

ティラピア背筋とウサギ骨格筋H-メロミオシツの比較生化学

誌名	日本水産學會誌
ISSN	00215392
著者	高士, 令二 室塚, 剛志 新井, 健一
巻/号	40巻10号
掲載ページ	p. 1033-1041
発行年月	1974年10月

ティラピア背筋とウサギ骨格筋

H-メロミオシンの比較生化学

高士 令二・室塚 剛志・新井 健一

(1974年7月6日受理)

Comparative Studies on the Heavy Meromyosin Fragments
from Tilapia Dorsal and Rabbit Skeletal Muscles

Reiji TAKASHI*, Takashi MUROZUKA*, and Ken-ichi ARAI*

Attempts were made to prepare heavy meromyosin (HMM) by tryptic digestion of dorsal muscle myosin from tilapia, *Tilapia mossambica*, and the biochemical properties of HMM from tilapia and rabbit were compared.

1) Results from gel filtration of HMM on a Sephadex G-200 column showed that tilapia myosin was digested by trypsin into smaller fragments more quickly than rabbit skeletal myosin.

2) Various effectors, such as KCl, Ca^{2+} , Mg^{2+} , PCMB, EDTA, actin and pH, showed essentially the same effects on tilapia HMM ATPase activity as on that of rabbit HMM.

3) It was recognized that tilapia HMM combine with F-actin revealed the identical characteristics of rabbit acto-HMM; that is, high ATP-sensitivity and the enhancement of Mg^{2+} -ATPase activity.

4) The most remarkable differences between tilapia and rabbit HMM were observed in the thermo-stability of their Ca^{2+} -ATPase activity. In 0.6 M KCl (pH 7.0) the rates of inactivation of HMM from tilapia and rabbit at 30°C were found to be $15.0 \times 10^{-5} \text{ sec}^{-1}$ and $4.60 \times 10^{-5} \text{ sec}^{-1}$, which values are comparable to the rates of their respective myosins.

メロミオシンに関する研究は数多くあるが、その大部分はウサギ骨格筋のメロミオシンについてである。すなわち、GERGELY¹⁾、MIHALYI²⁾、SZENT-GYORGYI³⁾はウサギの骨格筋ミオシンをトリプシンまたはキモトリプシンで短時間消化すると、ミオシンは超遠心力で二つの成分に分れることを見出し、早く沈降する成分をH-メロミオシン(HMM)、遅く沈降する成分をL-メロミオシン(LMM)と名づけた。このHMMはATPase活性およびアクチンとの結合能を保持しており、しかも水溶性である。LMMはミオシンと同じ塩溶解性を示すが、HMMのもつ二つの生理活性を示さないものである。以上のような理由で、ミオシンの生理機能および構造に関する研究を深めるため、ミオシンの活性部分であるHMMを研究することは非常に有意義である。

魚類筋肉のメロミオシンについては、codのミオシンをトリプシンで処理したCONNELLによる初歩的な実験があるが⁴⁾、その生理活性については全く研究されていない現状である。一方、従来の研究によれば、魚類背筋ミオシンはウサギ骨格筋ミオシンと極めて類似の理化学的性質ならびに生理的活性を示すが、一般に不安定で凝集し易く、ATPaseの熱に対する安定性は著るしく劣っている。この性質は魚類背筋ミオシン

略語: PCMB, *p*-chloromercuribenzoate; SDS, sodium dodecyl sulfate; HMM, heavy meromyosin; LMM, light meromyosin; HMM-S1, heavy meromyosin subfragment-1; TAME, tyrosyl L-arginine methyl ester.

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

の特異性になつている⁴⁻¹¹⁾。そこで、著者らは魚類背筋ミオシンの特異性の究明とその構造との関係を推定する試みとして、トリプシン消化によつてティラピア背筋ミオシンから HMM を調製する条件を検討し、ついでその生理活性などについて、ウサギ骨格筋の HMM と比較検討した。

