高濃度の中性塩によって起こるコイ・ミオシン B の解離 とソルビトールの抑制効果

熊 沢 義 之, 新 井 健 一

(1990 年 4 月 16 日受付)

Suppressing Effect of Sorbitol on Dissociation of Carp Myosin B into Actin and Myosin Induced by High Concentration of Salt

Yoshiyuki Kumazawa* and Ken-ichi Arai*

Carp myosin B (2-3 mg/ml) was treated at 10°C with 2.0 M NaCl or KCl in the presence of various concentrations of sorbitol. During the treatment of myosin B, changes in ATP sensitivity, the amount of denatured actin, and thermal inactivation mode of Ca-ATPase were investigated with a lapse of time. The ATP sensitivity irreversibly decreased and denatured actin increased with the duration of salt treatment. Thermal inactivation mode of Ca-ATPase changed from a single first order step to a biphasic first order process by the salt treatment. The changes induced by NaCl were relatively larger than those by KCl, and sorbitol reduced these changes.

After the treatment with 2.0 M NaCl for 3 h, dissociation of myosin from myosin B was recognized by ultracentrifugal sedimentation analysis and gel filtration profile on Sepharose-CL-4B followed by SDS-polyacrylamide gel electrophoretic analysis, and such salt-induced production of myosin monomer was also reduced by the treatment in the presence of sorbitol.

These results showed that sorbitol suppressed the dissociation of myosin B into actin and myosin induced by high concentration of salt.

ねり製品、塩蔵品、および塩干品などの生産工程で見られるように、魚肉の加工において中性塩 (NaCl) と魚肉タンパク質が接触し、なんらかの反応を起こす機会は非常に多い。それゆえ、これらの反応が製品の品質に影響を及ぼすことは論を待たないと思われる。一方、ねり製品の主原料である冷凍すり身や、その他の調味加工品にはソルビトールなどの糖類が用いられており、中性塩と共に糖の存在も製品の品質に影響しているものと考えられる。

そこで著者らは、従来中性塩と糖と魚肉タンパク質の三者の間に起こる相互反応について研究してきた。そして先に、低温下 (10°C) において、高濃度の塩 (KCl および NaCl) の添加によって起こるコイ・ミオシン B の粘性の低下や ATPase 活性などの変化に対して、ソルビトールが抑制的に作用すること、また KCl と NaCl を比較し、NaCl の作用の方が相対的に強いことを報告した¹⁾。一方、高濃度の NaCl によってミオシン B はその一部がアクチンとミオシンに解離しそのアクチンが優先的に変性する事実が報告²⁾ されているので、ソルビトールは塩によるミオシン B の解離反応を抑制している可能性が示唆される。そこで本研究では塩によるミオシン B の解離反応に対するソルビトールの作用を検討することを目的とした。

実験方法

ミオシン B の調製 コイ (Carp, *Cyprinus carpio*) のミオシン B は高士らが用いた方法³⁾ に従って調製し、0.5 M KCl, 40 mM Tris-maleate (pH 7.0) 溶液とした。

ソルビトール共存下でのミオシン B の塩処理とその停止 ミオシン B 溶液 (3 mg/ml) に対して、40 mM Tris-maleate (pH 7.5) を含む 3 M の塩溶液 (KCl または NaCl) とソルビトール溶液を加え、塩の終濃度は 2.0 M, ソルビトールの終濃度は 0~1.0 M の間の種々の濃度となるように調整し、これらの混合液を 10°C に保持した (以下この操作を塩処理と呼ぶ)。また処理中のミオシン B を経時的に取り出し、0.5 M KCl, 40 mM Tris-maleate (pH 7.0) 溶液に対して氷冷しつつ透析して、塩濃度を低下させて塩処理を停止させ、同時にソルビトールも除い

* 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).

