

魚類筋肉ミオキナーゼに関する研究 II.

誌名	日本水産學會誌
ISSN	00215392
巻/号	403
掲載ページ	p. 299-302
発行年月	1974年3月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



魚類筋肉ミオキナーゼに関する研究—II

精製コイ筋肉ミオキナーゼの酵素化学的性質について

福島正和・林 征一・大城善太郎

(1973年12月10日受理)

Studies on Myokinase in the Muscle of Fishes—II

Some Properties of Myokinase Isozymes Purified from Muscle of Carp

Masakazu FUKUSHIMA*, Seiichi HAYASHI* and Zentaro OOSHIRO*

Previously, the authors reported on the purification of myokinase I and II from the carp muscle by ammonium sulfate fractionation, Sephadex gel filtration, and by DEAE-cellulose and CM-cellulose column chromatography.

In this paper, studies on some properties of these purified myokinase isozymes were reported.

The molecular weights of myokinase I and II, determined both by gel filtration on Sephadex G-75 and by electrophoresis on SDS-polyacrylamide gel, were 27,000 and 22,000, respectively.

Influences of pH and temperature on the transphosphorylysis of ADP by these two isozymes were almost similar, and enzymatic reactions were ascertained to be optimally active at pH 7.5 and temperature 36–38°C.

Carp myokinase isozymes were found to be specific for ADP, whereas they were ascertained not to transphosphorylyse the following sorts of nucleoside-5'-diphosphate; GDP, IDP, CDP and UDP. These results show the extremely high specificity of the carp myokinase isozymes.

著者らは前報¹⁾において、コイ筋肉からミオキナーゼを抽出分離し、精製処理によつて、蛋白質として性質の異なるアイソザイムとしてのミオキナーゼ I および II の存在することを確認し、さらにこれらのアイソザイムをそれぞれ精製して分子的に均一と認められ、クロマトグラフ的に単一とみなされるまでに精製された酵素を得る方法について報告した。今回は、これら 2 種類の精製されたミオキナーゼのアイソザイムの物理化学的性質ならびに酵素化学的性質について報告する。

方 法

使用酵素 前報で述べたように、コイ筋肉に 0.5% KCl を加えてホモジナイズして得られた粗酵素液を硫酸塩析し、この塩析蛋白質を Sephadex G-75 を用いるゲル濾過によつてミオキナーゼ I および II 区分を分画した。さらにミオキナーゼ I 画分は DEAE-セルロース、ミオキナーゼ II 画分は CM-セルロースを用いるカラムクロマトグラフィーによつて精製してディスク電気泳動的に単一とみなし得るものを使用した。

ミオキナーゼ活性の測定法 前報において記載した方法に準じて行なつた。すなわち ADP を基質として酵素反応を行ない、生成する ATP 量を Dowex 1×4 を用いるイオン交換クロマトグラフィーにより定量して活性を測定した。また、両ミオキナーゼの基質特異性は ADP のほかに GDP, IDP, CDP および UDP

* 鹿児島大学水産学部 (Faculty of Fisheries, Kagoshima Univ., Shimoaratacho, Kagoshima)

(いずれも Sigma 社製) を用い、両ミオキナーゼとのインキュベートによつて生成する Nucleoside-5'-triphosphate 量を定量することによつて調べた。各基質に対する作用は、便宜上 ADP の場合を 100 としたときの相対値で比較した。

精製酵素の分子量の測定法 ゲル濾過法²⁻⁵⁾ および SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法を適用して精製酵素の分子量を測定し、両方の値を検討吟味してそれぞれの分子量を決定した。

ゲル濾過法: Sephadex G-75 を 0.05 M トリス緩衝液 (pH 7.6) で十分に膨潤させ、 2.6×90 cm のカラムを調製した。標準蛋白として Ovalbumin, Trypsin および Lysozyme をえらび、各 50 mg を秤取し、それぞれ 5 ml の 0.05 M トリス緩衝液 (pH 7.6) に溶解し、それらの等容混合液 4 ml をカラムに注入し、0.05 M トリス緩衝液を溶出剤としてゲル濾過を行ない、各蛋白の溶出容積を分子量に対してプロットして得られる直線関係を利用してミオキナーゼ I, II の分子量を測定した。

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法: 分子量マーカーキット (Mann Res. Lab. 社製) のうちから Ovalbumin, Myoglobin および Cytochrome C を選び、それぞれ 50 μ mole の蛋白溶液を調整し試料とした。SDS-ポリアクリルアミドゲルの調製および電気泳動法は林ら⁶⁾ の方法にしたがつて行なつた。電気泳動によつて得られた上記標準蛋白の Rf 値を求め、それぞれの分子量の対数に対してプロットして得られる直線関係を利用して、コイ筋肉ミオキナーゼ I, II の分子量を測定した。