実験方法

ティラピア背筋およびウサギ骨格筋からのミオシンの調製法は、前報で述べたとおり行なつた¹¹⁾。また、それらからの HMM の調製は Lowey らの方法に準じて行なつた¹²⁾。すなわち、0.5 M KCl-0.05 M リン酸緩衝液 pH 7.0 に溶解したミオシン溶液 (たん白質濃度はおよそ 10 mg/ml) に、トリプシン溶液 (たん白質濃度はおよそ 0.5 mg/ml) を、ミオシンとトリプシンの重量比が 200:1 になるように添加し、20°C または 25°C でミオシンを消化した。そして、トリプシンの 1.5 倍重量の大豆トリプシンインヒビター溶液 (たん白質濃度はおよそ 0.75 mg/ml) を添加して反応停止後、すぐ混液を氷冷し、つづいて 10-15 倍量の 0.007 M リン酸緩衝液 pH 7.0 に対して 12-15 時間透析し、未消化のミオシンおよび LMM などの不溶区分を 20,000 ×g, 30 分間遠心分離して除去し、その上澄を硫酸分画した。すなわち、40-55% 飽和 (NH₄)₂SO₄ 画分を 20,000 ×g, 20 分間遠心分離して集め、得られた沈澱を少量の 0.05 M Tris-HCl 緩衝液 pH 7.8 に溶解し、同液または 0.1 M KCl-20 mm Tris-HCl pH 7.6 に透析して (NH₄)₂SO₄ を除き、100,000 ×g, 60 分間遠心分離してその上澄を HMM 区分とした。なお、トリプシン活性の補正は TAME を加水分解するエステラーゼ作用を測定して行なつた¹³⁾。

F-アクチンの調製は Rees らの方法に準じて行なつた¹⁴⁾。すなわち、ライラピア背筋、ウサギ骨格筋のアセトン粉末を 20 倍容量の 0.5 mm ATP-0.5 mm β-メルカプトエタノール-0.2 mm CaCl₂-2 mm Tris-HCl 緩衝液 pH 8.0 を抽出液として 0°C で 20 分間抽出し、東洋汙紙 NO. 5c で吸引汙過し、その汙液を 0.1 M KCl-1 mm MgCl₂ として室温で重合させた。ここで生成した F-アクチンは 100,000 ×g, 2.5-3 時間遠心分離して集めた後、再び 0.2 mm ATP-0.5 mm β-メルカプトエタノール-0.2 mm CaCl₂-2 mm Tris-HCl 緩衝液 pH 8.0 に対して 2 日間透析して脱重合し、使用時に再重合させて使用した。

Sephadex G-200 による HMM 区分のクロマトグラフィーは、0.1 M KCl-20 mm Tris-HCl 緩衝液 pH 7.6 で平衡化したカラムにたん白質溶液を供し、同緩衝液によつて時速 10-15 ml の流速で下降法による溶出を行なつた。なお、分子量の推定は 2.5 × 95 cm カラムを使用し、void volume (V₀) は Blue Dextran 2000 の溶出位置から決定し、各たん白質の V₀ に対する相対溶出位置 (V₀/V₀) と分子量の対数値の関係から標準曲線を求めた。標準たん白質としては Mann Res. Lab. 社製の血清アルブミン、ミオクロビンおよびチトクローム C などを使用した。

Ca²⁺-ATPase 活性を測定する反応混液は、特に述べる場合以外は、0.5 M KCl, 5 mm CaCl₂, 25 mm Tris-maleate 緩衝液 pH 7.0, 1 mm ATP および 0.1-0.2 mg/ml 酵素である。また、Mg²⁺-ATPase 活性を測定する反応混液は 0.02 M KCl, 20 mm histidine-KOH 緩衝液 pH 7.0, 1 mm MgCl₂, 2 mm ATP および 0.1-0.2 mg/ml 酵素である。いずれの場合も 25°C で反応を行ない、終濃度 5% のトリクロール錯酸を加えて反応を止め、遊離する無機りん酸を比色定量した¹⁵⁾。

HMM およびミオシン Ca²⁺-ATPase の熱安定性は、0.1 M KCl または 0.6 M KCl-5 mm Tris-maleate 緩衝液 pH 7.0 で、30°C における変性失活を先の報告と同様に検討した¹⁰⁾。

粘度の測定は 10°C において、溶媒 (0.6 M KCl-5 mm Tris-maleate 緩衝液 pH 7.0) の流過速度が 180-230 秒で、容量が 2 ml のオストワルド型粘度計を使用した。

0.1% SDS を含む 10% ポリアクリルアミドゲル電気泳動法および同方法による各成分の分子量の推定は WEBER らの方法に従つて行なつた¹⁶⁾。

たん白質濃度はビューレット法およびマイクロキェルダール法によつた。なお、ゲル汙過の溶出液の場合には、従来ウサギ骨格筋 HMM について得られた紫外線吸光値 (O.D.₂₈₀ mμ = 6.47)¹⁷⁾ をティラピア背筋 HMM についても適用した。

