

キハダマグロおよびコイのアクトミオシンからトリプシン消化によるHメロミオシンの調製と性質

誌名	日本水産学会誌
ISSN	00215392
著者	木村, 郁夫 ほか3名,
巻/号	46巻5号
掲載ページ	p. 571-581
発行年月	1980年5月

キハダマグロおよびコイのアクトミオシンからトリプシン 消化による H メロミオシンの調製と性質

木村 郁夫・高城 茂展・高橋 康弘・新井 健一

(1979 年 12 月 6 日受理)

Preparation and Properties of Heavy Meromyosins by Tryptic Digestion of Yellowfin Tuna and Carp Actomyosins

Ikuo KIMURA*¹, Shigenori TAKAGI*², Yasuhiro TAKAHASHI*³,
and Ken-ichi ARAI*¹

Actomyosin (AM), when submitted to tryptic digestion, yielded fragments which remained bound to actin. The fragments were separated from actin by high concentration of ATP-Mg and collected in the supernatant by centrifugation.

When digestion of AM was conducted at 25°C for 10 min using trypsin in an amount of 1/200 (w/w) relative to AM, the enzymatically active fragments were isolated from yellowfin tuna AM. In the case of the enzymic activity of the fragments from carp AM was reduced even when the amount of trypsin was varied from 1/200 to 1/10,000 (w/w) relative to AM. The fragments thus obtained were characterized by its enzymic activity, actin-binding properties, and chromatographic profile on Sephadex G-200.

The proteolysis at 10°C instead of 25°C for 10 min using trypsin in an amount of 1/200 (w/w) relative to AM, was found to be favorable in preparing the enzymatically active fragments from carp AM. The fragments were further purified by salting with $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ in the presence of 10 mM ATP-Mg and then characterized by its enzymic activity, kinetic parameters (V_{max} and K_a) of ATPase in actin activation, chromatographic profile on Sephadex G-200, and sedimentation constant.

It was thus shown that these fragments from yellowfin tuna and carp AM's were similar to heavy meromyosins from rabbit and skipjack tuna myosins, which have already been reported.

魚肉ミオシンの特性を明らかにするために酵素的に活性な分子断片、Hメロミオシン (HMM) やサブフラグメント-I (S-I), をプロテアーゼの作用によつて分離し、研究する必要がある。しかし、魚肉構造タンパク質、特にミオシンはその構造が脆弱で、トリプシンによる消化を非常に受け易いことは良く知られている¹⁻³⁾。著者らも先に ATPase 活性⁴⁾ および粘性⁵⁾ を指標として魚肉ミオシンとアクトミオシンのトリプシン消化性 (消化速度および量) を比較した結果、魚種によつて著しい違いがあることを明らかにした。すなわち、これら魚肉構造タンパク質のトリプシンに対する感受性 (=消化性) は、これらタンパク質の加熱⁶⁾ や尿素⁷⁾ に対する感受性 (=安定性) とほぼ相関していることを知った。これらの結果を総合してみると、ミオシンからトリプシン消化

によつて HMM を生産するとき、ウサギ骨格筋ミオシンを原材料とするときに用いられてきた消化条件よりもさらに温和な条件によらなければ、魚肉ミオシンから HMM を高収量で調製することは困難であろうと推定された。しかしながら、魚肉ミオシンから HMM を単離する目的でトリプシン消化条件を詳細に検討した研究はほとんど見ることが出来ない現状である。

本研究では魚肉ミオシンの調製があまり容易でない事実をも考慮して、アクトミオシンを原材料として選び、トリプシン消化によつて HMM を生産するための良い条件を見出すことを目的として基礎的な検討を行った。続いて、その条件下でアクトミオシンをトリプシン消化して HMM を分離し、その諸性質を明らかにしようとして試みた。なお、ミオシンとアクトミオシンのトリプシン

*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 041).

*² 現住所: 大塚製薬株式会社 (Present address: Ohtsuka Pharmaceutical Co. Ltd., Oosaka 540).

*³ 現住所: 大和製缶株式会社 (Present address: Daiwa Can Co. Ltd., Sagamigahara 228).

による粘度の減少速度は同じでありアクチンは影響しないことが従来から知られているので^{4,5,8,9)}、その消化条件はミオシンから HMM を調製した従来の研究成果¹⁰⁾を参考とした。

実験方法

アクトミオシン (本文中では AM と略す) は、コイ *Carp*, *Cyprinus carpio* 背筋およびキハダマグロ *Yellowfin tuna*, *Thunnus albacares* 背筋、また対照としてウサギ骨格筋の、いずれも新鮮肉から高土らの報じた方法に準じて調製した¹¹⁾。ウサギ骨格筋の純アクチンは SPUDICH と WATT の方法により調製した¹²⁾。キハダマグロおよびコイの AM をトリプシン消化した後、ATP を加えて解離するアクチンを除き、粗 HMM を分離する方法と、コイの AM を同じようにトリプシン処理した後、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ で塩析して HMM を精製する方法については、実験結果の項において詳しく述べる。

トリプシンによる魚肉 AM の消化性の検討は、AM (0.6 M KCl-20 mm Tris-maleate, pH 7.0) 溶液に一定重量のトリプシンを加え、定温で消化しながら一定時間ごとに消化液の一定容量をとり出し、トリプシンの5倍重量のトリプシンインヒビターを添加して消化を止め、氷冷して保存し、その粘性および ATPase 活性の変化を測定して行つた。

AM およびそのトリプシン消化液の粘度の測定は、容量が 2 ml で溶媒の流過速度が 90~120 秒のオストワルド型粘度計を使用し、10°C で行つた⁵⁾。なお、トリプシンによる AM 溶液の粘度減少は二相性を示し、初期は速く後期は遅い速度の二段階の一次反応に従うが^{5,9)}、本実験では初期における粘度減少の速度定数 (K) を次式によつて求めた。 $K = (\ln Z_{\eta_0} - \ln Z_{\eta_t}) \cdot 1/t$ ここで $Z_{\eta_0} = \ln \eta_0/C$, $Z_{\eta_t} = \ln \eta_t/C$, また、 η_0 と η_t はトリプシン消化前と後の AM 溶液の相対粘度、 C はタンパク質濃度 (mg/ml) である。 t は消化時間 (秒) である。

