

スケトウダラ・ミオシンBの NaCl による変性

誌名	日本水産學會誌
ISSN	00215392
著者	西本, 真一郎 新井, 健一
巻/号	54巻8号
掲載ページ	p. 1429-1436
発行年月	1988年8月

スケトウダラ・ミオシン B の NaCl による変性

西本真一郎, 新井健一

(1988年1月6日受付)

Denaturation of Alaska Pollack Myosin B Induced by NaCl

Shin-ichiro Nishimoto* and Ken-ichi Arai*

Alaska pollack myosin B (MB) was dissolved in 40 mM Tris-maleate (pH 7.0) containing varied concentrations (0.3~2.0 M) of NaCl and stored at 10°C, to examine for physico-chemical and biochemical changes. At 1.0 M or higher concentrations of NaCl, MB showed a marked decrease in viscosity and ATP-sensitivity, a decrease in Mg-, and EDTA-ATPase activities. These changes were accompanied by a concomitant appearance of myosin in ultracentrifugal and gel filtration patterns. Occurrence of 50 mM KCl-soluble actin was also observed. The soluble actin did not activate Mg-ATPase activity nor inhibit EDTA-ATPase activity of intact myosin. On the other hand, MB quickly lost Ca-ATPase activity when treated with NaCl more than 1.0 M.

These results indicated that most of Alaska pollack MB was dissociated into myosin and actin, and both components were denatured at higher concentration of NaCl.

魚肉ねり製品の製造においては塩摺りと呼ばれる工程があるが、^{1,2)} この工程における魚肉中の筋原繊維タンパク質は、塩と反応し製品の品質に大きな影響をおよぼすことが考えられる。それ故、魚肉タンパク質と塩との反応を制御することや、反応機構を明らかにする研究は極めて重要であると思われる。

先に若目田ら³⁻⁸⁾ は、コイとシログチの筋原繊維タンパク質と中性塩との反応について詳細な研究を行い、高濃度の NaCl によって、低温度下においてもミオシン B (MB) 中のアクチンの一部が速やかに変性し、MB より解離し、低イオン強度の溶液に可溶化すること、また、MB 中のミオシンの塩に対する感受性は魚種によって異なり、シログチのそれは変性するがコイでは変性し難いことも明らかにした。ただしねり製品の主原料はスケトウダラの冷凍すりみであるがこの魚種については検討されていない。

そこで本研究においては、スケトウダラの塩摺り肉(肉糊)中で起こる筋原繊維タンパク質の変性を明らかにするためのモデルとしてスケトウダラ MB を用いて低温度で起こる NaCl との反応の機構を検討した。

実験方法

スケトウダラのミオシン B, ミオシンおよびアクチンの調製 新鮮なスケトウダラ Alaska pollack, *Theragra*

chalcogramma の背肉を採取し、ミオシン B (以下 MB と略す) は高土らの採用した方法に準じて調製し 0.5M KCl, 40 mM Tris-maleate (pH 7.0) 溶液とした。ミオシンの調製は碓谷らが採用した方法¹⁰⁾より、先ず MB を抽出した後 ATP-MgCl₂ の共存下で 40~55% 飽和硫酸の塩析画分を集め、0.5 M KCl, 20 mM Tris-maleate (pH 7.0), 1.5 M sorbitol 溶液とした。アクチンはアセトンパウダーから Spudich-Watt¹¹⁾ の方法に従って調製した F-アクチンを 0.1 M KCl, 0.2 mM ATP, 0.2 mM CaCl₂, 2 mM Tris-HCl (pH 7.5) 溶液として使用した。

MB の塩処理とその停止法 MB (2~3 mg/ml) を終濃度が 0.3~2.0 M の NaCl を含む 40 mM Tris-maleate (pH 7.0) 溶液とし、10°C に保持した(以下この操作を塩処理と呼ぶ)。塩処理中の MB の一部を経時的に取り出し、0.5 M KCl, 40 mM Tris-maleate (pH 7.0) 溶液に対して氷冷しつつ透析して NaCl 濃度を下げ、塩処理を停止させて以下の実験に供した。

粘度および ATP 感度の測定法 塩処理した MB をただちにオストワルド型粘度計(試料の容量は 2.0 ml で溶媒の流速は 60~80 秒のもの)に移し、約 5 分間恒温化(10°C)した後、粘度を測定した。粘度は次式による粘度数 ($Z\eta$)¹²⁾ で表わした。 $Z\eta = \ln \eta_r / C$, $\eta_r = \eta / \eta_0$, ここで η_0 は溶媒の流出時間, η は MB 溶液の流出時間, また C はタンパク質濃度 (mg/ml) を示す。また MB

* 北海道大学水産学部生物化学教室 (Laboratory of Biochemistry, Faculty of Fisheries, Hokkaido University, Hakodate, Hokkaido 041, Japan).

