高濃度の塩存在下で起るコイミオシン B のアクチンと ミオシンへの解離

若目田 篤, 新井 健一

(1985 年 7 月 9 日受理)

Dissociation of Carp Myosin B into Actin and Myosin in the Presence of a High Concentration of NaCl

Atsushi Wakameda^{*1*2} and Ken-ichi Arai^{*1}

Carp myosin B was treated at 10°C in a medium containing 2.0 M NaCl and 40 mM Tris-maleate (pH 7.0) and its physico-chemical properties were examined with a lapse of time. During the treatment of myosin B with NaCl, (1) the viscosity ($\ln \eta_r/C$) of myosin B decreased, (2) the 22S component in the ultracentrifugal sedimentation pattern disappeared accompanied by a product of 5S component, (3) actomyosin fraction at void volume in the Sepharose Cl-4B gel filtration decreased with a formation of myosin fraction (elution volume/void volume=2.3), (4) of the supernatant from myosin B by salting out with 40% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ saturation, the intensities of bands corresponding to myosin (identified by SDS polyacrylamide gel electrophoretic pattern) increased, and (5) the amount of myosin bands increased further by the co-presence of ATP and NaCl.

These results suggested that the reaction between myosin B and a high concentration of NaCl may proceed through the dissociation process of myosin B into actin and myosin.

従来、著者らは筋原繊維 (Mf) たんぱく質と中性塩 (特に NaCl) との反応について研究し、以下のような結果を明らかにした。すなわち、Mf たんぱく質は塩と反応し Mf Ca-ATPase の熱変性速度を速め、また、同たんぱく質溶液の粘度の低下速度を大きくするが、この反応の速さは魚種によって異なり、グチとコイで比べると、0.3 M 以上の塩濃度で相違が大きくなり、グチの Mf たんぱく質の方が反応し易いことが示された。^{1,2)} また、塩との反応によってミオシン B (MB と略す) 中のアクチン部分が速やかに変性し、³⁾ その量は MB 中の同成分含量の 60% に達することを示した。⁴⁾ しかし、MB 中のミオシンの挙動についてはまだ研究が充分行なわれていない。

本研究では、コイの MB について、高濃度の塩の存在下で起る粘性、超遠心沈降図、およびゲル濾過の溶出図など、理化学的諸性質の変化を測定し、主に MB 中におけるミオシン部分の動き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 コイ *Cyprinus carpio* のミオシン

ン B の調製は高士らの用いた方法⁵⁾ を一部改良して行った。

ミオシン B の塩処理とその停止法 ミオシン B (2~3 mg/ml) を 2.0 M NaCl を含む 40 mM Tris-maleate (pH 7.0) 溶液として 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 の一部を経時的に取り出し、ただちに 0.5 M KCl-40 mM Tris-maleate (pH 7.0) 溶液に 2~4°C で透析して NaCl 濃度を低下させ、塩処理を停止させた。なお、0.3 または 0.5 M NaCl-40 mM Tris-maleate (pH 7.0) 溶液の条件で上と同様に処理し、透析したものを対照 (未処理 MB とよぶ) とした。

粘度の測定 粘度はオストワルド粘度計 (試料の容量は 2.0 ml で、溶媒の流速は 50~100 秒のもの) を用い、 $10 \pm 0.05^\circ\text{C}$ で測定した。測定値は以下に示す粘度数 ($Z\eta$) で表わした。⁶⁾

$$Z\eta = \ln \eta_r / C, \quad \eta_r = \eta / \eta_0$$

ここで η_0 , η および C は、溶媒の流出時間、MB の流出時間、およびたんぱく質濃度 (mg/ml) を示す。

超遠心沈降分析 超遠心による MB の沈降図は、シュリーレン光学系を装備した Beckman L 2-65 B 型超

^{*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} 現住所: 大洋研究所 (Present address; Research Laboratory of Taiyo Fisheries Co. Ltd., Chūō, Tokyo 104, Japan). 略語: SDS, sodium dodecylsulfate; EDTA, ethylenediamine tetraacetate.

