コイミオシン加熱時におけるミオシン重鎖の SS 高分子化に関与するサブフラグメント

来住 晃, 伊藤慶明, 小島 渥

(1996 年 6 月 10 日受付)

The Subfragment Responsible for the Polymerization of Myosin Heavy Chain through SS Bonding during the Heating of Carp Myosin

Akira Kishi,* Yoshiaki Itoh,* and Atsushi Obatake*

To decide the subfragment in carp myosin responsible for the polymerization of myosin heavy chain (HC) through SS bonding during the heating at 80°C, carp myosin was digested with α -chymotrypsin into S-1 and rod, and was heated. From the SDS-PAGE patterns (3% polyacrylamide gel) of the heated samples solubilized in 8 M urea-2% SDS, two components were found to be produced. The one was observed on the top of the polyacrylamide gel, and the other was just over HC and was 260 kDa in molecular mass. By treating each component with 10% 2-mercaptoethanol, it was found that the former component was made only from S-1 (80 kDa) and the latter was only from rod (130 kDa).

Therefore, it was concluded that in the polymerization of HC through SS bonding during the heating of myosin, SH groups on rod is responsible for the formation of HC dimer and those on S-1 is responsible for the HC polymer formation.

キーワード: ミオシン・サブフラグメント, ミオシン, 加熱, SS 結合, SH 基, 高分子化

先に, 著者ら¹⁾はコイミオシンを加熱すると SH 基が酸化して SS 結合を形成するとともに, HC が SS 結合による高分子化 (SS 高分子化) を起こすことを明らかにした。ミオシン分子中の反応性に富む SH 基には S-1 部分の SH₁ および SH₂,²⁾ rod 部分の SH₃ とそれぞれ呼ばれるものが報告されている。³⁾ Samejima ら⁴⁾は, ウサギミオシンの加熱による凝集に rod の SH 基は関与せず, S-1 の SH 基が関与することを報告している。著者ら^{5,6)}の最近の一連の研究の中で, コイのアクトミオシンおよびミオシンの氷蔵中には S-1 ではなく, rod の SH 基の分子間酸化によって HC 二量体が形成されることを明らかにし, SH₃ が関与していることを推察した。

そこで, コイミオシンを加熱した場合に認められた HC の SS 高分子化に関与しているサブフラグメントを明らかにすることを目的とし, ミオシンを α -キモトリプシンで処理して S-1 と rod に切断した後, 80°C で加熱して各サブフラグメントの SS 高分子化の挙動を調べ

た。

実験方法

ミオシンの調製 前報¹⁾に記載した高士ら⁷⁾の変法に従ってコイ *Cyprinus carpio* 活魚の背肉からミオシンを抽出, 精製した。

筋原繊維の調製 加藤ら⁸⁾の方法に従ってコイ活魚の背肉から調製した。

タンパク質の定量 ビューレット法により牛血清アルブミンを標準タンパク質として定量した。⁹⁾

ミオシンおよび筋原繊維の α -キモトリプシン処理 加藤ら^{10,11)}の方法に準じて処理した。すなわち, 0.05 M KCl-1 mM EDTA-20 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.0) に懸濁したミオシン (タンパク質濃度 1%) に, α -キモトリプシン (和光純薬工業㈱) をミオシンの 1/250 量添加し, 20°C で 1 時間静かに攪拌しながら消化させた後, 30 mM PMSF (70% エタノール溶液) を加

* 高知大学農学部栽培漁業学科 (Department of Aquaculture, Faculty of Agriculture, Kochi University, Monobe, Nankoku, Kochi 783, Japan).

本論文では以下の略号を用いた。HC, ミオシン重鎖; Ac, アクチン; S-1, ミオシン・サブフラグメント-1; rod, ミオシン尾部; EDTA, エチレンジアミン四酢酸; PMSF, フェニルメタンスルホニルフルオリド; SDS-PAGE, SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動; PAG, ポリアクリルアミドゲル; LMM, ライトメロミオシン。