実験結果

トリプシン消化によるミオシンのサブユニットの変化 トリプシンによるティラピア背筋およびウサギ骨格筋ミオシンのサブユニット構造の変化を比較するため、まず各ミオシンをトリプシンで短時間消化した後、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法でそのサブユニットの変化を追跡した。その結果 (Fig. 1) によれば、ウサギのミオシンサブユニットの泳動パターンは、HAYASHI の報告¹⁸⁾と良く一致しており、分子量がそれぞれ 2.5×10^4 , 1.85×10^4 , 1.4×10^4 の light chain のうち、 1.4×10^4 成分だけはトリプシン消化 10 分後でも変化しなかつた。一方、ティラピアのミオシンの場合は分子量 2.5×10^4 , 1.75×10^4 , 1.4×10^4 の light chain のうち、とくに 1.75×10^4 の成分はトリプシン消化 1 分後に消失した。次に、heavy chain の分解過程を見ると、ウサギのミオシンでは分子量 2.7×10^4 , 5.1×10^4 および 5.4×10^4 以上の成分が生成し、しかも 2.7×10^4 と 5.1×10^4 の成分は消化時間が進むに従って増加する傾向にあつた。一方、ティラピアのミオシンでは分子量 2.7×10^4 , 4.8×10^4 および $5.0-8.0 \times 10^4$ の成分が生成し、このうち 2.7×10^4 と 4.8×10^4 の成分は消化が進むと増加する傾向があつた。全体的に見ると、heavy chain に由来するサブユニットの分子量分布は、ティラピアの方がウサギの場合に比べて、分子量がより大きい成分が多数含まれていた。このことからティラピアのミオシンはトリプシンによつて、ウサギのミオシンよりも、その高次構造上複雑な変化をうけていることが推定される。

トリプシン消化の条件と HMM 生成の関係 ミオシンをトリプシンで消化する時の温度および時間と、得られた HMM の収量および Ca^{2+} -ATPase 比活性との関係をあらわした結果を Table 1 に示した。これによると、HMM の収量はティラピアおよびウサギの場合共に、ミオシンの 30-40% であつた。また、得られた HMM の Ca^{2+} -ATPase 比活性は、いずれもミオシンの比活性より高くなり、ウサギでは 1.4-1.5 倍、ティラピアでは 1.2-1.4 倍になつていた。

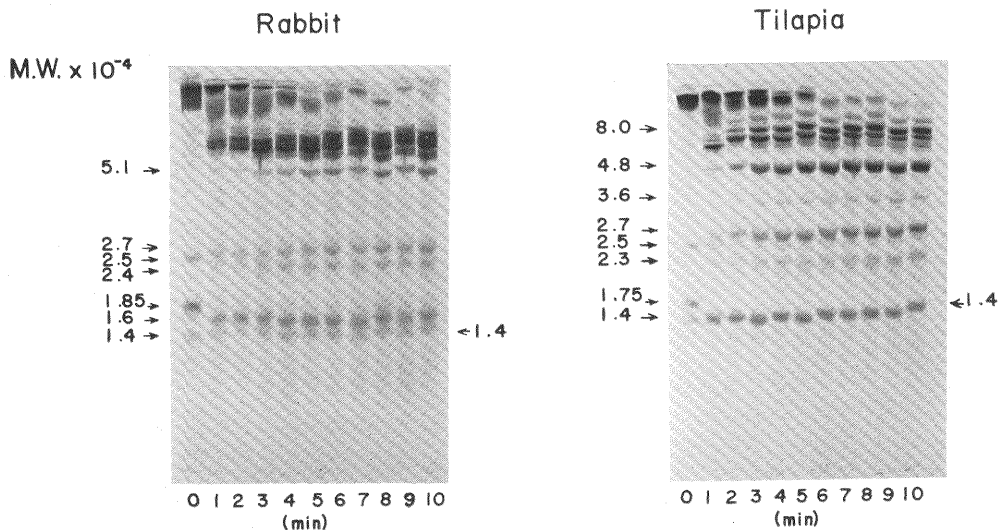


Fig. 1. Changes in the subunits of tilapia and rabbit myosins during tryptic digestion revealed in SDS-polyacrylamide gel electrophoresis.

Myosin was digested at 25°C in 0.5 M KCl-50 mM phosphate buffer (pH 7.0) with trypsin at a weight ratio of 200:1 (myosin to trypsin). After addition of trypsin aliquots were taken from the solution at intervals of a minute and immediately added to a solution containing 1.5 fold excess of trypsin inhibitor. The resulting solution was subjected to SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. Figures represent molecular weight of bands.

Table 1. Tryptic digestion of tilapia and rabbit myosins. Digestion was performed with trypsin at a weight ratio of 200:1 (myosin to trypsin)

	Myosin (mg)	Digestion time	Temp. (°C)	Yield HMM/Myosin (%)	Ca ²⁺ -ATPase*2	
					HMM	HMM/Myosin
Tilapia	1000	3	20	28.0	0.160	1.30
	930	5	20	35.1	0.172	1.30
	1000	10	20	39.2	0.232	1.39
	1000*1	10	25	37.4	0.275	1.20
Rabbit	1000	10	25	40.4	0.250	1.19
	1000	10	25	38.2	0.497	1.42
	1100	10	25	41.1	0.402	1.52

*1 Chromatographed myosin was used.

