ウバガイ、ホタテガイおよびアカザラガイ閉殻筋 アクトミオシンの性質の比較について

西田 清義・福山 龍次・石原 義雄

(1976 年 8 月 5 日受理)

Comparative Studies on Biochemical Properties of Actomyosins from Adductor Muscles of Sea-shells

Kiyoyoshi NISHITA*, Ryuji FUKUYAMA*, and Yoshio ISHIHARA*

Attempts have been made to prepare actomyosins from the adductor muscle of some sea-shells (akazara scallop, giant ezo scallop, and surf-clam).

1) Actomyosins prepared in this experiment showed all the typical properties of actomyosin as already known on rabbit skeletal muscle; that is, high ATP hydrolyzing activity, superprecipitation (the rate of superprecipitation is slower than that of the rabbit actomyosin), anomalous viscosity and reversible viscosity drop with Mg-ATP.

2) SDS-polyacrylamide gel electrophoretic patterns revealed a little contamination with paramyosin in the actomyosins from the akazara scallop and the giant ezo scallop, and a considerable amount in the surf-clam actomyosin.

3) A maximum activity of Ca^{2+} -ATPase was found at KCl concentrations of 0.21 M, 0.26 M and 0.31 M for actomyosins from the giant ezo scallop, the surf-clam and the akazara scallop, respectively. A remarkable increase in Ca^{2+} -ATPase of these actomyosins occurred upon the addition of urea at a final concentration of 1.25 M.

4) The first order rate constants for the denaturation of actomyosin Ca^{2+} -ATPase were compared at 30°, 35° and 40°C. The relative stability of the actomyosins was found to decrease in the order: akazara scallop, surf-clam and giant ezo scallop.

近年、ホタテガイなど貝類の栽培増殖が盛んに行なわれるようになってきているため、それに応じた貝肉の新しい利用加工法および貯蔵法の開発が望まれている。一方、貝類の筋肉たんぱく質に関する研究は極めて数少ない現状にある。このような観点から見ると、貝類の筋肉構造たんぱく質の特異性を明らかにする生化学的および食品化学的研究を進めることは現在極めて重要な研究課題である。著者は先にアカザラガイ閉殻筋のアクトミオシンを調製し、その性質について報告した¹⁾。それによれば、アカザラガイのアクトミオシンはウサギ骨格筋アクトミオシンと同程度の高い ATPase 比活性ならびに ATP 感度を示すが、超沈殿の形成はかなり遅く不完全であり、また Ca^{2+} -ATPase 活性の KCl 濃度依存性などの性質は、従来知られた哺乳動物平滑筋アクトミオシンの ATPase に類似する特異な性質を示すことを知った。

本研究ではさらにホタテガイ閉殻筋と、函館近海で養殖され広く食用に供されているウバガイの閉殻筋からアクトミオシンを調製し、それらの性質についてアカザラガイ閉殻筋アクトミオシンと比較検討した。

ウバガイ (Surf-clam, *Supisula sachalinensis*)

ホタテガイ (Giant ezo scallop, *Patinopecten yessoensis*)

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

アカザラガイ (*Akazara scallop*, *Chlamys nipponensis akazara*)

実験方法

生存している貝を実験室に搬入し、麻酔などの前処理なしに閉殻筋を分取し直ちに使用するか、または、まれに -20°C で凍結貯蔵して少なくとも 1 ヶ月以内に使用するようにした。なお生鮮試料と凍結試料から得たアクトミオシンの諸性質に違いは認められなかつた。ホタテガイ閉殻筋（横紋部位）からのアクトミオシンの調製は前報のアカザラガイ閉殻筋（横紋部位）の場合と同様に BÁRÁNY らの原報²⁾ に準じて行なつた。その概略を Fig. 1 に示す。特にウバガイ閉殻筋（無紋部位）からアクトミオシンを調製するには、 0.04 M KCl , $\text{pH } 7.0$ でホモジナイズ、洗浄した筋肉残渣から先ず 0.6 M KCl - 0.05 M Tris-HCl , $\text{pH } 7.5$ で一夜抽出されるたんぱく質を棄て、次にその残渣を 2 mM ATP を含む 0.6 M KCl - 0.05 M Tris-HCl , $\text{pH } 7.5$ で 0°C にて一夜抽出するとよいことを見出した。パラミオシンはホタテガイ閉殻筋（平滑筋部）から RIDDIFORD らの方法³⁾ によつて調製した。アクトミオシンの生物活性 (ATPase 活性, 超沈殿, ATP 感度) の測定は前報¹⁾ と同様に行なつた。

