魚類筋肉トロポミオシンのサブユニット組成について

関 伸 夫・岩 淵 三 郎

(1978 年 5 月 30 日受理)

On the Subunit Composition of Fish Tropomyosins

Nobuo SEKI*¹ and Saburo IWABUCHI*¹

Tropomyosins were prepared from the ordinary muscle of 25 different species of fish, and were analyzed by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis to obtain the subunit composition.

Tropomyosins from 22 species of fish showed a single band on the SDS-polyacrylamide gels, whereas tropomyosins from 3 species classified among the *Scombrina* fishes showed double bands on the gels. These results suggest that the former tropomyosins were composed of two α -chain subunits ($\alpha\alpha$ type), while the latter tropomyosins contained both α - and β -chain subunits ($\alpha\beta$ type). Dye elution analysis of coomassie brilliant blue-stained gels indicated that approximate molar ratio of α to β chain subunits was 1:1 for the $\alpha\beta$ type fish tropomyosins, whereas the same ratio was 3:1 for the $\alpha\beta$ type rabbit tropomyosin.

All the tropomyosins tested were found to confer the Ca^{2+} -sensitivity on the Mg^{2+} -ATPase activity of desensitized actomyosin in the presence of troponin. Both $\alpha\alpha$ and $\alpha\beta$ type tropomyosins formed a complex (i.e. regulatory protein) with troponin, and were effective as the $\alpha\beta$ type of rabbit tropomyosin in regulating the actin and myosin interaction.

トロポミオシン (TM)*² は筋原繊維蛋白質の 1 つでアクチン、トロポニンと共に thin filament を構成し、筋収縮の調節に与つている分子量 68,000 の蛋白質である。TM は 2 個のサブユニットから成つているが、ウサギ骨格筋の TM に関する最近の研究¹⁻³⁾ではアミノ酸組成と配列がやや異なる α と β の 2 個のサブユニットから成ることが明らかにされてきた。

TM のサブユニットの不均一性は SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により検出できるので、著者ら⁴⁾は魚類筋肉 TM の研究の一端として、コイ筋肉 TM とウサギ骨格筋 TM の比較をおこなつて先に報告した。コイの TM はウサギ TM とは異なり SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で 1 本のバンドを示し、これはウサギの α サブユニットに相当していた。そこでコイ以外の多種類の魚類筋肉 TM についてそのサブユニット組成と生理活性面から検討をおこなつた。多くの魚ではコイ TM と同様の結果が得られたが、一部の魚の TM は電気泳動で 2 本のバンドを示し、 α と β *³ のサブユニットから成ることが明らかとなつたので報告する。

実験方法

試料 以下に述べる 25 種類の魚を用いた。ホンザメ (dogfish, *Mustelus manazo*), ニシン (herring, *Clupea pallasii*), マイワシ (sardine, *Sardinops melanosticta*), ニジマス (rainbow trout, *Salmo gairdnerii irideus*), ヒメマス (kokanee salmon, *Oncorhynchus nerka*), チカ (smelt, *Hypomesus japonicus*), コイ (carp, *Cyprinus carpio*), ウナギ (eel, *Anguilla japonica*), サンマ (saury, *Cololabis saira*), マサバ (mackerel, *Scomber japonicus*), キハダマダゴ (yellowfin tuna, *Thunnus albacares*), メバチマダゴ (bigeye tuna, *Thunnus obesus*), カツオ (skipjack, *Euthynnus pelamis*), シロカジキ (white marline, *Makaira marlina*), ブリ (yellowtail, *Seriola quinqueradiata*), ティラピア (*Tilapia nilotica*), スズキ (see bass, *Lateolabrax japonicus*), タイ (parrotfish, *Chrysophrys major*), ハタハタ (sand fish, *Arctoscopus japonicus*), アイナメ (greenling, *Hexagrammos otakii*), ホッケ (atka mackerel, *Ple-*

*¹ 北海道大学水産学部生物化学教室 (Laboratory of Biochemistry, Faculty of Fisheries, Hokkaido University, Hakodate).

