コイ背肉ミオシンからサブフラグメント-1 の調製と その生化学的性質について

碓谷敏紀*・木村郁夫*・新井健一*

(1981 年 4 月 1 日受理)

Preparation and Biochemical Properties of Subfragment-1 from Dorsal Muscle of Carp *Cyprinus carpio*

Toshinori IKARIYA, Ikuo KIMURA, and Ken-ichi ARAI

A method was developed to obtain subfragment-1 (S-1) from carp dorsal muscle myosin by chymotryptic digestion. The biochemical properties of carp S-1 were studied.

(1) Carp myosin was more highly sensitive to chymotryptic digestion than was rabbit myosin. The digestion at 10°C instead of 20°C was therefore preferable to obtain the biologically active fragment from carp myosin.

(2) The carp S-1 was shown to be homogeneous on gel filtration-gel electrophoresis, and on ultracentrifugation. The sedimentation constant was estimated to be 5.38 S (2.6 mg/ml), which was comparable to rabbit S-1.

(3) The SDS-gel electrophoretic patterns showed that carp S-1 contained two light chains of different molecular weights, but the smallest light chain of myosin was lost during chymotryptic digestion.

(4) The ATPase activity of carp S-1 was found to be very similar to that of rabbit S-1 in the following respects: KCl concentration dependence, pH dependence, and kinetic parameters (V_{max} and K_m) in actin activation.

(5) The plots of the changes in light scattering intensity and turbidity of carp S-1 against F-actin concentration indicated that one mole of S-1 (estimated M.W.: 1.0×10^5) was bound per mole of actin monomer.

筋肉たんぱく質を構成する主要な成分の一つであるミオシンは、分子量が約 48 万で 2 個の頭部を持つ細長い繊維状分子であることが、ウサギのミオシンに関する多くの研究の成果から明らかにされている。¹⁾ また、筋収縮における基本的な反応であるミオシンとアクチンの相互作用および ATPase 反応にはミオシンの頭部、すなわちサブフラグメント-1 (S-1) が関与していることが知られている。²⁾ しかし、ミオシンは本来塩溶性であり、しかも繊維状の巨大たんぱく質分子特有の性質を示し、細胞内と同じ生理的条件下でその物理化学的、並びに生化学的性質を測定する際にしばしば実験技術上の困難を伴うことがある。ミオシンの活性部位に相当する分子断片(サブフラグメント)である S-1 は水溶性の球状分子であって実験上取り扱いやすい上に、ミオシンの生物学的

活性のほとんどを受けついで保有しているため、これを使用してミオシンの諸性質をより詳細に研究できると考えられている。

一方、従来の研究によれば、魚類筋肉ミオシンはウサギ骨格筋ミオシンと極めてよく似た一般的性質を示すが、³⁾ 例外なく不安定であり、そのミオシン ATPase 活性 [EC 3.6.1.3] は、熱、尿素、およびトリプシン [EC 3.4.4.4.] に対する安定性が著しく劣っていることが明らかにされている。⁴⁻⁶⁾ このように、魚類筋肉ミオシンの活性中心が不安定である事実をさらに検討するためには、活性中心を含む分子断片に関する研究を進める必要がある。しかし、魚類筋肉ミオシンの活性分子断片についての研究例は極めて少ない上、H-メロミオシン (HMM) に関する研究にとどまっており、⁷⁻¹⁰⁾ S-1 についてはその調製

* 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, Japan).

本報告では、次の略語を使用した。

S-1: subfragment-1, HMM: heavy meromyosin, LMM: light meromyosin, PMSF: phenylmethylsulfonyl fluoride, SDS: sodium dodecyl sulfate, DTT: dithiothreitol, EDTA: ethylene diamine tetra acetate, EGTA: ethyleneglycol bis(β -aminoethylether)-N, N'-tetra acetate.

方法さえも確立されていない現状である。

以上述べた理由から、本研究ではたんばく質分解酵素にキモトリプシン [EC 3.4.4.5.] を用いてコイ背肉ミオシンから S-1 を調製するための至適消化条件を見出し、さらに、調製した S-1 の生化学的諸性質について、ウサギの S-1 と比較検討することを目的とした。

