魚類ミオシンのフィラメント形成能と生化学的活性に 及ぼす pH の影響

松 浦 基, 新 井 健 一

(1986 年 2 月 27 日受理)

Effect of pH on Filament-Forming Ability and Biochemical Activity of Fish Myosins

Motoi Matsuura* and Ken-ichi Arai*

Effect of pH (5.5-8.0) on filament-forming ability and biochemical activity of carp, tilapia, and rabbit myosins were studied.

In the acidic pH range, both filament-forming ability and actin-activation of Mg-ATPase of the three myosins tended to increase. When the Mg-ATPase was strongly actin-activated and the activity was saturated by a small amount of actin, bipolar filaments whose thickness and length were more than 290 Å and more than 0.7 μm, respectively, were formed. Tilapia myosin unusually formed the bipolar filaments only in acidic condition. Changes in light scattering intensity of each myosin suspension suggested that the bipolar filaments might be in a rigid form, because they hardly dissociated into small myosin filaments by treatment with KCl or ATP.

著者らは、従来、魚類背筋から調製したミオシンの Mg-ATPase 活性はアクチンによる活性化が著しく弱い事実に着目し、その理由を明らかにするためミオシンのフィラメント形成能について検討してきた。その結果、ティラピアのミオシンが形成するフィラメントは、ウサギ・ミオシンのそれに比べて 1/3 の長さにすぎず、これはフィラメント形成の際の温度や KCl 濃度の希釈速度の影響を受けないことを知った。¹⁾ また、ティラピアのミオシンを加熱するとき起るフィラメント形成能は複雑な経過で変化するが、このとき、ミオシンの Mg-ATPase のアクチン活性化及び超沈殿活性も同じ経過をたどって変化し、フィラメント形成と生化学的活性は強く関連していることを示唆した。²⁾ さらに、ティラピア・ミオシンのフィラメント形成能とアクチン活性化 Mg-ATPase 活性に対する二・三の要因 (pH, 尿素) の影響とその反応の可逆性について研究し、上記したフィラメント形成及び ATPase 活性はいずれも同じ要因によって可逆的に影響を受けることを認め、2つの性質が強く係わっているという先の推定を支持する結果を提出した。³⁾

しかしながら、魚類のミオシン・フィラメントがウサギのミオシン・フィラメントに匹敵するような長いサイズとなるための必要条件は未だ明らかになっていない。そこで本研究では、従来から良く知られている要因の1つである pH⁴⁾ の影響について検討を加えた。

実験方法

ミオシンはウサギ *Oryctolagus cuniculus* 骨格筋より Connell の方法⁴⁾に従って、0.45 M KCl, 5 mM MgCl₂-ATP, 50 mM リン酸 buffer (pH 6.4) で抽出し、希釈沈殿して調製した。魚類ミオシンは前報⁵⁾に述べたように、コイ *Cyprinus carpio*, 及びティラピア *Tilapia nilotica* の背筋より先ずアクトミオシンを抽出し、ATP-MgCl₂ の共存下で硫酸分画して調製した。なお、ミオシンの調製の際には、調製に用いた全ての溶液に 0.1 mM dithiothreitol (DTT) を共存させて行ない、氷蔵して実験に供した。

アクチンは、ウサギ骨格筋アセトン粉末より Spudich と Watt の方法⁶⁾に従って調製した。

また、たんぱく濃度は牛血清アルブミン分画 V を標準とし、ビュレット法で比色定量した。⁷⁾

ミオシン Mg-ATPase のアクチン活性化は、30 mM KCl, 25 mM Tris-maleate (pH 5.5, 6.3, 7.0) または、25 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM MgCl₂, 種々の量のアクチン、及び 1 mM ATP の反応混液で、25°C において測定した。反応はミオシンを添加して開始し、経時的に一部を取り出し、終濃度 5% となるように過塩素酸を添加した。遊離した無機リン酸を Youngburg-Youngburg 法,⁸⁾または Gomori 法⁹⁾のどちらかで測定

* 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).

