アカザラガイ閉殻筋からアクトミオシンの調製について*

西 田 清 義

(1975 年 6 月 13 日受理)

Preparation of Actomyosin from the Adductor Muscle of Akazara Scallop

Kiyoyoshi NISHITA*

Actomyosin was prepared from the striated adductor muscle of akazara scallop.

1) Akazara scallop actomyosin showed the well-known characteristics, that is, anomalous viscosity, high ATP-sensitivity, marked ATP-hydrolyzing activity, and superprecipitation. These are very similar to those of actomyosin from rabbit skeletal muscle.

2) The Ca^{2+} -ATPase activity of akazara scallop actomyosin was activated continuously as the KCl concentration increased from 0.06 to 0.31 M, and reached about two fold at 0.31 M KCl, while that of carp actomyosin was decreased steadily as the KCl concentration was increased from 0.06 to 0.5 M.

3) The Ca^{2+} -ATPase specific activity of akazara scallop actomyosin increased 4.7 fold up on the addition of 1.25 M urea; on the other hand, the activity of carp actomyosin rapidly decreased on the addition of urea.

4) The rate constants for the denaturation of akazara scallop actomyosin Ca^{2+} -ATPase were calculated as $1.6 \times 10^{-5} \text{ sec}^{-1}$ at 30°C , $36.9 \times 10^{-5} \text{ sec}^{-1}$ at 35°C and $249.5 \times 10^{-5} \text{ sec}^{-1}$ at 40°C . These values were comparable with those of yellowtail actomyosin.

水産動物の筋肉構成たんぱく質に関しては、近年多数の魚種について研究され、生物学上だけでなく食品学上も有用な知見を提供している。一方、水産無脊椎動物の筋肉構成たんぱく質に関しては、ホタテガイ閉殻筋^{1,2)}、エビ³⁾、カブトガニ⁴⁾、ザリガニ⁵⁾などの報告が見られるが、一般にその調製法は困難であり、ウサギ骨格筋や魚類背筋に採用されている方法とは、やや異なっている。また、極めて限られた種類の動物を除いては、生物学的活性も十分に明らかにされていない現状である。ただし、ホタテガイ閉殻筋のように特に研究が深められたものの生物学的活性は、従来報告されたウサギや魚類の場合と比べると、明らかに異なり、比較生化学的な興味を投げかけている。一方、わが国では多種にわたる軟体動物肉を摂食する関係上、これらの筋肉たんぱく質を食品として応用する立場から、例えばその加工または貯蔵に対する適性、安定性を研究してゆく必要があると考える。このような観点に立つて、著者は水産無脊椎動物の筋肉構成たんぱく質の調製法とその性質を比較生化学的ならびに食品化学の見地から研究することを目的として、先ずアカザラガイ閉殻筋のアクトミオシンについて研究を行なった。

実験方法

アカザラガイ閉殻筋からアクトミオシンの調製法 アカザラガイ (*Chlamys nipponensis akazara*) は

*1 本研究は昭和 49 年 11 月、日本水産学会秋季大会において発表した。

*2 北海道大学水産学部 (Laboratory of Biopolymer, Faculty of Fisheries, Hokkaido Univ. Hakodate, Japan)

水揚げ直後で生きているもの、または -20°C 以下で凍結保存したものを1カ月以内に使用した。閉殻筋は白色不透明部を除去し、透明な肉質部だけを調製に供した。アクトミオシンの抽出は BÁRÁNY らの方法⁹⁾ に準じて行なつた。すなわち、閉殻筋 10~20 g を 10 倍量の 0.04 M KCl, pH 7.0 でホモジナイズし、2500×g, 15 分間遠心分離して洗浄した。この操作を 3~4 回繰返したのち、残渣を 10 倍量の 0.6 M KCl-0.05 M Tris-HCl (pH 7.5) で 0°C , 15~20 時間抽出した。20,000×g, 30 分間の遠心分離によつて得た上澄を 10 倍量の冷水に注ぎ、生じた沈殿を 8,000×g, 15 分間の遠心分離で集めた。この沈殿を 3 M KCl (pH 7.0) で溶解し、KCl の終濃度を 0.6 M とし、0.6 M KCl-0.05 M Tris-HCl (pH 7.5) に対して一晚透析した。透析後この溶液を 10,000×g, 15 分または 30,000×g, 1 時間遠心分離して、上澄をアクトミオシン溶液とした。