実験方法

コイ *Carp Cyprinus carpio* 背筋からのミオシンの調製は次の方法で行なった。すなわち、活魚を即殺して背肉を採取し、これを十分に冷却後細切した。これを希リン酸緩衝液 (pH 7.0) で 3~4 回洗浄した後、0.45 M KCl, 5 mM $MgCl_2$, 5 mM ATP, 0.1 mM DTT の抽出液 (pH 6.4) で氷冷しながらアクトミオシンを 30 分間抽出した。抽出したアクトミオシンを希釈沈殿によって集め、0.5 M KCl, 20 mM Tris-maleate (pH 7.5), 0.1 mM DTT 溶液中に溶解した。続いて、このアクトミオシン溶液に対して、10 mM ATP, 5 mM $MgCl_2$, 0.5 mM EGTA を添加してミオシンとアクチンを解離させた後、 $(NH_4)_2SO_4$ による塩析を行ない、40~55% 飽和硫酸区分別を遠心分離して集めた。この沈殿を、0.5 M KCl, 20 mM Tris-maleate (pH 7.5), 0.1 mM DTT 溶液に溶解し、氷冷しながら同液に対して透析した後、100,000×g で 60 分間超遠心分離を行ない、上澄みをミオシンとした。

比較のために用いたウサギ骨格筋ミオシンの調製は、CONNELL らの方法¹²⁾ に準じて行なった。

ウサギ骨格筋アクチンの調製は、SPUDICH-WATT の方法によって行った。コイ背肉ミオシンのキモトリプシンによる消化性について基礎的な検討を行なったが、その実験方法、およびコイ S-1 の調製方法は、実験結果の項で詳しく述べる。

比較のために用いたウサギ骨格筋ミオシンからの S-1 の調製は、ONODERA らの方法¹⁴⁾ によって行なった。すなわち、ウサギ骨格筋ミオシンを、20°C においてその 1/130 重量のキモトリプシンで 5 分間消化した後、氷冷下で低イオン強度溶液に透析しながらさらに一晚消化を続け、透析中に生じた沈殿物を遠心分離によって除き、上澄みを Sephadex G-200 によってゲル濾過して S-1 を分離精製した。

ATPase 活性を測定するための反応組成は各図表の説明文中に示したが、反応は 25°C で行い、終濃度 5% の過塩素酸を加えて反応を止め、遊離した無機リン酸を FISKE-SUBBAROW 法¹⁵⁾ (ただし、還元試薬として 1,2,4-aminonaphthol sulfonic acid のかわりに *p*-methylamino-phenol sulfate を使用した) に従って比色定量した。

粘度の測定は、容量 2 ml, 溶媒の流速が 5~233 秒の間にあつた数種のオストワルド型粘度計を使用し、たんば

く質濃度は 2 mg/ml とし、測定温度は 10°C で行なった。

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動は、WEBER-OSBORN の方法¹⁶⁾ に従って 0.1% の SDS を含む 10% ポリアクリルアミドゲル、または、0.05% の SDS を含む 10% ポリアクリルアミドスラブゲル (Tris-glycine 緩衝液系) を用い、¹⁷⁾ 染色は Coomassie Brilliant Blue R を使用した。

調製した S-1 標品の沈降分析は、シュリーレン光学系を装備した Beckman L2-65B 型超遠心分離機を使用して行なった。すなわち、測定は 10°C において行ない、optical path が 12 mm のアルミニウム製 single sector cell を使用し、回転数が 49,970 rpm または 50,200 rpm に達した後、60~90 分に至る一定の時間ごとに bar angle 59° における沈降図型を写真にとった。

調製したコイ S-1 とアクチンとの結合能を測定する方法として、S-1 とアクチンの結合に伴う光散乱強度¹⁸⁾ と濁度¹⁹⁾ の変化を測定した。光散乱強度は、島津分光光度計 RF-500 を用いて、340 nm の波長における 90° 方向への散乱強度を 20°C において測定した。濁度は、(株) 島津製作所製分光光度計 UV-210A 型を用い、350 nm における吸光値を指標として 25°C において測定した。

たんばく質濃度の測定は、牛血清アルブミン画分 V を標準とし、ビウレット法²⁰⁾ により比色定量した。キモトリプシンの濃度は、 $E_{283nm}^{1\%} = 20.5$ を使用して決定した。²¹⁾ また、コイ HMM と S-1 のたんばく質濃度はビウレット法の他に、紫外線吸収、すなわち、コイ HMM では $E_{280nm}^{1\%} = 5.7$ 、コイ S-1 では $E_{280nm}^{1\%} = 7.7^{14)}$ を採用して決定した。

結 果

キモトリプシンによるコイミオシンの消化性 コイのミオシンから S-1 を生成するための至適消化条件を見いだすため、コイミオシンのキモトリプシンによる消化性について基礎的な検討を行なった。すなわち、0.5 M KCl, 20 mM Tris-maleate (pH 7.5) 溶液としたミオシン (たんばく質濃度は 4~6 mg/ml) を 20°C、または 10°C に保ち、ミオシンの 1/130 重量のキモトリプシンを加えて消化を始めた。次に、予定の時間経過ごとに一定量の消化物を取り出し、これに終濃度で 0.2 mM の PMSF を加えて消化を止め、同時に氷冷した。このミオシンの ATPase 活性、SDS-ゲル電気泳動図型、および粘性の変化を経時的に追跡した。結果をそれぞれ Fig. 1, 2 および 3 に示す。まず、ウサギの S-1 の調製方法に従ってコイのミオシンを消化した。すなわち、消化温度を 20°C として、ミオシンの 1/130 重量のキモトリプシンを作用させたと

