SDS 存在下におけるコイ筋原繊維たんぱく質 のゲル濾過と電気泳動^{*1}

関 伸 夫・新 井 健 一

(1974 年 8 月 7 日受理)

Gel Filtration and Electrophoresis of Fish Myofibrillar Proteins in the Presence of Sodium Dodecyl Sulfate

Nobuo SEKI^{*2} and Ken-ichi ARAI^{*2}

A gel filtration method in the presence of sodium dodecyl sulfate (SDS) was applied to the separation of the components of myofibrillar proteins from fish muscle. A characterization of the components obtained by gel filtration chromatography was made by measuring the mobilities on SDS-polyacrylamide gel electrophoresis.

Gel filtration of carp myosin gave two clearly separated peaks, corresponding to myosin heavy chains and light chains. The weight ratio of heavy chains to light chains of myosin was estimated to be approximately 87 : 13, while carp actin gave a single peak which was eluted between the peaks of myosin heavy chains and light chains.

Actomyosin was separated into three peaks. The weight ratio of myosin to actin in actomyosin prepared by the ordinary method was estimated to be approximately 3 : 1.

Myofibrils, accounting for 70% of the muscle proteins, were completely dissolved in SDS. The elution pattern of dissolved myofibrils was closely similar to that of actomyosin.

The present method was successfully used to examine the purity of myosin, actin, and actomyosin and to estimate the contents of their respective components.

魚肉構成たんぱく質の研究が困難である理由は幾つかあるように思われる。その一つとして魚肉からのたんぱく質の抽出性、溶解性がウサギ骨格筋の場合のように良く知られておらず不明な点が多いことである。例えば魚肉からの筋形質たんぱく質や筋原繊維たんぱく質の抽出法、調製法について研究者により各種の異なる方法が提案されている¹⁾。それは魚肉を溶解または抽出して得たたんぱく質が、ミオシン、アクチンあるいはそれ以外のたんぱく質成分から成るのかどうかについて適当な判定の手段を持たなかつたことによる。著者らの研究室では、先に生物活性を測定し、ミオシン、アクチン、アクトミオシンの特性を表わすことを研究したが、これらの成分を定量的に表わすことは、ほとんど不可能であつた²⁾。一方魚肉を原料とした加工品の品質判定を行なうことも要望されており、例えば当研究室では Ca^{2+} -ATPase 全活性を測定して、冷凍すり身をアクトミオシンとみなし、その品質を判定する方法を報告した³⁾。しかし、それを構成している魚肉たんぱく質の組成については積極的な研究はまだ行なわれていない。

最近、高分子たんぱく質や不溶性たんぱく質を SDS で処理して可溶化すると同時に、サブユニットに分

^{*1} SDS: sodium dodecyl sulfate

^{*2} 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)

けて電気泳動などの方法で分析して、それらのサブユニット構造や純度を明らかにする技術が発展している。この方法によれば、筋原繊維たんぱく質、変性して一部不溶化の進んだたんぱく質でも、あるいは魚肉そのもの、魚肉の加工品についてもある程度の研究が可能であると考えられる。

そこで本研究では、魚肉筋原繊維たんぱく質（ミオシン、アクチン、アクトミオシン）、筋原繊維および魚肉加工品の一例として、冷凍すり身の構成たんぱく質を SDS によつて可溶化し、その構成を知ると同時に各成分の簡便な定量法を確立することを目的とした。

実験方法

ミオシンの調製⁴⁾ コイ筋肉から 5 mM ATP-1 mM $MgCl_2$ を含む 0.45 M KCl (pH 6.4) で 5 分間抽出し、14 倍量の冷水に入れ、ミオシンを稀釈沈澱した。この沈澱を 0.04 M ピロリン酸バッファー (pH 7.5) に溶解後、DEAE-Sephadex A-50 クロマトグラフィーによつて精製した。すなわち稀釈沈澱で得たミオシンおよそ 150~200 mg を $\phi 2.2 \times 25$ cm の DEAE-Sephadex A-50 カラムに供した。カラムからたんぱく質の溶出は stepwise elution によつて行ない、15 ml ずつを分取し、280 m μ の吸光値を測定した。まず 0.04 M ピロリン酸バッファー (pH 7.5) で溶出される区分を捨て、溶媒を 0.25 M KCl-0.04 M

Fig. 1. Sephadex G-200 gel filtration of myosin in the presence of SDS.