*² 本文中では次の略号を用いた。TM, トロポミオシン; SDS, ドデシル硫酸ナトリウム; EGTA, グリコールエーテルジエタミン四酢酸。

*³ 本文中では魚類筋肉 TM のサブユニットは分子量 34,000 を示すサブユニットを α , 36,000 を示すものを β サブユニットとした。

urogrammus azonus), キチジ (*channel rock fish*, *Sebastes macrochir*), マガレイ (*flat fish*, *Limanda herzensteini*), オヒョウ (*halibut*, *Hippoglossus stenolepis*), スケトウダラ (*Alaska pollack*, *Theragra chalcogramma*). いずれの魚も普通筋を用い、血合筋の混入がないように注意した。

TM の調製 TM は前報⁷⁾に準じて調製した。すなわち細碎した筋肉を 50 mM KCl-2 mM NaHCO₃ で数回洗浄したのちアセトン粉末とした。あるいは BAILEY 法⁹⁾によりエタノール・エーテル粉末とした。これから 1 M KCl-20 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5)-10 mM 2-メルカプトエタノールで一夜 4°C で抽出し、遠心分離して上清液を得た。上清液を N-HCl で pH 4.5 とし、生じた沈殿を遠心分離で集めた。沈殿を水に懸濁し、N-NaOH で pH 7.6 に修正したのち不溶性の沈殿を除去した。上清の蛋白質濃度をおよそ 2 mg/ml とし硫酸で分画した。50~60% 硫酸飽和分を集め、1 mM NaHCO₃ に透析した。透析後、蛋白質濃度をおよそ 2 mg/ml にし、1 M KCl となるように KCl を添加した。再び HCl を加え、pH 4.5 とし沈殿を集めた。沈殿を水に懸濁し中和後、硫酸分画 (53~60%) をおこなった。さらに等電点沈殿と硫酸分画により精製し、1 mM NaHCO₃ に透析後 -20°C で凍結した。

TM の結晶化⁹⁾はメバチマダゴの精製 TM の 2% 溶液を 0.2 M KCl-0.01 M 酢酸緩衝液 (pH 5.6) に透析しておこなった。

TM の生理活性の測定⁴⁾ TM の生理活性はトロポニンとの共存下でアクトミオシンに Ca²⁺ 感受性を賦与することに基づいて測定した。すなわちアクトミオシンの Mg²⁺-ATPase 活性から次式により Ca²⁺ 感受性を求めた。Ca²⁺ 感受性 = (1-EGTA 存在下の Mg²⁺-ATPase 活性/Ca²⁺ 存在下の Mg²⁺-ATPase 活性) × 100。Mg²⁺-ATPase 活性の測定は 25°C でおこない、その反応組成は最終濃度 30 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 20 mM Tris-maleate 緩衝液 (pH 7.5), 2 mM ATP, 0.1 mM CaCl₂ (または 0.5 mM EGTA) および脱感作アクトミオシン、トロポニン、トロポミオシンである。反応組成中の各蛋白質量は図表の説明中に記した。ATPase 活性は脱感作アクトミオシン 1 mg 当り 1 分間に ATP から生成する無機リン酸の μmol で表わした。

TM とトロポニンの結合⁷⁾ コイのトロポニンとメバチマダゴ TM を 0.1 M KCl-20 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) 中で混合し、同緩衝液で緩衝化した Sephadex G-200 カラムでゲル透過をおこなった。

電気泳動 TM を 1% SDS, 1% 2-メルカプトエタノール, 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.2) 中で室温で一夜イ

ンキュベートし、電気泳動用試料とした。尿素存在下で電気泳動をおこなう場合にはさらに 5 M になるように尿素を添加した。SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動^{1,2)}は 0.1% SDS-10% アクリルアミドゲルおよび 0.1% SDS-5 M 尿素-10% アクリルアミドゲルのカラム ($\phi 0.5 \times 10 \text{ cm}$) を使用し、ゲル当り 8 mA で、マーカーのブロムフェノールブルーがカラムを通過してからさらに 2 時間泳動を続けた。試料の添加量はゲル当り 1.5~3 μg を用いた。TM およびトロポニンの純度検定のためには 30~40 μg でおこなった。ゲルの染色は 0.12% コマシーブリリアントブルー R, 9.2% 酢酸, 50% メタノール混液を用い、室温で一夜おこなった。