Ca-ATPase 活性の測定は 5 mm CaCl₂, 25 mm Tris-maleate (pH 7.0), 0.06 M KCl または 0.5 M KCl, 1 mm ATP の組成、EDTA-ATPase 活性の測定は 5 mm EDTA (ethylenediamine tetraacetate), 1.0 M KCl, 25 mm Tris-maleate (pH 7.0), 1 mm ATP の組成に適量の AM または HMM を含む反応混液で 25°C において生成した無機リン酸量を比色定量して行つた¹³⁾。

Sephadex G-200 による HMM のゲル濾過は次の条件で行つた。すなわち、カラムは 2.2×85~90 cm とし、タンパク質は約 20~40 mg を供試した。流量は 15~20 ml/時間とし 5~10 ml の間の一定容量を分画して集め、280 nm の吸光値を測定した。

超遠心沈降分析はシュリーレン光学系を装備した Beckman L2-65B 型超遠心分離機により、タンパク質は 0.05 M KCl-10 mm Tris-HCl (pH 7.5) 溶液とし、4~6 mg/ml の濃度で、59,800 rpm における沈降図型を bar angle 60° において撮影した。

SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動は WEBER と OSBORN の方法¹⁴⁾によつて行つた。

使用したトリプシンは牛脾臓製タイプ I, 2 回結晶, Sigma Chem. Co. の製品であり、濃度は $E_{280\text{nm}}^{2\%} = 15.4^{15)}$ を用いて決定した。なお、AM と HMM のタンパク質濃度は牛血清アルブミン fraction V を標準とし、ビュレット法によつて比色定量し決定した¹⁶⁾。

結果

AM のトリプシン消化物から分離した粗 HMM の収量と性質 異なる量のトリプシンで処理した AM 消化物から粗 HMM (水溶性の ATPase 活性を示す画分) を分離してその性質を比較検討し、HMM を調製するための良い消化条件を見出そうとした。

方法は AM (約 20 mg/ml, 0.6 M KCl-20 mm Tris-maleate, pH 7.0) 溶液を 25°C とし、異なる量のトリプシンを加えて消化し、10 分(または 60 分)後に 5 倍量のトリプシンインヒビターを加え、同時に 10 倍容量の冷水を加える。次に、10,000×g で 60 分間遠心分離して沈殿を集め、この沈殿を 0.6 M KCl-20 mm Tris-maleate, pH 7.0 溶液に溶解し、終濃度が 10 mm ATP と 5 mm MgCl₂ を加えて冷室で数時間保存する。解離した HMM を 100,000×g で 1 時間遠心分離して上澄に集め、0.05 M KCl-10 mm Tris-HCl, pH 7.5 溶液に対して透析した後、再び 100,000×g で 1 時間遠心分離して粗 HMM とした。

AM に加えたトリプシン量と分離した粗 HMM の収量および Ca-ATPase 活性との関係を Table 1 に示した。これによると、キハダマグロの AM から高い Ca-ATPase 活性を示す粗 HMM を収量良く得るためには、AM に対してトリプシンを 1/200 量添加して 10 分間消化したときが良かった。(60 分間消化した場合の結果もあまり違いがなかった)。AM に対するトリプシン量が上記より少ないときは粗 HMM の収量と Ca-ATPase 活性は共に低値となり、一方、トリプシン量が多いときは収量はあまり変らないが、後述するように、小分子量の分子断片が生成してくる (Sephadex G-200 によるゲル濾過法で判定)。

次に、ウサギの AM の消化の場合は、トリプシン量が AM の 1/50 という多量のときでも、高い Ca-ATPase 活性を示す粗 HMM が収量良く得られた。すなわち、キハダマグロの場合よりもやや強い消化条件が

Table 1. Ca-ATPase activity and yield of crude HMM's isolated from the digests of actomyosins.

The methods for tryptic digestion of actomyosin (AM) and for isolation of crude HMM were described in the legend of Fig. 1.

The ATPase assay was carried out at 25°C in a medium containing 5 mM CaCl₂, 25 mM Tris-maleate (pH 7.0), 0.06 M KCl, 1 mM ATP, and an appropriate amount of AM or crude HMM (HMM* in the table).

	Digestion		Protein yield		Ca-ATPase	
	trypsin/AM (w/w)	min	HMM*/AM (%)	Activity of HMM* (μ mol Pi/min. mg protein)	Activity ratio HMM*/AM (%)	
Yellowfin tuna	1/ 100	10	15	—	—	
	1/ 200	10	16	0.80	204	
	1/ 200	60	20	1.05	209	
	1/ 2,000	60	5	0.15	44	
Carp	1/ 200	10	9	0.13	21	
	1/ 2,000	10	18	0.60	92	
	1/ 7,000	10	15	0.59	98	
	1/20,000	10	15	0.32	54	
Rabbit	1/ 50	60	14	1.90	286	
	1/ 200	10	19	1.75	277	

HMM生成のために適していることが示唆された。これに対して、コイの AM から高い ATPase 活性を示す粗 HMM を得るための消化条件は、トリプシン量が AM の 1/2,000~1/7,000 と極めて少量で 10 分間消化したときであり、これはキハダマグロ AM からの場合に比べてかなり温和な条件である。なお、キハダマグロ AM から HMM を生産するのに適していると判定された条件、すなわち、1/200 のトリプシン量で 10 分間コイの AM を消化すると、収量と Ca-ATPase 活性は共に非常に低い標品しか得られなかつた。

分離した粗 HMM の Ca-ATPase 比活性に注目して比べると、ウサギの粗 HMM の比活性は AM のそれよりも 2~3 倍に上昇し、キハダマグロの粗 HMM の比活性も AM の約 2 倍に上昇したが、コイの粗 HMM の比活性は最も高いときでも AM の 0.98 倍にとどまっていた。したがって、コイの AM を 25°C で消化する場合は、高い Ca-ATPase 活性を有する HMM を分離・調製することが極めて困難であることを予想させるものであつた。

分離した粗 HMM を Sephadex G-200 によつてゲル濾過を行い、その溶出図型から標品の分子サイズを検討した。その結果を Fig. 1 (A~F) に示し。先ず、Fig. 1 (A, B) にはキハダマグロ AM をその 1/100 (A) および 1/200 (B) 量のトリプシンで 10 分間消化して得た粗 HMM をゲル濾過した結果を示したが、いずれの場合も void volume に相当する位置にその主成

