イワシおよびコイの普通筋と血合筋の調節タンパク質の比較について

下村 昌夫・関 伸 夫

(1980 年 5 月 8 日受理)

A Comparative Study on the Regulatory Proteins
from Fish Ordinary and Dark MusclesMasao SHIMOMURA*¹ and Nobuo SEKI*¹

Native tropomyosins were extracted from the two main types of fish muscle, ordinary and dark muscles, and partially purified by salting-out with ammonium sulfate.

SDS*²-polyacrylamide gel electrophoresis showed that both the native tropomyosins from the ordinary and dark muscles were similar in composition. They consisted of tropomyosin subunits with a molecular weight of 34,000, troponin subunits with molecular weights of 30,000 (T), 21,000 (I), and 19,000 (C), and several other components. The ultraviolet absorption spectrum of the isolated dark muscle tropomyosin was similar to that of the ordinary muscle tropomyosin.

The dark muscle native tropomyosin conferred calcium sensitivity on the desensitized myosin B to the same degree as the ordinary muscle native tropomyosin. The concentrations of calcium and strontium ions required for half-maximal activation of Mg^{2+} -ATPase activity of the desensitized ordinary muscle myosin B plus dark muscle native tropomyosin were almost equal to those of the ordinary muscle myosin B.

These results suggest the essential similarity of the regulatory proteins in both the types of fish muscle.

魚の体側筋には普通筋の他に魚類特有の血合筋と呼ばれる筋肉がある。形態的には血合筋の筋原繊維は普通筋のそれに比較して細い¹⁾。また両者は生理的・生化学的に多くの相違点が知られている²⁾。例えば血合筋の方がミオグロビンやチトクロム含量が高く赤色にみえ、ミトコンドリアの量も多く生理活性が高いことが推測されている。しかし筋肉の運動にかかわる筋原繊維タンパク質に関する生化学的研究は少ない現状である。

JOHNSTON ら³⁾は普通筋と血合筋から筋原繊維を調製し、その Mg^{2+} -ATPase 活性を測定したところ、血合筋の活性は、普通筋の数分の一と低いことを見出した。渡部⁴⁾はイワシについて Ca^{2+} -ATPase 活性も血合筋の方が低いことを報告している。このことは血合筋が平常時の遊泳に専ら活動し、普通筋は急激な遊泳の際に活動するという両筋肉の機能的相違を反映しているものと考えられている^{1,2)}。

著者らは⁴⁻⁶⁾、魚類筋肉の調節タンパク質、特にトロポニンとトロポミオシンについて研究をおこない、魚類普通筋の筋収縮の調節タンパク質は、存在においても機能においても、哺乳動物骨格筋のものと類似しているこ

とを明らかにしてきた。しかし血合筋については検討していない。前述のように、両筋肉は機能を異にするので、本報告では血合筋の調節タンパク質について若干の性状を調べ、普通筋との比較をおこなった。

実 験 方 法

試料 マイワシ sardine, *Sardinops melanosticta* とコイ carp, *Cyprinus carpio* の普通筋と血合筋を用いた。コイは即殺魚、イワシは死後硬直中の鮮魚を使用した。

筋原繊維タンパク質の調製 活性トロポミオシン(native tropomyosin)は先に報告⁷⁾したコイ普通筋からの方法に準じて調製した。すなわち、ひき肉を 50 mM KCl-2 mM $NaHCO_3$ で洗浄後、15 mM 2-メルカプトエタノール-2 mM $NaHCO_3$ に透析して活性トロポミオンを抽出した。遠心分離後、上清を硫酸分画し、45~60% 飽和画分を集め、これを活性トロポミオンとした。これは主として、トロポニンとトロポミオシンの複合体から成っている。イワシ肉の場合は、ひき肉の洗浄の際に 1% Triton X-100 を含む洗浄液を使用した。

*¹ 北海道大学水産学部 (Faculty of Fisheries, Hokkaido University, Hakodate 041).

*² 略号: SDS, sodium dodecylsulfate; EGTA, ethyleneglycol-bis(2-aminoethylether)-tetra-acetic acid.