実験結果

粘性 Fig. 1 に示した方法で調製した閉殻筋アクトミオシンの粘性は、Fig. 2 に示したように 1 mM Mg-ATP を添加することにより急激に低下し、その後回復した。これは可逆的であつた。この現象はこれらのアクトミオシンが ATP との相互作用によりミオシンとアクチン間で解離、重合をくり返すことを示している。また、これらの結果から ATP 感度を求めるとアカザラガイでは $105\sim 115$ に対し、ホタテガイは $70\sim 100$, ウバガイは $53\sim 59$ であつた。これらのアクトミオシンのたんぱく濃度と相対粘度の関係をみる

A --- procedure for akazara and giant ezo scallop actomyosins

B == procedure for surf-clam actomyosin

All solutions used for preparation of actomyosin from surf-clam contain 2 mM cysteine.

Fig. 1. Preparative methods of actomyosins from the adductor muscles.

Fig. 2. Reversible dissociation of actomyosins from the adductor muscles.

At the arrow, 1 mM ATP-MgCl₂ (final concentration) was added to actomyosin in 0.6 M KCl-0.05 M Tris-HCl (pH 7.5). Viscosity was measured at 25°C (in case of akazara scallop) or 20°C (in cases of surf-clam and giant ezo scallop). a) surf-clam, b) giant ezo scallop, c) akazara scallop.

Fig. 3. Relationship between reduced viscosity and actomyosin concentration.

Surf-clam (—▲—), giant ezo scallop (—○—), and akazara scallop (—●—) 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 58 seconds, in a total volume 2 ml.

と、いずれも明らかに異常粘性を示した (Fig. 3)。おおよその固有粘度を比較するとアカザラガイの 2.1 (dl/g) に対しホタテガイでは 2.7 (dl/g)、ウバガイでは 3.8 (dl/g) となるが、この値は特にウバガイにおいて標品ごとにかなりの変動が認められることから、混在するパラミオシンの量によって影響を受けるものと考えられる。

超沈殿 これらの閉殻筋アクトミオシンについて、たんぱく質濃度を約 1 mg/ml になるように 0.1 M KCl 中に懸濁させたのち 1 mM ATP を添加して、超沈殿現象を試験管内で観察した結果を Fig. 4 に示した。これらの図から明らかのようにすべての標品は超沈殿することを認めた。なお、アカザラガイ、ホタテガイのアクトミオシンは ATP 感度が 100 前後の高い標品であるが、超沈殿の進行は遅く、完了までに 10 分前後を要し、“栓状沈殿”を呈しなかつた。この際、1 mM MgCl₂ を添加すると超沈殿が速くなる傾向が見られた。ウバガイの場合は、ATP 感度が他のも

Fig. 4. Superprecipitation of actomyosins from the adductor muscles.

a) akazara scallop, b) giant ezo scallop, c) surf-clam.

Superprecipitation was observed at approximately 10 min after the addition of ATP to a final concentration 1 mM. Actomyosins (1-3 mg/ml) in 0.1 M KCl-8 mM Tris-HCl, pH 7.5 were used.

のに比較して低く、その上、SDS*-ポリアクリルアミド電気泳動の結果などから判断してパラミオシンの混入が比較的多いにもかかわらず典型的な栓状沈殿を呈し、13分程で完了した。なお対照として行なつたコイ背筋のアクトミオシンは3分以内の速く、そして典型的な栓状沈殿を呈する。ただし、試験管内における超沈殿現象はあまり定量的ではなく、種々の要因によって影響を受けるので、ここで観察した結果をそのままアクトミオシンの収縮能の強さと関係づけて論ずるわけにはいかないが、貝類閉殻筋から調製したすべての標品はミオシンとアクチンから成る特性を示すことが認められる。

SDS-ポリアクリルアミド電気泳動 各アクトミオシン標品の SDS-ポリアクリルアミド電気泳動図を Fig. 5 に示した。この結果によれば、各標品は極めて類似の泳動パターンを与え、ミオシンのH鎖、L鎖

Fig. 5. SDS-polyacrylamide gel electrophoretic patterns of actomyosins from the adductor muscles.