*2 ATPase activity was measured at 25°C in 0.5 M KCl, 25 mM Tris-maleate buffer (pH 7.0), 5 mM CaCl₂, 1 mM ATP, and 0.1–0.2 mg/ml of protein and expressed as μ moles Pi liberation per minute per mg of protein.

次に、ティラピアおよびウサギのミオシンを 25°C で 10 分間トリプシン消化をして調製した HMM について、Sephadex G-200 によるクロマトグラフィーを行なった結果を Fig. 2 に示した。この結果、ティラピアではその 66.9%，ウサギでは 86.7% が void volume に溶出し、ティラピアでは 25.7%，ウサギでは 9.5% が分子量 1.2×10^5 以下の成分として溶出することがわかった。したがって、ティラピアのミオシンは、ウサギの場合に比べて、トリプシン消化を受け易く、HMM よりさらに小さい分子になることがわかる。

次に、25°C でトリプシン消化して得られる HMM の粘性と消化時間の関係を検討した。その結果を Fig. 3 に示す。これによると、トリプシンによる消化時間の進行に従ってティラピア HMM 区分の固有粘度は低下しており、消化 5 分後では 1.00 dl/g 前後であるが、10 分後には 0.70–0.85 dl/g となり同時に粘度のたん白質濃度依存性も弱くなっていた。一方、ウサギの HMM の固有粘度は消化 10 分後で 0.45 dl/g と低く、粘度のたん白質濃度依存性もティラピアの場合に比べて弱かった。ウサギの HMM に関する以上の結果は従来の報告¹²⁾と良く一致している。

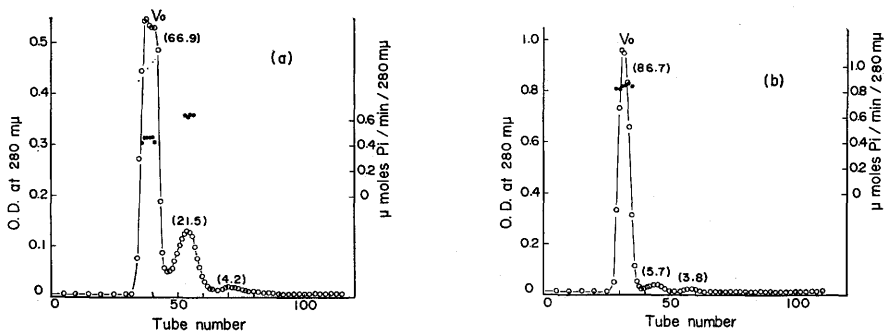


Fig. 2. Chromatography of tilapia and rabbit heavy meromyosins on a Sephadex G-200 equilibrated with 0.1 M KCl-20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.6) at 4°C.

Tilapia (O.D. at 280 μ = 10.1, 3.0 ml) and rabbit (O.D. at 280 μ = 9.0, 3.5 ml) heavy meromyosins prepared by 10 minutes tryptic digestion at 25°C were applied to a 2.5 \times 90 cm column, respectively. The flow rate was 10 ml per hour. Fractions of 4.7 ml (tilapia) and 5.4 ml (rabbit) were collected. Figures in parenthesis represent the protein recovery (%) of each fraction.

(a) Tilapia; (b) Rabbit. (●) Ca²⁺-ATPase activity.

HMM ATPase の性質について ミオシンを 25°C で 5 分間トリプシン消化して調製した HMM の示す ATPase について検討した。ティラピアおよびウサギの HMM ATPase は、いずれも CaCl_2 濃度 2.0mM において、ほぼ最大に活性化され 2.0–10.0mM の間にはあまり変化がなかった。(Fig. 4) また、同図中に示したように、いずれの HMM ATPase も EDTA によつて活性化され、1.0mM まで濃度の増加にしたがつて活性はじよじよに高くなつていた。

次に、HMM ATPase 活性に対する PCMB の効果を検討し結果を Fig. 5 に示した。この結果によると、ティラピア HMM ではたん白質量 10^5 g 当り 2 モルの PCMB を、そしてウサギ HMM では 10^5 g 当り 3 モルの PCMB を加えるとき、おのおのの Ca^{2+} -ATPase は最大活性に達し、それぞれ添加前の 1.5 倍および 2.2 倍の比活性になつた。さらに PCMB 量を増加すると、ティラピア HMM では 10^5 g 当り約 5 モルで、ウサギ HMM では 6.0–6.5 モルでその Ca^{2+} -ATPase は完全に失活した。

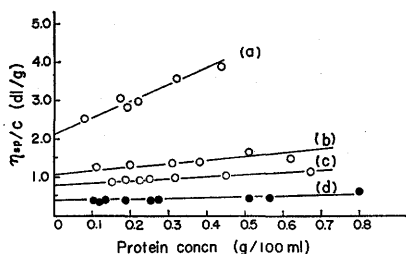


Fig. 3. Concentration dependence of the reduced viscosities for tilapia and rabbit heavy meromyosins prepared by tryptic digestion of their myosins at 25°C.

