魚類筋原繊維の収縮性と ATPase 活性の関係に関する基礎的研究

阪本正博・新井健一

(1979 年 8 月 1 日受理)

A Fundamental Study on Relationship between ATPase Activity and Contractile Property of Fish Myofibrils

Masahiro SAKAMOTO*¹ and Ken-ichi ARAI*²

Fish myofibrils were prepared for the study on the relation of their ATPase activity to contractile properties, especially in the presence of Mg or Ca ion. The degree of contraction of the myofibrils was measured in relative terms by centrifuging the myofibrillar system at 1,000 rpm for 20 minutes, and then measuring the volumes of the fibril layer, in the absence and presence of ATP. The ATPase activity of myofibrils under the same condition as above was also assayed, separately.

When Mg ion alone was added as divalent cation to our myofibril preparation, it had little or no effect on the degree of contraction and on the rate of ATP splitting as well. Further addition of EDTA to this Mg system, however, resulted in considerable inhibition of ATPase activity and in the complete inhibition of contraction. On the other hand, Ca ion alone, even at high concentration, somewhat reduced the degree of contraction, although it allowed a very high rate of ATP splitting. These results showed that the fish myofibrillar system closely resembled that of rabbit in its reaction towards ATP and divalent cations.

Three myofibril preparations which consisted of different sized fragments of fibrils were obtained by using differential centrifugation. No differences was found in contractile properties and in their ATPase activity between them.

魚類の筋原繊維(以下、Mf と略す)に関する研究は、加藤らがその調製を試みてから¹⁾、非常に多く行われるようになった。すなわち、Mf は生筋のモデルとして優れており取り扱いやすい利点を持つているからである²⁾。すでに著者らはその ATPase 活性について基礎的な検討を行つたが³⁾、これを指標として魚類 Mf の安定性に関する研究³⁻⁵⁾および機能に関する研究などが報告されている^{6,7)}。一方、Mf が他の生筋モデルと同様に、ATP によつて収縮することは良く知られていることであるが、魚類 Mf の収縮に関する研究は全く行われていない。一般に、Mf の収縮能の測定は筋節の長さの変化を顕微鏡視野で算定したり^{8,9)}、電気的に記録したりして行われている¹⁰⁾。本研究ではもつとも単純な試みではあるが簡便な方法として知られている ATP による Mf の容積変化から判定する試みを追試した。初めに Mf の収縮(容積変化)が強く起こる反応条件を見出すため基礎的な検討を行い、次に同条件下における ATPase 活性との関係を明らかにしようとした。また、サイズの

異なる(微細または粗大) Mf 断片から成る Mf 標品の収縮性と ATPase 活性についても比較検討した。

実験方法

魚類筋原繊維の調製法 本実験で使した Mf の大部分は、先に加藤らが報じた方法に準じて調製した¹⁾。すなわち、生鮮魚肉を 0.1 M KCl~40 mM Tris-HCl (pH 7.5) と共に日本精機製ホモジナイザーにより、充分に冷却し 30 秒間の休止時間をおきながら、1 分間ずつ計 6 分間ホモジナイズした後、3,000×g で 10 分間遠心分離して上澄み液を捨てる操作を数回くりかえし、最後に一層のガーゼで濾過して結合組織などを除き Mf 標品とした(標品 a とする)。この操作は、いわゆる遠心分画法^{11,12)}を採用しておらず、Mf を集めるために用いる遠心力が従来の場合と異なっている。しかし、調製した Mf 標品は生化学的に均質で定量的な取扱いが可能であり¹⁾、ATPase の純度および一般的性質は従来の報告と同じであつた。一方、上記の方法と異なる遠心力で集め

*¹ Present address; Department of Dermatology, University of California San Francisco, School of Medicine, San Francisco, Calif.

*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 041).

た Mf 標品も本実験の中の一部 (Table 1 に示す実験) において、標品 a と比較するために使用した。すなわち、上記の Mf 標品 a の懸濁液を $300\times g$ で 5 分間遠心分離し、微細な Mf 断片を上層部に集めた (標品 b とする)。ここで沈殿する粗いサイズの Mf は再び $0.1\text{ M KCl} \sim 40\text{ mM Tris-HCl}$ (pH 7.5) に懸濁して実験に供した (標品 c とする)。実験に用いた魚種は主にコイ (Carp, *Cyprinus carpio*) であるが、マガレイ (Flat-fish, *Limanda angustirostris*)、スケトウタラ (Alaska pollack, *Theragra chalcogramma*) は加熱変性の比較の実験に使用した。

