

コイ変性ミオシンのカルパイン分解と生成断片の性質

誌名	日本水産學會誌
ISSN	00215392
著者	村元, 学 関, 伸夫
巻/号	54巻6号
掲載ページ	p. 1055-1061
発行年月	1988年6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



コイ変性ミオシンのカルパイン分解と生成断片の性質

村元 学, 関 伸 夫

(1987年12月7日受付)

Fragmentation of the Denatured Carp Myosin by Calpain
and Some Properties of the FragmentsManabu Muramoto*¹ and Nobuo Seki*¹

When carp myosin was denatured, its heavy chain was cleaved by calpain to give a major fragment of Mr=150,000 (150 k fragment). The same result was obtained from the denatured myosin which had been labeled at SH₁ group of the heavy chain with a fluorescent probe 1,5 IAEDANS. The following results indicated that the 150 k fragment corresponds to a major part of the heavy chain of myosin rod segments: (1) the 150 k fragment was insoluble at a low ionic strength; (2) it was not released by calpain digestion of heavy meromyosin; (3) it was larger in size than that of the rod prepared by α -chymotryptic digestion; (4) it did not contain the SH₁ group.

The remainder of the heavy chain including the SH₁ group was further digested by calpain to lower molecular weight-fragments.

On gel filtration at a high ionic strength where the denatured myosin aggregates and the 150 k fragment were fully soluble, it was found that they were eluted together as an indistinguishable single peak, suggesting that they were strongly associated together by non-covalent forces.

The significance of the 150 k fragment in relation to changes in meat proteins during processing or storage was discussed.

筋肉に存在する内因性プロテアーゼであるカルパイン (EC 3.4.22.17) は高塩濃度下 (>0.2 M NaCl) において、コイのミオシンを heavy meromyosin (HMM) 様と light meromyosin (LMM) 様の断片に限定分解する。^{1,2)} この HMM 様断片はもとのミオシンの ATPase 活性を完全に保持している水溶性タンパク質であり、SDS-PAGE^{*)} によると、Mr=170,000 (170 k) を示すタンパク質バンドと3本の軽鎖が検出される。更に、LMM 様断片は Mr=43,000 (43 k) のタンパク質バンドとして泳動されることを既に明らかにした。しかし、低塩濃度下においては、カルパインはミオシンにほとんど作用しない。一方、カルパインは変性ミオシンにたいしては容易に作用し、変性の条件 (例えば加熱あるいは低 pH) とその程度によらず、SDS-PAGE で Mr=150,000 (150 k) を示す成分を主として生成し、上述の 170 k 成分と 43 k 成分を殆ど生成しないことが知られている。^{3,4)} しかし 150 k 成分がミオシン分子のどの部位に由来しているかすなわち変性ミオシンに対するカルパインの作用部位に

ついてはまだ明らかにされていない。なお、魚肉を貯蔵した場合⁵⁾ や、かまぼこ製造時にも、それらのタンパク質を SDS-PAGE で分析した結果によると 150 k 成分と易動度の同じ成分が検出されるので、この成分との関連についても興味を持たれる。そこで本研究では 150 k 成分の由来を明らかにし、その存在様式についての検討を行った。

実験方法

試薬 1,5 IAEDANS と α -キモトリプシン (EC 3.4.21.1) は Sigma 製をもちいた。

カルパインおよびミオシンの調製 コイ背筋肉からカルパイン (II 型) とミオシンをいずれも坂本らの報告¹⁾ に従って調製した。なお、150 k 成分は未変性ミオシンではなく変性ミオシンのカルパイン処理によって生成されるので、^{3,4)} ミオシンを 0.1 M NaCl-20 mM Tris-acetate (pH 7.0) 中で 29°C, 30 分間加温して変性させたものを基質として用いた (以下変性ミオシンと呼ぶ)。変性

*¹ 北海道大学水産学部食品学科 (Department of Food Science, Faculty of Fisheries, Hokkaido University, Hakodate 041, Japan).

*² 省略記号: SDS, sodium dodecyl sulfate; SDS-PAGE, SDS-polyacrylamide gel electrophoresis; 1,5 IAEDANS, *N*-iodoacetyl-*N'*-(5-sulfo-1-naphthyl) ethylendiamine; EGTA, ethyleneglycol-bis(2-amino-ethylether)tetraacetic acid; EDTA, ethylenediamine tetraacetic acid.

