ピロリン酸塩と MgCl_2 の存在下で起るコイ・ミオシン B の変性機構

八 木 浩, 新 井 健 一

(1986 年 1 月 16 日受理)

Denaturation Mechanism of Carp Myosin B in the Presence of Inorganic Pyrophosphate and MgCl_2

Hiroshi Yagi* and Ken-ichi Arai*

The changes in biochemical and physico-chemical properties of carp myosin B, induced by addition of inorganic pyrophosphate (PPi) and MgCl_2 were investigated.

The myosin B solution (0.3 or 0.5 M KCl-40 mM Tris buffer, pH 7.0) was mixed with PPi and MgCl_2 giving a final concentration of each 1 mM. Soon after or after storage for various periods at 10°C, the mixture was dialyzed overnight to exclude PPi and MgCl_2 and fractionated by centrifugation at $79,000 \times g$ for 5 h at 5°C. The supernatant thus obtained was used for measurements viscosity, its ATP-sensitivity, thermal inactivation mode of Ca-ATPase activity, and subunits composition.

These results indicated that when PPi and MgCl_2 were mixed, 45% of myosin B weight value was reversibly dissociated into actin and myosin, but 40% of it was irreversibly transformed to unsedimented form of actomyosin by ultracentrifugal fractionation. As the storage time was prolonged, these alterations gradually proceeded further.

冷凍すり身に添加されている重合リン酸塩の効果を明らかにするため、著者らは先に、魚類の筋原繊維 (Mf) タンパク質に対する重合リン酸塩の作用について研究を行った。^{1,2)} すなわち、重合リン酸塩がすり身の貯蔵の段階および塩ずりの工程で Mf タンパク質に作用する可能性を考え、低いイオン強度、¹⁾ および高いイオン強度下²⁾ における Ca-ATPase 活性の熱変性速度に及ぼす効果を検討した。その結果、重合リン酸塩はイオン強度 (I) が 0.1 を大きく越えないように、そして pH が中性を保つように添加されたときに、Mf タンパク質を安定化しその貯蔵性を高めること、また、塩ずりの工程では I を高め Mf タンパク質の熱変性を速める効果を示すが、特にピロリン酸塩と MgCl_2 が共存する場合には、Mf タンパク質の変性は低温下においてさえも著しく速くなる事実を明らかにした。

以上の経緯に基づき、本研究では、低温で、高い I の下で Mf タンパク質がピロリン酸塩と MgCl_2 によって変性する機構を解明することを目的とした。

実験方法

ミオシン B の調製 新鮮なコイ *Cyprinus carpio* の背肉から、高士ら³⁾の報じた方法に従ってミオシン B (MB)

を調製し、0.3 M KCl (主に超遠心分析に使用) または 0.5 M KCl (主に粘度と硫酸塩析の検討に使用) を含む 40 mM Tris-maleate (pH 7.0) 溶液とした。

ピロリン酸塩と MgCl_2 共存下における MB の粘度の測定 タンパク質濃度が 2.0 mg/ml の MB 溶液 (0.5 M KCl-40 mM Tris-maleate, pH 7.0) をオストワルド粘度計中で約 5 分間恒温化 (10°C) した後、終濃度が最高 10 mM に至る種々の濃度のピロリン酸塩と、最高 1 mM に至る種々の濃度の MgCl_2 を添加して、24 時間後まで経時的に粘度を測定した。なお、添加に伴う pH の上昇を避けるため、使用するピロリン酸ナトリウム (以下 PPi とする) を予め HCl で pH を 7.0 に調節した。粘度は粘度数 ($Z\eta$)⁴⁾ で表わし、次の関係式によって算出した。 $Z\eta = \ln \eta_r / C$, $\eta_r = \eta / \eta_0$, ここで η_0 は溶媒の流出時間, η_r は MB 溶液の流出時間, また, C はタンパク質濃度 (mg/ml) である。

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ による MB の分画とサブユニット組成の測定 タンパク質濃度が 2.0 mg/ml の MB 溶液 (0.5 M KCl-40 mM Tris-maleate, pH 7.0) に対して、終濃度が共に 1 mM になるように PPi と MgCl_2 、または ATP と MgCl_2 を添加した後、0~50% の間の種々の飽和濃度となるように $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (硫酸) を添加し、10°C で

* 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).

