カルパインによるコイミオシンの限定分解

坂 本 慎 一・関 伸 夫

(1985 年 3 月 14 日受理)

Limited Hydrolysis of Carp Myosin by Calpains

Shin-ichi SAKAMOTO* and Nobuo SEKI*

Hydrolytic degradation of carp myosin with carp and rabbit calpains in 0.5 M NaCl were followed by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and other methods. Carp myosin heavy chain was degraded restrictively into two subfragments (170,000 and 43,000 Mr proteins), carp calpain's activity being three times higher than rabbit calpain. In contrast, three light chains from this myosin were hardly degraded. Maximal hydrolysis as well as caseinolysis of this myosin occurred at 1 mM Ca^{2+} and at neutral pH. The hydrolysis showed an accelerated pace above 20°C. Rabbit myosin used for comparison was insusceptible to both calpains.

The two subfragments thus produced from carp myosin were separated from each other by differences in solubility. The soluble subfragment was composed of 170,000 Mr protein and three light chains, and the insoluble was composed of 43,000 Mr protein. The soluble subfragment exhibited a Ca^{2+} -ATPase activity similar to the original myosin and the Mg^{2+} -ATPase activity was accelerated by F-actin. It was concluded that carp myosin is degraded by either calpain into heavy and light meromyosin-like subfragments.

著者らは前報¹⁾で、コイとウサギの骨格筋からカルパインⅡ型 [EC 3.4.22.17] を精製し、その酵素的性質を調べて比較検討をおこなった。そこで次にカルパインの筋肉タンパクの代謝や死後変化への係わりを一層明らかにするために、筋原繊維タンパクの主成分であるミオシンに対する作用を検討した。

既に著者ら²⁾はコイのカルパインは筋原繊維中のミオシンを分解することを示唆したが、さらにニワトリ骨格筋³⁾やサルの心筋⁴⁾から精製されたカルパインもウサギのミオシンを分解することが報告されている。しかし、DAYTON⁵⁾は、カルパインが筋原繊維中のミオシンにほとんど作用しないことを述べており、KANG⁶⁾もウサギ・ミオシンはカルパインで分解されず、その ATPase 活性などの機能も変化しないことを報告している。

このようにカルパインによるミオシンの分解については、一致した結果が得られていない。これは、恐らくカルパインやミオシンの由来が研究者間で異なること、あるいはカルパインとの反応条件の相違によるものと思われる。そこで本研究では、コイとウサギの骨格筋から同じ方法で精製したカルパインⅡ型を用い、両ミオシンに対する作用を同一の反応条件下で比較し、酵素と基質のそれぞれの種特異性について検討をおこなった。

実験方法

カルパインとカルバスタチンの調製 カルパインⅡ型はコイおよびウサギの骨格筋から前報¹⁾に従って精製した。カルバスタチンはコイ筋肉から著者らの方法⁷⁾でカルバスタチン H と L を調製した。

ミオシンとアクチンの調製 コイおよびウサギ・ミオシンは 0.45 M KCl, 1 mM MgCl_2 , 5 mM ATP, 17.6 mM Na_2HPO_4 , 25 mM NaH_2PO_4 (pH 6.4) で抽出し、0.5 M KCl, 5 mM MgCl_2 , 10 mM ATP (pH 7.5) 中で、硫安分画 (35%~50% 飽和画分) して精製した。⁸⁾ アクチンはウサギ骨格筋のアセトン粉末から抽出し、SPUDICH と WATT⁹⁾の方法に従って精製した。

カルパイン活性の測定 カルパインのカゼイン分解活性は前報¹⁾に準じて 5 mg/ml のカゼイン, 0.5 M NaCl, 0.1 M Tris-Acetate (pH 7.0), 5 mM CaCl_2 , 10 mM 2-メルカプトエタノールおよび酵素からなる混液 2 ml を 25°C で反応させ、5% (W/V) 過塩素酸 1 ml を添加して、反応を停止した。1,000×g, 20 分間遠心分離後、上清液の 278 nm の吸光値を測定した。カゼイン分解活性は、278 nm の吸光値を 1 時間当たり 1.0 増加させる活性を 1 unit として表示した。ミオシンを基質にし

* 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).