遠心分離機を用い, 39,400 rpm, 10°C, たんぱく質濃度 2.5 mg/ml で撮影した。また, たんぱく質の偏比容を 0.74 として,⁷⁾各ピークの沈降速度, $S_{20,w}$ を求めた。

Sephacrose Cl-4B によるゲル濾過 ゲル濾過は, Sephacrose Cl-4B を用い, 0.5 M KCl-20 mM Imidazole-HCl (pH 7.0) 溶液で平衡化したカラム (2.6×100 cm) によって行った。負荷するたんぱく質量は 17 mg とし, 流速は 18 ml/h で, 上記の溶液を用いて溶出を行い 5 ml ずつを分画した。各画分のたんぱく質濃度はマイクロビウレット法⁸⁾で測定した。また, ピークの溶出位置は (V_e/V_0) で示したが, V_0 は void volume, V_e は elution volume である。

SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 0.05% SDS を含む 10% ポリアクリルアミド・スラブゲル (Tris-glycine 緩衝液) を用い,⁹⁾染色には Coomassie Brilliant Blue R を使用した。

たんぱく質濃度は, ゲル濾過の場合を除きビウレット法¹⁰⁾により, 牛血清アルブミン画分 V を標準として比色定量した。

結 果

ミオシン B の粘度に及ぼす塩処理の影響 コイの MB を 2.0 M NaCl で処理したときの粘度数の変化を測定し, 結果を Fig 1 に示した。すなわち, MB (3.2 mg/ml) を 10°C で 1~180 分間にわたって塩処理し, 透析した後粘度を測定した。これによると, 未処理の MB の粘度数はたんぱく質濃度 1.0~2.5 mg/ml の間で一定値, $0.45 \text{ (mg/ml)}^{-1}$ を示し, この値はウサギやコイの MB について報じられた値^{5,8)}と良く一致している。一方, 塩処理の時間の進行に伴い MB の粘度数は徐々に低下し, 1 分後には 0.37 , 1 時間後には 0.25 , そして 3 時間後には $0.23 \text{ (mg/ml)}^{-1}$ となり, ほぼ最低の一定値に達した。また, 未処理の MB はたんぱく質濃度が 2.5 mg/ml 以上で異常粘性¹¹⁾を示したが, 塩処理後の MB はいずれも示さなくなった。なお, この粘度低下の反応は不可逆であり, 透析によって塩濃度を低下させても粘度は回復しない。²⁾

以上の事実から, コイの MB は塩処理によって著しく大きな構造変化をひき起すことが強く示唆される。そ

Fig. 1. Protein concentration dependence of NaCl-treated myosin B.

Carp myosin B was treated at 10°C in a medium containing 2.0 M NaCl and 40 mM Tris-maleate (pH 7.0). After the treatment with NaCl for 15 (Δ), 60 (□), and 180 (●) min, a portion of which was taken out to dialyze against 0.5 M KCl and 40 mM Tris-maleate (pH 7.0) at 2–4°C. The dialyate was used to measure the viscosity, using an Ostwald-type viscometer having a flow time of 50–100 s at a protein concentration of 1.0–3.5 mg/ml. As a control (○), myosin B treated with 0.5 M KCl in place of 2.0 M NaCl for 180 min, was subjected to dialysis and used for the measurement of viscosity in the same way as above. The viscosity number ($Z\eta$) was calculated using the following relation, $Z\eta = \ln \eta_r / C$, where η_r and C are the relative viscosity and the protein concentration (mg/ml).