TM サブユニットの定量 染色したゲルを 50% メタノール-7% 酢酸で 6~7 時間脱色後、さらに 7% 酢酸でゲルのバックグラウンドの色素が完全に抜けるまで暗所で脱色した。脱色後ゲル上の蛋白質バンドを安全カミソリの刃を用いて切り出し、これを Potter 型ホモジナイザーに入れ、ジメチルスルホオキシド中でホモジナイズ抽出し、3,000 rpm で 5 分間遠心分離して上清液を得た。この操作を繰返し、最後に全容積を 5 ml とし、600 nm で比色した。コイ TM を同様に処理して標準直線を作成し、これを用いて定量した。

トロポニンおよび脱感作アクトミオシンの調製 トロポニンおよび脱感作アクトミオシンは、コイおよびウサギ骨格筋から前報^{7,8)}に従って調製した。コイのトロポニン標品はトロポニンの 3 成分の他に分子量 43,000 成分を含んでいた。

実験結果

前報⁷⁾で述べたように、TM は SDS で 2 個のサブユニットに解離する。SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動によるとウサギ骨格筋の TM は分子量 34,000 の α サブユニットと 36,000 の β サブユニットの 2 本のバンドが見出され、サブユニットの不均一性が知られている^{2,3)}。一方コイ筋肉 TM ではウサギの α サブユニットに相当する分子量 34,000 の 1 本のバンドが検出され、 β サブユニットに相当するものはない。そこで魚類筋肉の TM はコイと同様に α サブユニットの組み合わせからなる $\alpha\alpha$ 型なのかどうかについて多種類の魚類筋肉 TM を調製して比較した。

Fig. 1* は 25 種類の魚から得た TM を 1% SDS-1% 2-メルカプトエタノールで処理してサブユニットに解離し 0.1% SDS-10% アクリルアミドゲルで電気泳動をおこない比較したものである。図から明かなように、軟骨魚のホンザメ TM は 1 本のバンドを示した。多くの硬骨魚の TM もコイと同様に 1 本のバンドを示し、 $\alpha\alpha$

* 魚類の分類表は松原⁹⁾によった。

Class	Order	Species	+	-
Chondrichthyes		dogfish		
Osteichthyes	Clupeida	herring		
		sardine		
		rainbow trout		
		kokanee salmon		
		smelt		
	Cyprinida	carp		
	Anguillida	eel		
	Belonida	saury		
	Percida	mackerel		
		yellowfin tuna		
		bigeye tuna		
		skipjack		
		white marline		
		yellowtail		
		tilapia		
		sea bass		
		porgy		
		sand fish		
	Cottida	greenling		
		atka mackerel		
		channel rock fish		
	Pleuronectida	flat fish		
		halibut		
	Gadida	Alaska pollack		
		rabbit		

Fig. 1. SDS-polyacrylamide gel electrophoretic comparison of tropomyosins from ordinary muscle of various fishes. Electrophoresis was carried out in 10% acrylamide- 0.1% SDS gels at 8 mA/tube. Dogfish, *Mustelus manazo*; herring, *Clupea pallasi*; sardine, *Sardinops melanosticta*; rainbow trout, *Salmo gairdnerii irideus*; kokanee salmon, *Oncorhynchus nerka*; smelt, *Hypomesus japonicus*; carp, *Cyprinus carpio*; eel, *Anguilla japonica*; saury, *Cololabis saira*; mackerel, *Scomber japonicus*; yellowfin tuna, *Thunnus albacares*; bigeye tuna, *Thunnus obesus*; skipjack, *Euthynnus pelamis*; white marline, *Makaira marlina*; yellowtail, *Seriola quinqueradiata*; tilapia, *Tilapia nilotica*; sea bass, *Lateolabrax japonicus*; porgy, *Chrysorhynchus major*; sand fish, *Arctoscopus japonicus*; greenling, *Hexagrammos otakii*; atka mackerel, *Pleurogrammus azonus*; channel rock fish, *Sebastrolabus macrochir*; flat fish, *Limanda herzensteini*; halibut, *Hippoglossus stenolepis*; Alaska pollack, *Theragra chalcogramma*.

Fig. 2. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of fish tropomyosins in the presence of urea.

Electrophoresis was carried out in 10% acrylamide-0.1% SDS gels containing 5 M urea at 8 mA/tube. C, carp; S, skipjack; B, bigeye tuna; R, rabbit.

