魚類ミオシン B より中性塩の存在下で解離するアクチンの定量

若目田 篤・新井 健一

(1984 年 8 月 4 日受理)

The Amount of Actin Portion Dissociated from Myosin B
in the Presence of NaCl

Atsushi WAKAMEDA* and Ken-ichi ARAI*

When myosin B was kept at 2–30°C in a medium containing 40 mM Tris-maleate (pH 7.0) and 0.3–2.0 M NaCl, soluble proteins in a medium of low ionic strength (50 mM KCl, pH 7.0) increased. SDS-polyacrylamide gel electrophoretograms exhibited that there was a large amount of actin in this soluble fraction. The relative amount (%) of soluble actin on the basis of actin content in native myosin B was then estimated by a staining density on the gel rod.

It was found that the amount of actin dissociated from myosin B increased as the treatment with NaCl proceeded. Thus, the maximum liberation of actin amounted to approximately 60% within 1–2 h upon addition of 2 M NaCl (for carp) or 1 M NaCl (for white croaker). It was also found that the actin component in such a soluble form does not show activating effect on myosin Mg-ATPase nor inhibiting effect on myosin EDTA-ATPase.

Based on the above findings, we confirmed that actin portion of white croaker myosin B is more sensitive to NaCl compared to that of carp myosin B.

著者らは、魚類筋原繊維たんぱく質に及ぼす中性塩、特に NaCl の影響を研究し、以下のような結果を先に報じた。すなわち、筋原繊維たんぱく質の Ca-ATPase の変性速度および粘度の低下の速度と度合は、塩濃度の増加に伴って全般に増加する傾向を示した。^{1,2)} また、コイとグチの筋原繊維たんぱく質について、上記の性質の変化速度を比較すると、0.035~0.3 M の低い塩濃度では大きな相違は認められないが、0.3~2.0 M の高い塩濃度では明らかな差異が認められ、グチの方がコイより塩の影響を受けやすいことが示された。(著者らはこれを筋原繊維たんぱく質の塩感受性と呼んだ)。^{1,2)} さらに、NaCl と反応すると、ミオシン B 中のミオシンよりもアクチン部分が速やかに変性、解離して低イオン強度液中に可溶化すること、そして、コイに比べてグチのミオシン B からの解離が速いことが示された。³⁾ しかしながら、このとき、ミオシン B から解離してくるアクチンの量はまだ明らかにされておらず、検討の余地が残されている。

本研究では、NaCl と反応したミオシン B から、50 mM KCl 溶液中に可溶化してくるアクチンの生化学的性質を検討し、併せて、その量を SDS-ポリアクリルアミドゲ

ル電気泳動法によって定量する試みを行なった。さらに、先に報じたようなグチとコイのミオシン B の塩感受性の違いが、解離するアクチンの量と対応しているかどうかを明らかにすることを目的とした。

実験方法

ミオシン B の調製法 コイ carp *Cyprinus carpio* およびシログチ white croaker *Argyrosomus argenteatus* のミオシン B の調製は、高士らの方法を一部改良した方法に従って行なった。⁴⁾

ミオシン B の塩処理とその停止法 ミオシン B (2 mg/ml) を 0.3~2.0 M の NaCl を含む 40 mM Tris-maleate (pH 7.0) 溶液とし、10°C に保持した (以下この操作を塩処理とよぶ)。塩処理したミオシン B の一部 (2 ml) を経時的に取り出し、50 mM KCl, 40 mM Tris-maleate (pH 7.0) 溶液に対して氷冷しつつ透析して NaCl 濃度を下げ、塩処理を停止させた。

塩処理中に解離するたんぱく質の定量 上記した操作法に従って 50 mM KCl (pH 7.0) 溶液に対して透析したミオシン B は、10,000×g で 30 分間遠心分離して不溶性のたんぱく質を沈殿させ (沈殿画分とよぶ)、上清に可

* 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).

略語: EDTA, ethylenediamine tetraacetate; SDS, sodium dodecylsulfate.