て以下の実験に供した。

ミオシン B の粘性と ATP 感度の測定 塩処理中または塩処理を停止させた後のミオシン B 溶液の ATP 感度をオストワルド型粘度計 (容量 2.0 または 2.5 ml で溶媒の流速は 60~100 秒のもの) を用いて測定した。すなわち、ミオシン B 溶液に対して ATP と MgCl_2 を終濃度が各 1 mM になるように添加し、その前後の粘度変化から ATP 感度を次式により算出した。⁴⁾

ATP 感度 (%) = $[(\log \eta_r - \log \eta_{r, \text{ATP}}) / \log \eta_{r, \text{ATP}}] \times 100$,
ここで η_r および $\eta_{r, \text{ATP}}$ は ATP を添加する前および後の相対粘度である。

ミオシン B Ca-ATPase 活性の測定 ミオシン B Ca-ATPase 活性 (EC 3.6.1.3) を測定する反応混液の基本組成は、0.1 M KCl, 25 mM Tris-maleate (pH 7.0), 5 mM CaCl_2 , 0.1~0.2 mg/ml のミオシン B および 1 mM ATP とした。反応はすべて 25°C で行い、終濃度 5% の HClO_4 で反応を停止させた後に、遊離する無機リン酸を Gomori の方法⁶⁾を用いて比色定量し、比活性 ($\mu\text{mol Pi/min} \cdot \text{mg}$) を求めた。

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) 法によるタンパク質サブユニット組成の検討 電気泳動は Laemmli の方法⁷⁾に従って、0.1% SDS を含む 10% アクリルアミドゲルを用いて行った。またタンパク質の染色は Coomassie Brilliant Blue R を用い、染色強度の測定は島津 CS-910 型クロマトスキャナーを使用した。なお、電気泳動に供するタンパク質量は供試量と染色強度との関係が比例関係にある範囲内 (20 μg 以下) とした。

ミオシン B の超遠心沈降分析 超遠心によるミオシン B の沈降図はシュリーレン光学系を装備した Beckman L2-65B 型超遠心分離機を用い、39,600 rpm, 10°C, タンパク質濃度 2.0 mg/ml の条件で撮影した。また、各ピークの沈降速度 ($S_{20, w}$) はタンパク質の偏比容を 0.74 として求めた。^{7,8)}

ミオシン B の Sepharose CL-4B によるゲル濾過 ミオシン B のゲル濾過は若目田らが採用した方法⁹⁾に従って行った。すなわち、0.5 M KCl, 20 mM imidazole-HCl (pH 7.0) 溶液で平衡化した Sepharose CL-4B のカラム (2.6×100 cm) を用い、添加するタンパク質量は 17 mg とし、18 ml/h で上記の溶液を用いて溶出を行い、4.8 ml/づつを分画した。各分画について、280 nm の吸収を測定し、さらに SDS-PAGE に供してタンパク質のサブユニット組成を検討した。なお、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。

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分画 V を標準とし、ビウレット法¹⁰⁾によって比

色定量して求めた。

結 果

塩処理によって起こるミオシン B の ATP 感度の変化とソルビトールの影響 ミオシン B (3 mg/ml) に対して、塩の終濃度が 2.0 M となるように、またソルビトールの終濃度が 0, 0.5, および 1.0 M になるように添加した混合液を 10°C に保持した。経時的に一部を取り出して 0.5 M KCl, 40 mM Tris-maleate (pH 7.0) 溶液に対して透析して塩処理を停止した後、ミオシン B の粘性の ATP 感度を測定した。結果を Fig. 1 (A), (B) に示す。

これによると、未処理のミオシン B の ATP 感度は 132% であり、これは 10°C において 4 時間後に至るまではほとんど変化しなかった。また 2.0 M KCl で処理を行ったミオシン B の ATP 感度 (A) は経時的に減少していく傾向を示している。1.0 M のソルビトールを共存させて塩処理を行なったものも同様な減少傾向を示したが、その減少の度合は抑制された。2.0 M NaCl で塩処理を行った場合 (B) は、2.0 M KCl で処理を行った場合よりもその変化は大きく、処理直後から急激な減少が起こりその後緩慢に減少していく傾向を示した。また、ソルビトール共存下で同じ塩処理を行ったミオシン B では、その減少は抑制され、かつソルビトール濃度の増加に伴い抑制の度合も大きくなる傾向を示した。

