スルメイカミオシン ATPase の酵素的特性

吉 富 文 司*・今 野 久 仁 彦*

(1981 年 9 月 14 日受理)

Enzymatic Properties of Myosin ATPase from Squid
Todarodes pacificus Mantle Muscle

Bunji YOSHITOMI* and Kunihiro KONNO*

Enzymatic properties of squid mantle myosin were studied in terms of Ca-, Mg- and EDTA-ATPase activities under various conditions, and compared with those of rabbit skeletal myosin.

All ATPase activities of squid myosin were very similar to those of rabbit myosin in their pH and KCl concentration dependencies, with the exception of the KCl dependency of the Mg-ATPase activity. Activation energies of all ATPase activities estimated from the ARRHENIUS plot of ATPase activity were found to be identical for myosins from squid and rabbit, with the exception of that of EDTA-ATPase. Squid myosin showed an initial burst liberation of inorganic phosphate (1 mol/mol myosin) in its Mg-ATPase reaction. The LINEWEAVER BURK plots of myosin ATPase activities revealed that the V_{max} values were considerably different, but the K_m values remained the same, for the myosins of the two species. The profile of the ATPase activity of squid myosin against pCMB treatment was remarkably different from rabbit; no initial activation phase was observed in squid myosin.

These results confirmed that the enzymatic properties of squid myosin were similar to those of rabbit myosin in many respects, although a few properties were unique to squid myosin.

著者らは従来軟体動物に属するスルメイカの外套膜筋肉における Ca 制御について研究を行ってきた。^{1,2)} その中で、スルメイカ外套膜筋肉ではミオシン分子に連結した Ca 制御機構が主に作用し、筋収縮の調節を行なっていることを明らかにし、さらにその分子機構についても研究を進めつつある。^{3,4)} しかし、制御系が局在するスルメイカ筋肉ミオシンでも、ATP を水解してエネルギーを利用し、アクチンと相互作用して収縮作用を営む事実には変りはない。従って、ミオシンによる Ca 制御系に関する研究とは別に、スルメイカミオシンの酵素としての性質を研究することが必要である。すでにウサギ骨格筋ミオシンではその活性を測定する際の変化する条件によって、性質の異なる三種の ATPase 活性 [EC 3, 6, 1, 3] に区別されることが知られており、それらは Ca-ATPase, Mg-ATPase, そして EDTA-ATPase 活性と呼ばれている。そこでスルメイカミオシンでもその ATPase の詳細な性質を知る為に、以上述べた Ca-, Mg-そして EDTA-ATPase など三種の ATPase 活性を研究しウサギミオシンのそれらと比較検討することによ

って酵素的性質の特徴を明らかにした。なお著者らは、先報³⁾ でスルメイカ外套膜筋肉からの高純度のミオシン調製法を検討し、その基礎的な性質について研究し、ウサギミオシンに比べて、熱安定性が劣ることの他に、Ca-ATPase 活性と Mg-ATPase 活性が高く、EDTA-ATPase 活性が非常に低いことが一つの特徴であることを、すでに報告したが、本研究ではさらに、これら三種の ATPase 活性に対する pH, KCl 濃度、反応温度、基質濃度、尿素濃度の影響、pCMB の影響などを詳細に比較検討した。

実験方法

スルメイカ外套膜筋のミオシンは、先報に述べた方法³⁾ で調製した。対照のために使用したウサギ骨格筋ミオシンは、CONNELL⁵⁾ の報じた方法を応用して調製した。本研究ではスルメイカミオシンの Ca-ATPase, Mg-ATPase および EDTA-ATPase 活性を測定したが、その反応液組成および条件は実験結果を示した各図表の説明文中に示した。また生成した無機リン酸量は FISKE-

* 北海道大学水産学部生化学教室 (Laboratory of Biochemistry, Faculty of Fisheries, Hokkaido University, Hakodate, Hokkaido 041, Japan).

