

# コイとウサギのミオシン・サブフラグメント-1の加熱による濁度変化

誌名	日本水産學會誌
ISSN	00215392
著者	山本, 康博 碓谷, 敏紀 今野, 久仁彦 新井, 健一
巻/号	55巻4号
掲載ページ	p. 727-732
発行年月	1989年4月

## コイとウサギのミオシン・サブフラグメント-1 の加熱による濁度変化

山本康博, 碓谷敏紀, 今野久仁彦, 新井健一

(1988年11月8日受付)

### Turbidity Increase of Myosin Subfragment-1 from Carp and Rabbit Induced by Heat-treatment

Yasuhiro Yamamoto,<sup>\*1,2</sup> Toshinori Ikariya,<sup>\*1,3</sup> Kunihiro Konno,<sup>\*1</sup>  
and Ken-ichi Arai<sup>\*1</sup>

Myosin subfragment-1 (S-1) of carp was incubated at 30°C in a medium consisting of 0.5 M KCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) and the Ca-ATPase activity and turbidity change were followed. The turbidity of carp S-1 increased as Ca-ATPase activity decreased. Upon centrifugation of thus turbid S-1 solution, the insoluble fraction was obtained as the pellet, and was analyzed by SDS-gel electrophoresis. The turbid component of S-1 was proved to be S-1 heavy chain aggregates dissociating light chains. The elution profile of mildly heated carp S-1 on Sepharose CL-4B gel filtration showed an accumulation of S-1 oligomer, not dimer, which is an intermediate of the turbid form of the S-1 heavy chain aggregates.

These results indicated that the formation of heavy chain aggregates caused the increase in the turbidity of S-1 solution which was accompanied by light chain release. Such denaturations of S-1 as above were found to be delayed in the case of rabbit S-1.

魚類の筋原繊維 (Mf) タンパク質は、その生化学的性質がウサギの骨格筋のそれと本質的に同じであるにもかかわらず、<sup>1-3)</sup> 著しく不安定であることが知られている。<sup>4-7)</sup> そして、Mf Ca-ATPase の失活の速度は、その魚類の Mf タンパク質が環境水温に対して適応した結果であることが強く示唆されるに至った。<sup>8,9)</sup> そこで、我々は魚類の Mf タンパク質の不安定性を検討するための一つの方策として、ミオシンの頭部に相当し、Ca-ATPase 活性を保有しているサブフラグメント-1 をコイ筋肉か

ら調製しその生化学的性質について研究を行った。<sup>2)</sup>

本研究ではコイとウサギの S-1 を用いて加熱による両 S-1 の変性機構を比較することを目的とし、濁度、溶解性、サブユニット組成、ゲル濾過溶出図形などを検討し、Ca-ATPase の失活を基準にして、変化の相互関係について論じた。

### 実験方法

コイ *Cyprinus carpio* の背筋およびウサギ骨格筋か

\*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, Hokkaido 041, Japan).

\*2 現住所: 東和化成工業株式会社 (Present Address: Towa Chemical Industry Co., Ltd., Otemachi, Tokyo 100, Japan).

\*3 現住所: 三菱化成食品株式会社 (Present Address: Mitsubishi Chemical Food Co., Ltd., Ginza, Tokyo 104, Japan).