Myosin from carp muscle was incubated in 1% SDS-1% 2-mercaptoethanol- 5 mM phosphate buffer (pH 7.2) at room temperature overnight. Five milliliters of myosin (12.8 mg) were applied to a column (2.2 cm $\times$ 90 cm) of Sephadex G-200 equilibrating with 0.1% SDS- 5 mM phosphate buffer (pH 7.2). The protein was eluted with the same solution at room temperature and 4.8 milliliters fractions were collected. Void volume (V_o) indicated by the arrow determined by using Blue Dextran 2000. Protein was determined by the micro-biuret method.

The inserted figures are the SDS-polyacrylamide gel electrophoretic patterns of the indicated tube numbers and the original myosin (M) used for gel filtration. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis were performed according to WEBER and OSBORN¹³⁾ using 0.1% SDS- 10% gels.

ピロリン酸バッファー (pH 7.5) に変えて溶出されるミオシンを集めた。これを H_2O に透析後、生じた沈澱を遠心分離によつて集め、0.6 M KCl-20 mM Tris-maleate (pH 7.5) に溶解させた。

アクチンの調製⁹⁾ コイひき肉を 0.4% $NaHCO_3$ で洗浄したのち、アセトンパウダーとした。これから G-アクチンを 0.5 mM ATP-2 mM Tris-HCl (pH 8.0)-0.5 mM 2-メルカプトエタノール-0.2 mM $CaCl_2$ で抽出した。抽出液に 0.1 M KCl-1 mM $MgCl_2$ 濃度となるように KCl- $MgCl_2$ 混液を加え重合させ、これを $80,000 \times g$, 2 時間遠心分離して F-アクチンの沈澱を得た。F-アクチンを 0.2 mM ATP を含む前述のバッファーで透析脱重合して G-アクチンを得た。

アクトミオシンの調製 常法⁹⁾ に従つて 0.6 M KCl-リン酸バッファー (pH 7.5) で 20 時間抽出したのち、3 回稀釈沈澱を行なつて精製した。

筋原繊維の調製 コイひき肉を 5 倍量のリン酸バッファー ($I = 0.05$, pH 7.5) で 3 回洗浄後、同バッファーを加えて日本精機製ユニバーサルホモジナイザー HB 型 (回転目盛 2.5, 約 6,000 rpm) を用いて 1 分間ずつ 3 回ホモジナイズした。ホモジネートを一層のガーゼを通して汙過し、汙液を遠心分離して沈澱を集め、沈澱をさらに 3 回、15 倍量の同バッファーで洗浄した。ここで得られるたんぱく質は魚肉の全たんぱく質のおよそ 70% に相当する。ここで述べた調製方法は、従来の方^{7,8)}とは異なつており、得られたものについて形態学的観察や生理活性についての検討は加えていないが、筋原繊維たんぱく質を筋形質たんぱく質から分画することを主目的としたものである。

筋原繊維たんぱく質の可溶化 塩溶液として得られたアクトミオシン、ミオシンは H_2O に透析して脱塩したが、同時に不溶化するので引き続き 0.1% SDS-5 mM リン酸バッファー (pH 7.2) に室温で透析して、再溶解させた。筋原繊維は 8 M 尿素-1% SDS-1% 2-メルカプトエタノール-10 mM リン酸バッファー

Fig. 2. Sephadex G-200 gel filtration of actin in the presence of SDS.

Five milliliters (14.6 mg) of partially purified actin by reversible polymerization were applied to a column.

The inserted figures are the SDS-polyacrylamide gel electrophoretic patterns of the indicated tube numbers and the original actin (A).

Other experimental conditions were same as in Fig. 1.

The purity of this actin preparation was easily estimated at 86% from the area of elution pattern.