30 分間放置した後, $10,000\times g$ で 30 分間遠心分離を行った。得られた沈殿を 0.5 M KCl (pH 7.0) 溶液に溶解してタンパク質量を測定し, 硫酸の飽和濃度に対してプロットし塩析曲線を描いた。また, 上清液中のタンパク質サブユニット成分を SDS*-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法で解析した。方法はスラブゲルと Tris-glycine 緩衝液を用いた Laemmli¹³⁾ の方法をカラムゲルに応用した。供試量は Coomassie Brilliant Blue R による染色強度とタンパク質量の間に比例関係が成立する $10\text{ }\mu\text{g}$ 以下にした。染色強度の測定はクロマトスキャナー (島津 CS-910 型) を使用した。

MB の超遠心分離による分画とサブユニット組成の測定 タンパク質濃度が 0.2 mg/ml の MB 溶液 (0.3 M KCl-40 mM Tris-maleate, pH 7.0) に対して, 終濃度が共に 1 mM となるように PPI と MgCl_2 , または ATP と MgCl_2 を加えた。これらの混合液を $79,000\times g$ で 5 時間 (5°C) 遠心分離し, 上清液中のタンパク質の生化学的性質, およびサブユニット組成を測定した。

MB の ATPase 活性の測定 MB の Ca^{2+} , EDTA-, および Mg -ATPase 活性 (EC 3.6.1.3) の測定は, 前報^{1,2)} および若目田らが採用した条件下^{6,7)} で行い, 遊離する無機リン酸量を Gomori の方法⁸⁾ で比色定量した。また, Ca -ATPase の熱変性速度恒数 (K_D) を次式から求めた。 $K_D = (\ln C_0 - C_t)/t$, ここで C_0 および C_t は加熱時間 t 秒前後における活性の相対値を示す。

タンパク質濃度の測定 タンパク質濃度は牛血清アルブミンV画分を標準とし, ビウレット法⁹⁾ により比色定量した。なお, 硫酸が共存すると発色が阻害されるため, タンパク質溶液に対して 4 倍量の 6.25% (w/v) トリクロール酢酸を添加し, 沈殿したタンパク質を遠心分離によって集めた後, ビウレット法を適用した。

実験結果

ピロリン酸塩と MgCl_2 の添加による MB の粘度の経時変化 初めに, MB 溶液に対して終濃度 10 mM の PPI だけを添加し, 経時的に粘度を測定したが, 24 時間後まで変化は起らなかった。次に, MB 溶液に対して終濃度が 0~10 mM の種々の濃度の PPI と, さらに 1 mM の MgCl_2 を添加すると, 粘度の経時変化が起るので, その結果を Fig. 1(A) に示した。また, MB 溶液に対して終濃度 1 mM の PPI と, 0~1.0 mM の間の種々の濃度の MgCl_2 を添加して, 経時的に粘度を測定した結果を Fig. 1(B) に示した。これによると, PPI と MgCl_2 を同時に添加すると, MB の粘度は直後に大きく低下し, その後緩慢に低下して約 12 時間後に最低値

Fig. 1. Decrease in viscosity of myosin B, induced by addition of PPI and MgCl_2 .

To carp myosin B (2.0 mg/ml in 0.5 M KCl and 40 mM Tris-maleate, pH 7.0), various concentrations of PPI (inorganic pyrophosphate) and MgCl_2 were added. The viscosity of myosin B was measured at 10°C with a lapse of time, using a Ostwald type viscometer having a flow time of 60–80 s for a 2.0 ml of solvent. Sodium inorganic pyrophosphate in aqueous solution was neutralized with HCl and used for experiment. The viscosity was expressed as the viscosity number ($Z\eta$) by the following equation, $Z\eta = \ln \eta_r / C$, where η_r and C are the relative viscosity and protein concentration (mg/ml), respectively.

(A) varied concentrations of PPI with 1.0 mM MgCl_2 . 0 (●), 0.1 (○), 0.3 (△), 0.5 (□), 1.0 (▽), and 10.0 (▲) mM of PPI.

(B) varied concentrations of MgCl_2 with 1.0 mM PPI. 0 (●), 0.1 (○), 0.5 (△), and 1.0 (□) mM of MgCl_2 .