筋原繊維の収縮率の測定法 基礎的な検討を行った後、採用した測定条件は 0.09 M KCl , 5 mM MgCl_2 , 0.1 mM CaCl_2 , 36 mM Tris-HCl (pH 7.5), Mf タンパク質 $3\sim 7\text{ mg/ml}$, 3 mM ATP (いずれも終濃度) である。まず ATP を除く混合液 (9 ml) を目盛付きスピッツ管に入れ、最後に ATP (1 ml) を加えて良く攪拌混和し、1 分後に 2°C で $1,000\text{ rpm}$ ($185\times g$)、20 分間遠心分離して沈殿する Mf の占める容積を読みとつた。収縮率の表示は次式によつた。収縮率 $= [(V_0 - V_{\text{ATP}})/V_0] \times 100$, ここで V_0 および V_{ATP} は ATP を加えない時と加えた時の Mf の容積である。新鮮肉から調製した Mf の収縮率はほぼ $65\sim 75\%$ であつた。

筋原繊維の収縮の形態観察 ATP による Mf の収縮を NIKON S-Ke 型位相差顕微鏡を使用し、室温で観察した。すなわち、収縮率の測定に供した同じ組成の Mf 懸濁液をスライドガラス上にとり、その上のカバーガラスの一端から ATPase 溶液を 1 滴しみ込ませて Mf の収縮を観察し、写真撮影を行つた。

筋原繊維 ATPase 活性の測定 Mf の収縮率と ATPase 活性との関係を明らかにするため、Mf の収縮を行わせたときと同じ反応組成液において Mf ATPase 活性を別箇に測定した。すなわち、特別な目的の実験の場合以外は、 0.09 M KCl , 5 mM MgCl_2 , 0.1 mM CaCl_2 , 36 mM Tris-HCl (pH 7.5), 3 mM ATP , $3\sim 7\text{ mg/ml}$ タンパク質の混液で 2°C において生成する無機りん酸を比色定量した¹³⁾。また、Mf タンパク質はビウレット法により比色定量した¹⁴⁾。

結 果

ATP による筋原繊維の容積変化に影響する各種因子について (1) 遠心分離の条件 収縮に伴う Mf の容積変化を測定する遠心分離の条件は、多数試料を同時に測定するための所要時間などを考慮して 20 分間と定め、Mf の収縮率に及ぼす遠心力 (国産冷却遠心機 H-103 RS 型のローターの回転速度で表わした) の影響を検討した (Fig. 1)。この実験ではコイ Mf のタンパク質濃度が 3.0 および 6.3 mg/ml の場合の収縮の結果を示したが、い

Fig. 1. Effect of centrifuging force used for sedimentation of fibril layer, on the contractility of carp myofibrils.

Fresh muscle was homogenized with a cold 0.1 M KCl - 40 mM Tris-HCl (pH 7.5). The myofibrils were sedimented by centrifugation at $3,000\times g$ for 10 minutes. They are then washed thoroughly to remove the soluble proteins with the same cold KCl-buffer solution. Finally, the myofibrils were separated from connective tissue and intact fibers by filtration through a layer of gauze.

The degree of contraction of myofibrils was demonstrated in relative terms by centrifuging the myofibrillar system at various speeds (rpm) for 20 minutes and at 2°C , and then measuring the volume of the fibril layer, in the absence and presence of ATP. The assay system for the contractility of myofibrils was 0.09 M KCl , 36 mM Tris-HCl (pH 7.5), 5 mM MgCl_2 , 0.01 mM CaCl_2 , 3 mM ATP where added, and 6.3 mg/ml (O) or 3.0 mg/ml (Δ) of protein.

Contractility $= [(V_0 - V_{\text{ATP}})/V_0] \times 100$, where V_0 and V_{ATP} represent the volumes of myofibrils in the absence and presence of ATP, respectively.

ずれの場合も遠心力が $900\sim 1,500\text{ rpm}$ (約 $150\sim 400\times g$) において一定の高い収縮率を示した。なお、遠心力を強めると、ATP を加えないときの Mf の容積が小さくなるために収縮率は低値となり、一方、遠心力を弱くすると、ATP 添加後の Mf の容積がなかなか安定した値に到達せず一定の収縮率が得られにくくなる。したがって、本実験では特に述べる時を除き、 $1,000\text{ rpm}$ で 20 分間遠心分離して Mf の容積を測つた。

(2) KCl 濃度 コイ Mf の収縮に及ぼす KCl 濃度の影響を次に検討した。また、同条件下における Mf ATPase 活性も別箇に測定した (Fig. 2)。この結果によると、Mf の収縮は $0.08\sim 0.1\text{ M KCl}$ において強く起こり $0.12\sim 0.14\text{ M KCl}$ では起こりにくかつた。特に 0.1 M から 0.12 M KCl の濃度範囲で収縮率の低下が著しいが、この現象は同条件下の ATPase 活性の著しい低下と良く相関していた。Mf の Ca^{2+} -ATPase 活性は 0.1 M 以上の高 KCl 濃度下では著しく低下すること

Fig. 2. Effects of KCl concentration on the contractility and the ATPase activity of carp myofibrils.

The assay system for the contractility (○) of myofibrils was the same as in Fig. 1, except that 6.4 mg/ml of protein and various concentrations of KCl were used. The volume of fibril layer in the system was measured by centrifuging at 1,000 rpm for 20 minutes. The demonstration of the contractility was the same as in the legend of Fig. 1.