本研究では、次の略号を使用した。

S-1: myosin subfragment-1

HMM: myosin heavy meromyosin

HC: S-1 heavy chain

LC: S-1 alkali light chains

PMSF: phenylmethylsulfonyl fluoride

SDS: sodium dodecyl sulfate

DTT: dithiothreitol

Tris: Tris (hydroxymethyl) aminomethane

ら, それぞれ高土らの方法<sup>10)</sup> および Connell の方法<sup>11)</sup> に準じてミオシンを調製した。次に高土らの方法<sup>6)</sup> を用いてコイミオシンからトリプシン消化により HMM を調製した。ミオシンからの S-1 の調製は, Weeds and Pope の方法<sup>12)</sup> に準じて行った。すなわちコイでは 50 mM KCl-1 mM EDTA-20 mM Tris-maleate (pH 7.0), 0.1 mM DTT 溶液, また, ウサギでは 50 mM KCl-1 mM EDTA-20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.1 mM DTT 溶液中のミオシンを, それぞれ 20°C あるいは 25°C において, 1/500 あるいは 1/400 倍量の  $\alpha$ -キモトリプシンを加えて 10 分間消化した後, 氷冷下で終濃度が 0.1 mM の PMSF を添加してこの反応を止め, 次に終濃度で 5 mM の  $MgCl_2$  を加えて超遠心分離 (100,000  $xg$  120 分間) し, その上清に水溶性画分を得, さらに, 0.5 M KCl-20 mM Tris-HCl (pH 7.5) に対して透析し S-1 標品とした。また, 一部の実験では Sephadex G-200 によるゲル濾過により精製して用いた。<sup>2)</sup>

ミオシン, HMM および S-1 の加熱変性は 0.5 M KCl-20 mM Tris-HCl (pH 7.5) の条件で行い, 加熱温度は目的に応じて選定し氷冷して変性を停止した。

Ca-ATPase 活性の測定は, 終濃度で 0.5 M KCl, 5 mM  $CaCl_2$ , 25 mM Tris-maleate (pH 7.5), 1 mM ATP を含む混液を用い, 20°C で反応を行い, 生成する無機リン酸を比色定量した。また, 加熱による S-1 Ca-ATPase の失活速度を一次反応式によって求め, 変性速度定数 ( $K_D$ ) として表した。<sup>13)</sup>

加熱による S-1 溶液の濁度の増加は, 350 nm における吸光値を指標として測定し, 濁度が最大値の 1/2 に達するのに要する時間 (秒) の逆数値によって増加速度定数 ( $K_T$ ) と表した。加熱によって濁度を生じた S-1 は, 20,000  $xg$  で 30 分間遠心分離し, 透明な上清液と沈殿に分離し, それぞれのペプチド組成を SDS-ポリアクリルアミド電気泳動で解析した。電気泳動は, Laemmli-Favre の方法<sup>14)</sup> に従って 0.1% の SDS を含む 10% ポリアクリルアミドスラブゲル (Tris-glycine 緩衝液系) を用いた。

加熱処理した S-1 のゲル濾過は, 0.5 M KCl-20 mM Tris-HCl (pH 7.5) で平衡化した Sepharose CL-4 B カラム ( $\phi$  1.5 cm  $\times$  65 cm) を用いた。

タンパク質濃度の測定は, 牛血清アルブミン画分 V を標準とし, ビウレット法<sup>15)</sup> 又は, ミクロビウレット法<sup>16)</sup> に従い比色定量した。また,  $\alpha$ -キモトリプシン濃度は,  $E_{282\text{ nm}}^{1\%} = 20.5^{17)}$  を採用し決定した。

## 結 果

加熱によって起こるコイ S-1 の濁度増加 コイとウサギの S-1, HMM およびミオシン溶液 (0.5 M KCl, pH

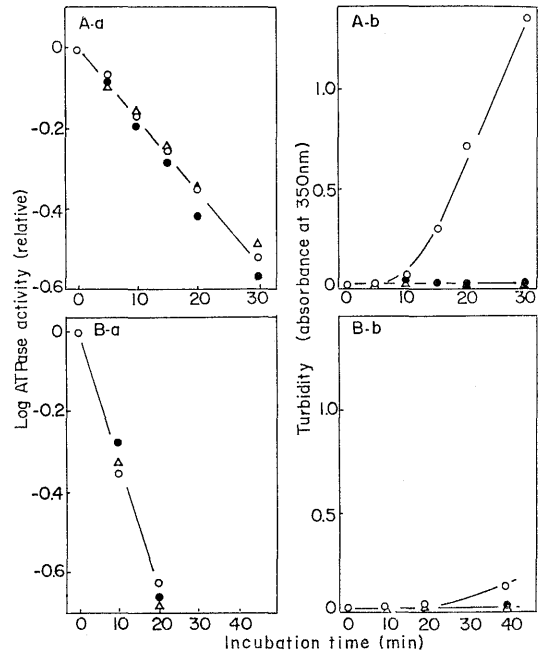


Fig. 1. Changes in the Ca-ATPase activity and the turbidity of S-1 during heat-treatment.

