

魚類筋肉構成たんぱく質に関する研究VI

誌名	日本水産學會誌
ISSN	00215392
巻/号	381
掲載ページ	p. 73-78
発行年月	1972年1月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波事務所
Tsukuba Office, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council Secretariat



魚類筋肉構成たんぱく質に関する研究—VI.

コイ筋肉ミオシン, アクトミオシンの
希釈沈殿法による精製*

高 士 令 二

(1971年8月28日受理)

Studies on Muscular Proteins of Fish—VI.
Purification of Myosin and Actomyosin from Carp
Muscle by Dilution Method

Reiji TAKASHI**

It has been believed that the tendency of fish myosin to denature is much greater than that of rabbit during repeated precipitation by dilution.

An investigation was made to purify carp myosin and actomyosin by the usual dilution method. The preparations obtained at each step of precipitation were characterized by measuring ATP-ase activity, ATP-sensitivity, and activities of other contaminating enzymes (myokinase and adenylic deaminase).

Crude myosin usually had ATP-sensitivity of 5-20. Some which had slightly higher values were improved by an intermediate precipitation at a KCl concentration of 0.28 mole/l.

The crude preparations of myosin and actomyosin usually contained myokinase and adenylic deaminase. The repeated precipitation resulted in virtually complete removal of myokinase but not of adenylic deaminase.

It was observed that specific ATP-ase activity of myosin preparations decreased slightly during repeated precipitation by dilution, while those of actomyosin preparations remained almost constant.

The above results suggest that myosin denaturates slightly during repeated precipitation by dilution.

一般にミオシンおよびアクトミオシンは希釈沈殿を2~3回繰り返して精製し、使用するのが通常の方法である。これは家兎、その他の哺乳動物などの場合のようにそのミオシンおよびアクトミオシンが魚類のそれに比べて安定であるものについてはあまり疑問の余地のない方法である。CONNELLによれば、タラ筋肉からえたミオシンは¹⁾希釈沈殿を繰り返すと、分子の凝集を起こし、変性にいたるといふ。このように魚類筋肉ミオシンおよびアクトミオシンは家兎などのそれらに比べて不安定であり、タラ筋肉ミオシンの場合は必ずしも希釈沈殿による精製法がよいとはいえないと述べられている。一方、魚類筋肉たんぱく質の調製法に関しては、そのほとんどが家兎筋肉たんぱく質に使用されている方法をそのまま応用しており、精製法についてはまだ詳細な検討が行なわれていない。著者らは前報で、コイ筋肉からミオシンおよびアクトミオンを抽出調製する方法について報告した^{2,3)}。本実験ではこれらミオシンおよびアクトミオンをさらに精製する目的で、まず希釈沈殿法による精製効果を検討した。精製の尺度としては、ATP-ase活性、ATP感

* 本研究は昭和45年4月日本水産学会春季大会において講演発表した。

** 北海道大学水産学部生物化学教室 (Laboratory of Biochemistry, Faculty of Fisheries, Hokkaido University, Hakodate, Japan)

度、などの特性のほか、これらたんぱく質に混在している可能性がよい myokinase, adenylic deaminase 活性を測定した。

実験方法

コイ筋肉からミオシンとアクトミオシンの調製

生きている養殖コイを断頭して殺し、ただちに背筋を切り取り、先の報告に準じてたんぱく質を抽出し、さらに Table 1 および 2 に示すようにイオン強度の差による希釈沈殿を 4 回繰り返した。希釈沈殿を繰り返すごとにそのたんぱく質の一部をとりだし、希釈沈殿の各段階での調製品の性質を比較検討した。

Table 1. Preparative method of carp myosin by repeated precipitation.

Minced muscle	
Washed mince	
extract with 0.45 M KCl-5 mM ATP-MgCl ₂ , pH 6.4	
Crude extract	
dilution by 14 volumes of water	
First precipitation (crude myosin).....I	
dissolve into 0.28 M KCl	
centrifuge at 30,000 g 60 min.	
dilution	
Second precipitation.....II	
dilution	
Third precipitation.....III	
dilution	
Fourth precipitation.....IV	

Table 2. Preparative method of carp actomyosin by repeated precipitation.