溶性たんぱく質を得た（以下文中では 50 mM KCl-可溶画分、または単に可溶成分とよぶ）。上清と沈殿（透析溶液に再懸濁させた）画分の一定容量（30 μ l）を 1% SDS で溶解し、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって、そのたんぱく質組成を分析した。方法は、LAEMMLI⁶⁾ らの Tris-glycine buffer を用いたスラブゲルによる泳動法を、カラムゲルに応用した。カラムに負荷するたんぱく質量は、たんぱく質供試量と染色強度との関係が比例関係にある範囲内（10 μ g 以下）にとどめた。なお、たんぱく質の染色には、Coomassie Brilliant Blue R を使用し、染色強度の測定は、島津 CS-910 型クロマトスキャナーを使用した。

ATPase 活性の測定法 ミオシンの ATPase 活性 (EC 3, 6, 1, 3) の測定は、前報と同様に行なった。⁹⁾ すなわち、Mg-ATPase は 30 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$, 0.1 mM $CaCl_2$, また、EDTA-ATPase は 500 mM KCl, 5 mM EDTA の他に、どちらの場合も、25 mM Tris-maleate (pH 7.0), 1 mM ATP, 0.07 mg/ml ミオシンおよび 0.05 mg/ml F-アクチンを含む混液を、25°C で反応させ、経時的に一部を取り出して 1/2 容量の 15% $HClO_4$ を加えて反応を停止させた後、濾液中に遊離する無機リン酸を比色定量した。⁹⁾ 比活性は μ mol Pi/min·mg of myosin で表わした。

たんぱく質濃度は、牛血清アルブミン分画 V を標準とし、ビウレット法によって比色定量した。⁷⁾

実験結果

コイミオシン B を 2 M NaCl で処理したときに解離するアクチンの性質と定量 コイミオシン B を 2.0 M NaCl, 40 mM Tris-maleate (pH 7.0) 溶液とし、10°C で 3 時間に至るまで、50 mM KCl に可溶化する画分と沈殿画分についてたんぱく質の SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動図を調べ Fig. 1 とした。その結果、塩処理の時間に伴い、可溶画分に多量のアクチンと少量のトロポミオシンおよび微量のトロポニンに相当する成分の増加が認められ、ミオシン B から解離することを示唆した。一方、沈殿画分のたんぱく質組成から、対照的にアクチンとトロポミオシンおよびトロポニンに相当する成分が減少していることが示されている。

そこで、塩処理によってミオシン B より可溶化してくるアクチンに相当するたんぱく質成分とコイミオシンとの相互反応を検討した。すなわち、ミオシンの Mg-ATPase の可溶成分による活性化および EDTA-ATPase の同成分による阻害作用を測定した。^{8,9)} それによると、ミオシン単独の Mg-ATPase 活性は 0.01 μ mol Pi/min·mg of myosin 以下であり、その 3/4 量のウサギ F-アクチンによって 0.76 μ mol Pi/min·mg of myosin

Fig. 1. Changes in the SDS-polyacrylamide gel electrophoretogram of 50 mM KCl-soluble proteins from carp myosin B during the NaCl-treatment.

Carp myosin B (2.8 mg/ml) was kept at 10°C in a medium containing 40 mM Tris-maleate (pH 7.0) and 2.0 M NaCl or 0.3 M NaCl (control). After the treatment for 1, 15, 30, 60, and 180 min, a portion (2 ml) of myosin B was taken out and subjected to dialysis at 2–4°C against 50 mM KCl-40 mM Tris-maleate (pH 7.0), overnight. The dialyzates were then centrifuged at 10,000×g for 30 min to separate the supernatant and the precipitate. The precipitate was suspended in the above solution. A fixed volume (30 μ l) of both proteins in the supernatant and the precipitate were subjected to gel electrophoresis using 10% polyacrylamide gel and 0.1% SDS.

HC, A, and TM indicate the bands corresponding to myosin heavy chain, actin and tropomyosin, respectively.