した。

光散乱強度は 350 nm の波長で 90° 方向の散乱光を島津蛍光光度計 RF-500 を用いて 15°C で測定した。また、ミオシン懸濁液 (0.1 M KCl) に ATP を添加した時の光散乱強度の変化率 (ΔI) を以下の式に従って計算した。

$$\Delta I = (I - I_{\min}) / (I_0 - I_{\min}) \times 100$$

ここで、 I_0 は ATP 添加前の光散乱強度であるが、イオン強度の補正のために ATP の代りに ATP の 3 倍濃度の KCl を加えたときの強度を測定した。¹⁰⁾ また、 I は ATP 添加後の光散乱強度であり、 $I_{\min}$ は大過剰 (20 mM) の ATP を添加したときの光散乱強度を示す。

ミオシン・フィラメントの電子顕微鏡による観察は、Huxley の方法¹¹⁾ に準じて行った。すなわち、コロジオン支持膜に炭素蒸着して補強したシートメッシュ上にサンプルをのせ、1% 酢酸ウランを用いてネガティブ染色した後、日立電子顕微鏡 H-300 を用い、加速電圧 75 kV で観察した。

結 果

ミオシン Mg-ATPase のアクチン活性化に対する pH の効果 ウサギ、コイ、およびティラピアのミオシンの Mg-ATPase のアクチン活性を異なる pH において測定し、結果を Fig. 1 に示した。

この結果によると、ウサギ・ミオシンの場合、Mg-ATPase 活性は pH 6.3 および pH 7.0 では 1/3~1/4 量のアクチンで強く活性化され、かつ飽和したが、pH

Fig. 1. pH-Dependence of the actin-activation of myosin Mg-ATPases from rabbit, carp, and tilapia muscle.

Mg-ATPase activity was measured at 25°C in media containing 30 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM ATP, 25 mM Tris-maleate (pH 5.5 (▽), pH 6.3 (Δ), or pH 7.0 (○)) or 25 mM Tris-HCl (pH 8.0 (□)), 0.1 mg/ml of rabbit or carp myosin plus 0–0.1 mg/ml of rabbit actin, or 0.2 mg/ml of tilapia myosin plus 0–0.2 mg/ml of rabbit actin.

8.0 では活性化はやや弱くなり、1/3 量のアクチンで活性化は飽和する傾向を示すものの、活性はなお増加しつづけた。また、同様の傾向は、コイ・ミオシンの場合においても見られた。

一方、ティラピア・ミオシンの場合は、pH 8.0 ばかりでなく、pH 7.0 においても、Mg-ATPase のアクチン活性化は非常に弱く、ミオシンと同量のアクチンを添加しても活性は飽和しなかった。しかし、pH 6.3 では、pH 8.0 や pH 7.0 の場合よりも活性化は明らかに強くなり、かつ、1/2 量のアクチンで飽和を示すようになったが、pH 5.5 において、活性値は減少するものの、活性化はさらに強くなった。

以上の結果は、ティラピア・ミオシン Mg-ATPase のアクチン活性化が、コイやウサギのミオシンの場合と同様に強くなり、また、飽和を示すのに必要な条件の1つは、pH を酸性側 (pH 5.5~6.3) に保つことを示している。

ミオシンの光散乱強度の KCl 濃度依存性に対する pH の効果 ミオシンの 500 mM KCl, 20 mM Tris-maleate (pH 7.5) 溶液に、異なる pH の buffer を加えて KCl 濃度を 50~500 mM の間の種々の濃度に調節した後、氷水中で 30 分放置した後、光散乱強度を測定し、結果を Fig. 2 に示した。

これによると、ウサギ・ミオシンの場合は、pH 6.3 および pH 7.0 においては、KCl 濃度が 250 mM 以下になると、光散乱強度は著しく強くなり、また、pH 8.0 においては、KCl 濃度が 100 mM 以下で光散乱強度は強くなることを示した。次に、コイ・ミオシンの場合

Fig. 2. KCl concentration dependence of light scattering intensity of rabbit, carp, and tilapia myosins.