結 果

コイ筋肉ミオキナーゼ I, II の分子量 ゲル濾過法を適用して求めたコイ筋肉ミオキナーゼ I, II の分子量は Fig. 1 に示すようにそれぞれ 27,000, 22,000 という結果を得た。

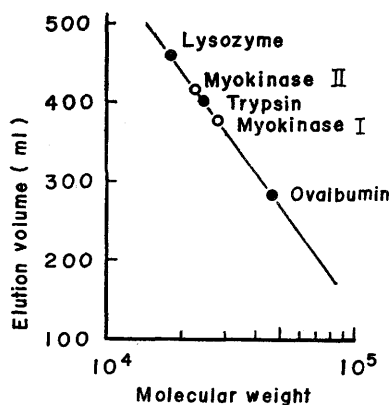


Fig. 1. Determination of the molecular weight of the carp myokinase I and II by gel filtration on a Sephadex G-75 column (2.6×90 cm) calibrated with proteins of known molecular weight.

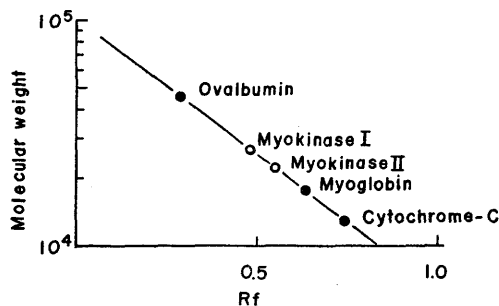


Fig. 2. Molecular weight determination of purified carp myokinase I and II by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis.

The molecular weights assumed for the marker proteins are: Ovalbumin, 45,000; Myoglobin, 17,800; and Cytochrome C, 12,400.

一方、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法を適用して得られたコイ筋肉ミオキナーゼ I, II の分子量は Fig. 2 に示すようにそれぞれ 27,000, 21,500 という結果を得た。

以上の通り両方で求められた分子量はほぼ一致することが明らかにされた。

酵素作用におよぼす温度の影響 精製されたミオキナーゼ I および II の基質 ADP に対する触媒反応における温度の影響を検討し、その結果を Fig. 3 に示した。

図より明らかなように、作用温度はミオキナーゼ I が $35-38^\circ\text{C}$ 、ミオキナーゼ II が $35-37^\circ\text{C}$ で最高値が

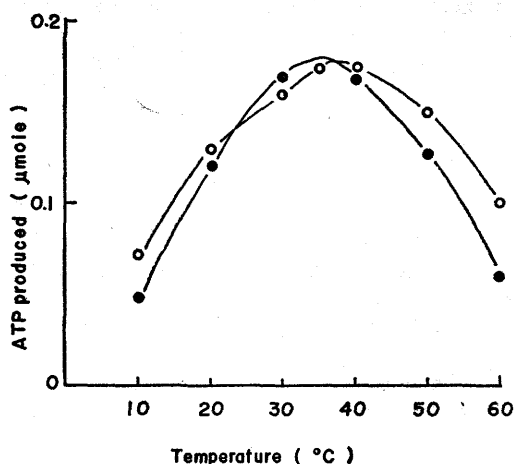


Fig. 3. The effect of temperature on the activity of enzymes.

Myokinase activity was assayed by incubating a mixture of 1 ml of 10 mM ADP, 2 ml of 0.05 M Tris buffer solution (pH 7.6) and 1 ml of enzyme solution at various temperatures for 10 min.

The produced ATP was estimated by the column chromatographic method using an ion-exchange resin, Dowex 1×4. ○—○: Myokinase I, ●—●: Myokinase II.

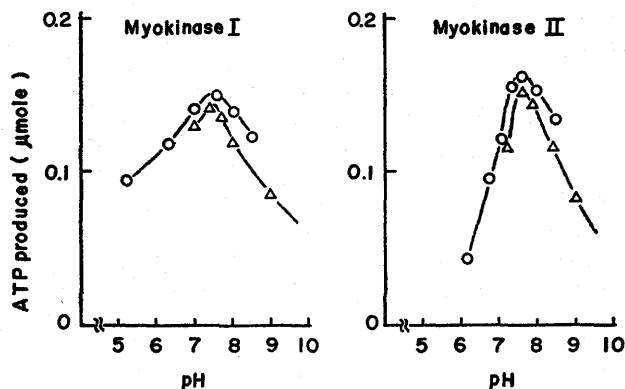


Fig. 4. The effect of pH on the activity of enzymes.