に達する傾向を示した。なお, PPI および MgCl_2 の濃度が増加するに伴って粘度の低下度合も増加するが, 1 mM においてほぼ最大の低下度に達し, それ以上 10 mM までの間ほとんど差異が見られなかった。この結果は MB の Ca -ATPase の熱変性速度に対する PPI と MgCl_2 の効果が, それぞれ 1 mM 添加したときに最大に達すると言う前報²⁾ の結果と良く対応している。

ピロリン酸塩と MgCl_2 の添加による MB ATPase 比活性の変化 MB 溶液 (0.3 M KCl, pH 7.0) に終濃度が各 1 mM の PPI と MgCl_2 を加え, 10°C で 24 時間保管する間の ATPase 活性を測定した。すなわち, 経時的に MB の一部をとり出し, 0.3 M KCl, pH 7.0 溶液に透析して塩類を除去した後, Ca^{2+} , EDTA-, および Mg -ATPase 活性を測定した。その結果, 保管中に活性値はほとんど変化せず, それぞれ, 0.50, 1.10, および

* Sodium Dodecylsulfate

0.45 μ mol Pi/min·mg of protein) を保持していた。

ピロリン酸塩と MgCl₂ を添加した MB の硫安分画とたんぱく質サブユニット組成の変化 MB 溶液に対して PPI と MgCl₂ を加えずに、種々の飽和濃度になるように硫安を添加し塩析されるタンパク質量を測定して塩析曲線を Fig. 2 (A) に示した。また、塩析されない上清液中のタンパク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図により検討した。硫安の飽和濃度が異なると得られる上清液の容量が異なるため、この実験では、便宜上上清液中のミオシン重鎖 (HC) およびアクチン (A) に相当する成分量 (染色強度) をトロポミオシン (TM) 量に対する割合で表わし、Fig. 2 (B) に示した。これは TM が硫安の飽和度が 50% でも塩析されず、上清中に全て含まれるため基準として好ましいからである。Fig. 2 によると、本来 MB は 30~35% 飽和濃度で塩析される単一画分から成り、この画

Fig. 2. Salting-out profile of myosin B with (NH₄)₂SO₄.

To 3 ml of myosin B (2.0 mg/ml in 0.5 M KCl and 40 mM Tris-maleate, pH 7.0), saturated (NH₄)₂SO₄ solution was added to make its final concentration to various saturations. By centrifugation at 10,000 $\times$ g for 30 min, the supernatant and the precipitate fractions were separated.

(A) The precipitate was solubilized into 2 ml of 0.5 M KCl and 40 mM Tris-maleate, pH 7.0. The protein concentration (○) was demonstrated as an absorbance at 560 nm by the biuret method. The change in the absorbance at 560 nm for each 5% increment of (NH₄)₂SO₄ saturation (Δ) was calculated.

(B) The supernatant fraction was subjected to SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and the staining density with Coomassie Brilliant Blue R of the bands corresponding to myosin heavy chain (HC), actin (A), and tropomyosin (TM) were measured. Relative values of HC/TM (○) and A/TM (Δ) were then calculated.

分のサブユニット組成はアクトミオシンを構成する化学量論的な HC と A 量¹⁰⁾ から成っていた。したがって、この塩析画分は未変性のアクトミオシンに相当するが、HC/TM および A/TM は 8.15 および 2.2 であった。

次に、MB 溶液に対してそれぞれ 1 mM の ATP と MgCl₂ を添加した後、ただちに種々の飽和濃度の硫安を加えて塩析曲線を求め Fig. 3 (A) に示した。また、上清液中のタンパク質サブユニット組成を分析した結果を Fig. 3 (B) に示した。これによると、ATP と MgCl₂ を添加した MB は 20% および 42% 飽和濃度において塩析される 2 つの画分から成り、添加前に認められた 30~35% 飽和濃度の画分は消失した。また、上清中のタンパク質サブユニット組成から見ると 20% 飽和濃度で塩析される画分は A であり、また 42% 飽和濃度の塩析画分は HC に相当することが示され、各画分の A/TM および HC/TM はそれぞれ 2.4 と 8.12 であった (Fig. 3 (B))。したがって、MB は ATP と MgCl₂ によって A とミオシン (M) に完全に解離し、別々に塩析されることが示された。

さらに、MB 溶液に 1 mM の PPI と MgCl₂ を添加し、上記と同じように種々の飽和濃度の硫安を添加して塩析を行った。塩析曲線と上清液中のタンパク質サブ

Fig. 3. Salting-out profile of myosin B with (NH₄)₂SO₄ in the presence of ATP-MgCl₂.

