トリプシン消化ミオシン溶液の粘度変化^{*1}

中山照雄・白井光昭・鹿海成生・丹羽栄二・浜田 巖

(1975 年 8 月 6 日受理)

Viscosity Changes in Trypsin-Digested Myosin Solutions

Teruo NAKAYAMA^{*2}, Mitsuaki SHIRAI^{*2}, Naruo KANOME^{*2},
Eiji NIWA^{*2}, and Iwao HAMADA^{*2}

In order to account for the interaction between myosin molecules at 35°C, viscosity changes in trypsin-digested myosin solutions were measured with a coaxial cylinder type viscometer.

To establish experimental conditions, tryptic digestion of myosin was first measured at 25°C. Viscosities of the trypsin-free blanks remained almost constant and those of the digested samples obtained from carp, hen, and rabbit myosins decreased to approximately one-half, two-thirds, and three-fourths of the respective initial value after digestion for 3 min.

The viscosities of hen and rabbit myosin solutions obtained after the 3 min. digestion increased on incubation at 35°C, as was the case with those obtained after the 1 min digestion. Carp myosin, which digests at a rapid rate, showed a viscosity increase after 1 min digestion but none after 3 min digestion. After digestion for 120 min, no viscosity increase was observable in rabbit myosin solution and only an extremely small one in hen myosin solution.

ミオシンにトリプシンを作用させると急速に消化されて沈降定数の異なる二つのコンポーネントを生成すること、アクトミオシンも同じ消化を受けるがこの時消化ミオシンの二つのコンポーネントのうち沈降定数の小さい方を遊離することが MIHÁLYI と SZENT-GYÖRGYI によつてはじめて見出された。¹⁾

動力学的解析によるとアクチンはミオシン、アクトミオシンにくらべてその消化速度が 1/240 で、消化によるアクトミオシン溶液の粘度減少は全くミオシン部分の消化に依存する。²⁾ そしてミオシンの ATP アーゼ活性およびアクチン結合能は沈降定数の大きい方のコンポーネントに局在し、これは初期の消化によつては失活しないが、さらにトリプシン消化をつづけると失活することも判つてきた。³⁾

ウサギミオシンの ATP アーゼ活性部位は Na⁺ 溶液中よりも K⁺ 溶液中で消化されにくい、これにヌクレオチドと二価陽イオンを加えると K⁺ 溶液中でも消化されやすくなり、これらはそれぞれのコンフォメーションの違いとして説明された。⁴⁾ またこの消化はヘビーメロミオシン部の S-1 と S-2 の間で起こりやすく、Mg²⁺ によつて妨害されることも明らかにされている。⁵⁾

一方、魚肉ミオシンのトリプシン消化についてはティラピア背筋肉から得られたものについて検討され、ティラピアのミオシンがウサギのそれよりも消化の過程で複雑な高次構造上の変化を受けることが見出されている。⁶⁾

さきに筆者らはコイとニワトリのミオシン溶液を加温したときの粘度変化を調べ、コイミオシンの方が粘度増加が大きいことを知つた。⁷⁾

今回はトリプシン消化中のミオシン溶液の粘度変化と各段階に消化したミオシン溶液をさらに加温したと

*1 食肉の結着力と筋原繊維蛋白質の関連 第9報 昭和50年度日本農芸化学会大会発表

*2 三重大学水産学部 (Faculty of Fisheries, Mie University, Tsu, Mie, Japan)

きの粘度変化を検討したので報告する。

実験方法

ミオシンの調製 コイ背筋、ニワトリ胸筋およびウサギ骨格筋から前報⁷⁾にしたがってミオシンを抽出した。得られたミオシンの ATP 感度は 7—15 で、超沈澱現象は認められなかった。

たんぱく質濃度の測定 ビューレット法⁸⁾およびマイクロケルダール法によった。

粘度の測定 粘度の測定は回転粘度計（東京計器 BL 型）で前報⁷⁾と同じ内筒、外筒を用い、次の様に行なった。

a) 消化の過程におけるミオシン溶液の粘度変化

17.5 ml ミオシン溶液（濃度 11.4 mg/ml; 0.6 M NaCl, 20 mm トリス-マレイン酸緩衝液 pH 6.8）を粘度計の外筒に入れ、25°C の恒温水槽に浸す。恒温に達した後、ミオシン重量の 1/200 のトリプシン (Sigma Chemical Co. 製 Type III) を 4°C の上記溶媒 2.5 ml に溶解して加えた。したがってミオシンの最終濃度は 10 mg/ml となった。添加と同時に粘度計を 12 rpm（ずり速度 13.7 sec^{-1} ）で回転させ 1 分後の指示を読み、これを消化 0 分の粘度とし、以後所定時間ごとに粘度計を 1 分間回転させその指示を読みとつた。

b) 消化されたミオシン溶液の加温による粘度変化

上記にしたがって所定時間ミオシンとトリプシンを反応させた後、トリプシンに対して 1.5 倍量の大豆トリプシンインヒビター (Sigma Chemical Co. 製 Type I-S) を 4°C の同溶媒 2 ml に溶解したものを加えて消化を止めた。したがってミオシンの最終濃度は 9.1 mg/ml となった。反応溶液を氷水に浸して 2°C に急冷し、その 20 ml を外筒にとつて 35°C の恒温水槽に浸し、恒温化された時点を加温 0 時間として a) と同様に粘度変化を測定した。

実験結果

消化の過程におけるミオシン溶液の粘度変化 コイ、ニワトリ、ウサギミオシン溶液のトリプシン消化の過程における粘度変化を Fig. 1 に示した。トリプシン無添加の対照ミオシン溶液の粘度はほとんど一定で、それぞれ 17, 8 および 5.5 c.p. であり、ニワトリにくらべてコイが高いのは前報⁷⁾と同様であつた。ただ前報では 25°C でコイの場合粘度がわずかに増加していたのにくらべ、今回はほとんど一定であつたが、

