スルメイカのトリニトロフェニル化ミオシンの酵素的性質と キモトリプシン消化性

小玉 修 嗣・今野久仁彦・新井 健 一・渡 辺 静 雄

(1984 年 9 月 22 日受理)

Enzymatic Property and Chymotryptic Digestability of Squid Trinitrophenylated Myosin

Shuji KODAMA,*¹ Kunihiro KONNO,*¹ Ken-ichi ARAI,*¹
and Shizuo WATANABE*²

Squid mantle myosin was trinitrophenylated with 2,4,6-trinitrobenzene sulfonate and squid trinitrophenyl myosin, in which approximately one mol of trinitrophenyl group bound to 2.4×10^5 g of myosin was thus obtained. The Ca-, EDTA-, and Mg-ATPase activities of squid trinitrophenyl myosin were practically identical to those of squid unmodified myosin in the KCl-concentration dependence, in the temperature dependence, and in the effect of thiol modification, although specific activities of the three ATPases were all affected. The thermostability of Ca-ATPase activity of squid myosin was also unaltered by trinitrophenylation of myosin. These results suggested that the trinitrophenylation of squid myosin caused no change in the bulk conformation of squid myosin molecule.

The effect of the α -chymotryptic digestion on the three ATPase activities was enhanced by trinitrophenylation of myosin, and even further enhanced when trinitrophenylation was conducted in the presence of PPi. Analysis of the digested products by SDS gel electrophoresis revealed that the yield of subfragment-1 from the chymotryptic digestion decreased by trinitrophenylation of myosin, and decreased even further when trinitrophenylation was conducted in the presence of PPi.

It is therefore suggested that the reactive lysine residues trinitrophenylated in the presence of PPi are located closer to the ATPase active site than those of trinitrophenylated in the absence of PPi and that the chymotryptic cleavage at the site within subfragment-1 was enhanced by trinitrophenylation.

著者らは前報において、スルメイカ・ミオシンのリジン残基に着目し、2,4,6-トリニトロベンゼンスルホン酸 (TNBS) によるその化学修飾がミオシンの生化学的性質 (吸収スペクトルや ATPase 活性) に及ぼす影響を検討した。¹⁾ その結果、ミオシンと TNBS との反応性やトリニトロフェニル化 (TNP 化) されるリジン残基周辺の環境などに関して、イカのミオシンとウサギのミオシンとの間には僅かな差が見出されるものの、ATPase 活性の発現に重要な役割を果たしているリジン残基は、ウサ

ギ・ミオシンの場合と同様に、イカ・ミオシンにも存在することを推定した。また、そのリジン残基とイカ・ミオシンの Mg-ATPase の Ca 調節との関係は、リジン残基と EDTA-ATPase および Ca-ATPase の活性との関係と相同であることを明らかにしたが、この発見の意味するところは明らかでない。なお、アカザラ貝横紋閉殻筋・ミオシンを用いた場合も、本質的に類似した結果が得られている。²⁾

一方、室塚ら³⁾は、魚類 (コイ、ティラピア) のミオ

*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 群馬大学工学部応用化学科 (Department of Applied Chemistry, Faculty of Technology, Gunma University, Kiryu, Gunma 376, Japan).

略語 TNBS: 2,4,6-trinitrobenzene sulfonate, TNP: trinitrophenyl, PPi: inorganic pyrophosphate, EDTA: ethylenediamine tetraacetate, CMB: *p*-chloromercuribenzoic acid, PMSF: phenylmethylsulfonyl fluoride, SDS: sodium dodecyl sulfate, HMM: heavy meromyosin, S-1: subfragment-1 of myosin.

*³ 尾島孝男・飯田一幹・西田清義: 昭和 58 年度日本水産学会春季大会 (東京), 講演要旨集, p. 236.

*⁴ 室塚剛志・新井健一: 昭和 54 年度日本水産学会秋季大会 (函館), 講演要旨集, p. 162.