The method for salting-out of myosin B with (NH₄)₂SO₄ was the same as in Fig. 2, except that (NH₄)₂SO₄ was added to myosin B in the presence of 1.0 mM ATP and 1.0 mM MgCl₂. Other methods for measurements of protein concentration and of staining density of gel rod by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis were also the same as in Fig. 2.

(A) The protein concentration (○) of the precipitate fraction and the change in the absorbance at 560 nm for each 5% increment of (NH₄)₂SO₄ saturation (Δ).

(B) The relative density of HC/TM (○) or A/TM (Δ) in the supernatant fraction.

Fig. 4. Salting-out profile of myosin B with $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ in the presence of PPI- MgCl_2 .

The method for salting-out of myosin B with $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ was the same as in Fig. 2, except that $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ was added to myosin B in the presence of 1.0 mM PPI and 1.0 mM MgCl_2 , and that salting-out was conducted immediately after addition of PPI- MgCl_2 (A, B) or after storage at 10°C for 24 h (C, D) with PPI- MgCl_2 . Other methods for measurements of protein concentration and of staining density of the gel rod by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis were also the same as in Fig. 2.

(A, C) The protein concentration (○) and the change in the absorbance at 560 nm for each 5% increment of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ saturation (△).

(B, D) The relative intensity of HC/TM (○) or A/TM (△) in the supernatant fraction.

ニット組成をそれぞれ、Fig. 4 (A) と (B) に示した。これによると、MB は 20% および 40% 飽和濃度近辺に小さな画分を含むが、むしろ 15~45% 飽和濃度の広い範囲にわたって塩析されるようになった。また、サブユニット組成から見ると、30% 以上の飽和濃度画分は HC と A から成っているが、35% 以上の飽和濃度画分は主に HC から成ることを示した。なお、30~35% 飽和画分中の HC/TM および A/TM はそれぞれ 4.0 および 0.5 であり、A の相対的含量が特に低かった。この事実

は PPI と MgCl_2 により MB の一部分は A と M に解離し、他の一部分は変性したアクトミオシンになることを示唆している。

さらに、MB 溶液に 1 mM の PPI と MgCl_2 を添加した後、10°C で 24 時間放置して貯蔵中に起る変化を検討した。すなわち、貯蔵後の塩析曲線と上清液中のタンパク質サブユニット組成を求め、Fig. 4 (C) および (D) に示した。これによると、MB は 15~45% までの広い飽和濃度にわたって塩析されるようになり、一方、サブユニット組成から見ると、30% 以下の飽和濃度画分には A が主に認められ、30~45% の飽和濃度画分には HC が多く認められた。この結果を、PPI と MgCl_2 を添加した直後に硫酸分画を行った MB の結果 (Fig. 4 (A) と (B)) と比べると、貯蔵中に M に相当する画分が増加し、A に相当する画分が減る点が異なっている。したがって、PPI と MgCl_2 を添加して長時間貯蔵すると、MB の A と M への解離がさらに進行するが、塩析曲線上にははっきりした M の画分が出現せず、広い飽和濃度域にわたって塩析されるのでなんらかの変性している可能性が考えられる。

ピロリン酸塩と MgCl_2 を添加した MB の超遠心分離による分画とタンパク質サブユニット組成の変化 MB に PPI- MgCl_2 や ATP- MgCl_2 を添加したとき、解離するタンパク質成分と残存する MB を分画する手段として超遠心分離法を採用する試みをした。硫酸による分画法では M は変性しないが、A は変性することが既に知られている。^{6,7)} 一方、超遠心分画では、M は上清画分に、また、A (F-アクトン) と未変性のアクトミオシンは沈殿画分に、それぞれ変性することなく集められる。なお、F-アクトンは高塩濃度下では変性して、断片化すること^{6,7)}が知られているので、以下の実験では MB を 0.3 M KCl, pH 7.0 溶液として使用した。