コイアクトミオシンの調製法 コイ背筋肉から高士らの方法⁸⁾ によつてアクトミオシンを調製した。得られたアクトミオシンは ATP 感度が 113, Ca^{2+} -ATPase 比活性は $0.223\sim 0.419 \mu\text{moles Pi/min/mg}$ であつた。

アクトミオシンの生物活性測定法 調製アクトミオシンの ATPase 活性測定法、粘性測定法および超沈殿の観察は高士らの報告⁹⁾ によつた。アクトミオシンと尿素が反応するときの条件は、アクトミオシン濃度 0.10~0.25 mg/ml, 5 mm CaCl_2 , 60 mm KCl, 50 mm Tris-maleate, pH 7.0 と種々の尿素濃度 (いずれも終濃度で表わした) である。このうちアクトミオシンは最後に添加し、 25°C で 5 分間加温してから 1 mm ATP を加えて、ただちに ATPase 活性を測定した。アクトミオシンの加熱変性は、0.6 M KCl-50 mM Tris-HCl, pH 7.5 の溶液でたんぱく質濃度が 1.0~2.5 mg/ml とし、魚肉アクトミオシンについて行なつた新井らの報告¹⁰⁾ の方法に準じた。

たんぱく質の定量法 ビウレット法によつて、牛血清アルブミン、フラクシオン V を標準たんぱく質として比色定量した。

実験結果

ATPase 活性 生鮮ならびに凍結アカザラガイ閉殻筋から調製したアクトミオシンはほぼ同じ生物活性を示し、あまり差異がなかつた。このアクトミオシンは Table 1 に示した通り極めて高い ATPase 比活性を有し、 Ca^{2+} 添加によつて強く活性化され、特に KCl 濃度が高くなるに従つて比活性が増加した。しかし、 Mg^{2+} によつては、12 mM KCl で強く活性化されたが高塩濃度すなわち 600 mM KCl では阻害された。これらの性質は哺乳動物、魚類の横紋筋アクトミオシン ATPase のもつ傾向によく似ていた。

次に Ca^{2+} -ATPase 活性におよぼす KCl 濃度の影響を詳細に検討し Fig. 1 に示した。アカザラガイ閉殻筋アクトミオシンの Ca^{2+} -ATPase 活性は KCl 濃度が 0.31 M 付近で最大を示し、60 mM KCl にお

Table 1. Characteristic properties of actomyosin ATPase activity of akazara scallop

KCl concentration (mm)	ATPase activity ($\mu\text{moles Pi/mg/min.}$)		
	None	CaCl ₂	MgCl ₂
12	0.032	0.766	0.442
60	0.046	0.921	0.082
600	0.406	1.345	0.041

ATPase activity was measured under the following conditions; 25 mM Tris-maleate (pH 7.0), 1 mM ATP, 0.1~0.2 mg/ml of protein, various concentration of KCl with or without 5 mM CaCl_2 or 1 mM MgCl_2 .

In the case of control and MgCl_2 treatment, 0.5 mM EGTA was also added.

Fig. 1. Effect of KCl concentration on Ca^{2+} -ATPase activity of akazara scallop and carp actomyosins.

Akazara scallop (—●—), carp (○): Conditions of ATPase assay; 50 mM Tris-maleate, pH 7.0, 5 mM CaCl_2 , and 1 mM ATP.