型であることがわかった。しかしサバ、キハダマダロ、メバチマダロの TM は明らかに 2 本のバンドに分離された。比較対照のためにウサギ骨格筋の TM を同時に電気泳動に付したが、これは従来の知見¹⁻³⁾と同様に 2 本のバンドが検出された。

次にメバチマダロ、カツオ、コイおよびウサギの TM を尿素の存在下で SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動に付して比較した。Fig. 2 に示すように、コイとカツオでは 1 本、メバチマダロとウサギ TM では 2 本のバンドが検出された。この結果は尿素存在下で電気泳動をおこなっても Fig. 1 の場合とそのパターンが同じであることを示している。

Fig. 1 および 2 に示したように、電気泳動で 2 本のバンドを示す TM ($\alpha\beta$ 型) はいずれもサバ亜目に属する魚の TM である。しかし同亜目に属するカツオ、シロカジキの TM は 1 本のバンドを示した。そこでこれらの魚の TM を相互に混合して電気泳動をおこない詳細に比較した。その結果を Fig. 3 に示したが、カツオとシロカジキの TM は Fig. 1 と同様に 1 本のバンドが検出された。カツオとコイを混合して泳動をおこなっても 1 本のバンドとなるので、この両者は全く同一の分子量を示した。しかしシロカジキ TM は 1 本のバンドを示す $\alpha\alpha$ 型ではあるが、同じように 1 本のバンドを示すコイやカツオ TM の α サブユニットよりは分子量がやや小さいことがわかった。サバ TM の 2 本のバンドのうち α サブユニットがコイやカツオの TM と同じ分子量を示した。シロカジキとサバの TM を混合した場合には 3 本のバンドが検出された。したがってシロカジキ TM のサブユニットはサバの α サブユニットより分子量が小さいことを示している。

Fig. 1 から明らかであるが、サバ、キハダマダロ、

Fig. 3. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of tropomyosins from *Scombrina* fish and carp.

Approximately 3 μ g of tropomyosin from a single species or of their 1:1 mixture from two species was applied to a gel. B, bigeye tuna; Y, yellowfin tuna; M, mackerel; W, white marline; S, skipjack; C, carp.

Fig. 4. Absorption spectrum of tropomyosin-coomassie brilliant blue R complex in dimethyl sulfoxide.

メバチマダロの各 TM サブユニットの α と β の比率はウサギ骨格筋 TM の α と β の比率とは異なっている。そこで α と β の比を求めるために、電気泳動後染色、脱色し、2 本のバンドを別々に切り出し、ジメチルスルホキシドで溶出して比色定量を試みた。TM とコマシーブリリアントブルー複合体のジメチルスルホキ

Fig. 5. Standard curve of protein concentration against colour yield of the protein-dye complex.

Carp tropomyosin was subjected to electrophoresis on SDS-polyacrylamide gels and stained with coomassie brilliant blue R. The stained protein band was cut from the gel with a razor blade. The gel sections were broken in dimethylsulfoxide with homogenizer and centrifuged. Absorption of the supernatant (5 ml in total volume) was measured in a spectrophotometer at 600 nm.

Fig. 6. Effect of bigeye tuna and carp tropomyosins on the Mg^{2+} -ATPase activity of desensitized carp actomyosin.

Assay conditions for Mg^{2+} -ATPase activity were the same as in Table 2, except that 127 $\mu g/ml$ of desensitized carp actomyosin with 20.5 $\mu g/ml$ of carp troponin was used. $\circ$, $\bullet$, bigeye tuna tropomyosin; $\triangle$, $\blacktriangle$, carp tropomyosin. Open symbols, calcium medium; closed symbols, EGTA medium.

Table 1. Ratios of α to β chain subunits of $\alpha\beta$ type tropomyosins*¹

Species	Ratios of β/α , W/W	() ^{*2}
yellowfin tuna	1:1.07	(4)
bigeye tuna	1:0.98	(2)
bigeye tuna* ³	1:0.98	(1)
mackerel	1:0.96	(6)
mackerel* ⁴	1:1.04	(4)
rabbit	1:3.11	(5)

*¹ Quantification of tropomyosin subunits was carried out by dye elution analysis as shown in Fig. 5.

*² Numbers in parenthesis were numbers of determinations.

*³ crystallized tropomyosin.