ころ, その Ca^{2+} -ATPase 活性は2時間後に約 50% まで低下し, ATPase 活性部位の破壊が激しいことが示唆された (Fig. 1)。この時, 消化物の SDS-ゲル電気泳動図型

Fig. 1. Changes in the Ca-ATPase activity of carp and rabbit myosins during chymotryptic digestion.

Carp dorsal myosin solution (4–6 mg/ml) in 0.5 M KCl, 20 mM Tris-maleate (pH 7.5) was digested at 20°C or at 10°C with chymotrypsin in an amount of 1/130 (w/w) relative to myosin. Rabbit skeletal myosin was digested only at 20°C and other conditions were the same as for carp myosin. The digestion was stopped by adding 0.2 mM PMSF and the digests were used for ATPase assay. The assay was carried out at 25°C in a reaction medium containing 0.5 M KCl, 5 mM CaCl_2 , 1 mM ATP, 25 mM Tris-maleate (pH 7.0), 0.18 mg/ml (carp) or 0.098 mg/ml (rabbit) of protein of digest or myosin.

(●) Carp myosin at 20°C, (○) carp myosin at 10°C, (Δ) rabbit myosin at 20°C.

をみると, 対照として行なったウサギの場合よりもミオシンの heavy chain がはるかに速く分解され, 低分子化される事実が観察された (Fig. 2 (A), (C))。さらに, 同消化条件下のミオシンの粘度も急激に低下し, ウサギの場合に比べて明らかに消化速度が速かった (Fig. 3)。

次に, キモトリプシンは上の実験と同じく 1/130 重量とし, 温度をより低温, すなわち, 10°C にしてミオシンの消化を行なった。その結果, コイのミオシン Ca^{2+} -ATPase 活性の変化は, ウサギの 20°C における消化の場合とほぼ同様となり, 消化後約 30 分まではほとんど低下しなかった。また, SDS-ゲル電気泳動図型をみると, 20°C で消化した場合よりも heavy chain の分解がゆるやかに進行し, ウサギの 20°C における消化の場合とよく似た傾向となった (Fig. 2 (B))。さらに, ミオシン

(A) Carp, 20°C

(B) Carp, 10°C

(C) Rabbit, 20°C

Fig. 2. Changes in subunit composition of carp and rabbit myosins during chymotryptic digestion, revealed in SDS-polyacrylamide slab gel electrophoretic patterns.

Myosins were digested for various periods under the same conditions as in Fig. 1. SDS-polyacrylamide slab gel electrophoresis was carried out by the method of Laemmli (Ref. 17) with use of gels containing 10% polyacrylamide and 0.05% SDS.

(A) Carp myosin at 20°C, (B) carp myosin at 10°C, (C) rabbit myosin at 20°C.

HC: heavy chain, LC-1: light chain-1, LC-2: light chain-2, LC-3: light chain-3.

の粘度の低下も, 20°C で消化した場合に比べてかなりゆるやかとなった。これらの結果から, コイのミオシン

Fig. 3. Changes in the viscosity of carp and rabbit myosins during chymotryptic digestion.

The conditions for chymotryptic digestion were the same as in Fig. 1. The viscosity was measured at 10°C with an Ostwald type viscometer having a flow time of 51–233 seconds for a 2.0 ml of solution. η_{sp} = specific viscosity.

(●) Carp myosin at 20°C, (○) carp myosin at 10°C, (Δ) rabbit myosin at 20°C.

から S-1 を生成するための消化温度は、20°C よりも 10°C が適当であると判断した。

なお、ウサギのミオシンのキモトリプシン消化では、HMM からさらに S-1 が生成する過程で 3 種の light chain のうち分子量が 2 番目に大きい light chain-2 (g_2 -chain と呼ばれる) が消失することが知られているが、²²⁾ 著者らが行なったウサギミオシンの消化の場合も、しだいに light chain-2 が消失してゆく過程が観察された (Fig. 2 (C))。一方、コイのミオシンの場合は、消化開始直後に、分子量が一番小さい light chain-3 が消失する点がウサギの場合と異なっていた。また、他の 2 種の light chain は全く変化しなかった。