Each myosin was dissolved in media containing 20 mM Tris-maleate (pH 5.5 (▽), pH 6.3 (Δ), or pH 7.0 (○)), or 20 mM Tris-HCl (pH 8.0 (□)), and various concentrations of KCl to attain the concentration of myosin at 0.2 mg/ml and measured for light scattering intensity (90°) at 350 nm at 15°C.

は、光散乱強度が高まる KCl 濃度は、pH 8.0 および pH 7.0 においては 150 mM 以下、pH 6.3 では 200 mM 以下、pH 5.5 では 300 mM 以下であった。また、ティラピア・ミオシンの光散乱強度に対する pH と KCl 濃度の効果は、上記したコイ・ミオシンの場合と同様だった。しかし、ティラピア・ミオシンの呈する光散乱強度の最大値は、コイ・ミオシンのそれらに比べて、pH 5.5 のときを例外として全て低い値であった。

これらの結果は、検討したいずれのミオシンも、一般に低イオン強度下ではフィラメント形成能が強まるので光散乱強度が増加すること、および、pH が酸性になるほど、フィラメント形成能が強まるので、より高い KCl 濃度においても光散乱強度が増加することを示唆しており、さらに、同じ pH で比較した場合、ウサギ・ミオシンに比べて、コイおよびティラピアのミオシンのフィラメント形成能は弱いため、より低い KCl 濃度でなければ光散乱強度が増加しないことを示唆している。

また、これらのフィラメント形成能に対する pH の効果は、ミオシン Mg-ATPase のアクチン活性化の様式に対する pH の効果と対応しており、この 2 つの性質に係っていることを示した。

ATP によるミオシン懸濁液の光散乱強度の減少と pH の効果 前記した (Fig. 2) 方法に従って、0.1 M KCl, 20 mM Tris-maleate (pH 5.5, 6.3, 7.0) または、20 mM Tris-HCl (pH 8.0) の溶液中に、ミオシン・フィラメントを形成させておき、これに 0.01~10 mM の間の種々の終濃度の ATP を添加し、ATP 添加前後の光散乱強度の偏差 (ΔI) を算出し、 ΔI を添加 ATP 濃度の関数として Fig. 3 に示した。

また、Fig. 3 の結果より、 ΔI が最大値の 50% を示

Table 1. ATP concentrations required for half-maximal decrease in the light scattering intensity ($\Delta I_{\max}/2$) of each myosin suspension at various pHs, as calculated from the data in Fig. 3. medium: 0.1 M KCl

Myosin	pH	ATP concentration (mM) required for ($\Delta I_{\max}/2$)
Rabbit	6.3	6.8
	7.0	3.3
	8.0	0.9
Carp	5.5	<10
	6.3	3.9
	7.0	2.1
	8.0	—
Tilapia	5.5	10
	6.3	2.8
	7.0	0.9
	8.0	—

Fig. 3. ATP-Induced decrease in light scattering intensity of rabbit, carp, and tilapia myosins.

Each myosin was suspended in media containing 0.1 M KCl, 20 mM Tris-maleate (pH 5.5 (▽), pH 6.3 (Δ), or pH 7.0 (○)), or 20 mM Tris-HCl (pH 8.0 (□)) at 0°C for 30 min to attain the concentration of myosin at 0.2 mg/ml. Each myosin suspension was incubated at 15°C for 5 min, and measured for light scattering intensity (90°) before (I_0) and after (I) addition of various concentrations (10^{-2} – 10^{-5} M) of ATP, at 350 nm at 15°C. The extent of change in light scattering intensity (ΔI) was calculated by the following formula,

$$\Delta I = (I - I_{\min}) / (I_0 - I_{\min}) \times 100.$$

I_0 : light scattering intensity in the absence of ATP, as measured corrected for ionic strength of ATP by adding KCl.

I : light scattering intensity after addition of ATP.