The ATPase activities (●) of myofibrils under the various KCl concentrations as above were also measured.

はすでに知られているが¹¹⁾, 本実験条件 (5 mm $MgCl_2$, 0.1 mm $CaCl_2$, 3 mm ATP) 下の活性も同様に低下した。なお, KCl 濃度が 0.16~0.2 M において収縮率が僅かに高値を示すのは, ATP を加える前の Mf の容積がこの KCl 濃度下で明らかに増加, すなわち, 膨潤する事実が認められたので, あくまでも見かけ上の増加にすぎないと言ふことが出来る。

(3) ATP, Mg^{2+} および Ca^{2+} 従来から Mf の収縮にとって必要な因子は ATP と, Mg^{2+} , Ca^{2+} の様な二価正イオンであることが知られている。そこで, 収縮を行わせるときの他の条件を一定に保持し, ATP (Fig. 3), Mg^{2+} (Fig. 4) または Ca^{2+} (Fig. 5) の濃度を変化させ, コイ Mf の収縮率に及ぼす影響を検討した。その結果はコイ Mf が最高の収縮率を示すためには ATP は 3 mm, Mg^{2+} は 5 mm (いずれも終濃度) 加えると良いことを示唆した。また, Ca^{2+} は別に加える必要がないという結果であつたが, 実験条件を明らかにしておくために 0.1 mm 添加して収縮率を測定することにした。なお, Fig. 3~6 に示したように, 本実験で使用了コイ Mf 標品は特に Mg^{2+} や Ca^{2+} を添加しなくとも, ATP によってある程度強く収縮した。そこで収縮に及ぼす Mg^{2+} や Ca^{2+} の必要性を確認するために, EDTA (ethylene diamine tetra acetic acid) と EGTA (ethylene glycol bis (β -aminoethylether)-N-N'-tetra-acetic acid) などのキレート剤を用いてさらに検討した (Fig. 6)。すなわち, Mg^{2+} を含まない反応混液に EDTA を加えると,

Fig. 3. Effect of ATP concentration on the contractility of carp myofibrils.

The assay system for the contractility of carp myofibrils was the same as in Fig. 1, except that 6.4 mg/ml of protein and various concentrations of ATP were used (○). The volume of fibril layer in the assay system was measured by centrifuging at 1,000 rpm for 20 minutes. The demonstration of the contractility was the same as in the legend of Fig. 1. As a control (c), the contractility of myofibrils with ATP in the absence of $MgCl_2$ and $CaCl_2$ was also measured (●).

Fig. 4. Effect of $MgCl_2$ concentration on the contractility of carp myofibrils.

The assay system for the contractility of carp myofibrils was the same as in Fig. 1, except that 6.4 mg/ml of protein and various concentrations of $MgCl_2$ were used (○). The other condition and method were the same as in Fig. 3. The demonstration of the contractility was the same as in the legend of Fig. 1. As a control (c), the contractility of myofibrils with ATP in the absence of $MgCl_2$ only was also measured (●).

その濃度が増すに従い Mf の収縮率は低下し約 1 mm で収縮は起こらなくなった (別に測つた同一条件下の ATPase 活性も低下していた)。次に, 収縮率を測つた同混液に 5 mm Mg^{2+} を加えると Mf の収縮率は元の値まで回復した。一方, Ca^{2+} を含んでいない反応混液に EGTA を 5 mm 加えても収縮はほとんど抑制されないが, ATPase 活性は僅かに低下した (この結果はここでは図示しないが, 後で Fig. 12 の一部として重ねて言及

Fig. 5. Effect of CaCl_2 concentration on the contractility of carp myofibrils.

The assay system for the contractility of carp myofibrils was the same as in Fig. 1, except that 6.4 mg/ml of protein and various concentrations of CaCl_2 were used (○). The other condition and method were the same as in Fig. 3. The demonstration of the contractility was the same as in the legend of Fig. 1. As a control (●), the contractility of myofibrils with ATP in the absence of CaCl_2 only was also measured (●).

する)。したがって、魚類 Mf の収縮において Mg^{2+} の必要量はかなり多いが、 Ca^{2+} は著しく微量にとどまるように推定される。この結果はウサギなど他の動物の Mf やグリセリン処理筋で知られている二価正イオン(特に Mg^{2+} と Ca^{2+}) の要求性と極めて良く似ている^{2,15,16)}。

Fig. 6. Effects of EDTA on the contractility and the ATPase activity of carp myofibrils.

(A) The assay system for the contractility of carp myofibrils was 0.09 M KCl, 36 mM Tris-HCl (pH 7.5), 6.2 mg/ml of protein, 3 mM ATP and various concentrations of EDTA (○). A further additional effect of 5 mM MgCl_2 on the contractility in the same system containing EDTA as above, was measured (Δ). The other experimental condition and method were the same as in Fig. 3. The demonstration of the contractility was the same as in the legend of Fig. 1.

(B) The ATPase activities of myofibrils under the various conditions of (A) described above, were also measured at 2°C.