All measurements were performed in 0.6 M KCl-5 mM Tris-maleate buffer (pH 7.0) at 9.7°C. The values for the individual intrinsic viscosities (η) are: (a) myosin, $[\eta]=2.15$ dl/g; (b) 5 minutes digest, $[\eta]=1.10$ dl/g; (c) 10 minutes digest, $[\eta]=0.80$ dl/g; (d) 10 minutes digest, $[\eta]=0.45$ dl/g, respectively. Every heavy meromyosin was prepared from different myosin, separately.

(○) Tilapia; (●) Rabbit.

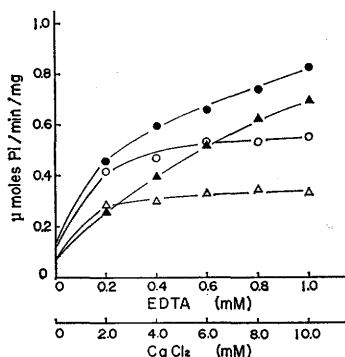


Fig. 4. Effect of CaCl_2 and EDTA concentration on the ATPase activity of tilapia and rabbit heavy meromyosins.

Heavy meromyosin was prepared by tryptic digestion of myosin for 5 minutes at 25°C. ATPase activity was measured at 25°C in 0.5 M KCl, 25 mM Tris-maleate buffer (pH 7.0), 1 mM ATP, 0.1–0.2 mg/ml of protein, and various concentration of CaCl_2 or EDTA as cited on abscissa.

(○) Rabbit, Ca^{2+} -ATPase; (△) Tilapia, Ca^{2+} -ATPase; (●) Rabbit, EDTA-ATPase; (▲) Tilapia, EDTA-ATPase.

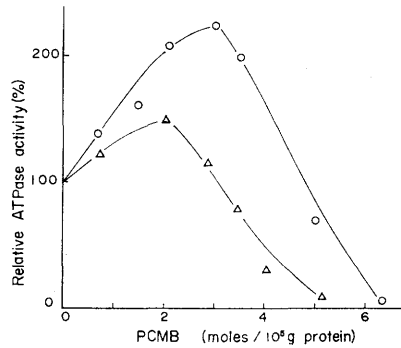


Fig. 5. Effect of PCMB on Ca^{2+} -ATPase activity of tilapia and rabbit heavy meromyosins. Heavy meromyosins prepared by tryptic digestion of myosins for 5 minutes at 25°C were incubated with various concentration of PCMB at 0°C overnight. The method of ATPase measurement was the same as in Table 1.
(○) Rabbit; (△) Tilapia.

なお, HMM の示す Ca^{2+} -ATPase の pH 依存性を測定した (Fig. 6)。これによると, ティラピア, ウサギ HMM はいずれも pH 6.1 に極大活性, pH 7.5 に極小活性を示した。この結果は, 先に著者がミオシン Ca^{2+} -ATPase について得た pH 活性化曲線¹¹⁾と一致しており, また, ウサギ骨格筋ミオシンについて報告された結果¹⁹⁾とも良く一致している。同図中に示した EDTA-ATPase の pH 依存性は, ティラピアおよびウサギ HMM は, いずれも pH がアルカリ側になるに従って急激に活性化され, すでに知られているウサギのミオシン EDTA-ATPase の pH 活性化曲線と同じ傾向であつた。ただし, pH 10.5 においてティラピア HMM の Ca^{2+} -ATPase と EDTA-ATPase は完全に失活するが, ウサギ HMM では失活しない点が異なっている。

HMM と F-アクチンの結合について ティラピアおよびウサギの HMM ATPase はいずれも Mg^{2+} で阻害されるが, F-アクチンと結合しアクチン-H-メロミオシンを構成すると, 低イオン強度下において Mg^{2+}

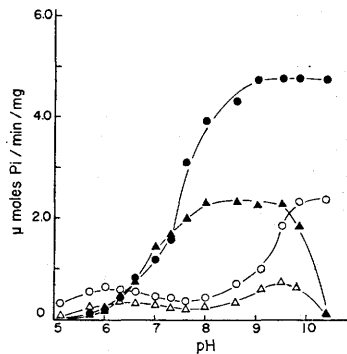


Fig. 6. pH dependence of Ca^{2+} -ATPase and EDTA-ATPase activities of tilapia and rabbit heavy meromyosins.