略語: EDTA, ethylenediamine tetraacetate; pCMB, p-chloromercuribenzoate; ITP, Inosine-5'-triphosphate.

SUBBAROW の変法,⁹⁾あるいは YOUNGBURG-YOUNGBURG の方法で比色定量した。なお、低濃度の ATP 存在下の Mg-ATPase 活性を測定する場合は、ATP 濃度を維持するため、ATP 再生系として 1 mM phosphoenol pyruvate (PEP), 0.04 mg/ml のウサギ骨格筋の pyruvate kinase (EC 4.1.1.49) を共存させ、生成したピルビン酸の量を比色定量した。⁹⁾ タンパク質濃度の測定はビュレット法によって行い、牛血清アルブミンを標準として比色定量した。⁹⁾

結果および考察

イカミオシンおよびウサギミオシンの ATPase 活性の

pH 依存性 イカミオシンの Ca-, Mg-, および EDTA-ATPase 活性の pH 依存性を測定し、結果を Fig. 1A に示す。対照としてウサギミオシンの場合を Fig. 1B に示す。これらによると、イカミオシンの Ca-, および Mg-ATPase 活性は pH 7.5 に極小値を有し、酸性側とアルカリ性側に二つの極大値を示した。また、EDTA-ATPase 活性はアルカリ性側になるに伴って高い値を示した。これらの結果はウサギミオシン ATPase 活性の pH 依存性とよく類似していた。なお、Ca-ATPase 活性の pH 依存性については、土屋ら¹⁰⁾も同じ結果を報告している。

イカミオシンおよびウサギミオシンの ATPase 活性の KCl 濃度依存性 イカミオシンおよびウサギミオシン

Fig. 1. pH dependences of ATPase activities of squid mantle myosin and of rabbit skeletal myosin.

ATPase assay was carried out at 25°C in a reaction medium containing 0.5 M KCl, 1 mM ATP, 5 mM CaCl_2 (○, for Ca-ATPase) 10 mM MgCl_2 (△, for Mg-ATPase), or 5 mM EDTA (□, for EDTA-ATPase) and 25 mM Tris buffer. The buffer used were Tris-maleate for pH 6.0–7.5 and Tris-HCl for pH 8.0–9.0.

(A), squid mantle myosin (B), rabbit skeletal myosin.

Fig. 2. KCl concentration dependences of ATPase activities of squid mantle myosin and of rabbit skeletal myosin.

ATPase assay was carried out at 25°C in a reaction medium containing 25 mM Tris-maleate (pH 7.0), 5 mM CaCl_2 (○, for Ca-ATPase), 10 mM MgCl_2 (△, for Mg-ATPase) or 5 mM EDTA (□, for EDTA-ATPase) and various concentrations of KCl.

(A), squid mantle myosin, (B), rabbit skeletal myosin.

の Ca-, Mg-, および EDTA-ATPase 活性の KCl 濃度依存性を、それぞれ Fig. 2A と 2B に示す。これらによると、イカミオシンの Ca-ATPase 活性は 0.1 M KCl 付近に極大値を有し、KCl 濃度の増大に伴なって低下した。この Ca-ATPase 活性の KCl 濃度依存性は土屋ら¹⁰⁾の報告と一致している。また、Mg-ATPase 活性の極大値は Ca-ATPase より高濃度の 0.4 M KCl 付近にあり、それより高い KCl 濃度では活性は低下した。また、EDTA-ATPase 活性は KCl 濃度の増加に伴なって上昇した。以上三種の ATPase のうち、Ca-, および EDTA-ATPase 活性の結果はウサギミオシンの場合と類似した傾向であったが、Mg-ATPase 活性については、ウサギミオシンの活性は KCl 濃度の上昇に伴なって一方的に低下するだけであり、イカミオシンの場合とは明らかに