Myokinase activity was assayed by incubating a mixture of 1 ml of 10 mM ADP in 0.05 M phosphate and Tris buffer solution and 1 ml of enzyme solution at 37°C for 10 min.

The produced ATP was estimated by the column chromatographic method using an ion-exchange resin, Dowex 1×4. ○—○: Phosphate buffer solution, △—△: Tris-HCl buffer solution.

みられ、両酵素ともほぼ一致していることが明らかとなつた。

酵素作用におよぼす pH の影響 いろいろな pH の 0.05 M りん酸塩およびトリス緩衝液に溶解して調製した 10 mM ADP 溶液を基質として 35°C における酵素作用を測定し、pH の影響を調べた。その結果を Fig. 4 に示した。

図に示すように、ミオキナーゼ I, II ともその触媒反応は pH 7.4-7.6 で最高値が認められた。

コイ筋肉ミオキナーゼ I および II の基質特異性 精製されたミオキナーゼ I, II は ADP に作用して ATP と AMP を生ずる転移酵素であると考えられるが、さらに両アイソザイムの基質特異性を明確にする

Table 1. Rate of transphosphorylysis of various substrates by carp myokinase I and II

Substrate (5 mM)	Relative rate	
	Myokinase I	Myokinase II
ADP	100	100
GDP	0	0
IDP	0	0
CDP	0	0
UDP	0	0

The relative rates were compared with the standard value of 100 for ADP.

ADP: Adenosine-5'-diphosphate

GDP: Guanosine-5'-diphosphate

IDP: Inosine-5'-diphosphate

CDP: Cytosine-5'-diphosphate

UDP: Uridine-5'-diphosphate

ために、ADP と類似する構造をもつ Nucleoside-5'-diphosphate すなわち GDP, IDP, CDP および UDP (いずれも Sigma 社製) に対する両ミオキナーゼの作用につき検討した。それらの結果を Table 1 に示した。

表に示したように、ADP を基質とした場合のほかは、いずれの基質とインキュベートしても相当する Nucleoside-5'-triphosphate (GTP, ITP, CTP および UTP) の生成は全く認められなかつた。このことからミオキナーゼ I および II は ADP に対してのみ特異的に作用することが確認された。

考 察

コイ筋肉より分離・精製したミオキナーゼ I および II の分子量をゲル濾過法と SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法によつて測定したところ、両法とも等しい値を与え、それぞれ 27,000, 22,000 という結果を得た。NODA ら⁷⁾ がウサギ筋肉より得たミオキナーゼの分子量を 21,000 と報告しているが、これは著者らの分離したミオキナーゼ II の分子量に近い。SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動図から判断すると、両ミオキナーゼとも単量体からなるものであることが確認された。

ADP を基質として酵素反応におよぼす温度ならびに pH の影響を調べた結果、ミオキナーゼ I, II とともにほぼ同じ傾向を示し、その作用は 36-38°C, pH 7.5 で最も高い値を示した。次に両ミオキナーゼの基質特異性を明らかにするために、ADP, GDP, IDP, CDP および UDP など Nucleoside-5'-diphosphate を基質として検討した結果、両ミオキナーゼとも ADP へのみ特異的に作用することが明らかとなつた。

以上のことからコイ筋肉ミオキナーゼ I と II はクロマトグラフ的性質や分子量等の物理化学的性質が明らかに異なる蛋白質であるにもかかわらず、その触媒機能がほぼ同じであるアイソザイムとしての典型的なミオキナーゼ、すなわち ATP: AMP phosphotransferase であることが確認された。

文 献

- 1) 大城善太郎・福島正和・林 征一: 本誌, 40, 291-298 (1974).
- 2) 加藤好雄: 化学と生物, 7, 423-430 (1969).
- 3) 加藤好雄: 同誌, 7, 485-492 (1969).
- 4) P. ANDREWS: *Nature*, 196, 36-39 (1962).
- 5) A. TISELIUS, J. PORATH and P. ALBERTSSON: *Science*, 141, 13-20 (1963).
- 6) 林 健志・大場義樹: 蛋白質 核酸 酵素, 17, 304-311 (1972).
- 7) L. NODA and S. A. KUBY: in "Methods in Enzymology", (ed. by S. P. COLOWICK and N. O. KAPLAN), Vol. VI, Academic Press, New York, 1963, pp. 223-230.