ミオシンは Ca-ATPase 活性が約 30% 残存しており, 0.6 M NaCl (pH 7.0) に完全に可溶化された。

カルパイン活性の測定 カルパインのカゼイン分解活性は坂本ら⁸⁾と同じ方法で測定した。すなわち 5 mg/ml のカゼイン, 5 mM CaCl₂, 10 mM 2-メルカプトエタノールおよび 0.1 M Tris-acetate (pH 7.0) からなる反応混液にカルパインを添加して全量を 2 ml とし, 25°C で反応を行った。反応は 1 ml の 5% 過塩素酸を添加して停止した。これを 1,000×g で 20 分間遠心分離し, 得られた上清液の吸光値を 280 nm で測定した。この吸光値を 1 時間当り 1.0 増加させる活性を 1 unit とした。なお本報告中では α-キモトリプシンの活性もカルパインと同じ方法によりカゼインを基質にして測定し, phenylmethyl sulfonyl fluoride を終濃度で 0.4 mM 添加して反応を停止した。活性は unit で表示したが α-キモトリプシン 1 mg は 218 unit に相当していた。

ミオシンまたは変性ミオシンを基質とした場合は, 4 μM ミオシン, 0.05 M NaCl, 5 mM CaCl₂, 5 mM 2-メルカプトエタノールおよび 20 mM Tris-acetate (pH 7.0) からなる反応混液にカルパインを添加して反応を開始した。反応は 20°C で行い, 終濃度 20 mM EGTA を添加して停止した。

ATPase 活性の測定 ミオシンの Ca-ATPase 活性の測定は常法により 1 mM ATP, 5 mM CaCl₂, 0.5 M KCl, 20 mM Tris-maleate (pH 7.0), および 300 μg/ml ミオシンからなる反応混液を用い, 25°C で測定を行った。比活性は生成する無機リン酸量を定量し⁶⁾ μmol Pi·mg⁻¹·min⁻¹ で表した。

SDS-PAGE 試料を 2% SDS-8 M 尿素 -20 mM Tris-HCl (pH 8.0) -2% 2-メルカプトエタノールに可溶化後, 100°C で 1 分間加熱して泳動用試料とした。これを Weber および Osborn⁷⁾の方法または Laemmli⁹⁾の方法によって SDS-PAGE をおこなった。染色は Coomassie Brilliant Blue R-250 を用いた。ミオシン重鎖はデントメーターによって定量した。²⁾ また蛍光バンドは, 紫外線ランプ (ウルトラ・バイオレット社製 TM-20) の照射によって検出した。

ミオシンの蛍光色素標識 ミオシンの SH₁ (fast-reacting thiol) 基の 1,5 IAEDANS 修飾は Takashi¹⁰⁾らの方法に準じて次のように行った。すなわち, 8 μM ミオシン -0.5 M NaCl-20 mM Tris-acetate (pH 7.0) 溶液に 160 μM 1,5 IAEDANS を加え 0°C で 6 時間, 暗所でインキュベートした。2-メルカプトエタノールを終濃度 1% になるように添加して反応を停止させた後, 0.1 M NaCl-20 mM Tris-acetate (pH 7.0) に対して透析した。タンパク質に結合した 1,5 IAEDANS の量は 340 nm の吸光値 (吸光係数 6,100 cm⁻¹·M⁻¹) から求めた。¹⁰⁾

ミオシンロッドの調製 Weed および Pope¹¹⁾の方法に準じて, コイミオシン 1 mg/ml を α-キモトリプシン 0.1 unit, 0.05 M NaCl, 20 mM Tris-acetate (pH 7.0) 溶液中で 20°C, 20 分間インキュベートした。消化したミオシンをエタノールで処理したのちロッドを 0.5 M NaCl で抽出した。