これらの結果は塩処理を経時的に停止した後測定したミオシン B の ATP 感度であるが、塩処理中のミオシン B を一定量ずつ取り出し、塩処理を停止することなく直接に ATP 感度を測定しても、同様な変化傾向の結果を示した。ただし、処理中のミオシン B の ATP 感度に比べて塩処理停止後のその値は高く、塩処理後の透析過程に 7~15% 程度の回復が起こったが、回復の度合はソルビトールの存否に関係がなかった。したがって、塩処理による ATP 感度の減少はソルビトールを共存させた場合でも、不可逆的に進行するものと考えられる。

塩処理によって起こるミオシン B Ca-ATPase の熱変性反応様式の変化とソルビトールの影響 塩処理を行ったミオシン B の Ca-ATPase 活性の熱変性反応様式の変化とソルビトールの影響について検討を行った。すなわち、Fig. 1 と同じ条件で、ソルビトール共存下の塩処理を行ったミオシン B を透析して塩濃度を 0.5 M KCl に戻し、同時に添加したソルビトールを除去した後、先ず 35°C で加熱して Ca-ATPase 活性の経時変化を測定した。

Fig. 2 (A) は塩処理を 30 分行ったミオシン B について、その Ca-ATPase 活性の熱変性様式を検討した結果である。これによると、未処理のミオシン B の Ca-ATPase の熱変性は遅い速度の一次反応に従うのに対して、

Fig. 1. Change in ATP sensitivity of myosin B induced by 2.0M salt treatment in the presence of various concentrations of sorbitol.

Myosin B (3 mg/ml) was kept at 10°C in a medium containing 2.0M KCl (A) or NaCl (B) in the presence of 0 (○), 0.5 (△), and 1.0 (□) M sorbitol.

During the salt treatment, a portion of the mixture was taken out at various intervals and dialyzed against 0.5 M KCl, 40 mM Tris-maleate (pH 7.0). The viscosity of myosin B was measured at 10°C in an Ostwald type viscometer having an outflow time of 60–100 s for a 2.0 or 2.5 ml solution. The ATP sensitivity was estimated using the following relation: $[(\log \eta_r - \log \eta_{r'ATP}) / (\log \eta_{r'ATP})] \times 100$, where η_r and $\eta_{r'ATP}$ are the relative viscosities before and after the addition of 1.0 mM ATP, respectively. Salt-untreated myosin B (●).

Fig. 2. Change in thermal inactivation mode of myosin B Ca-ATPase induced by 2.0M salt treatment in the presence of various concentrations of sorbitol.

(A) Myosin B was treated with 2.0M NaCl in the presence of 0 (○), 0.5 (△), and 1.0 (□) M sorbitol as in Fig. 1 and kept at 10°C for 30 min.

(B) Myosin B was treated with 2.0M NaCl in the presence of 1.0M sorbitol as in Fig. 1 and kept at 10°C for 1 (○), 2 (△), 3 (□), and 4 (△) hours, respectively.

After the salt treatment, the mixtures were immediately dialyzed as described in Fig. 1. The myosin B in the dialyze was then incubated at 35°C for various times in a medium containing 0.5 M KCl, 40 mM Tris-maleate (pH 7.0). The Ca-ATPase assay was carried out at 25°C in a reaction medium containing 0.1 M KCl, 5 mM CaCl_2 , 25 mM Tris-maleate (pH 7.0), 1 mM ATP and 0.1–0.2 mg/ml of myosin B. Salt-untreated myosin B (●).