ミオシン B は普通筋から常法通り WEBER-EDSALL 溶液 (0.6 M KCl-0.01 M Na_2CO_3 -0.04 M NaHCO_3) により抽出し、希釈沈殿を 1 回おこなって精製した。血合筋のミオシン B は 4 mM ATP と 4 mM MgCl_2 を含む WEBER-EDSALL 溶液中で 5 秒間ホモジナイズした後、氷冷下で一夜抽出した。

脱感作ミオシン B⁴⁾ は次の様に調製した。ミオシン B を 2 mM NaHCO_3 -2 mM 2-メルカプトエタノールで 5 回洗浄して活性トロポミオンを除去して脱感作した。

トロポミオンは活性トロポミオンから等電点沈殿によりトロポニン除去した後、Sephadex G-200 ゲル濾過により精製した⁹⁾。

ATPase 活性の測定 Mg^{2+} -ATPase 活性は前報⁹⁾に準じて測定した。すなわち 30 mM KCl-20 mM Tris-maleate 緩衝液 (pH 6.8)-2 mM MgCl_2 -1 mM ATP およびミオシン B または脱感作ミオシン B を反応液 1 ml 当り 100~150 μg 含む反応液を用い、25°C でおこなった。ATPase 活性はミオシン B または脱感作ミオシン B 1 mg 当り 1 分間に生成する無機リン酸の μmol で表わした。

ATPase 活性の Ca^{2+} あるいは Sr^{2+} 濃度依存性の測定において、 Ca^{2+} 濃度は Ca^{2+} -EGTA 緩衝液⁹⁾を用いて決定し、 Sr^{2+} 濃度は 0.1 mM EGTA 存在下で添加した SrCl_2 の濃度で表わした。

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動は前報⁴⁾と同じ方法によった。タンパク質量はビウレット法により求めた。

結果および考察

活性トロポミオシンのサブユニット組成 コイおよびイワシの普通筋と血合筋から得た活性トロポミオシンの SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動図を Fig. 1 に示した。コイ普通筋の活性トロポミオシンの構成成分であるトロポニンとトロポミオシンのサブユニットの電気泳動図上の位置はすでに知られているので^{4,9)}、それを参考にして血合筋の活性トロポミオシンの各サブユニットとの比較をおこなった。コイ普通筋 (Fig. 1, Co) と血合筋 (Cd) の活性トロポミオシンの電気泳動図は酷似しており、電気泳動図から両筋肉の区別はできなかった。一方イワシの場合も両筋肉の活性トロポミオシンの電気泳動図は良く似ていた。しかも両筋肉から得た活性トロポミオンを等量ずつ混合して電気泳動をおこなったところ (Fig. 1, So+Sd), トロポミオンとトロポニンのサブユニット組成はサブユニットの数と分子量ともに良く似ていることがわかった。ただしイワシ血合筋の活性トロポミオシンの電気泳動図 (Sd) にはトロポミオン

とトロポニン T の間に普通筋のそれには見出されない小さいバンドが検出されたが、この蛋白質の正体はわからなかった。

イワシ血合筋とコイ普通筋の活性トロポミオシンの電気泳動図を比較した場合も、ほとんど相違が認められなかった。

一方、イワシ血合筋と普通筋から調製したミオシン B の電気泳動図 (Fig. 1, SdAM と SoAM) を比較してみると可成りの相違が見られた。分子量 1 万~3 万の範囲でみられる違いは前述の結果から活性トロポミオンによるものではなく、ミオシン light chain の相違によるものであろう。事実、FOCANT ら¹⁰⁾、渡部・橋本*によつて、血合筋のミオシン light chain は普通筋のそれとは分子量的に異なっていることが報告されている。このことは両筋肉のミオシンは構造的に異なっていることを意味している。

さて活性トロポミオシンの成分であるトロポミオンは SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で魚種によつては 2 本のバンドが見出されている⁹⁾。イワシとコイの普通筋では 1 本のバンドを示す⁹⁾が、血合筋の場合は検

Fig. 1. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of native tropomyosin and myosin B.