ゲル濾過 Bio-Gel A-50 m (Bio-Rad 製) を 0.5 M NaCl-20 mM Tris-HCl (pH 7.5) で緩衝化し, 直径 2.6 cm×90 cm のカラムに充填した。6.4 mg/ml のミオシンまたはカルパイン処理したミオシンを 0.6 M NaCl-5 mM CaCl₂-20 mM Tris-acetate (pH 7.0) -10 mM 2-メルカプトエタノール -10 mM EDTA 溶液に可溶化し, ゲルカラムに添加し, 流速 12 ml/h で緩衝化に用いたのと同じ溶液で溶出した。ゲル濾過の操作はすべて 4°C で行った。

実験結果

加熱変性ミオシンのカルパイン処理による可溶成分の生成 変性ミオシンを 0.05 M NaCl 中でカルパイン処理し, EGTA を添加して反応を停止した後, 100,000×g で 60 分間遠心分離し, 上清に遊離されるタンパク質量を測定し, Fig. 1 に示した。また反応液中のミオシン重鎖と 150 k 成分の変化を SDS-PAGE により検討した。

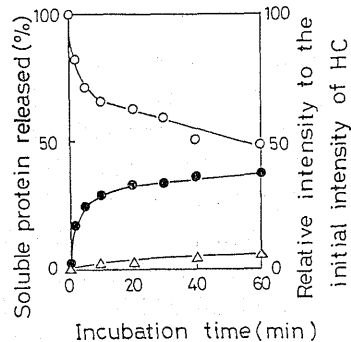


Fig. 1. Protein fragments released from denatured myosin after incubation with calpain.

Carp myosin (4 μM) was preincubated at 29°C for 30 min to induce thermal denaturation, and then incubated with calpain (0.2 unit/ml) at 20°C in the medium containing 0.05 M NaCl, 5 mM CaCl₂, 5 mM 2-mercaptoethanol, and 20 mM Tris-acetate (pH 7.0). After termination with addition of 20 mM EGTA, the reaction mixture was centrifuged at 100,000×g for 60 min; the protein concentration of the supernatant was measured (△). Changes in myosin heavy chain (○) and 150 k component (●) during the incubation were measured by SDS-PAGE and quantitative densitometry. HC, myosin heavy chain.

これらの結果によると 60 分間の反応で、重鎖の 50% が消失したが、可溶化されたタンパク質量は全タンパク質量のわずか 4% 程度と微量であった。さらに、SDS-PAGE によると上清液中には重鎖と 150 k 成分は全く検出されず、これらは沈殿部に存在していた。

ミオシンロッドとの比較 上述の結果から、150 k 成分はよく知られているミオシンの不溶性断片であるロッドと類似しているように推測された。そこで、Weed および Pope¹¹⁾の方法に準じてコイミオシンを α -キモトリプシンで消化し、エタノール処理後、0.6 M NaCl で抽出してロッドを得た。SDS-PAGE によって 150 k 成分とロッドを比較すると、Fig. 2 に示すように、150 k 成分はロッドよりも多少易動度が小さいことが示された。

一方、変性ミオシンをロッドの調製法と全く同様に α -キモトリプシンで消化したところ、エタノール処理後には 0.6 M NaCl で抽出されるタンパクはほとんどなく、ロッドは得られなかった。そこで変性ミオシンの α -キモトリプシン消化物を SDS-PAGE で分析したところ、Fig. 3 に示す結果が得られた。これによると、変性ミオシンからロッドはほとんど生成せず、カルパインと同様に主として 150 k 成分が得られることが明らかになった。以上の結果から、150 k 成分とキモトリプシン消化で得られるロッドは異なっていることが確認された。

標識ミオシンのカルパイン処理 150 k 成分がミオシン分子のどの部分に相当しているかを明らかにするために、ミオシン分子に標識をつけて調べた。Takashi ら⁹⁾

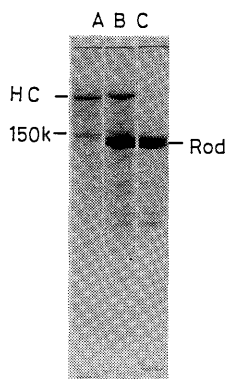


Fig. 2. Comparison of the mobilities of 150 k component and myosin rod on SDS-PAGE.

SDS-PAGE was carried out on 5% acrylamide gels.