溶液に対して ATP と $MgCl_2$ を最終濃度が各 1 mM になるように添加して粘度を測定し、その粘度変化から次式により ATP 感度を算出した。¹²⁾ ATP 感度 = $[(\log \eta_r / \log \eta_r \text{ ATP}) - 1] \times 100$, η_r および $\eta_r \text{ ATP}$ はそれぞれ ATP を添加する前および後の相対粘度である。

超遠心沈降分析 超遠心による MB の沈降図はジュリー光学系を装備した Beckman L 2-65B 型超遠心分離機を用い、39,800 rpm, 10°C, タンパク質濃度 2.5 mg/ml の条件で撮影した。またタンパク質の偏比容を 0.74 として¹³⁾ 各ピークの沈降速度, $S_{20,w}$ を求めた。

Sepharose C1-4B によるゲル濾過 MB のゲル濾過は 0.5 M KCl, 20 mM imidazole-HCl (pH 7.0) 溶液で平衡化した Sepharose C1-4B (2.6×100 cm) を用いて行った。負荷するタンパク質量は 17 mg とし、流速は 18 ml/h で、上記の溶液を用いて溶出を行い 4.8 ml ずつ分画した。各画分のタンパク質濃度はマイクロビレット法¹⁴⁾で測定した。またピークの溶出位置は (V_e/V_0) で示したが、 V_0 は void volume, V_e は elution volume である。

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動と塩処理中に解離するアクチンの定量 Laemmli らの方法に従って¹⁵⁾ 0.1% SDS を含む 10% ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動を行い、またタンパク質の染色には Coomassie Brilliant Blue R を使用した。また若目田らの方法に従い⁶⁾ 塩処理した MB から解離するアクチンの定量をした。すなわちその一部を経時的に取り出して 50 mM KCl, 40 mM Tris-maleate (pH 7.0) 溶液に対して氷冷しつつ透析し、10,000×g で 30 分間遠心分離して得た上清画分の一定容量を 1% SDS 溶液で溶解し、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動によってその中のアクチンを定量した。¹⁵⁾ なお染色強度の測定は島津 CS-910 型クロマトスキャナーを使用した。

各種 ATPase 活性の測定法 ATPase 活性 (EC 3.6.1.3) を測定する反応混液の基本組成は 0.5 M KCl, 25 mM Tris-maleate (pH 7.0), 0.1~0.3 mg/ml の MB および 1 mM ATP からなり、他に Ca-ATPase 活性の場合は 5 mM $CaCl_2$ を、また EDTA-ATPase 活性の場合は 5 mM EDTA を、別に含むものとした。また Mg-ATPase 活性の測定は 30 mM KCl, 25 mM Tris-maleate (pH 7.0), 1 mM $MgCl_2$, 0.1 mM $CaCl_2$, 1 mM ATP と 0.10~0.20 mg/ml の MB を含んだ反応混液とした。反応は全て 25°C で行い、経時的に一部を取り出し、1/2 容量の 15% $HClO_4$ と混合して反応を停止させた後、濾液中に遊離した無機リン酸を比色定量し、¹⁶⁾ 比活性 ($\mu\text{mol Pi}/\text{min} \cdot \text{mg of protein}$) を求めた。タンパク質濃度は牛血清アルブミン分画 V を標準としビレット法によって¹⁷⁾比色定量した。

結 果

塩処理中に起こる MB の粘度および ATP 感度の経時変化 先ず、スケトウダラ MB 溶液の NaCl の終濃度が 0.3~2.0 M となるように調製し、10°C で保持したときの粘度の経時変化を Fig. 1 (a) に示した。これによると NaCl の添加により MB の粘度は添加直後およびそれに続く初期において急激に減少し、後期は緩慢に減少する傾向を示した。また塩濃度が増加するに伴って初期および後期の粘度減少の速度と度合は大きくなる傾向を示した。特に塩濃度が 1.0 M 以上になると、添加直後の粘度減少の度合が大きく、また初期の速い粘度減少はほぼ塩処理 1 時間後に終了し、それ以上減少しなくなる傾向が示された。これらの変化の様式はシログチの MB の場合と良く似ており、コイの MB の場合よりも速く起こるのが特徴であった。⁴⁾

塩処理 4 時間後の MB に 1 mM ATP- $MgCl_2$ を添加し、そのとき起こる新たな粘度の減少度 (ATP 感度) を検討した。これによると 0.3 および 0.5 M NaCl で処理した MB では塩によって起こる粘度減少は小さく、ATP による粘度の減少が大きく起こった。一方、塩濃度が高くなると塩処理によって起こる粘度の減少が大きくなるので ATP による新たな減少の度合は小さくなる傾向が示されている。

そこで次に 0.5, 1.0 および 2.0 M NaCl で処理中の MB の一部を経時的に取り出し、ただちに 0.5 M KCl, 40 mM Tris-maleate (pH 7.0) 溶液に対して透析して塩濃度を下げ、塩との反応を停止させて得た MB 溶液の ATP 感度を測定し、その結果を Fig. 1(b) に示した。これによると 0.5 M NaCl では塩処理 4 時間後までほとんど変化しないのに対して、1.0 M NaCl で処理すると ATP 感度は 100% から 40% まで、初期 (1 時間後まで) に速く後期は遅い速さで減少した。また 2.0 M NaCl で処理すると、添加直後に 46% まで減少した後、1 時間後まで速くその後は緩慢に減少して 0% に達した。上記の結果は、塩処理によって起こる MB の粘度減少は ATP によって起こるミオシンとアクチンへの解離に伴う粘度減少とは良く似ているものの全く同じではなく、MB それ自体または解離したミオシンとアクチンのいずれかになんらかの構造変化が起こっていることを示している。