Preparative method of heavy meromyosins was the same as in Fig. 4. ATPase activity was measured at 25°C in 0.5 M KCl, 5 mM CaCl_2 or 5 mM EDTA, 1 mM ATP, and 0.1–0.2 mg/ml of protein. 50 mM Histidine–KOH buffer at pH 5.1–5.7, 50 mM Tris-maleate buffer at pH 6.0–8.6, and 50 mM glycine–KOH buffer at pH 9.2–10.5 were used.

(○) Rabbit, Ca^{2+} -ATPase; (△) Tilapia, Ca^{2+} -ATPase; (●) Rabbit, EDTA-ATPase; (▲) Tilapia, EDTA-ATPase.

で著るしく活性化されるようになる。この事実を確認したので Fig. 7 に示す。この実験ではティラピアおよびウサギの HMM と F-アクチンを相互に結合させたのであるが、 Mg^{2+} -ATPase の活性化の高さは使用した HMM によって決り、アクチンには無関係であることがわかった。この場合はティラピアおよびウサギのいずれのアクチンを使用しても、 Mg^{2+} -ATPase はティラピア HMM の場合は低く、ウサギ HMM の場合に高くなっている。次に、ティラピアの HMM と F-アクチンの結合性をアクト-H-メロミオンが構成されるときおこる粘性の変化から検討した。すなわち、HMM と F-アクチンを重量比を変えて混合しその粘度を測定すると、HMM と F-アクチンの量比がほぼ 1:0.5 のとき最大に達することを認めた。これに ATP を 1 mM 加えていわゆる ATP 感度を求めると、その値は 80 以上に達した。以上の二つの実験

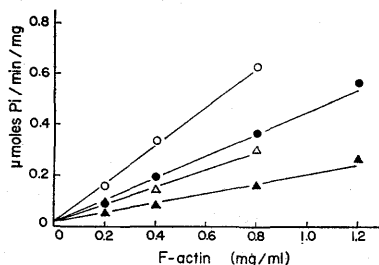


Fig. 7. Effect of F-actin on Mg^{2+} -ATPase activity of tilapia and rabbit heavy meromyosins. Preparative method of heavy meromyosin was the same as in Fig. 4. ATPase activity was measured at 25°C in 0.02 M KCl, 20 mM histidine-KOH buffer (pH 7.0), 1 mM $MgCl_2$, 2 mM ATP, and 0.1 mg/ml of protein.

(○) Rabbit HMM and rabbit actin. (△) Tilapia HMM and rabbit actin.
(●) Rabbit HMM and tilapia actin. (▲) Tilapia HMM and tilapia actin.

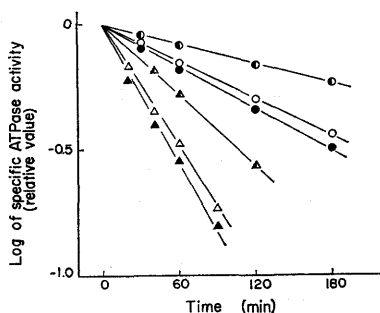


Fig. 8. Thermal inactivation in Ca^{2+} -ATPase activity of tilapia and rabbit myosins and their heavy meromyosin fragments as a function of time.

Incubation of protein (1.0 ml of 0.4–0.5%) was carried out at 30°C in 0.6 M KCl or 0.1 M KCl containing 5 mM Tris-maleate buffer (pH 7.0). The method of ATPase measurement was the same as in Table 1. The activity was expressed as logarithm of the relative value when the original activity was taken as 1.0. Curves represent mean of two determinations at least.

(○) Rabbit HMM in 0.1 M KCl (pH 7.0). $K_D = 2.17 \times 10^{-5} \text{ sec}^{-1}$
(●) Rabbit myosin in 0.6 M KCl (pH 7.0). $K_D = 4.14 \times 10^{-5} \text{ sec}^{-1}$
(○) Rabbit HMM in 0.6 M KCl (pH 7.0). $K_D = 4.60 \times 10^{-5} \text{ sec}^{-1}$
(▲) Tilapia HMM in 0.1 M KCl (pH 7.0). $K_D = 7.77 \times 10^{-5} \text{ sec}^{-1}$
(△) Tilapia myosin in 0.6 M KCl (pH 7.0). $K_D = 13.7 \times 10^{-5} \text{ sec}^{-1}$
(▲) Tilapia HMM in 0.6 M KCl (pH 7.0). $K_D = 15.0 \times 10^{-5} \text{ sec}^{-1}$

K_D is the first order rate constant of inactivation of Ca^{2+} -ATPase activity.