こで、次に塩処理した MB の超遠心による沈降分析を行った。

塩処理をしたミオシンBの超遠心沈降図型 未処理の MB および塩処理した MB の超遠心による沈降図型を、たんぱく質濃度が 2.5 mg/ml, 39,400 rpm で測定し、結果を Fig. 2 に示した。まず、未処理の MB の図型を見ると、初め沈降速度が 22 S の hypersharp peak が主成分として現れ、その後に 16 S の小さな成分も認められた。これら2つの成分は 60 分後には沈降セルの中央付近まで移動したが、他の成分は現れなかつ

た。次に、塩処理を 15 分間行った MB について見ると、初めに 26 S の hypersharp peak が出現するが、これは沈降に伴ってやや小さくなり拡散する傾向を示し、その他、16 S の小さな成分も混在していた。また、これらの成分は 60 分後にはやはり沈降セルの中央に達したが、そのときさらに遅れて 3~5 S の小さなピークが沈降してくることが見出された。なおまた、塩処理を 1 時間あるいは 3 時間行った MB の図型を見ると、両図型は良く似ており塩との反応はほぼ 1 時間で終了していることを示唆した。また、初めに現れる 22-26 S の成分は、

Fig. 2. Change in the ultracentrifugal sedimentation pattern of myosin B during NaCl-treatment.

Carp myosin B was treated with 2.0 M NaCl for 15, 60, 180 min or with 0.5 M NaCl for 180 min (as a control) and dialyzed as described in Fig. 1. All runs were conducted at 39,400 rpm and at 10°C (bar angle 65°). The solvent used was 0.5 M KCl and 40 mM Tris-maleate (pH 7.0). Photographs were taken at 5, 15, 30, and 60 min after reaching the top speed. Protein concentration is 2.7 mg/ml.

塩処理時間が 15 分間以上になると, 明らかに減少して小さなピークとなり, さらに沈降に伴って拡散し消失する傾向を示した。これに対応するように, 遅れて沈降してくる 3~5S のピークは大きくなる傾向を示したが, 16S のピークは塩処理によりほとんど変化しなかった。

以上の事実, 塩処理によってアクトミオシンに相当する成分 (22~26S) が減少して, その代りにミオシンと推定される成分 (3~5S) が新たに生成したことを示唆している。すなわち, この沈降速度 (3~5S) は他の魚類筋肉から精製したミオシン単量体の値^{12,13)}と良く近似しており, さらに, MB に 5 mM ATP と 1 mM $MgCl_2$ を添加すると同じ 3~5S の成分が顕著に増加することが上記の推定を支持している。

塩処理によるミオシン B のゲル透過溶出図の変化 塩処理の前後における MB のゲル透過溶出図型の比較を Fig. 3 において行った。すなわち, 未処理の MB の場合 (A) と塩処理 1 時間後の MB の場合 (B) を示したが, 未処理の MB は, $(V_e/V_0)=1.1$ の溶出位置 (a 画分とする) および $(V_e/V_0)=2.3$ の溶出位置 (b 画分とする)

の 2 つの成分から成っていた。a 画分は約 90% を占めていることからアクトミオシンに相当する成分と考えられ, 一方, b 画分は, 後で SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動図が示すように, 主にアクチンとトロポミオシンから成っており, 少量ではあるが遊離状態のアクチンが MB 中に存在することを示した。なお, 本方法では負荷したたんぱく質の 95% が回収された。次に, 塩処理を 1 時間行った MB の場合であるが, 上記と同じ $(V_e/V_0)=1.1$ の a 画分に続いて, $(V_e/V_0)=1.4$ の位置に新しい成分 (c 画分とする) が溶出され, さらに $(V_e/V_0)=2.3$ の b 画分が溶出した。そして, この場合も負荷したたんぱく質の 95% が回収された。この結果を未処理の MB の場合と比べると, アクトミオシンに相当している a 画分が減少し, それに対応して c 画分が生成し, かつ, b 画分の後半部が増加すると言う結果となるが, この c 画分と b 画分は, 後で SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動が示すようにそれぞれミオシンとアクチンに相当する成分である。実際に, c 画分の溶出位置は対照として行った精製ミオシンの位置と良く一致している。そこで, Fig. 3 のゲル透過によって分

Fig. 3. Change in the elution profile of myosin B in Sepharose Cl-4B gel filtration by NaCl-treatment.