ける比活性の約 1.9 倍に活性化され非常に特異的であつた。一方、対照のため用いたコイのアクトミオシン Ca^{2+} -ATPase 比活性は KCl が低濃度 (60 mM) の時に高く、高濃度になるに従つて活性の低下が認められ、ウサギの横紋筋アクトミオシンとよく似ている。

粘性 たんぱく質濃度と相対粘度の関係を Fig. 2 に示す。図から明らかのように、このたんぱく質は構造粘性を示した。また求められる固有粘度は約 $2.05 \text{ (g/100 ml)}^{-1}$ であり、この値はウサギ、魚類のアクトミオシンのそれに比べてかなり小さい。次にこのアクトミオシン溶液の粘性に対する ATP の影響を Fig. 3 に示した。すなわち、 25°C においてアクトミオシンの 0.6 M KCl 溶液に、1 mM ATP と MgCl_2 を添加すると急激に粘性が低下したが、時間が経過するに伴い、もとの粘性にまで回復した。これに再度 1 mM ATP を添加すると再び粘性低下が起こつた。こ

Fig. 2. Relationship between reduced viscosity and actomyosin concentration.

Viscosity of actomyosin in 0.6 M KCl-0.05 M Tris-HCl (pH 7.5) was measured at 10°C in the Ostwald type viscosimeter with the out-flow time of 58 seconds, in a total volume of 2 ml.

Fig. 3. Reversible dissociation of actomyosin from the adductor muscle of akazara scallop.

At the arrow, 1 mM ATP- MgCl_2 (final concentration) were added to actomyosin in 0.6 M KCl-0.05 M Tris-HCl (pH 7.5). Viscosity was measured at 25°C .

Fig. 4. Superprecipitation of akazara scallop and carp actomyosins.

a) Akazara scallop actomyosin, b) Carp actomyosin.

Superprecipitation of actomyosin in the left tube was observed by the addition of ATP-MgCl₂ to a final concentration of 1 mM.

Actomyosin (3 mg/ml) in 0.1 M KCl-8 mM Tris-HCl, pH 7.5 was used.

Fig. 5. Effect of urea on Ca²⁺-ATPase activity of akazara scallop and carp actomyosins.

Akazara scallop (—●—), carp (---○---): Conditions of Ca²⁺-ATPase activity assay; 50 mM Tris-maleate pH 7.0, 5 mM CaCl₂, 60 mM KCl, and 1 mM ATP.

のように、アカザラガイ閉殻筋のアクトミオシンはミオシンとアクチンに解離、再重合を繰返す能力をもっていた。この粘性低下から ATP 感度を算出すると 105~115 であり、コイのアクトミオシンの場合と同値であった。

超沈殿 このアクトミオシンの超沈殿は、Fig. 4 に示した通り ATP 添加分後に沈殿が起こり、約 10 分後に完了した。なお対照として使ったコイアクトミオシンは ATP 添加後 30 秒で沈殿が始まり、2~3 分後に完了したので、アカザラガイの場合は明らかに遅かった。

以上得られた結果から、アカザラガイ閉殻筋から調製したアクトミオシンはウサギのアクトミオシンで知られたすべての生物活性をほぼそなえたものであることが明らかとなった。

Ca²⁺-ATPase に対する尿素の影響 アカザラガイ閉殻筋のアクトミオシン Ca²⁺-ATPase に対する尿素の影響について検討し、その結果を Fig. 5 に示した。なお、対照としてコイのアクトミオシンについても、まったく同じように測定し同じ図中に示した。アカザラガイのアクトミオシンでは尿素濃度の増加に伴って活性が上昇し、1.25 M 尿素濃度で約 4.7 倍の活性に達した。その後、尿素濃度の増加に伴って失活し、2.1 M で完全に失活した。一方、コイのアクトミオシン Ca²⁺-ATPase は尿素濃度の増加に従って活性が急激に低下し、1.25 M 尿素濃度以上では完全に失活した。この尿素による アカザラガイのアクト