その理由として、単位時間あたりの測定回数をふやしたため形成されたミオシンのネットワークがこわされたことによると考えられる。

つぎにこれにトリプシンを加えると、いずれの粘度も減少し、コイでは最初の 3 分間で約半分になり、45 分で約 1/4 となり、後一定であつた。ニワトリでは最初の 3 分間で約 2/3 となり 20 分から 40 分までほぼ一定（約 1/2）となつた後、再び増加するのが認められた。ウサギでは 3 分の間に約 3/4 まで減少して、20 分までわずかに下り、後一定（約 1/2）となつた。以上の結果から消化の初期においてコイの粘度減少が大きいこと、消化の過程における最低粘度はコイ、ニワトリ、ウサギではほとんど同じであることが判つた。

消化されたミオシン溶液の加温による粘度変化

Fig. 2 に各時間トリプシン消化したミオシン溶液を

Fig. 1. Tryptic Digestion of Myosin.
Myosin concentration, 10 mg/ml; 0.6 M NaCl, 20 mm tris-maleate buffer (pH6.8); Trypsin concentration, 0.05 mg/ml in the digested sample; Digestion temperature, 25°C.
-----, ----- trypsin-free blank; ———, ——— digested sample.

35°C に加温した場合の粘度変化を示した。コイのミオシンを1分間消化したものでは加温によつて粘度が増加したが、3分間消化するともはや増加は認められなかつた。これに対してウサギやニワトリでは3分間消化したものでも粘度増加が認められたが、120分間消化するとウサギではほとんど粘度が一定となり、ニワトリではわずかな粘度の増加にとどまつた。

考 察

加温によりミオシン溶液の粘度が増加することはミオシン分子の重合によると考えられている。⁹⁾

ミオシンをトリプシンで消化すると粘度が小さくなるということはミオシンが切断されて分子が小さくなつたことを意味すると思われる。したがつて消化により分子がある段階まで小さくなると、35°C で加温してももはや重合は起こらず粘度が増加しなくなるとと思われる。コイではウサギやニワトリにくらべてミオシンの消化速度が大きいので、この段階に達する時間も早いのであろう。反対に消化の遅いウサギやニワトリでは3分間消化したものでもこの段階に達しないため加温によつて粘度が増加すると思われる。しかし、120分消化するとほとんど粘度の増加がみられなくなつた。ただし、ニワトリでは120分消化したものを35°C で加温するとわずかではあるが粘度が増加した。このことはニワトリで20~40分消化したものより120分消化したものの方が溶液の粘度が高い (Fig. 1) ことと関連があると思われるが、詳細は不明である。

また、コイのトリプシン無添加の溶液と添加して1分間消化させたものでは加温2時間ごろまで粘度が増加した後、減少した (Fig. 2)。このことは前報⁷⁾でより薄いミオシン溶液でも観察されたが、この理由は加温2時間ごろまでは分子の重合が進行するが、それ以後は異なつた変性が起こることによつて粘度が減少したと思われる。

要 約

1. トリプシン無添加ミオシン溶液の25°Cにおける粘度はほとんど一定で、コイ、ニワトリ、ウサギでそれぞれ17, 8, 5.5 c.p.であつた。これに1/200量のトリプシンを加えて消化すると粘度は3分でそれぞれ約1/2, 約2/3, および約3/4に減少し、コイの減少が特に大きかつた。しかし消化の過程における最低粘度はコイ、ニワトリ、ウサギでほとんど同じであつた。

2. 消化速度の大きいコイミオシン溶液はトリプシン消化1分では35°C加温による粘度増加が見られたが、消化3分ではもはや粘度増加が見られなかつた。ウサギおよびニワトリでは消化3分でもミオシン溶液の加温による粘度増加が見られた。消化120分ではウサギミオシン溶液でも加温による粘度増加が見られなくなり、ニワトリミオシン溶液でも粘度増加が極めて小さくなつた。

文 献

- 1) E. MIHÁLYI and A.G. SZENT-GYÖRGYI: *J. Biol. Chem.*, **201**, 189-196 (1953).
- 2) E. MIHÁLYI: *ibid.*, **201**, 197-209 (1953).
- 3) E. MIHÁLYI and A.G. SZENT-GYÖRGYI: *ibid.*, **201**, 211-219 (1953).
- 4) T. YAMASHITA and T. HASUMI MIMURA: *J. Biochem.*, **76**, 1049-1059 (1974).

Fig. 2. Effect of Tryptic Digestion on Viscosity Change in Myosin Solution.

Myosin concentration, 9.1 mg/ml; 0.6M NaCl, 20 mM tris-maleate buffer (pH6.8); Trypsin and the inhibitor concentrations, 0.045 and 0.068 mg/ml respectively in the digested sample; Incubation temperature, 35°C.

Digestion time is shown in the figure, and trypsin-free blank is shown as blank.

- 5) T. YAMASHITA and T. HASUMI MIMURA: *ibid.*, **76**, 1337-1342 (1974).
- 6) 高士令二・室塚剛志・新井健一: 本誌, **40**, 1033-1041 (1974).
- 7) 中山照雄・奥田秀夫・丹羽栄二・浜田巖: 同誌, **40**, 937-940 (1974).
- 8) R.M. ROBSON, D.E. GOLL, and M.J. TEMPLE: *Anal. Biochem.*, **24**, 339-341 (1968).
- 9) T. NAKAYAMA and Y. SATO: *Agr. Biol. Chem.*, **35**, 208-218 (1971).