MB 溶液に 1 mM ATP- MgCl_2 または 1 mM PPI- MgCl_2 を添加し、ただちに超遠心分離して得た上清液中のタンパク質量、生化学的性質およびサブユニット組成を検討した。また、無添加の MB を同じく超遠心分離したものを対照とし、結果を Table 1 に示した。先ず対照の MB の場合は、超遠心分離によって少量の沈殿を生じ、その上清は上部に透明な層、下部に濁った層の 2 層から成っていた。この透明な層にはタンパク質が検出されなかったが、濁った層と沈殿はいずれもアクトミオシンとして化学量論的な HC と A を含んでおり、未変性のアクトミオシンであることを示した。また、MB に 1 mM の ATP と MgCl_2 を加えて超遠心分離すると、少量の沈殿と透明で均質な上清液とに分離された。この上清液中には供試した MB 中の 95% の HC と約 5% の A に相当する成分が含まれていた。こ

Table 1. Relative content of myosin heavy chain and actin subunits in supernatant and precipitate fractions from myosin B with ATP-MgCl₂ and PPI-MgCl₂

To myosin B (2.0 mg/ml in 0.3 M KCl-40 mM Tris-maleate, pH 7.0), 1.0 mM ATP-1.0 mM MgCl₂ or 1.0 mM PPI-1.0 mM MgCl₂ was added. The myosin B thus treated, was centrifuged at 79,000 × g for 5 h at 5°C with and without elimination of additives by dialysis against 0.3 M KCl-40 mM Tris-maleate, pH 7.0. A fixed volume (10 μl) of the supernatant was subjected to SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and the protein bands were stained with Coomassie Brilliant Blue R. As a control, intact myosin B was centrifuged by the same condition with neither ATP-MgCl₂ nor PPI-MgCl₂ and a turbid heavy layer was regarded as the precipitate fraction. Relative content of myosin heavy chain and actin subunits in both fractions was calculated from the density of each band relative to those from whole myosin B.

	Relative distribution (%)			
	Supernatant		Precipitate	
	Myosin HC	Actin	Myosin HC	Actin
Myosin B	0	0	100	100
Myosin B+ATP-MgCl ₂	95	5	5	95
Myosin B+PPI-MgCl ₂	85	40	15	60
Myosin B+PPI-MgCl ₂ +dialysis	40	40	60	60

の結果は ATP-MgCl₂ により MB はほぼ完全に M と A に解離し、前者は上清に、後者は沈殿に分離されることを示している。なお、上清画分を透析して ATP-MgCl₂ を除去した後、その Ca-ATPase の熱変性速度と ATP 感度を測定したところ、 $K_D=6.1 \times 10^{-4}$ (s⁻¹)、また、ATP 感度はほぼ 0% となり、上記した結論を支持した。また、MB 溶液に 1 mM の PPI と MgCl₂ を加えた場合は、超遠心分離により少量の沈殿と透明な上清液に分離された。そして、この上清液中には供試した MB の約 85% に相当する量の HC と約 40% 量の A 成分が見出された。また、この上清画分を透析した後 Ca-ATPase の熱変性反応を検討すると、加熱初期は速く、後期は遅い速度の 2 段階からなり、初期の速度は M に、また後期のそれはアクトミオシンの既報¹¹⁾の速度に相応していた。さらに、上清画分の ATP 感度は 34% であるので、A と M は一部結合してアクトミオンを構成していると考えられる。

以上述べたように、PPI と MgCl₂ を添加すると、MB の一部は A と M に解離し、他の一部は変性アクトミオンになるが、この M とアクトミオンはいずれも Ca-ATPase 活性を保持しており、さらにアクトミオンは ATP-MgCl₂ により M と A に解離する能力も保有しているので、いずれも大きな変性を受けていないことを示した。それ故、A と M に解離した量は MB の約 45% であり、変性したアクトミオンは MB の約 40% に相当することが示唆されるが、これは硫安分画によって得た結果とも良く一致している。

ピロリン酸塩と MgCl₂ 共存下の貯蔵時間が MB の変性度合に及ぼす影響 MB 溶液に対して、終濃度が

1 mM の PPI と MgCl₂ を加えて 10°C で 24 時間貯蔵した。経時的にその一部を取り出し、0.3 M KCl, pH 7.0 溶液に対して透析して PPI-MgCl₂ を除去し、79,000 × g で 5 時間超遠心分離し、上清液中のタンパク質のサ

Fig. 5. Change in relative content of myosin heavy chain and actin subunits in supernatant fraction during storage of myosin B with PPI-MgCl₂.