(pH 7.2) または 5% SDS で可溶化したのち、0.1% SDS-5 mM リン酸バッファー (pH 7.2) に透析した。可溶化および透析は室温で行なつた。透析後たんぱく質量をビウレット法あるいはマイクロビウレット法により求めた。1% 以下の SDS の存在は発色には影響を与えないことを確かめた。

SDS-ゲル濾過 試料はゲル濾過に供する前に SDS 処理を行なつた。すなわち試料に SDS と 2-メルカプトエタノールを終濃度がそれぞれ 1% になるように加え、室温に一夜インキュベートした。Sephadex G-200 の $\phi 2.2 \times 90$ cm ゲルカラムを 0.1% SDS-5 mM リン酸バッファー (pH 7.2) で平衡化した。これに SDS 処理をしたたんぱく質 5 ml (10~30 mg) をゲルの上端に入れ、平衡化に用いたバッファーで溶出した。5 ml をフラクションコレクターで分取し、各画分中のたんぱく量をマイクロビウレット法によつて測定した。なおたんぱく質のゲルカラムからの回収率は、たんぱく質の種類によらず 90~95% であつた。

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動は、前報⁹⁾に述べた通り 10% アクリルアミド-0.1% SDS ゲルカラムを使用して行なつた。

実験結果

ミオシンのゲル濾過 DEAE-Sephadex A-50 カラムクロマトグラフィーで精製したコイのミオシンの SDS-ゲル濾過図を Fig. 1 に示した。Fig. 1 中の写真はゲル濾過によつて得た各画分の SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動図である。また M はゲル濾過に供する前のミオシン原試料の電気泳動図である。ミオシンの SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動では、ミオシンは分子量 20 万程度の heavy chain と分子量が 1~2 万程度の数本の light chain と呼ばれる成分に解離することが知られている⁸⁻¹¹⁾。コイの

Fig. 3. Sephadex G-200 gel filtration of actomyosin in the presence of SDS. Five milliliters (21.2 mg) of actomyosin were applied to a column. The inserted figures are the SDS-polyacrylamide gel electrophoretic patterns of the indicated tube numbers and the original actomyosin (AM). Other experimental conditions were same as in Fig. 1.

ミオシンの SDS-ゲル濾過図では void volume 付近に大きなピークと、かなり遅れて溶出される小さなピークの2つが見出される。最初のピークが heavy chains で、あとのピークが light chains に相当するものであつた。したがって SDS 存在下では、ゲル濾過によるミオシン成分の溶出順序と SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動におけるそれらの移動順序は全く同じで、分子量の順に従っていることが示されている。また Fig. 1 の結果から、最初のピークと後ろのピークのたんぱく質量を定量すると、コイミオシンの heavy chains と light chains の量を概算することができる。それによると両者の比率はそれぞれ 87:13 であつた。

アクチンのゲル濾過 重合-脱重合を一回行つて精製したアクチンのゲル濾過図が Fig. 2 である。図中の写真は Fig. 1 の場合と同様に A がゲル濾過前のアクチン原試料で、アクリルアミドゲルの上に記した数字はゲル濾過によつて得られた各画分の番号である。アクチンのピークは void volume の位置よりかなり遅れて溶出されるが、この位置はミオシンの heavy chains や light chains とは重ならない。Fig. 2 ではアクチンのピークの後ろに小さな2つのピークが見出されるので、アクチン以外のたんぱく質が混入していることがわかる。これらはトロポニンのサブユニットや、ミオシンの light chains の混合物であると思われる。前報⁹⁾で報告したように、アセトンパウダーより抽出したアクチンを重合脱重合で精製した標品には、まだ少量のトロポニン、トロポミオシンが混入しており、これらは通常の Sephadex G-200 による

Fig. 4. Sephadex G-200 gel filtration of myofibrils in the presence of SDS.

Myofibrils were roughly prepared by washing the muscle exhaustively with phosphate buffer ($I=0.05$, pH 7.5) and then dissolved in 8 M urea-1% SDS-1% 2-mercaptoethanol-10 mM phosphate buffer (pH 7.2).

Five milliliters (25.4 mg) of the sample were applied to a column.

The inserted figures are the SDS-polyacrylamide gel electrophoretic patterns of the indicated tube numbers and the dissolved myofibrils (Mf).

Other experimental conditions were same as in Fig. 1.

Fig. 5. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of myofibrils (*Mf*) and sarcoplasmic proteins (*S*) from carp, and "surimi" from Alaska pollack (*P*).

"Surimi" was dissolved in 8 M urea-1% SDS-1% 2-mercaptoethanol-10 mM phosphate buffer (pH 7.2).

SDS-polyacrylamide gel electrophoresis were performed according to WEBER and OSBORN¹³⁾.