Carp myosin B was treated with 2.0 M NaCl (A) or with 0.5 M NaCl (B) for 180 minutes and dialyzed as described in Fig. 1. The dialyzates (each 17 mg of myosin B) were applied on a column (2.6×100 cm) equilibrated with 0.5 M KCl and 20 mM Tris-maleate (pH 7.0), then eluted with the same solution at a flow rate of 18 ml/h. Fractions of 4.8 ml were collected and each fraction indicated with the bar (of a, b, and c) was pooled and used for the various assays. The protein concentration in the fraction was determined by the micro-biuret method. The arrows indicate the void volume (V_0).

(A) control (untreated), (B) NaCl-treated.

離された各画分中のたんぱく質の相対含量を求め、全たんぱく質量に対する百分率を算出した。それによると、Fig. 3 で用いた塩処理の条件下では a 画分のたんぱく質量は 88% から 37% まで減少した。一方、c 画分は 0 から 44.5% に、また、b 画分は 11.8% から 18.5%

まで増加すると言う結果を示し、a 画分の減少は c と b 画分の増加に良く対応していた。

次に、ゲル濾過で分離した各たんぱく質画分のサブユニット組成を、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動法によって分析し、結果を Fig 4 に示した。これによ

Fig. 4. The SDS-polyacrylamide gel electrophoretic patterns of the eluted fractions of NaCl-treated myosin B in gel filtration.

The eluted fraction (indicated as a, b, and c with the bars in figure 3) from Sepharose Cl-4B were subjected to the analysis of subunits protein composition. The numbers over the patterns indicate the fraction numbers in the gel filtration. The SDS-polyacrylamide gel electrophoresis was carried out by the method of Laemmli, using 10% polyacrylamide slab gel containing 0.1% SDS. The protein bands were stained with Coomassie Brilliant Blue R.

HC, A, TM, and LC are myosin heavy chain, actin, tropomyosin, and myosin light chains, respectively.

(A) control (untreated), (B) NaCl-treated.

ると、a と b 画分のサブユニット組成は未処理および塩処理 MB の間で同じであり、a 画分はミオシン重鎖 (HC) と軽鎖 (LC) およびアクチン (A) に相当するバンドと微量のトロポミオシン (TM) とトロポニン (TN) に相当するバンドから成っていた。ただし、この画分中の HC に対する A の量比 (染色強度) は塩処理後の MB の方が明らかに大きく、A が増量していることを示した。さらに b 画分中の A 量も塩処理で著しく増量することが示されている。しかし、b 画分の前半部に含まれる TM と TN に相当する成分はほとんど変化しなかった。なお、塩処理した MB 中にのみ認められる c 画分は多量の HC と LC から成りミオシンであると考えられる。

さらに、ゲル透過で分離した各画分の生化学的性質を検討した。それによると、a 画分のたんぱく質は高い Mg-ATPase 活性⁹⁾を示し、Ca-ATPase の熱変性速度は先に報じたコイのアクトミオシンの速度¹⁴⁾と一致した。次に、b 画分のたんぱく質は別に調製したミオシンの Mg-ATPase を活性化せず、かつ、EDTA-ATPase

活性を阻害しないので、²⁾ 変性したアクチンであるように考えられる。また、c 画分のたんぱく質は単独では Mg-ATPase 活性を全く示さないが、別に調製した F-アクチンを加えると強く活性化を受けること、さらに、その Ca-ATPase の熱変性速度がコイのミオシンの既報の値¹³⁾と一致すること、さらに、F-アクチンを加えて構成したアクトミオシンの熱変性速度はコイの MB のそれ¹⁴⁾と一致することなどから、解離したミオシンであると結論される。

以上述べた全ての事実は、MB を塩処理するとアクトミオシンの一部が解離して、未変性のミオシンと変性したアクチンを生成することを明らかにしたが、仮に MB の約 55% がミオシンであるとして、¹⁵⁾ 解離するミオシン量を概算すると、その値は約 80% に達すると言う結果となった。

塩処理によるミオシン B のたんぱく質組成の変化 塩処理中の MB の一定量を経時的に取り出し、透析して 0.5 M KCl, pH 7.0 溶液にした後、40% 飽和になるように $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ を加えて塩析し、上清に残るたんぱく

Fig. 5. The SDS-polyacrylamide gel electrophoretic patterns of the supernatant by salting out with $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ saturation of NaCl-treated myosin B.