A, denatured myosin incubated with calpain as shown in Fig. 1

B, A+C

C, myosin rod prepared from carp myosin according to the method of Weed and Pope.¹¹⁾ HC, myosin heavy chain; 150 k, Mr=150,000 component.

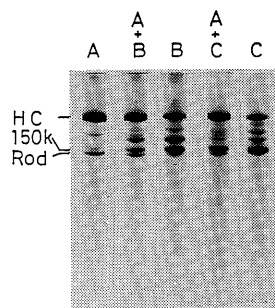


Fig. 3. SDS-PAGE of carp myosin and its denatured myosin digested by α -chymotrypsin.

Myosin or denatured myosin (each 4 μ M) was digested with α -chymotrypsin (0.1 unit/ml) in the medium containing 0.05 M NaCl, 10 mM 2-mercaptoethanol, and 20 mM Tris-acetate (pH 7.0) at 20°C for 20 min. The digestion was terminated by the addition of phenylmethyl sulfonyl fluoride (0.4 mM). SDS-PAGE was carried out on 5% acrylamide gels.

A, myosin digested by α -chymotrypsin.

B, denatured myosin digested by α -chymotrypsin.

C, denatured myosin incubated with calpain.

によると、蛍光色素 1,5 IAEDANS はウサギ骨格筋のミオシンの SH₁ 基を特異的に修飾できることが知られている。コイミオシンにも SH₁ 基が存在するので、^{12,13)} 彼らの⁹⁾ 方法に準じてコイミオシンの修飾を試みた。SH₁ 基が修飾されると、Ca-ATPase 活性の上昇をもたらすので、コイミオシンについてこの点について検討した。Fig. 4 に示すごとく、Ca-ATPase 活性は 6 時間の修飾で約 4 倍に増大した。この時の活性レベルは反応時間を 50 時間まで延長しても、また試薬の添加量を 2 倍に増加した場合もこれ以上には増大しなかったので最大値に達したと判定した。

一方、1,5 IAEDANS のミオシンに対する結合量を調べると (Fig. 5), ミオシン重鎖当たり、1 モルの 1,5 IAEDANS が急速に取り込まれることが示されたので、SH₁ 基が特異的に修飾されていることが示唆された。試薬の結合量は 3 時間の修飾で重鎖当たり 1 モルを越え、6 時間後には約 1.3 モルとなった。試薬が重鎖当たり 1 モルに達するよりも Ca-ATPase 活性が最大値に達するほうが少し遅いのは、ミオシン軽鎖の一部と微量混入しているタンパク質にこの色素が少量結合するためと考えられた (Fig. 7 を参照) ので、修飾は 6 時間行うことにした。

このようにして修飾したミオシンを 0.5 M NaCl 中でカルパイン処理して分解生成物を SDS-PAGE で検討した。この条件下ではミオシンから 170 k 成分 (HMM

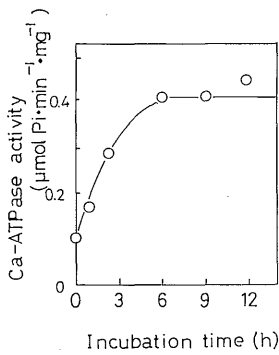


Fig. 4. Effect of labeling on the Ca-ATPase of myosin.

Carp myosin (8 μM) was incubated with 1,5 IAEDANS (160 μM) in 0.5 M NaCl-20 mM Tris-acetate (pH 7.0) at 0°C in the dark. Ca-ATPase activity was measured at 25°C in 0.5 M KCl, 1 mM ATP, 5 mM CaCl₂, and 20 mM Tris-maleate (pH 7.0).

様断片に相当)と 43 k 成分 (LMM 様断片) が主として生成した (Fig. 6, A, C)。この結果は未修飾ミオシンのカルパイン分解と定性的に同じであったが、150 k 成分の生成量は多少多かった。ゲルに紫外線を照射すると 170 k 成分に蛍光が検出されたが、43 k 成分には検出さ

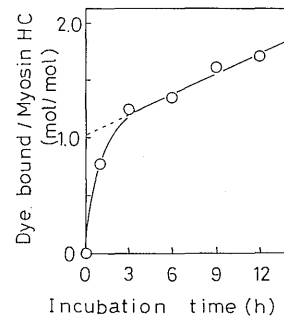


Fig. 5. Kinetics of labeling of myosin.