Fig. 7. Effect of protein concentration on the contractility of carp myofibrils.

The assay system for the contractility of carp myofibrils was the same as in Fig. 1, except that various concentrations of myofibrillar protein were used. The other experimental condition and method were the same as in Fig. 3. The demonstration of the contractility was the same as in the legend of Fig. 1.

(4) *p*-CMB (*p*-chloro mercuribenzoate) SH 基阻害剤として良く知られている *p*-CMB のコイ Mf の収縮に及ぼす影響を検討した。結果は図示しないが、*p*-CMB は Mf の収縮を強く抑制し同時に Ca^{2+} -ATPase 活性も低下していた。測定した Ca^{2+} -ATPase 活性の反応条件は 5 mM CaCl_2 , 100 mM KCl, 25 mM Tris-maleate (pH 7.0), 1 mM ATP, 温度 = 25°C である。また、ATPase の完全失活に要する *p*-CMB 量は、Mf タンパク質の 54% がミオシンに相当するとして計算すると、ミオシン 10⁵ g あたり 5.8 mol となつたが、この値は先にウサギおよびティラピアのミオシン Ca^{2+} -ATPase

Fig. 8. Effects of pH on the contractility and the ATPase activity of carp myofibrils.

The assay system for the contractility of carp myofibrils was the same as in Fig. 1, except that pH of the system was changed from 6.0 to 8.7 using 50 mM buffer (○). The other experimental condition and method were the same as in Fig. 3. The demonstration of the contractility was the same as in the legend of Fig. 1.

The ATPase activities (●) of myofibrils under the various pH's as above, were also measured at 2°C.

の *p*-CMB による阻害から得られた結果と良く一致している¹⁷⁾。

(5) 筋原繊維タンパク質濃度 コイ Mf を用いてタンパク質濃度が収縮率に及ぼす影響を検討した (Fig. 7)。これによると、Mf タンパク質として 3~7 mg/ml の濃度にわたって一定の収縮率を示す結果となった。なお、Mf のタンパク質濃度が高い方が、Mf の占める容積が大きいので正確な収縮率が得られ易かった。

(6) pH Mf の収縮に及ぼす pH の影響を検討し、あわせて同一条件下の Mf ATPase 活性も測定した (Fig. 8)。pH の調節は出来るだけ低温で行い、短時間で測定を終えたが、その結果によると、コイ Mf の収縮は pH 6 付近でやや弱いが pH 7.0~8.6 では強まりほぼ一定の収縮率を示した。なお、pH 9.5 以上では Mf の膨潤が見られるが、pH 8.6 では認められないので収縮率の増加は見かけの現象ではない。一方、ATPase 比活性は pH 7.0 以上で逆に低下する傾向を示したが、大きな低下ではなく収縮をするためには充分な比活性を保持していた。その比活性は、Fig. 7 の結果から 6~7 nmol Pi/min·mg タンパク質程度と推定される。

(7) 温度 魚類 Mf の収縮を測定する温度については、その不安定性を考慮して低温で行うことが好ましい。しかし、ここでは ATP により Mf が収縮するときの温度 (2~35°C) と遠心分離操作の温度 (2°C または 20°C) について検討した。結果は図示しないが、前者は 5~10°C において相対的にやや高い収縮率を与え、後者の場合は 2°C と 20°C であまり変りなかつた。

(8) その他の条件 Mf の収縮率の測定に影響する要因として他にまだ考慮すべき因子があるように思われる。たとえば、Mf と ATP を混合してから経過時間の問題がある。コイ Mf の場合、ATP を添加しても混和しないうちで、氷藏 30 分後に操作を続行しても結果になんらの影響も及ぼさなかつた。一方、ATP を混和後遠心分離せずに 15~30 分間にわたり放置し、その後遠心分離して収縮率を求める場合は、放置時間の経過に従いやや低い収縮率を示すようになる。また、遠心分離終了後 Mf の容積を読みとらずに放置すると、このときも経過時間に従ってやや低い収縮率を示すようになった。この場合は Mf タンパク質濃度が高い方がその傾向が強かつた。したがって、ATP 混和後の遠心分離までの時間および遠心分離後 Mf 容積を読みとるまでの時間は一定にすることが大切である。ATP による Mf の収縮は非常に速やかに進行することはすでに知られているが²⁾、ATP との反応が不完全な時や、遠心分離して Mf と ATP、Mg²⁺、Ca²⁺ との接触をある程度断つてから放置する時に、どのように進むかは知られていない。なお、Mg²⁺ と Ca²⁺ だけを添加した場合は、時間経過にとも

なう収縮率の変化は見られなかつた。

以上述べた実験結果は、コイ Mf を使用して得たものであるが、他にニジマス (Rainbow trout, *Salmo gairdnerii irideus*) やマダラ (Pacific cod, *Gadus morhua macrocephalus*) の Mf について検討した結果も同じであつた。