次に、コイのミオシンを 10°C で 15 分間消化した後、0.2 mM PMSF を加えて反応を停止し、さらに、透析により KCl 濃度を 50 mM まで下げ、超速心分離によって未消化のミオシン、および L-メロミオシン (LMM) を除き、上澄みの水溶性たんぱく質区を Sephadex G-200 を使用してゲル濾過した (Fig. 4 (A))。また、比較のために、ウサギのミオシンを実験方法の項で述べたように処理して得た水溶性たんぱく質区分の Sephadex G-200 ゲル濾過の結果を Fig. 4 (B) に示した。その結果、たんぱく質として第 1 の成分 (I) は void volume に、第 2 の成分 (II) は溶出液量約 170 ml 付近 ($V_e/V_0=15.4$, V_0 : elution volume, V_0 : void volume) に認められた。この II の溶出

Fig. 4. The elution profile of crude S-1 fraction obtained by chymotryptic digests of myosin in Sephadex G-200 gel filtration.

(A) Carp myosin was digested at 10°C for 15 min by chymotrypsin under the same condition as in Fig. 1, and the digest was dialyzed against low salt medium. After centrifuging of dialyzate, 120 mg of protein in the supernatant was applied to the column.

(B) Rabbit myosin was digested under the same condition reported by ONODERA and YAGI. (Ref. 14), and 100 mg of protein in the supernatant was applied to the column.

Gel filtration was carried out at 4°C using a column (2.2 × 85 cm) equilibrated and eluted with 0.05 M KCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5). The flow rate was about 12 ml per hour. Fractions of 4.8 ml for carp or 4.3 ml for rabbit were collected and absorbance at 280 nm was measured.

The photographs in the inset show the SDS-gel electrophoretic patterns of the eluted fractions. a: fraction at effluent volume of 124.8 ml (carp) or 129.0 ml (rabbit), b: fraction at effluent volume of 172.8 ml (carp) or 176.3 ml (rabbit), and sup: supernatant before applying to the column.

SDS-gel electrophoresis was carried out by the method of Weber and Osborn (Ref. 16), using 10% polyacrylamide and 0.1% SDS.

Ca-ATPase assay (X) was measured at 25°C in a reaction medium containing 0.5 M KCl, 5 mM CaCl_2 , 1 mM ATP, 25 mM Tris-maleate (pH 7.0), 0.03–0.20 mg of carp or 0.05–0.09 mg of rabbit protein/ml.

位置はウサギの S-1 の溶出位置 ($V_e/V_0=1.50$, Fig. 4 (B) II) と良く一致しており、分子サイズからみてコイの S-1 に相当する。そこで、それぞれの成分の Ca^{2+} -ATPase 比活性を測定し、結果を同図中に示したが、それによると II の方が相対的に高く、また使用したミオシンに比べて約 2 倍高い値であった。また、両成分の SDS-ゲル電気泳動図では、両成分が混合していると見られる画分を除いて、各溶出画分の全体にわたり全く同じ泳動図型を示しており、それぞれ均質の成分から構成されていることが示唆された。さらに、II のサブユニット組成 (Fig. 4 (A)-b) はウサギの S-1 のそれ (Fig. 4 (B)-b) と非常によく似ていることを認めた。以上の結果を総合すると、II はコイの S-1 に相当していることが明らかである。なお、上記の Sephadex G-200 ゲル濾過の void volume に溶出した I は、分子サイズから主に HMM であろうと推定される。この画分は ATPase 活性やアクチンとの結合能を保持しており、SDS-ゲル電気泳動図型からみたサブユニット組成 (Fig. 4 (A)-a) は、コイの S-1 (II) の場合よりも多数のサブユニットからなり、コイのアクチンミオシンをトリプシン消化して得た HMM¹⁰⁾ によく似ていた。また、ウサギの HMM の SDS-ゲル電気泳動図型 (Fig. 4 (B)-a) には 3 種の light chain が認められるのに対して、コイの HMM では 3 種のうち 1 種が消失していた。同様の結果は、トリプシン消化によって得たコイの HMM の light chain 組成でも認められている。^{10,20)}

次に、コイのミオシンに対してキモトリプシンをその

Fig. 5. The yields of HMM and S-1 from carp myosin as a function of digestion time with chymotrypsin.

Carp myosin was digested at 10°C with chymotrypsin and the dialyzate against low ionic strength medium was applied to gel filtration as in Fig. 4. The HMM and S-1 were calculated from the absorbance of each fraction eluted from the gel column, using $E_{280\text{nm}}^{1\%} = 5.7$ for HMM and $E_{280\text{nm}}^{1\%} = 7.7$ for S-1 respectively. The yield was demonstrated as a weight ratio (%) of HMM or S-1 relative to myosin used.