ミオシン Ca^{2+} -ATPase の活性化の現象は、すでに報じられたホタテのアクトミオシンの場合¹⁾と良く似ている。

Ca^{2+} -ATPase の熱安定性 次にアカザラガイのアクトミオシン Ca^{2+} -ATPase の熱安定性について検討した。すなわち、新井らの報告¹⁰⁾によると、アクトミオシン Ca^{2+} -ATPase の温度に対する安定性は、動物の種類によつて異なり固有のものであることが知られている。そこで $25\sim 40^\circ\text{C}$ における Ca^{2+} -ATPase の失活を測定した。一般にウサギや魚肉のアクトミオシン Ca^{2+} -ATPase の加熱による失活は、一次反応的に進行することが知られている。そこで、この測定結果を一次反応プロットしてみると Fig. 6 の通りである。なお、 25°C ではこの Ca^{2+} -ATPase は極めて安定で、3時間加熱によつても失活は認められなかった。図から明らかのように加熱温度が 30 , 35 および 40°C のいずれの場合も、 Ca^{2+} -ATPase の失活は一次反応に従い、直線的に進行することがわかった。次式に従つて変性速度恒数を求めると、

$$K_D = \frac{1}{t} \cdot (\ln C_0 - \ln C_t),$$

C_0 : 加熱前の Ca^{2+} -ATPase 相対活性

C_t : 加熱後の Ca^{2+} -ATPase 相対活性

t : 加熱時間 (秒)

$[K_D]^{30^\circ\text{C}} = 1.6 \times 10^{-5}$, $[K_D]^{35^\circ\text{C}} = 36.9 \times 10^{-5}$, $[K_D]^{40^\circ\text{C}} = 249.5 \times 10^{-5}$ となつた。

考 察

本実験ではアカザラガイ閉殻筋のうち、平滑筋といわれている白色不透明部を除き、横紋筋から生物活性をもつたアクトミオシンを調製した。このアクトミオシンのもつ Ca^{2+} -ATPase 比活性は通常 $0.6\sim 1.0 \mu\text{moles Pi/mg/min}$ であつたが、 $1.5 \mu\text{moles Pi/mg/min}$ という高い比活性も数回得られた。一方、著者がコイ背筋から得たアクトミオシンは $0.22\sim 0.42 \mu\text{moles Pi/mg/min}$ であつた。さらに新井らの報告している種々の魚類筋肉アクトミオシンの値と比較すると、アカザラガイ閉殻筋のアクトミオシン Ca^{2+} -ATPase 比活性は非常に高いものであるといえる。なお、アクトミオシンは生鮮または冷凍の閉殻筋から作つたが、いずれからも同程度の生物活性を示すものが得られた。しかし、ここで使用された冷凍筋は -20°C で1ヵ月貯蔵したものである。冷凍貯蔵が長期間にわたつたものについては検討していない。

アカザラガイのアクトミオシン Ca^{2+} -ATPase 活性の KCl 濃度依存性をみると、 0.31 M KCl 付近で最も高く、 0.06 M KCl の時の比活性の1.9倍であることを先に示したが、この傾向はコイ背筋およびウサギ骨格筋アクトミオシンの場合とは異なつてゐる。すなわち、コイ背筋アクトミオシンは Fig. 1 に示したように、KCl 濃度に従つて反比例的に比活性の低下が起り、ウサギのアクトミオシンも同じ傾向をもつ。一方、BARÁNY らはホタテガイ閉殻筋のアクトミオシン Ca^{2+} -ATPase 活性が 0.2 M KCl で最高値 (0.05 M KCl における活性の2~3倍)を示すことを報告しているので、 Ca^{2+} -ATPase 活性の KCl 濃度依存性はホタテガイとアカザラガイの閉殻筋で傾向的に共通しているが KCl の至適濃度にやや相違が認められ

Fig. 6. Logarithm of Ca^{2+} -ATPase activities of akazara scallop actomyosin as a function of time.

Incubation of actomyosin ($1.0\sim 2.5 \text{ mg/ml}$) was performed at pH 7.5 in 0.6 M KCl - 0.05 M Tris-HCl and at temperature of a) 30°C , b) 35°C and c) 40°C .

Conditions of Ca^{2+} -ATPase activity assay were the same as in Fig. 5.