$I_{\min}$: light scattering intensity after addition of excess (20 mM) ATP.

すのに要する ATP 濃度 $\Delta I_{\max}/2$ を算出し、Table 1 に示した。

これらの結果によると、いずれのミオシン・フィラメントの場合も、その光散乱強度は ATP 濃度が増加すると減少し、解集合することを示唆した。また、pH が酸性になるに伴い $\Delta I_{\max}/2$ を示すのに必要な ATP 濃度は増加する傾向を示し、ATP によってフィラメントは解集合しにくくなることを示唆している。また、同じ pH 条件下のウサギ、コイ、およびティラピアのミオシン・フィラメントに、同濃度の ATP を添加し、その時に起る ΔI を較べると、その値の小さい方から、ウサギ < コイ < ティラピアの順であり、ティラピアのミオシン・フィラメントは、ウサギやコイのミオシン・フィラメントに較べて ATP により解集合しやすいことを示唆している。

また、Fig. 1 に示したミオシン Mg-ATPase のアクチン活性化が強く起り、かつ、飽和するような条件下では、いずれのミオシン・フィラメントの場合も $\Delta I_{\max}/2$ を示すのに要する ATP 濃度は、例外なく 2 mM 以上であることが示されている。

ミオシン・フィラメントの電子顕微鏡像と pH の効果
ミオシン・フィラメントの形態に対する pH の効果を観察した。すなわち、KCl 濃度は 100 mM に固定し、種々の pH で形成させたミオシンのフィラメントをネガティブ染色した後に電子顕微鏡で観察し、その結果を Figs. 4, 5, および 6 に示した。

まず、フィラメントの極性について見ると、ウサギ・ミオシンの場合は、いずれの pH においてもフィラメント中央に bare zone が認められ、両極性のフィラメントを形成していた。また、コイ・ミオシンの場合も、いずれの pH においても両極性のフィラメントを形成して

いた。

しかしながら、ティラピア・ミオシンの場合は例外で、pH 8.0 および pH 7.0 においては、フィラメント中央に bare zone を見る事ができず、無極性のフィラメントを形成していた。また、pH 6.3 および pH 5.5 においては、全体の約 80% のフィラメントの中央に bare zone が見られ、両極性のフィラメントを形成していた。

そこで、これらのフィラメントのサイズを計測し、長さの分布を Fig. 7 に、また、太さの分布を Fig. 8 に示した。

Fig. 4. Electron micrographs of “thick filaments” of rabbit myosin formed at three different pHs. Rabbit myosin was allowed to form “thick filaments” at 0°C in media containing 0.1 M KCl and 20 mM Tris-HCl (pH 8.0) (A), or 20 mM Tris-maleate (pH 7.0 (B), or pH 6.3 (C)). Samples were negatively stained with 1% uranyl acetate. Bar indicates 0.5 μ m length in all figures. Arrow in figures show the central bare zone of thick filaments.

Fig. 5. Electron micrographs of “thick filaments” of carp myosin formed at four different pHs. Carp myosin was allowed to form “thick filaments” at 0°C in media containing 0.1 M KCl and 20 mM Tris-HCl (pH 8.0) (A), or 20 mM Tris-maleate (pH 7.0 (B), pH 6.3 (C), or pH 5.5 (D)). Samples were negatively stained with 1% uranyl acetate. Bar indicates 0.5 μ m length in all figures. Arrows in figures show the central bare zone of thick filaments.

Fig. 6. Electron micrographs of “thick filaments” of tilapia myosin formed at four different pHs. Tilapia myosin was allowed to form “thick filaments” at 0°C in media containing 0.1 M KCl and 20 mM Tris-HCl (pH 8.0) (A), or 20 mM Tris-maleate (pH 7.0 (B), pH 6.3 (C), or pH 5.5 (D)). Samples were negatively stained with 1% uranyl acetate. Bar indicates 0.5 μ m length in all figures. Arrows in figures show the central bare zone of thick filaments.

Fig. 5.

Fig. 6.