Carp myosin labeled with 1,5 IAEDANS as shown in Fig. 4 was dialyzed and the amount of bound dye was measured by absorbance at 340 nm.

れなかった。以上の結果から 1,5 IAEDANS はミオシン重鎖の SH₁ 基に結合していることが確かめられた。そこで修飾したミオシンを変性した後、これをカルパインで処理したところ、150 k 成分が生成した (Fig. 6, B)。この結果も未修飾変性ミオシンの場合と同じであった。しかし、紫外線照射によると、この成分からは蛍光が検出されなかった (Fig. 6, D)。以上の結果から、150 k 成分は SH₁ 基を含まないミオシン重鎖の断片であること

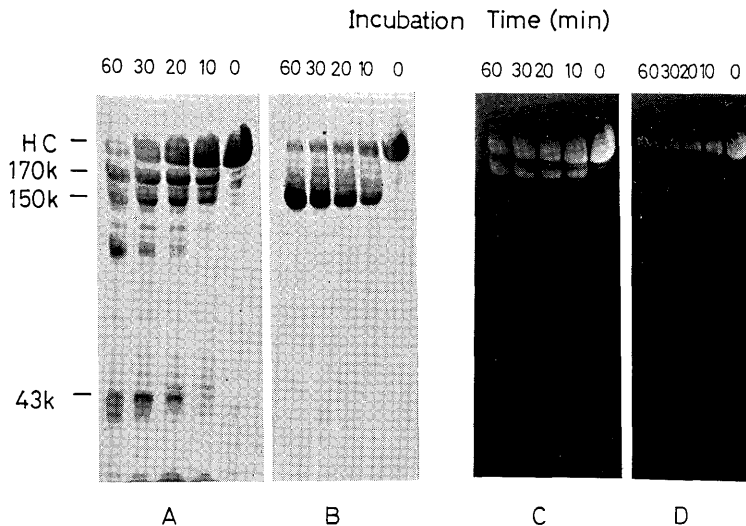


Fig. 6. SDS-polyacrylamide gel electrophoretic pattern of 1,5 IAEDANS-labeled myosin digested by calpain for different time intervals.

Carp myosin was labeled with 1,5 IAEDANS for 6 h under the same conditions as shown in Fig. 4.

(A, C) labeled myosin digested by calpain in 0.5 M NaCl, 5 mM CaCl₂, and 20 mM Tris-acetate (pH 7.0); (B, D) labeled and denatured myosin digested by calpain in 0.05 M NaCl, 5 mM CaCl₂ and 20 mM Tris-acetate (pH 7.0); (A, B) Coomassie Brilliant Blue-stained protein bands; (C, D) fluorescence of 1,5 IAEDANS incorporated in SH₁ group detected by illuminating a gel with an UV lamp. Each sample (60 μg/lane) was applied on SDS-PAGE using 7.5% acrylamide gel.

が推定された。

SDS-PAGE によると、ミオシン重鎖は $M_r=200,000$ (200 k) を示すので、150 k 断片の残りの部分は蛍光標識を有する約 50 k の成分が検出されるはずであるが Fig. 6, B, D にはこれに相当するバンドは示されていないし、また蛍光バンドの存在も明らかでない。そこで、同じ試

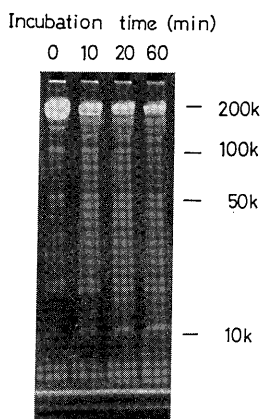


Fig. 7. SDS-polyacrylamide gel electrophoretic pattern of 1,5 IAEDANS-labeled and denatured myosin digested with calpain. The same sample as shown in Fig. 6 (B, D) with a large amount (100 $\mu\text{g}/\text{lane}$) was applied on SDS-PAGE using 10% acrylamide gel. Fluorescence of 1,5 IAEDANS was detected by illuminating a gel with an UV lamp.

