ティラピア・ミオシンの加熱初期に起るフィラメント形成能と 生化学的活性の変化

松浦 基・吉岡 武也・田中 晴生・新井 健一

(1985 年 5 月 13 日受理)

Changes in Some Biochemical Activities and Filament Forming Ability of Tilapia Myosin during Heat Treatment

Motoi MATSUURA,*¹ Takeya YOSHIOKA,*¹ Haruo TANAKA*^{1,*2}, and Ken-ichi ARAI*¹

Changes in some biochemical activities and filament formation ability of tilapia myosin during heat treatment were studied.

The Mg-ATPase activity and superprecipitation activity of tilapia actomyosin constituent, increased in the very early period of heat treatment of tilapia myosin. On the other hand, tilapia heavy-meromyosin (HMM) showed a decreasing Mg-ATPase activity in the presence of actin, as the time of heating was prolonged.

Electron microscopy revealed that the filaments of tilapia untreated myosin were much shorter than those of rabbit untreated myosin, and filaments of tilapia myosin became thicker and longer in the early period of heat treatment.

On the basis of these findings, it was strongly suggested that the changes in actin-activated Mg-ATPase and superprecipitation activities of tilapia actomyosin are closely correlated with those in the physiological state of myosin filaments.

先に木村らはウサギ・ミオシンの熱変性について詳細な研究を行った結果、ミオシンを加熱するとその極めて早い時期に、アクチンを加えて再構成したアクトミオシンの Mg-ATPase 活性及び超沈殿活性が急速に低下し、同時にミオシンの分子集合能が変化する事を見出した。¹⁾さらに、この変化はウサギミオシンだけではなく、カツオ、コイ、ニジマスなどの魚類背筋ミオシンの加熱処理の場合にも起ることを認めた。²⁾

最近、著者らはより多種類にわたる魚類の背筋ミオシンについて同様な加熱処理を行った結果、上記の場合とは異なるアクトミオシン Mg-ATPase 活性の変性様式を示す魚類ミオシンが存在することを見出した。すなわち、サバ、イワシ、カレイ、ヒラメ、及びティラピアの背筋のミオシンを加熱すると、再構成したアクトミオシンの Mg-ATPase 活性は、初期に一旦増加し、続いて初めは急速に、その後は緩慢に減少する反応様式を示した。そこで本研究では、特にティラピア・ミオシンをその代表例として、上記の変性反応を明らかにするために検討を加えた。

実験方法

ウサギ Rabbit *Oryctolagus cuniculus* のミオシンは CONNELL の方法³⁾に準じて 5 mm MgCl₂-ATP を含む 0.45 M KCl, 50 mm リン酸 buffer (pH 6.4) で抽出した。ティラピア *Tilapia nilotica* のミオシンは先に報じた方法⁴⁾に従って調製した。また、ティラピア H-メロミオシン (HMM) は KIMURA らの報じた消化条件⁵⁾を用いて調製した。

ウサギ骨格筋アクチンは SPUDICH と WATT の方法⁶⁾に従って調製した。

ミオシン及び HMM の加熱変性は 4~10 mg/ml の蛋白濃度で 0.5 M KCl, 20 mm Tris-maleate (pH 7.5) 溶液中で行った。加熱処理中に経時的にその一部を取り出し、氷水中に浸漬して反応を停止させた後、諸性質の測定に供した。

ATPase 活性を測定する反応条件は、図表の説明文中に示したが、ATP を含む反応混液にミオシンまたは HMM を添加して 25°C で反応を始め、経時的にその一定量を取り出し、終濃度 5% の HClO₄ を加えて反応

*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, Hokkaido 041, Japan).

*² 現所属: 味の素株式会社中央研究所 (Present address: Applied Research Dept. Central Research Laboratories, Ajinomoto Co., Inc., Suzukicho, Kawasaki 210, Japan).