結果は、ティラピア HMM が、そのミオシンについて良く知られている、F-アクチンとの結合能をうけつぎ保持していることを証明するものである。

HMM Ca^{2+} -ATPase の熱安定性について ティラピアおよびウサギの HMM Ca^{2+} -ATPase の 30°C における失活を測定し、結果を Fig. 8 に示す。この結果で明らかなように、0.1 M KCl, pH 7.0 溶液のティラピアおよびウサギの HMM Ca^{2+} -ATPase は、いずれも 0.6 M KCl, pH 7.0 溶液のそれぞれのミオシン Ca^{2+} -ATPase に比べやや安定であった。このとき、ティラピア HMM Ca^{2+} -ATPase の変性速度恒数は $7.77 \times 10^{-5} \cdot \text{sec}^{-1}$ 、ウサギのそれは $2.17 \times 10^{-5} \cdot \text{sec}^{-1}$ であり、前者が後者より 3.5 倍不安定であった。一方、0.6 M KCl, pH 7.0 溶液のティラピアおよびウサギの HMM Ca^{2+} -ATPase は、同条件下のそれぞれのミオシン Ca^{2+} -ATPase に比べやや不安定であった。HMM Ca^{2+} -ATPase の変性速度恒数はティラピアでは $15.0 \times 10^{-5} \cdot \text{sec}^{-1}$ 、ウサギでは $4.60 \times 10^{-5} \cdot \text{sec}^{-1}$ であつて、同じくティラピア HMM は 3.3 倍不安定であった。

考 察

ティラピアから調製した HMM ATPase の基本的性質はウサギの場合と良く類似するものであつた。すなわち、先ずトリプシン消化によつてその ATPase は水溶性となる。そして、その活性は Ca^{2+} で強く活性化され Mg^{2+} で阻害される。EDTA や PCMB などの活性に対する影響も同傾向を示していた。ただし、ティラピア HMM の Ca^{2+} -ATPase はウサギのそれに比べて PCMB による活性化度は弱く、完全失活に必要な PCMB 量はティラピア HMM ではウサギ HMM に比べ 10^5 g 当り 1 モルだけ少なかつた。この違いは両者の SH 基の反応性の差異を反映しているかも知れない。

HMM について得られた EDTA-ATPase と Ca^{2+} -ATPase の pH 活性化曲線は、いずれもミオシンで見られる曲線と一致していたが、先述したようにティラピア HMM ATPase は pH 10.5 において完全に失活した。一方、ティラピアのミオシンにおいては pH 10.5 における活性は pH 7.0 の場合の約 1.3 倍であることを先に報告した¹¹⁾。したがつて、この事実はティラピア HMM の特性であるように思われる。すなわち、ウサギの slow muscle (赤筋) と fast muscle (白筋) のミオシンについて比較研究した SAMAHA²¹⁾によれば、slow muscle のミオシン ATPase は室温で pH 10.5 に 10 分間おいた後、再び pH 7.0 にもどすと活性は約 30-40% 減少するが、fast muscle のミオシン ATPase の場合は 90% 以上残存すること、そして同時に両ミオシンから電気泳動的に異なつた light chain が遊離してくることを認めている。さらに GERSHMAN らによれば^{22,23)}、ウサギ骨格筋ミオシンは pH 10.0-10.5 の間で light chain の解離を起こすこと、そして light chain の解離と ATPase の失活の相関性を論じている。以上の報告を考慮すれば、ティラピアの HMM ATPase の pH 10.5 における失活も light chain の解離と関係があるように思われる。

本研究ではティラピアおよびウサギ HMM が F-アクチンと結合して、 Mg^{2+} -ATPase を活性化することを示したが、このとき EISENBERG らの方法²⁰⁾に従つて ATPase 活性を求めた。すなわち、添加した F-アクチン量の逆数とそのときの ATPase 活性の逆数との直線関数グラフから、いわゆる最大活性値 (F-アクチン量を無限大に外挿したときの ATPase 活性) を求めると、ティラピアでは 0.64、ウサギでは $2.50 \mu\text{moles Pi/min/mg}$ たん白質となり、前者は四分の一の低さであつた。このように ATPase 活性が低い事実は、魚類に共通しているようである。

魚類背筋ミオシンとウサギ骨格筋ミオシンの最も顕著な性質の差異は、 Ca^{2+} -ATPase の熱に対する安定性にあることが知られているが、それぞれの HMM の Ca^{2+} -ATPase もミオシンの場合と同じ傾向を示した。すなわち、同じ動物筋肉から得たミオシンと HMM の Ca^{2+} -ATPase の熱に対する安定性はあまり変わらないが、ウサギとティラピアを比較すれば、ミオシンと HMM はいずれもティラピアが 3.3-3.5 倍不安定であつた。このように、はじめアクトミオシンについて見出された動物の種類による Ca^{2+} -ATPase の熱に対する安定性の違いは²⁴⁾、それらのミオシンに、さらに HMM に引きつがれていることがわかつた。この性質は魚肉構成たん白質の、とりわけ ATPase 活性部位の特性であるから、HMM-S1 部分²⁵⁾に受けつがれ