2.0 M NaCl で処理をしたミオシン B の場合は、初期に速く、後期は遅い速度の二段階の一次反応に従うようになることを示された。さらに、ソルビトールを共存させて塩処理を行ったミオシン B では、ソルビトール濃度の増加に伴い、初期の速い速度の失活段階は小さくなる傾向を示すようになり、特に 1.0 M のソルビトール共存下で塩処理をおこなったものではほとんど初期の失活段階が認められなくなった。また、Fig. 2 (B) は、1.0 M ソルビトール共存下で 2.0 M NaCl で 4 時間処理する間、経時的にミオシン B の塩処理を停止させて、35°C で Ca-ATPase 活性の熱変性様式の変化を調べた結果である。これによると、いずれの場合も熱変性は初期に速く、後期は遅い二段階の一次反応となったが、塩処理時間が長くなるに従って初期の速い失活段階が大きくなる傾向が示された。なお、KCl で処理を行ったミオシン B の Ca-ATPase 活性の熱変性様式の結果を Fig. 3 に示した。すでに Fig. 2 (A) に示したように、2.0 M NaCl では 30 分程度の処理によって熱変性様式は明らかな二段階の反応となるが、2.0 M KCl では 4 時間の処理を行っても、初期の速い失活段階は極めて小さかった。

Ca-ATPase 活性の熱による変性の反応様式が上記のように二段階となるのは、ミオシンとアクチンが

Fig. 3. Change in thermal inactivation mode of myosin B Ca-ATPase induced by 2.0 M KCl treatment.

Myosin B was treated with 2.0 M KCl as in Fig. 2, and kept at 10°C for 30 (○), and 240 (Δ) min. The mixture was dialyzed and thermal inactivation of its Ca-ATPase was measured in the same manner as in Fig. 2. Salt-untreated myosin B (●).

Fig. 4. Change in amount of actin released from myosin B induced by 2.0 M salt treatment in the presence of various concentrations of sorbitol.

Myosin B was mixed with salt in the presence of sorbitol as in Fig. 1. During the treatment with 2.0 M NaCl (○, Δ, ◻) or KCl (▽), a portion of mixture was dialyzed against 50 mM KCl, 20 mM Tris-maleate (pH 7.0), and centrifuged at $10,000 \times g$ for 30 min. A fixed volume (10 μ l) of the supernatant was subjected to SDS-polyacrylamide gel electrophoresis using 10% acrylamide gel, by the method of Laemmli. The amount of 50 mM KCl-soluble actin was demonstrated as the relative intensity to that of myosin B before centrifugation, by measuring the staining density on gel rods.

Sorbitol concentrations: 0 (○), 0.5 (Δ), and 1.0 (◻) M.

Salt-untreated myosin B: (●).

混合状態にある場合（言いかえれば、ミオシンと結合する化学量論的なアクチンが存在しないため、ミオシンの一部が遊離状態となっている状態）に相当していることが報告されている。^{11,12)} これはミオシンとアクトミオシンの Ca-ATPase の熱変性速度が著しく違うため、その混合系の熱変性反応が見かけ上二段階となる現象を利用して、アクトミオシンに混合している遊離状態のミオシンの存在を検知するのが原理である。したがって、上記の実験の結果は、塩処理の際に共存するソルビトールは遊離状態のミオシン量を減少させていること、云いかえれば、塩によるミオシンBの解離の度合を抑制することを示唆している。

塩処理によってミオシン B から解離する変性アクチン量とソルビトールの影響 塩処理によってミオシンBより解離してくる変性アクチンの量と、それに対するソルビトールの影響を若目田らの方法¹⁸⁾に従い測定した。すなわち、Fig. 1 と同じ条件下で、塩処理中のミオシンBを経時的に取り出し、50 mM KCl, 20 mM Tris-maleate (pH 7.0) に対して透析して、10,000×g で 30 分間遠心分離して得た上清画分中に可溶化するアクチン量を、SDS-PAGE に供し、同様にして定量した遠心分離前のミオシンBが含んでいる全アクチン量に対する割合(%)で表し、Fig. 4 にその結果を示した。