る。この差異は比較生化学的見地から興味をもたれるところである。

尿素処理においては、コイのアクトミオシン Ca^{2+} -ATPase 活性は急激に低下するのみであつたが、アカザラガイのアクトミオシンは尿素濃度 1.0~1.5 M において、いつたん著しく活性化された。BÁRÁNY らによればホタテガイのアクトミオシンの Ca^{2+} -ATPase 活性もまた尿素濃度 1.0 M で最高に達し、約 2~2.5 倍に活性化されると述べている。おそらく、尿素のアクトミオシン Ca^{2+} -ATPase におよぼす影響は、アカザラガイおよびホタテガイの場合いずれも、ほぼ同様であることが推定出来る。この尿素による ATPase の活性化の機構は明確ではないが、酵素の活性中心近辺の高次構造の変化 (特に Unmasking といわれる) によるなどと一般に解釈されているようである。とにかくコイのアクトミオシンとは高次構造の差異があることが予想される。

アカザラガイのアクトミオシン Ca^{2+} -ATPase の加熱変性恒数は、新井ら¹⁰⁾の報告した魚類筋肉アクトミオシンの値に比較するとブリのそれと同程度の安定性であつた。ただ、加熱変性の測定条件がやや異なつていたので厳密には比較出来ないが、このような条件を加案しても、アカザラガイのアクトミオシンは寒帯産の水産動物としては安定なものに属する。スケトウダラ筋肉に比べるとはるかに安定である。

アカザラガイ閉殻筋のアクトミオシンを総合的にみと、ATP 感度は 105~115 という高い値を示し、ATP に対しては充分に感受性を示すにもかかわらず、超沈殿の進行はむしろコイのアクトミオシンに比べて非常に遅いことは特徴的である。その理由についてはまだ明確ではないが、閉殻筋の収縮はウサギの骨格筋や魚の背筋の良く知られている収縮機構とは明らかに異なつているのであるから¹¹⁾、調製されたアクトミオシンの生理活性や理化学的性質になんらかの差異があるのは当然であると思われる。事実、ホタテガイ閉殻筋には極めて特異な性質、すなわち、筋収縮における Ca^{2+} の制御がミオシン部分に局在して行なわれているという例⁹⁾もあるので、その面に関する研究を今後すすめてゆく予定である。

謝 辞

本研究の遂行にあたり深い御理解と御助言を賜つた本学部石原義雄教授、懇切な御指導を賜つた新井健一助教授に深く感謝申し上げます。また試料を採取して下さつた函館漁業協同組合入舟支所に深謝致します。

文 献

- 1) M. BÁRÁNY and K. BÁRÁNY: *Biochem. Z.*, **345**, 37-56 (1966).
- 2) Y. TONOMURA, K. YAGI, and H. MATSUMIYA: *Arch. Biochem.*, **59**, 76-89 (1955).
- 3) J. KENDRICK-JONES: *Nature*, **249**, 631-634 (1974).
- 4) H. TOMIOKA, K. YAMAGUCHI, K. HASHIMOTO, and F. MATSUURA: *This Bull.* **40**, 1269-1275 (1974).
- 5) H. TOMIOKA, K. YAMAGUCHI, K. HASHIMOTO, and F. MATSUURA: *ibid.*, **41**, 51-58 (1975).
- 6) G. W. DeVILLAFRANCA: *Comp. Biochem. Physiol.*, **26**, 443-454 (1968).
- 7) G. BENZONANA, L. KOHLER, and E. A. STEIN: *Biochim. Biophys. Acta*, **368**, 247-258 (1974).
- 8) 高士令二・新井健一・斎藤恒行: 本誌, **36**, 169-172 (1970).
- 9) 高士令二・新井健一・斎藤恒行: 同誌, **36**, 165-168 (1970).
- 10) 新井健一・川村久美子・林千恵子: 同誌, **39**, 1077-1085 (1973).
- 11) 野々村禎昭: 生体の科学, **15**, 285-293 (1964).