Myosin (1.3 mg/ml), HMM (1.1 mg/ml), and S-1 (0.75 mg/ml) were incubated at 30°C for carp proteins or at 40°C for rabbit proteins in a medium of 0.5 M KCl 20 mM Tris-HCl (pH 7.5). Ca-ATPase (a) was assayed in a medium of 0.5 M KCl, 20 mM Tris-maleate (pH 7.0), 5 mM,  $CaCl_2$ , and 1 mM ATP. The turbidity (absorbance at 350 nm) of S-1 solution (b) was measured at 15°C in the incubation medium. (A); carp, (B); rabbit (a): Ca-ATPase, (b): turbidity (○): S-1, (△): HMM, (●): myosin.

7.5) をそれぞれ 30°C および 40°C で加熱し, 経時的に Ca-ATPase 活性と濁度の変化を測定した。これらの結果を Fig. 1 に示した。これによると, ウサギおよびコイのいずれの場合も S-1, HMM およびミオシンの Ca-ATPase 活性の失活速度は, ほとんど同じであった (Fig. 1 A-a, B-a)。それにもかかわらず, Fig. 1 A-b に示すように, コイ S-1 が失活していく時のみ大きな濁度の増加が起こることが示された。すなわち, ミオシンや HMM も同様に Ca-ATPase の失活が起こるにもかかわらず, 濁度の増加は起こらない点が S-1 との変性様式の違いである。また, ウサギ S-1 では Ca-ATPase がほぼ完全失活に至るまで (30 分) 濁度上昇がほとんど起こらないので, 失活に平行して起こる著しい濁度上昇はコイ S-1 の変性における特徴であると推定した。ただし, 後で Fig. 2 に示すように, ウサギ S-1 でも加熱時間を長くすると lag phase を経て S-1 が完全失活した後に濁度が上昇す

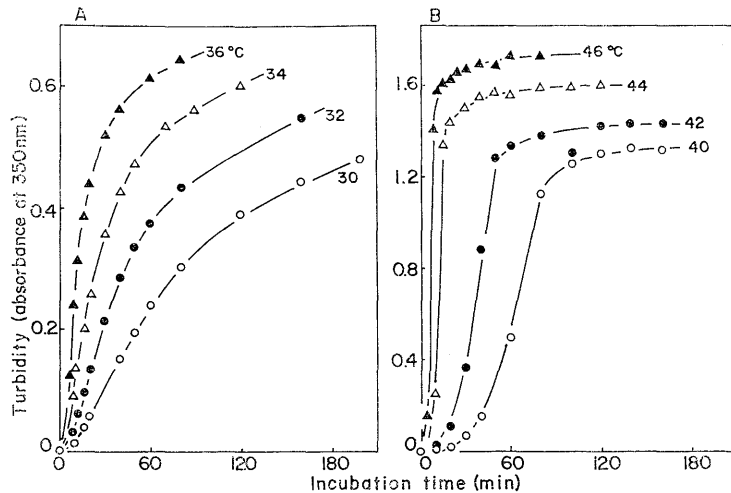


Fig. 2. Effect of incubation temperature on the increase in the turbidity of S-1. Myosin S-1 was incubated as described in Fig. 1, except that the incubation temperature was varied shown in the figure. The turbidity was also measured at 15°C. (A): carp S-1. (B): rabbit S-1.