1/130 重量加え、10°C においてミオシンを消化する時、生成する S-1 と HMM を先述したゲル濾過からの溶出成分として定量し、両成分の生成量の経時変化を検討した (Fig. 5)。その結果によると、消化時間が約 20 分に至るまで HMM および S-1 の生成量は急激に増加し、供試したミオシン量の約 45% が HMM に、約 19% が S-1 となった。消化時間が 30 分以上になると、明らかに HMM が減少し、それに伴って S-1 は徐々に増加の傾向を示すが、急激な増加は認められなかった。なお 180 分消化後の HMM と S-1 の収量は、ともに供試ミオシンの約 25% になった。この結果と、先述した同条件下における Ca^{2+} -ATPase 活性、SDS-ゲル電気泳動図型、および粘性の測定結果を総合すると、消化時間は約 20 分が適当であると判断した。

コイのミオシンから S-1 の調製方法 上記の成果に基づいて、コイのミオシンから S-1 の調製を次のように行なった。すなわち、コイのミオシン 0.5 M KCl, 20 mM Tris-maleate, pH 7.5 溶液、(約 10 mg/ml) にミオシンの 1/130 重量のキモトリプシンを加え、温度を 10°C とし、20 分間消化した後、終濃度 0.2 mM の PMSF を加えて消化を止め、同時に氷水中で冷却する。次に、このミオシン消化物を 10 倍容量の 20 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) に一夜透析して未消化のミオシンと LMM を析出沈殿させ、これを超遠心分離して除いた上澄みの水溶性成分を Sephadex G-200 によってゲル濾過し、 $V_e/V_0=1.54$ 付近に溶出するたんぱく質画分を集めて濃縮し、これを S-1 標品とする。なお、濃縮法は、S-1 溶液を透析チューブに入れ、シロ糖粉末中に埋没し、冷室に一夜放置することによって行なった。方法の概略を Fig. 6 に示した。

Carp myosin (10 mg/ml in 0.5 M KCl-20 mM Tris-maleate, pH 7.5)
 — digestion by chymotrypsin
 (myosin:chymotrypsin = 130:1 by weight, 10°C, 20 minutes)
 — add 0.2 mM PMSF
 — dialysis against 10 volumes of 20 mM phosphate, pH 7.0
 — centrifuge at 26,000 rpm for 60 minutes
 Supernatant
 — gel filtration with Sephadex G-200
 Fraction at V_e/V_0 (Elution volume/Void volume) = 1.55
 — concentrate
 Carp S-1

Fig. 6. The method for preparation of S-1 from carp myosin.

コイ S-1 の理化学的性質について 調製したコイ S-1 標品の超遠心沈降分析における挙動を検討した (Fig. 7 (A)), それによると、沈降図型は測定時間が 60 分に至るまで単一の成分であることを示し、沈降係数は $S_{20,w} = 5.38\text{S}$ (2.6 mg/ml) であった。また、比較対照としたウサギの S-1 も測定時間 90 分まで単一の成分であることを示し (Fig. 7 (B)), 沈降係数は $S_{20,w} = 5.89\text{S}$ (2.1 mg/ml)

Fig. 7. Ultracentrifugal sedimentation patterns of carp and rabbit S-1s.

All runs were conducted at 49,970 rpm for carp S-1 and 50,200 rpm for rabbit S-1 at 10°C. The solvent used was 0.5 M KCl, 20 mM Tris-maleate (pH 7.5). Photographs were taken at various times after reaching top speed. Bar angle was 59°.

(A) Carp S-1, 2.6 mg/ml, (B) rabbit S-1, 2.1 mg/ml.

で既報の値と一致しており¹⁴⁾、また、コイの S-1 とも近似した値であった。この結果は、調製したコイ S-1 の分子サイズは均質であり、また、高純度であることを示唆している。

次に、SDS-ポリアクリルアミドスラブゲル電気泳動法¹⁷⁾によって、コイ S-1 のサブユニット組成をウサギの S-1 のそれと比較検討した。アクリルアミドの濃度が 10 % のゲルを用いて行なった結果を Fig. 8 に示した。この図中にはコイとウサギの S-1、両者の混合物および両ミオシンについて示したが、ミオシンの heavy chain に由来するバンドは、コイとウサギでは全く同じ位置に泳動し、また light chain-1 も全く重なった。コイ S-1 の light chain-2 とウサギ S-1 の light chain-3 にわずかに差が認められたが、これを除くと両 S-1 のサブユニット組成は全体的によく似ていた。この結果と、先述したコイ S-1 の Sephadex G-200 によるゲル濾過の溶出位置がウサギの S-1 のそれと良く一致しているという結果を総合して、コイ S-1 の分子量はウサギ S-1 (M.W. = 1.0×10^{-5})¹⁴⁾ と同じであると判断した。これは両 S-1 の超遠心による

Fig. 8. SDS-polyacrylamide slab gel electrophoretic patterns of S-1s from carp and rabbit.