た場合は、カゼインのかわりに $10 \mu\text{M}$ (5 mg/ml) のミオシンを用いた。ミオシンの分解活性は、1 unit のカゼイン分解活性を示すカルpainにより1分間当りに消失する。ミオシン重鎖の量 (μmol) で表示した。

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 WEBER と OSBORN の方法¹⁰⁾ により 10% または 5% ポリアクリルアミドゲルを用いておこなった。染色は Coomassie brilliant blue R-250 を用いておこなった。

ミオシン重鎖の定量 カルpain処理したミオシンを 0.1% SDS-5% ポリアクリルアミドゲルカラム ($\phi 0.5 \times 10 \text{ cm}$) を用いて電気泳動に付し、染色および脱色後、ミオシン重鎖 (HC) の量をデンストメーター (島津 CS-910 型) をもちい、640 nm と 700 nm の吸光値の差から定量した。ゲルカラム当り 0~10 μg のミオシン量と HC 染色度は比例したので、この範囲内で HC の定量をおこなった。タンパク質濃度はビウレット法¹¹⁾およびマイクロビウレット法¹²⁾によって、牛血清アルブミンを標準にして求めた。

粘度および ATPase 活性の測定法 粘度は OSTWALD 型粘度計 (2 ml 容量) で溶媒の流過速度が 100~120 秒のものをもちい 20°C で測定した。Ca²⁺-ATPase 活性は 0.5 M KCl, 25 mM Tris-maleate (pH 7.0), 5 mM CaCl₂, 1 mM ATP の組成で、EDTA-ATPase 活性は同組成で、CaCl₂ のかわりに 5 mM EDTA を用い、Mg²⁺-ATPase 活性は 30 mM KCl, 25 mM Tris-maleate (pH 7.0), 1 mM MgCl₂, 1 mM ATP のものに、それぞれ適当量のミオシンを加えた反応混液中 25°C において測定した。なお、反応停止は 5% 過塩素酸を用い、また遊離した無機リン酸の定量は FISKE-SUBBAROW 法¹³⁾ (還元剤は *p*-methylaminophenol sulfate を用いた) によった。

結 果

カルpainによるミオシンの分解 カゼインおよびコイのミオシンをコイとウサギの両カルpainと 25°C で反応させ、終濃度で 1.7% の過塩素酸を添加し反応を停止後、上清に得られる酸可溶性ペプチドの量を 278 nm の吸光値で示し、Fig. 1 の結果を得た。その結果、カゼイン基質の場合は反応時間に比例して吸光値の増大がおこったが、同じカルpain量でミオシンを処理した場合には、コイとウサギのいずれのカルpainによっても、また、コイとウサギのどちらのミオシンについてもほとんど吸光値の増大はみられなかった。

次に、Fig. 1 と同じ反応条件下でミオシンの粘度変化を測定した。ただし、25°C で反応をおこなうと、コイのミオシンは熱変性によると思われる粘度の上昇 (約 25%/h の上昇) がおこるので、20°C で反応をおこな

Fig. 1. Release of acid soluble peptides from casein and myosin during incubation with calpain. The incubation was carried out at 25°C in 0.5 M NaCl, 20 mM Tris-acetate (pH 7.0), 5 mM CaCl₂, 10 mM 2-mercaptoethanol and calpain (0.3 unit/ml) containing either 5 mg/ml of casein (○, ●) or of carp myosin (△, ▲) as a substrate. At each indicated time, the reaction was terminated by addition of perchloric acid (final conc. 1.7%). The mixture was centrifuged at 1,000×g for 20 min, and then absorbance of the supernatant was measured at 278 nm. ○, △, with carp calpain; ●, ▲, with rabbit calpain.

た。Fig. 2 に示すように、コイのミオシンは 20°C で約 4% の粘度増加を示したが、カルpainを添加するとミオシンの粘度は低下した。一方、ウサギのミオシンは 25°C でも全く粘度変化をおこさないが、カルpainを添加した場合にも粘度の変化は、僅かしか起らなかった (Fig. 2, □)。なお、コイのミオシンの場合は、カルpainの添加で粘度低下が観察されたが、この変化がミオシンの分解のためにおこったのか、構造変化によるのか明らかではない。そこで次にミオシンとカルpainの反応を、経時的に EDTA (終濃度 20 mM) を添加して停止したのち、一定量を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動に付して、ミオシン・サブユニットの変化を調べた (Fig. 3)。