塩処理による MB の超遠心沈降図型の変化 Fig. 1 (a), (b) の結果は、1.0 M 以上の濃度の NaCl 存在下でほぼ 1 時間処理するとき起こる MB の大きな粘度減少は、ミオシンとアクチンへの解離に起因するか、または、いずれかの成分に大きな構造上の変化が起こったことを示している。そこで 1.0 または 2.0 M の NaCl 濃

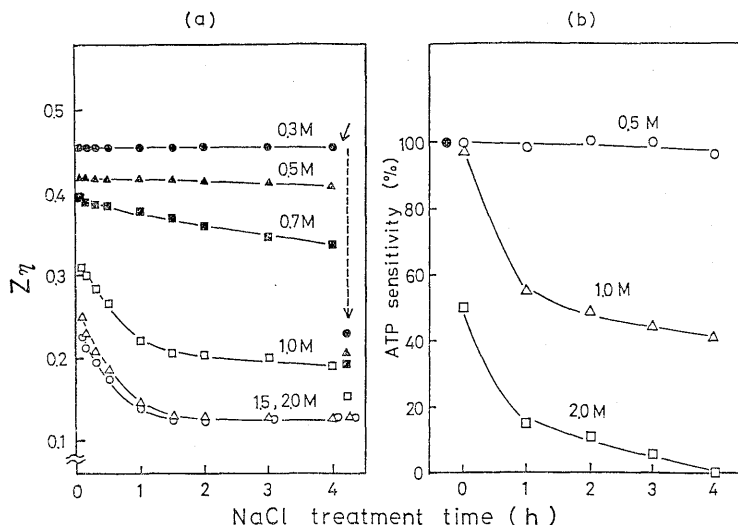


Fig. 1. Changes in viscosity and ATP sensitivity of Alaska pollack myosin B during NaCl-treatment.

Alaska pollack myosin B (2.0 mg/ml) was kept at 10°C in a medium containing varied concentrations (0.3~2.0 M) of NaCl and 40 mM Tris-maleate (pH 7.0).

(a) The viscosity of myosin B was measured at 10°C with the lapse of time, using an Ostwald-type viscometer having a flow time of 60~80 sec for 2.0 ml solution. At the arrow, 1 mM ATP was added. Viscosity number ($Z\eta$) was given by $\ln \eta_r/C$, where η_r and C are relative viscosity and protein concentration (mg/ml), respectively.

NaCl concentrations: 0.3 (●), 0.5 (▲), 0.7 (■), 1.0 (□), 1.5 (△), 2.0 (○) M.

(b) During the NaCl treatment, a portion of myosin B was taken out at various intervals and dialyzed against a medium containing 0.5 M KCl and 40 mM Tris-maleate (pH 7.0) at 2~4°C. ATP sensitivity was calculated by the equation, $[(\log \eta_r / \log \eta_r \text{ ATP}) - 1] \times 100$, where η_r and $\eta_r \text{ ATP}$ are the relative viscosities before and after the addition of ATP.

Untreated myosin B (●), 0.5 (○), 1.0 (△), 2.0 (□) M NaCl-treated myosin B.

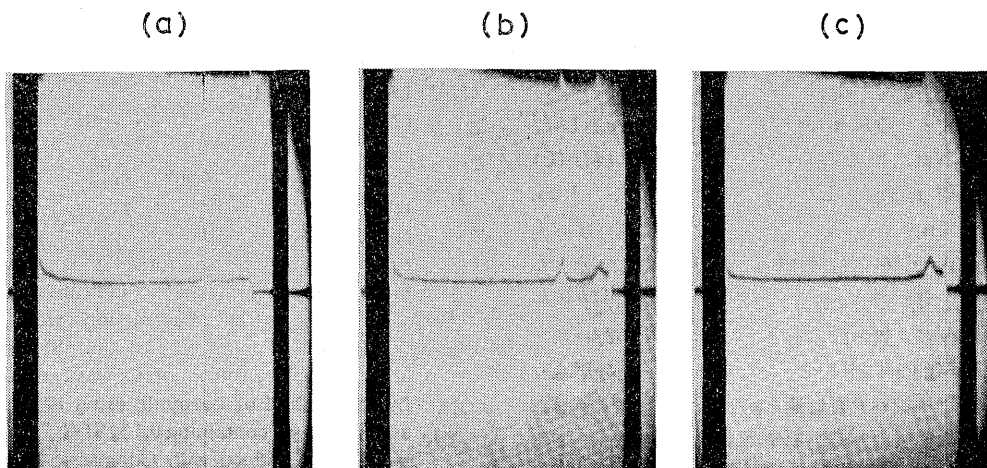


Fig. 2. Changes in ultracentrifugal sedimentation pattern of myosin B during NaCl-treatment.