*⁴ prepared from the muscle which was allowed to stand for 48 h at 4°C before ethanol-ether treatment.

Fig. 7. Formation of a complex from the mixture of bigeye tuna tropomyosin and carp troponin.

Bigeye tuna tropomyosin (10 mg) was mixed with carp troponin (10 mg) in 0.1 M KCl~20 mM phosphate buffer (pH 7.2), and applied to a Sephadex G-200 column (2.6×90 cm) equilibrated with the same buffer. Bigeye tuna tropomyosin and carp troponin were also chromatographed separately at the same condition. Each 4.8 ml fraction was collected. Vo: Void volume. A, a mixture of bigeye tuna tropomyosin and carp troponin; B, bigeye tuna tropomyosin; C, carp troponin.

Inserted figure is SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of the peak A. Arrows indicate the α and β chain subunits of bigeye tuna tropomyosin. Bars indicate the subunits of carp troponin. T, troponin T; I, troponin I; C, troponin C.

Table 2. Inhibition of Mg^{2+} -ATPase activity of desensitized rabbit actomyosin in the presence of troponin by various fish tropomyosins

Protein added $\mu\text{g/ml}$		ATPase activity* $\mu\text{mol Pi/min}\cdot\text{mg}$		Ca ²⁺ -sensitivity
Tropomyosin	Rabbit troponin	Ca ²⁺	EGTA	
carp				
11.2	—	0.446	0.472	0
11.2	11.4	0.553	0.299	46
atka mackerel				
10.5	—	0.413	0.413	0
10.5	11.4	0.513	0.279	46
channel rock fish				
10.4	—	0.469	0.440	4
10.4	11.4	0.560	0.379	32
sand fish				
10.8	—	0.466	0.433	7
10.8	11.4	0.506	0.379	25
flat fish				
9.5	—	0.486	0.440	9
9.5	11.4	0.559	0.273	51
mackerel				
10.8	—	0.453	0.433	4
10.8	11.4	0.560	0.273	51
yellowfin tuna				
10.8	—	0.453	0.459	0
10.8	11.4	0.533	0.299	44
—	—	0.562	0.480	9
—	11.4	0.452	0.446	1
rabbit				
9.6	—	0.506	0.446	8
9.6	11.4	0.546	0.372	32

* Mg^{2+} -ATPase activity was assayed in 2 mM ATP, 2 mM $MgCl_2$, 30 mM KCl, 20 mM Tris-maleate buffer (pH 7.5) and 98 μg of desensitized rabbit actomyosin per ml of the reaction mixture with either 0.1 mM $CaCl_2$ or 0.5 mM EGTA at 25°C.

シンド溶液は Fig. 4 に示すように 600 nm に吸収極大値を示すので、この波長で比色した。

まずコイ TM を用い、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動をおこなった後、TM バンドを溶出し、TM 量と色素・蛋白質溶液の吸収値との関係を求めた (Fig. 5)。この結果から、TM 量が 20 μg までの範囲では吸収値と蛋白質量が比例することがわかった。そこでこれを標準直線とし、サバ、メバチマダロ、キハダマダロ、ウサギの各 TM の α と β サブユニットの比率を求め Table 1 に示した。魚の TM ではいずれも $\alpha:\beta$ は 1:1 (w/w) であつたが、ウサギ TM では 3:1 であり、魚とウサギ TM では比率が異なつてることがわかった。

魚類筋肉 TM は魚種によつてサブユニット組成に差があることが明らかになつたので、次に TM の生理活性について比較をおこなつた。7 種類の魚から調製した TM の生理活性をウサギ骨格筋の脱感作アクチンとウサギ骨格筋トロポニンを用いて調べた (Table 2)。

いずれの魚の TM もトロポニンが存在しない場合は脱感作アクチンと Mg^{2+} -ATPase 活性に対して Ca^{2+} 感受性を賦与しなかつた。一方トロポニンとの共存下では Ca^{2+} 感受性を賦与することが認められた。TM の活性の強さは魚種による差がみられたが、対照としたウサギ TM の活性があまり強くなかつたので、これが魚種差による有為の差であるかどうかは、この結果からは断定できない。魚の TM は $\alpha\alpha$ 型、 $\alpha\beta$ 型ともにウサギのアクチン系に対して活性を示した。Table 2 の結果は、定性的ではあるが、調製した魚の TM が生理活性を有していることを示し、ウサギ TM と同様に調節蛋白質としての役割を担うことを意味しているように思われる。

