ATP による魚類ミオシンの熱変性抑制の再検討

吉岡武也, 浜井昌志, 今野久仁彦, 新井健一

(1990年6月25日受付)

Re-examination of Protective Effect of ATP on Thermal Inactivation of Myosin Ca-ATPase

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

The mechanism involved in protective effect of ATP on thermal inactivation of myosin Ca-ATPase was re-examined. 1) ATP concentration required for full protection against thermal denaturation is myosin concentration dependent, and two concentrations were similar to each other. 2) The protection by ATP is more effective in the presence of Mg^{2+} than in the presence of Ca^{2+} or EDTA, suggesting the high affinity of ATP-Mg to the ATPase active site. 3) The protective effects of triphosphate compounds (ATP and AMPPNP) were distinguishable from those of diphosphate compounds (ADP, PPi) in their concentration dependence and in the maximal protection achieved, and monophosphate compounds (AMP and IMP) were unable to protect myosin from inactivation at all.

ATP 存在下のミオシンは著しく熱安定性が増すという事実は以前より知られているが,^{1,2)} この安定化はミオシンと ATP が結合した結果であると推定されている。我々も、熱安定性がかなり異なるティラピアミオシン³⁾においても ATP を加えると、ウサギ同様にその熱変性が著しく抑制されることを報告した。⁴⁾ しかし、この変性抑制に要する ATP 濃度は実験に用いたミオシンモル濃度に比べ非常に高かったので、単にミオシンATP が結合したことによって安定化されたのか疑問が残った。そこで、本研究では、ATP によるミオシンの変性抑制作用について、化学量論的に再検討した。

方 法

ウサギ骨格筋およびコイとティラピアの背肉からのミオシンは、それぞれ Connell⁵⁾ および碓谷ら⁶⁾の方法に従って調製し、0.5 M KCl, 20 mM Tris-maleate (pH 7.5) 溶液として用いた。なお、一部の実験では DEAE-Sephadex A-50 により精製したミオシンを用いた。⁷⁾ ATP 存在下でのミオシンの加熱および停止後の処理、ミオシン Ca-ATPase 活性の低下から求めた変性速度 (K_d) は前報に従って求めた。⁴⁾ ただし、加熱の際に共存する Mg^{2+} 濃度は ATP の濃度にかかわらず 1 mM と

した。また必要に応じて 30 mM $CaCl_2$ あるいは 1 mM EDTA を共存させた。

結 果

ミオシンの熱変性に対する ATP の抑制効果 (高濃度 $MgCl_2$ 共存下での検討)

ウサギおよびティラピアのミオシンに 1 mM $MgCl_2$ 共存下 1~20 μ M の ATP および ATP 再生系⁸⁾としてホスホエノールビルビン酸 (PEP) とビルベートキナーゼ (PK) を添加し、40°C (ウサギ) あるいは 35°C (ティラピア) で加熱処理した。各 ATP 濃度における Ca-ATPase 活性失活の経時変化を測定し、その結果を Fig. 1 に示した。すでに報じたように、⁴⁾ ATP 再生系により加熱処理中の ATP 濃度を一定に保持すると、Ca-ATPase の失活はその初期については一次反応と近似でき、 K_d は添加した ATP 濃度の増加につれて著しく減少した。これはウサギ、ティラピアいずれのミオシンを用いてもほぼ同じであった。そして Ca-ATPase の失活抑制にはわずか数 μ M の濃度で十分であった。この実験に用いたミオシンの濃度は約 1 mg/ml であるので、ミオシンの分子量を 48 万とすると約 2 μ M に相当する。この結果はミオシン Ca-ATPase の失活はほぼ同程度の濃度の

*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 現所属: 日本水産株式会社中央研究所 (Central Research Laboratory, Nippon Suisan Co., Ltd., Kitano, Hachioji, Tokyo 192, Japan).

Fig. 1. Quantitative analysis of protective effect of ATP on the thermal inactivation of myosin Ca-ATPase.

