コイ・ミオシンサブフラグメント-1 の加熱による構造変化

浜井 昌志, 吉岡 武也, 今野久仁彦, 新井 健一

(1989 年 3 月 29 日受付)

Structural Changes of Carp Myosin Subfragment-1 Induced by Thermal Denaturation

Masashi Hamai,*¹ Takeya Yoshioka,*^{1,2} Kunihiko Konno,*¹
and Ken-ichi Arai*¹

We studied the structural changes of carp myosin subfragment-1 (S-1) induced by the heat treatment by monitoring several indicators. We confirmed that, upon heat treatment, the turbidity of S-1 solution increased and that the light chain (LC) dissociated from S-1 heavy chain (HC). The tryptic digestion of native carp S-1 converted HC into intramolecular three fragments and LC-1 into cleaved LC-1', which are very similar to those of rabbit S-1. However, tryptic digestion of completely inactivated carp S-1 produced neither such intramolecular fragment nor LC-1', but small pieces of fragments, suggesting the complete disordered structure of this S-1 molecule. Since the production of three fragments from partially inactivated S-1 is proportional to the remaining activity, it is concluded that these fragments are derived only from native S-1. It is also suggested that LC binding to HC in carp S-1 is weak, resulting easily in dissociation by thermal inactivation. LC-dissociated HC may lose its native conformation, thus increasing susceptibility to tryptic attack, aggregation, and turbidity.

魚肉の筋原繊維タンパク質やその主成分であるミオシンの熱安定性は、その魚種の棲息水温に依存しており、寒帯に棲息するものほど劣ると報告されているが、これらは主に指標として、加熱によるミオシンの Ca-ATPase の失活速度の大きさから求められたものである。^{1,2)} それゆえ、ミオシンを加熱し、Ca-ATPase が失活していく過程でミオシン分子にいかなる構造変化が生じたのかを調べ、Ca-ATPase の失活と比較して検討すれば、魚種による熱安定性の違いをタンパク質分子の構造安定性の相違として説明できると考えられる。ミオシン分子は種々の機能を有するが、その分子断片であるミオシン・サブフラグメント-1 (S-1) は、主要な機能である酵素活性中心およびアクチン結合部位を含み、水溶性であるので取り扱いやすく、この目的には好ましい研究材料と思われる。すでに碓谷らはコイ・ミオシンからの S-1 の単離に成功している。³⁾ そして、この S-1 を用い碓谷ら⁴⁾ また山本ら⁵⁾ は S-1 を加熱すると、失活に伴

いアルカリ軽鎖 (LC) が重鎖 (HC) から解離し、HC は凝集して濁度上昇が起こることを見いだしている。本研究では、山本らの報告した S-1 の失活と LC の遊離の関係、さらに S-1 HC 内部の構造変化を詳細に知るため、S-1 のトリプシン消化性などの指標を用い、ウサギ S-1 と対比させながら研究を行い、魚類 S-1 の構造特性を明らかにしようとした。

実験方法

コイ *Cyprinus carpio* の背筋、およびウサギ *Oryctolagus cuniculus* の骨格筋からそれぞれ碓谷らの方法³⁾ および Connell らの方法⁴⁾ に準じて、ミオシンを調製し、Weeds and Pope の変法⁶⁾ に従いキモトリプシン消化して S-1 を得、さらに Sephacryl S-300 のゲル濾過により精製して用いた。

S-1 の加熱は、0.1 M KCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.1 mM DTT の条件下、失活速度定数 (K_t) がほぼ同じ

*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: 日本水産 (株) 中央研究所 (Present address: Nippon Suisan Kaisha LTD., Central Research Laboratory, Hachioji, Tokyo 192, Japan).

*³ 碓谷敏紀, 木村郁夫, 新井健一: 昭和 54 年度日本水産学会秋期大会講演要旨集 p. 159.

*⁴ 山本康博, 今野久仁彦, 新井健一: 昭和 59 年度日本水産学会秋期大会講演要旨集 p. 448.