Electrophoresis was carried out by the method of Laemmli (Ref. 17) with use of gel containing 10% polyacrylamide and 0.05% SDS. Approximately 10 μ g of S-1s or 30 μ g of myosins were applied.

C·M: carp myosin, C·S: carp S-1, R·M: rabbit myosin, and R·S: rabbit S-1, HC: heavy chain, LC-1: light chain-1, LC-2: light chain-2, and LC-3: light chain-3.

沈降係数が近似しているという結果からも支持される。
コイ S-1 の酵素的性質 コイ S-1 の Ca^{2+} 、および EDTA-ATPase 活性に対する KCl 濃度と pH の影響を検討した。まず、KCl 濃度依存性を Fig. 9 (A) に示した。その結果によると、KCl 濃度が高くなるにつれて Ca^{2+} -ATPase 活性は低下するだけであったが、一方、EDTA-ATPase 活性は著しく高くなり、0.6 M KCl 以上ではやや低

下した。これらの傾向はコイのミオシン ATPase 活性の場合と全く同様であり、しかも S-1 の比活性はミオシンの約 2 倍に増加していた。この値は、コイミオシンおよびコイ S-1 の分子量をそれぞれ 4.8×10^5 ^{24,26)}、 1.0×10^5 として求めた理論値²⁾とほぼ一致している。以上の結果から、ミオシン活性中心部位の機能は破壊されることなく本 S-1 標品に受けつがれているものと考えられる。比較のためにウサギの S-1 についても同じ検討を行なったところ、コイ S-1 に比べて Ca^{2+} -ATPase 活性は著しく高く、EDTA-ATPase 活性は低塩濃度側で特に低い点が相違するだけで、それらの KCl 濃度依存性は基本的にコイ S-1 の場合とよく似ていた (Fig. 9 (B))。

Fig. 9. KCl concentration dependences of the ATPase activity of S-1s and myosins from carp and rabbit.

The ATPase assay was carried out at 25°C in a reaction medium containing 5 mM CaCl_2 or 5 mM EDTA, 1 mM ATP, 25 mM Tris-maleate (pH 7.0), 0.05–0.10 mg/ml (carp S-1), 0.09–0.17 mg/ml (carp myosin), 0.027–0.053 mg/ml (rabbit S-1), or 0.05–0.10 mg/ml (rabbit myosin), and various concentrations of KCl.

Ca-ATPase activity: S-1 (○), myosin (●).

EDTA-ATPase activity: S-1 (△), myosin (▲).

(A) Carp, (B) rabbit.

次に、コイ S-1 ATPase 活性の pH 依存性を検討した (Fig. 10 (A))。その結果、 Ca^{2+} -ATPase は酸性側とアルカリ性側にそれぞれ二つの活性の極大を示し、EDTA-ATPase は pH が 6 以上になると急激に活性化され、8 以上ではほぼ一定値に達した。これらの傾向はコイのミオシン ATPase の pH 依存性と全く同様であり、また、S-1 の比活性は常にミオシンの約 2 倍の値を示した。続いて比較のためにウサギの S-1 ATPase の pH 依存性を検討したところ、その傾向は基本的にコイの S-1 と同じであった (Fig. 10 (B))。以上述べたように、本研究で調製したコイ S-1 の ATPase 活性はコイのミオシンのそれらと全く同じ KCl、および pH 依存性を示し、しかも、比活

Fig. 10. pH dependences of the ATPase activity of S-1s and myosins from carp and rabbit.

ATPase assay was carried out at 25°C in a reaction medium containing 0.5 M KCl, 5 mM CaCl_2 or 5 mM EDTA, 1 mM ATP, 50 mM buffer of various pHs, and 0.042–0.080 mg/ml (carp S-1), 0.034–0.17 mg/ml (carp myosin), 0.027–0.053 mg/ml (rabbit S-1), or 0.050–0.10 mg/ml (rabbit myosin). Tris-maleate buffer was used for pH 5.5–7.5, and Tris-HCl buffer for 8.0–9.0.

Ca-ATPase activity: S-1 (○), myosin (●).

EDTA-ATPase activity: S-1 (△), myosin (▲).

(A) Carp, (B) rabbit.