を止め、生成した無機リン酸を YOUNGBURG-YOUNGBURG 法⁷⁾または FISKE-SUBBAROW 法の変法⁸⁾によって比色定量し、比活性は ($\mu\text{mol Pi/min}\cdot\text{mg}$ of protein) の単位で表わした。

超沈殿活性を測定する反応条件は、図表の説明文中に示したが、アクトミオシン懸濁液に ATP を添加して 25°C で反応を始め、550 nm における吸光値の変化を恒温セルを備えた島津分光光度計 UV-210 A で記録した。

ミオシンの thick filament は、高橋の方法⁹⁾に従って形成させた。すなわち、氷冷したミオシンの 0.5 M KCl, 20 mM Tris-maleate (pH 7.0) 溶液に対して 4 倍量の冷 20 mM Tris-maleate (pH 7.0) 溶液を徐々に加え、KCl 濃度を 5 分間かけて 0.1 M に調節した。ミオシンの thick filament の電子顕微鏡による観察は HUXLEY の方法¹⁰⁾に従い、炭素蒸着したグリッド上にミオシン懸濁液をのせ、2% 酢酸ウランを用いミオシンの thick filament をネガティブ染色後、75 kV で日立電子顕微鏡 HU-12 によって観察した。

蛋白質濃度の測定はビュレット法¹¹⁾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。

実験結果

ミオシンを加熱処理した時のアクトミオシン Mg-ATPase 活性の変化 ティラピア及び対照としてウサギのミオシンを 30°C において加熱した。加熱処理したミオシンに未加熱のウサギ F-アクチン (ミオシンに対して 1/2 重量) を加えて再構成したアクトミオシンの Mg-ATPase 活性を測定し、加熱時間と活性の関係を Fig. 1 に示した。

Fig. 1 によると、ウサギのミオシンの場合、アクトミオシンの Mg-ATPase 活性は加熱初期に早く、後期には遅い速度の二段階の減少を示した。しかし、ティラピアのミオシンの場合は、ウサギのミオシンの場合とは異なり、そのアクトミオシン Mg-ATPase 活性は加熱の初期に一時的に増加して 9 分後に最大活性に達し、その後急速に、続いてゆっくりと減少する三段階の反応から成ることを示した。*

HMM を加熱処理する時に起るアクト HMM Mg-ATPase 活性の変化 低イオン強度溶液中でフィラメントを形成する能力を持たないミオシンの活性分子断片である HMM を、ミオシンの場合と同じく、0.5 M KCl, 20 mM Tris-maleate (pH 7.5) 溶液中で 30°C で加熱処理した。加熱処理した HMM に未加熱のウサギ F-アクチン (HMM に対して 1/2 重量) を加え、アクト-HMM の Mg-ATPase 活性を測定し、加熱時間と活

Fig. 1. Changes induced by heat treatment of rabbit and tilapia myosins in Mg-ATPase activity of both actomyosin constituted.

Rabbit myosin ($\square$) and tilapia myosin ($\circ$) were incubated at 30°C in a medium containing 0.5 M KCl and 20 mM Tris-maleate (pH 7.5). Mg-ATPase activity was measured at 25°C in a medium containing 30 mM KCl, 1 mM MgCl_2 , 25 mM Tris-maleate (pH 7.0), 1 mM ATP, and 0.1 mg/ml of rabbit myosin plus 0.05 mg/ml of rabbit F-actin or 0.2 mg/ml of tilapia myosin plus 0.1 mg/ml of rabbit F-actin.

Fig. 2. Change induced by heat treatment of tilapia HMM in Mg-ATPase activity of actomyosin.

Tilapia HMM was incubated at 30°C in a medium containing 0.5 M KCl and 20 mM Tris-maleate (pH 7.5). Mg-ATPase activity was measured at 25°C in a medium containing 30 mM KCl, 1 mM MgCl_2 , 25 mM Tris-maleate (pH 7.0), 1 mM ATP, and 0.2 mg/ml of tilapia HMM plus 0.1 mg/ml of rabbit F-actin.