During storage of myosin B (2.0 mg/ml in 0.3 M KCl and 40 mM Tris-maleate, pH 7.0) at 10°C with 1.0 mM PPI and 1.0 mM MgCl₂, a portion of which was taken out with a lapse of time and dialyzed to exclude PPI and MgCl₂. The methods for preparation of supernatant fraction by centrifugation and for measurement of protein subunits were the same as in Table 1.

The relative content of myosin heavy chain (○) and actin (△) subunits in the supernatant fraction was calculated on the basis of the respective band from intact myosin B.

ブユニット組成を検討した。その結果を Fig. 5 に示したが、これによると、先ず PPi-MgCl_2 を除去してから超遠心分離して得た上清画分中のサブユニット組成は、 PPi-MgCl_2 共存下で超遠心分離した上清液中のそれとは明らかに異なることを示した。すなわち、この結果は Table 1 中の最下列に付記されているが、 PPi-MgCl_2 共存下で集めた上清画分には MB 中の 85% に相当する HC が見出されるのに対し、 PPi-MgCl_2 を除去してから集めた上清画分には 40% に当る HC が認められるだけであり、透析によって HC の 45% が減少した。しかし、 PPi-MgCl_2 の除去とは係わりなく上清画分中の A 量は同じであり、MB 中の 40% に相当する量を保持していた。したがって、以上の結果は、 PPi-MgCl_2 によって MB から解離した M の一部が、透析により PPi-MgCl_2 が除去されるのに伴って沈殿中の F アクチンと可逆的に結合し、超遠心分離によって沈降するようになることを示している。その量は透析前に見出された 85% の中の 45% に相当しており、残りの 40% の M は上記した A (MB 中の 40%) と共に上清液に残っている。なお、後述するように、このタンパク質画分は高い ATP 感度

(90%) を示すのでアクトミオシンを構成していると考えられる。しかし、 PPi-MgCl_2 添加前とは異なり、超遠心分離によって沈降しないのであるから、おそらくなんらかの構造変化を受けていると推定される。

次に、 PPi-MgCl_2 を添加して 24 時間貯蔵する間に起る変化を、同じく透析により PPi-MgCl_2 を除いてから検討すると、時間経過に伴い得られる上清画分中の HC と A の量はいずれも増加し、約 12 時間後にはほぼ最大に達し、24 時間後には HC は MB 中の約 80%、A は約 60% に達した。なお、この貯蔵中には Ca-ATPase 比活性が低下しなかったため、 PPi-MgCl_2 による MB の変性は M ではなく A に起っていることが示唆される。そこで、この上清画分中の M と A の生化学的性質を知るため、透析した後得た上清画分について Ca-ATPase の熱変性の反応様式と、粘度の ATP 感度の経時変化を検討した。前の結果は Fig. 6 に示すが、先ず PPi-MgCl_2 を添加する前の MB の Ca-ATPase の熱変性は単純な一次反応に従い、アクトミオシンと同程度の速い速度¹¹⁾を示すのに対し、一方、 PPi-MgCl_2 共存下で貯蔵した MB から得た上清画分の Ca-ATPase は、初期は速く後期は遅い 2 段階の反応で変性するようになって

Fig. 6. Change in thermal inactivation mode of Ca-ATPase activity in supernatant fraction during storage of myosin B with PPI and MgCl_2 .

The methods for storage of myosin B with 1.0 mM PPI and 1.0 mM MgCl_2 and for preparation of supernatant fraction by centrifugation were the same as in Table 1. The supernatant fraction was then incubated at 30°C for various periods and its Ca-ATPase was assayed at 25°C in a medium containing 0.1 M KCl , 5 mM CaCl_2 , 25 mM Tris-maleate (pH 7.0), 1.0 mM ATP , and adequate concentration of myosin B.

Storage time: 0 (○), 6 (△), 12 (□), and 24 (▽) h.

Fig. 7. Change in ATP-sensitivity of viscosity during storage of myosin B with PPI and MgCl_2 .