メバチマダロ TM ($\alpha\beta$ 型) とコイ TM ($\alpha\alpha$ 型) の生理活性をコイの脱感作アクチンとコイのトロポニン系を用いて測定した (Fig. 6)。この場合 Ca^{2+} 存在下では両 TM も同程度の活性を示したが、EGTA 存在下

ではコイ TM の方が Mg^{2+} -ATPase 活性を強く抑制した。

前報⁷⁾でコイの TM とトロポニンの結合能をゲル濾過によつて調べたが、Fig. 7 はメバチマグロとコイトロポニンとの結合について調べたものである。メバチマグロとコイのトロポニンを混合してゲル濾過をおこなうと、各々を単独にゲル濾過に付した場合よりピークの溶出位置が早くなつた。これはメバチマグロ TM とコイのトロポニンが結合したことを示している。また Fig. 7 に挿入したピーク A の SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動図からは、コイのトロポニンに由来する 4 本のバンド (分子量の大きい順に 43,000 成分, トロポニン-T, -I, -C)^{8,10)} とメバチマグロ TM に由来する 2 本のバンド (α と β) が検出されたので、ピーク A は TM とトロポニンから成り、両蛋白質の複合体が形成されたことが示された。

考 察

本実験で魚類筋肉から調製した TM の多くは SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で単一のバンドを示したが、一部の魚の TM は 2 本のバンドを示した。この原因として、調製した TM の精製が不十分なために他の蛋白質の混入、鮮度低下による、あるいは調製中に生じた分解物などに起因する可能性が指摘される。

ウサギ骨格筋の TM の場合も、しばしばトロポニンが混入していることがあるが、特に TM と分子量に近いトロポニン T が問題とされている²⁾。この場合には尿素の存在下で電気泳動をおこなうと、TM の泳動速度が他の筋原繊維蛋白質に比較して著しく遅くなるので、トロポニン T との判別が容易となる。そこで 0.1% SDS-5M 尿素-10% アクリルアミドゲルを用いて魚の TM を電気泳動に付したところ (Fig. 2), コイとカツオの TM は 1 本、メバチマグロとウサギ TM では 2 本のバンドが見出され、そのパターンは尿素の存在しない場合と同じであつた。さらにトロポニンあるいはそのサブユニットの混入でないことは、硬骨魚類トロポニン T の分子量は 30,000¹⁰⁾ でウサギトロポニン T (分子量 37,000) とは異なり、TM とは電気泳動的に区別し易く、また魚類トロポニンの SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動によると 4 成分が検出されるが、TM の 2 本のバンドに相当する分子量を示す成分はトロポニンには存在しない^{8,10)}ことから明らかである (Fig. 7 の電気泳動図参照)。

次に Table 1 に示したように、サバを 4°C に 48 時間放置して鮮度低下をおこさせ、その肉から TM を調製したが、TM の α と β の比率には変化がみられなかつたので、 α または β は鮮度低下で生じた魚肉蛋白質の分

解物によるものではない。さらに TM を結晶化しても (Table 1), トロポニンと結合させても (Fig. 7), α と β の比率には変化がなかつた。

これらの結果は α と β がいずれも TM のサブユニットであることを支持しているように思われる。

α と β のサブユニットを有する TM は調製した魚の TM のうち、サバ亜目に属するサバとマグロから見出された。これらの TM の α と β の比率は両サブユニットのコマシーブリリアントブルーによる染色度が同じであると仮定すると、その重量比は 1:1 である。両サブユニットの分子量が近似しているので、等モル比で存在するものと思われる (Table 1)。 α と β が random な混合から成るとすれば、これらの魚の TM は $\alpha\alpha$, $\alpha\beta$, $\beta\beta$ の 1:2:1 の組合せから成るが、この点についてはさらに検討が必要である。CUMMINS と PERRY^{2,3)} によれば、両生類以上の鳥類、哺乳動物骨格筋の TM はいずれも α と β の分子種があり、さらにウサギ骨格筋 TM は isoelectrofocusing で α_1 , α_2 , β_1 , β_2 の 4 種に分かれるので、4 種類の分子種から成るとしているが、量的には α_1 , β_1 が多い。一方、ハイドロキシアパタイトカラムにより変性剤を用いない条件下では、ウサギ TM は $\alpha\alpha$ と $\alpha\beta$ の 2 分子種に分離されている⁹⁾。