Carp myosin B was treated with 2.0 M NaCl for 1 (a), 15 (b), 30 (c), 60 (d), and 180 (e) min or with 0.5 M NaCl for 180 (f) min and dialyzed as described in Fig. 1. To a portion of thus treated myosin B, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ was added to make 40% saturation and kept for 30 min. To another portion of the NaCl-treated myosin B for 15 (g) and 180 (h) min or to the untreated myosin B (i), ATP was added to make a final concentration of 1 mM and then fractionated with $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ as described above. By centrifugation at $10,000 \times g$ for 30 min, the supernatant was obtained and a fixed volume of it was loaded on the SDS-polyacrylamide gel column. Intact myosin B was also analyzed for reference. The method for SDS-gel electrophoresis was the same as in Fig. 4.

質のサブユニット組成を、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動法によって分析し、結果を Fig. 5 に示した。これによると、未処理の MB (f) の場合は微量の TM および TN に相当するバンドだけが見出され、HC と A に相当するバンドは認められなかった。一方、塩処理した MB の場合は処理時間の経過に伴い (a→e)、HC と LC に相当するバンドが徐々に増加する傾向を示し、また、TM と TN のバンドも僅かに増加した。しかし、A に相当するバンドは全く見られず完全に塩析されていることを示している。

次に、未処理の MB (i) と塩処理 30 分 (g) および 180 分 (h) 後の MB に終濃度 1 mm の ATP を加え、同様に硫酸分画を行い、上清を SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供した結果も Fig. 5 に示した。この結果によると、いずれの MB の場合も ATP 存在下で硫酸分画したときの方が、明らかに多量の HC に相当するバンドが上清液中に出現した。また、無処理の MB よりも塩処理した MB の方が多量の HC 相当のバンドを示したが、処理時間が 15 分と 180 分間の MB の間に余り大きな差異は認められなかった。

これらの事実は、塩処理によって MB 中のアクチンとミオシンの結合が著しく弱まり、解離を促すが、アクトミオシンの全部が解離するわけではなく、また、残存しているアクトミオシンは ATP による解離能を保持していることを示している。

考 察

著者らは、先に高濃度の塩によって MB 中のアクチンが速やかに変性、解離し、低イオン強度溶液に可溶化すること、さらに、その量は MB 中に含まれるアクチン量の約 60% に達することを示した。⁴⁾ 一方、本研究の結果から、同じ塩処理によって MB 中のミオシンもまた解離しており、その量は MB 中のその約 80% に達することが示された。したがって、解離しているアクチンも 80% に相当することになるが、この値が前報の値と一致しない理由は明らかでない。しかし、いずれにせよ、MB 中のアクトミオシンの過半量がアクチンとミオシンに解離していることは確実である。一方、アクトミオシンの一部分が解離しないままに残存している理由も不明であるが、MB 標品中に変性した MB が既に含まれており、それが塩との反応性を示さず解離しない性質を担っていると言う可能性、あるいは、塩によって MB の一部分に構造変化が起り、塩との反応性を失われる可能性などが考えられる。そこで MB に 0.5 mm ATP と 1 mm $MgCl_2$ を加えて、Sephrose Cl-4B でゲル濾過を行った。その結果は図示しないが、アクトミ

オシンの 90% 以上が消失し、それに対応する量のミオシンが生成した。この事実は、用いた MB 標品中に塩によって解離しにくいアクトミオシンが在るとしても、その量は僅か 10% 以下であり、これは塩処理した MB 中に解離せずに残存するアクトミオシン量を説明する程多量ではなかった。したがって、高濃度の塩によって MB がアクチンとミオシンに解離する反応は、ATP による解離反応とはなんらかの点で異なっており、言い換えれば、塩によって高次構造が変化したアクトミオシンが形成される可能性が大きいと推定している。この推定がおそらく正しいことは、塩処理によって MB 溶液に起る粘度の低下速度が、MB からミオシン (またはアクチン) が解離する速度よりも見かけ上大きいことから支持されるものと考ええる。