えて終濃度を 0.3 mM として酵素作用を停止させた。NaCl 濃度を 0.6 M とした後, 20 倍量の 0.6 M NaCl-50 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 6.8) に対して透析したものを加熱に供した。筋原繊維を α -キモトリプシン処理する場合は, 酵素の使用量を筋原繊維の 1/500 量とし, ミオシンの場合と同様に処理した。 α -キモトリプシン処理したミオシン溶液および筋原繊維溶液 (タンパク質濃度 0.5%) の酸化を促進させるため, これらに CuCl_2 を終濃度 5 μM となるように添加して 80°C で加熱後ただちに氷冷した。

SDS-PAGE 前報¹⁾の方法に従って, 加熱タンパク質の泳動用試料 (未還元試料および還元試料) を調製し, Weber および Osborn の方法¹²⁾に従って泳動した。先の実験¹⁾でミオシン軽鎖の SS 高分子物の形成はほとんど認められなかったので, 低分子側よりも高分子側の挙動を調べるのに重点をおいた 3% 濃度の PAG を用い, 未還元試料および還元試料の泳動像を比較することによって SS 結合による高分子物 (SS 高分子物) の生成を判断した。分子量のマーカーには Pharmacia 社製の High Molecular Weight-SDS Calibration Kit を用いた。

二段階 SDS-PAGE 前報¹⁾に記載した方法に従った。ただし, PAG 上端部の成分の還元処理法を簡略化し, 第二段階の泳動を行った。すなわち, 8 M 尿素-2% SDS-10% 2-メルカプトエタノール-50 mM リン酸緩衝液 (pH 6.8) を PAG が充填された第二段階用のカラム (内径 4 mm) の中に高さ 5 mm になるように加えておき, ここへ第一段階の泳動後切りとった PAG 上端 5 mm を上下逆転させて装填し, 室温で 60 分間放置した後, 先と同様に泳動した。

SH 基の定量 前報¹³⁾に記載したように加熱試料を 8 M 尿素-2% SDS-10 mM EDTA-0.2 M リン酸緩衝液 pH 6.8 に溶解し, Ellman 法¹⁴⁾に従って定量した。

結果および考察

ミオシンを α -キモトリプシン処理して得られた S-1 と rod の共存液 (S-R 共存液) の 80°C 加熱による SH 基量の変化を Fig. 1 に示した。SH 基量は未加熱では 8.25 mol/10⁵ g, 加熱 20 分後に 7.65 mol/10⁵ g となり, その後, 徐々に減少した。このように, ミオシンを α -キモトリプシン処理した S-R 共存液でもミオシンの場合¹³⁾と同様, 加熱による SH 基の酸化が認められた。

S-R 共存液の加熱による SS 高分子化挙動を Fig. 2 に示した。加熱 10 分後には PAG 上端部および HC と PAG 上端部との間に SS 高分子物 (それぞれ, P₁ および P₂ とする) が認められ, これらは加熱時間が長くなるにしたがって増加した。ただし, P₁ と P₂ の間にはいずれの加熱時間においても SS 高分子物のバンドは認め

Fig. 1. Changes in SH group content during the heating at 80°C of the subfragment 1 (S-1) and rod mixture (0.5% protein) prepared by digesting carp myosin with α -chymotrypsin (250: 1 by weight).^{10,11)}

The SH group content was determined by the same method as described in the previous paper.¹³⁾

られなかった。P₂ の分子量はマーカーの SDS-PAGE 像から 260 kDa であり, rod が 130 kDa であったのでこの SS 高分子物は rod の二量体と推察した。

次に, P₁ および P₂ のタンパク質組成を二段階 SDS-PAGE により調べると (Fig. 2), P₂ からは rod だけが認められ, P₁ からは S-1 だけが認められた。これらの結果から, S-R 共存液を 80°C で加熱すると, SS 結合によって rod の二量体および S-1 の多量体が形成されるが, 他の SS 高分子物は形成されないことが明らかになった。

これらの SDS-PAGE 像のデンストメトリーから, 加熱時の各サブフラグメントの SS 高分子化率を算出した (Fig. 3)。すなわち, 未加熱 S-R 共存液の還元試料の第一段階 SDS-PAGE 像に認められる各サブフラグメントの染色強度を 100 として, 第二段階の泳動像に見られる各サブフラグメントの染色強度の率を求め, 未加熱時の値を差し引いた。その結果, rod に比べて S-1 の方が SS 高分子化率が高く, rod よりも S-1 の方が SS 高分子化しやすいものと推察した。

S-1 の SS 高分子化に及ぼす Ac やトロポミオシンなどの他の筋原繊維タンパク質の影響を調べるため, 筋原繊維を α -キモトリプシン処理した S-R 共存液を加熱して, SS 高分子化挙動を調べた (Fig. 4)。ミオシンから

Fig. 2. Two-step SDS-PAGE patterns of the S-1 and rod mixture (0.5% protein) which was prepared from carp myosin and was heated at 80°C for various times.