シンの酵素的性質は TNP 化によって著しく変化し、しかも、その変化はウサギ・ミオシンを TNP 化した場合の変化と本質的に同じであることを報告している。すなわち、ウサギや魚類の骨格筋ミオシンでは、リジン残基の TNP 化は、単に ATPase 活性を減少させるだけでなく、ミオシンの ATPase 活性の KCl 濃度依存性、温度依存性、および熱安定性などをも変化させるほどの広範囲の影響を与えている。

本研究では、イカ・ミオシンの ATPase 活性、およびキモトリプシンによる消化性に対する TNP 化の影響を検討し、イカ・ミオシンの機能と構造の関係を明らかにしようと試みた。

実験方法

スルメイカ *Todarodes pacificus* 外套膜筋ミオシンは、木村らの方法²⁾により調製した。

イカ・ミオシンの TNP 化は MIYANISHI らの方法³⁾に準じて行い、先に報告した方法に従って TNP 化ミオシンを調製した。すなわち、0.5 M KCl, 2 mM MgCl₂, 0.1 mM EDTA, 0.1 M imidazole-HCl (pH 7.0) に溶解したイカ・ミオシン (5 mg/ml) に、2 mM PPI の存在下または非存在下で、種々の濃度の TNBS を加え、10°C で 30 分間反応させた後、残存する未反応の TNBS とその他の成分を透析によって除去し、TNP 化ミオシンを調製した。ミオシンに結合した TNP 量は、透析後の TNP 化ミオシンの 345 nm の吸光値を測定し、TNP-ε-Lysine のモル吸光係数として 1.45×10^4 を用いて算出した。⁴⁾

ATPase (EC 3.6.1.3) 活性の測定条件の詳細は、図の説明文中に示した。反応は ATP を含む反応混液にミオシンを添加して開始し、経時的にその一定量を取り出し、終濃度 5% の HClO₄ で反応を停止させた後、生成した無機リン酸量を FISKE と SABBAROW の変法⁵⁾ (還元試薬は *p*-methyl aminophenol sulfate を使用) を用いて定量した。

TNP 化ミオシンのプロテアーゼによる消化実験は、0.5 M KCl, 20 mM Tris-maleate (pH 7.5) に溶解したミオシンに対し、1/500 量 (w/w) の α-キモトリプシンを加え、20°C で行った。経時的にその消化混液の一定量を取り、終濃度で 0.2 mM の PMSF を添加して消化反応を停止させた後、諸性質の測定に供した。

粘度の測定は、20°C において、オストワルド型粘度計を用いて行った。溶媒 (0.5 M KCl, 20 mM Tris-maleate pH 7.5) の流過速度は 90-110 秒で、容量は 2 ml であった。

SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動は、LAEMMLI と FAVRE の方法⁶⁾に従って行った。すなわち、0.1%