Rabbit myosin (A, 0.98 mg/ml, 40°C) and tilapia myosin (B, 1.07 mg/ml, 35°C) were thermally treated in the presence of ATP concentration denoted in the figure in μM together with 1 mM MgCl_2 . The medium also contains 0.5 M KCl, 20 mM Tris-maleate (pH 7.5), and ATP-regenerating system consisting of pyruvate kinase (0.05 mg/ml) and phosphoenol pyruvate (1 mM). The first order rate constant of Ca-ATPase inactivation (K_D) was estimated from the slope.

Fig. 2. Temperature dependent protective effect of ATP.

Rabbit (circles), tilapia (squares), and carp (triangles) myosins were thermally treated at different temperatures in the either absence (open) or presence (closed) of 0.1 mM ATP. The other medium compositions are the same as in Fig. 1 except that 0.1 mM ATP with ATP-regenerating system was used. The first order rate constant of Ca-ATPase inactivation (K_D) was estimated as in Fig. 1.

ATP により最大の抑制が得られることを示し、前報と異なる結果が得られた。⁴⁾ そしてこの結果は ATP の抑制効果は共存する MgCl_2 濃度により見かけ上強く影響を受け、高濃度の MgCl_2 が共存すると抑制作用が著しいことを示している。

ウサギおよびティラピアミオシンの種々加熱温度における ATP 存在下および非存在下での K_D を求め、ATP の変性抑制効果に対する温度の影響を比較した。ここでは、抑制効果が飽和している 0.1 mM ATP (1 mM MgCl_2) を用いた。結果をアレニウスプロットし、Fig. 2 に示し

Fig. 3. Myosin concentration dependent protective effect of ATP.

Rabbit myosin at three different concentrations were thermally treated exactly the same way as in Fig. 1, and the inactivation rate constant was estimated. Myosin concentrations used are 1 ($\circ$), 2 ($\square$), and 8 μM ($\triangle$). The ATP concentrations required for half maximal protection (K_p) at each myosin concentration were estimated and plotted in the inset figure.

た。それによると、ATP 存在下での K_D の直線はいずれのミオシンについても高温側に約 10°C 移動し、ATP による安定化が魚類ミオシンでもウサギミオシンと同様に起こることが示されている。

既に ATP の抑制効果はミオシン濃度に依存することが示唆されているが、⁴⁾ このことを明らかにするため、ミオシン濃度を変えて ATP の変性抑制効果を再検討した。すなわち、ミオシン濃度を 1, 2, および 8 μM とし、Fig. 1 と同様な方法で種々濃度の ATP 存在下で加熱を行い、 K_D を求め、その結果を Fig. 3 に示した。ATP 濃度が増加するに伴い、 K_D はすべてのミオシン濃度について著しく減少し、最終的にはほぼ一定の値に達した。しかし、用いたミオシン濃度が高くなるに伴い、Ca-ATPase の熱変性を抑制するのに必要な ATP 濃度は次第に高濃度側に移行していることが示された。そこでそれぞれのミオシン濃度について K_D が 50% に減少する ATP 濃度 (K_p) を算出し、Fig. 3 中に示した。これによると、ミオシン濃度と K_p の間には比例関係が認められるので、ATP はミオシンに化学量論的に結合して発揮されることが強く示唆された。

ATP の変性抑制効果と共存するイオンの影響 ATP の変性抑制効果は ATP がミオシンに結合して発揮されることが示唆され、さらにミオシン ATPase は Mg^{2+} , Ca^{2+} , あるいは K^+ (EDTA) で活性化を受けることが知られているので、ATP の保護効果を三種類のイオン共