にまで活性化された。しかし、上記の可溶成分は全く活性化を行わなかった。さらに、ミオシンの EDTA-ATPase 活性は 3.3 μ mol Pi/min·mg of myosin を示し、その 3/4 量のアクチンによって 0.78 μ mol Pi/min·mg of myosin まで阻害された。これに対して、可溶成分は全く阻害作用を示さなかった。これらの事実は、

Fig. 2. Densitometric tracings of SDS-gel electrophoretogram of 50 mM KCl-soluble and insoluble proteins from carp myosin B by the NaCl-treatment.

The methods for preparation of 50 mM KCl-soluble and insoluble proteins from NaCl-treated carp myosin B and for SDS-gel electrophoresis were the same as described in Fig. 1. The staining density with Coomassie Brilliant Blue R was recorded at 640 nm.

コイミオシン B を 2.0 M NaCl で処理するとき、50 mM KCl 液に可溶化してくるアクチンはミオシンとの結合を持たず変性していることを示している。³⁾

次に、塩処理によって解離してくるアクチンを定量するために、泳動したゲルカラム上の各成分の染色強度を測定して、その結果を Fig. 2 に示した。これによると、

Fig. 3. Changes in the amount of 50 mM KCl-soluble actin from carp myosin B during the NaCl-treatment.

The treatment of carp myosin B with 2.0 M NaCl and SDS-gel electrophoresis of the 50 mM KCl-soluble proteins were performed as described in Fig. 1, except that the protein concentrations of 2.9 (○), 2.3 (△), 1.7 (□), and 1.1 (▽) mg/ml were used. The amount of 50 mM KCl-soluble actin was calculated as the percentage of that in native myosin B by measuring the staining density on gel rods.

塩処理時間に伴って、可溶画分中にアクチン、トロポミオシンおよびトロポニンに相当する成分が増加し、沈殿中のそれら成分は対照的に減少することが明瞭に認められる。続いて、これらの各成分の面積を計算し、同じ方法によって求めたミオシンB中の全アクチン量に対する

Fig. 4. Time courses of dissociation of actin from myosin B in the presence of various concentrations of NaCl.

The NaCl-treatment of myosin B was carried out as described in Fig. 1, except that 0.3 (▲), 0.5 (●), 0.7 (▽), 1.0 (□), 1.5 (△), and 2.0 (○) M of NaCl were used. The amount of 50 mM KCl-soluble actin was measured as described in Fig. 3.

(A) white croaker, (B) carp.

Fig. 5. The relation between NaCl concentration and the amount of 50 mM KCl-soluble actin from myosin B.

The data shown in Fig. 4 were used to estimate the amount of 50 mM KCl-soluble actin (R) using the following relation,

$$R = \frac{A_{3h,C} - A_{3h,0.3}}{A_0} \times 100$$

where $A_{3h,C}$ and $A_{3h,0.3}$ represent the amount of 50 mM KCl-soluble actin after treatment with C and 0.3 M NaCl at 10°C for 3 h, respectively. A_0 represents the amount of actin in native myosin B preparation.

(A) white croaker, (B) carp.

割合 (%) で、解離したアクチン量を表わし、結果を Fig. 3 に示した。この実験では、塩処理を行なうときのミオシン B のたんぱく質濃度は 1.1, 1.7, 2.3 および 2.9 mg/ml と変えて行なったが、いずれの場合も、アクチンの解離は急激に起こり、塩処理 1 時間後には最大に達することを示した。このときのアクチン量はミオシン B 中のアクチンの約 60% に相当している。

種々の濃度の塩処理によってミオシン B より解離するアクチンの定量 上述した 2.0 M NaCl による処理の場合にならって、次に、NaCl 濃度を 0.3 から 2.0 M まで変えて処理を行ない、そのときに解離するアクチンを定量し、結果を Fig. 4 (B) とした。また、著者らは先に、グチとコイの塩に対する感受性が異なることを報告しているので、^{1,2)} その比較検討をするため、コイの他にグチのミオシン B についても同じ実験を行ない、結果を Fig. 4 (A) とした。

この結果によると、コイのミオシン B を塩処理する場合、0.3 M NaCl では 6 時間後まではほとんどアクチンの解離は起こらず、数 % 以内の値であった。塩濃度を高くすると、次第にアクチンの解離が進行するようになるが、その反応は塩処理直後に急速に進み、2 時間後に最大に達し、以後一定値を保持する傾向を示した。この結果より、塩濃度と解離するアクチン量との関係を求め、