分が現われ、少し遅れた位置に少量の成分が溶出された。この少量成分はトリプシンが多い場合 (A) の方がやや増加しており、溶出位置から推定してサブフラグメント 1 にあたると思われる。次に、ウサギ AM をその 1/50 (C) および 1/200 (D) 量のトリプシンで 10 分間消化して得た粗 HMM をゲル濾過した結果を見ると、この溶出図型はキハダマグロの場合と良く似ており、その主成分は void volume に現われるがサブフラグメント 1 と推定される少量の成分も含んでいた。また、コイ AM をその 1/2,000 (E) および 1/7,000 (F) 量のトリプシンで 10 分間消化して得た粗 HMM をゲル濾過した結果を示すと、1/2,000 量のトリプシンによつて消化した場合は void volume に現われる成分とやや遅れて溶出する成分が一部重なつて溶出されていたが、1/7,000 量のトリプシンによる場合は void volume に大部分の成分が現われ、その他の成分は非常に少なかつた。

これらの粗 HMM と F アクチンとの結合能を粘度を指標として検討した¹⁷⁾。すなわち、粗 HMM とウサギ骨格筋の F アクチンを 0.6 M KCl, pH 7.0 溶液中で等重量混合した後 ATP 感度を求めた¹⁷⁾。それによると、キハダマグロの粗 HMM (AM: トリプシン=200:1, 10 分消化物から分離)、ウサギ粗 HMM (AM: トリプシン=200:1, 10 分消化物から分離)、コイの粗 HMM (AM: トリプシン=7,000:1, 10 分消化物から分離) を使用して構成した Acto-HMM の ATP 感度

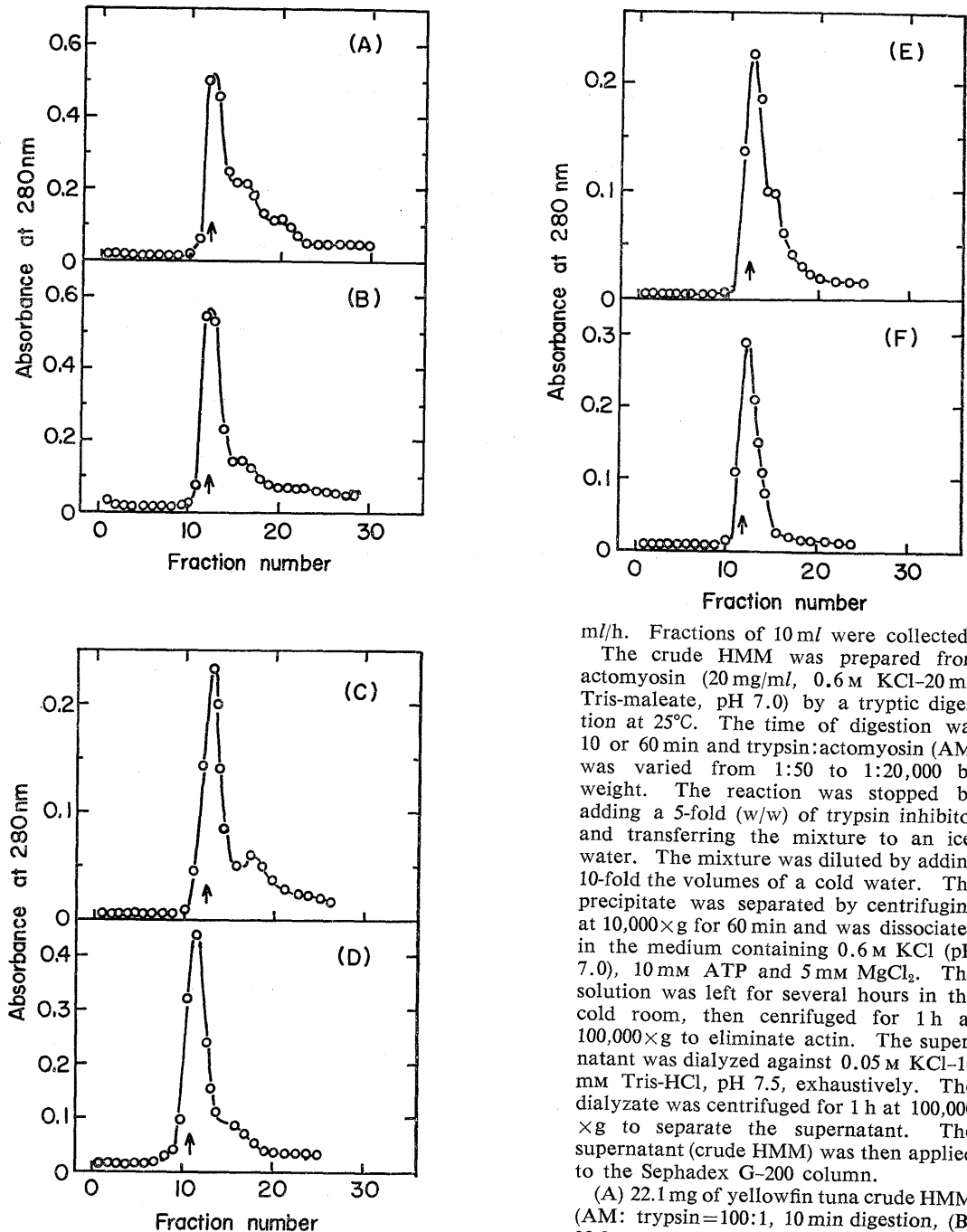


Fig. 1. Sephadex G-200 gel filtration of crude HMM (water soluble and enzymatically active fragments) obtained by tryptic digestion of actomyosin from yellowfin tuna, carp, and rabbit.

Gel filtration was carried out at 5°C on Sephadex G-200 using a column (2.2×85-90 cm) equilibrated with 0.05 M KCl-20 mM Tris-HCl, pH 7.5. Elution was done with the same solution at a flow rate of 10-15

ml/h. Fractions of 10 ml were collected.