塩によって構造変化した MB の生化学的性質については既に報じたが、³⁾ 上記の結果からこれは複数のたんぱく質混合物の性質に相当していることになる。さらに、塩処理した MB をゲル濾過した結果によると、解離したアクチンはアクトミオシンが溶出する a 画分とトロポミオシンが溶出する b 画分にわたって出現した。それ故、解離したアクチンの分子サイズはかなりの広い範囲に分散していると推定される。¹⁵⁾ おそらく、このような理由で、解離したアクチンは超遠心沈降図上に明瞭なピークを形成しなかったものと思われる。

超遠心沈降図中に見られた 16 S の成分は何であるかまだ不明であるが、少量である上、塩処理中に変化しないので論議から除いた。また、塩処理中に MB の主ピークの沈降速度が 22 S から 26 S まで僅かに増加する原因は、おそらく、MB の濃度変化や高次構造の変化が影響しているものと考えられる。

塩処理によって、変性したアクチンと未変性のミオシンが、MB から解離する反応の機構については、初めにアクチンが選択的に変性し、結果としてミオシンと解離するのか、または、アクチンとミオシンが解離し易くなる結果、アクチンが変性するのか、未だ検討中である。しかし、あらかじめ ATP を MB に加えてから塩処理をすると、より低い塩濃度においてさえも変性したアクチンの解離が起ってくるようになるので、^{*1)} おそらく、塩による両たんぱく質の解離が初期の反応段階であるように推定している。その詳細は次報にゆずる。

本研究は、文部省科学研究補助金によって行われたので、ここに記して感謝致します。

文 献

- 1) 若目田 篤, 野澤誠子, 新井健一: 日本誌, **49**, 237-243 (1983).

* 若目田 篤, 新井健一: 昭和 60 年度日本水産学会講演要旨集 p. 235.

- 2) 若目田 篤, 新井健一: 日水誌, **49**, 643-653 (1983).
- 3) 若目田 篤, 新井健一: 日水誌, **50**, 635-643 (1984).
- 4) 若目田 篤, 新井健一: 日水誌, **51**, 497-502 (1985).
- 5) 高士令二, 新井健一, 齊藤恒行: 日水誌, **36**, 169-172 (1970).
- 6) H. H. Weber and H. Portzehl: *Adv. Protein Chem.* (ed. by M. L. Anson, K. Bailey, and T. T. Edsall) Vol. 7, Academic Press, New York, 1952, p. 267.
- 7) 林 勝哉: 蛋白質の分子量・分子形, 学会出版センター, 東京, 1971, pp. 18.
- 8) R. F. Itzhaki and D. M. Gill: *Anal. Biochem.*, **37**, 149-154 (1964).
- 9) U. K. Laemmli: *Nature*, **227**, 680-685 (1970).
- 10) A. G. Gornall, C. J. Bardwill, and M. M. David: *J. Biol. Chem.*, **177**, 751-756 (1946).
- 11) 川出由己: 生物物理化学実験法 (渡辺 格, 島内武彦 編) 培風館, 東京, 1962, pp. 34.
- 12) 室塚剛志: 日水誌, **42**, 163-169 (1976).
- 13) 高士令二, 室塚剛志, 新井健一: 日水誌, **40**, 1151-1161 (1974).
- 14) 新井健一, 川村久美子, 林千恵子: 日水誌, **39**, 1077-1085 (1973).
- 15) I. A. Johnston and G. Goldspink: *Nature*, **257**, 620-622 (1975).
- 16) B. Nagy and W. P. Jencks: *J. Am. Chem. Soc.*, **87**, 2480-2488 (1965).