した後、粘度を測定した。ATP を添加する前および後の相対粘度の対数値をとり、それらから ATP 感度を求めた。使用した F-アクチンとミオシンについて ATP 感度を測定してみると、それぞれ 0 および 7 であったが、再構成アクトミオシンについて得られた最高値は 100 となり、そのときアクチンとミオシンの重量比はほぼ 1:1.8 であった。この場合、ATP 感度が最高値を示すアクチンとミオシンの重量比は、アクチンとミオシンの純度が調製ごとにやや異なるため、実験ごとに少し異なつた比率となるが、アクチンが 1 に対してミオシンが 1.7–2.2 の範囲にあつた。次に、DEAE-Sephadex A 50 によつて精製したミオシン¹⁰⁾ (4.00 mg/ml) と F-アクチン (4.00 mg/ml) を使用して、Fig. 2 と同じ実験を行ない同傾向の結果を得た。そこで使用したアクチンとミオシンについて測定した ATP 感度は 0 と 2 であったが、再構成アクトミオシンの最高値は 100 であり、そのときアクチンとミオシンの重量比は 1:2 であった。

再構成アクトミオシンの ATP による可逆的解離について ATP 感度の測定の場合と同様に、0.6 M KCl 溶液のアクトミオシンは ATP によつてアク

Fig. 2. Viscosity and ATP-sensitivity of reconstituted actomyosin.

F-actin, 4.33 mg/ml, and myosin, 3.88 mg/ml, in 0.6 M KCl containing 5 mM Tris-maleate at pH 6.8 were mixed at various ratios (V/V) as cited on abscissa.

Viscosity was measured at 10°C before, (●—●), and after, (○—○), addition of ATP plus MgCl_2 to 1 mM, respectively.

ATP-sensitivity, (□—□), was calculated from the formula;

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

where η_r and $\eta_{r \cdot \text{ATP}}$ are the relative viscosities before and after addition of ATP, respectively.

Fig. 3. Reversible dissociation of reconstituted actomyosin.

At the arrow 1 and 2, 1 mM ATP at final concentration was added to actomyosin, 2 mg/ml, in 0.6 M KCl containing 5 mM Tris-maleate, pH 6.8, respectively.

Actomyosin was reconstituted at an actin to myosin ratio of 1:2 (W/W).

Viscosity measurement was essentially the same as in Fig. 2, except that MgCl_2 was excluded and temperature was at 20°C.

チンとミオシンに解離するが、次に、ATP が分解消失すると両者は再び結合する過程をくりかえす。ここでは、F-アクチンとミオシンを 1:2 に混合し再構成したアクトミオシンで、たんぱく質濃度が 2 mg/ml の溶液について、以上の過程を粘度の変化から検討した。その結果を Fig. 3 に示した。先ず、アクトミオシンの粘度を測定し、次に、粘度計内で 1 mM ATP を加えると (矢印 1), 粘度は急速に下がり一定値になるが、20 分後には粘度が上昇しはじめ、40 分後に一定値に回復する。そこで、あらためて 1 mM ATP を加えると (矢印 2), 粘度は再び急速に下がり、20 分後に上昇回復する過程をくりかえすことがわかる。この実験では 0.6 M KCl 溶液でアクトミオシン ATPase を阻害する Mg^{2+} を添加しないので、加えられた ATP はじょじょに分解し消失する 20 分後にはアクチンとミオシンが再結合して粘度が上ると考えられる。

事実、この系の中に Mg^{2+} を加えると、ATP による解離は長時間保持される上に粘度の回復が著しく遅れることを認めた。ATP の分解を早くしアクチンとミオシンの再結合を円滑に行なわせる目的で、本実験は 20°C で行なった。