これによると、塩処理をしないミオシンB中のアクチンは、貯蔵4時間後に至るまで 50 mM KCl 溶液中に可溶化する量は数パーセントであるが、一方 2.0 M NaCl で処理を行ったミオシンB中のアクチンは処理後急激に可溶化するようになり、二時間後にはほぼ最大値の 60 数%に達した。また、ソルビトール共存下で塩処理を行ったミオシンBではアクチンの可溶化は抑制され、さらにソルビトール濃度の増加に伴い、その量は減少する傾向を示し、0.5 M ソルビトール存在下では約 55%、1.0 M ソルビトールでは約 45% が可溶化するにとどまった。また、2.0 M KCl で処理を行った場合は 30% 程度で可溶化はかなり小さくなり、最大値は 2.0 M NaCl の場合の約 1/2 程度にとどまった。

塩処理によって起こるミオシン B の超遠心沈降図型の変化とソルビトールの影響 次に、塩処理によって起こるミオシン B (2.0 mg/ml) の超遠心沈降図型の変化と、それに対するソルビトールの影響について検討を行った。その結果を Fig. 5 (A)~(D) に示した。

これによると、まず、未処理のミオシン B(A)は沈降速度が 13S の大きな hypersharp ピークを示したが、対照のためこのミオシンBに 1 mM の ATP および MgCl_2 を添加すると、初めに 21S の小さなピークと、それに続いて 13S のピークと 5.5S の大きなピークの生成が認められた（結果は図示しない）。21S のピークは沈降に伴い

Fig. 5. Change in ultracentrifugal sedimentation pattern of myosin B induced by 2.0 M salt in the presence of 1.0 M sorbitol.

Myosin B was mixed with salt in the presence of 1.0 M sorbitol as in Fig. 1. After the treatment with salt for 180 min, myosin B was dialyzed as in Fig. 1. All runs of myosin B (2 mg/ml) were conducted at 39,600 rpm at 10°C (bar angle 70°). Photograph was taken at 30 min after reaching the top speed.

(A): Salt-untreated myosin B, (B): 2.0 M NaCl-treated myosin B, (C): 2.0 M NaCl-treated myosin B in the presence of 1.0 M sorbitol, (D): 2.0 M KCl-treated myosin B.

拡散して認められなくなった。21S のピークの本体は未だ不明であるが、未処理のミオシンBが示す主要な 13S のピーク、および ATP と MgCl_2 の添加により新たに生成した 5.5S のピークはそれぞれアクトミオシンおよびミオシンに相当するものと推定される。一方、2.0 M NaCl で 3 時間処理を行ったミオシン B(B)では、アクトミオシンに相当する 12.6S の小さなピークの他に、ミオシンに相当する 5.1S の大きなピークの生成が認められるようになるので、塩処理によりミオシンBの一部が解離したことを示している。しかし、1.0 M のソルビト

Fig. 6. Change in elution profile on gel filtration of myosin B induced by 2.0 M salt treatment in the presence of 1.0 M sorbitol.

Myosin B was treated with 2.0 M salt in the presence of 1.0 M sorbitol as in Fig. 1. After 180 min at 10°C, the mixture (each 17 mg of protein) was applied on a column (2.6 × 100 cm) of Sepharose CL-4B equilibrated with 0.5 M KCl, 20 mM Imidazole-HCl (pH 7.0), and then eluted with the same solution at a flow rate of 18 ml/h. Each fraction of 4.8 ml was collected and measured an absorbance at 280 nm. Fractions indicated with the bar (a, b, and c) were pooled. The arrows indicate the void volume (V_0). (A)~(D) showed as in Fig. 5.