これによると、コイの HC は、コイ・カルpainとの反応時間の経過とともに減少し、それに伴って Mr=170,000 (以下 170 k と呼ぶ) と Mr=43,000 (43 k) に相当する成分が生成し、増加することを見出した。また反応時間が長くなると、Mr=110,000 の生成がみられた。しかしミオシンの 3 種の軽鎖 (LC) は変化が認められなかった。コイのミオシンをウサギのカルpainで

Fig. 2. Changes in viscosity of carp and rabbit myosins during incubation with calpain. Carp myosin was dissolved in the same medium as in Fig. 1, and incubated with different amount of carp calpain in a viscometer (2 ml) at 20°C and the flow time was measured with a lapse of incubation time. Amount of calpain added: ○, 0 unit/ml; ●, 0.18 unit/ml; △, 0.35 unit/ml; ▲, 0.55 unit/ml. Rabbit myosin (□) was incubated with carp calpain (0.6 unit/ml) in the same way at 25°C. Z_η was calculated using the following formula: $Z_\eta = \ln \eta_r / C$, where η_r and C are relative viscosity and protein concentration (mg/ml), respectively. $Z_\eta = 0.158$ was taken as 100%.

処理した場合にも同様な HC 減少と生成物が示された。一方、ウサギのミオシンに対しては、コイおよびウサギのいずれのカルパインで同様に処理しても、HC および LC 組成は変化が認められなかった。なお、この図には示さなかったが、コイ・ミオシンとカルパインとの反応液中の Ca^{2+} を、1 mM EDTA に替えた場合、および、コイ筋肉のカルバスタチンをカルパインの2倍量添加した場合は、上述した HC の変化はみられなかった。

以上の結果から、コイ・ミオシンとカルパインとの反応は、酸可溶性ペプチドの生成を伴わず、少数の比較的大きな分子量の断片がみられることから、HC の限定分解であると推定し、また、コイとウサギの両カルパインは、コイのミオシンの同一部位を切断すると推定される。

コイ・ミオシンの限定分解に及ぼす酵素濃度、 Ca^{2+} 濃度、及び温度の影響 次にカルパインによるコイのミオシンの限定分解に及ぼす Ca^{2+} 濃度、酵素量などの影響を調べた。まず、ミオシンに対するカルパインの分解活性を、HC の減少量から測定することを試みた。Fig.

Fig. 3. Changes in electrophoretic pattern of carp myosin during incubation with calpain. Carp myosin was incubated with either carp calpain (A) or rabbit calpain (B) under the same conditions as described in Fig. 1. At an indicated time, the reaction was terminated by the addition of 20 mM EDTA (final concentration). Electrophoresis was performed on 5% (upper gels) and 10% (lower gels) polyacrylamide gels containing 0.1% SDS. 10 μg and 40 μg of the protein were applied to 5% and 10% gels, respectively. HC, myosin heavy chain; LC₁–LC₃, myosin light chains.

3 に示すように、HC はカルパインとの反応時間の経過とともに減少するので、残存する HC をデンストメーターで定量し、反応時間に対して半対数プロットをすると Fig. 4 の結果が得られた。なお、酵素量はカゼイン分解活性で表わした。

これによると、HC の減少は反応初期 (HC の約 60% が減少するまで) は速く、後期に遅い二段階の一次反応で減少することが示された。また、反応速度は、添加するカルパイン量に比例して大きくなることが示された。そこでコイとウサギのカルパインによる HC の初期の分解速度を比較すると、0.75 unit までは酵素量に比例して速くなることを示した。その結果を Fig. 5 に示す。

NaCl の存在はウサギとコイのカルパインに対して異なる影響を与えるため、¹⁾ Fig. 5 では 0.5 M NaCl 中で同一のカゼイン分解活性を示すコイとウサギのカルバ

Fig. 4. Decrease in carp myosin heavy chain during incubation with carp calpain. Carp myosin was incubated with carp calpain under the same conditions as described in Fig. 1 except that the amount of calpain was varied. SDS-Polyacrylamide gels were scanned at 640 nm. Peak area was proportional to the amount ($<10 \mu\text{g}$) of myosin heavy chain applied. The relative value (% of the initial value) of myosin heavy chain was plotted against incubation time. Amount of calpain added: $\square$, 0 unit/ml; $\circ$, 0.095 unit/ml; $\bullet$, 0.19 unit/ml; $\triangle$, 0.38 unit/ml; $\blacktriangle$, 0.76 unit/ml.