存下で比較した。PK, PEP の ATP 再生系は MgCl_2 を必須とするのでこの場合は使用できなかった。さらに、 Ca^{2+} あるいは K^+ 存在下のミオシン ATPase 活性は著しく高く、加熱中の ATP 濃度を一定に保つことはできなかった。そこで、この実験では ATP の代わりに ATP と同程度の親和力でミオシンに結合するが、ミオシンにより分解を受けない ATP 類似化合物である AMP PNP (アデニルイミドリン酸) を用いた。⁹⁾ ミオシンに 1 mM MgCl_2 , 30 mM CaCl_2 あるいは 1 mM EDTA 共存下、1 μM ~5 mM の AMPNP を添加して、 K_D を求めた。その結果を Fig. 4 に示した。 MgCl_2 存在下では約 30 μM で K_D は最小値に達したが、 CaCl_2 あるいは EDTA が共存した場合は 5 mM まで加えても最大抑制には至らなかった。そして K_D が 50% に達する濃度で比較すると CaCl_2 と EDTA は MgCl_2 の場合の 200~400 倍高濃度であった。先に吉富ら¹⁰⁾ は MgCl_2 , CaCl_2 および K^+ (EDTA) 存在下のウサギヘビーメロミオシンの ATPase の ATP 濃度依存性からミカエリス定数 (K_m) を求めたが、 Ca^{2+} または K^+ 存在下の K_m は Mg^{2+} 存在下の 450 倍程度であることを報告している。この K_m の大きさの違いは本研究で求めたそれぞれのイオン存在下の安定化に必要な濃度の違いとよく対応している。この対応は ATP による変性抑制効果は ATPase 活性中心に ATP が結合し、はじめて発揮されるという結論を強く支持するものである。

ATP の類似化合物による定性的な変性抑制については前報に述べたが,⁴⁾ 濃度を変えて詳細に検討したところ, ATP の場合は約 $3 \mu\text{M}$ で K_D は未添加の場合の 2-

Fig. 4. Comparison of the protective effect of AMPPNP in the presence of MgCl_2 , CaCl_2 , and EDTA.

Rabbit myosin was thermally treated at 40°C in the presence of various concentrations of AMPPNP together with either 1 mM MgCl_2 (○), 30 mM CaCl_2 (□) or 1 mM EDTA (△). The other conditions are the same as in Fig. 1 except for the omission of ATP-regenerating system. K_D estimated was plotted by using the K_D value without AMPPNP as 1.0.

5% にまで達し, 同じ三リン酸の AMPPNP の場合も, K_D は 10% 程度まで減少した。一方, ニリン酸化合物の ADP および PPi の場合は最大抑制効果は約 50% で三リン酸化合物より明らかに劣り, 最大抑制に必要な濃度も高かった。一リン酸化合物の AMP および IMP の場合は 1 mM まで増加しても変性抑制作用は認められなかった (Fig. 5)。以上の結果は, ヌクレオチドによる変性抑制にはこれら化合物のリン酸基の数に依存したミオシンへの親和力およびその結果のミオシンの構造変化が関与していることが明らかとなった。

考 察

先に著者らはミオシン Ca-ATPase の熱変性に対する ATP の抑制効果について検討し, ATP を加える際に同濃度の MgCl_2 を共存させた系ではその最大抑制にはモル比でミオシンの 50 倍ほどの ATP を必要とする報告した。⁴⁾ 本報告ではこの ATP 要求性について再検討し, 高濃度の MgCl_2 (1 mM) があればミオシンのモル濃度とほぼ同程度の ATP 濃度の添加で抑制の最大効果が得られることを示し, ミオシンへの Mg-ATP 複合体の結合が変性抑制の機構であると修正した。前報での ATP による変性抑制の実験では加熱中の ATP 濃度を一定に保つため, PEP と PK から成る ATP 再生系を用いたが, PK の活性発現に Mg^{2+} を要求することが知られている。⁸⁾ それゆえ, 加えた MgCl_2 は ATP と複合体を形成してミオシンと結合するだけでなく PK の活性化にも必要なので, 低い濃度の ATP-Mg を添加した系では十

Fig. 5. Comparison of the protective effect of ATP analogues.

Rabbit myosin was incubated at 40°C in the presence of various concentrations of ATP (○), AMPPNP (□), ADP (△), PPi (▽), AMP (●), and IMP (■). The medium always contains 1 mM MgCl_2 and other conditions were the same as in Fig. 1. Purified myosin (1 mg/ml) on DEAE-Sephadex A-50 was used. K_D value without any additives was taken as 1.0.