SDS を含む 10% ポリアクリルアミドのスラブゲルを用い、染色には Coomassie Brilliant Blue R を用いた。

蛋白質濃度の測定は、ビュレット法⁷⁾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

酵素的性質 前報において、¹⁾イカ・ミオシンを TNBS と反応させると、PPI の存否にかかわらず同じ程度の TNP 化がおこり、それに伴って、Ca-ATPase や EDTA-ATPase 活性が減少することを示した。また、ミオシン単独の Mg-ATPase 活性に認められる Ca 感受性も上記の ATPase 活性の減少に伴って減少することを報告した。本研究ではまず、Ca-ATPase, EDTA-ATPase, および Mg-ATPase の活性の KCl 濃度依存性に対するミオシンの TNP 化の影響を検討した。Fig. 1 に示したように、未修飾のイカ・ミオシンの Ca-ATPase 活性は (Fig. 1-A) 低 KCl 濃度 (約 0.2 M KCl) 側で高く、EDTA-ATPase 活性は (Fig. 1-B), 高 KCl 濃度 (0.6 M KCl 以上) 側で高く、また、Mg-ATPase 活性は (Fig. 1-C), 0.3-0.4 M KCl 付近に極大値を有している。3 種の ATPase 活性の上のような KCl 濃度依存性は TNP 化したイカ・ミオシンを用いた場合にも観察された。また、TNP 化の際の PPI の存否は Ca-ATPase および EDTA-ATPase 活性の KCl 濃度依存性には影響を及ぼさず、比活性の低下の度合にも差を示さなかった。ただし、Mg-ATPase の比活性は、PPI の非存在下で TNP 化したミオシンでは増加し、PPI の存在下で TNP 化したミオシンでは減少した。すなわち、イカ・ミオシンの TNP 化反応の経時変化は PPI の存在下でも PPI の非存在下でも同じであった¹⁾にもかかわらず、PPI の存在下で TNP 化した場合と PPI の非存在下で TNP 化した場合とでは、Mg-ATPase 活性に対する TNP 化の効果が違っていることが明らかになった。以上の結果はミオシン 2.4×10^6 g 当たり約 1 モルの TNP 基が結合したミオシンを用いた場合であるが、TNP 結合量の異なる TNP 化ミオシン (0.5-3 mol TNP/ 2.4×10^6 g myosin) を用いた場合にも同様な結果が得られた。従って、以上の結果は、ウサギや魚類の骨格筋ミオシンの TNP 化の場合に得られた結果⁸⁾とは明らかに異なっている。

なお、ここには図示していないが、イカの TNP 化ミオシンの ATPase 活性の温度依存性を検討し、活性化エネルギーを求めたところ、Ca-ATPase および EDTA-ATPase 活性では約 8 kcal/mol, Mg-ATPase 活性では約 16 kcal/mol となり、これらは未修飾のイカ・ミオシンで得られた値と一致した。従って、ここでもまた、イカ・ミオシンの結果は、TNP 化によってミオシン

*5 室塚剛志・新井健一：昭和 54 年度日本水産学会秋季大会 (函館)，講演要旨集，p. 162.

Fig. 1. KCl-concentration dependence of the ATPase activities of squid unmodified and trinitrophenylated myosins.

Trinitrophenyl myosin (5.0 mg/ml) was isolated from the myosin reacted with 2,4,6-trinitrobenzene sulfonate (TNBS) in the presence or absence of 2 mM PPI; TNP-myosin (+PPI) and TNP-myosin (-PPI). The amount of TNP bound to myosin was estimated to approximately one mol of TNP per 2.4×10^5 g of myosin. The ATPase assay was carried out at 20°C at various concentrations of KCl in the medium containing 5 mM CaCl_2 , 25 mM Tris-maleate (pH 7.0), and 1 mM ATP for Ca-ATPase (A); 5 mM EDTA, 25 mM Tris-maleate (pH 7.0), and 1 mM ATP for EDTA-ATPase (B); 2 mM MgCl_2 , 0.1 mM CaCl_2 , 25 mM Tris-maleate (pH 7.0), and 1 mM ATP for Mg-ATPase (C). (○) Unmodified myosin, (Δ) TNP-myosin (-PPI); trinitrophenylated in the absence of PPI, and (□) TNP-myosin (+PPI); trinitrophenylated in the presence of PPI.

Fig. 2. Effect of *p*-chloromercuribenzoate (CMB) on the ATPase activities of squid unmodified and trinitrophenylated myosins.

Trinitrophenyl myosins (TNP-myosins) were prepared as described in Fig. 1. Unmodified myosin and TNP-myosins were incubated at 0°C with various amounts of CMB overnight in a medium of 0.5 M KCl and 20 mM Tris-maleate (pH 7.5). The ATPase activity was assayed in the same medium as described in Fig. 1, except that the KCl concentration was fixed at 30 mM KCl for Ca-ATPase (A) and for Mg-ATPase (C); or at 0.5 M for EDTA-ATPase (B). (○) Unmodified myosin, (Δ) TNP-myosin (-PPI), and (□) TNP-myosin (+PPI).