イン量をもちいておこなったが、ミオシン分解活性は、コイ・カルパインの方がウサギ・カルパインよりも約3倍高かった。すなわち、この反応条件下 (0.5 M NaCl 中) における両カルパインによるカゼイン分解の比活性は、コイ・カルパインが 147 unit/mg, ウサギでは 117 unit/mg であり,¹⁾ 一方ミオシン分解に対する比活性はコイ・カルパインで 735, ウサギ・カルパインで 188 $\mu\text{mol}\cdot\text{HC}/\text{min}\cdot\text{mg}$ と求められ、いずれもコイ・カルパインの比活性の方が高かった。なお、ウサギ・ミオシンはカルパイン量を 0.9 unit/ml まで増加しても全く分解されなかった。この時のミオシンとカルパインの量比 (重量比) は 650:1 であるが、さらにカルパイン量を 250:1 まで増加させても分解されなかった。

結果は図示しないが、カルパインのミオシン分解反応における Ca^{2+} 要求量は、カゼインの場合¹⁾と同様であり 0.3 mM 以下の Ca^{2+} の存在下では分解されなかった。また至適 pH は、コイ・カルパインで pH 7.0, ウサギで pH 7.2 で両カルパインとも至適 pH は中性付近にありカゼイン分解活性の場合¹⁾と同じであった。

次に、カルパインによるミオシンの限定分解反応に及ぼす温度の影響を 5~35°C の範囲で調べた。いずれの反応温度でも、Fig. 4 と同様に、HC の減少は一次反応に従うので、その速度定数 (k) を求めて、Table 1 に

Fig. 5. Effect of calpain concentration on the decrease in myosin heavy chain. Carp ($\circ$ and $\bullet$) and rabbit ($\square$ and $\blacksquare$) myosins were dissolved in the same medium as described in Fig. 1, and incubated at 25°C with different amount of carp ($\circ$ and $\square$) and rabbit ($\bullet$ and $\blacksquare$) calpains.

Table 1. Effect of temperature on the degradation rate of carp myosin heavy chain by carp calpain. The assays were carried out as described in Fig. 1, except that the reaction mixture was incubated at different temperatures

Temperature (°C)	Normalized first-order rate constant for decrease in myosin heavy chain $k \times 10^4 (\text{sec}^{-1} \cdot \text{unit}^{-1})$
5	3.3
10	5.7
15	8.7
17	12.3
20	16.0
25	40.7
30	115.0
35	644.0

示した。これによると温度の上昇とともに、k は急激に増大した。これをアレニウスプロットすると (Fig. 6), 20°C を境に高温域では急で、低温域では緩い勾配をもつ、折れまがる直線が得られた。20°C 以下と 20~30°C の活性化エネルギーを求めると、それぞれ 16.8 と 34.2 kcal/mol となった。カゼイン基質の場合は、このような屈折点は現われず 15~30°C にわたって 11.5 kcal/mol を示す直線となるので、¹⁾ 20°C 以下における HC の分解反応の活性化エネルギーと近似していた。したがって、20°C 以上での HC の分解反応はミオシンの

Fig. 6. Temperature dependence of the degradation rate of carp myosin heavy chain. The values shown in Table 1 were quoted in this figure.

熱変性の影響を受けていることが推定され、少なくともカゼイン分解の場合との比較から、カルパインの変化に基づくものではないと考えられる。一方、ウサギのミオシンは 35°C で 60 分間反応させても、全く分解されなかった。

次に、ミオシンの ATPase 活性に及ぼすカルパインの影響を調べた。この実験は Fig. 4 と全く同じ条件下でおこなったが、コイ・ミオシンの EDTA-ATPase 活性は、カルパイン処理をおこなわなくても、25°C で加温中に徐々に失活する（一次反応による変性速度定数 $2 \times 10^{-4} \text{ sec}^{-1}$ ）。また、カルパインを添加しても、ATPase の失活速度は、カルパインの量とは関係がなく変化しなかった。すなわち、ミオシンの ATPase 活性は熱変性によって低下し、HC の分解には影響されないことを示している。したがって、カルパインとの反応で生成する HC の分子断片は、ATPase 活性を保持していることを示唆している。