筋原繊維の収縮性と ATPase 活性の関係について

すでに述べたように、Mf の収縮は 2 価正イオン特に Mg²⁺ の影響を強くうける。そこで Mg²⁺ および Ca²⁺ 存在下の Mf の収縮率と ATPase 活性を同一条件下で別々に測定し、両者の関係を検討した (Fig. 9)。まず、Mf 標品に ATP だけを加えたとき (Mg²⁺ と Ca²⁺ は添加していない) の収縮率は 69% で、ATPase 比活性は 16 nmol Pi/min·mg タンパク質であつたが、これを基準とすると、ATP の他に 5 mM Mg²⁺ または 5 mM Mg²⁺ と 0.1 mM Ca²⁺ を同時に加えたときは収縮率はやや高値となり、ATPase もまたやや活性化された。しかし、Mg²⁺ と Ca²⁺ を添加せずに ATP と 5 mM EDTA を加えたときは、収縮性および ATPase 活性は共に強く抑制された。負の収縮率は ATP による Mf の膨潤を表わすが後で考察する。EDTA の代りに 5 mM EGTA を加えたときは、収縮率はあまり変らないが ATPase 活性はやや抑制された。一方、ATP と 5 mM Ca²⁺ を加

Fig. 9. Effects of divalent cations on the contractility and ATPase activity of carp myofibrils.

The contractility of carp myofibrils was measured in various systems (A-F). 0.09 M KCl; 36 mM Tris-HCl (pH 7.5); 3 mM ATP where added; 4.8 mg/ml of protein; temperature=2°C. (A) ATP, no MgCl₂ and CaCl₂; (B) ATP+5 mM MgCl₂; (C) ATP+5 mM MgCl₂+0.1 mM CaCl₂; (D) ATP+5 mM EDTA; (E) ATP+5 mM CaCl₂; (F) ATP+5 mM EGTA. The other experimental conditions and methods were the same as in Fig. 2. The demonstration of the contractility was the same as in the legend of Fig. 1. The ATPase activities of myofibrils under the same conditions as above (A-F) were assayed.

□, contractility; ■, ATPase activity

えたときは、収縮率はやや低下するが ATPase 活性は著しく高くなり 5~6 倍になった。したがって、本実験条件下では Ca^{2+} は Mf の ATPase を強く活性化する割には収縮率を高め得ないこと、一方、 Mg^{2+} は Mf の収縮にとって必須であり、ATPase と収縮性を同時に活性化することを示唆する結果となった。

ATP による筋原繊維懸濁液の濁度変化と ATPase 活性の関係について ATP による Mf の容積変化は非常に速く進行するため、収縮の割合(強さ)を知るために適しているが、収縮の反応速度に関する知見は得られない。そこで次に、Mf 懸濁液に ATP を添加したときに起こる濁度変化を追跡する方法を試みた。この実験の条件は Mf 懸濁液のタンパク質濃度を低くし(0.6 mg/ml)、測定温度が高い(室温)他は容積変化を測定する方法と全く同じにした。その結果は Fig. 10 に示したが、これによると、 Mg^{2+} と Ca^{2+} を含まない Mf に ATP だけを加えたときは、その濁度は一時的にあるレベルまで低下するが再び上昇しある程度まで回復した。また、5 mM Mg^{2+} または 5 mM Mg^{2+} と 0.1 mM Ca^{2+} 存在下の Mf に ATP を加えると、濁度の低下は著しく速く起こりその割合も大きかった。一方、5 mM Ca^{2+} 存在下の Mf に ATP を加えると、濁度は一時的に上昇した後徐々に低下するが、その割合は小さかった。これらの実験は、容積変化から求めた Mf の収縮に関する実験結果(Fig. 9)よりも、その速度に関する知見を多く与えるが、得られ

Fig. 10. Effect of divalent cations on the contractility, as measured by change in turbidity of carp myofibrils.

The contraction of the myofibrils was investigated by measuring the turbidity (absorbance at 550 nm in 1.5 cm light path) of the system after addition of ATP.

The assay system used was principally the same as that for volume change of myofibrils by ATP. 0.09 M KCl; 36 mM Tris-HCl (pH 7.5); 3 mM ATP where added; 0.6 mg/ml of protein; temperature = 2°C. (O) control, no ATP; (●) ATP; (Δ) ATP + 5 mM MgCl_2 ; (▲) ATP + 5 mM CaCl_2 ; (□) ATP + 5 mM MgCl_2 + 0.1 mM CaCl_2 .