性の関係を Fig. 2 に示した。

Fig. 2 によると、ティラピアの HMM を加熱すると、アクト-HMM の Mg-ATPase 活性は単純な一次反応様式に従って減少し、アクトミオシン Mg-ATPase 活性の場合にみられた加熱初期の活性の一時的な増加は認

* 田中晴生・今野久仁彦・木郁村夫・新井健一：昭和 56 年度日本水産学会春季大会講演要旨集，p. 197.

Fig. 3. Changes induced by heat treatment of tilapia myosin in superprecipitation of actomyosin constituted.

Tilapia myosin was incubated at 30°C in a medium containing 0.5 M KCl and 20 mM Tris-maleate (pH 7.5). Superprecipitation was induced at 25°C by adding 0.5 mM ATP to actomyosin suspension in 30 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$, 25 mM Tris-maleate (pH 7.0). Actomyosin was reconstituted by 0.2 mg/ml of tilapia myosin and 0.1 mg/ml of rabbit F-actin. Numbers in parenthesis indicated the time durations (min.) of heat treatment.

められなかった。なお、図示しないが、ウサギのHMMを加熱する時も全く同じ傾向の結果が得られた。

従って、ティラピア・ミオシンを加熱するとき、再構成アクトミオシン Mg-ATPase 活性に起る変化は、ミオシンの酵素活性部位に起る変化の単なる反映ではなく、ミオシンのフィラメント形成能が強く係っている変

化と推定される。

ミオシンを加熱処理した時のアクトミオシンの超沈殿能の変化 Fig. 1 の実験と同じ条件においてティラピアのミオシンを加熱し、再構成アクトミオシンの超沈殿能の経時変化を検討した。

Fig. 3 に示したように、ティラピアのミオシンを加熱処理すると、その初期の3分後までは超沈殿能はほとんど変わらないが、その後加熱9分後までは超沈殿能が一旦強くなり、それ以上加熱時間が長くなると、こんどは弱まる傾向が認められる。この変化の傾向は同じ加熱ミオシンで再構成したアクトミオシン Mg-ATPase 活性の経時変化と極めて似た傾向であり、2つの生化学的活性の変化がある程度良く対応していることを示している。また、以上の結果は ATP 濃度を 0.5 から 0.2 mM に減少させても同じである。

なお図示はしないが、ウサギのミオシンを加熱した場合は、加熱に伴って再構成アクトミオシンの超沈殿能は初期に速く、その後は遅い2段階で経時変化をしている。¹⁾

以上の結果は、ミオシンを加熱するとき、その初期にはミオシンのフィラメント形成能の変化が起るという先の推論¹⁾をさらに支持するものと考えられる。

加熱によるミオシン Mg-ATPase 活性のアクチン濃度依存性の変化 Fig. 1 の実験と同じ条件において、ティラピアのミオシンを加熱し、経時的に一部を取り出し、それぞれのミオシン Mg-ATPase 活性のアクチン濃度依存性を検討した。

Fig. 4. Effect of actin concentration on the changes induced by heat treatment of tilapia myosin or HMM in actin-activated Mg-ATPase activity.

(A) Tilapia myosin was incubated at 30°C for 0 (○), 3 (□), 6 (△), 9 (▽), 15 (---), and 25 (—) min in a medium containing 0.5 M KCl and 20 mM Tris-maleate (pH 7.5). Mg-ATPase activity of myosin was measured at 25°C at various concentrations of rabbit F-actin as described in Fig. 1.

(B) Tilapia HMM was incubated at 30°C for 0 (○), 9 (△), 15 (▽), and 35 (□) min in a medium containing 0.5 M KCl and 20 mM Tris-maleate (pH 7.5). Mg-ATPase activity of HMM was measured at 25°C at various concentrations of rabbit F-actin as described in Fig. 2.