The methods for storage of myosin B with 1.0 mM PPI and 1.0 mM MgCl_2 and for preparation of supernatant fraction by centrifugation were the same as in Table 1.

The ATP-sensitivity of myosin B was measured before (○) and after (△) centrifugation of myosin B at $79,000 \times g$ for 5 h at 5°C, using the following equation:

$$\text{ATP-sensitivity} = \frac{(\log \eta_r - \log \eta_{r, \text{ATP}})}{\log \eta_{r, \text{ATP}}} \times 100$$

where η_r and $\eta_{r, \text{ATP}}$ are the relative viscosities before and after the addition of 1 mM ATP and 1 mM MgCl_2 .

た。また、貯蔵時間が長くなるに伴って初期の変性速度がより大きくなり、かつ、初期の変性段階が変性の大部分を占めるようになった。なお、PPi-MgCl₂ 共存下で貯蔵した MB を、透析後超遠心分離することなく、そのまま Ca-ATPase の熱変性反応の経時変化を測定しても、結果は Fig. 6 と同じ傾向となった。また、これらの結果は、前報²⁾で述べたように、PPi-MgCl₂ を添加した MB について直接検討した Ca-ATPase の熱変性の反応様式と同じであった。

次に、PPi-MgCl₂ 共存下で貯蔵中の MB から一部をとり、透析後超遠心分離して得た上清タンパク質画分について粘度の ATP 感度を測定し、結果を Fig. 7 に示した。それによると、ATP 感度は初め 90% であったが、貯蔵時間に比例して減少し、24 時間には 10% となった。なお、超遠心分離をせずに、透析後のタンパク質の ATP 感度を直接測っても、時間経過に伴って比例的に減少する傾向は同じであった。ただし、24 時間後の ATP 感度が 55.6% であるので、この上清画分中には未変性の M とアクトミオシンの両方が含まれていることは確実である。

考 察

アクトミオシンに ATP または PPi と MgCl₂ を加えたときに起る分子上の変化に関しては、古くから筋収縮における同上タンパク質の挙動を探る目的から、高い関心が持たれてきた。^{4,12)} その結果、特に PPi と MgCl₂ は単にアクチンとミオシンの結合能に影響を及ぼすだけではなく、アクトミオシンの粒子量を変えずにそのサイズを伸長させると言う事実が報じられている。^{13,14)}

一方、本研究は魚肉の性状に対する重合リン酸塩（特に PPi 塩）の影響を、食品学的な視点から明らかにすることを目的としたものである。得られた成果を総括すると PPi-MgCl₂ によって MB に起る変性は Fig. 8 に示すようになると考えられる。すなわち、MB に 1 mM の PPi と MgCl₂ を加えると、直後に MB の 45% が A と M に可逆的に解離し、また、MB 中の約 40% に相当するアクトミオシンは構造変化し、超遠心分離によって沈降しなくなる。しかし、その Ca-ATPase の熱変性速度が既知の値と一致することや ATP 感度が高いことを考慮するとアクトミオシンとして大きな変性を受けていないことは確かである。一方、解離した上清中の M と沈殿画分の A は変性していないので、透析（図中点線）すると再結合して沈降するようになり、また、ATPase 活性は変化しないことを認めた。

次に、PPi-MgCl₂ 共存下で MB を貯蔵すると、上清液中には M と A の量が徐々に増加するが、同時にこの画分の Ca-ATPase の熱変性の反応様式が初期は速く、

Fig. 8. A proposed scheme for the denaturation of carp myosin B (actomyosin) induced by addition of PPi-MgCl₂ or ATP-MgCl₂.

AM: intact actomyosin

AM*: transformed form of actomyosin (dissociable into myosin and actin by ATP-Mg)

M: intact myosin

A: intact F-actin

後期は遅い2段階を示すようになるので、この画分中には解離した M と A (変性) の他にアクトミオシンも含まれていることが示された。貯蔵時間が長くなると、上記した熱変性反応における初期の段階が顕著となるので、解離した未変性の M の相対的含量が増加していることが確められる。なお、このとき ATP 感度が減少してゆくが、Ca-ATPase 比活性は減少する傾向を示さないもので、アクトミオシンも大きな変性は受けていないと考えられる。なお、PPi-MgCl₂ 共存下で 24 時間貯蔵した後に透析した画分には、超遠心分離には係わりなく、MB 中に含まれていた量の約 80% の M と約 60% の A が見出されたが、その Ca-ATPase の熱変性の反応様式が 2 段階になることや ATP 感度が低いことから、両者は解離状態にあり、それは A が変性して M との結合能を失っていることに起因すると考えられた。それ故、このとき超遠心分離で沈殿する画分中には、約 20% に相当する MB と約 20% の A が（後者は F アクチンとして）含まれていることになるが、詳細は検討中である。