The crude HMM was prepared from actomyosin (20 mg/ml, 0.6 M KCl-20 mM Tris-maleate, pH 7.0) by a tryptic digestion at 25°C. The time of digestion was 10 or 60 min and trypsin:actomyosin (AM) was varied from 1:50 to 1:20,000 by weight. The reaction was stopped by adding a 5-fold (w/w) of trypsin inhibitor and transferring the mixture to an ice-water. The mixture was diluted by adding 10-fold the volumes of a cold water. The precipitate was separated by centrifuging at 10,000×g for 60 min and was dissociated in the medium containing 0.6 M KCl (pH 7.0), 10 mM ATP and 5 mM MgCl₂. The solution was left for several hours in the cold room, then centrifuged for 1 h at 100,000×g to eliminate actin. The supernatant was dialyzed against 0.05 M KCl-10 mM Tris-HCl, pH 7.5, exhaustively. The dialyze was centrifuged for 1 h at 100,000×g to separate the supernatant. The supernatant (crude HMM) was then applied to the Sephadex G-200 column.

(A) 22.1 mg of yellowfin tuna crude HMM (AM: trypsin=100:1, 10 min digestion), (B) 22.0 mg of yellowfin tuna crude HMM (AM: trypsin=200:1, 10 min digestion), (C) 13.5 mg of rabbit crude HMM (AM: trypsin=50:1, 10 min digestion), (D) 18.6 mg of rabbit crude HMM (AM: trypsin=100:1, 10 min digestion), (E) 13.9 mg of carp crude HMM (AM: trypsin=2,000:1, 10 min digestion), and (F) 17.2 mg of carp crude HMM (AM: trypsin=7,000:1, 10 min digestion) were applied respectively. The arrows indicate the void volume.

Table 2. Apparent first order rate constants of inactivation of Ca-ATPase activities of crude HMMs and acto-HMMs at 30°C and 35°C.

Actomyosin was digested at 25°C for 10 min by trypsin in an amount of 1/200 (for rabbit), 1/200 (for yellowfin tuna), or 1/7,000 (for carp) relative to actomyosin by weight, respectively. The method for isolation of crude HMM was described in the legend of Fig. 1. Crude HMM and rabbit F-actin were combined to form acto-HMM in 0.6 M KCl-20 mM Tris-HCl (pH 7.5) at a mixing ratio of 1:2 by weight. Crude HMM and acto-HMM (4-5 mg/ml, 0.6 M KCl-20 mM Tris-HCl, pH 7.5) were incubated at 30°C and 35°C. The heat inactivation was stopped by cooling in ice water. The loss of ATPase activity during incubation was measured. The ATPase assay was carried out at 25°C in a reaction medium containing 5 mM CaCl₂, 25 mM Tris-maleate (pH 7.0), 1 mM ATP and 0.1 mg/ml of crude HMM or 0.3 mg/ml of acto-HMM. The first order inactivation rate of ATPase was calculated by the following equation: $K_D = (\ln C_0 - \ln C_t) / t$, where C_0 and C_t are the ATPase activities before and after incubation time (t second).

Species	The first order rate constant of inactivation (K_D) sec ⁻¹			
	HMM Ca-ATPase		Acto-HMM Ca-ATPase	
	30°C	35°C	30°C	35°C
Yellowfin tuna	3.85×10^{-4}	—	0.44×10^{-4}	—
Carp	5.55×10^{-4}	—	0.51×10^{-4}	—
Rabbit	0.94×10^{-4}	3.59×10^{-4}	—	0.25×10^{-4}

はそれぞれ 60, 70 および 68% となつた。したがつて、これらの粗 HMM はいずれもアクチンと結合し ATP-Mg によつて解離することを示唆した。

次に、同じ粗 HMM に対して 2 倍重量のウサギの F アクチンを加え Acto-HMM を構成し、その Ca-ATPase 活性の温度安定性を、HMM だけの場合と比較した。これは HMM がアクチンと結合すると、その Ca-ATPase 活性が熱に対して約 10 倍安定になる現象を利用し¹⁸⁾、両者の結合能を検討しようとしたものである。結果を Table 2 に示すが、30°C における HMM Ca-ATPase の失活は一次反応に従うので、その速度定数を比べると、ウサギの HMM Ca-ATPase が最も安定で、キハダマグロのそれは 4 倍、コイのそれは 6 倍ウサギに比べて不安定であつた。これらの速度定数はミオシン Ca-ATPase の値と近似している⁷⁾。また、Acto-HMM Ca-ATPase の 30°C (ウサギの場合は 35°C) の失活も一次反応に従うので、速度定数を求めると、ウサギ、キハダマグロ、コイいずれの場合も HMM の値に比べてそれぞれ約 10 倍安定になつた。したがつて、この結果も上記の粗 HMM がアクチンと良く結合したことを示唆していた。

キハダマグロおよびコイ AM の低温におけるトリプシン消化性 25°C におけるトリプシン消化では、コイの AM は速やかに断片化され、ATPase 活性の高い HMM 標品を得ることが出来なかつた。そこで、コイの AM のトリプシン消化に対する消化温度の影響を検討した。

トリプシンを AM に対して 1/200 量と定め、コイの AM を 5~25°C の間の異なる温度で消化してその粘度減少速度を比較した。結果は Fig. 2 に示す様にトリプシンによる AM の消化速度は 25°C においてかなり速く進むが、20°C 以下では著しく減速し、10°C では 25°C の場合の 1/10 以下になつた。この結果はコイと対照するために行つたキハダマグロの AM の消化においても同じであり、粘度減少の速度定数 (K) は兩者についてほぼ近似していた。

次に、10°C および 25°C における AM のトリプシン消化中の Ca-ATPase の経時変化を測定し、結果を Fig. 3 に示した。それによると、キハダマグロ AM 消化物の Ca-ATPase は、10°C と 25°C のいずれの場合も消化前 (AM である) の比活性 ($0.350 \mu\text{mol Pi}/\text{min} \cdot \text{mg タンパク質}$) よりも高くなつた。一方、コイ AM の消化物の Ca-ATPase は、10°C では消化 2 時間後までは、消化前 (=AM) の比活性 ($0.348 \mu\text{mol Pi}/\text{min} \cdot \text{mg タンパク質}$) の 90% 前後を保つたが高くなるはず、また、25°C では消化に伴つて低下するだけであつた。これらの結果の中、25°C における消化の場合は、AM の消化物から粗 HMM を分離した前述の実験結果 (Table 1) と良く一致するものであつた。

次に、コイ AM を 10°C または 25°C において異なるトリプシン量 (AM に対して 1/200~1/10,000 量) によつて消化し、先ず粘度減少を指標として AM の消化速度を比較し、結果を Fig. 4 に示した。それによると、25°C における消化ではトリプシンが AM の 1/200

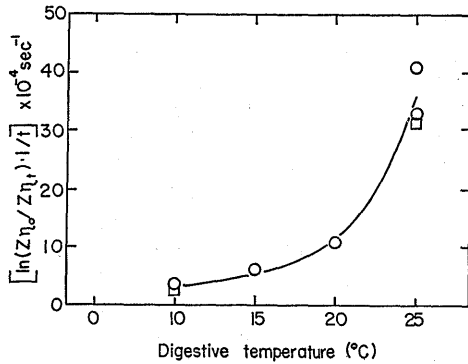


Fig. 2. Effect of temperature on the rate constant of the first phase of the decrease in viscosity of actomyosin during tryptic digestion.