略語 S-1, myosin subfragment-1; HC, S-1 heavy chain; LC, S-1 alkali light chains; SDS, sodium dodecyl sulfate; DTT, dithiothreitol; Tris, Tris (hydroxymethyl) aminomethane.

になるような温度, すなわち, コイでは 35°C , ウサギでは 40°C で行った。その後, S-1 の加熱による性状変化を以下のようにして測定した。

S-1 の Ca-ATPase (EC 3. 6. 1. 3) 活性測定の詳細な条件については, 図の説明文中に示した。なお, 反応により生成した無機リン酸量を Gomori の変法⁶⁾を用いて定量した。

加熱した S-1 溶液の濁度は, 350 nm での吸光値を指標として Shimadzu 210A 分光光度計を用いて, 25°C で測定した。

加熱によって濁度の生じた S-1 は, $130,000\times\text{g}$, 30 分間の超遠心分離により, 上清と沈殿に分離し, それぞれに含まれる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で解析した。SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動は Laemmli and Farve の方法⁷⁾に従い, 0.1% SDS を含む 12.5% ポリアクリルアミドゲルを使用し, 染色は Coomassie Brilliant Blue-R で行った。

S-1 のトリプシン消化は, S-1 の 1/100 量 (w/w) のトリプシンを用い, ウサギは 25°C , コイは 10°C で消化した。⁸⁾消化反応はトリプシンの 5 倍量 (w/w) のトリプシンインヒビターを加えることにより停止した。S-1 から生成した内部断片の量は SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動後, それぞれのバンドの染色強度から求めた。

結果および考察

コイ S-1 の加熱に伴う Ca-ATPase の失活と濁度変化 まず初めに, コイ S-1 の失活に伴う構造変化について検討するために適当な加熱条件を設定した。すなわち, 先に山本らはミオシンとヘビーメロミオシンなどと比較するため, 0.5 M KCl 溶液中で加熱しているが, ここでは生理的条件に近い 0.1 M KCl (pH 7.5) に溶解したコイ S-1 を 35°C で加熱した。まず, Ca-ATPase 活性と S-1 溶液の濁度変化を追跡した。Fig. 1-(A) に示すように, コイ S-1 では Ca-ATPase が失活するに伴い, ほぼ同時に 350 nm での吸光値でも十分検出されるような大きな濁度上昇が起こった。碓谷⁹⁾や山本¹⁰⁾は 0.5 M KCl 溶液中の加熱でも濁度上昇が認められると報告しているので, この性質は加熱時の KCl 濃度に依存せず, 変性コイ S-1 の特性であるように思われる。しかし, 比較対照としたウサギ S-1 では, Ca-ATPase が完全に失活しても, 同じ指標ではほとんど濁度の上昇として検出されなかった (Fig. 1-(B))。

そこで, この加熱により濁度の生じたコイ S-1 凝集物の性質を知るために, 加熱した S-1 を超遠心分離し

Fig. 1. Changes in the Ca-ATPase activity and in the turbidity of S-1 during heat treatment.

Carp S-1 (A) and rabbit S-1 (B) (0.5 mg/ml) were incubated at 35°C and 40°C , respectively, in a medium containing 0.1 M KCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), and 0.1 mM DTT. Ca-ATPase activity of S-1 (○) thus thermally treated was assayed at 20°C (A) or 25°C (B) in a reaction medium containing 0.5 M KCl, 25 mM Tris-maleate (pH 7.0), 5 mM CaCl_2 , 0.025 mg/ml of S-1 and 1 mM ATP. Absorbance increment (Δ) of S-1 solution induced by thermal treatment as above was measured at 350 nm in the incubation medium at 25°C as an indicator of turbidity.