8% polyacrylamide gels were used.

a) akazara scallop, b) giant ezo scallop, c) surf-clam, d) paramyosin of giant ezo scallop.

Hc, heavy chain of myosin; Lc, light chain of myosin; Pm, paramyosin; A, actin.

およびアクチンに相当する主要なバンドが認められる。また、パラミオシンの混入はウバガイでやや多く、デンストメトリーによつて概算するとミオシンのH鎖の約60%程度混在することを知つたが、アカザラガイ、ホタテガイではかなり少なく約1~14%であつた。

ATPase 活性 まず各アクトミオシン標品 ATPase の活性に対する KCl 濃度および Ca^{2+} , Mg^{2+} の効果を検討し、Table 1 に結果を示した。その結果いずれの貝類閉殻筋のアクトミオシン ATPase も KCl が低い (0.012 M および 0.06 M) ときよりも高い (0.6 M) ときの方が強い活性を示した。 Ca^{2+} はいずれの KCl 濃度下でも ATPase を著しく活性化するが、 Mg^{2+} は KCl 濃度が低い (0.012 M) 時は活性化し、KCl 濃度が高くなると活性化の程度は弱くなり、0.6 M KCl 中ではむしろ阻害的に作用した。この事実は本実験で調製した三種の貝類閉殻筋アクトミオシン

Table 1. Effect of KCl, CaCl_2 , and MgCl_2 on actomyosin ATPase activities of surf-clam, akazara scallop, and giant ezo scallop.

ATPase activity was measured under the following conditions; 25 mM Tris-maleate (pH 7.0), 1 mM ATP, 0.5 mM EGTA*, 0.1–0.2 mg/ml of protein, and various concentration of KCl with or without 5 mM CaCl_2 or 1 mM MgCl_2 . In the case of CaCl_2 added, EGTA was removed from the mixture.

Surf-clam, *Supisula sachalinensis*; Akazara scallop, *Chlamys nipponensis akazara*; Giant ezo scallop, *Patinopecten yessoensis*

KCl Concentration	ATPase activity ($\mu\text{moles Pi/min}\cdot\text{mg protein}$)								
	Surf-clam			Akazara scallop			Giant ezo scallop		
	None	CaCl_2	MgCl_2	None	CaCl_2	MgCl_2	None	CaCl_2	MgCl_2
0.012 M	0.01	0.13	0.10	0.03	0.77	0.44	0.01	0.27	0.48
0.060 M	0.05	0.30	0.04	0.05	0.92	0.08	0.06	0.70	0.73
0.600 M	0.10	1.61	0.09	0.41	1.35	0.04	0.16	0.82	0.05

* EGTA (Glycoetherdiamine-NNN'-tetra-acetic acid).

* SDS (Sodium dodecyl sulfate).

Fig. 6. Effect of KCl concentration on actomyosin Ca^{2+} -ATPase activities of the adductor muscles.

Surf-clam ($\blacktriangle$), giant ezo scallop ($\circ$), akazara scallop ($\bullet$), and carp ($\times$).

Conditions of ATPase assay; 25 mM Tris-maleate, pH 7.0, 5 mM CaCl_2 , and 1 mM ATP.

Fig. 7. Effect of urea on actomyosin Ca^{2+} -ATPase activities of the adductor muscles.

Surf-clam ($\blacktriangle$), giant ezo scallop ($\circ$), akazara scallop ($\bullet$), and carp ($\times$).

Conditions of ATPase assay; 25 mM Tris-maleate, pH 7.0, 5 mM CaCl_2 , 60 mM KCl, and 1 mM ATP.

ATPase についてまったく共通の傾向であつた。ただ、ホタテガイのアクトミオシン ATPase は他の貝の場合と異なり 0.06 M KCl においても 0.012 M KCl と同じく Mg^{2+} によつて強く活性化されることが特異的であつた。この活性化がミトコンドリアやその他の生体膜由来の ATPase の混入によるものでないことは、反応液に 5 mM NaN_3 を共存させても結果に大きな変化は認められず、同じ傾向を示したことから確められる⁴⁾。