Alaska pollack myosin B (3.0 mg/ml) was treated with 1.0 or 2.0 M NaCl for 60 min and dialyzed as described in Fig. 1. All runs were conducted at 39,800 rpm and at 10°C (bar angle 65°). The solvent was used 0.5 M KCl and 40 mM Tris-maleate (pH 7.0). Photographs were taken at 30 min after reaching the top speed. Protein concentration was 2.5 mg/ml.

(a) Control (untreated), (b) 1.0 M NaCl, (c) 2.0 M NaCl.

度で塩処理を1時間行った後でMBの超遠心による沈降図型を測定した。それらの結果をFig. 2 (a), (b) および (c) に示した。測定条件は39,800 rpm, タンパク質濃度が2.5 mg/mlであるが, 10°Cで30分後に撮影を行った。これによると未処理のMB (a) の主要成分は沈降速度が25Sのhypersharpなピークであることを示し, このMBを1.0Mで1時間塩処理 (b) すると25Sの成分は減少して新たに4Sのピークを生成する事実を示した。なおまた, 2.0Mで1時間塩処理したMB (C) では25Sの成分は完全に消失し4Sのピークだけが生成することが示された。しかし25S成分の減少度に比べて4S成分の生成の割合が小さいので, 生成したミオシンはさらに凝集して多量体に変化した可能性もなお考えられる。いずれにせよ, 高濃度(1.0~2.0M)のNaClでMBを処理するとアクトミオシンに相当する25Sの成分が大きく減少して新たにミオンと推定される4Sの成分が増加すること, またこれは塩濃度が高い方が強く起こることを示している。この結果は同じ条件下のコイのMBを塩処理したときの結果と類似していた。⁸⁾ なお, 塩処理時間との関係は詳しく検討していない。

塩処理によるMBのゲル濾過溶出図型の変化 超遠心による沈降分析に供した同じ塩処理MBを, Sepharose Cl-4Bを支持体としてゲル濾過に供し溶出図型の変化を検討した。それらの結果をFig. 3 (A), (B) および (C) に示した。これによると, 先ず未処理のMB (A) は void volume 付近の (V_e/V_0)=1.23の溶出位置 (a 画分とする) に主要成分が, また (V_e/V_0)=2.2の溶出位置 (b 画分とする) に少量の成分が認められ, 2つの成分から成っていた。次に1.0M NaClで1時間塩処理したMBの場合 (B) は, 上記のa画分が減少し, これに対応するようにb画分が増加することを示した。なお2.0M NaClで1時間塩処理したMBの場合 (C) は, a画分が減少してb画分が増加する点では1.0M NaCl処理の場合と同じであるが, a画分はさらに減少して (V_e/V_0)=1.46の位置に新しい成分 (c 画分とする) を生成していることを示した。また上記したゲル濾過によるタンパク質の回収量はいずれも88~90%であったので, Fig. 3に示したゲル濾過によって分離された各画分中のタンパク質含量を測定し全タンパク質量に対する百分率を算出した。それによると, 未処理のMB中のa画分のタンパク質量は87.2%であったが, 1.0M NaClで処理すると71.9%, さらに2.0M NaClで処理すると41.7%まで減少した。一方, b画分は未処理MBでは12.7%であったが, 1.0Mおよび2.0M NaCl処理MBでは28%であった。またc画分は未処理MBでは0%であったが, 2.0M NaCl処理MBでは

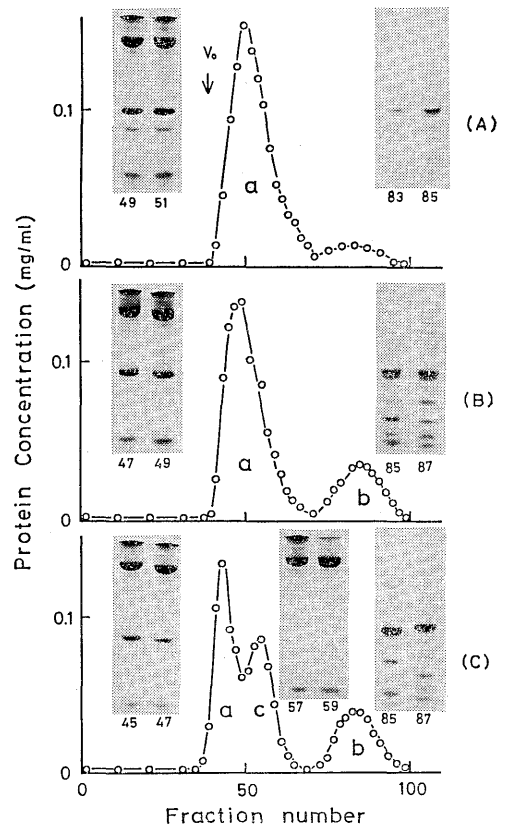


Fig. 3. Changes in elution profile and SDS-polyacrylamide gel electrophoretic pattern of same fractions of NaCl-treated myosin B on Sepharose Cl-4B gel filtration.