カルパインによるコイ・ミオシンの限定分解産物の性質 SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (Fig. 3) によると、コイの HC は、カルパインにより 170k と 43k 成分に分解されることが示されたので次に、これらのミオシン断片を単離して、その性質を調べた。

すなわち、ミオシンとカルパインの反応を経時的に EDTA を添加して停止したのち、未分解のミオシンを除くために 0.05 M NaCl, 20 mM Tris-acetate (pH 7.0), 0.1 mM EDTA, 10 mM 2-メルカプトエタノール溶液に対して透析し、100,000×g で 60 分間遠心分離し、沈殿を除去した。得られた上清液のタンパク量、EDTA-ATPase 活性および SDS-ポリアクリルアミドゲル

Fig. 7. Changes in the amount and EDTA-ATPase activity of soluble proteins formed from carp myosin during incubation with calpain. Carp myosin (5 mg/ml) was incubated at 25°C as described in Fig. 1 with either carp (0.1 unit/ml; ○ and ●) or rabbit (0.3 unit/ml; △ and ▲) calpain. The reaction was terminated by the addition of 20 mM EDTA (final concentration). The reaction mixture was dialyzed against a solution containing 0.05 M NaCl, 20 mM Tris-acetate (pH 7.0), 0.1 mM EDTA, and 10 mM 2-mercaptoethanol at 0°C and then centrifuged at 100,000 ×g for 60 min. The supernatant thus obtained was analyzed.

A) The protein concentration (○ and △) and EDTA-ATPase activity (● and ▲) of the supernatant.

B) SDS-Polyacrylamide gel electrophoretic patterns of the supernatants obtained from the myosin before (a) and after incubation with carp calpain for 10 (b), 20 (c), 30 (d) and 60 (e, f) min. An aliquot (20 μl) of the supernatant was applied on 5% polyacrylamide gels (a-e, M) and 10% gel (f) containing 0.1% SDS. M, myosin.

Fig. 8. Gel filtration profile of the soluble protein from carp myosin incubated with carp calpain. Carp myosin was incubated at 20°C as described in Fig. 1 with carp calpain (0.3 unit/ml) for 20 min. The soluble fraction (62 mg) obtained by the same procedures as in Fig. 7 was applied on a Sephacryl S-300 column (2.4×94 cm), and then eluted with 0.1 M KCl-20 mM Tris-acetate (pH 7.0). Fractions of 5 ml were collected at a flow rate of 12 ml/h. The fractions (No. 42–46) at void volume were pooled and analyzed by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis using 5% (a and b) and 10% (c and d) polyacrylamide gels (inset figures). a and c, myosin; b and d, the fraction pooled.

ル電気泳動図を、それぞれ Fig. 7, A と B に示した。これによると、上清液中に回収されるタンパク量 (Fig. 7, A, ○, △) は、反応時間の経過に伴って増加し、コイ・カルパインでは 40 分後に反応前のミオシン量の約 45%, ウサギ・カルパインでは 20 分後に約 32% に達した。また、上清液中の ATPase 活性も反応時間とともに増大し、上清液中のタンパク量が最大に達するときに最大値に達した。したがって、上清液中に生成する主なタンパク質は ATPase 活性を有する成分であることが示唆される。この上清成分の SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動図 (Fig. 7, B) によると、170k 成分および 3 本の LC バンドが検出された。一方、沈殿する成分の SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動図 (図示しない) は、主として HC および LC と、相対的に多量の 43k 成分から成っていた。それ故、170k 成分は水溶性の断片で 43k 成分は不溶性断片に由来することが推定される。

水溶性のミオシン分子断片の性質を詳細に検討するために、コイのカルパイン (0.3 unit/ml) で 20°C, 20 分間、コイのミオシンを処理したのち、前述の方法で上清液を集め、Sephacryl S-300 によってゲル透過をおこな