る事実が見いだされた。

Fig. 1 では、加熱による濁度上昇を、コイおよびウサギ S-1 の Ca-ATPase の失活速度が近似している加熱温度を選定して、比較したが、次にコイ S-1 では 30~36°C の範囲で、ウサギ S-1 では 40~46°C の範囲で温度を変えて加熱し、濁度の経時変化を測定し、結果を Fig. 2 に示した。これによると温度の上昇に伴って濁度の最大値は増加するものの濁度の増加様式は本質的に変わらなかった。すなわち、コイ S-1 の濁度上昇は、加熱初期に Ca-ATPase の失活を伴いながら急速におこり、後期は速度増加の遅い反応である。一方、ウサギ S-1 の濁度上昇は初期の lag phase を経由し、ATPase の完全失活の後に急激な増加となる反応であった。そして加熱温度が上昇するに従って lag phase も短くなった。なお、ここには図示しないがウサギ S-1 は 30°C においては失活速度が小さく、また 180 分にいたるまで全く濁度の増加を生じなかった。そこで濁度が最大値の 1/2 に達するまでに要する時間の逆数値 ( $K_T$ ) を算出し、これを濁度増加の速度と定義して加熱温度との関係をアーレニウス・プロットした。また同じ条件下における S-1 の Ca-ATPase の失活速度 ( $K_D$ ) のアーレニウス・プロットもあわせて Fig. 3 に示した。これによると、コイとウサギのいずれの S-1 の場合も  $K_D$  および  $K_T$  のアーレニウス・プロットは一本の直線となった。そして、 $K_D$  および  $K_T$  いずれの場合もウサギの S-1 のアーレニウス・プロットはコイ S-1 よりもそれぞれ約 8°C 高温領域に位置することを示した。また同一温度で比べると  $K_D$ ,  $K_T$  いずれもコイ S-1 の方が約 18 倍ほど速度が大きかっ

た。そこでこのアーレニウス・プロットの直線から熱力学的パラメーターとして活性化エネルギー ( $E_a$ )<sup>8,9)</sup> を算出してみると、コイ S-1 の場合では  $K_D$ ,  $K_T$  いずれについても約 55~75 Kcal/mol であった。また、ウサギ S-1 では約 80~93 Kcal/mol であり、コイ S-1 の場合より若干大きい傾向があった。この  $K_D$ ,  $K_T$  の活性化エネルギーの値が一致する事から、加熱による S-1 の濁度増加は Ca-ATPase 活性の失活の反応と熱力学的に類似した反応であることが示された。また、コイよりもウサギの S-1 の方がアーレニウス・プロットの直線が高温域に移動しているので耐熱性の強い構造をしていることを示唆している。

加熱による S-1 の濁度変化にかかわるサブユニット成分 加熱によって濁度の生じたコイ S-1 は、その遠心分離により濁度成分を沈殿として分離することが出来た。そこで透明になった上清液 (可溶性タンパク質成分) および沈殿 (濁度構成成分) のペプチド組成を SDS-ゲル電気泳動法で調べた。コイ S-1 を用いて得られた結果を Fig. 4 に示した。まず、可溶性タンパク質成分について見ると加熱に伴いサブユニット成分のうち分子量 10 万の HC 成分が顕著に減少することが示されているが 2 本の LC 量にはほとんど変化は認められなかった (Fig. 1 参照)。この実験では上清液を一定容量ずつゲルに供しているため各バンドの染色強度は上清液中のタンパク質濃度を反映する。また、沈殿画分 (濁度構成成分) に回収される HC の量は加熱と共に増加し、この画分にはほとんど LC は検出されないため、HC はその不溶化に際してほとんどの LC を遊離し上清に残したものと判断し

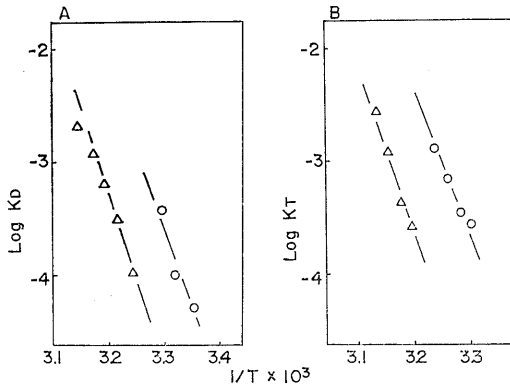


Fig. 3. Arrhenius plots of the inactivation rate of S-1 Ca-ATPase and the increasing rate of turbidity of S-1 solution.