ATPase の活性化エネルギーが増加する傾向を示すウサギや魚類の骨格筋ミオシンの場合*⁸とは異なっていた。

SH 基の反応性 イカ・ミオシンの SH 基を CMB で

化学修飾すると、Ca-ATPase や Mg-ATPase の活性の上昇は起こらずに一方的に減少するため、イカ・ミオシンの ATPase 活性中心の化学構造はウサギ・ミオシンの

それとは異なると推定されている。⁸⁾ すなわち、ウサギの骨格筋ミオシンでは ATPase 活性中心 部位の近くに SH₁ 型の SH 基があり、これを化学修飾すると Ca-ATPase および Mg-ATPase 活性が増加することが知られているが、⁹⁾ イカ・ミオシンには SH₁ 型の SH 基はないと思われる。今回は、イカの TNP 化ミオシンを CMB で化学修飾し、その ATPase 活性に及ぼす影響を検討し、その結果を Fig. 2 に示した。イカの TNP 化ミオシンは未修飾のイカ・ミオシンの場合と同様で、いずれの ATPase 活性も CMB 量の増加に伴って一方的に減少する傾向を示し、ミオシン 1 モル当たり約 15 モルの CMB の添加により完全に失活した。従って、イカ・ミオシンの SH 基の反応性は、TNP 化しても元の状態のまま保持されていることが示唆される。

熱安定性 イカ・ミオシンはウサギ・ミオシンに比べて、熱に対して著しく不安定であり、²⁾ また、尿素に対する抵抗性も弱いこと⁸⁾ が知られている。一方、室塚ら¹⁰⁾ は、魚類ミオシンは TNP 化によって熱に対して約 2 倍安定になることを見出している。今回は Ca-ATPase 活性を指標として、イカ・ミオシンの熱安定性に対する TNP 化の影響を検討した。すなわち、0.5 M KCl, 20 mM Tris-maleate (pH 7.5) 溶液中の未修飾ミオシンおよび TNP 化ミオシン (4 mg/ml) を 25–30°C の各温度で加

熱し、Ca-ATPase 活性を経時的に測定した。Fig. 3 に示したように、いずれの場合も失活は一次反応に従っており、TNP 化ミオシンも未修飾ミオシンと同じ速度で失活することを示した。すなわち、イカ・ミオシンの熱安定性は TNP 化により、全く変化しないことが示された。また、ここには図示していないが、イカの TNP 化ミオシンの ATPase 活性の尿素に対する抵抗性について検討したところ、その Ca-ATPase, EDTA-ATPase, および Mg-ATPase の活性の尿素による抑制は、いずれも未修飾ミオシンのそれらと同じであり、尿素に対する抵抗性においても TNP 化の影響はみられなかった。

以上の実験結果は、イカ・ミオシンの TNP 化は、魚類やウサギの骨格筋ミオシンの TNP 化とは違って、ミオシン分子全体にわたる構造を大きく変えるような影響を与えないことを示唆するものと考えられる。

α-キモトリプシンによる消化性 TNP 化がイカ・ミオシンの高次構造に及ぼす影響を検討するために、α-キモトリプシンによる消化性について検討した。すなわち、0.5 M KCl, 20 mM Tris-maleate (pH 7.5) に溶解した未修飾ミオシンおよび TNP 化ミオシンを、1/500 量 (w/w) の α-キモトリプシンを用いて、20°C で消化した時の粘度、ATPase 活性、および SDS ゲル電気泳動図型の変化を検討した。

Fig. 3. Heat-induced decrease in the Ca-ATPase activity of squid unmodified and trinitrophenylated myosins.