サバ亜目に属する魚は魚類の中でも特化の程度が高い一群であるとみなされており、一般に強力な遊泳力を持つ回遊魚である。しかしサバ亜目に属する魚の TM がすべて $\alpha\beta$ 型とは限らない。カツオ TM ではコイの TM との差異が電気泳動的には認められない (Fig. 2, 3), またシロカジキ TM はコイと同様に電気泳動で 1 本のバンドのみであるが、コイ TM より分子量が小さい。

以上のようにサバ亜目に属する魚の TM のサブユニット組成は複雑であることがわかつた。これらの TM サブユニットの不均一性については、哺乳動物 TM サブユニットの不均一性との対比においてもさらに検討したいと考えている。

TM は生体内ではアクチンとトロポニン (トロポニン T) と結合していることが知られている。 $\alpha\beta$ 型 TM を有するサバとマグロのトロポニン T と $\alpha\alpha$ 型 TM を有するコイのトロポニン T は分子量が等しい⁹⁾。一方軟骨魚類のホンザメの TM は $\alpha\alpha$ 型でありコイの TM と分子量は等しいが、サメのトロポニン T¹¹⁾ はコイのその分子量の約 2 倍である。TM のサブユニットの相違はトロポニンの相違とは対応していないようにみえる。

魚類筋肉から調製した 7 種類の TM の生理活性をウサギ骨格筋のアクトミオシン・トロポニン系を用いて測定したところ、魚の TM は $\alpha\alpha$, $\alpha\beta$ 型によらず定性的には、いずれもウサギ骨格筋の TM と同じ生理活性を有しており、また魚の TM がウサギのアクトミオシン

系に有効であることが示された (Table 2)。このことはまた、ここで調べた $\alpha\alpha$, $\alpha\beta$ 型 TM がいずれもトロポニンと複合体を形成する能力があることを意味している。ゲル濾過による方法 (Fig. 7) においてもメバチマダロ TM とトロポニンの複合体の形成が示された。コイ TM とトロポニンの複合体の形成については前報⁷⁾で述べた。これらの結果は魚の TM がウサギ TM と機能的に差がないことを示しているものと考えられる。コイのアクチオシン・トロポニン系においては (Fig. 6), コイの TM の方がメバチマダロ TM よりは活性が強いことが示されたが、これはサブユニットの種特異性によるものかもしれない。両サブユニットの単離と性状の比較が今後必要である。

終りに本研究に際し有益な御助言をいただいた東京工業大学、渡辺静雄教授、本学部の新井健一助教授に深謝します。また本研究費の一部は昭和 52 年度文部省科学研究補助金によつたので記して感謝します。

文 献

- 1) K. WEBER and M. OSBORN: *J. Biol. Chem.*, **244**, 4406-4412 (1969).
- 2) P. CUMMINS and S. V. PERRY: *Biochem. J.*, **133**, 765-777 (1973).
- 3) P. CUMMINS and S. V. PERRY: *Biochem. J.*, **141**, 43-49 (1974).
- 4) 関 伸夫・今野久仁彦: 日水誌, **41**, 1135-1141 (1975).
- 5) K. BAILEY: *Biochem. J.*, **43**, 271-279 (1948).
- 6) M. YAMAGUCHI, M. L. GREASER, and R. G. Cassens: *J. Ultrastructure Res.*, **48**, 33-58 (1974).
- 7) 今野久仁彦・関 伸夫: 日水誌, **41**, 1327-1333 (1975).
- 8) 関 伸夫・長谷川 栄治: 日水誌, **44**, 71-75 (1978).
- 9) 松原喜代松: 魚類の形態と検索, 第1版, 石崎書店, 東京, 1955, pp. 77-85.
- 10) 下村昌夫・関 伸夫: 日水誌, **44**, 231-238 (1978).
- 11) D. A. MALENCIK, C. W. HEIZMAN, and E. H. FISCHER: *Biochemistry*, **14**, 715-721 (1975).