なお、PPi の代りにトリポリリン酸塩やポリリン酸塩（食品添加物）を用いて MB の粘度の経時変化を比較検討したところ、添加直後の変化が小さく、貯蔵中の変化が大きい傾向を示す以外は、良く類似した結果を示した。それ故、これらのリン酸塩類の MB に対する作用は、かなり似ているように推定している。

魚肉中に 1 mM 以上に及ぶ重合リン酸塩と MgCl₂ を同時に添加するようなことは、産業上ありうるかどうか不明であるが、おとし身には数 mM に及ぶ MgCl₂ が含まれているので、仮に重合リン酸塩を加えるとその状態

が実現する。しかし、冷凍すり身の場合は、おとし身は水晒しされるため既存の塩類が著しく除去されていると推定できる。ただし、それが不十分なときは重合リン酸塩と共に働かし、MBを変性させる可能性を考えなければならぬ。

本研究ではMBに対して1mmのPPiとMgCl₂を添加したときの変化を検討したが、一方、冷凍すり身には通常0.2~0.3%の重合リン酸塩が添加されているので、魚肉中の水分に対して概算10mmに相当する。そこで、本研究でもPPi濃度を1から10mmにわたって増加し、その影響を検討したが、MBに起る変性には大きな相違は見られなかった。したがって、本研究で得られた結果は、冷凍すり身においても適用できる可能性がありうるように思われる。特にねり製品の製造工程の塩ずりと坐りにおいては、顕著となるものと推定される。ただし、本研究は低濃度のMfタンパク質を用いて行ったモデル試験であり、おとし身中のMfタンパク質の推定濃度に比べれば低すぎるので、この点に関して今後詳細な検討が必要である。また、PPiはATP¹⁵⁾と同じく、ミオシン分子上の局限された部位に結合すると推定されるので、その観点に立った検討も必要であると考えられる。

本研究は、文部省科学研究費補助金によって行われた。

文 献

- 1) 八木 浩, 阪本正博, 若目田 篤, 新井健一: 日水誌, **51**, 667-675 (1985).
- 2) 八木 浩, 若目田 篤, 新井健一: 日水誌, **51**, 1899-1905 (1985).
- 3) 高士令二, 新井健一, 齊藤恒行: 日水誌, **36**, 169-172 (1970).
- 4) H. H. Weber and H. Portzehl: in "Advances in Protein Chemistry" (ed. by M. L. Anson, K. Bailey, and T. T. Edsall) Vol. 7, Academic Press, New York, 1957, pp. 161-252.
- 5) U. K. Laemmli: *Nature*, **227**, 680-685 (1970).
- 6) 若目田 篤, 新井健一: 日水誌, **50**, 635-643 (1984).
- 7) 若目田 篤, 新井健一: 日水誌, **51**, 497-502 (1985).
- 8) 高橋泰常: 生化学の領域における光電比色法 (関根隆光編), 南江堂, 東京, 1962, pp. 13-14.
- 9) A. G. Gornall, C. J. Bardwill, and M. M. David: *J. Biol. Chem.*, **177**, 751-756 (1946).
- 10) Y. Tonomura: *Muscle Proteins, Muscle Contraction, and Cation Transport*, University of Tokyo Press, 1972, pp. 164-170.
- 11) 室塚剛志, 高士令二, 新井健一: 日水誌, **42**, 57-63 (1959).
- 12) J. Gergely: *J. Biol. Chem.*, **220**, 917-926 (1956).
- 13) J. J. Blum and M. F. Morales: *Arch. Biochem. Biophys.* **43**, 208-230 (1953).
- 14) T. Nihei and Y. Tonomura: *J. Biochem.*, **46**, 1355-1366 (1959).
- 15) Y. Tonomura and F. Morita: *J. Biochem.*, **46**, 1367-1378 (1959).