Fig. 3 中に挿入した SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動図から、最初のピークがミオシンの heavy chains, 次のピークがアクチン, 最後のピークがミオシンの light chains であることが明らかである。すなわちアクトミオシンは SDS 存在下ではミオシン heavy chains, light chains およびアクチンに解離しているので、そのゲル泳過図はミオシンとアクチンを合わせたものになる。しかもアクチンとミオシンは重なって溶出されないで、アクトミオシン中のアクチンとミオシンの量を求めることが可能である。Fig. 3 のゲル泳過図から、ここで用いたアクトミオシン中のアクチンとミオシンの比率を概算してみた。ミオシン量はミオシンの heavy chains 含量から算出すると、ミオシン量=ミオシン heavy chains $\times$ 100/87 であり、アクチンとミオシンの比率は、およそ 1:3.3 となる。ミオシン量はミオシンの heavy chains と light chains の合計量で求められるのであるが、アクトミオシンの場合には light chains の画分にはトロポニンなどが混在するので、ミオシン heavy chains の量から算出した。しかし注意を要することは、従来の方法⁷⁾で調製したアクトミオシンにはトロポニンやトロポミオシンが存在するのが普通であることである。特にトロポミオシンは SDS-ゲル泳過ではアクチンのピークと重なるので、常法で得たアクトミオシンのゲル泳過で得られるアクチンのピークにはトロポミオシンが含まれる。本実験で用いたアクトミオシンは調製に当り稀釈沈澱をくり返して精製して、トロポミオシンを除去した。すなわち SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動ではトロポミオシンのバンドはアクチンよりやや移動が早いので検出が容易であるにもかかわらず見出されていない。

筋原繊維たんぱく質のゲル泳過 方法の項で述べたように本実験で用いた筋原繊維は、低イオン強度リン酸バッファで筋肉を洗浄して、徹底的に水溶性成分を除いて得られる残渣であるが、筋肉の全たんぱく質のおよそ 70% に相当する。これを SDS で可溶化すると基質たんぱく質と考えられるものを除いて、すべて可溶化される。コイ背筋の場合は SDS で可溶化されないたんぱく質量は筋原繊維の 1% 以下である。筋原繊維たんぱく質のゲル泳過図を Fig. 4 に示した。最初のピークがミオシンの heavy chains, 次がアクチンのピークである。この結果とアクトミオシンのゲル泳過で得られた結果 (Fig. 3) を比較してみると、両者は極めて良く似ており、それぞれの図中に挿入した SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動図も似ている。これらの結果は魚の筋原繊維の大部分を占めるたんぱく質がアクトミオシンであることを示している。ここで用いたコイ筋原繊維中のアクチンとミオシンの比率はおよそ 1:2.8 である。別に調製したアクトミオシン中での比率と異なっている主なる理由は、0.6 M KCl によるアクチンとミオシンの溶出性の差、小胞体由来のたんぱく質成分の混入の問題や水溶性たんぱく質の残存量の違いなどが考えられる。

ゲル泳過ではトロポニン-トロポミオシン複合体として G-アクチンのピークより早く void volume 付近に溶出される。ところが SDS-ゲル泳過では、これらは各々のサブユニットに解離するので、アクチンのピークよりは遅れて溶出されることが示されている。しかしコイのトロポニンは現在まで純粋に単離されていないので、そのサブユニットの位置についての詳細はまだ断定できない。ここで用いたアクチン試料の純度は各々のピークのたんぱく量を測定して簡単に概算できる。それによるとおよそ 86% となる。

アクトミオシンのゲル泳過 アクトミオシンの SDS-ゲル泳過では、Fig. 3 に示すように 3 つのピークが得られる。これらのピークはミオシンとアクチンそれぞれのゲル泳過図、およ

考 察

本実験ではかなり精製されたミオシン、アクチン、アクトミオシンを用いたので、それらのサブユニットに関する SDS-ゲル浮過およびポリアクリルアミドゲル電気泳動図は確立できた。したがってこれを標準として、今後抽出溶解したたんぱく質の組成を知り、純度を推定して行くことが容易になるであろう。ただし魚種によつてミオシンの light chains の組成¹¹⁾には差があるので注意が必要である。またトロポニンについてもその純粋なものについてサブユニットが発表されていないので、比較生化学的に異なることも考慮しておく必要がある。また本方法によつて各たんぱく質成分の精密な定量を行なうための配慮はしていないので、本実験で得られた値はあくまでも概算値といわねばならないが、魚肉たんぱく質の抽出性、溶解性における疑問点を整理するためには極めて有効な方法であるといえる。特に SDS による筋原繊維や、変性たんぱく質の可溶化と、SDS 存在下におけるゲル浮過と電気泳動の組合わせにより、各構成たんぱく質成分の簡便な定量や、サブユニットの検策に役立てることができる。