Minced muscle	
Washed mince	
extract with 0.45 M KCl, pH 7.5	
Crude extract	
dilution by 10 volumes	
First precipitation (crude actomyosin).....I	
dissolved into 0.6 M KCl	
dilution	
Second precipitation.....II	
dilution	
Third precipitation.....III	
dilution	
Fourth precipitation.....IV	

ATP-ase 活性の測定 特に述べる場合以外の反応混液の組成は、60 mM KCl, 5 mM CaCl₂, ミオシンおよびアクトミオシン 0.2~0.5 mg/ml, 25 mM Tris-maleate buffer pH 6.8, 1 mM ATP である。反応は 25°C で行ない、15% -HClO₄ 1/2 容量添加によつて反応を止めた後、濾液について遊離する無機燐を比色定量した⁴⁾。

ATP 感度および粘性の測定 0.6 M KCl たんぱく質溶液 2~3 mg/ml に対し、0.1 M ATP および MgCl₂ を最終濃度が各 1 mM になるように添加し、ATP 添加前後の粘度の変化から次式により計算した⁵⁾。

$$\frac{\log \eta_{rel.} - \log \eta_{rel.,ATP}}{\log \eta_{rel.,ATP}} \times 100$$

測定は 10°C で行ない、2 種のオストワルド型粘度計を使用した。その一つは試料溶液 5 ml を必要とし、溶媒の流過速度が 45 秒で、他の一つは試料溶液 2 ml で、溶媒の流過速度が 160 秒位の粘度計である。

$\eta_{rel.}$: ATP を添加する前のたんぱく溶液の相対粘度

$\eta_{rel.,ATP}$: ATP を添加した後のたんぱく溶液の相対粘度

Myokinase 活性の測定⁶⁾ 反応組成は 0.6 M KCl, 1 mM MgCl₂, 20 mM Tris-maleate buffer pH 7.5, 1 mM ADP, 2~4 mg/ml たんぱく質, それに 5 mM EDTA である。反応は 25°C, ADP 添加 5 分後に EDTA で myokinase の反応を止め、反応生成物である ATP を共存している ATP-ase により水解、遊離する無機燐を比色定量した⁴⁾。

Adenylic deaminase 活性の測定 反応組成は 0.5 M KCl, 50 mM citrate buffer pH 6.4, 1 mM AMP ミオシンおよびアクトミオシン 0.3~0.8 mg/ml である。反応は 25°C で行ない、等容量の

10% HClO₄ の添加により、反応を止め、遠心分離後その上澄液について、265 m μ の吸収の減少を測定した⁷⁾。

たんぱく質濃度の測定 たんぱく質濃度の測定は、牛血清 albumin fraction V を標準とし、ビュレット法により比色定量し⁸⁾、Kjeldahl 法によつて補正した。

実験結果

コイ筋肉からミオシンを調製し、Table 1 に示してあるような I から IV までのそれぞれの段階でのミオシンの性質について検討した。その結果を Table 3, および Fig. 1 に示した。すなわちミオシンの ATP 感度からみると、1 回だけ希釈沈殿を行なつた試料と、途中で KCl 濃度 0.28 M で沈殿を除く操作を含めて 2 回の希釈沈殿を行なつた試料とを比較してみると、後者が前者に比べていずれも低い値を示しており、混在が予想されるアクトミオシンが、ある程度除去されたことを示している。さらに希釈沈殿を 3 回、4 回と

Table 3. Characteristic properties of carp myosin after repeated precipitation.

Preparation	ATP-sensitivity*		ATP-ase activity**		Myokinase activity***		Adenylic deaminase activity****	
	1	2	1	2	1	2	1	2
Crude extract					0.074	0.090		
1st precipitate	6	21	0.118	0.194	0.033	0.040	4.320	7.350
2nd precipitate	2	7	0.095	0.213	0.016	0.023	3.580	6.490
3rd precipitate	3	4	0.098	0.197	0.008	0.009	4.900	6.480
4th precipitate	3	4	0.091	0.174	0.005	0.006		

* $\log \eta_{rel.} - \log \eta_{rel.,ATP} / \log \eta_{rel.,ATP} \times 100$

** $\mu\text{moles } P_i \text{ produced/min./mg of protein}$

*** $\mu\text{moles ATP produced/min./mg of protein}$

**** $-4 \text{ O.D. at } 265 \text{ m}\mu\text{/min./mg of protein}$

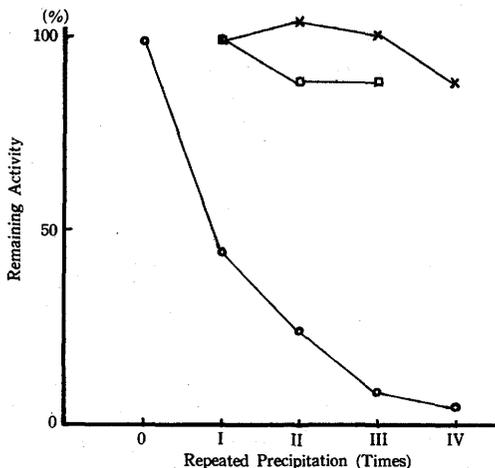


Fig. 1. Enzymatic activities of carp myosin after repeated precipitation.