分に ATP の再生が行われておらず、実際の ATP-Mg 濃度は加えた濃度よりかなり低い可能性が高い。再生系の複雑さを除くため ATP の代わりに AMPPNP を使用して同じ実験を行ったが (ATP 再生系を必要としない), MgCl_2 を同濃度加えた場合の変性抑制に必要な AMPPNP 濃度は今回の高濃度の MgCl_2 を用いた場合より (Fig. 4), 高濃度側に移動していることを認めているので (図示せず), 単に ATP 再生系だけの問題ではないことが示された。次の理由として ATP が効率よく変性抑制するためには ATP-Mg として存在していることが必須であったと推定されたが (Fig. 4), ATP と MgCl_2 を同濃度ずつ添加した場合は Mg-ATP 複合体の濃度はそれより低い可能性がある。本報告で ATP による最大抑制作用が得られる $10\ \mu\text{M}$ ATP の場合, もし加える MgCl_2 が $10\ \mu\text{M}$ で ATP と Mg^{2+} の結合定数を $1 \times 10^4\ \text{M}^{-1}$ と仮定して試算すると,¹¹⁾ ATP-Mg 複合体の濃度は $0.84\ \mu\text{M}$ となり, 一方 $1\ \text{mM}$ MgCl_2 を加えた場合は $9.1\ \mu\text{M}$ となる。すなわち前者では加えたごく一部の ATP しか変性抑制に作用していないことが推定され, これらのことが, 先の報告での高い ATP 濃度要求性の理由であると思われる。

MgCl_2 の代わりに CaCl_2 や EDTA 中でも ATP によるかなりの変性抑制が認められたので, いずれにせよ ATPase の活性中心に ATP が結合して立体構造が変化すれば安定化されると結論されよう。そして, ATP 分子のリン酸基が重要な役割を担っていることが推定され, ADP や PPi の抑制作用が小さく, しかも高濃度を必要とするのはこれらのミオシンに対する親和力が小さいこと, 結合できても引き起こす構造変化が異なるというこれまでの知見で説明された。¹²⁾ また一リン酸化合物は結合できないと言われているので, これは変性抑制作用が

認められないことと一致する。¹²⁾

ATP のミオシンに対する変性抑制効果は広い温度域に渡り ($30\text{--}50^\circ\text{C}$) 発揮されること (Fig. 2), 生理的なイオン強度下でも認められること, また筋肉細胞内でのミオシン濃度 ($100\ \text{mg/ml}$, $0.2\ \text{mM}$) と ATP および Mg^{2+} 濃度 (数 mM) から, 生筋中の弛緩条件でアクチンから解離しているミオシンは ATP により安定化されている可能性が高いと推定される。一方, 収縮および硬直中はアクチンが強く結合しミオシンを安定化しており, ミオシンはいずれにせよ非常に安定な条件に置かれていると推定された。

参 考 文 献

- 1) L. Ouellet, K. J. Laidler, and M. F. Morales: *Arch. Biochem. Biophys.*, **87**, 104-119 (1952).
- 2) A. Setton and A. Muhrad: *Arch. Biochem. Biophys.*, **235**, 411-417 (1984).
- 3) 室塚剛志, 高士令二, 新井健一: 日水誌, **42**, 57-63 (1976).
- 4) 吉岡武也, 新井健一: 日水誌, **52**, 1829-1836 (1986).
- 5) J. J. Connell: *Biochem. J.*, **58**, 360-367 (1957).
- 6) 碓谷敏紀, 木村郁夫, 新井健一: 日水誌, **47**, 947-955 (1981).
- 7) 高士令二: 日水誌, **38**, 136-132 (1972).
- 8) A. Tietz and S. Ochoa: *Arch. Biochem. Biophys.*, **78**, 477-494 (1958).
- 9) R. G. Yount, D. Ojiala, and D. Babcock: *Biochemistry*, **10**, 2490-2495 (1971).
- 10) 富吉文司, 今野久仁彦: 日水誌, **48**, 581-586 (1982).
- 11) S. Watanabe, C.-S. Wu, and K. Konno: *J. Biochem.*, **79**, 717-722 (1976).
- 12) F. Morita: *J. Biol. Chem.*, **242**, 4501-4506 (1967).