料をタンパク質量を多量にして、10% アクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE に供した後、紫外ランプで蛍光を検出した (Fig. 7)。この結果、カルパイン処理により $M_r=10,000\sim 50,000$ の間に蛍光を有する多数のバンドが検出された。ミオシン重鎖の 150 k 断片を除いた残部は、150 k 成分が S-1 (Subfragment-1) のサイズ¹¹⁾より大きいこと、並びに SH_1 基が S-1 の C 末端近傍に存在する¹²⁾ (Fig. 9 を参照) ことから、S-1 の主部分と推定されるので、S-1 部分はカルパインにより多くの小断片に分解されることが明らかになった。なお、カルパインのかわりに α -キモトリプシンを用いて変性ミオシンを消化した場合にも同様の結果が得られた (図示していない)。

カルパイン処理したミオシンの存在様式 ミオシンは高塩濃度下 (0.5 M NaCl) では単量体 (分子量 480,000) として存在することが良く知られており、0.5 M NaCl 中でコイミオシンをゲル濾過に供すると、Fig. 8 の Δ で示したように分画番号 70 付近にピークが得られた。一方、ミオシンを 29°C で 30 分間加熱変性して同条件下でゲル濾過に供すると、Fig. 8 の \circ で示すようにピークは V_0 の直後に得られ、ミオシンが凝集していることが示された。この変性ミオシンを 0.05 M NaCl 中でカルパインで処理した後、同様にゲル濾過に供したところ、Fig. 8 の \bullet で示す溶出図が得られた。この図は、カルパイン処理前の変性ミオシンの溶出図 (\circ) と良く類

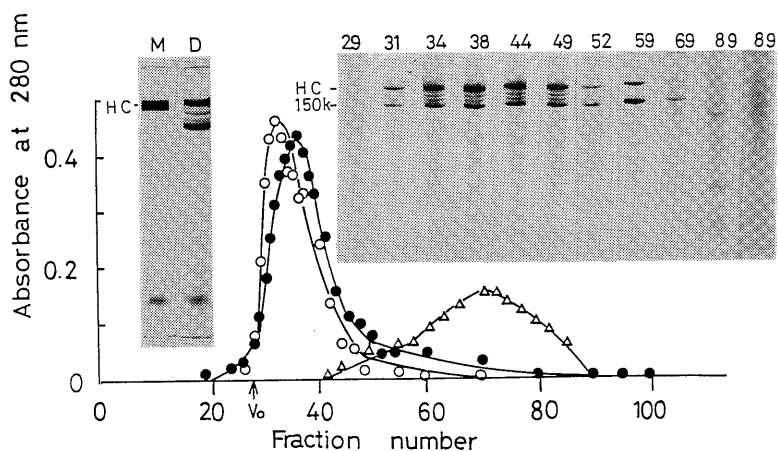


Fig. 8. Elution profiles of native, denatured, and digested myosins upon gel filtration.

Each myosin sample (45 mg/7 ml) was applied to a column of Bio Gel A-50 m (2.6 \times 90 cm) equilibrated with 0.5 M NaCl-20 mM Tris acetate (pH 7.0). Each fraction of 6 ml was collected at a flow rate of 12 ml/h. Δ , native myosin; \circ , denatured myosin in 0.6 M NaCl prepared by heating at 29°C for 30 min; \bullet , digested myosin: The denatured myosin was digested for 30 min with calpain under the same conditions as shown in Fig. 1. After termination, the digest was solubilized with addition of 0.6 M NaCl. V_0 , void volume.

Inserted figures show SDS-PAGE of the denatured myosin (M) and the digested myosin (D) before the gel filtration. Numbers above the figures indicate fraction numbers for the gel filtration of the digested myosin (\bullet).