性が約 2 倍に上昇していることを考慮すると、ミオシンの ATPase 活性部位が破壊されずに本標品に受けつがれていると結論できる。また、比較対照としたウサギの S-1 の ATPase 活性も同様の KCl、および pH 依存性を示したことから、コイ背筋の S-1 はウサギ骨格筋タイプの S-1 であることが明らかとなった。

コイ S-1 とアクチンの相互作用 次に、本方法で調製したコイ S-1 とアクチンとの相互作用を研究した。まず、S-1 Mg^{2+} -ATPase のアクチンによる活性化を検討した。すなわち、一定量の S-1 にウサギの F-アクチンを加えて、アクト-S-1 の Mg^{2+} -ATPase 活性を測定し、EISENBERG と MOOS の作図法にならい、 Mg^{2+} -ATPase 比活性の逆数値に対してアクチン濃度の逆数値をプロットした。作図した結果を Fig. 11 に示したが、両値の間には直線関係が成立する。そこで、アクチンが無限量に加えられたときの比活性、つまり $V_{\max}$ を同図から求めると、 $20.0 \mu\text{mol Pi/min} \cdot \text{mg}$ of carp S-1 となり、また、この時のアクチンとコイ S-1 との見掛けの親和力、 K_a も同じ図から、 $9.3 \times 10^{-5} \text{M}$ actin と求められた。一方、同条件下の ATPase 活性の測定結果から求めたウサギの S-1 の $V_{\max}$ は、 $10.0 \mu\text{mol Pi/min} \cdot \text{mg}$ of rabbit S-1 で、既報の値と近似しており、コイの S-1 の $V_{\max}$ と大差はなかったが、コイの方がわずかに大きな値であった。また、 K_a は、 $9.3 \times 10^{-5} \text{M}$ actin であったが、これはコイの

Fig. 11. Double-reciprocal plots of the Mg-ATPase activity of carp and rabbit S-1s against the concentration of rabbit F-actin.

ATPase assay was carried out at 25°C in a reaction medium containing 20 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 25 mM Tris-maleate (pH 7.0), 0.033 mg/ml of carp S-1 or 0.01 mg/ml of rabbit S-1 and various concentrations of rabbit F-actin.

The V_{max} and K_a values obtained from this result were 20.0 μmol Pi/min·mg of S-1 and 9.4 × 10⁻⁶ M actin for carp and 10.0 μmol Pi/min·mg of S-1 and 9.3 × 10⁻⁶ M actin for rabbit, respectively.

(○) carp S-1, (●) rabbit S-1.

S-1と同値であった。したがって、ここに調製したコイ S-1 は、ウサギの S-1 の場合と同様なアクチンとの相互作用を示すことが推定される。

次に、コイ S-1 とウサギアクチンとの結合比について検討した。その方法は、ウサギの S-1 (または HMM) とアクチンとの結合比を知るために ANDO らが用いた光散乱強度の変化から測定する方法¹³⁾ および、YOSHIDA らが報じた濁度の変化から測定する方法¹⁴⁾ を採用した。すなわち、一定濃度 (1.4 μM) のウサギアクチンを含む溶液に 0~4.0 μM の異なる濃度のコイの S-1 を加え、340 nm の入射光に対して 90° 方向への光散乱強度、または 350 nm における吸光値から濁度を測定した。そして、コイ S-1 およびウサギアクチンの分子量をそれぞれ 1.0 × 10⁵, 4.3 × 10⁴²⁷⁾ として算出した結果を Fig. 12 に示すが、どちらの測定法によってもアクチン 1.4 μM に対して S-1 を 1.4 μM 加えた付近で両者の関係に転移点が認められ、S-1 とアクチンの結合がほぼ最大に達したことが推定された。したがって、従来、ウサギの S-1 で報告されている結合比と同様に、コイ S-1 はアクチンと 1:1 のモル比で結合することを示した。

Fig. 12. Changes in the light scattering and the turbidity upon binding of carp S-1 and rabbit F-actin.

The binding of S-1 and F-actin was performed in the medium containing 0.1 M KCl, 2 mM MgCl₂, 20 mM Tris-maleate (pH 7.5), 1.4 μM actin, and various concentrations of carp S-1. The increment of the light scattering of acto-S-1 solution was measured at an angle of 90° to incident beam of 340 nm with thermo-statted cell at 20°C. The increase in the turbidity of acto-S-1 solution was measured at room temperature, using the absorbance at 350 nm.

(○) Light scattering intensity, (●) Turbidity.