- ; Myokinase
- ; Adenylic deaminase
- ×—; ATP-ase

繰り返しても、2 回目の沈殿精製以後は、それ程の差は見られなかつた。なお ATP 感度が 20 前後の、ミオシンとしては比較的高い値の試料の場合には、2 回目の希釈沈殿で、かなりはつきりした精製が行なわれるようである。

ATP-ase 活性については、多少の差異はあるが、1 回の沈殿を行なつた試料から、4 回の希釈沈殿を行なつた試料にいたるまでわずかではあるが、ATP-ase 活性の比活性が減少した。

一方、水溶性たんぱく質であり、ADP から ATP を再生産する酵素、myokinase については、Table 3, および Fig. 1 に示したように、その活性は、希釈沈殿を繰り返すことによつて著しく減少することがわかつた。希釈沈殿を全く行なわない粗酵素液ではかなりの myokinase の混在が認められた。しかし、1 回沈殿精製を行なうと 50% 以上の myokinase が除かれ、また 4 回沈殿を繰り返すと、その活性はほとんどなくなつていた。3 回行なつたものでは 90% 以上の myokinase が除去されたも

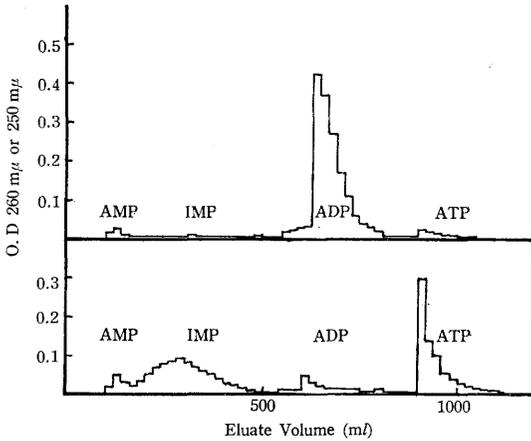


Fig. 2. The reaction products from ADP with myokinase included in carp myosin.

Dowex 1×8, 1×8 cm., HCl-NaCl solvent system.

Upper; 4th precipitate, bottom; 1st precipitate (myosin)

Table 4. Separation of adenylic deaminase from carp myosin by heat treatment.

Preparation	Adenylic deaminase activity*	ATP-ase activity**
Original	0.827	0.154
After heat treatment for 1 min. at 51°C	0.827	0.00

* -*A* absorbance (O. D.) at 265 mμ/min./mg of protein

** μmoles *P_i* produced/min./mg of protein

のとみられる。

次に、希釈沈殿を1回行なつたものと、4回行なつたミオシン中の myokinase の活性をイオン交換クロマトグラフィーで検討した。すなわち、myokinase による反応生成物を Dowex 1×8, 1×8 cm, 塩酸系溶媒⁹⁾ によつて分析した結果を Fig. 2 に示した。この結果から4回希釈沈殿を行なつたミオシンでは、基質として加えた ADP はほとんど変化しておらず、myokinase の活性は認められなかつたが、1回だけ沈殿精製を行なつたミオシンでは基質の ADP がほとんど、ATP と IMP になつており、その量的関係もほぼ等モルずつであるから、明らかに myokinase 活性が確認された。

Adenylic deaminase は同表から明らかなように、希釈沈殿を繰り返すだけではほとんど除去されず、比活性の変化は3回の希釈沈殿で80~90% 残つていた。従来から家兎などの哺乳動物筋肉について報告されているように¹⁰⁾、筋肉中の adenylic deaminase はミオシンと堅く結合しているが熱に対する安定性の差から、この酵素はミオシンとは全く別種のたんぱく質である。これに関し、コイ筋肉について検討した結果を Table 4 に示す。この結果から明らかなように、熱に対して比較的安定なコイ筋肉 adenylic deaminase は、51°C, 1分間の加熱前後の間には全く活性の変化がみられなかつたが、熱に不安定なミオシン ATP-ase は加熱によつて完全に失活し、明らかに、これらの酵素は全く別種のものであることが認められた。またア