た結論は本質的に同じであつた。すなわち、ATP による Mf 懸濁液の濁度低下は Mg^{2+} によつて僅かに強められる。 Mg^{2+} 存在下では Ca^{2+} のあらたな添加効果はほとんど認めることが出来ず、また、 Ca^{2+} だけによつてはむしろ異常な変化が起こり、濁度は一時的に増加した後低下するが、 Mg^{2+} 存在下の場合は逆にその割合は小さくなった。

筋原繊維の収縮の形態変化 ウサギ骨格筋の Mf は筋肉を硬直させてからホモジナイズすると良い標品が得られると報じられている²⁾。また、筋肉をいつたん冷凍してからホモジナイズして Mf を調製した例もあるが¹²⁾、これらの方法の原理は刺激による Mf の収縮を避け、均等な大きさの Mf を集めることによつて、顕微鏡による形態観察に適した標品を得るように考案されている¹²⁾。したがって、別な見地からすれば、この方法では供試した筋肉の一部分が標品化されるだけで収量はかなり低く、その Mf 標品が供試筋肉全部の性質を反映しているかどうかについて疑問が残る。一方、著者らは経験的な結果より、魚肉から Mf を調製するに当り収量を高めるために遠心分画法を採用していない¹⁾。したがって、Mf の大きさは必ずしも均等ではなく、顕微鏡の視野に微細な Mf 断片や Mf の集合体と思われる塊状の像が見られる。そこで、このような Mf 標品と全体に均等な大きさの Mf からなる標品の収縮率と ATPase 活性を比較検討した (Table 1)。すなわち、コイ筋肉を 0.1 M KCl (pH 7.5) 溶液でホモジナイズし、遠心分離 (3,000 ×g, 10 分間) 後の上澄を捨て、集めた沈殿を同上液に再懸濁させて遠心分離する操作を数回くりかえして得た Mf を標品 a とした。さらに、この Mf 懸濁液を 300 ×g, 5 分間遠心分離して上層部に残る Mf を標品 b とした。これは比較的微細で均等な大きさの Mf 標品とみなされる¹²⁾。なお、この操作で沈殿した Mf を再懸濁し標品 c とする。これら 3 種の Mf 標品の収縮率、ATPase 比活性および両者に対する Mg^{2+} と Ca^{2+} の効果などを比べると、いずれもほとんど同じ結果になった。また、Mf の収縮を顕微鏡下で観察すると (Fig. 11)、いろいろの大きさの Mf 断片を含む標品 a には Mf の集合体と思われる塊状の像が見られるが (Mf 断片のそれぞれは区別しにくい上、横紋も明瞭に認めることができない)、これは ATP によつてその外観を保つままで収縮しているのが認められる (A, A')。対照のためにスケウタラ Mf の収縮の場合も示すが (B, B')、この Mf は標品 b の調製法によつたものである。この場合は Mf 断片は分散したままで ATP によつて激しく収縮している。以上述べたように、顕微鏡的には各種の大きさと塊の Mf 標品ではあつても、収縮率と ATPase 活性から見る限りいずれも同じ Mf とみなしうろという結果となつた。な

Table 1. The contractility and ATPase activity of different myofibril preparations from carp.

The method for preparation of myofibrils (a) in 0.1 M KCl containing 40 mM Tris-HCl (pH 7.5) was the same as described in Fig. 1. The myofibril suspension (a) was then centrifuged at $300\times g$ for 5 minutes to separate the upper layer which consisted mainly of small fragments of myofibrils (b). The sediments collected by this centrifugation were resuspended in the same 0.1 M KCl-buffer (pH 7.5) solution, which contained mainly a larger fragments of myofibrils (c).

The contractility of myofibrils was measured in various systems. 0.09 M KCl; 36 mM Tris-HCl (pH 7.5); 3 mM ATP were added; 4.8 mg/ml of protein; temperature = 2°C . (A) ATP; (B) ATP + 5 mM MgCl_2 ; (C) ATP + 5 mM MgCl_2 + 0.1 mM CaCl_2 ; (D) ATP + 5 mM CaCl_2 ; (E) ATP + 5 mM MgCl_2 + 5 mM CaCl_2 . The demonstration of the contractility was the same as in Fig. 1. The ATPase activities of myofibrils under the various conditions as above, were also measured.

Divalent cation	Myofibrils					
	Contractility (%)			ATPase activity (nmol Pi/min·mg of protein)		
	a	b	c	a	b	c
A none	70	66	64	17	20	18
B 5 mM Mg^{2+}	73	73	71	19	24	20
C 5 mM Mg^{2+} + 0.1 mM Ca^{2+}	73	73	72	23	20	25
D 5 mM Ca^{2+}	45	48	44	99	99	90
E 5 mM Mg^{2+} + 5 mM Ca^{2+}	68	—	—	—	—	—

Fig. 11. Phase-contrast micrographs of fish myofibrils contracted by ATP.

The assay system for the contraction of myofibrils was principally the same as in Fig. 1. A drop of myofibrils suspension was placed on a slide glass and then a cover glass placed on it. A drop of ATP solution (pH 7.0) was instilled at one edge of a cover glass. Photographs were taken before (A and B) and after (A' and B') addition of ATP.

A, A' (Carp); B, B' (Alaska pollack)

Fig. 12. Changes in the contractility and ATPase activity of carp myofibrils during incubation at 35°C .

Incubation of myofibrils (0.1 M KCl-40 mM Tris-HCl, pH 7.5) was performed at the protein concentration of 4.5 mg/ml and at 35°C .