似していた。Fig. 8 に挿入した SDS-PAGE の写真はカルパイン処理した変性ミオシンのゲル濾過(●)で得られた画分のものである。これによると、150 k 成分と重鎖は、同一画分に共存していることが示されたが、分子量 150,000 に相当する溶出区分(画分 90~100 付近)にはピークは全く検出されなかった。以上のゲル濾過の結果から、変性ミオシンは 0.5 M NaCl 中においても凝集体として存在しており、この凝集体をカルパイン処理した際に生成する 150 k 成分は、凝集体から遊離されることなく、凝集体の中にとどまっていることが明らかになった。

考 察

コイの変性ミオシンはカルパインで容易に分解され、SDS-PAGE によると 150 k 成分が主として生成されることが知られている。^{8,4)}しかし、変性ミオシン分子上のカルパインの作用部位についてはまだ明らかになっていない。すでに坂本および関⁹⁾は 150 k 成分がミオシンの HMM 様断片(170 k)およびその加熱変性物のカルパイン処理からは生成されないこと、また 150 k 成分の生成がカルパイン処理時の塩濃度の影響をほとんど受けないことを報告している。カルパインの作用部位は変性ミオシンの HMM 部分にあることが推測される。さらに著者らは本研究の Fig. 1 に示したように、150 k 成分が水溶性タンパク質として遊離されないことなどからミオシンロッドと類似しているように推定した。Weed および Pope¹¹⁾によると、低塩濃度、EDTA の存在下でミオシンは α -キモトリプシン消化により S-1 とロッドに分解される。この方法でロッドを調製し、150 k 成分との比較を SDS-PAGE でおこなったところ(Fig. 2)、150 k 成分はロッド(Mr=117,000)¹¹⁾よりも多少大きなサイズであることが認められた。さらにミオシンにかえて変性ミオシンを同条件下で α -キモトリプシン消化すると、ロッドはほとんど生成されなくなり 150 k 成分が主として生成される事実(Fig. 3)から、ロッドと 150 k 成分は明らかに異なるものであることが確かめられた。

次に、ミオシン重鎖上の SH₁ 基を蛍光色素 1,5 IAEDANS で標識してから、ミオシンを変性し、カルパインで処理したところ、標識をしない場合と同様に 150 k 成分が生成されたが、150 k 成分からは標識は検出されなかった(Fig. 6)。すなわち、150 k 成分は SH₁ 基を含んでいないことが示された。SH₁ 基は S-1 の C 末端近傍に存在していることが明らかにされていること¹⁴⁾(コイのミオシンでも同じであると仮定した)、および S-1 のサイズ(SDS-PAGE で Mr=90,000)¹¹⁾が 150 k より小さいことを考えると、カルパインの作用部位は S-1

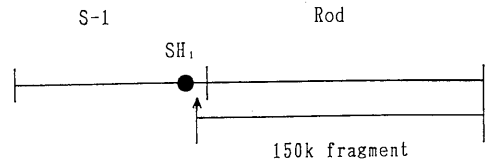


Fig. 9. Schematic representation of a denatured myosin heavy chain showing the primary cleavage site.

上にあつて SH₁ 基よりは C 末端に近い部位にあることが明らかになった。したがって 150 k 成分はミオシンのロッド部分に相当するが、キモトリプシン消化で得られるロッドよりも多少サイズが大きいので S-1 の C 末端部を含んでいると考えられる(Fig. 9)。一方、ミオシン重鎖の 150 k 成分の残りの断片は SDS-PAGE 上で単一のバンドとして検出できない(Fig. 6)が、多量の試料を用いて電気泳動(Fig. 7)をおこなえば、1,5 IAEDANS の蛍光を有するバンドは Mr=10,000~50,000 の範囲に多数検出される。これは 150 k 断片がカルパインに対して抵抗性を示すのと比べると対照的である。この蛍光を有するバンドはいずれも 150 k 成分より小さいことから、ミオシンが変性をうけるとカルパインによってまず 150 k 断片を生じ、続いて残りの S-1 部分は直ちに数多くの小断片に分解されることが示唆された。

ミオシンおよび変性ミオシンは低塩濃度下では凝集体として存在しているが、Fig. 8 によると変性ミオシンは 0.5 M NaCl (pH 7.0) 中においても凝集体として存在している。さらにカルパインで処理した後も 150 k 成分は変性ミオシンの凝集体から解離されないことが示されている。SDS の存在下においてはミオシン重鎖と 150 k 成分は互いに分離されることから、変性ミオシンはカルパインで共有結合の一部が切断されてもその凝集体としての構造は保たれた状態で存在していることが明らかとなった。この結果は 150 k 成分(ミオシンのロッド部分)がカルパイン分解に抵抗性を示し、蓄積される理由のように思われる。