SDS 存在下において、ミオシンは heavy chains と light chains と呼ばれる部分に分かれる。ミオシン heavy chain は分子量が 22 万と大きく、ゲル浮過では void volume 付近に溶出される。10% ゲルを用いた SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動では、ゲルの中に少し入るだけであるが、このミオシン heavy chains に相当するものは分子量的にも量的にも、筋形質たんぱく質には存在しないので、このものはミオシンを含む筋原繊維たんぱく質の特徴となるものである。参考のために、Fig. 5 にコイの筋肉から低イオン強度リン酸バッファー ($I = 0.05$, pH 7.5) で溶出されるたんぱく質の SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動図 (S) を示した。図から明らかなように、ミオシンの heavy chains に相当するものは見出されず、筋原繊維と筋形質たんぱく質の間には明瞭な差がある。しかし、アクチンのバンドにはそれに相当する位置にバンドが見出されている。これは解糖系酵素 (アルドラーゼなど) やクレアチンキナーゼのサブユニットがアクチンに近い分子量をもつためであろう^{12,13)}。さらに魚肉の場合は次の点の考慮も必要と思われる。すなわち魚肉のアクチン、トロポミオシンは筋原繊維やアクトミオシンを水あるいは低イオン強度のバッファーに晒しておくで、一部溶出され易いので、これらのたんぱく質が水溶性区分に混入している可能性も考えなければならない。アクトミオシンのゲル浮過図 (Fig. 3) から、アクチンとミオシンの比率はおよそ 1:3 であり、ミオシン heavy chains は分子量が大きいだけでなく量的にも多いことが示される。Fig. 3 のパターンをアクトミオシン型と呼ぶことにすると、筋原繊維たんぱく質のパターンもまたアクトミオシン型を示す。これは筋原繊維はアクトミオシンそのものであることの一つの証拠である。すなわち、SDS-ゲル浮過あるいは SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動図がミオシンやアクトミオシン型のパターンを示すことは、そのたんぱく質試料が筋原繊維たんぱく質に由来していることを予想させるものである。

Fig. 5 中の写真 P は、スケトウダラ冷凍すり身を直接 SDS で可溶化して、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供したときの図である。ここには示さなかったが、SDS-ゲル浮過の図もアクトミオシン型を示していた。この事実は魚肉を水晒して製造したすり身では、水溶性たんぱく質は除去されており、アクトミオシンが主成分であることを示している。このようにして、本方法はすり身などの魚肉加工品のたんぱく質成分の推定や、添加した異種たんぱく質の検出など、品質の判定面にも広く応用できるので、この点についても現在検討を続けている。

本研究の遂行にあたり御協力をいただいた横山和博君に深く感謝致します。

文 献

- 1) 志水 寛: *New Food Industry*, **12**, 4-8 (1970).
- 2) 新井健一: 同誌, **12**, 15-18 (1970).
- 3) 川島孝省・大場明子・新井健一: 本誌, **39**, 1201-1209 (1973).
- 4) 高士令二: 同誌, **38**, 126-132 (1972).

- 5) 関 伸夫・北尾 勝・今野久仁彦・新井健一: 同誌, **39**, 1211-1219 (1973).
- 6) 高士令二・新井健一・斎藤恒行: 同誌, **36**, 169-172 (1970).
- 7) S. V. PERRY and T. C. GREY: *Biochem. J.*, **64**, 184-192 (1956).
- 8) 常盤知宣・松宮弘幸: 本誌, **35**, 1099-1109 (1969).
- 9) B. PATERSON and R. C. STROHMAN: *Biochemistry*, **9**, 4094-4105 (1970).
- 10) A. G. WEEDS and S. LOWEY: *J. Mol. Biol.*, **61**, 701-725 (1971).
- 11) 高士令二・室塚剛志・新井健一: 本誌, **40**, 1155-1161 (1974).
- 12) R. K. SCOPES and I. F. PENNY: *Biochim. Biophys. Acta*, **236**, 409-415 (1971).
- 13) K. WEBER and M. OSBORN: *J. Biol. Chem.*, **244**, 4406-4412 (1969).