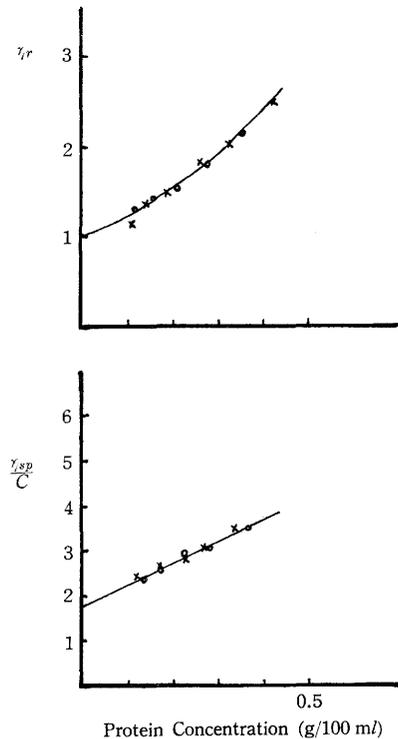


Fig. 3. Relative viscosity and reduced viscosity of carp myosin in 0.6 M KCl, pH 6.8.

(○) First precipitate, (×) Third precipitate η_{sp}/C = reduced viscosity, η_r = relative viscosity

Table 5. Characteristic properties of carp actomyosin after repeated precipitation.

Preparation	ATP-sensitivity*	ATP-ase activity**		Myokinase activity***		Adenylic deaminase activity****	
		1	2	1	2	1	2
1st precipitate	124	0.307	0.316	0.056	0.108	0.767	0.942
2nd precipitate	—	0.320	0.332	0.019	0.041	0.761	0.857
3rd precipitate	126	—	—	0.013	0.028	0.610	0.748
4th precipitate	120	0.290	0.316	0.013	0.017	0.580	0.720

* $\log \eta_{rel.} - \log \eta_{rel.,ATP} / \log \eta_{rel.,ATP} \times 100$

** $\mu\text{moles } P_i \text{ produced/min./mg of protein}$

*** $\mu\text{moles ATP produced/5 min./mg of protein}$

**** $-d \text{ O. D. at } 265 \text{ m}\mu\text{/min./mg of protein}$

クトミオシン中の adenylic deaminase 活性がミオシン中のそれに比べてかなり低い値であることから、この酵素がミオシンと結合していることがわかった。

なお、希釈沈殿を1回、4回行なつたミオシンの粘性を測定し、Fig. 3 に示した。この図から双方共に、相対粘度および固有粘度はほとんど同じで、前報²⁾ で述べた値とよく一致し、 $1.90 \text{ (g/100 ml)}^{-1}$ 付近を示した。

つぎに、ミオシンについて行なつた以上の希釈沈殿法をアクトミオシンについて応用してみた。すなわち、コイ筋肉からアクトミオシンを調製し、Table 2 に示すようにIからIVまでのアクトミオシンの性質について比較検討した。その結果を Table 5 に示した。ATP 感度は希釈沈殿を4回繰り返すと、やや低い値を示す傾向にあり、わずかではあるが、分子の凝集変性がおこつたようにみえる。

この間、ATP-ase 活性は1回目から4回の希釈沈殿の間、ほとんど変化なく、ほぼ同じ比活性を示した。

Myokinase は3~4回の希釈沈殿の繰り返しで活性が非常に減少し、その80%は除去出来ることがわかった。また adenylic deaminase は1~4回にいたる希釈沈殿を行なつてもほとんど除去されず、その活性には大きな変化がみられなかつた。

考 察

一般に著者らがコイ筋肉から調製するミオシンは5~20の範囲のATP感度を示す。これらのミオシンを第2回目にKCl濃度0.28M(pH7.0)にあわせ、混在するアクトミオシンを遠心除去すると、このミオシンのATP感度はやや低下した。さらに、コイミオシンについて、KCl濃度0.23~0.25M(pH6.8)で上と同じ操作を試みたところ最終的にえられるミオシンの収量が極端に悪かつたのでここでは採用しなかつた。