Actomyosin (5 mg/ml, 0.6 M KCl-20 mM Tris-maleate, pH 7.0) was digested at various temperatures by trypsin in an amount of 1/200 relative to actomyosin (AM) for various intervals. The digestion was stopped by adding trypsin inhibitor to 5-fold the amount of trypsin (w/w). The digest was then used for the measurement of viscosity. The viscosity was measured at 10°C with an Ostwald-type viscometer having a flow time of 60-100 seconds for a 2.0 ml of sample solution.

The first order rate constant (K) at the first phase of the viscosity drop was calculated. The K was defined by the equation, $K = (\ln Z\eta_0 - \ln Z\eta_t) / t$, where η_0 and η_t are viscosities before and after digestion time (t second). $Z\eta = \ln \eta / C$, where η and C are the relative viscosity and the protein concentration (mg/ml), respectively.

○, carp; □, yellowfin tuna.

から 1/5,000 に減ざると、消化速度も減少し約 1/16 になった。一方、10°C における消化速度は Fig. 2 中その一部を示したが、トリプシンが AM の 1/200 量の場合でさえも 25°C の消化速度の 1/10 になっているため、トリプシンをさらに減じて大きな変化は認められなかつた。

さらに、トリプシンが AM の 1/200 から 1/1,000 量の間で、10°C における消化速度を詳しく測定した (Fig. 5) が、トリプシンが 1/200 量の速度に比べて 1/1,000 量のそれは 1/3 程度であつて大きな差ではなかつた。図中には、対照としてキハダマダロ AM の消化速度も示されているが、コイ AM の値とほぼ同じであつた。

次に、トリプシンを AM の 1/200, 1/500, および

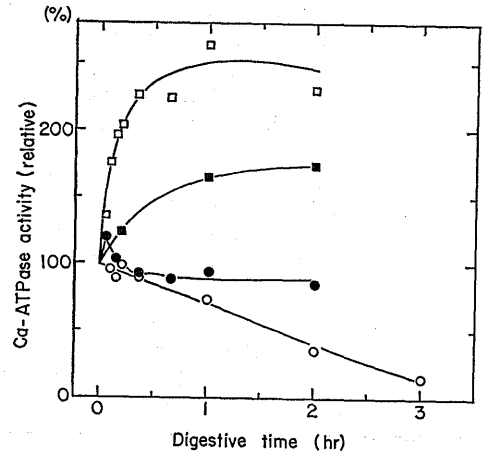


Fig. 3. Changes in Ca-ATPase activity of actomyosins during tryptic digestion at 10°C and 25°C.

The method for tryptic digestion of actomyosins from carp and yellowfin tuna was the same as in Fig. 2, except that the digestion was performed at 10°C (●, ■) and 25°C (○, □) by trypsin in an amount of 1/200 relative to actomyosin (w/w). The condition for ATPase assay was the same as in Table 1.

□, yellowfin tuna (25°C); ■, yellowfin tuna (10°C), ○, carp (25°C); ●, carp (10°C)

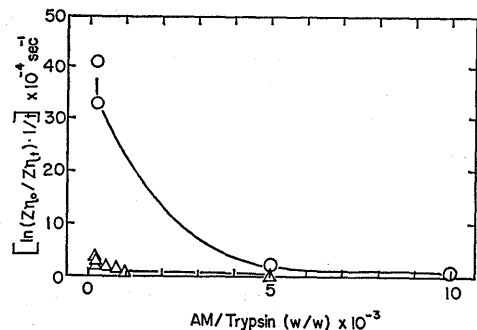


Fig. 4. Effect of trypsin concentration on the rate constant (K) of the first phase of the decrease in viscosity of carp actomyosin during tryptic digestion.

The method for tryptic digestion was the same as in the legend of Fig. 2, except that the digestion was performed at 10°C (Δ) and 25°C (\circ) at various ratios of trypsin to actomyosin (w/w). The measurement of viscosity and the calculation of rate constant (K) were also the same as in the legend of Fig. 2. The concentration of trypsin was expressed as weight ratio of actomyosin to trypsin.

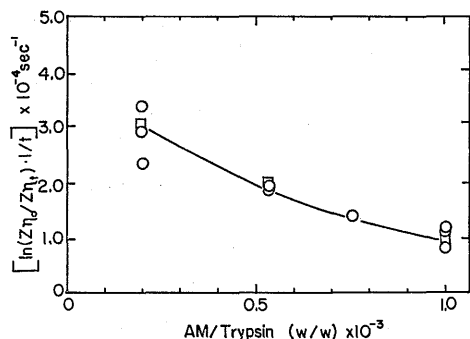


Fig. 5. Effect of trypsin concentration on the rate constant of the first phase of the decrease in viscosity of actomyosins during tryptic digestion at 10°C.

The method for tryptic digestion was the same as in the legend of Fig. 2, except that the digestion was performed at 10°C at various concentrations of trypsin. The concentration of trypsin was expressed as weight ratio of actomyosin to trypsin. The measurement of viscosity and the calculation of rate constant (K) were also the same as in the legend of Fig. 2.