ールを共存させて同じ塩処理をおこなったミオシン B (C) では、ミオシンに相当する 5S のピークの生成はほとんど認められず、29.6S の大きなピークと 13.4S の小さなピークが認められるだけであった。この 29.6S のピークは沈降に伴い拡散して 60 分後にはほとんど認められなくなった。なお 2.0 M KCl で処理を行ったミオシン B (D) の沈降図型は、(C) の場合と良く似ており、初めに 29S の大きなピークが、続いて 14S の小さなピークが認められた。すなわち (C) と (D) の場合はともに遊離状態のミオシンに相当するピークの生成は観察されず、特に (C) の場合は、ソルビトールが塩によるミオシン B の解離を抑制していることを示している。(C), (D) で認められた 29~31S の大きな成分の本体は未だ不明であるが、これに 1 mM の ATP および $MgCl_2$ を添加してみるとこのピークは完全に消失し、代わって 5S の大きなピークを生成することから、なんらかの構造変化を起こしたミオシン B と推定される。

塩処理によって起こるミオシン B のゲル濾過溶出図

型の変化とソルビトールの影響 次に塩処理によってミオシン B に起こる変化とソルビトールの影響を、Sepharose CL-4B を用いたゲル濾過法を用いて検討した。すなわち、Fig. 5 と同じ塩処理をしたミオシン B をゲル濾過に供し溶出画分の 280 nm における吸光値を測定し、それぞれの溶出図型を描いた。それらの結果を Fig. 6 (A)~(D) に示す。

これによると、まず未処理のミオシン B (A) では、(V_e/V_0)=1.20 の溶出位置に主要成分 (a 画分とする) が、また (V_e/V_0)=2.10 の溶出位置に少量の成分 (b 画分とする) が認められた。一方、2.0 M NaCl で 3 時間の処理をおこなったミオシン B の場合 (B) では、上記の a 画分が大きく減少し、それに伴って b 画分が増加するが、さらに (V_e/V_0)=1.35 の溶出位置に新たな成分 (c 画分とする) の生成が認められた。また、2.0 M NaCl で処理をする際に、1.0 M のソルビトールを共存させ処理を行ったミオシン B の場合 (C) では、c 画分の生成および b 画分の増加は認められるものの、その量は少なく、

Fig. 7. Change in subunits composition of eluted fractions from gel filtration of myosin B induced by 2.0 M salt treatment in the presence of 1.0 M sorbitol.

Each fraction from Sepharose CL-4B (as shown in Fig. 6) was subjected to SDS-polyacrylamide gel electrophoresis to analyze the subunits composition of protein eluted by the same method as in Figs. 4. The amount of MHC (○) and actin (●) in each fraction was quantitatively determined as in Fig. 4 and expressed as the relative value to that of myosin B applied. (A)~(D) showed as in Fig. 5. MHC: myosin heavy chain.

また a 画分の減少も少なかった。なお、2.0 M KCl で 3 時間の処理を行ったミオシン B の場合は、未処理のミオシン B(A) に比べて僅かに a 画分の減少および b 画分の増加が認められるものの、溶出図型は余り変わらなかった。

Fig. 6 (A)~(D) に示したゲル濾過で得た各溶出画分を SDS-PAGE によって分析した。その結果は図示しないが、a 画分は、全て例外なく、ミオシン重鎖、アクチンとミオシン軽鎖よりなるのでアクトミオシンであり、b 画分は例外なくアクチンと少量のトロポミオシンおよびトロポニンから成ること、また c 画分はミオシン重鎖とミオシン軽鎖のみから成るのでミオシンに相当する成分であることが示された。

そこで、SDS-PAGE 法により、溶出画分中に含まれるミオシンとアクチンに相当する成分量をそれらの染色強度から求め、供試したミオシン B 中の含量に対する相対値 (%) として表した結果を Fig. 7 (A)~(D) に示した。これによると、塩処理前のミオシン B(A) の a 画分にはミオシンとアクチンの両方がほぼ同じ比率で多量に含まれているが、2.0 M NaCl で処理をしたミオシン B