150 k 成分は 25°C で貯蔵したコイ筋肉⁵⁾あるいはスケトウダラ、コイ、グチ、などの NaCl を添加した肉糊を高温で坐らせた場合*にも検出されている。さらに Arakawa らは¹⁵⁾ウサギ筋肉を 37°C で貯蔵した場合に 150 k 成分が生成することを報告している。Schwartz および Bird,¹⁶⁾ Robbins ら¹⁷⁾ および Zeece ら¹⁸⁾はウサギあるいはウシのミオシンおよび筋原繊維にカテプシン D を pH 4~5, 37°C で作用させると 150 k 成分が生成することを報告している。このような 150 k 成分はいずれもミオシンが変性をうけやすい条件下でその生成が検出されているので本報告のものとの類似性が考えられる。

* 西本真一郎, 横尾 裕, 橋本昭彦, 関 伸夫, 新井健一: 昭和 62 年度日本水産学会春季大会講演要旨集 p. 227.

しかし、これらの報告では基質の変性ならびに 150 k 成分の同定については検討されていないので本研究の 150 k 成分との厳密な比較は出来ない。カテプシン D でミオシンから 150 k 成分が生成されるとすれば、本研究で示したように変性ミオシンに対してはカルパインだけでなく α -キモトリプシンも 150 k 成分を生成するところから、変性ミオシンではプロテアーゼの種類によらずミオシンのこの部位がプロテアーゼで特異的に作用を受け易いことが推測されるので現在検討を続けている。なお、最近 Pemrick および Grebenau¹⁹⁾ はウサギのミオシンからカルパイン消化で 150 k 断片が生成することを報じているが、この報告は坂本ら^{1,2)}の結果と一致していないし、基質ミオシンの状態が明らかでないので討論しなかった。

文 献

- 1) 坂本慎一, 山田裕三, 関 伸夫: 日水誌, **51**, 825-831 (1985).
- 2) 坂本慎一, 関 伸夫: 日水誌, **51**, 1551-1557 (1985).
- 3) 坂本慎一, 高田早苗, 関 伸夫: 日水誌, **53**, 439-444 (1987).
- 4) 関 伸夫, 高田早苗: 日水誌, **53**, 457-463 (1987).
- 5) 関 伸夫, 渡辺孝博: 日水誌, **48**, 517-524 (1982).
- 6) C. H. Fiske and Y. Subbarow: *J. Biol. Chem.*, **66**, 375-400 (1925).
- 7) K. Weber and M. Osborn: *J. Biol. Chem.*, **244**, 4406-4412 (1969).
- 8) U. K. Laemmli: *Nature*, **227**, 680-685 (1970).
- 9) R. Takashi, J. Duke, K. Ue, and M. F. Morales: *Arch. Biochem. Biophys.*, **175**, 279-283 (1976).
- 10) P. Wahl, K. Towada, and J.-C. Auchet: *Eur. J. Biochem.*, **88**, 421-424 (1978).
- 11) A. G. Weed and B. Pope: *J. Mol. Biol.*, **111**, 129-157 (1977).
- 12) 宝塚剛志: 日水誌, **45**, 1503-1512 (1979).
- 13) 渡辺孝博, 関 伸夫: 日水誌, **48**, 57-63 (1982).
- 14) M. Gallagher and M. Elzinea: *Fed. Proc.*, **39**, 2168 (1980).
- 15) N. Arakawa, C. Inagaki, T. Kitamura, S. Fujiki, and M. Fujimaki: *Agr. Biol. Chem.*, **40**, 1445-1447 (1976).
- 16) W. N. Schwartz and J. W. C. Bird: *Biochem. J.*, **167**, 811-820 (1977).
- 17) F. M. Robbins, J. E. Walker, S. H. Cohen, and S. Chatterjee: *J. Food Sci.*, **44**, 1672-1677, 1680 (1979).
- 18) M. G. Zeece, K. Katoh, R. M. Robson, and F. C. Arrish Jr.: *J. Food Sci.*, **51**, 769-773, 780 (1986).
- 19) S. M. Pemrick and R. C. Grebenau: *Cell Biol.*, **99**, 2297-2308 (1984).