□, yellowfin tuna; ○, carp

1/1,000 量とし、10°C で消化したとき、AM 消化物の Ca-ATPase 活性の経時変化を測定した結果を Fig. 6 (A, B) に示した。これによると、キハダマグロ AM 消化物の Ca-ATPase 比活性 (A) は、トリプシン量の多少に関係なく AM の値より高くなり、少なくとも 2 時間後までは低下することはなかった。

一方、コイ AM 消化物の Ca-ATPase 比活性 (B) はトリプシンが 1/200 量の場合だけは AM の値の 90% 前後にとどまったが、1/500 と 1/1,000 の場合はやや高くなり消化 2 時間後までは 100% 以上を保っていた。

以上の結果から、コイ AM の ATPase 活性中心部位は、キハダマグロのそれに比べて、トリプシンによる消化を受け易いことは明らかであり、また、より低温で低濃度のトリプシンで消化すると、コイ AM からでも高い ATPase 活性をもつ分子断片が得られる可能性が示唆された。そこで、この示唆にしたがって次の実験を行った。

コイ HMM の精製とその性質 コイの AM を 10°C でトリプシン消化し、それから HMM を分離すると同時に精製を行った。すなわち、AM (約 15 mg/ml, 0.6 M KCl-20 mM Tris-maleate, pH 7.0) の一定量を 10°C に保ち、その 1/200 量のトリプシンを加え 10 分間消化した後、5 倍量のトリプシンインヒビターを加えて消化を止め、ただちに 12 倍容量の 20 mM Tris-maleate,

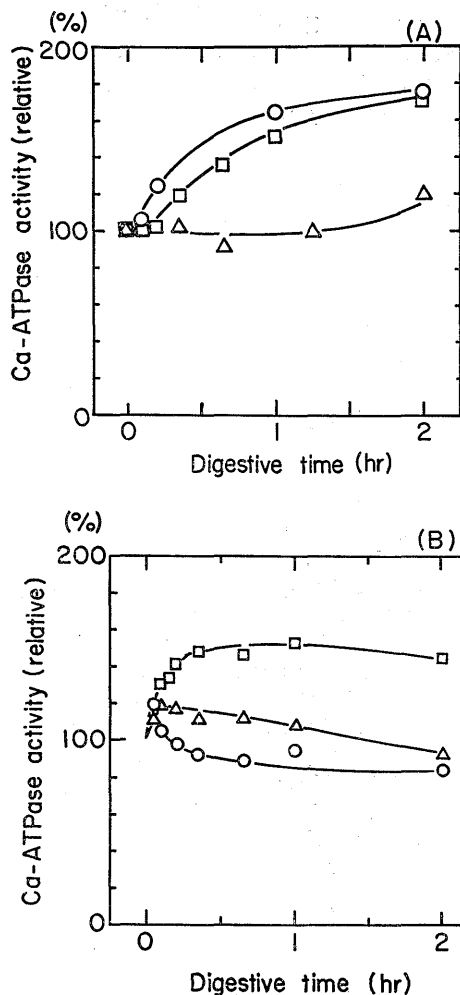


Fig. 6. Changes in Ca-ATPase activity of actomyosins during tryptic digestion at 10°C.

The method for tryptic digestion of actomyosins from yellowfin tuna (A) and carp (B) was the same as in Fig. 2, except that the digestion was performed at 10°C by trypsin in an amount of 1/200 (○), 1/500 (□ in A, △ in B), and 1/1,000 (△ in A, □ in A) relative to actomyosin (w/w). The condition for ATPase assay was the same as in Table 1.

pH 7.0 溶液に対して透析し KCl 濃度を 50 mM に調整した。次に終濃度で 5 mM の MgCl₂ と 10 mM の ATP を添加し、80,000×g, 1 時間遠心分離してアクチンを除き、ここで得た上清液の 43~55% 飽和 (NH₄)₂SO₄ 画分を集め、水冷した 20 mM Tris-HCl, pH 7.5 に対して透析した後、100,000×g で 1 時間遠心分離して上清に精製した HMM を集めた。収量は AM に対して 22% 前後であった。

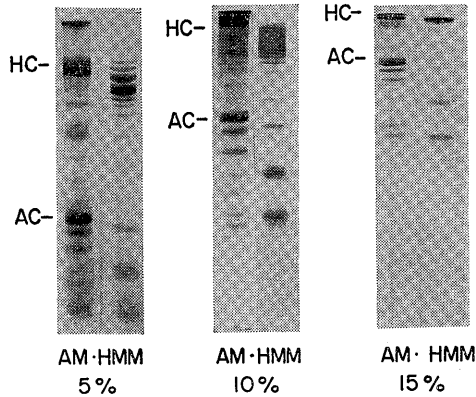


Fig. 7. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of HMM from carp.

The method for preparation of HMM from carp actomyosin (AM) by tryptic digestion was the same as in the legend of Table 3. SDS gels containing 5, 10, and 15% polyacrylamide of 10 cm length and 0.5 cm diameter were prepared. Electrophoresis was carried out in 0.1 M sodium phosphate (pH 7.0) containing 0.1% SDS at constant current of 8 mA per gel for 4 hours. Approximately 50 μ g of HMM and AM were applied. Coomassie Brilliant Blue was used to stain the protein band. HC and AC indicated the bands corresponding to myosin heavy chain and actin, respectively.

この精製 HMM 標品の SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動の結果を Fig. 7 に示した。ここにはアクリルアミド濃度が 5, 10 および 15% のゲルを使用した泳動図を表わしたが、5% ゲルによると、AM の heavy chain に比べて HMM の heavy chain はやや小分子の断片であることが明らかであり、また、10 および 15% ゲル上では、AM 中に見られた 3 種の light chain (ミオシン中のそれも同種であつた²⁰⁾) の中、分子量が一番小さい light chain が HMM 標品から消失している事実が知られた。一方、ウサギやカツオの HMM には 3 種の light chain が含まれていることがすでに報じられているので²¹⁾、コイのミオシン中の light chain の 1 種がトリプシンによつて消化され易い事実は特徴的である。

コイの精製 HMM の ATPase 活性を Table 3 に示した。これによると、コイ HMM ATPase 比活性は AM のそれに比べると明らかに高くなつており、Ca-ATPase では約 2 倍、EDTA-ATPase では 1.4 倍であつた。また、HMM Mg-ATPase のウサギ骨格筋 F アクチンによる活性化をアクチン量を変えて測定し、Mg-ATPase 比活性の逆数値をアクチン濃度の逆数値に対し

Table 3. ATPase activity of carp purified HMM.

HMM was prepared from carp actomyosin (13.9 mg/ml, 0.6 M KCl-20 mM Tris-HCl, pH 7.5) by tryptic digestion at 10°C. The time of digestion was 10 minutes and trypsin: actomyosin ratio was 1:200 (w/w). The reaction was stopped by adding 5-fold of trypsin inhibitor (w/w). The purification of HMM was carried out by dialysis against 12 times its volume of 20 mM Tris-maleate, pH 7.0 at 2°C. After addition of 5 mM MgCl₂ and 10 mM ATP in a final concentration, the dialyate was centrifuged at 80,000 \times g for 1 h. The supernatant was then salted-out with 43-55% saturation of (NH₄)₂SO₄ to eliminate actin. The precipitate was dialyzed against 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) at 2°C overnight. The dialyate was then centrifuged at 100,000 \times g for 1 h to collect HMM in the supernatant. The yield of purified HMM was 22% when the original actomyosin was taken as 100.