Fig. 5 (B) に示した。すなわち、ミオシン B 中のアクチンは 0.5 M NaCl で約 8%, 1.0 M NaCl で約 40% 2.0 M NaCl では最大の 60% が、解離することを示している。一方、グチのミオシン B の場合は、塩処理によるアクチンの解離の反応は、Fig. 4 (A) に示すように、コイの場合と同様な傾向で進行した。しかし、解離するアクチン量と塩濃度の関係は Fig. 5 (A) に示すように、明らかにコイの場合とは異なり、0.5 M NaCl で約 20%, 0.7 M NaCl で 43%, 1.0 M NaCl では最大の 56% に達しており、コイの場合よりも低い塩濃度でアクチンの解離が急激に進行する特徴を示した。また、コイとグチの結果を比較すると、グチの場合は NaCl が 0.5 M 以上になるとアクチンの解離が急激に増加するようになり、1.0 M で最大に達するのに対し、コイミオシン B の場合は、NaCl が 1.0 M 以上になるとその解離量が急増し始め、2.0 M で最大に達することを示している。なお、0.5 M から 1.0 M までの間で、塩濃度とアクチンの解離量との関係がほぼ比例することから、その傾きを塩感受性として表わすと、グチの方がコイよりも約 2 倍塩感受性が高いという結果となった。

ミオシン B より解離するアクチンの量に及ぼす塩処理温度の影響 次に一定濃度の NaCl 存在下で、処理温度を 2~35°C まで変化させて解離するアクチンを定量し、結果を Fig. 6 に示した。ただし、この実験は、グチミオシン B の場合は 1.0 M NaCl で処理を行ない、また、コイミオシン B の場合は 2.0 M NaCl で処理を行なったものである。その結果、どちらのミオシン B の場合も、2~10°C の低い温度において解離するアクチンの量は、塩処理 1 時間後までに急激に増加し、その後はほぼ一定値を保つような傾向を示した。ところが、塩処理温度が 15°C 以上になると、解離してくるアクチン量は、初めに増加し、後に減少するという 2 相の変化を示すようになった。また、温度がさらに高まると解離するアクチンの最大量が減少する傾向を示し、また、最大量に達するまでに要する時間が短くなると同時に、その後に続いて起こるアクチンの量的な減少も速く起こるようになった。

考 察

著者らは前報において、魚類のミオシン B が高濃度の中性塩と接触し反応するときの変性の分子機構を推定した。³⁾ すなわち、塩によってミオシン B に引き起こされる変性は、主にミオシン分子よりもアクチン分子上に起こることを見出し、また、塩処理によって変性するアクチンの量は、ミオシン B それ自体の生化学的性質 (Mg-ATPase 活性, EDTA-ATPase 活性および ATP 感度など) の変化から、かなりの量に相当すると推測した。し

Fig. 6. Effect of temperature on the time course of dissociation of actin from myosin B in the presence of NaCl.

Myosin B was kept in a medium containing 40 mM Tris-maleate (pH 7.0) and 1.0 M NaCl (for white croaker) or 2.0 M NaCl (for carp) at 2 (○), 5 (□), 10 (△), 15 (▽), 20 (●), 25 (▲), and 30 (■)°C, respectively. The amount of 50 mM KCl-soluble actin was measured as described in Fig. 3. (A) white croaker, (B) carp.