($130,000\times\text{g}$, 30 分間), 可溶性画分を上澄みに分離し, SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供し, そこに含まれる HC および LC 量を定量した。その結果を Fig. 2 に示す。ここでは, 用いた未加熱 S-1 中の HC と LC 量に対する百分率として表示している。

コイ S-1 では (Fig. 2-(A)), 加熱に伴い上澄みに回収される HC 量は減少した。この回収量の減少は破線で示した Ca-ATPase の失活とほぼ一致し, 変性した S-1 は凝集してこの超遠心分離により沈殿してしまったことを示唆した。また, この上澄みには S-1 の失活の程度に関係なく, LC 量はほぼ 100% 回収され, HC の挙動とは全く異なっていた。すなわち, 変性が進むにつれて, LC は変性 S-1 HC から遊離した形で上澄みに回収されたと推定される。この結果もまた 0.5 M KCl 溶液で行った山本らの結果¹⁰⁾と一致する。一方, ウサギ S-1 では Fig. 1 で示したように失活しても濁度上昇が検出されなかったが, 超遠心分離により上澄みに回収される HC 量が減少することから, 変性ウサギ S-1 も凝集していることが確かめられた。この上澄み中の HC の減少は, Ca-ATPase の失活より少し遅れ, 0.1 M KCl 溶液に可溶性の変性 S-1 が存在することが推定された。さらに,

* 碓谷敏紀, 木村郁夫, 新井健一: 昭和 54 年度日本水産学会秋期大会講演要旨集 p. 159.

Fig. 2. Centrifugal separation of soluble fractions from the thermal treated S-1.

The thermal treatment of S-1 was conducted as in Fig. 1, and S-1 thus treated was centrifuged down at $130,000 \times g$ for 30 min. The supernatant obtained (soluble fraction) was applied to SDS-gel electrophoresis. Recovered HC (○) and LC (△) in the supernatant was estimated densitometrically. The HC and LC content in intact S-1 was taken as 100%. The dashed lines indicate the decrease in the Ca-ATPase activity. Carp S-1 (A), Rabbit S-1 (B).

上澄みに回収される LC 量も減少するので、コイ S-1 とは異なり、超遠心分離で沈殿した変性 S-1 の HC は LC を結合したまま不溶化していることが推定された。

しかし、上澄みへの LC の回収量の減少は HC のそれより少し遅れるので、一部の LC は HC から遊離していることを示唆させる。このことは、ウサギ S-1 の変性凝集物は 350 nm での吸光値として検出されないかなりサイズの小さなものであることを示唆している。⁹⁾ そして、変性しても初期には LC を結合したまま凝集するが、加熱時間が長くなるとその遊離が始まると推定した。

加熱 S-1 のトリプシン消化性 このように、変性に伴う S-1 の構造変化が、コイ S-1 とウサギ S-1 ではかなり異なることが明らかになったので、さらに S-1 分子の構造、特に HC の内部構造を知るため、タンパク質分子の高次構造変化を調べる指標としてよく用いられるトリプシン消化性を応用して検討した。ミオシンの熱安定性を考慮し、コイ S-1 では 10°C で、ウサギ S-1 では 25°C で消化を行うことにした。まず、Fig. 3-(A-a) に未加熱コイ S-1 のトリプシン消化の経時変化を示す。また、Fig. 3-(B-a) には、対照としたウサギ S-1 の場合を示した。コイ S-1 はウサギ S-1 と良く似たトリプシン消化の経時変化¹⁰⁾を示し、S-1 HC(95 kDa) の消失に伴い、75 kDa, 20 kDa を経由して、27 kDa, 50 kDa および 20 kDa の安定した 3 つの内部断片に変化した。そして、3 つの内部断片は SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動図上、コイとウサギの間ではほとんど差が認められず、しかも LC-1 の分子量はお互い異なるものの、いずれもトリプシン消化により分解を受け低分子量化し (LC-1' と示す)、LC-2 はそのような変化は認められな

Fig. 3. Tryptic digestion profile of native and thermally treated S-1s.

Carp S-1 (A) and rabbit S-1 (B) were incubated as in Fig. 1 at 35°C for 30 min and 40°C for 60 min, respectively. The untreated (a) or heat-treated (b) S-1 was digested with 1/100 (w/w) of trypsin at 10°C for carp S-1 or 25°C for rabbit S-1. The 95 k, A-1, A-2 and A-1' are S-1 heavy chain, alkali light chain-1, alkali light chain-2, and tryptic cleaved alkali light chain-1, respectively. The 50 k, 27 k, and 20 k are the three intramolecular fragments derived from S-1 heavy chain by tryptic digestion.