再構成アクトミオシンの超沈澱について アクトミオシンは生理的塩濃度において、ATP との相互作用の結果、超沈澱 (収縮) する性質を示すが、F-アクチンとミオシンは単独では超沈澱を起さないことが知られている。ここでは、F-アクチンとミオシンを 1:2 の重量比で再構成したアクトミオシンを使用し、0.10 M KCl 懸濁液とした後、ATP を加え、試験管内における超沈澱を観察した。その結果を Fig. 4 に示した。Fig. 4 にはたんぱく質濃度が 1.0 mg/ml で 0.1 M KCl に調整したミオシン (M), F-アクチン (A), および再構成アクトミオシン (AM) に対して、ATP を添加する前 (a), 添加後 1 分 (b), 添加後 2 分 (c), および 4 分 (d) の状態が示されている。この中で、非常に早く顕著な栓状の超沈澱を生ずるのは再構成アクトミオシンだけであつて、F-アクチンとミオシンには認められなかった。

再構成アクトミオシンの Mg^{2+} -ATPase 活性について F-アクチンは ATPase 活性を持たず、ミオシンは Ca^{2+} によつて著しく活性化されるが Mg^{2+} によつて阻害される ATPase を保持している。一方、アクトミオシン ATPase も Ca^{2+} によつて活性化されるが、低イオン強度下では Mg^{2+} によつても活性化される特徴がある。そこで、ミオシンに F-アクチンを添加してアクトミオシンを構成するとき、 Mg^{2+} -ATPase が活性化される事実を確かめようとした。その実験の結果を Fig. 5 に示した。すなわち、一定量 (6 mg/ml) のミオシンに対して F-アクチンを 0 から 8.4 mg まで、段階的に増量してゆき、構成したアクトミオシンの Ca^{2+} -ATPase と Mg^{2+} -ATPase を測定した。その結果を使用したミオシンのたんぱく質量あたりの比活性であらわした

Fig. 4. Superprecipitation of reconstituted actomyosin.

Observation of superprecipitation was made at protein concentration of 1.0 mg/ml in 0.1 M KCl, pH 6.8 by addition of ATP to a final concentration of 1 mM.

Photographs were taken at zero time, (a); 1 minute, (b); 2 minutes, (c); and 4 minutes, (d) after addition of ATP, respectively.

(A), F-actin.

(AM), Actomyosin reconstituted at an actin to myosin ratio of 1:2 (W/W).

(M), Myosin.

が、これによると、ミオシンに対してアクチンが増量されると、 Ca^{2+} -ATPase 比活性は変化しないままで、 Mg^{2+} -ATPase 比活性が高まり、活性化されることがわかる。 Mg^{2+} -ATPase はミオシンが 6 mg に対して F-アクチンが 3.6 mg 加えられたときに、最大活性に達しそれ以上アクチンを増量しても変化しなかった。このときの F-アクチンに対するミオシンの重量比は 1:1.7 となっており、先に述べた ATP 感度が最高値を示すときの比率と良く類似していた。

考 察

魚肉から調製した G-アクチンが F-アクチンへ重合する能力についてはすでに述べたが¹⁾、本研究ではその F-アクチンがミオシンとの間に、ATP の関与の下で、特異な相互作用を示す事実を、アクトミオシン構成にともなう異常粘性の出現、0.6 M KCl 溶液中における ATP による可逆的な解離、高い ATP 感度、0.10 M KCl における超沈澱性、および Mg^{2+} -ATPase の活性化などから確認することができた。したがって、魚肉アクチンの生物学的活性は家兎骨格筋のアクチンと本質的に全く同じであることが確かめられる。

ただし、本研究で使用した魚肉アクチンは精製していないので、少量ではあるがトロポニン、トロポミオシンなどが残存していることが知られている²⁾。また、粗 G-アクチン中に含まれているといわれる不活性 G-アクチン (重合能を失なった G-アクチン)³⁾ の除去についても検討を加えておらず、活性型 G-アクチンの含有量は約 60% と推定される²⁾。それゆえ、ATP 感度および Mg^{2+} -ATPase の活性化に関する実験から得られた F-アクチンとミオシンの結合比 (重量)、1:1.7-2.2 は補正をする必要があると考える。イオン交換クロマトグラフィーによつて高度に精製したミオシンを使用しても、以上の結合比はほとんど変わらないので、ミオシン中の不純物については無視することとし、使用したアクチンの純度を 60% と仮定すると²⁾、本研究で得られた F-アクチンに対するミオシンの結合比は 1:3 以上となるので、兎の場合と近似してくる。