次に Ca^{2+} -ATPase 活性の KCl 濃度依存性を詳細に検討した結果を Fig. 6 に示す。この結果から明らかなように、いずれのアクトミオシン Ca^{2+} -ATPase 活性も、最大活性を示す濃度に多少の差はあるが、KCl 濃度に特異的な依存性を示した。すなわち、ホタテガイでは 0.21 M、ウバガイでは 0.26 M、アカザラガイでは 0.31 M で最高の比活性を示している。

次に、これらアクトミオシン標品の Ca^{2+} -ATPase 活性は Fig. 7 に示したように、尿素によつてまったく同じような特異な影響を受けることを認めた。すなわち、アクトミオシン溶液に尿素を加えるとき、尿素濃度が 0.5~1.0 M で著しい比活性の増加を示し、1.25 M 付近で最大活性に達したのち、さらに濃度が増加すると急激な活性の減少が見られる。この尿素による ATPase の見かけ上の活性化現象は対照のコイ肉アクトミオシンでは見られない。

Ca^{2+} -ATPase の熱安定性 三種の貝類アクトミオシン標品の熱安定性を Ca^{2+} -ATPase 活性を指標として比較した。30°, 35° および 40°C 加熱による失活は、ウサギや魚類のアクトミオシン⁸⁾と同様に、一次反応的に進行することを認め¹⁾、それらの結果から Ca^{2+} -ATPase 活性の変性速度恒数を求めて Table 2

Table 2. The rate constants of inactivation of actomyosin Ca^{2+} -ATPase activities of the adductor muscles.

Incubation of actomyosin (5–6 mg/ml) was performed at 30°, 35°, and 40°C in 0.6 M KCl–0.025 M Tris-HCl (pH 7.5).

The first order inactivation rate of ATPase activity was calculated from the following formula, $K_D = (\ln C_0 - \ln C_t) \cdot 1/t$, C_0 : activity before incubation, C_t : activity after adequate incubation time (sec).

	$K_D \times 10^5 \text{ (sec}^{-1}\text{)}$			Number of determinations
	30°C	35°C	40°C	
Akazara scallop	1.6– 6.6	24.3–36.9	221–250	3
Surf-clam	9.7–18.6	75.2	—	4
Giant ezo scallop	26.9	276	—	3
Rabbit	—	—	2.3	3

に示した。また、対照のためにウサギのアクトミオシンについても示した。Table 2 の結果から閉殻筋アクトミオシン Ca^{2+} -ATPase の熱安定性は、良い方からアカザラガイ>ウバガイ>ホタテガイの順となっており、特にホタテガイのアクトミオシン Ca^{2+} -ATPase 活性はアカザラガイのそれに比較して 30°C で約 17 倍、35°C で約 8 倍も不安定であることがわかる。しかしながら、アカザラガイのアクトミオシン Ca^{2+} -ATPase でもウサギのそれに比較すると、40°C において 100 倍以上も不安定であるという結果が得られた。

考 察

本研究の結果から、ウバガイとホタテガイ閉殻筋からも明らかにアクトミオシンとしての性質を示すたんばく質を調製出来たといえる。これらのアクトミオシンは異常粘性を示し、 Mg^{2+} -ATP との相互作用によつて解離・重合を繰返すこと、また、超沈殿する性質があり、さらに Ca^{2+} で著しく活性化される ATPase 活性を有することなどから、ウサギ骨格筋のアクトミオシンで知られている基本的な生物学的活性をすべて保持したものであることを認めた。さらに、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動の結果から、ウサギ、コイなどのアクトミオシンの場合と同じくミオシンとアクチンに由来するバンドが主成分となつていることが示された。また、明らかにパラミオシンの混在が認知出来るが、その完全な除去法についてはなお検討中である。従来、効果的な除去方法は余り知られていない。

ウバガイ閉殻筋からアクトミオシンを調製するにあつて、アカザラガイおよびホタテガイ閉殻筋に用いた方法をそのまま適用すると、抽出されるたんばく質は Ca^{2+} -ATPase 比活性が低く (0.06~0.13 $\mu\text{moles Pi/mg}\cdot\text{min}$)、ATP 感度も低かつた。そこで哺乳動物平滑筋のアクトミオシンを調製する場合³⁾ にならつて抽出液に 2 mM ATP を添加すると、 Ca^{2+} -ATPase 比活性は高くなり (0.18~0.30 $\mu\text{moles Pi/mg}\cdot\text{min}$)、ATP 感度も 52.9~59.2 というアクトミオシンとしての特性を示すたんばく質標品を調製することが出来た。なお、ウバガイから、より優れた生物活性を示すアクトミオシンを調製する条件については、現在なお検討中である。