The assay system for the contractility of myofibrils was the same as in Fig. 1. The volume of fibril layer in the assay system was measured by centrifugation at 1,000 rpm for 20 minutes. The demonstration of the contractility was the same as in the legend of Fig. 1. (○)

The ATPase activities of myofibrils under the same conditions as above, were measured (●). The ATPase activity of myofibrils in the assay system containing 5 mM CaCl_2 alone as divalent cation, was also measured at 2°C (▲).

お、Mf が変性すると、やはり集合体または凝集体と思われる像が顕微鏡視野に現れるが、これは後述するように ATP によつて収縮しなかつた。

加熱による筋原繊維の収縮率の変化 先ずコイ Mf を 35°C で加熱したときの収縮率と ATPase 活性の変化を検討した (Fig. 12)。それによると、この条件下における Mf の Mg^{2+} -ATPase 活性および収縮率の変化はいづれも二相性を示し、初期にやや上昇し以後降下する曲線となつた。さらに、収縮率の変化は Mg^{2+} -ATPase 活性のそれより速く進行した。一方、 Ca^{2+} -ATPase 活性 (5 mM Ca^{2+} のみ存在) の変化は二相性を示さず、良く知られるように一次反応にしたがつて失活した⁴⁾。Mf の Mg^{2+} -ATPase の失活はその収縮率の低下と強く相関していることがここでも示されている。この結果は異なる加熱温度および異なる魚類 Mf の場合においても同じであつた。なお、上の実験で使したコイ Mf の収縮率は 70%、 Mg^{2+} および Ca^{2+} -ATPase 比活性はそれぞれ 22 および 99 nmol Pi/min·mg タンパク質である。次に、加熱による Mf の収縮率の変化を異なる魚種間で比較した (Fig. 13)。ここにはコイ、マガレイ・スケウタラ Mf の変化を示すが、これによるといずれの魚種の場合

Fig. 13. Changes in the contractility and ATPase activity of fish myofibrils during incubation.

The incubation of myofibrils was performed as described in the legend of Fig. 12.

(A) The contractility of myofibrils was measured in the same assay system as in Fig. 12. (B) The ATPase activity under the same condition as in A, was measured.

(○) Carp; (□) Flat fish (Magarei in local name); (△) Alaska pollack.

Fig. 14. Phase-contrast micrographs of incubated myofibrils before and after addition of ATP.

Incubation of myofibrils (0.1 M KCl-40 mM Tris-HCl, pH 7.5) was performed at 35°C for 30 minutes (Alaska pollack) or at 45°C for 120 minutes (Carp), respectively. The incubation was stopped by cooling in the ice water, and photographs were taken before (A and B) and after (A' and B') addition of ATP according to the the same method as in Fig. 11.

A, A' (Carp); B, B' (Alaska pollack)

も Fig. 12 の結果と同様に、その収縮率および Mg^{2+} -ATPase 活性は二相性を示す変化曲線となつた (スケウタラの場合は変性が速すぎるため明瞭な二相性を示さないが、30°C では明らかな二相性を示す)。また、収縮率の変化は Mg^{2+} -ATPase 活性の変化よりやや速く起こつた。なお、この結果から Mf の温度安定性を推定すると、安定な方からコイ、マガレイ、スケウタラとなり、 Ca^{2+} -ATPase を指標とした従来の報告⁴⁾ とほぼ同じとなつた。しかし、これらの変化曲線の再現性はあまり良くなく、Mf 標品ごとに変動する上、特に初期に見られる活性化の度合も著しく変化した。この変動の原因は不明である。なお、加熱した Mf はしばしば集合体 (もしくは凝集体) を形成するが、顕微鏡下で観察するとこの像は ATP によつて収縮しない (Fig. 14)。すなわち、コイ Mf の場合は 40°C において 120 分後に (A, A'), 不安定な魚種として知られるスケウタラ Mf の場合は 35°C で 15 分後 (B, B') に収縮性を失なう。これによると、ATP を添加する前 (A, B) と後 (A', B') を比べて形態的に大差が見られず、このような形態観察の結果は収縮率の変化 (Fig. 13) と良く一致するものであつた。他の魚類 Mf についても同じ結果が認められている。

考 察

魚類の Mf に関する研究の中、特に収縮性に関する研究は少ないため、魚種、筋肉部位、鮮度および貯蔵条件などが Mf の収縮率に及ぼす影響については明らかでない。本実験では活魚または新鮮肉を使用した、Mf の収縮率は 65~75% の範囲で標品ごとに異なる値を示した(経験的には測定誤差は数%である)。Mf の調製に使用した筋肉の生理状態と収縮率の関係についてもまだ検討を加えていないが、硬直前後の筋肉から得た Mf の ATPase 活性には差がないという⁹⁾。また、魚肉のホモジナイズに際して 0.1 M KCl (pH 7.5) 溶液に EDTA を添加しても得られた Mf の収縮率は変らなかつた。一方、Mf 標品中に筋小胞体(弛緩因子)が混入すると ATP によつてかえつて膨潤(弛緩)する現象も知られており¹⁰⁾、Mf の収縮率に影響することもあり得る。ただし、本実験で使用した Mf 標品は洗浄をかなりよくくりかえしているため筋小胞体は残存していないと考えている。著者らが主に使用した Mf は、先述したように必ずしも顕微鏡的に均等大きさの Mf ではないが、その生化学的性質や収縮率の研究に供するためにはなんら支障がないものであつた。したがつて、一定量の魚肉を強くホモジナイズし定量的に Mf 懸濁液に変えた後その性質(たとえば ATPase 全活性)を測定すると、これは供試魚肉全体の性質を反映すると推定することができる。このような方法によつて魚肉の品質判定をする試みもすでに提出されている¹⁰⁾。