Fig. 4-A に示したように、加熱前のティラピア・ミオシンの Mg-ATPase 活性はアクチンによる活性化が弱く、ミオシンと等量のアクチンを加えても活性は飽和しないが、加熱 3 分後にはアクチンによる活性化がやや強まり、高い活性値を示すようになった。さらに加熱時間が長くなると活性化は一層強まる傾向を示し、また、加熱 9 分後のミオシンの Mg-ATPase 活性は約 1/4 量のアクチンによって飽和する傾向を示すように変化した。なお、加熱時間が 9 分以上になると、活性が飽和するのに必要なアクチン量は 9 分間加熱の場合と変わらないが、活性値は低下していく傾向を示すようになった。

一方、対照のために、ティラピアの HMM を用いて同じ加熱実験を行った結果を Fig. 4-B に示した。これらによると、未加熱の HMM の Mg-ATPase 活性のアクチンによる活性化は弱く、等量のアクチンを加えても活性は飽和しないが、この結果は加熱しても全く変化せず、活性値が低下していく傾向のみを示した。

なお、Fig. 4 と同じ実験をウサギ・ミオシンを用いて行い、結果を Fig. 5 に示した。ウサギのミオシンの場合は、加熱前のミオシンの Mg-ATPase 活性のアクチンによる活性化が非常に強く、1/4 量のアクチンの添加でその活性が飽和することを示している。また、ミオシンを加熱すると、活性が飽和するのに必要なアクチン量はほとんど変化しないままで、加熱時間に伴って活性値が低下する傾向を示した。この結果は、Fig. 4-A に示した加熱 9 分以後に起るティラピア・ミオシン Mg-ATPase 活性のアクチン濃度依存性の変化と良く似てい

る。従って、ティラピアのミオシン Mg-ATPase 活性のアクチンによる活性化が弱いことと、ミオシンの加熱初期に活性のアクチン濃度依存性がウサギのミオシンの場合とは異なる変化を示すのは、おそらく、ティラピアのミオシンに固有の特徴であり、その原因はミオシンの加熱初期においてフィラメント形成能が強まるような変化が起ったためと推定される。

加熱によりティラピア・ミオシンが形成するフィラメントの電子顕微鏡像の変化 0.1 M KCl, pH 7.0 の条件下でティラピアのミオシンが形成するフィラメントの電子顕微鏡像をウサギ・ミオシンの場合と比較した結果を前報¹²⁾において示した。すなわち、ティラピアのミオシンフィラメントはウサギのミオシンフィラメントに比べて、その太さは変わらないが、長さは約 1/3 にすぎず、214 個のフィラメントについて比べると、ウサギ・ミオシンは平均長 1.49 μm なのに対し、ティラピア・ミオシンの平均長は 0.56 μm であった。

次に、ティラピア・ミオシンを Fig. 1 と同じ条件下で加熱してからフィラメントを形成させ、その電子顕微鏡写真を撮り、Fig. 6 に示した。これによると、加熱 3 分後にはミオシンフィラメントのサイズはほとんど変わらないが、加熱時間が 6 分になると一部のフィラメントが末端及び側面で相互に会合して太く長くなる事実が見出された。さらに、加熱時間が 9 分になると太く長いフィラメントの形成が顕著になり、未加熱のミオシンのフィラメントに比べて太さは最大のもので約 2 倍、長さも最長のもので約 2.7 倍となり、ウサギのミオシンフィラメントに匹敵するようなサイズのフィラメントを形成することを示した。しかし、加熱時間が 15—25 分になると形成するフィラメントは未加熱のフィラメントよりもむしろ細く短かく、しかも形のくずれた凝集体を形成するようになった。また、このような凝集体はさらに不規則に集合して異常に大きな凝集塊を形成する傾向を示した。なお、結果は図示しないが、前報で述べた方法¹²⁾によってミオシンフィラメントの超遠心沈降図及び沈降速度、あるいは光散乱強度を検討した結果も、電子顕微鏡観察の結果を良く支持していた。

以上の実験で見出した加熱 9 分以後に起るティラピア・ミオシンのフィラメント形成能の変化は、ウサギのミオシンを加熱するときその初期に起るフィラメント形成能の変化と極めて良く似ている。一方、加熱する前のティラピアのミオシンが形成するフィラメントは、ウサギ・ミオシンのフィラメントに比べてそのサイズは小さいが、加熱をするとその初期には全体にそのサイズが大きくなり、あたかもフィラメント形成能が強くなり、ウサギのミオシンフィラメントのサイズに近似したサイズになる。この事実は、同じ条件下で加熱処理するとき起

Fig. 5. Effect of actin concentration on the changes induced by heat treatment of rabbit myosin in actin-activated Mg-ATPase activity.