異なる結果であった。このイカミオシンの Mg-ATPase 活性の KCl 濃度依存性は、同じ軟体動物に属するホタテガイミオシン Mg-ATPase の場合¹¹⁾とも異なるので、軟体動物に普遍的な特徴ではなく、むしろスルメイカの特徴である。

イカミオシンおよびウサギミオシンの ATPase 活性の温度依存性 Fig. 3A, 3B にはイカミオシンおよびウサギミオシンの Ca-, Mg-, および EDTA-ATPase 活性を、10°C~35°C の間で測定し、それぞれ ARRHENIUS plot した結果を示す。これによると三種の ATPase 活性とも、この温度範囲では直線関係を示し、この直線の勾配より求めた活性化エネルギー (E_a) は、イカミオシンの場合、Ca-ATPase で約 8 kcal/mole, Mg-ATPase で約 16 kcal/mole, EDTA-ATPase で約 8 kcal/mole と

Fig. 3. ARRHENIUS plots of ATPase activities of squid mantle myosin and of rabbit skeletal myosin.

ATPase assay was carried out at various temperatures in a reaction medium containing 0.5 M KCl, 25 mM Tris-maleate (pH 7.0), 1 mM ATP, and 5 mM CaCl_2 ($\circ$, for Ca-ATPase), 10 mM MgCl_2 (Δ , for Mg-ATPase), or 5 mM EDTA ($\square$, for EDTA-ATPase).

(A), squid mantle myosin, (B), rabbit skeletal myosin.

Fig. 4. Effect of urea on ATPase activities of squid mantle myosin and on rabbit skeletal myosin.

ATPase assay was carried out at 25°C in a reaction medium containing 0.5 M KCl, 25 mM Tris-maleate (pH 7.0), 1 mM ATP, 5 mM CaCl_2 ($\circ$, for Ca-ATPase), 10 mM MgCl_2 (Δ , for Mg-ATPase), or 5 mM EDTA ($\square$, for EDTA-ATPase) and various concentrations of urea.

(A), squid mantle myosin, (B), rabbit skeletal myosin.

なった。一方、ウサギミオシンの場合、Ca-ATPase で約 8 kcal/mole, Mg-ATPase で約 16 kcal/mole, EDTA-ATPase で約 18 kcal/mole, であった。すなわち、イカミオシンの EDTA-ATPase 活性の E_a がウサギミオシンのその約 1/2 であることを除いては、その他の結果はほぼ近似していた。

イカミオシンおよびウサギミオシンの ATPase 活性の尿素濃度依存性 イカミオシンおよびウサギミオシンの Ca-, Mg-, および EDTA-ATPase 活性を、種々の濃度の尿素存在下で測定し、その結果 Fig. 4A, 4B をに示した。これによると、イカミオシンでは、0.2 M~0.5 M 尿素の存在で Ca-ATPase および Mg-ATPase 両活性は一旦上昇し、さらに尿素濃度の増加に伴って低下し、1.5 M 尿素付近で完全失活した。一方、EDTA-ATPase 活性は尿素濃度の増加にともなって一方的に低下した。ウサギミオシンでは、三種の ATPase 活性ともにイカミオシンの場合より高い尿素濃度側に極大値を示し、さらに尿素濃度が増加するに伴って活性は低下し、完全失活するのに必要な尿素濃度はイカミオシンのそれよりもかなり高く、約 4 M 付近であった。この結果、イカミオシンの ATPase 活性中心に対する尿素の作用は、ウサギミオシンのそれに対する場合とほぼ同じであるが、イカミオシンの活性中心が不安定であるため、低濃度の尿素によって完全失活がおこると推定される。先に述べたように、イカミオシンがウサギミオシンに比べて熱安定性が劣ることは、イカミオシンそれ自体の構造が不安定であるという事実を支持している。

イカミオシン Mg-ATPase によるリン酸の初期突発量 ウサギミオシンでは、ATP を分解するときの反応経路についてかなりよく理解されるようになっているが、そ

の反応経路上の重要な中間体の一つに M_{ADP}^{ADP} (または、 $M \sim Pi$ (ADP) と表わす) がある。この中間体では ATP が無機リン酸 (Pi) と ADP に分解しているが、ミオシンと付着している状態となっている。ただし、この Pi はトリクロル酢酸 (TCA) や過塩素酸 (PCA) によってミオシンから遊離するので、Mg-ATPase 活性を測定す

Fig. 5. Time course of Pi liberation by squid myosin Mg-ATPase.