考 察

コイ背肉ミオシンのキモトリブシンに対する感受性は、ウサギのミオシンのそれと比較すると著しく高く、かなり速く消化されて低分子化されることが明らかである。消化温度を下げるとミオシンの消化速度はかき遅くなり、また、生成する S-1 がそれ以上に小分子化する反応も明らかに抑制された。このような事実は、コイのアクチンミオシンをトリブシンで消化して HMM を生成分離する試みの場合も全く同様に認められるものであった。²³⁾ 従来から、コイのミオシンは加熱に対して不安定であり、^{3,4)} その高次構造はウサギのミオシンに比べて脆弱であって、プロテアーゼで攻撃を受けやすいことが推定されているが、^{8,9,17,18)} 本実験の結果はそれを支持するものであった。これは、コイだけではなく多くの魚類の筋肉ミオシンについても言い得ることであって、魚類ミオシンからその ATPase 活性を保っている断片をプロテアーゼによって生成するためには、なるべく緩やかな条件、特に低温下で消化することが重要であると考えられる。ただし、その消化温度と時間については魚種ごとに

検討することが必要であろう。

本研究で調製したコイの S-I 標品は、コイミオシンの ATPase 活性部位の性質を非常によく受けついでおり、さらに、その生化学的諸性質はいずれもウサギの S-1 とよく似ていた。したがって、生体内におけるミオシン ATPase 活性部位の機能は、両者の間でよく似ているのであろうと推定される。また、S-I の ATPase がミオシンの約 2 倍に高まったことや、ウサギの S-1 と同じようなアタチンとの相互作用を示したことは、その調製過程で全く変性を受けなかったことを示すものである。このような優れた生理活性を示す魚類の S-1 を調製したのは本研究が最初である。現在は他の魚種の S-1 についても検討を続けている。

本研究は文部省科学研究費補助金によって行なわれた。ここに記して感謝致します。

文 献

- 1) Y. TONOMURA: Muscle Proteins, Muscle Contraction and Cation Transport, Univ. Tokyo Press, 1972, pp. 27-28.
- 2) 高士令二: 日本誌, **39**, 179-205 (1973).
- 3) J. J. CONNELL: *Biochem. J.*, **80**, 503-509 (1961).
- 4) 木村郁夫・室塚剛志・新井健一: 日本誌, **43**, 315-321 (1977).
- 5) A. HASNAIN, I. KIMURA, K. ARAI, and T. YASUI: *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **44**, 143-148 (1978).
- 6) K. ARAI, A. HASNAIN, and Y. TAKANO: *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **42**, 687-695 (1976).
- 7) 高士令二・室塚剛志・新井健一: 日本誌, **40**, 1033-1041 (1974).
- 8) T. TSUCHIYA and J. J. MATSUMOTO: *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **41**, 1319-1326 (1975).
- 9) I. KIMURA, K. ARAI, and S. WATANABE: *J. Biochem.*, **86**, 1629-1638 (1979).
- 10) 木村郁夫・高城茂展・高橋康弘・新井健一: 日本誌, **45**, 571-581 (1980).
- 11) K. M. NAUSS, S. KITAGAWA, and J. GERGELY: *J. Biol. Chem.*, **244**, 755-765 (1969).
- 12) J. J. CONNELL: *Biochem. J.*, **58**, 360-367 (1954).
- 13) J. A. SPUDICH and S. WATT: *J. Biol. Chem.*, **246**, 4866-4871 (1971).
- 14) M. ONODERA and K. YAGI: *J. Biochem.*, **69**, 145-153 (1971).
- 15) C. H. FISKE and Y. SUBBAROW: *J. Biol. Chem.*, **66**, 375-400 (1925).
- 16) K. WEBER and M. OSBORN: *J. Biol. Chem.*, **244**, 4406-4412 (1969).
- 17) U. K. LAEMMLI: *Nature*, **227**, 680-685 (1970).
- 18) T. ANDO and H. ASAI: *J. Biochem.*, **79**, 1043-1047 (1976).
- 19) M. YOSHIDA and F. MORITA: *J. Biochem.*, **82**, 1135-1145 (1977).
- 20) A. G. GORNALL, S. S. BARDWILL, and M. M. DARID: *J. Biol. Chem.*, **177**, 751-766 (1949).
- 21) F. J. KEZDY and E. T. KAISER: *Methods in Enzymology* (ed. by G. E. PERLMANN and L. LEONARD), Vol. 19, Academic Press, New York, 1970, pp. 73.
- 22) K. YAGI, and F. OTANI: *J. Biochem.*, **76**, 365-373 (1974).
- 23) 高士令二・室塚剛志・新井健一: 日本誌, **40**, 1063-1069 (1974).
- 24) A. HASNAIN, K. SAMEJIMA, and T. YASUI: *Indian J. Experimental Biology*, **17**, 281-284 (1979).
- 25) 木村郁夫・室塚剛志・新井健一: 日本誌, **43**, 795-803 (1977).
- 26) E. EISENBERG and C. MOOS: *J. Biol. Chem.*, **245**, 2451-2456 (1970).
- 27) I. SAKAKIBARA and K. YAGI: *Biochem. Biophys. Acta.*, **207**, 178-183 (1970).