ミオシンをイオン強度の差異によつて沈殿精製してゆく方法は、ここに明らかにされたように、本来水溶性であるmyokinaseの除去のために非常に有効である。したがつてmyokinase以外の水溶性たんぱく質であつて、ミオシンやアクトミオシンと結合しやすいといわれている^{11,12)}特殊の酵素、(解糖系酵素、aldolase, glycerophosphate dehydrogenaseなど)は、おそらく除去できるであろう。しかし、一般に魚類からえたミオシンはきわめて不安定であるのが普通であるので、特別の目的の場合以外には、希釈沈殿をあまり繰り返すことは変性をひき起こす可能性があるのでは好ましいこととは思われない。つまり、一般的にはアクトミオシンはミオシンよりも安定であることが知られている¹³⁾が、そのアクトミオシンについても4回の希釈沈殿によつてATP感度の減少がおこり、さらに、ミオシンについては1回目から4回目にわたつてATP-ase活性はむしろ低下する傾向があるからである。

著者はこの次に、イオン交換クロマトグラフィーによる精製を試みて、よい結果をえた¹⁴⁾。

一方、コイ筋肉からえたアクトミオシンについても、ミオシンの場合と全く同じ傾向がえられ、希釈沈殿に

よつて myokinase は有効に除去しうるが、ATP 感度はやや低くなる傾向を示し、ATP-ase 活性の増加はみられない。アクトミオシンはミオシンに比べて、以上の精製操作中における変性は一層少ないと考えてよいが、なおかつ ATP-ase の比活性は増加しなかつた。しかし、アクトミオシンについては、イオン交換クロマトグラフィー法、その他有効な精製法に関する報告はほとんどない現状である。

要 約

魚類の筋肉からえたミオシンは、いわゆる希釈沈殿法の間、家兎のミオシンの場合よりも著しく早い変性をうけるといわれている。

そこで著者は先に報じた方法で調製した、コイのミオシンおよびアクトミオシンについて、いわゆる希釈沈殿を繰り返す各段階で、ATP-ase、ATP 感度、混在する myokinase、adenylic deaminase 活性を検討してみた。

粗ミオシンはふつう ATP 感度 5~20 であるが、この高い方の値を示すものは、0.28 M KCl で沈殿するものを除くと低い ATP 感度のものに改良される。

粗ミオシンおよびアクトミオシンはふつう myokinase と adenylic deaminase を含んでおり、希釈沈殿を繰り返すと、myokinase はほとんど除去できるが、adenylic deaminase は全く除去できなかつた。希釈沈殿を繰り返すと、アクトミオシンの ATP-ase 活性はほとんど変わらないけれども、ミオシンのそれはやや減少してゆくことがわかつた。以上の結果から、希釈沈殿を繰り返す間に、わずかにミオシンの変性がおこるように思われた。

本研究の遂行にあたり終始御懇切な御指導を賜わつた齋藤恒行教授、ならびに新井健一博士に深謝いたします。

文 献

- 1) J. J. CONNELL: *Biochem. J.*, **69**, 5~12 (1958).
- 2) 高士令二・新井健一・齋藤恒行: 本誌, **36**, 165~168 (1970).
- 3) 高士令二・新井健一・齋藤恒行: 本誌, **36**, 169~172 (1970).
- 4) C. H. FISKE and Y. SUBBAROW: *J. Biol. Chem.*, **66**, 375~400 (1925).
- 5) H. H. WEBER and H. PORTZEHL: *Advances in Protein Chemistry.*, **7**, 161~252 (1952).
- 6) W. J. BOWEN and T. D. KERWIN: *Arch. Biochem. Biophys.*, **57**, 522~524 (1955).
- 7) S. P. COLOWICK: *Methods in Enzymol.*, **2**, 598~604 (1955).
- 8) A. G. GORNALL, S. S. BARDAWILL and M. M. DAVID: *J. Biol. Chem.*, **177**, 751~766 (1949).
- 9) T. SAITO and K. ARAI: *Nature*, **179**, 820~821 (1957).
- 10) V. S. HERMANN and G. JOSEPOVITS: *ibid.*, **164**, 845~846 (1949).
- 11) H. ARNOLD and D. PETTE: *Eur. J. Biochem.*, **6**, 163~171 (1968).
- 12) H. ARNOLD and D. PETTE: *ibid.* **15**, 369~366 (1970).
- 13) 新井健一・高士令二・齋藤恒行: 日本水産学会春季大会発表 (1970).
- 14) 高士令二: 本誌 (印刷中) (1972).