ATPase assay was carried out at 1°C in a reaction medium containing 0.5 M KCl, 25 mM Tris-maleate (pH 7.0), 1 mM ATP, 10 mM $MgCl_2$ and 7.55 mg/ml of myosin. Pi liberation was determined by the method of YOUNGBURG and YOUNGBURG, after termination of reaction by adding 5% TCA as a final concentration. The amount of Pi burst was estimated by extrapolating the steady state rate of Pi liberation to zero time of reaction.

Table 1. Kinetic parameters of Ca-, Mg- and EDTA-ATPase of squid mantle myosin and of rabbit skeletal myosin.

ATPase assay was carried out at 25°C in a reaction medium containing 0.5 M KCl, 25 mM Tris-maleate (pH 7.0), 5 mM $CaCl_2$ (○, for Ca-ATPase), 10 mM $MgCl_2$ (△, for Mg-ATPase) or 5 mM EDTA (□, for EDTA-ATPase) and various concentrations of ATP (100 μM –1000 μM for Ca-ATPase, 50 μM –100 μM for EDTA-ATPase, and 1 μM –10 μM for Mg-ATPase). In Mg-ATPase assay, 1 mM phosphoenol pyruvate and 0.04 mg/ml of pyruvate kinase were further added to maintain ATP concentration in the medium. K_m and V_{max} were estimated from the LINEWEAVER-BURK plots of these data.

		Squid		Rabbit	
		V_{max} (μmol Pi/min · mg)	K_m (μM)	V_{max} (μmol Pi/min · mg)	K_m (μM)
Ca	ATP	2.22	200	0.77	200
	ITP	1.33	1000	2.5	1000
Mg	ATP	0.20	0.44	0.02	0.44
	ITP	0.20	3.0	0.05	3.0
EDTA	ATP	0.05	220	0.77	220
	ITP	nil	nil	nil	nil

る際に反応を停止させるために酸を添加すると、反応が定常状態に入る前の非常に早い時期に、リン酸の突発的な放出が起ったように見える。これは初期突発と呼ばれている。¹³⁾ そこでイカミオシン Mg-ATPase の反応においても、この反応中間体、 M_{Pi}^{ADP} が生成するか否かを知る目的で、初期突発量を測定した。すなわち、ミオシンを含む反応組成液 (10 mM $MgCl_2$, 0.5 M KCl, pH 7.5) を $1^\circ C$ をに保ち、これに 1 mM ATP を吹き込み、すばやく攪拌し、経時的に TCA を吹き込んで反応を停止させ、濾液中に遊離した無機リン酸を YOUNGBURG 法⁷⁾ で比色定量した。その結果を Fig. 5 に示す。それによると、反応開始後 5~60 秒の間はリン酸生成量と反応時間との間に直線関係が成り立つが、この直線を反応時間 0 秒に外挿すると、無機リン酸の初期突発量が求められる。その値はイカミオシンの分子量を 4.8×10^5 と仮定すると、1 分子当り 1 mol のリン酸に相当する値になり、イカミオシンの場合も、ウサギミオシンと同様に、ATP 分解過程において M_{Pi}^{ADP} 複合体が生成することが示唆された。