Electrophoresis of the native tropomyosins from carp ordinary (Co), carp dark (Cd), sardine ordinary (So), and sardine dark (Sd) muscles was carried out in 10% acrylamide-0.1% SDS gels at 8 mA/gel. Electrophoresis of myosin B from sardine ordinary (SoAM) and dark (SdAM) muscles was also performed. HC, myosin heavy chain; A, actin; TM, tropomyosin; T, troponin T; I, troponin I; C, troponin C.

* 渡部終五・橋本周久：昭和 53 年度日本水産学会春季大会講演要旨集 p. 161.

Fig. 2. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of tropomyosins from ordinary and dark muscles.

Electrophoresis of tropomyosins from sardine dark (A) and ordinary (B) muscles was carried out in 10% acrylamide-0.1% SDS gels.

討されていない。Fig. 1では電気泳動に付したトロポミオシンの含量が多くバンドの幅が広すぎて細かな相違はわからない。また純度の点からも問題がある。そこで、トロポミオシンを精製した後、電気泳動に付して、普通筋と血合筋のトロポミオシンの比較を行なった (Fig. 2)。Fig. 2に示すようにイワシの普通筋と血合筋のトロポミオシンはいずれも 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、それらの分子量はほとんど同じであることが認められた。Fig. 3はイワシの普通筋と血合筋のトロポミオシンの紫外外部吸収スペクトルを示したが、これらはコイ普通筋のトロポミオシンで報告³⁾されているスペクトルと酷似していた。

活性トロポミオシンの生理活性 先に報告⁴⁾したように、活性トロポミオシンは筋肉の弛緩に関与しており、アクトミオシン系に Ca^{2+} 感受性を賦与することが知られている。しかし、血合筋の活性トロポミオシンについては生理活性の検討はなされていない。そこで、イワシ

Fig. 3. Ultraviolet absorption spectrum of sardine ordinary muscle tropomyosin (1.0 mg/ml, —) and sardine dark muscle tropomyosin (1.0 mg/ml, ---) in 0.1 M KCl-10 mM phosphate buffer (pH 7.2).

Fig. 4. Effect of sardine dark and ordinary muscle native tropomyosins on the Mg^{2+} -ATPase activity of desensitized myosin B.

ATPase activity was assayed at 25°C in a medium containing 30 mM KCl, 20 mM Tris-maleate buffer (pH 7.5), 2 mM MgCl_2 , 2 mM ATP, 0.1 mM CaCl_2 (○, △) or 0.5 mM EGTA (●, ▲), 100 μg/ml desensitized carp myosin B from ordinary muscle, and either sardine dark (○, ●) or ordinary (△, ▲) muscle native tropomyosin.

の普通筋と血合筋の活性トロポミオシンの生理活性を測定した。すなわちコイ普通筋の脱感作ミオシンBに活性トロポミオシンを添加してゆき Ca^{2+} 存在下 (0.1 mM) または EGTA 存在下 (0.5 mM) の Mg^{2+} -ATPase 活性の変化をみた (Fig. 4)。EGTA 存在下の Mg^{2+} -ATPase 活性は、血合筋および普通筋のいずれの活性トロポミオシンの添加によつても抑制がみられた。また抑制の程度は両活性トロポミオシンとも同程度であつた。これはイワシ血合筋と普通筋の活性トロポミオシンがコイ普通筋のアクトミオシンに対して同程度の Ca^{2+} 感受性を賦与することができることを示している。ここには示さなかつたがコイの血合筋と普通筋の活性トロポミオシンの場合もイワシの場合と同様の結果が得られた。

次にコイ普通筋の脱感作ミオシンBに、コイの血合筋あるいは普通筋の活性トロポミオシンを添加して再感作し、その Mg^{2+} -ATPase 活性に及ぼす Ca^{2+} 濃度、あるいは Sr^{2+} 濃度依存性を調べた (Fig. 5)。 Mg^{2+} -ATPase 活性の Ca^{2+} 濃度依存性は血合筋あるいは普通筋の活性トロポミオシンのいずれを用いて再感作したミオシンBの場合も、ほとんど同じであつた (Fig. 5, A, △, ▲)。 Mg^{2+} -ATPase 活性を 50% 活性化するのに必要な Ca^{2+} 濃度は、いずれもおおよそ 1.4×10^{-6} M であつた。

同様にして Sr^{2+} 濃度に対する血合筋と普通筋由来の活性トロポミオシンの効果をみると (Fig. 5, B, △, ▲),

Fig. 5. Activation effect of calcium (A) and strontium (B) ions on the Mg^{2+} -ATPase activity of carp myosin B.