The two-step SDS-PAGE was performed by the same method as described previously.¹⁾ The second step SDS-PAGE of the substance on the top of 3% SDS polyacrylamide gel was carried out with the slightly modified procedure as follows. The top 5 mm of the 3% SDS polyacrylamide gel (the 1st step gel) was cut off. The inverted specimen was put into 8 M urea-2% SDS-10% 2-mercaptoethanol-50 mM phosphate buffer (pH 6.8) which was poured on a newly prepared 3% SDS polyacrylamide gel column, and was allowed to stand at room temperature for 60 min, followed by carrying out SDS-PAGE.¹²⁾

a, myosin heavy chain (212 kDa); b, α_2 -macro globulin (170 kDa); c, rod; d, β -galactosidase (116 kDa); e, transferrin (76 kDa); f, glutamate dehydrogenase (53 kDa); A, marker; B, marker with the mixture of S-1 and rod; C, prepared myosin; P₁, the substance on the top of the 1st step polyacrylamide gel; P₂, the substance (260 kDa) just over HC on the 1st step polyacrylamide gel.

得た S-R 共存液を用いた上記の結果と同様、加熱によって PAG 上端部および HC のすぐ上部に SS 高分子物が認められた。後者の分子量は 260 kDa であり、rod (130 kDa) の二量体と推定した。PAG 上端部の第二段階 SDS-PAGE 像から主に S-1 が認められ、その他にはごく微量の Ac と HC が認められたにすぎない。したがって、各種筋原繊維タンパク質が存在しても S-1 の SS 高分子物は形成されることが明らかになった。PAG 上端部の成分中に S-1 以外に Ac も認められたが、これは Ac が S-1 と SS 結合しているのか Ac だけの SS 高分子物かは本実験では区別できない。Ac 以外のトロポミオシンやミオシン軽鎖等低分子タンパク質も SH 基を持っていることから SS 高分子化することが予測されたが、本実験条件下では認められなかった。これらのタンパク質は S-1 や rod に比べて酸化しにくいものと考えられる。

以上の結果から、ミオシンの加熱初期に認められた HC の SS 結合による二量体形成¹⁾は rod の SH 基間の酸化によるものであり、その熱の HC の多量体形成は

S-1 の SH 基間によるものと結論した。また、筋原繊維から得た S-R 共存液でもミオシンから得たそれと同様の SS 高分子化が認められたことから、晒肉のゲル形成においてもミオシンの SH 基が同様に高分子化に関与するものと推察した。更に、興味深いことは rod と S-1 とで構成される SS 高分子物が認められなかったことである。このことは、rod 自身の SH 基の反応性が S-1 よりも低いため (Fig. 3) と考えられるとともに、Yamamoto ら¹³⁾の報告にあるように、ミオシンの変性の際 S-1 部分が集まって凝集体を形成しやすいことによることも考えられる。

著者ら^{5,6)}は S-R 共存液の氷藏中、SS 結合による rod の二量体は形成されるが、S-1 の SS 高分子物は形成されないことを認めている。このことは易反応性の SH₁ および SH₂ をはじめ、S-1 に存在する SH 基は低温では極めて反応しにくいことを意味している。Ogawa ら¹⁶⁾はコイミオシンの構造変化は 30°C で始まり、この変化は S-1 および LMM の構造変化と対応していたと報告している。これらのことから、本研究で認めら

Fig. 3. The ratio of the amount of the polymerized S-1 or rod to the total amount of S-1 or rod (0.5% protein) through SS bonding during the heating at 80°C.

The 1st and 2nd step SDS-PAGE patterns were analyzed by densitometry at 640 nm. The increased intensity of S-1 and rod in 2nd step SDS-PAGE patterns during the heating was represented as a percentage to the intensity of those in 1st step SDS-PAGE pattern of the reduced sample.

○, rod; ●, S-1.