Trinitrophenyl myosins (TNP-myosins) were prepared as described in Fig. 1. Incubation of unmodified myosin and TNP-myosins was performed at 25°C, 27.5°C, or 30°C in a medium of 0.5 M KCl and 20 mM Tris-maleate (pH 7.5). The heat-treatment was stopped by cooling in ice-cold water, and the loss in the ATPase activities during the heat-treatment was measured. The Ca-ATPase assay was carried out at 20°C in a reaction medium containing 30 mM KCl, 5 mM CaCl₂, 25 mM Tris-maleate (pH 7.0), and 1 mM ATP. (○) Unmodified myosin, (Δ) TNP-myosin (–PPI), and (□) TNP-myosin (+PPI).

*8 室塚剛志・新井健一：昭和 54 年度日本水産学会秋季大会（函館），講演要旨集，p. 162.

Fig. 4. Changes in viscosities of squid unmodified and trinitrophenylated myosins during α -chymotryptic digestion.

Trinitrophenyl myosins (TNP-myosins) were prepared as described in Fig. 1. Unmodified myosin and TNP-myosins in 0.5 M KCl and 20 mM Tris-maleate (pH 7.5) were digested at 20°C with α -chymotrypsin in an amount of 1/500 (w/w) relative to myosin, and the viscosity was determined in an OSTWALD type viscometer with the out flowtime of 90–110 seconds for 2 ml of the buffer. (○) Unmodified myosin, (Δ) TNP-myosin (–PPI), and (□) TNP-myosin (+PPI).

まず初めに、消化によって起こるミオシンの粘度の経時変化を測定し、その結果を Fig. 4 に示した。PPI の非存在下 (Δ) または存在下 (□) で TNP 化したミオシンの粘度の低下速度は、未修飾ミオシン (○) のそれと区別できなかった。しかし、ミオシンの ATPase 活性の経時変化を測定した結果では、Fig. 5 に示したように、TNP 化の効果が認められた。すなわち、ミオシンの Ca-ATPase および EDTA-ATPase の活性は (Fig. 5-A と B)、いずれも一次反応に従い、ほぼ等速で減少したが、未修飾ミオシン (○) の減少速度に比べ、PPI の非存在下で TNP 化したミオシン (Δ) は約 4 倍、PPI の存在下で TNP 化したミオシン (□) は約 8 倍速く減少した。一方、Mg-ATPase 活性では、未修飾ミオシンのそれは、他の ATPase 活性よりは遅いが、やはり消化に伴う一段の減少を示した。ところが、TNP 化ミオシンの Mg-ATPase 活性は (Fig. 5-C: Δ, □)、消化に伴って、二段の減少を示し、初期の速い反応に続いて遅い反応が起こった。この初期の減少速度についてみると、PPI の存在下で TNP 化したミオシンの方が、PPI の非存在下でのそれに比べ、約 2 倍速く減少している。また、PPI の存在下で TNP 化したミオシンでも PPI の非存在下で TNP 化したミオシンでも、後期の減少速度は未修飾ミオシンのそれとよく近似していた。従って、まず第 1 に、 α -キモトリプシンは ATPase 活性中心または

Fig. 5. Changes in the ATPase activities of squid unmodified and trinitrophenylated myosins during α -chymotryptic digestion.

Trinitrophenyl myosins (TNP-myosins) were prepared as described in Fig. 1. Unmodified myosin and TNP-myosins were digested under the same condition as described in Fig. 4. The digestion was stopped by adding 0.2 mM PMSF at various intervals, and the digests were used for the ATPase assay. The ATPase activity was assayed in the same medium as described in Fig. 1, except that the KCl concentration was fixed at 30 mM for Ca-ATPase (A) and for Mg-ATPase (C); or at 0.5 M KCl for EDTA-ATPase (B). (○) Unmodified myosin, (Δ) TNP-myosin (–PPI), and (□) TNP-myosin (+PPI).

Fig. 6. Changes in submolecular composition of squid unmodified and trinitrophenylated myosins during α -chymotryptic digestion.