Rabbit myosin was incubated at 35°C for 0 (○), 4.5 (△), and 9 (□) min in a medium containing 0.5 M KCl and 20 mM Tris-maleate (pH 7.5). Mg-ATPase activity of myosin was measured at 25°C at various concentrations of rabbit F-actin as described in Fig. 1.

Fig. 6. Electron microscopic changes in tilapia myosin filaments, as caused by heat treatment of tilapia myosin.

Tilapia myosin was incubated at 30°C for 0 (A), 3 (B), 6 (C), 9 (D), 15 (E), and 25 (F) min in a medium containing 0.5 M KCl and 20 mM Tris-maleate (pH 7.5). After the heat treatment, KCl concentration was slowly (taking 5 min) reduced by adding 20 mM Tris-maleate (pH 7.0). The myosin suspensions thus obtained were negatively stained with 2% uranyl acetate, and examined under an electron microscope. Bar indicates 0.5 μ m in all figures.

るティラピアのミオシンの Mg-ATPase 活性のアクチンによる活性化及び再構成アクトミオシンの超沈殿能の変化と極めて良く対応している。従って、これらの結果は、ミオシンのフィラメント形成能が、Mg-ATPase 活性のアクチンによる活性化や再構成アクトミオシンの超沈殿能のような生化学的活性と強く係っているとした前報の結果¹²⁾を支持するものである。

考 察

著者らは前報¹²⁾において、ティラピアのミオシンMg-ATPase 活性のアクチンによる活性化が著しく弱く、アクチン量を増加しても活性が飽和しないのは、ミオシンのフィラメント形成能が弱く、フィラメントの長さがウサギのミオシンフィラメントの約1/3にすぎないことと強く係っていると推論した。また、ウサギ・ミオシンを

加熱処理するとき、その初期にフィラメント形成能に異常を生じ、フィラメントは細く、かつ、短くなる事実を認めている。¹⁾ 従って、ティラピアの加熱しないミオシンが形成する短いフィラメントも、ミオシンの調製中になんらかの原因で起った変性に基づく生成物であることが懸念される。しかし、ウサギのミオシンを加熱しても、その Mg-ATPase 活性のアクチンによる活性化の様式は、ティラピアの加熱しないミオシンの Mg-ATPase 活性のアクチンによる活性化の様式のように変化することはなく、また、ティラピアのミオシンを加熱すると、その初期にはミオシンが形成するフィラメントはむしろ太く長くなり、ウサギの加熱しないミオシンが形成するフィラメントのサイズに近似してくる。これらを考慮すると、ティラピアの短いミオシンフィラメントは単なる変性の産物として説明できないものである。

ティラピアのミオシンを 30°C で加熱処理すると、ミオシンの Mg-ATPase 活性のアクチン活性化は、ウサギ・ミオシンの場合とは異なり、加熱初期に一旦増加し、9 分後に最大値に達しその後は減少する結果を示したが、この経時変化は加熱したミオシンから再構成したアクトミオシンの超沈殿活性においても認められた（加熱した HMM から再構成したアクト-HMM の Mg-ATPase 活性では認められない）。しかも、加熱処理したミオシンのフィラメントの電子顕微鏡像についても同様な経時変化が起り、太く長いフィラメントが形成するのは 9 分加熱したミオシンであった。この結果は、ミオシンのフィラメント形成能がその生化学的活性と密接に係っていることを示唆していると同時に、ティラピア・ミオシンの加熱変性は、ウサギ・ミオシンの場合とは異なる中間生成物を経て進行することを示している。