かし、上記した結果を基にして変性するアクチン量を正確に定量することは困難であるため、本実験では、塩処理によってミオシンB中のアクチンが解離して50 mM KCl溶液に可溶化してくる性質を利用して、直接定量する方法を採用した。ただし、可溶化するたんぱく質成分はアクチンに相当する成分だけではないので、そのたんぱく質成分をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法によって分離し、その染色強度からアクチンを定量したものである。

なお、前報で述べたように、ミオシンBの塩処理を停止した後のKCl濃度およびその後の遠心分離の条件によっては、可溶成分中にミオシン重鎖に当る成分が見出されることもある。³⁾すなわち、KCl濃度を100 mMとして、遠心分離(10,000×g, 30分)した上清画分中には、明らかにミオシン重鎖に当る成分が認められ、50 mM KClの場合でも、僅かながら同重鎖に相当する成分が見出されることを経験した。しかし、塩処理後のミオシンB溶液のKCl濃度を100または50 mMのいずれに調整しても、解離して可溶画分中に見出されるアクチン量はほぼ同じであった(その結果は図示しない)。したがって、塩処理によってミオシンB中のアクチンが解離して可溶化を起こす反応は、単なる溶解度の塩濃度依存性を反映した現象ではないことが明らかである。

ミオシンBは塩処理1~2時間以内に、急激にそのアクチンを解離し、かつ、最大量はミオシンB中のアクチンの約60%に到達することを示した。一方、ミオシン

B中に残る約40%のアクチンは、この状態にまで塩処理したミオシンBのMg-ATPase活性とATP感度が完全には失われていない事実³⁾を考えると、変性していない可能性も考えられる。

なお、ミオシンBを15°C以上の高温で塩処理するときは、解離してくるアクチン量は一旦増加した後に減少するという2相の変化を示した。この結果より、ミオシンB中のアクチンには塩による変性と熱による変性が重なって起こり、可溶化だけではなく不溶化の反応も進行しているように推定される。しかし、この2種の変性反応がある程度共通した反応経路を有する連続した段階であるのか、あるいは、全く別の反応機構であるのかは、現在まだ明らかでない。

塩処理中のミオシンBから解離してくるアクチンの量(%)とNaCl濃度との関係を調べた結果、グチミオシンB中のF-アクチンの方が、コイミオシンB中のF-アクチンよりも塩に対する感受性が高く、変性し易いことが示された。これは筋原繊維Ca-ATPaseの変性速度およびミオシンBの粘性の低下速度を指標として用いた検討した結果^{1,2)}と良く一致するものである。

現時点では、ミオシンBを構成しているF-アクチンが、どのような機構によって変性し、解離し易くなるのかはまだ不明である。ただし、解離してくるアクチンの分子サイズは、100,000×g, 2時間の遠心分離によって、その約80%が上清に残り沈殿しないこと¹⁰⁾や、塩処理後のミオシンBをSephacrose Cl-4Bを用いてゲル透過してみると、ミオシンBに相当する成分が先ずvoid

volume に、ミオシンに相当する成分がそれに続いて溶出され、最後にアクチンに相当する成分が bed volume 近くに溶出してくること、などから推定すると、余り大きな分子サイズとは考えられない。この結果は次報において述べる。

本研究の一部は、文部省科学研究費補助金によって行なわれたので、記して感謝致します。本研究に用いた新鮮なシログチは、紀文株式会社研究所、野崎 恒所長の御好意で御分与を受けたものである。併記して感謝申し上げます。

文 献

- 1) 若目田 篤・野澤誠子・新井健一: 日水誌, **49**, 237-243 (1983).
- 2) 若目田 篤・新井健一: 日水誌, **49**, 643-650 (1983).
- 3) 若目田 篤・新井健一: 日水誌, **50**, 635-643 (1984).
- 4) 高士令二・新井健一・斎藤恒行: 日水誌, **36**, 169-172 (1970).
- 5) U. K. LAEMMLI: *Nature*, **227**, 680-685 (1970).
- 6) C. H. FISKE and Y. SUBBAROW: *J. Biol. Chem.*, **66**, 375-400 (1925).
- 7) A. G. GORNALL, C. J. BARDWILL, and M. M. DAVID: *J. Biol. Chem.*, **177**, 751-766 (1946).
- 8) S. BARRON, E. EISENBERG, and C. MOOS: *Science*, **151**, 1941 (1966).
- 9) K. TAKEUCHI: *J. Biochem.*, **19**, 1001-1007 (1982).
- 10) B. NAGY and W. P. JENCKS: *J. Am. Chem. Soc.*, **87**, 2480-2488 (1965).