Trinitrophenyl myosins (TNP-myosins) were prepared as described in Fig. 1. (A) Unmodified myosin and TNP-myosins were digested as described in Fig. 5, and the digests were used for SDS-polyacrylamide slab-gel electrophoresis. (B) The digests in (A) were dialyzed overnight at 0°C against 50 mM KCl containing 5 mM $MgCl_2$ and 20 mM Tris-HCl (pH 7.5). The dialyzates were then centrifuged at $100,000 \times g$ for 2 hours, and the supernatants were

その近傍を切断していること、第2に、この切断が TNP 化によって影響を受けていることを示唆している。しかも、TNP 化の際の PPi の存否も消化性の違いとして検出できることがわかった。次いで、 α -キモトリブシンによる消化によって起こる未修飾および TNP 化ミオシンの成分組成の変化を SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動により追跡した。未修飾ミオシン (a)、および PPi の非存在下 (b) または存在下 (c) で TNP 化したミオシンの α -キモトリブシン消化物の SDS 電気泳動パターンを Fig. 6-A に示した。ミオシンの heavy chain (HC) に相当する band は、どのミオシンを用いた場合も同じような速さで消失していて粘度の低下の速さ (Fig. 4) に対応しているが、ミオシン HC の消失に伴って生成する分解産物の成分 (bands) 組成は若干異なっていた。この差を見やすくするために、上記の消化物を 50 mM KCl (pH 7.5) に透析し、100,000 $\times$ g で2時間遠心分離して得た上澄、すなわち、“可溶性画分”を SDS 電気泳動に供した。Fig. 6-B に示したように、この可溶性画分中には、分子サイズが heavy meromyosin (HMM) に相当する band が、どのミオシンの場合もほぼ等量見出されるのに対し、subfragment-1 (S-1) に相当する band の量は異なっていた。すなわち、未修飾ミオシン (a) から得た可溶性画分には S-1 (→) が多量含まれるのに、PPi の非存在下 (b) で TNP 化したミオシンから得た可溶性画分には未修飾ミオシンのその約半分、そして、PPi の存在下 (c) で TNP 化したミオシンから得た可溶性画分には S-1 はほとんど含まれていなかった。従って、先に、Fig. 5 に示したように、 α -キモトリブシンによる消化によって、TNP 化ミオシンの各種 ATPase 活性が未修飾ミオシンのそれに比べて速く減少するのは、S-1 の生成量と直接関連した現象である可能性が強く示唆された。

考 察

著者らは先に、イカ・ミオシンの Ca-ATPase や EDTA-ATPase の活性が TNP 化に伴って一方的に減少する傾向は、ウサギや魚類の骨格筋ミオシンの TNP 化の場合と同じであることを報告した。¹⁾ 本研究でも、イカ・ミオシンの Ca-ATPase, EDTA-ATPase, および Mg-ATPase のいずれの活性も TNP 化によって影響を受けていることを観察した。従って、ウサギや魚類の骨

格筋ミオシンの場合と同様、イカ・ミオシンでも、TNP 化は ATPase 活性中心部位の近傍で起こったものと推定した。

しかし、イカ・ミオシンのこれら ATPase の活性の KCl 濃度依存性 (Fig. 1) および熱安定性 (Fig. 3) は TNP 化によって全く変らなかった。これは、ウサギや魚類の骨格筋ミオシンの場合とは対照的な結果である。すなわち、後者のミオシンの ATPase 活性の KCl 濃度依存性、温度依存性、および熱安定性はミオシンの TNP 化に伴って著しく変化する。²⁷⁾ 従って、これらのミオシンの TNP 化は、ATPase 活性に対して、直接的な影響の他に間接的な影響を与えるような変化、たとえば、ミオシン分子全体の高次構造の変化を伴うことが推定された。しかし、イカ・ミオシンの場合には、TNP 化はそのような変化を起こさないで、ATPase 活性に対する間接的な影響を与えないという点で、ウサギや魚類の骨格筋ミオシンの TNP 化とは違っていることになる。