BENDALL は ATP による Mf の収縮をストロボスコープを使つて、その容積の減少速度(沈降速度)から追跡して、収縮は遠心力が最大に達する前に非常に速く終了すると述べている²⁾。本研究では Mf の収縮速度を懸濁液の濁度変化として追跡したが(Fig. 10)、この変化も非常に速くほぼ 1 分以内に終了するため、正確な速度を知るには反応に関する基礎的な条件検討が必要である。いずれにしても、本研究で行つた魚類 Mf の ATP による容積変化は明らかに筋肉の生理的な収縮能を反映しており、また、Mf の加熱に際しては Mg^{2+} -ATPase の失活より速く変化するので、魚肉の品質を示す鋭敏な指標の一として検討する価値があろう。一方、Mf の Mg^{2+} -ATPase 活性はその収縮能と強く相関しているという結果を示したが、それがどのような分子上の問題であるかは今後研究しなければならない。 Ca^{2+} -ATPase 活性は収縮とは関連せず、発生するエネルギーは熱として消費されると言われる²⁾。したがつて、この活性はその中に含まれるミオシン全量に相当する数値と見えよ

う。なお、加熱に際して Mf の Mg^{2+} -ATPase 活性は二相性を示す山型の変化曲線を示すが、活性の半減期(活性が初めの 50% に達するまでの時間)を測定して変性の速さを比較した実験報告もすでにある⁹⁾。しかし、著者らの検討した結果によると、この変化曲線および半減期は実験ごとに、また標品ごとにより変動し再現性に乏しいので厳密な比較は不可能であつた。

本研究は文部省科学研究費補助金によつて行われた。ここに記して謝意を表する。

文 献

- 1) 加藤 登・内山 均・塚本志朗・新井健一: 日水誌, **43**, 857-867 (1977).
- 2) J. R. BENDALL: Muscles, molecules and movement, Heinemann Educational Books Ltd. London, 1969, pp. 42-57.
- 3) I. A. JOHNSTON, N. FREARSON, and G. GOLDSPIK: *Biochem. J.*, **133**, 735-738 (1973).
- 4) 内山 均・加藤 登・工藤雄司・新井健一: 日水誌, **44**, 491-497 (1978).
- 5) 橋本昭彦・新井健一: 日水誌, **44**, 1389-1393 (1978).
- 6) I. A. JOHNSTON, N. J. WALESBY, W. DAVIDSON, and G. GOLDSPIK: *Nature*, **254**, 74-75 (1975).
- 7) I. A. JOHNSTON and G. GOLDSPIK: *Nature*, **257**, 620-622 (1975).
- 8) S. K. SUNG, T. ITO, and T. FUKAZAWA: *J. Food Sci.*, **41**, 102-107 (1976).
- 9) K. TAKAHASHI, T. FUKAZAWA, and T. YASUI: *J. Food Sci.*, **32**, 409-413 (1967).
- 10) A. OPLATKA, J. BOREJDO, and H. GADASI: *FEBS Letters*, **45**, 55-58 (1974).
- 11) R. YANG, A. OKITANI, and M. FUJIMAKI: *Agr. Biol. Chem.*, **34**, 1765-1772 (1970).
- 12) S. V. PERRY: *Biochem. J.*, **48**, 257-264 (1951).
- 13) 高橋泰常: 生化学の領域における光電比色法各論 2 (関根隆光・笹川泰次・森田茂広・木村徳次・倉富一興編), 南江堂, 東京, 1962, pp. 13-14.
- 14) A. G. GORNALL, C. T. BARDWILL, and M. M. DAVID: *J. Biol. Chem.*, **177**, 751-766 (1949).
- 15) 丸山工作: 筋収縮の制御, 岩波書店, 東京, 1976, p. 71.
- 16) D. W. STANLEY and G. W. DEVILLA FRANCA: *Comp. Biochem. Physiol.*, **38**, 733-742 (1971).
- 17) 高士令二: 日水誌, **39**, 197-205 (1973).
- 18) 常盤知宣: 水産生物化学・食品学実験書 (斎藤恒行・内山 均・梅本 滋・河端俊治編), 恒星社厚生閣, 東京, 1974, pp. 170-178.
- 19) 加藤 登・野崎 恒・小松一宮・新井健一: 日水誌, **45**, 1027-1032 (1979).