った (Fig. 8)。その結果によると、排除体積に主要な成分が溶出され、他の成分は非常に少なかった。また、この主要成分の SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動図は、170k 成分と 3 本の LC の成分および、極少量の 110k 成分から成っていた。また、主成分の Ca^{2+} および EDTA-ATPase 活性を測定し、ミオシンの同活性と比較すると、 Ca^{2+} -ATPase 活性は $0.24 \mu\text{mol Pi/min}\cdot\text{mg}$ となり、ミオシンと同程度か、あるいはやや高かったが、EDTA-ATPase 活性は $2.20\sim 2.32 \mu\text{mol Pi/min}\cdot\text{mg}$ で、ミオシンより 10~13% 低かった。また、この結果は、コイとウサギのいずれのカルパインをもちいても同じであった。続いて、 Mg^{2+} -ATPase の F-アクチンによる活性化を調べた。添加したアクチン濃度と Mg^{2+} -ATPase 活性の関係を両逆数プロットし、¹⁴⁾ その直線から V_{max} は $4.0 \mu\text{mol Pi/min}\cdot\text{mg}$ 、アクチンとの見掛けの親和力は、 $47 \mu\text{M}$ を得た。この結果はウサギ・カルパインを用いて得た水溶性ミオシン断片でも同じであり、さらに先に、木村らがコイ¹⁵⁾およびカツオ¹⁶⁾の heavy meromyosin (HMM) で得た値とほぼ近似している。

これらの結果から、カルパインはコイのミオシンをトリプシンで消化した場合と、極めて良く似たペプチド部位で切断し、水溶性の HMM に類似したタンパク成分を生成すると判断した。したがって、170k 成分はこの HMM 様タンパク質の HC に相当し、一方 43k 成分は light meromyosin (LMM) に類似したタンパク成分に相当している可能性が示唆される。

考 察

コイとウサギのミオシンを同一の反応条件下で、カルパインと反応させると、コイのミオシンはコイおよびウサギのいずれのカルパインによっても限定分解されることが示されたが、ウサギのミオシンは、全く分解されなかった。この結果は KANG ら⁶⁾の報告と一致している。一方、HARA ら⁴⁾および Ishiura ら³⁾は、それぞれサル心筋やニワトリ骨格筋のカルパインが、ウサギのミオシンを分解することを報告しているが、いずれの場合もカルパインを多量 (ミオシンとカルパインの重量比が 400:1 程度である) に用いた実験結果である。また、著者らの実験では 250:1 の場合も、ウサギのミオシンの分解は認められなかった。この相違の理由は、反応条件のちがいによるものと思われるが、その詳細はなお検討中である。しかし、カルパインによりミオシン LC が分解しないことは、本研究の結果とも一致している。

コイのミオシンの分解においては、コイのカルパインの方が、ウサギのそれよりも 3 倍以上高い活性を示し、またカゼインを基質にしても同様に、コイのカルパイン

の方が高い活性を示した。¹⁾ この事実は、コイとウサギのカルパインの種特異性を反映しているかもしれない。一方、上と同じ反応条件下ではウサギのミオシンが全く分解されなかったことから、ミオシンのカルパインによる分解には、カルパインの種特異性よりも、基質ミオシンの種特異性の方が強く反映されていることは、本研究の結果から明らかである。

カルパインによるコイ・ミオシンの分解生成物は、主として HMM および LMM に良く似た分子断片から成っており、他の成分は極めて少ないことから、カルパインはミオシンの極めて限定された部位に作用していることが示唆された。トロポニンやトロポミオシンのカルパイン分解も限定的であることがすでに知られている。¹⁷⁾

コイの HMM 様の成分は、すでにミオシン B からトリブシン消化により調製され、¹⁵⁾ その性質が調べられているので、ミオシンのカルパイン処理で得られた HMM 様タンパク質と比較すると、トリブシン消化によって得た HMM 様成分は HC の断片化が著しく、また DTNB-LC (LC₂) が消失しているが、カルパインで得た HMM 様タンパク質の HC はほとんど 170k の単一の成分からなり、また LC は 3 種類とも全て存在する点で異なっていた。しかし、Mg²⁺-ATPase 活性に対する F-アクチンの影響などは、両方で類似していた。