ている可能性が強い。

なお、本実験で得られたティラピア HMM は超遠心分析によると、必ずしも単一成分とはならず、 $S_{20,w}$ (たん白質濃度 5 mg/ml) が 5.7 S と 4.7 S の主要二成分と 3.2 S の微量成分からなる不均一なものであった。また、同時に対照としたウサギ HMM の主要成分である 6.7 S と一致する成分が認められなかった。先に、CONNELL⁴⁾ は Cod ミオシンはトリプシン消化を非常に受け易いこと、そしてウサギ骨格筋ミオシンのように、超遠心分析によつて HMM と LMM の二成分にはつきりと分離しないこと、さらに沈降の早い二成分と遅い微量成分からなると報告している。これらは本実験のティラピアの場合と良く類似している。このように、魚肉ミオシンからトリプシン消化によつて得られる HMM は、その諸性質とりわけ生理的活性はウサギの HMM に良く類似しているにもかかわらず、不均質であるため今後は調製方法について検討を加える必要があると考えている。一方、魚肉ミオシンが熱に対して不安定であり、トリプシンのようなたん白質分解酵素に対して非常に感受性が強いなどの一般的事実から、その高次構造はウサギ骨格筋ミオシンに比べて脆弱であつて明らかに異なつていると思われること、また、ミオシン ATPase の活性中心に極めて密接な関係があるといわれている light chain の組成が、ウサギのそれと明らかに異なつていること²⁶⁾などを考慮すれば、魚肉の HMM が本来不均一である可能性も残されていると思われる。

文 献

- 1) J. GERGELY: *J. Biol. Chem.*, **200**, 543-550 (1953).
- 2) E. MIHALYI and A. G. SZENT-GYORGYI: *ibid.*, **201**, 189-196 (1953).
- 3) A. G. SZENT-GYORGYI: *Arch. Biochem. Biophys.*, **42**, 305-320 (1953).
- 4) J. J. CONNELL: *Biochem. J.*, **80**, 503-509 (1961).
- 5) H. BUTTKUS: *J. Fish. Res. Bd. Canada*, **23**, 563-573 (1966).
- 6) J. J. CONNELL: *Biochem. J.*, **71**, 83-86 (1959).
- 7) J. J. CONNELL: *Biochim. Biophys. Acta.*, **74**, 374-385 (1963).
- 8) G. HAMOIR, H. A. MCKENZIE, and M. B. SMITH: *ibid.*, **40**, 141-149 (1960).
- 9) H. BUTTKUS: *J. Fish. Res. Bd. Canada*, **24**, 1607-1612 (1967).
- 10) H. BUTTKUS: *Can. J. Biochem.*, **49**, 97-107 (1971).
- 11) 高士令二: 本誌, **39**, 197-205 (1973).
- 12) S. LOWEY and C. COHEN: *J. Mol. Biol.*, **4**, 293-308 (1962).
- 13) B. C. W. HUMMEL: *Can. J. Biochem. Physiol.*, **37**, 1393-1399 (1959).
- 14) M. K. REES and M. YOUNG: *J. Biol. Chem.*, **242**, 4449-4458 (1967).
- 15) C. H. FISKE and Y. SUBBAROW: *ibid.*, **66**, 370-540 (1925).
- 16) K. WEBER and M. OSBORN: *ibid.*, **244**, 4406-4412 (1969).
- 17) M. YOUNG, S. HIMMELFARB, and W. F. HARRINGTON: *ibid.*, **240**, 2428-2436 (1965).
- 18) Y. HAYASHI: *J. Biochem.*, **72**, 83-100 (1972).
- 19) W. F. H. M. MOMMAERTS and K. SERAIDARIAN: *J. Gen. Physiol.*, **30**, 401-422 (1947).
- 20) E. EISENBERG and C. MOOS: *Biochemistry*, **7**, 1486-1489 (1968).
- 21) F. J. SAMAHA, L. GUTH, and R. W. ALBERS: *J. Biol. Chem.*, **245**, 219-224 (1970).
- 22) L. C. GERSHMAN, A. STRACHER, and P. DREIZEN: *ibid.*, **244**, 2726-2736 (1969).
- 23) P. DREIZEN and L. C. GERSHMAN: *Biochemistry*, **9**, 1688-1693 (1970).
- 24) 新井健一・川村久美子・林千恵子: 本誌, **39**, 1077-1085 (1973).
- 25) H. KAWAKAMI, J. MORITA, K. TAKAHASHI, and T. YASUI: *J. Biochem.*, **70**, 635-648 (1971).
- 26) 高士令二・室塚剛志・新井健一: 本誌, **40**, 1063-1069, (1974),