Alaska pollack myosin B was treated with 1.0 or 2.0 M NaCl for 60 min and dialyzed as described in Fig. 1. The dialyzates (each 17 mg of myosin B) were applied on a column (2.6 × 100 cm) of Sepharose Cl-4B equilibrated with 0.5 M KCl and imidazole-HCl (pH 7.0), then eluted with the same solution at a flow rate of 18 ml/h. Fractions of 4.8 ml were collected and the protein concentration in each fraction was determined by the micro-biuret method. The arrows indicate the void volume (V_0). Indicated fractions were analyzed for subunit composition. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis was carried out by the method of Laemmli, using 10% polyacrylamide gel containing 0.1% SDS. Protein bands were stained with Coomassie Brilliant Blue R.

(A) Control (untreated), (B) 1.0 M NaCl, (C) 2.0 M NaCl.

30.3%まで増加するという結果を示し, a画分の減少量はbとc画分の増加量にほぼ良く対応していた。

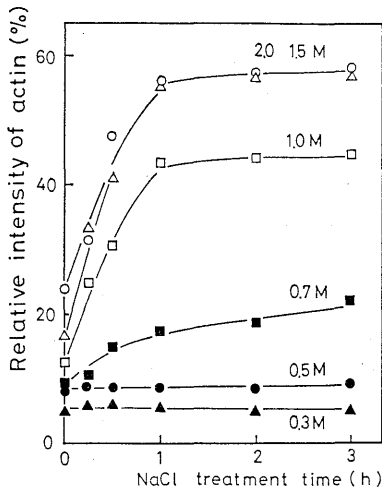


Fig. 4. Change in the amount of 50 mM KCl-soluble actin from myosin B during NaCl-treatment.

Alaska pollack myosin B was treated with 0.3~2.0 M NaCl as described in Fig. 1. After the treatment at various intervals, a portion (2 ml) of myosin B was taken out and dialyzed against 50 mM KCl and 40 mM Tris-maleate (pH 7.0) at 2~4°C. The dialyzates were then centrifuged at 10,000×g for 30 min. A fixed volume (30 μl) of the supernatant was subjected to SDS-polyacrylamide gel electrophoresis using 10% gel. The amount of 50 mM KCl-soluble actin was calculated as percentage to that in native myosin B by measuring the staining density on gel rods.

NaCl concentrations: 0.3 (●), 0.5 (▲), 0.7 (■), 1.0 (□), 1.5 (△), 2.0 (○) M.

次にゲル透過で分離した各画分中のタンパク質のサブユニット組成を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法によって分析した。それによると a 画分はアクトミオシンに、b 画分はアクチンおよび調節系タンパク質 (トロポミオシンとトロポニン) に、c 画分はミオシンに相当するサブユニットから成っていた。したがって、以上に述べた研究の成果は MB を高濃度の NaCl で処理すると、アクトミオシンの一部が明らかにミオシンとアクチンに解離することを示している。ただし 1.0 M NaCl による処理では解離が強く起らずに 2.0 M NaCl でそれが起こる事実を考慮すると、スケトウダラの MB の NaCl による解離のし易さは、コイよりも強くシログチよりも弱い傾向がある。⁹⁾

塩処理中に MB より解離するアクチン量の変化 次に塩処理によって MB より解離してくるアクチン量について検討するため、塩処理した MB を 50 mM KCl に透析した後に溶液中に可溶化してくるアクチン量を測

定し、その経時変化を Fig. 4 に示した。これによると塩濃度が 0.5 M 以下では処理時間が 3 時間後まではほとんどアクチンの解離は起こらないが、0.7 M では僅かに、また 1.0 M 以上になるとその解離が強く起こるようになり、また塩処理 1 時間後まで急激に増加してほぼ最大に達する傾向を示した。特に 1.5 および 2.0 M で塩処理した場合はおよそ MB 中の 60% のアクチンが解離することを示している。すなわち、先に報じたコイの MB よりもアクチンの解離が起こり易く、シログチの MB よりはやや起こり難いことを裏づけている。⁹⁾

2.0 M NaCl で 1 時間塩処理した MB から解離したアクチン相当の成分を遠心分離で上清に集め、スケトウダラミオシンとの間に起こる反応性を検討し、その結果を Table 1 に示した。すなわちミオシンに対して同成分を加えて Mg-ATPase の活性化および EDTA-ATPase の阻害が起こるかどうかを検討した。それによ

Table 1. Effect of the 50 mM KCl-soluble actin and intact F-actin on Mg- and EDTA-ATPase activities of myosin.

Alaska pollack myosin B was treated with 2.0 M NaCl for 60 min and dialyzed as in Fig. 1. Soluble actin in 50 mM KCl was prepared in the supernatant as described in Fig. 4. ATPase activities were assayed at 25°C in the following conditions. The reaction medium always contained 25 mM Tris-maleate (pH 7.0), and 1 mM ATP, 0.12 mg/ml of Alaska pollack myosin and 0.02 mg/ml of F-actin or 50 mM KCl-soluble actin in the supernatant from NaCl-treated myosin B. It also contained 30 mM KCl, 1 mM MgCl₂ for Mg-ATPase assay, or 0.5 M KCl, 5 mM EDTA for EDTA-ATPase assay.