Fig. 7. Length distribution of "thick filaments" of rabbit, carp, and tilapia myosins, as estimated from electron micrographs.

Filament lengths (in Figs. 4, 5, and 6) were measured on 137 pieces of filaments formed each myosin at pH 5.5 (---), pH 6.3 (-·-·-), pH 7.0 (—), and pH 8.0 (—).

Fig. 8. Width distribution of "thick filaments" of rabbit, carp, and tilapia myosins, as estimated from electron micrographs.

Filament width (in Figs. 4, 5, and 6) were measured on 137 pieces of filaments formed from each myosin at pH 5.5 (---), pH 6.3 (-·-·-), pH 7.0 (—), and pH 8.0 (—).

なお, Fig. 7 および Fig. 8 よりフィラメントのサイズを集計し, その平均値を計算し, Table 2 に示した。

フィラメントの太さについてみると, いずれのフィラメントも一般に pH がアルカリ側では細く, 酸性側になるにつれて太くなる傾向を示した。次に, 長さについてみると, いずれのフィラメントも一般に pH がアルカリ側では短かく, 酸性側に移るにつれて長くなる傾向を示した。ただし, ウサギのミオシン・フィラメントは pH 7.0 において, また, コイ, およびティラピアのミオシン・フィラメントは pH 6.3 において最長になり, これ以下の pH ではフィラメントはむしろやや短くなることや, ティラピア・ミオシンが pH 8.0 や pH 7.0 において形成するフィラメントは, 同じ pH で形成するウサギやコイのミオシン・フィラメントに較べて著しく短かく, かつ細いことは, それぞれの種のミオシンの特徴であるように思われた。なお, ウサギ・ミオシンについて得られた本実験の結果は, Kaminer and Bell の報告

Table 2. Size of "thick filaments" of rabbit, carp, and tilapia myosins at various pHs, as estimated from electron micrographs. Length and width of "thick filaments" of rabbit, carp, and tilapia myosins were referred from the data shown in Figs. 7 and 8. Numbers in parenthesis indicate the average values. medium: 0.1 M KCl

Myosin	pH	Filament size	
		Length (μm)	Width (Å)
Rabbit	6.3	0.9–1.8 (1.22)	300–500 (385)
	7.0	1.3–1.8 (1.54)	200–430 (290)
	8.0	0.4–0.6 (0.51)	100–230 (165)
Carp	5.5	0.4–0.9 (0.67)	300–530 (430)
	6.3	0.7–1.3 (0.99)	300–430 (347)
	7.0	0.5–0.9 (0.72)	200–660 (332)
Tilapia	8.0	0.2–0.5 (0.30)	60–300 (178)
	5.5	0.4–0.9 (0.70)	330–530 (391)
	6.3	0.7–1.0 (0.85)	300–600 (393)
	7.0	0.4–0.7 (0.53)	100–330 (207)
	8.0	0.2–0.3 (0.28)	30–60 (42)

した結果¹²⁾とよく似ていた。

以上, 本実験の結果を総括してみると, ミオシン Mg-ATPase のアクチン活性化が強く起り, かつ, 明らかな飽和を示すような pH の条件下では, ミオシンのフィラメントの形態は, 1) 再極性を示し, 2) 平均の太さが約 290 Å 以上となり, 3) 平均の長さが約 0.7 μm 以上とすることが示された。

考 察

ウサギ, コイ, およびティラピアのミオシン Mg-ATPase 活性のアクチン活性化を異なる pH で比較すると, ウサギとコイのミオシンでは, pH 6.3~8.0 にわたっていずれも比較的強く活性化され, 飽和に達するのには, ティラピアのミオシンでは一般に活性化が弱く, pH 6.3 以下においてのみ比較的強く活性化されることが示された。また, 本文中には結果を図示しなかったが, Mg-ATPase 活性のみならず, 超沈殿活性を指標としても同様の結果が得られ, ティラピア・ミオシンの場合はアクチン活性化の程度が小さかった。