The ATPase assay was carried out at 25°C in a reaction medium containing 25 mM Tris-maleate (pH 7.0), 1 mM ATP, 0.1 mg/ml of HMM or 0.3 mg/ml of actomyosin, 0.06 M KCl or 0.5 M KCl and 5 mM CaCl₂ for Ca-ATPase activity or 5 mM EDTA and 1 M KCl for EDTA-ATPase activity.

	Ca-ATPase (μ mol Pi/min·mg of protein)		EDTA-ATPase
	KCl	60 mM	1.0 M
HMM	0.708	0.250-0.450	1.272
Actomyosin (AM)	0.426	0.115-0.142	0.901
Activity ratio HMM/AM (%)	170	220-320	140

てプロットすると (EISENBERG and MOOS プロットとよばれる²¹⁾), Fig. 8 に示したような直線関係となつた。これから求めた V_{max} は 4.0~5.0 μ mol Pi/min·mg タンパク質、アクチンとの親和力は、アクチンの分子量を 43,000 とすると、30 μ M となつた。これらの値はカツオ HMM について別に著者が報じた値²²⁾とほぼ同じである。

このコイ HMM とウサギ F アクチンを 2:1 の重量比で混合し、構成した Acto-HMM Mg-ATPase 活性を指標として Ca 感受性を測定した²³⁾。それによると、Acto-HMM だけでは Ca 感受性を示さなかつたが (2%)、これにコイの活性トロポミオシン (NTM: native tropomyosin) を加えると Ca 感受性を示すようになり (88%)、アクチンに連結した Ca 制御系が機能する可能

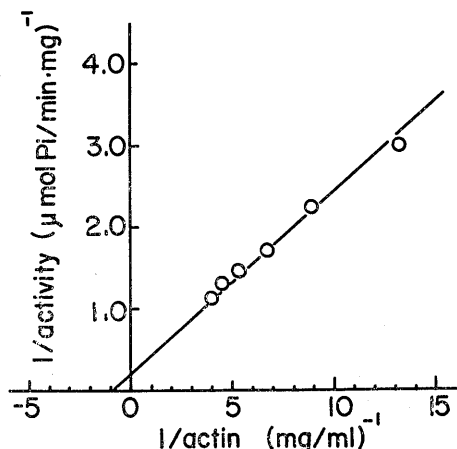


Fig. 8. Double reciprocal plot of the Mg-ATPase activity of carp HMM against the concentration of rabbit F-actin.

The ATPase assay was carried out at 25°C in a reaction medium containing 30 mM KCl, 1 mM MgCl_2 , 25 mM Tris-maleate (pH 7.0), 1 mM ATP, 0.1 mg/ml of carp HMM and various amounts of rabbit F-actin. The V_{max} value was approximately 4.0–5.0 $\mu\text{mol Pi/min}\cdot\text{mg}$ of HMM, whereas the K_a value was 30 μM .

The method for preparation of HMM from carp actomyosin by tryptic digestion was the same as in the legend of Table 3.

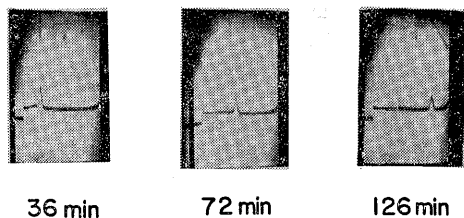


Fig. 9. Ultracentrifugal sedimentation patterns of carp HMM.

Sedimentation was conducted at 59,700 rpm and at 10°C (bar angle=60°). The solvent used was 0.05 M KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5). Protein concentration was 4.3 mg/ml. Photographs were taken at 36, 72, and 126 min after reaching the top speed.

The method for preparation of HMM from carp actomyosin by tryptic digestion was the same as in the legend of Table 3.

性を示した。

精製したコイ HMM の均質性を検討するため、超速心沈降分析を行った。Fig. 9 に示した沈降図型によると、コイ HMM はほぼ均質な組成を示したが、やや遅

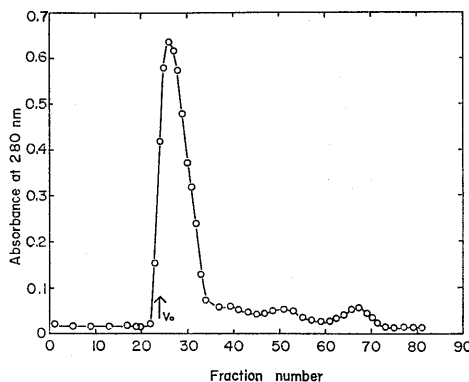


Fig. 10. Elution profile of carp HMM in Sephadex G-200 gel filtration.

Carp HMM (42.3 mg) was applied to a column (2.2×80 cm) equilibrated with 0.05 M KCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) and eluted with the same solution at a flow rate of 15 ml/h. Fractions of 4.75 ml were collected. The arrow indicates the void volume.

The method for preparation of carp HMM was the same as in the legend of Table 3.

れて沈降する微量成分の存在が認められた。この微量成分は沈降時間 120 分後には拡散して認めにくくなる性質のものである。主要成分ピークの沈降定数 ($S_{20,w}$) は 6.52 S (4.3 mg/ml タンパク質) であつて、従来の報告値と近似している^{3,22)}。また、本 HMM の Sephadex G-200 によるゲル濾過による溶出図を Fig. 10 に示した。それによると、主要成分は void volume に現われており他の成分は非常に少なかった。なお、図示しないが、ゲル濾過によつて HMM のサブユニット組成は変化しないことが、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動図から確かめられた。

以上の結果から、本実験で調製したコイの精製 HMM は、分子量のやや大きい微量成分を含んでいるが、その生化学的性質に関してはすでに良く知られているウサギ骨格筋の HMM の諸性質と非常に良く類似しており¹⁹⁾、その点から良い標品であると判断した。