	Myosin	Myosin + F-actin	Myosin + 50 mM KCl-soluble actin
Mg-ATPase	0.010	0.632	0.016
EDTA-ATPase	0.513	0.234	0.549

るとミオシン単独の Mg-ATPase 活性はその 1/6 量のスケトウダラF-アクチンによって著しく活性化されるのに対し、上清成分によっては全く活性化されなかった。またミオシンの EDTA-ATPase 活性はその 1/6 量のアクチンによって強く阻害されるのに対し、上清成分によっては全く阻害されなかった。これらの事実は塩処理した MB から解離したアクチンはミオシンとの結合能を示さず既に変性していることを示している。

塩処理した MB に対するF-アクチンの添加効果 塩

処理した MB より解離したアクチンは変性している事実が示されたが、次に塩処理した MB 中のミオシン部分について検討した。しかし、スケトウダラのミオシンは極度に不安定なため単離することが難かしいので、塩処理後の MB に対して直接 F-アクチンを添加して MB の ATPase 活性と粘度の ATP 感度について検討した。先ず 2.0 M NaCl で 1 時間塩処理した MB に対して F-アクチンを加えて、Mg²⁺ および EDTA-ATPase 活性を測定し、結果を Fig. 5 (a) に示した。これによると塩処理前の MB の Mg-ATPase 活性 (●) は高い値であるが、塩処理後には著しく低下した。この MB に F-アクチンを添加したが、その Mg-ATPase 活性はほとんど変わらず塩処理前の MB の活性値まで回復しなかった。また塩処理前の MB の EDTA-ATPase 活性 (▲) は高い値であるが、塩処理後は約 50% 以下まで低下した。この MB に F-アクチンを添加したが同活性はほとんど変化しなかった。

次に塩処理した MB に F-アクチンを添加して粘度の ATP 感度を測定した。その結果を Fig. 5 (b) に示したが、これによると塩処理前の MB の粘度の ATP 感度は 105 であるが塩処理によって 5 まで低下した。こ

の MB に対してその 1/8 量の F-アクチンを添加すると、ATP 感度は 35 まで増加するがそれ以上には回復しなかった。これらの結果は塩処理した MB 中のミオシンは F-アクチンとの結合能が低下しており、少なくともその一部は変性していることを示している。

塩処理中に起こる MB の各種 ATPase 活性の経時変化 MB を 0.5, 1.0, または 2.0 M の NaCl で処理した場合の Ca²⁺、Mg²⁺、および EDTA-ATPase 活性の経時変化を測定し、その結果を Fig. 6 (a), (b) および (c) に示した。これによると 0.5 M で処理した場合は上記 3 種の ATPase 活性は塩処理 4 時間後までほとんど変化しなかった。しかし 1.0 および 2.0 M で処理するときは、いずれの ATPase 活性も全て減少し、また塩濃度の高い方がより大きく減少する傾向を示した。特に Ca-ATPase 活性の場合は、1.0 M NaCl で 1 時間処理した場合は 60% まで、2.0 M NaCl で 1 時間処理した場合は 40% まで減少していた。この結果は、塩処理によって MB 中のミオシンの酵素活性部位に比較的大きな変性が起こっていることを示しており、これはコイやシログチの場合より明らかに大きいのでスケトウダラの MB の特徴の一つであると言える。したがって、塩処

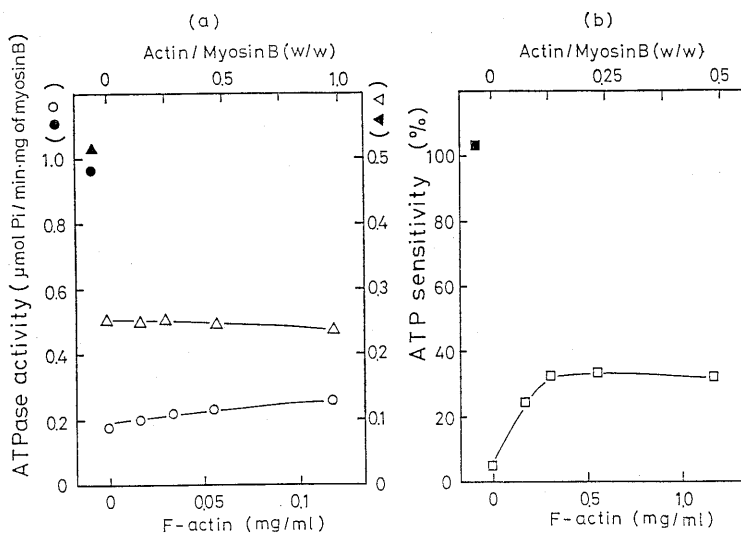


Fig. 5. Effect of F-actin on the Mg- and EDTA-ATPase activities, as well as ATP sensitivity of NaCl-treated myosin B.