The ATPase activity was assayed at 25°C in a medium containing 30 mM KCl, 20 mM Tris-maleate buffer (pH 6.8), 1 mM $MgCl_2$, 1 mM ATP, and various concentrations of Ca^{2+} or Sr^{2+} .

▲, desensitized myosin B (140 $\mu g/ml$) from ordinary muscle plus dark muscle native tropomyosin (19.8 $\mu g/ml$); △, desensitized myosin B (140 $\mu g/ml$) from ordinary muscle plus ordinary muscle native tropomyosin (19.2 $\mu g/ml$); ●, myosin B (104 $\mu g/ml$) from dark muscle.

両筋肉の相違がほとんどないことがわかった。 Mg^{2+} -ATPase 活性を 50% 活性化するのに必要な Sr^{2+} 濃度はおよそ $2.8 \times 10^{-5} M$ であった。 Mg^{2+} -ATPase 活性を活性化するのに Sr^{2+} は Ca^{2+} 濃度の約 20 倍量必要であった。

次に血合筋ミオシンBの Mg^{2+} -ATPase 活性について Ca^{2+} と Sr^{2+} 濃度依存性を同様に調べてみた (Fig. 5, ●)。血合筋ミオシンBの ATPase 活性のレベルは普通筋のそれ (Fig. 5, △ に相当する) に比較して、かなり低いことがわかった。しかし Ca^{2+} および Sr^{2+} 濃度依存性については大きな差はみられなかった。したがって、ATPase 活性のレベルの相違は活性トロポミオシンの違いによるものではなく、両筋肉のミオシンの相違によることが示唆される。

ウサギ骨格筋と心筋のアクトミオシンの収縮に必要な

Sr^{2+} 濃度は異なっており、前者の Sr^{2+} 感受性は後者の 1/30 と低いことが知られている¹¹⁾。これは両筋肉のトロポニンの相違によるのであるが、コイの普通筋と血合筋の間には、このような著しい相違はみられなかった。

以上の結果から、血合筋と普通筋の活性トロポミオンは、そのサブユニット構造と機能が良く似ていることが示唆された。

終りに適切な御助言を賜わった本学部新井健一助教授に深謝する。

文 献

- 1) 日比谷 京: 白身の魚と赤身の魚, 水産学シリーズ No. 13 (日本水産学会編), 恒星社厚生閣, 東京, 1976, pp. 18-27.
- 2) I.A. JOHNSTON and B. TOTA: *Comp. Biochem.*

- Physiol.*, **49B**, 367-373 (1974).
- 3) 渡部終五・神名孝一・鈴木たね子: 日水誌, **43**, 1353 (1977).
  - 4) 下村昌夫・関 伸夫: 日水誌, **44**, 231-238 (1978).
  - 5) 関 伸夫・長谷川栄治: 日水誌, **44**, 71-75 (1978).
  - 6) 関 伸夫・岩淵三郎: 日水誌, **44**, 1333-1340 (1978).
  - 7) 関 伸夫・北尾 勝・今野久仁彦・新井健一: 日水誌, **39**, 1211-1219 (1973).
  - 8) 関 伸夫・今野久仁彦: 日水誌, **41**, 1135-1141 (1975).
  - 9) Y. OGAWA: *J. Biochem.*, **64**, 255-257 (1968).
  - 10) B. FOCANT, F. HURIAUX, and I.A. JOHNSTON: *Int. J. Biochem.*, **7**, 129-133 (1976).
  - 11) S. EBASHI, F. EBASHI, and A. KODAMA: *J. Biochem.*, **62**, 137-138 (1967).