ホタテガイ閉殻筋のアクトミオシン ATPase 活性が Mg^{2+} により特別に強く活性化される事は、すでに BÁRÁNY らも報じており²⁾、アクトミオシン中に混入するミクロゾームに由来する Mg^{2+} -ATPase ではないことを確めている。本研究においても、ミトコンドリア膜 ATPase の阻害剤である NaN_3 ⁴⁾ 存在下の ATPase を測定したが、結果にはほとんど影響がなかつた。さらにこの点に関しては、ホタテガイ閉殻筋のミオシンとウサギのアクチンから合成したアクトミオシンの ATPase 活性もまた、 Mg^{2+} によつて強く活性化されることから考えて、この性質はホタテガイのミオシンに由来する性質であるように思われる。

一般に哺乳動物の平滑筋から得たアクトミオシン (およびミオシン) は ATPase 比活性が低く、アクチ

ンとの結合能は普通であるが超沈殿は非常に遅く起ることが知られている。また Ca^{2+} -ATPase の特性としては特異な KCl 濃度依存性を示し、 $0.2 \sim 0.3 \text{ M}$ 付近に最大活性をもつことも認められている。本研究で調製した三種の貝類閉殻筋アクトミオシンは上述した平滑筋の諸性質に極めて良く類似している。ただ、ATPase 比活性は著しく高く、魚類の背筋（横紋筋）のアクトミオシン（およびミオシン）の比活性よりもむしろ高いことは、貝類閉殻筋の収縮能力と関係があるかも知れない。

本実験に使用したウバガイ、ホタテガイならびにアカザラガイの閉殻筋から PERRY らの方法⁶⁾によつて筋原繊維を調製し、それを位相差顕微鏡で観察した (Fig. 8)。その結果によるとホタテガイおよびアカザラガイの閉殻筋横紋部では明らかに横紋構造を観察出来たが、ウバガイ閉殻筋では同構造を認めることが出来ず、形態的に見れば斧足類閉殻筋は平滑筋であるという従来の説⁷⁾と一致している。平滑筋と見なされるウバガイ閉殻筋と、ホタテガイおよびアカザラガイ閉殻筋横紋部のアクトミオシンの諸性質がいずれも哺乳動物平滑筋のアクトミオシンに極めて良く類似している事実は、貝類閉殻筋の、特にそのミオシン分子の進化および収縮能力への適応の結果であるようにも想像できるので非常に興味深い問題と考えている。なお、貝類閉殻筋アクトミオシンの性質が哺乳動物平滑筋アクトミオシンと明らかに異なっている点は、その熱に対する著しい不安定性である。変性速度恒数からみるとアカザラガイは魚類のうちコイに、ウバガイはブリ、ニジマスに、またホタテガイはカレイにほぼ似た安定性⁸⁾を示している。

Fig. 8. Phase-contrast micrographs of the myofibrils of the adductor muscles.

a) akazara scallop, b) giant ezo scallop, c) and d) surf-clam.

謝 辞

本研究の遂行にあたり御指導並びに御校閲賜わつた北大水産学部新井健一助教授に深謝致します。また、材料採集に便宜を図つて頂いた函館漁業協同組合入舟支所ならびに上磯漁業協同組合に感謝致します。

文 献

- 1) 西田清義: 本誌, **41**, 1003-1008 (1975).
- 2) M. BÁRÁNY and K. BÁRÁNY: *Biochem. Z.*, **345**, 37-56 (1966).
- 3) L. M. RIDDIFORD and H. A. SCHERAGA: *Biochemistry*, **1**, 95-107 (1962).
- 4) G. P. BRIERLEY, E. MURER and E. BACHMAN: *Arch. Biochem. Biophys.*, **105**, 89-102 (1964).
- 5) 山口正弘: 生化学, **43**, 185-196 (1971).
- 6) S. V. PERRY and T. C. GREY: *Biochem. J.*, **64**, 184-192 (1956).
- 7) K. BAILEY: in "The Proteins" (ed. by H. NEURATH and K. BAILEY), Vol. 2, Part B, Academic Press, New York, 1954, pp. 951-1055.
- 8) 新井健一・川村久美子・林千恵子: 本誌, **39**, 1077-1085 (1973).