(a) Alaska pollack myosin B was treated 2.0 M NaCl for 60 min and dialyzed as described in Fig. 1. ATPase assay was carried out at 25°C in a reaction medium containing 25 mM Tris-maleate (pH 7.0), 1 mM ATP, 0.12 mg/ml of myosin B, varied concentrations (0~0.12 mg/ml) of F-actin and the following components: 30 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 0.1 mM CaCl₂ for Mg-ATPase (●, ○) and 0.5 M KCl, 5 mM EDTA for EDTA-ATPase (▲, △), respectively.

(●, ▲) Untreated myosin B, (○, △) NaCl-treated myosin B.

(b) The methods for treatment of Alaska pollack myosin B with 2.0 M NaCl and for dialysis were the same as those described in Fig. 1. The measurement of the viscosity of myosin B and the calculation of ATP sensitivity were carried out as described in Fig. 1.

(■, □) Untreated myosin B, (□) NaCl-treated myosin B.

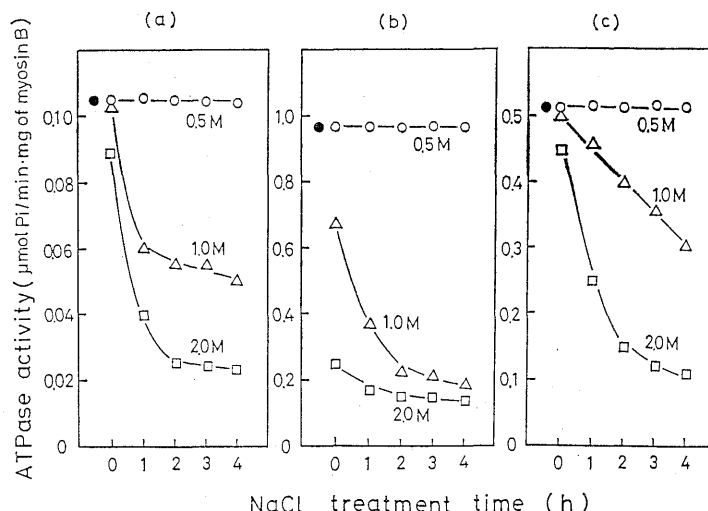


Fig. 6. Changes in Ca-, Mg-, and EDTA-ATPase activities of myosin B during NaCl treatment. Alaska pollack myosin B was treated with 0.5, 1.0, or 2.0 M NaCl and dialyzed as described in Fig. 1. ATPase assay of dialyzate was carried out at 25°C in a reaction medium containing 25 mM Tris-maleate (pH 7.0), 1 mM ATP and the following components: 0.5 M KCl, 5 mM CaCl₂, 0.24 mg/ml of myosin B for Ca-ATPase (a), 30 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 0.12 mg/ml of myosin B for Mg-ATPase (b), and 0.5 M KCl, 5 mM EDTA, 0.12 mg/ml of myosin B for EDTA-ATPase (c).
 Untreated myosin B (●), 0.5 (○), 1.0 (△), 2.0 (□) M NaCl-treated myosin B.

理中に起こる Mg- や EDTA-ATPase 活性の経時的な減少の傾向にはこの酵素活性の失活が大きく反映しているものと推定される。これは減少した同上 ATPase 活性が新しい F-アクチンの添加によって回復しないという前記の結果 (Fig. 5) からも支持されるものである。

考 察

コイ MB を高濃度 (2.0 M) の塩で処理すると、低温度 (10°C) においてさえも MB のほぼ 60% がアクチンとミオシンに解離し、また解離するアクチンはすみやかに変性するが、ミオシンは全く変性しない事実がすでに明らかとなっている。^{6,7)} 本研究では、冷凍すりの主原料であるスケトウダラの MB に対する NaCl の影響を明らかにすることが急務であると考えて検討を行ったものであるが、塩処理により MB の粘度と ATP 感度の減少が起こり、超遠心沈降図やゲル濾過の溶出図上にミオシンに相当するピークが出現し、さらに 50 mM KCl 中に MB 中の 60% のアクチンが可溶化するようになることなどの諸結果は、コイの MB の塩処理の場合と同じで、MB の一部がアクチンとミオシンに解離し、アクチンが変性していることを示した。しかし、塩処理によって EDTA-ATPase 活性が減少する点はコイの MB の場合と異っている。この塩処理した後の MB に対して別に調製した新鮮な F-アクチンを添加しても

塩処理によって変化した MB の性質 (ATPase 活性と ATP 感度) が元に回復しないので、MB 中のミオシンはアクチンとの結合能を失わない変性していることが推定されたが、さらに MB の Ca-ATPase 活性が塩処理の時間経過に伴ない急に減少する事実も示されたので上記の推定が正しいことが認められた。このミオシンの変性が著しく起こる点がコイ MB の場合と明らかに異っている。ただしシログチの MB の塩処理においてはアクチンばかりでなくミオシンの一部が変性することが最近報じられた。⁸⁾ しかし、その量はほぼ 10% 程度でありスケトウダラ MB の場合よりもかなり少ない。言い換えれば、スケトウダラの MB を塩処理した場合に 60% におよぶ MB 中のアクチンとミオシンが解離し、さらに両者が変性してゆくのの特徴であることが示された。