イカミオシンおよびウサギミオシンの ATPase 活性の基質濃度依存性 イカミオシンの Ca-, Mg-, および EDTA-ATPase 活性の基質濃度依存性を検討した。まず、種々濃度の ATP (Ca-ATPase では $100 \mu M \sim 1000 \mu M$, Mg-ATPase では $1 \mu M \sim 10 \mu M$, EDTA-ATPase では $50 \mu M \sim 1000 \mu M$) 存在下でミオシン ATPase 活性を測定し、ATPase 比活性を求めて、ATP 濃度に対して LINWEAVER-BURK plot した。その結果、上記の ATP 濃度範囲では、いずれの場合も直線関係が得られた。この直線の両軸接点から求めた基質との見かけの親和力の

逆数 K_m と最大活性 V_{max} を Table 1 に示した。また、同時に測定したウサギミオシンの結果も示す。これによると、イカミオシンの Ca-, および EDTA-ATPase では K_m はほぼ等しく $200 \mu M$ であるが、Mg-ATPase では親和力が大きく K_m は $0.44 \mu M$ であった。また、この三種の ATPase の K_m の値は、ウサギミオシンのそれらとほぼ近似している。一方、 V_{max} に関しては、ウサギミオシンの値に比べてイカミオシンの Ca-ATPase が約 3 倍、Mg-ATPase が約 10 倍、EDTA-ATPase では約 1/15 倍となり、両者はかなり異なっていた。したがってこの結果から、イカミオシンおよびウサギミオシンに対する ATP の結合は両者ほぼ等しいが、ATP 分解反応過程における律速段階の反応速度が両者の間で異なっているように思われる。さらに推測すると、イカとウサギの間の種 (species) の相違さらに両者の筋肉の運動性の相違にも関連していると思われる。事実このことは、ATP の代りに ITP を用いて求めた ITP に対するイカミオシンおよびウサギミオシンの K_m からも支持された。つまり、イカミオシンおよびウサギミオシンと ITP との間の K_m では差はほとんどなく、両ミオシン共に Mg-ITPase の K_m が $3.0 \mu M$ と小さく、Ca-ITPase の K_m が $1000 \mu M$ と大きかった。一方、 V_{max} に関してはウサギミオシンの値に比べてイカミオシンの Ca-ITPase が約 1/2 倍、Mg-ITPase が約 4 倍であった。なお、EDTA-ATPase 活性はイカミオシン、ウサギミオシン共に検出されなかった。

イカミオシンおよびウサギミオシンの ATPase 活性におよぼす pCMB の影響 すでに、SEKINE^{18,44)} らによれば、ウサギミオシンの ATPase 活性中心近傍にあ

Fig. 6. Effect of pCMB on ATPase activities of squid mantle myosin and of rabbit skeletal myosin.

Myosin was preincubated with various concentrations of pCMB at $0^\circ C$ overnight. ATPase assay was carried out at $25^\circ C$ in a reaction medium containing 0.5 M KCl, 25 mM Tris-maleate (pH 7.0), 1 mM ATP, and 5 mM $CaCl_2$ (○, for Ca-ATPase), 10 mM $MgCl_2$ (△, for Mg-ATPase) or 5 mM EDTA (□, for EDTA-ATPase).

(A), squid mantle myosin, (B), rabbit skeletal myosin.