(B) の a 画分中にはミオシンとアクチンが、b 画分中にはアクチンが、および c 画分中にはミオシンが多く含まれていることが認められた。また、ソルビトール共存下で同じ塩処理を行ったミオシン B(C) では、塩処理ミオシン B(B) の場合に似て、c 画分にはミオシンが、b 画分にはアクチンが認められるが、いずれもその量は少ないこと、また a 画分中にはミオシンとアクチンが等量含まれているが、その量はより多いことが示されている。なお KCl で処理をしたミオシン B(D) では、NaCl で処理した場合 (B) と良く似ているが、b 画分のアクチンは少量であり、a 画分中のミオシンとアクチンは多いが、その後半部分にはアクチンより明らかにミオシンの含量が多いので、アクトミオシンの他に遊離状態のミオシンの存在が示された。これはゲル濾過の溶出図型 (Fig. 6) だけから判断した推定をよく支持するものである。

考 察

高濃度の NaCl と魚類の筋原線維タンパク質との間に起こる反応については、既に若目田ら^{9,18)} が詳細な検討をしており、特にコイとグチの筋原線維タンパク質が高

濃度 (1.5~2.0 M) の NaCl と、低温下においてさえも反応し、アクチンとミオシンに解離するが、そのアクチンは優先的に変性してしまうこと、また解離したミオシンはコイでは大きな変性が起こらず、グチでは僅かに変性することを報告している。また、西本ら¹⁴⁾は塩に対する感受性は魚種によって異なり、スケトウダラは他の魚種よりも塩感受性が高く、アクチンとミオシンに解離した後、いずれも速やかに変性してしまうことを報告している。

著者らは、塩によって起こるミオシンBの性状変化に対してソルビトールが及ぼす効果について検討してきた。¹⁾そして、高濃度の塩 (NaCl および KCl) によって起こるミオシンBの粘度の低下や、Mg²⁺ および EDTA-ATPase 活性の変化に対して、ソルビトールは抑制的に作用することを報告したが、本研究では、塩によって起こるミオシンBの解離反応に対するソルビトールの影響を検討することを目的とした。塩によってミオシンBに起こるアクチンとミオシンへの解離反応は、初めはミオシンBの急激な粘度低下や Ca-ATPase の熱変性の反応様式の変化から推定されたものであるが、これらの指標の変化は解離反応を予測させるにすぎないものである。しかし、超遠心沈降分析や SDS-PAGE を組み合わせたゲル濾過法の技法は、アクチン、ミオシン、およびアクチンを直接定量的に分析することを可能としている。超遠心沈降図型による分析では、5S の沈降速度を示す遊離状態のミオシンの出現を直接的に撮影できるが、2.0 M NaCl で処理をしたミオシンBからは明らかにミオシンに相当するピークが出現し、これは 1.0 M のソルビトールを共存させて塩処理をするとほとんど認められなくなった。しかし、ソルビトール濃度を 0.5 M として3時間の塩処理を行った場合にはミオシンに相当するピークが観察され、また1時間の塩処理をした場合にはミオシンに相当するピークは小さくなり観察されなくなった (結果は図示していない)。それゆえ塩によるミオシンBの解離反応に対するソルビトールの抑制の効果は、塩処理の際の塩の種類と濃度、および処理時間の他に、共存する糖の濃度によって影響を受けることは確実である。また、NaCl の作用は KCl のそれよりも極めて強い。ため、ソルビトールによってはそれを完全に停止させることは出来ないことも、本研究の結果から明らかである。

1.0 M のソルビトールの共存下で塩処理を行ったミオシンB中にはミオシンに相当するピークが超遠心沈降図型上には認められなかったが、ゲル濾過法によると僅かにその溶出画分が認められ、さらに、SDS-PAGE 法によってアクチン量に比べてより大過剰のミオシン量の存在が明らかに定量された。したがって、ミオシンBのアクチンとミオシンへの解離反応を確認する方法としてこ