コイとウサギのミオシンに対するカルパイン作用の著しい違いは、両ミオシンの構造の相違に基づくことが推測されるが、従来、両ミオシンの HC の分子量は同じであるが、LC の分子量は異なっており、さらにコイ・ミオシンの方が熱安定性が著しく劣ることが知られている。¹⁸⁻²⁰⁾ なお、一般に、変性タンパクは、未変性のタンパクにくらべてプロテアーゼによる分解を受け易いが、カルパインも変性タンパクを良く分解する。³⁾ そこで、コイ・ミオシンの変性度がカルパイン分解に及ぼす影響を考察してみると、コイ・ミオシンを 25°C 以下で加温するとき、EDTA-ATPase の失活や、粘度の変化とはほとんど関係なく、ミオシンの HC の分解はカルパイン量にのみ依存して起っており、心ずしも上記の性質の変性がカルパインによるミオシンの限定分解のために必要ではないことが示された。しかし 20°C 以上の高温下では、ミオシンの熱変性により、カルパインとの反応速度が増大することが推定されたので、ミオシンの変性速度とカルパインによる分解の関係についてはさらに検討中である。

なお、本研究は高イオン強度下 (0.5 M NaCl 中) で溶解しているミオシンに対するカルパインの反応を検討したものであるが、コイとウサギのミオシンのカルパ

インに対する感受性の著しい相違は、直接筋肉細胞内のミオシン代謝の違いを反映しているとは考えにくい。そこで、低イオン強度下におけるミオシンに対するカルパインの反応について研究をし、その結果の一部を先に報じた*がその詳細は次報にゆずる。

本研究にあたり御指導をいただいた新井健一助教授に深謝します。また本研究の一部は文部省科学研究費補助金によっておこなったので記して感謝する。

文 献

- 1) 坂本慎一・山田祐三・関 伸夫: 日水誌, **51**, 825-831 (1985).
- 2) 種田貴司・渡辺孝博・関 伸夫: 日水誌, **49**, 219-228 (1983).
- 3) S. ISHIURA, H. SUGITA, K. SUZUKI, and K. IMAHORI: *J. Biochem.*, **86**, 579-581 (1979).
- 4) K. HARA, Y. ICHIHARA, and K. TAKAHASHI: *J. Biochem.*, **93**, 1435-1445 (1983).
- 5) W. R. DAYTON, W. J. REVILLE, D. E. GOLL, and M. H. STROMER: *Biochemistry*, **15**, 2159-2167 (1976).
- 6) C. G. KANG, M. MUGURUMA, Y. IKEUCHI, T. ITO, and T. FUKAZAWA: *Agric. Biol. Chem.*, **44**, 2077-2081 (1980).
- 7) 山田祐三・坂本慎一・関 伸夫: 日水誌, **51**, 1021-1028 (1985).
- 8) K. M. NAUSS, S. KITAGAWA, and J. GERGELY: *J. Biol. Chem.*, **244**, 755-765 (1965).
- 9) J. A. SPUDICH and S. WATT: *J. Biol. Chem.*, **246**, 4866-4871 (1971).
- 10) K. WEBER and M. OSBORN: *J. Biol. Chem.*, **244**, 4406-4412 (1969).
- 11) A. G. GORNALL, C. S. BARDAWILL, and M. M. DAVID: *J. Biol. Chem.*, **177**, 751-766 (1949).
- 12) R. F. ITZHAKI and D. M. GILL: *Anal. Biochem.*, **9**, 401-410 (1964).
- 13) C. H. FISKE and Y. SUBBAROW: *J. Biol. Chem.*, **60**, 375-400 (1925).
- 14) E. EISENBERG and C. MOOS: *J. Biol. Chem.*, **245**, 2451-2456 (1970).
- 15) 木村郁夫・高城茂展・高橋康弘・新井健一: 日水誌, **46**, 571-581 (1980).
- 16) I. KIMURA, K. ARAI, and S. WATANABE: *J. Biochem.*, **86**, 1629-1638 (1979).
- 17) W. R. DAYTON, J. V. SCHOLLMMEYER, R. A. LEPLEY, and L. R. CORTES: *Biochim. Biophys. Acta*, **659**, 48-61 (1981).
- 18) 高士令二: 日水誌, **39**, 197-205 (1973).
- 19) 高士令二・室塚剛志・新井健一: 日水誌, **40**, 1155-1161 (1974).
- 20) 木村郁夫・室塚剛志・新井健一: 日水誌, **43**, 795-803 (1977).

* 坂本慎一・関 伸夫: 昭和 58 年度日本水産学会春季大会講演要旨集, p. 242.