る特異的な SH 基 (SH_1 と呼ぶ) が修飾されると、ミオシン ATPase の性質が影響を受けることが報じられている。そこでイカミオシンの ATPase 活性中心にも、同じような SH 基が存在するかどうかを検討した。すなわち、イカミオシンの種々の濃度の pCMB と氷冷下で一晩反応させた後、その Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、および EDTA-ATPase 活性を測定した。その結果を Fig. 6 に示した。これによるとイカミオシンでは上記三種の ATPase 活性はともに、pCMB 濃度の増加にともなって低下し、 10^6 g ミオシンあたり $4 \sim 5 \text{ mol}$ の pCMB の添加によっていずれも完全に失活した。一方、ウサギミオシンの場合は、すでに知られているように、 Ca^{2+} 、および Mg^{2+} -ATPase 活性の変化では pCMB の増加にともなって一旦活性化が起こり、次に失活するという二相性を示した。ただし、EDTA-ATPase 活性は pCMB 濃度の増加にともなって一方的に失活するのみであった。以上の事実をウサギミオシンや魚のミオシンで知られている結果^{14,15)}と比べてみると、イカミオシンは明らかに異なり、 Ca^{2+} 、および Mg^{2+} -ATPase の活性化に関与している SH_1 に相当する SH 基がイカミオシン中には存在しないことを示唆している。同じような実験結果はホタテミオシン¹¹⁾およびアワビミオシン¹⁰⁾についても報告されており、軟体動物のミオシンの特徴の一つではないかと考えられる。しかしながら、イカミオシンの SH_1 がなんらかの理由で最初から修飾されていたり、変性による構造変化によって影響を受けている場合も考えられる。このような場合には Ca^{2+} -ATPase の活性化はあらためて起らないからである。このことに関し、 SH_1 がすでに修飾されているミオシンでは、その Ca^{2+} -ATPase 活性の温度依存性から求めた活性化エネルギー (E_a) は SH_1 が修飾を受ける前に比べて大きくなるという事実^{13,10)}が報告されている。しかし、本研究で使用したイカミオシンの Ca^{2+} -ATPase 活性の温度依存性から求めた E_a は、ウサギミオシンの場合の E_a と良く近似している (Fig. 4)、イカミオ

シンの SH_1 がすでに修飾されていたり、あるいは変性していたりする可能性は極めて小さいと考えられる。以上述べたイカミオシン ATPase の pCMB に対する挙動は土屋らの報告している結果¹⁰⁾と異なっている。

なお、本研究は文部省科学研究費補助金によって行われたので、記して感謝します。

文 献

- 1) K. KONNO: *J. Biochem.*, **84**, 1431-1440 (1978).
- 2) K. KONNO, K. ARAI, and S. WATANABE: *J. Biochem.*, **86**, 1639-1650 (1979).
- 3) 木村郁夫・吉富文司・今野久仁彦・新井健一: 日水誌, **46**, 885-892 (1980).
- 4) 今野久仁彦・吉富文司: 日水誌, **47**, 133-138 (1981).
- 5) J. J. CONNELL: *Biochem. J.*, **58**, 360-367 (1954).
- 6) C. H. FISKE and Y. SUBBAROW: *J. Biol. Chem.*, **66**, 375-400 (1925).
- 7) G. E. YOUNGBURG and M. V. YOUNGBURG: *J. Lab. Clin. Med.*, **16**, 158-166 (1930).
- 8) A. M. REYNARD, L. F. HAAS, D. D. JACOBSEN, and P. D. BOYER: *J. Biol. Chem.*, **236**, 2277-2291 (1961).
- 9) A. G. GORNALL, C. T. BARDWILL, and M. M. DAVID: *J. Biol. Chem.*, **177**, 751-766 (1949).
- 10) T. TSUCHIYA, N. YAMADA, and J. J. MATSUMOTO: *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **44**, 181-184 (1978).
- 11) 浅川哲弥: 北海道教育大学紀要, 第 30 巻, 第 2 号, 249-270.
- 12) T. KANAZAWA and Y. TONOMURA: *J. Biochem.*, **57**, 604-615 (1965).
- 13) T. SEKINE and W. W. KIELLY: *Biochem. Biophys. Acta*, **81**, 336-345 (1964).
- 14) M. YAMAGUCHI, T. NAKAMURA, and T. SEKINE: *Biochem. Biophys. Acta*, **328**, 154-165 (1973).
- 15) 室塚剛志: 日水誌, **45**, 1503-1512 (1979).
- 16) N. AZUMA, A. ASAKAWA, and K. YAGI: *J. Biochem.*, **77**, 973-981 (1975).