れらの3種の分析技術の組み合わせが極めて有効であることが裏づけられた。

ミオシンBのミオシンとアクチンへの解離は、ATP およびその類似化合物であるピロリン酸塩によっても起こる (Mg²⁺ 共存下) ことは既に良く知られている。¹⁸⁾ また、コイのミオシンBからピロリン酸塩により解離するアクチン量は、処理中に共存する KCl 濃度により影響を受け、また KCl 濃度が 0.3 M 以下の場合には、透析によりピロリン酸塩 (および Mg²⁺ イオン) を除くと解離したアクチンはミオシンと再び結合すること、また KCl 濃度が 0.7 M 以上の場合には、アクチンの変性が進行して解離が不可逆となり、透析しても再結合しないと云われる。^{19,17)} 本実験のように、高濃度の NaCl で処理する場合は、処理後すぐに塩濃度を元の 0.5 M KCl に戻しても粘度や ATP 感度の回復が非常に僅かでありソルビトール共存下の塩処理においてさえも最大 15% 程であった。それゆえ塩処理停止後のミオシンB溶液について求めた解離の度合とほとんど変わらないと考えられる。

本実験結果はあくまでも試験管内のモデル試験から得たものであるため、塩蔵肉や塩干品の肉中でも、同じような変化が起こるかどうかは未だ確認出来ない。しかし、最近に至り、塩干品やねり製品の製造工程において、筋原線維タンパク質中のミオシンが単独で強い多量化反応をひき起こす事実が知られるようにされてきた。¹⁸⁻²⁰⁾ したがって、これらの製品の生産過程において塩により両タンパク質の解離反応が上と同じように起こり、糖はその解離反応とそれに続くミオシンの多量化反応を抑制している可能性は極めて高いものと推定できる。

本研究に用いたソルビトールは東和化成工業株式会社から御分与いただいたものであり、ここに併記して感謝いたします。

文 献

- 1) 熊沢義之, 新井健一: 日水誌, 56, 679-686 (1990).
- 2) 若目田 篤, 新井健一: 日水誌, 50, 635-643 (1984).
- 3) 高士令二, 新井健一, 斎藤恒行: 日水誌, 36, 169-172 (1970).
- 4) H. H. Weber and H. Portzehl: Adv. Protein Chem., 7, 61-252 (1952).
- 5) G. Gomori: J. Lab. Clin. Med., 27, 955-960 (1942).
- 6) U. K. Laemmli: Nature, 227, 680-685 (1970).
- 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, p. 18.
- 8) 川出由巳: 生物物理化学実験法 (渡辺 格, 島内武彦編) 培風館, 東京, 1962, pp. 23-41.
- 9) 若目田 篤, 新井健一: 日水誌, 52, 293-300

- (1986).
- 10) A. G. Gornall, C. T. Bardawill, and M. M. David: J. Biol. Chem., **177**, 751-766 (1949).
 - 11) T. Yasui, Y. Hashimoto, and Y. Tonomura: Arch. Biochem. Biophys., **87**, 55-62 (1960).
 - 12) T. Yasui, H. Kawakami, and F. Morita: Agr. Biol. Chem. **32**, 225-233 (1968).
 - 13) 若目田 篤, 新井健一: 日水誌, **51**, 497-502 (1985).
 - 14) 西本真一郎, 新井健一: 日水誌, **54**, 1429-1436 (1988).
 - 15) T. Nihei and Y. Tomomura: J. Biochem., **46**, 1355-1366 (1959).
 - 16) 岩見史郎, 新井健一: 日水誌, **54**, 2019-2027 (1988).
 - 17) 岩見史郎, 新井健一: 日水誌, **54**, 2009-2017 (1988).
 - 18) 伊藤 剛, 北田長義, 山田典彦, 関 伸夫, 新井健一: 日水誌, **56**, 999-1006 (1990).
 - 19) 沼倉忠弘, 関 伸夫, 木村郁夫, 豊田恭平, 藤田孝夫, 高間浩蔵, 新井健一: 日水誌, **51**, 1559-1565 (1985).
 - 20) 沼倉忠弘, 関 伸夫, 木村郁夫, 豊田恭平, 藤田孝夫, 高間浩蔵, 新井健一: 日水誌, **53**, 633-639 (1987).