塩処理によって解離する MB 量は全体の 60% が最大であり、その他の 40% がアクトミオシンのままで残存する理由はいまだ明らかでない。これはゲル濾過の溶出図や解離するアクチンの定量結果とも矛盾しない事実である。しかし 2.0 M NaCl で処理した MB の超遠心沈降図にはアクトミオシンに相当する成分が認められないのに、その減少に相応する量のミオシン成分の増加も見られない。これはアクトミオシンの一部が凝集体を形成したか、¹⁵⁾ またはミオシンとアクチンに解離してから両者が凝集体を形成したため、遠心の初期に速い速度

で沈降した可能性が考えられる。事実, ゲル透過の溶出図型を見ると, 2.0 M NaCl で処理した MB 中の a 画分は $(V_e/V_0)=1.08$ の位置に溶出し, 1.0 M NaCl で処理した MB 中の画分よりもさらに void volume に近いことが凝集体の形成を示唆している。

なお, 1.0 M NaCl で MB を処理した場合は超遠心沈降図型には明らかにミオシンのピークが認められ, MB の一部に解離が起きていることを示唆しているにもかかわらず, ゲル透過の溶出図型にはミオシンのピークを認めることが出来ない。この理由は共存している多量のアクチンがミオシンと重って溶出しているためであると推定される。この推定は MB の粘度や ATP 感度の減少度, およびアクチンの解離量が, 2.0 M NaCl で処理した MB の場合に比べて, いずれも小さい値であることから支持されるものと考ええる。

本研究で見出したような塩処理によってスケトウダラ MB に起こった変性が, 実際にスケトウダラの塩摺り肉中においても起こっているかどうかについては未だ明らかでない。しかしスケトウダラの肉糊が極めて坐り易い性質を示し, かつ坐り肉中ではミオシンの重合が極めて起こり易い事実¹⁰⁾を考えると, 両者間になんらかの関連があることを示すように思われる。ただし, 本研究で実施した塩処理はタンパク質濃度が 2~3 mg/ml の MB 溶液について行った, いわばモデル試験であるが, 実際にスケトウダラの塩摺りした肉中のタンパク質濃度は極めて高く 150 mg/ml 以上に相当していると考えられる。それ故, 塩摺り肉中で起こる反応について検討を加えることが今後重要であり, 現在その試みをしている。

本研究は, 文部省科学研究費補助金によって行われたので, ここに記して感謝致します。

文 献

- 1) 岡田 稔: 新版魚肉ねり製品 (岡田 稔, 衣巻豊輔, 横関源庵編), 恒星社厚生閣, 東京, 1981, pp. 184-185, 197-198, 231-232.
- 2) 新井健一, 山本常治: 冷凍すりみ, 日本食品経済社, 東京, 1986, pp. 159-161, 238-246.
- 3) 若目田 篤, 野澤誠子, 新井健一: 日水誌, **49**, 237-243 (1983).
- 4) 若目田 篤, 新井健一: 日水誌, **49**, 643-650 (1983).
- 5) 若目田 篤, 新井健一: 日水誌, **50**, 635-643 (1984).
- 6) 若目田 篤, 新井健一: 日水誌, **51**, 497-502 (1985).
- 7) 若目田 篤, 新井健一: 日水誌, **52**, 293-300 (1986).
- 8) 若目田 篤, 尾崎弘忠, 野中道夫, 新井健一: 日水誌, **53**, 847-852 (1987).
- 9) 高士令二, 新井健一, 斎藤恒行: 日水誌, **36**, 169-172 (1970).
- 10) 碓谷敏紀, 木村郁夫, 新井健一: 日水誌, **47**, 947-955 (1981).
- 11) J. A. Spudich and S. Watt: *J. Biol. Chem.*, **246**, 4866-4871 (1971).
- 12) H. H. Weber and H. Portzehl: *Adv. Protein Chem.*, **7**, 161-252 (1952).
- 13) 林 勝哉: 蛋白質の分子量・分子形, 学会出版センター, 東京, 1971, p. 18.
- 14) R. F. Itzhaki and D. M. Gill: *Anal. Biochem.*, **37**, 149-154 (1964).
- 15) U. K. Laemmli: *Nature*, **227**, 680-685 (1970).
- 16) C. H. Fiske and Y. Subbarow: *J. Biol. Chem.*, **66**, 375-400 (1925).
- 17) A. G. Gornall, C. J. Bardwill and M. M. David: *J. Biol. Chem.*, **177**, 751-766 (1946).
- 18) 梅本 滋, 神名孝一: 日水誌, **36**, 798-805 (1970).
- 19) 沼倉忠弘, 関 伸夫, 木村郁夫, 豊田恭平, 藤田孝夫, 高間浩蔵, 新井健一: 日水誌, **51**, 1559-1565 (1985).