ティラピア・ミオシンの加熱温度を 25°C から 33°C までの間で変えて、アクトミオシン Mg-ATPase 活性の経時変化を測定すると、温度が高いほど活性の一時的な増加が、加熱のより早い時期に起ることを示した。すなわち、活性値が最大になる時間は、25°C では 20 分 30°C では 9 分、そして 33°C では 6 分であった（結果は図示しない）。一方、ミオシンの Ca-ATPase 活性を別に測定したところ、温度が高いほどその変性速度は急速になるが、特に 25°C では 20 分までほとんど失活しないことを示した。従ってこのことからアクトミオシン Mg-ATPase 活性に起る変化は、単なるミオシンの酵素活性部位に起る変化の反映でなく、おそらくミオシンの他の部位に起る別の変性反応であることを推定させる。

加熱したウサギ・ミオシンから再構成したアクトミオシン Mg-ATPase 活性を異なる pH で測定すると、活性の経時変化が著しく異なる様式を示す事実は既に知られており、これは pH の影響を受けて形成されるミオシ

ンフィラメントのサイズが異なる（微酸性で太く長いフィラメントを作る¹³⁾）ためであると考えられる。そこで、加熱したティラピア・ミオシンの場合も Mg-ATPase 活性を pH 6.3 において測定し、経時変化を検討した。その結果は図示しないが、pH 7.0 で測定した活性の経時変化 (Fig. 1) とは異なり、pH 6.3 で測定した場合は加熱初期における一時的な活性増加が認められなくなり、まず、初期に急速に低下し、その後はゆっくりと低下する二段階の経時変化を示すようになった。これはむしろウサギのミオシンを加熱して同上活性を pH 7.0 で測定した結果と良く似ている。しかも、加熱したティラピア・ミオシンを用いて構成したアクトミオシンの超沈殿能の経時変化も測定時の pH (7.0~6.3) を変えて検討すると、アクトミオシン Mg-ATPase 活性の変化と傾向的に全く同じ結果を示した。従ってティラピア・ミオシンのフィラメント形成能は微酸性の場合に比べて中性で弱く、それが再構成アクトミオシンの Mg-ATPase 活性や超沈殿能などの生化学的活性が弱い事実と強く係っているというように考えられる。

謝 辞

本研究を遂行するに当り、懇切な御指導を賜った群馬大学工学部渡辺静雄教授に深謝します。

また、ティラピアを御分与下さった大沼淡水魚センターの斉藤小三郎氏、また、飼育をしていただいた本学生理生態学講座の斉藤節郎氏に謝意を表します。

この研究は文部省科学研究費補助金によったのでここに併せて感謝します。

文 献

- 1) I. KIMURA, K. TAKAHASHI, K. ARAI, and S. WATANABE: *J. Biochem.*, **88**, 1703-1713 (1980).
- 2) 田中晴生・木村郁夫・新井健一・渡辺静雄: 日水誌, **48**, 445-453 (1982).
- 3) J. J. CONNELL: *Biochem. J.*, **58**, 360-367 (1957).
- 4) 碓谷敏紀・木村郁夫・新井健一: 日水誌, **47**, 947-955 (1981).
- 5) I. KIMURA, K. ARAI, and S. WATANABE: *J. Biochem.*, **86**, 1629-1638 (1979).
- 6) J. A. SPUDICH and S. WATT: *J. Biol. Chem.*, **245**, 4866-4871 (1971).
- 7) G. E. YOUNGBURG and M. V. YOUNGBURG: *J. Lab. Clin. Med.*, **16**, 58-166 (1930).
- 8) C. H. FISKE and Y. SUBBAROW: *J. Biol. Chem.*, **66**, 375-400 (1925).
- 9) 高橋興成: 蛋白質・核酸・酵素, **12**, 61-67 (1976).
- 10) H. E. HUXLEY: *J. Mol. Biol.*, **7**, 281-308 (1963).
- 11) A. G. GORNALL, C. J. BARDWILL, and M. M. DAVID: *J. Biol. Chem.*, **177**, 751-766 (1949).
- 12) 松浦 基・新井健一: 日水誌, **51**, 1697-1704 (1985).
- 13) I. KATSURA and H. NODA: *J. Biochem.*, **69**, 219-229 (1971).