なお, ウサギとティラピアの HMM Mg-ATPase 活性のアクチン活性化には差が見られず, 同じ様式で, (アクチン量に比例して)活性化された。また, ウサギとティラピアのミオシンのアクチンとの結合能を, ミオシン EDTA-ATPase 活性のアクチンによる阻害度, または, 濁度の増加度から検討した。その結果は図示しないが, 両ミオシンで差が認められなかった。それ故, その Mg-ATPase のアクチン活性化において見られたミオシ

ンの動物種による差は、そのミオシンのフィラメント形成能の差を反映していると推定された。そして実際に、ティラピアのミオシン・フィラメントはウサギのそのの1/3の長さしかなかった。¹⁾ また、本実験の結果では、コイのミオシン・フィラメントも、ティラピアのそれほどではないが、ウサギのミオシン・フィラメントよりも短いことは明らかであった。しかし、コイのミオシン Mg-ATPase 活性および超沈殿活性のアクチン活性化の式は、ウサギ・ミオシンの場合に良く似ていた。従って、形成したミオシン・フィラメントの長さだけからは、その生化学活性 (Mg-ATPase 活性および超沈殿活性のアクチン活性化) の度合と様式の相違を説明することができないことは明らかである。

そこで、電子顕微鏡により、ミオシンのフィラメント像に対する pH の効果について詳細な検討をした。その結果、ミオシン Mg-ATPase のアクチン活性化が強く起り、また、活性が飽和に達するような pH 条件では、ミオシン・フィラメントの形態とサイズは、以下の3つの条件を満足する必要があることが示唆された。すなわち、

- 1) 両極性を示すこと、
 - 2) 平均の太さが約 290 Å 以上であること、
 - 3) 平均の長さが約 0.7 μm 以上であること、
- である。

一方、このような条件を満たしているミオシン・フィラメントを解集合させるために必要な KCl 濃度は 150 mM 以上であること、また、形成されたフィラメントの約 50% を解集合させるために要する ATP の濃度は 2.1 mM 以上であることが確かめられた。なお、これらの2つの条件は、ミオシン・フィラメントの構造の硬さ(強さ)を反映しているように考えられる。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、懇切な御指導を賜った故群馬大学工学部渡辺静雄教授に深謝いたします。また、本研究を行なうに際し、ティラピアの入手に当って特別な御好意を下さった大成町アワビ種苗センターの皆様、また、飼育の御世話をいただいた本学学生理生態学講座の天津順氏に謝意を表します。

この研究は文部省科学研究費補助金によったので、ここに記して感謝いたします。

文 献

- 1) 松浦 基, 新井健一: 日水誌, **51**, 1697-1704 (1985).
- 2) 松浦 基, 吉岡武也, 田中晴生, 新井健一: 日水誌, **51**, 2007-2012 (1985).
- 3) 松浦 基, 新井健一: 日水誌, **52**, 831-837 (1986).
- 4) J. J. Connell: *Biochem. J.*, **58**, 360-367 (1954).
- 5) 碓谷敏紀, 木村郁夫, 新井健一: 日水誌, **47**, 947-955 (1981).
- 6) J. A. Spudich and S. Watt: *J. Biol. Chem.*, **246**, 4866-4871 (1971).
- 7) A. G. Gornall, C. J. Bardwill, and M. M. David: *J. Biol. Chem.*, **177**, 751-766 (1949).
- 8) G. E. Youngburg and M. V. Youngburg: *J. Lab. Clin. Med.*, **16**, 58-166 (1930).
- 9) G. Gomori: *J. Lab. Clin. Med.*, **27**, 955-960 (1942).
- 10) H. Suzuki, H. Onishi, K. Takahashi, and S. Watanabe: *J. Biochem.*, **84**, 1529-1542 (1978).
- 11) H. E. Huxley: *J. Mol. Biol.*, **7**, 281-308 (1963).
- 12) B. Kaminer and A. L. Bell: *J. Mol. Biol.*, **20**, 391-401 (1966).