Fig. 4. Change in the tryptic digestability of S-1 during heat treatment.

Carp S-1 (A) and rabbit S-1 (B) were heat-treated at 35°C and at 40°C, respectively, as described in Fig. 1. Heat-treated S-1 was digested with trypsin. The conditions for tryptic digestion are the same as in Fig. 3 except the digestion period of 120 min.

い点でも、コイ S-1 の内部構造がウサギ S-1 と良く似ていることが示唆された。コイ S-1 での 3 つの内部断片が一次構造上のように並んでいるか断定できないが、トリプシン消化の経過がウサギのそれと酷似することから、ウサギ S-1 の場合と同様に N 末端から 27 kDa, 50 kDa, 20 kDa の順になるものと推定された。次に、加熱により完全失活させた S-1 についても同条件で消化し、Fig. 3 (A-b, B-b) に示した。コイ S-1 では、消化により S-1 HC (95 kDa) が減少しても、未加熱 S-1 HC から生成される 3 つの内部断片はほとんど検出されず、HC が小断片化した可能性を示唆した。しかも LC-1 は LC-1' には変換されず、また LC-2 も消失してしまい、小断片化している可能性が示唆された。さらに HC の消失が未加熱 S-1 の場合よりも遅れることを見いだした。一方、失活したウサギ S-1 からは、27 kDa, 20 kDa フラグメントおよび LC-1' の生成および LC-2 はまだ認められたが、50 kDa フラグメントの生成は認められず、これに相当するフラグメントのみが小断片化されていることが推定され、先に Setton らが報告している結果¹¹⁾と一致した。これらの結果から、コイ S-1 HC の内部構造はウサギ S-1 のそれと極めて良く似ているにもかかわらず、加熱により、Ca-ATPase 活性を失った S-1 HC の構造は両者で大きく異なることが示唆された。

そこで、コイ S-1 を 35°C で種々の時間加熱し、その後、上記の条件でトリプシン消化し、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供した。その結果を Fig. 4 に示

Fig. 5. Changes in the production of the 50 kDa, 27 kDa and 20 kDa fragments by tryptic digestion of heat-treated S-1.

The production of each intramolecular fragment, shown in Fig. 4, from heat-treated S-1 was estimated from the staining intensity of each band by scanning the gels. In estimation, the fragment content produced from untreated S-1 was taken as 100%. 50 kDa (○), 27 kDa (△), and 20 kDa (□) fragment, sum of A-1' and A-2 (▽), HC (●).

す。ここでは、Fig. 3 の実験結果から 60~120 分間消化すると、未加熱 S-1 HC はすべて 3 つの内部断片に変化するので、いずれの加熱した S-1 についても 120 分間消化した。この SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動図上に検出された S-1 HC から生成する 3 つの内部断片および LC 量をその染色強度から定量し、その結果を Fig. 5 に示した。コイ S-1 では加熱により失活するに従い、S-1 をトリプシン消化した時に生成される 3 つの内部断片はばらつきは多いものの互いに良く似た挙動を示しながら減少した。また、LC-1 の消失に伴う LC-1' の生成も加熱に伴い消失していった。しかも、図には示さないが、Ca-ATPase の失活速度とそれらの生成量が減少して行く速度はほぼ同じであった。ところが、同じ条件で消化しても消化を受けずに残存する HC が加熱時間とともに緩やかに増加することを見いだした。こういった現象が観察されるのは、かなり濁度の生じた変性 S-1 の場合であるので (Fig. 1 参照)、凝集の程度がかなり大きくなると、トリプシンが物理的に侵入できないために見かけ上の消化性の低下が起こると推定した。ウサギ S-1 を用いた系では、加熱に伴い、その S-1 をトリプシン消化した時に生成する 50 kDa フラグメントの生成量の減少が Ca-ATPase の失活とほぼ同時に起こることを認めた (図には示さず)。しかし、S-1 から生成す