れたS-1多量体の形成は、加熱によってS-1の構造がはぐれてSH基が露出し、分子間で酸化され易くなることによるものと推察した。Samejima ら⁴⁾は、ウサギミオシンのS-1の加熱凝集にはそのSH基の分子間酸化を伴うが、rodの場合にはSH基の酸化は起こらなかったと報告している。しかし、今回のコイの結果からはrodのSS高分子物も認められSamejimaらの結果とは異なった。その理由として、コイのrodのSH基がウサギ等の哺乳動物のそれより酸化されやすいことが考えられる。

文 献

- 1) 来住 晃, 伊藤慶明, 小島 渥: コイ・ミオシン加熱時のSS結合によるタンパク質の高分子化機構. 日本誌, 61, 75-80 (1995).
- 2) E. Reisler, M. Burke, and W. F. Harrington: Cooperative role of two sulfhydryl groups in myosin adenosine triphosphatase. *Biochemistry*, 13, 2014-2022 (1974).
- 3) T. Yamashita, M. Kobayashi, and T. Horigome: The sulfhydryl groups involved in the active site of myosin B adenosine triphosphatase. *J. Biochem.*, 77, 1037-1046 (1975).
- 4) K. Samejima, M. Ishioroshi, and T. Yasui: Relative roles

Fig. 4. Two-step SDS-PAGE patterns of the mixture of S-1 and rod (0.5% protein) which was prepared from myofibrils by digesting with α -chymotrypsin and was heated at 80°C for 20 min.

The two step SDS-PAGE was carried out by the same procedures as described in Fig. 2. The digestion of myofibrils was carried out by the same method as shown in Fig. 1. except the ratio of α -chymotrypsin to myofibrils (1:500 by weight).

UH, unheated; H, heated; Ac, actin.

of the head and tail portions of the molecule in heat-induced gelation of myosin. *J. Food Sci.*, 46, 1412-1423 (1981).

- 5) W. Sompongse, Y. Itoh, and A. Obatake: Role of SH₂ in the polymerization of myosin heavy chain during ice storage of carp actomyosin. *Fisheries Sci.*, 62, 110-113 (1996).
- 6) W. Sompongse, Y. Itoh, and A. Obatake: Responsibility of myosin rod for the dimer formation of myosin heavy chain through SS bonding during ice storage of carp actomyosin. *Fisheries Sci.*, 62, 473-477 (1996).
- 7) 高士令二, 新井健一, 齊藤恒行: 魚類筋肉たんぱく質に関する研究—I. コイ筋肉からのミオシンの調製について. 日本誌, 46, 621-624 (1980).
- 8) 加藤 登, 野崎 恒, 小松一宮, 新井健一: スケトウダラ冷凍すり身の一新品質判定法 冷凍すり身の筋原繊維ATPase活性とかまぼこ形成能の関係. 日本誌, 45, 1027-1032 (1979).
- 9) 梅本 滋: ビュレット反応による魚肉たんぱく質の定量法の改良. 日本誌, 32, 427-435 (1966).

- 10) 加藤早苗, 今野久仁彦: キモトリプシン消化性からみたコイミオシンの構造特性. 日水誌, **56**, 1877-1883 (1990).
- 11) 今野久仁彦, 加藤早苗, 江湖正育: コイ筋原繊維を出發材料としたミオシン・サブフラグメント-I の簡単な調製法. 日水誌, **56**, 1885-1890 (1990).
- 12) K. Weber and M. Osborn: The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.*, **224**, 4406-4412.
- 13) 米住 晃, 伊藤慶明, 小島 渥: コイ・ミオシン加熱時のSS結合によるタンパク質の高分子化に及ぼす数種緩衝液の影響. 日水誌, **61**, 380-386 (1995).
- 14) G. L. Ellman: Tissue sulfhydryl groups. *Biophys.*, **82**, 70-77 (1959).
- 15) K. Yamamoto, S. Hayashi, and T. Yasui: Hydrostatic pressure-induced aggregation of myosin molecules in 0.5 M KCl at pH 6.0. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **57**, 383-389 (1993).
- 16) M. Ogawa, T. Tamiya, and T. Tsuchiya: Structural changes of carp myosin during heating. *Fisheries Sci.*, **60**, 723-727 (1994).