再構成アクトミオシンの固有粘度、ATP による粘性変化、および超沈澱に関する実験は F-アクチンとミオシンの結合比 (重量) が 1:2 の場合について行なつた。しかし、実験結果はアクチンとミオシンの比が 1:1 の場合でもあまり変わらず同じであつた。また、1:3 の場合は明らかに劣り固有粘度は低値となり、ATP 感度も低値で、超沈澱もやや遅くおこつた。いうまでもなく、アクチンとミオシンの結合に関する研究は、両たんぱく質を良く精製した上で、再検討する必要があると考えている。

本研究はティラピアの背筋から調製した F-アクチンとミオシンから再構成したアクトミオシンについて行なわれた。しかし、ティラピア以外の魚種、例えば、コイ、ニジマス、ホッケなどから調製した F-アクチンについても検討しているが、結果は同じである。したがって、本研究で得られた魚肉の再構成アクトミオシンに関する実験結果は、他の魚類筋肉においても認められるだろうと思われる。ただし、ティラピア、コイ以外の魚肉からは、F-アクチンとの結合能が十分なミオシンを調製したという報告例が少ないので、今後の研究課題となつている。

Fig. 5. Restoration of Mg^{2+} dependent ATPase activity of reconstituted actomyosin.

The ATPase assay was performed at 25°C in the reaction mixture of 1 mM MgCl_2 , 15 mM KCl, 0.5 mM EGTA, 25 mM Tris-maleate, pH 7.0, and 0.3 mg/ml of protein (namely Mg^{2+} -ATPase activity) or 5 mM CaCl_2 , 60 mM KCl, 25 mM Tris-maleate, pH 7.0, and 0.3 mg/ml of protein (namely Ca^{2+} -ATPase activity), respectively.

Note that the rate of ATP hydrolysis is expressed in terms of the myosin content.

●-●, Mg^{2+} -ATPase activity.

○-○, Ca^{2+} -ATPase activity.

要 約

ティラピアの背筋から F-アクチンとミオシンを別々に調製し、それらを異なる量比で混合してアクトミオシンを再構成した。

再構成アクトミオシンは、異常粘性、高イオン強度下において ATP を加えたとき起るアクチンとミオシンへの可逆的解離 (それにもとづく高い ATP 感度)、低イオン強度下において ATP を加えらるとおこる超沈殿、および Mg^{2+} -ATPase の活性化など、天然アクトミオシンと同じ特性を示すことを認めた。

これらの事実から、魚肉アクチンの生物学的活性は兎の場合と本質的に同じであることが確かめられる。

文 献

- 1) 北尾 勝・関 伸夫・新井健一: 本誌, **39**, 1263-1269 (1973).
- 2) 関 伸夫・北尾 勝・今野久仁彦・新井健一: 同誌, **39**, 1211-1219 (1973).
- 3) J. J. CONNELL: *J. Sci. Food Agric.*, **11**, 513-519 (1960).
- 4) 高土令二・新井健一・斎藤恒行: 本誌, **36**, 165-168 (1970).
- 5) Y. TONOMURA: *Muscular Proteins, Muscular Contraction and Cation Transport*, University of Tokyo Press, 1972, pp. 1-155.
- 6) 新井健一・高土令二・斎藤恒行: 本誌, **36**, 237-240 (1970).
- 7) 新井健一・高土令二・斎藤恒行: 同誌, **36**, 487-490 (1970).
- 8) 高土令二・新井健一・斎藤恒行: 同誌, **36**, 169-172 (1970).
- 9) J. J. CONNELL: *Biochem. J.*, **58**, 360-367 (1954).
- 10) 高土令二: 本誌, **38**, 126-132 (1972).