る 27 kDa, 20 kDa フラグメントおよび LC-1' の生成量の減少速度は 50 kDa フラグメントのそれに比べかなり小さく, Ca-ATPase の失活と対応しなかった。^{11,12)} Fig. 2 に示したように, ウサギ S-1 の失活に伴って大部分の LC は HC に結合したまま不溶化していることが示されたので, おそらくこのゆっくりとした減少は失活しても LC の結合した HC が関与していると推定される。これらの結果は, 失活したコイ S-1 では LC が遊離し, S-1 HC 全体に構造変化が起こり, もはや元の高次構造を保持していないのに対し, 失活したウサギ S-1 分子では主として 50 kDa フラグメントで構造変化が起こり, 残りの 2 つのフラグメントでの立体構造はかなり保持されていることを示唆する。

本論文では, コイとウサギ S-1 の構造特性の違いを加熱による構造変化から検討した。その結果, 未変性コイ S-1 ではそのトリプシン消化性から (Fig. 3) ウサギ S-1 と HC の構造がかなり良く似ていることが明らかにされたが, 加熱変性に伴う構造変化はかなり異なることも明らかとなった。すなわち, コイ S-1 では Ca-ATPase が失活すると, S-1 HC はもはや LC を結合できず, HC から LC は遊離し, HC の凝集が起こって, 直ちに濁度上昇が起こるのに対し, ウサギ S-1 では変性しても, LC は遊離せず HC に結合したままサイズの小さい凝集体を形成し,⁹⁾ S-1 HC はまだ LC 結合能を失っていないことが示唆された。そして, この失活したウサギ S-1 は濁度を生じないこと, トリプシン消化しても, LC はもとより, 20 kDa および 27 kDa のフラグメントが生成されることより, LC 結合は S-1 HC のこの部分を安定化し, 結果として, S-1 の凝集が抑制されると推定した。コイ S-1 では LC 遊離が認められるので, この LC 結合による S-1 HC の構造安定が失われ, 結果として 50 kDa はおろか 27 kDa, 20 kDa フラグメントの部分も構造が変化し, トリプシン消化を受けやすくなり, フラグメント生成も起こらないと結論づけた。また, コ

イ S-1 で加熱により HC から遊離した LC は容易にトリプシン消化により小断片化されることが示されたので, HC に結合している LC も安定な立体構造を有していると考えられた。このコイ S-1 で見られた魚類 S-1 の構造特性が他の魚種でも認められるのか, また Ca-ATPase の失活速度から見た熱安定性と関係があるのかなどについて詳細に検討中である。

本研究の公表にあたり, 御助言をいただいた東和化成工業 (株) 山本康博氏に感謝いたします。また文部省科学研究費補助金によって行ったので, ここに記して深謝いたします。

文 献

- 1) 新井健一, 川村久美子, 林 千恵子: 日水誌, **39**, 1077-1085 (1973).
- 2) 木村郁夫, 室塚剛志, 新井健一: 日水誌, **43**, 315-321 (1977).
- 3) 碓谷敏紀, 木村郁夫, 新井健一: 日水誌, **47**, 947-955 (1981).
- 4) J. J. Connell: *Biochem. J.*, **58**, 360-367 (1957).
- 5) A. Weeds and B. Pope: *J. Mol. Biol.*, **111**, 129-157 (1977).
- 6) G. Gomori: *J. Lab. Clin. Med.*, **27**, 955-960 (1942).
- 7) U. K. Laemmli and M. Farve: *J. Mol. Biol.*, **80**, 579-599 (1973).
- 8) K. Yamamoto and T. Sekine: *J. Biochem.*, **86**, 1855-1862 (1972).
- 9) 山本康博, 碓谷敏紀, 今野久仁彦, 新井健一: 日水誌, **55**, 727-732 (1989).
- 10) M. Balint, L. Wolf, A. Tarcsafalvi, J. Gergely, and F. A. Sreter: *Arch. Biochem. Biophys.*, **190**, 793-799 (1978).
- 11) A. Setton and A. Muhrlad: *Arch. Biochem. Biophys.*, **235**, 411-417 (1984).
- 12) M. Burke, S. Zaager, and J. Bliss: *Biochemistry*, **26**, 1492-1496 (1987).