考 察

キハダマグロとコイの AM のトリプシンによる消化速度を粘度を指標として比べると、消化温度を 25°C と 10°C のいずれで行つた場合でも、また、異なるトリプシン量で消化した場合でも、消化条件を同じにして比べるとかぎり両 AM の間に差が見られなかつた。(他の魚種の AM と比べれば、おそらく異なると思われる⁶⁾)。一方、Ca-ATPase 活性を指標として比べると、AM の消

化性はキハダマグロとコイでかなり異なっており、コイ AM の方がその活性の低下が明らかに速く、これは粘度を指標とした結果とは一致しなかつた。しかし、本研究のその他の実験結果、諸性質の変化も考慮すると、AM から HMM を生成する最適の消化条件を見出すためには、粘性よりも ATPase 活性を指標とする方が良いように思われる。

トリプシン消化による AM の粘度低下速度がほとんど同じであるのに、ATPase 活性の変化曲線がキハダマグロとコイの間で異なる事実の原因を究明するために、トリプシン消化物の SDS ゲル電気泳動図を経時的に検討した。その結果は図示しないが、たとえば、25°C において 1/200 量のトリプシンで消化するとき、コイ AM の heavy chain は消化し易く小分子の断片になつてゆくが (10% アクリルアミドゲル上で認知出来る変化である)、キハダマグロの AM の heavy chain は同じ消化条件によつてコイの場合のような断片化を起さなかつた。なお、コイ AM の heavy chain の断片化は 15°C 以下の消化では非常に遅くなる。これらの結果から、コイとキハダマグロの AM のトリプシンによる断片化は、ポリペプチド鎖上の互いにやや異なる部位で起り (アクチンはトリプシン感受性が低い^{8,9)} のでミオシン分子上の部位と考えられる)、かつ、切断箇所の数も異なるように推定される。すなわち、コイの AM はトリプシンによつて攻撃を受け易いような緩い高次構造をしていることを推定させる。

キハダマグロの AM をトリプシン消化するとき、消化物の Ca-ATPase 比活性 (低塩濃度すなわち 0.06 M KCl での測定値) が、見かけ上著しく高くなる事実を先に述べた。この原因は AM が本来塩溶性であつて水不溶性であるのに対して、HMM が水溶性であることを考えると、ATPase 活性を測定する反応条件、特に塩濃度が関係しているように推定される。事実、最近になつて、著者らがカツオのミオシンと HMM の ATPase 活性と KCl 濃度の関係を比較した結果によると²²⁾、低い KCl 濃度で反応させる場合よりも高い KCl 濃度で反応させて求めた活性、すなわちミオシン 1 モル当りの活性と HMM 1 モル当りの活性は近似することを知つた。しかし、本実験で使用した AM (natural actomyosin) のタンパク質組成は、制御系タンパク質を含むなど複雑であるから HMM の場合との正確な比較は困難であろう。

一般に、寒帯産の魚類の AM の構造はコイのそれよりもさらに脆弱で不安定であることは既に報じられており^{6-7,24)}、これら AM から HMM を分離することは極めて困難であろうと予想される。したがつて、これらの AM については、さらに詳細なトリプシン消化の条件

検討が必要である。

本実験に供したキハダマグロは、宮城県水産物加工研究所、佐藤文三所長の御好意によつて分与を受けたので、ここに感謝します。

また、本研究は文部省科学研究費補助金によつて行われたので、記して深謝致します。

文 献

- 1) J. J. CONNELL: *Biochem. J.*, **80**, 503-509 (1961).
- 2) 高士令二・室塚剛志・新井健一: 日水誌, **40**, 1033-1041 (1974).
- 3) T. TSUCHIYA and J. J. MATSUMOTO: *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **41**, 1319-1326 (1975).
- 4) A. HASNAIN, I. KIMURA, K. ARAI, and T. YASUI: *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **44**, 143-147 (1978).
- 5) A. HASNAIN, H. TAMURA, and K. ARAI: *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **42**, 783-791 (1976).
- 6) 新井健一・川村久美子・林 千恵子: 日水誌, **39**, 1077-1085 (1973).
- 7) K. ARAI, A. HASNAIN, and Y. TAKANO: *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **42**, 687-695 (1976).
- 8) E. MIHALYI and A. G. SZENT-GYÖRGYI: *J. Biol. Chem.*, **201**, 189-196 (1953).
- 9) E. MIHALYI: *J. Biol. Chem.*, **201**, 197-209 (1953).
- 10) S. LOWEY and C. COHEN: *J. Mol. Biol.*, **4**, 293-308 (1962).
- 11) 高士令二・新井健一・斉藤恒行: 日水誌, **36**, 169-172 (1970).
- 12) J. A. SPUDICH and S. OSBORN: *J. Biol. Chem.*, **246**, 4866-4871 (1971).
- 13) 高橋泰常: 生化学の領域における光電比色法, 各論 2 (関根隆光・他編) 南江堂, 東京, 1962, pp. 13-14.
- 14) K. WEBER and M. OSBORN: *J. Biol. Chem.*, **244**, 4406-4412 (1969).
- 15) F. J. KEZDY and E. T. KAISER: in "Methods in Enzymology" (ed. by G. E. PERLMANN and L. LEONARD) 19, Academic Press, New York, 1970, p. 37.
- 16) A. G. GORNALL, S. S. BARDAWILL, and M. M. DAVID: *J. Biol. Chem.*, **177**, 751-766 (1949).
- 17) H. PORTZEHL and H. H. WEBER: in "Advances in Protein Chemistry" (ed. by M. L. ANSON, K. BAILEY, and T. T. EDSALL) 7, Academic Press, New York, 1952, p. 207.
- 18) 室塚剛志・新井健一: 日水誌, **42**, 65-70 (1976).
- 19) 八木康一: 生化学実験講座—15, 筋肉 (日本生化学編) 東京化学同人, 東京, 1975, pp. 1-34.
- 20) 高士令二・室塚剛志・新井健一: 日水誌, **40**, 1063-1069 (1974).

- 21) E. EISENBERG and C. MOOS: *Biochemistry*, **7**, 1481-1489 (1968).
- 22) L. KIMURA, K. ARAI, and S. WATANABE: *J. Biochem.*, **86**, 1629-1638 (1979).
- 23) K. KONNO, K. ARAI, and S. WATANABE: *J. Biochem.*, **82**, 931-938 (1977).
- 24) 矢部和夫・中村一治・鈴木美恵子・伊藤裕三: 日水誌, **44**, 1345-1350 (1978).