イカ・ミオシンの3種類の ATPase 活性のうち、Mg-ATPase 活性に対する TNP 化の効果だけは、TNP 化を PPi 存在下で行った場合と PPi 非存在下で行った場合とで全く異なっていることが観察された (Fig. 1-C)。すなわち、PPi 非存在下で TNP 化すると Mg-ATPase 活性は増加し、PPi 存在下で TNP 化するとそれは逆に減少した。このことは、TNP 化の部位と PPi の結合部位 (すなわち、ATPase 活性中心部位) との間隔について示唆している。すなわち、PPi の添加がイカの TNP 化ミオシンの TNP 基の吸収スペクトルに影響を与えないという点から言うと、上記の間隔はウサギや魚類の骨格筋ミオシンの場合ほど近くはないが、しかし、Fig. 1-C に示した結果はその間隔はそれ程遠くもないことを示唆していると考えられる。

Mg-ATPase 活性に対する TNP 化の効果は、 α -キモトリブシンの消化性に対する TNP 化の際にも同様に認められ、Ca-ATPase や EDTA-ATPase の活性に対する TNP 化の効果とは違っていた。しかし、これがどういうことを意味するのかは、現在のところ明らかではない。

イカ・ミオシンを α -キモトリブシンで消化すると、3種類の ATPase 活性のいずれもが減少する。これは、 α -キモトリブシンによる切断が ATPase 活性中心部位の近傍で起こるということを示していると考えられる。しか

²⁷⁾ 室塚剛志・新井健一：昭和54年度日本水産学会秋季大会（函館），講演要旨集，p. 162.

(Fig. 6) used for SDS-polyacrylamide slab-gel electrophoresis. The gel electrophoresis was carried out by the method of LAEMMLI and FAVRE, using 10% acrylamide gel and 0.1% SDS, (M) Myosin, (H) Heavy meromyosin, and (S) Subfragment-1. (a) Unmodified myosin, (b) TNP-myosin (-PPi), and TNP-myosin (+PPi).

も、消化に伴う ATPase 活性の減少は、PPi の非存在下で TNP 化してさえも目立って速くなるが、PPi の存在下で TNP 化するとさらに速くなる (Fig. 5)。従って、PPi 存在下で TNP 化されるリジン残基の方が、PPi 非存在下で TNP 化されるリジン残基よりも α -キモトリプシンによって切断される部位の近くにある可能性があると考えられる。

一方、 α -キモトリプシンによる分解物を SDS ゲル電気泳動で検討した結果では、S-1 の生成量は未修飾のイカ・ミオシンの分解物に一番多く、PPi 非存在下で TNP 化したミオシンの分解物では半減し、そして、PPi 存在下で TNP 化したミオシンではほとんど検出できなかった。従って、 α -キモトリプシンはイカ・ミオシン分子の頭部 (S-1) の内部で切断を起こしている可能性が考えられる。この可能性については、現在、さらに研究中である。

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) 小玉修嗣・今野久仁彦・新井 健一・渡辺 静雄: 日水誌, **51**, 641-649 (1985).
- 2) 木村郁夫・吉富文司・今野 久仁彦・新井 健一: 日水誌, **46**, 885-892 (1980).
- 3) T. MIYANISHI, A. INOUE, and Y. TONOMURA: *J. Biochem.*, **85**, 747-753 (1979).
- 4) T. OKUYAMA and K. SATAKE: *J. Biochem.*, **47**, 454-466 (1960).
- 5) 高橋泰常: 生化学の領域における光電比色法 (関根隆光編), 各論 2, 南江堂, 東京, 1962, p. 13-14.
- 6) V. K. LAEMMLI and M. FAVRE: *J. Mol. Biol.*, **80**, 579-599 (1973).
- 7) A. G. GORNALL, C. T. BARDWILL, and M. M. DAVID: *J. Biol. Chem.*, **177**, 751-766 (1949).
- 8) 吉富文司・今野久仁彦: 日水誌, **48**, 581-586 (1982).
- 9) T. SEKINE and W. W. KIELLEY: *Biochem. Biophys. Acta*, **81**, 336-345 (1964).