The data shown in Fig. 2 were used to obtain the increasing rate of turbidity of S-1. The rate of increase in the turbidity was expressed in  $K_T$ , defined as  $K_T=1/t$ , where  $t$  is the time (seconds) required for the half-maximal value of the turbidity of S-1 solution. The inactivation rate of S-1 Ca-ATPase activity was calculated using the relation,  $K_D (\ln C_0 - \ln C_T)/t$ , where  $C_0$  and  $C_T$  are the activities before and after  $t$  seconds of incubation, respectively. The Ca-ATPase was assayed as in Fig. 1.

(A): Ca-ATPase, (B): turbidity, (O): carp S-1, ( $\Delta$ ): rabbit S-1, respectively.

た。同様の結果はウサギの S-1 についても得られたので (結果は図示せず) 加熱によって生ずる濁度の本体はおそらく S-1 の HC の多量体であり, その凝集体は LC の解離に伴って生成するように推定された。

次に S-1 の加熱による凝集の様式を知るため, Sepharose CL-4B のゲル濾過溶出図形の変化から検討した。ここではコイ S-1 を 30°C で 10 分間, ウサギ S-1 を 40°C で 10 分間加熱したものを供試したが, この条件の加熱では両 S-1 とともにほとんど濁度は認められなかった (Figs. 1, 2 参照)。Fig. 5A に示すように, 上のように加熱したコイ S-1 では  $V_0$  の位置と S-1 単量体の位置に 2 つのピークが検出された。しかも, Ca-ATPase 活性は S-1 単量体の画分のみ検出された。また  $V_0$  画分には S-1 HC も LC も検出されることから, まだ濁度を生じるに至らない失活したコイ S-1 の多量体であろうと推定した。一方加熱したウサギ S-1 では  $V_0$  に溶出される画分はほとんどなく, 単量体の溶出位置の前になだらかな肩が検出された。また, ATPase 活性はここでも単量体の位置のみ認められ, 肩の部分に溶出されている S-1 は失活していることが示唆された。この ATPase 活性が

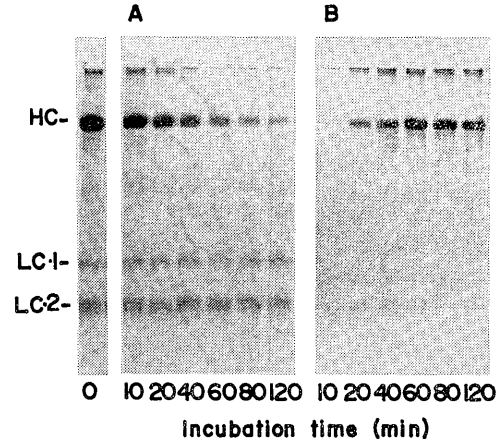


Fig. 4. Changes in the subunit composition of soluble and insoluble fractions of S-1 during heat-treatment.

Myosin S-1 was incubated at 30°C as described in Fig. 1 and centrifuged at  $20,000 \times g$  for 30 min to separate the supernatant and the pellet. After the treatment of both fractions with SDS, equal volume (10  $\mu$ l) of sample was applied on each gel. Ten percent polyacrylamide gel containing 0.1% SDS was used according to the method of Laemmli and Favre (A); supernatant, (B); pellet, HC: S-1 heavy chain, LC: light chains.

失活した肩の部分のサブユニット組成を SDS-ゲル電気泳動法で調べたところ, S-1 HC と LC が共に検出された。この成分は一つのピークとして溶出されないのて, 二量体以上の低度に多量化した変性 S-1 の混合物であることが推定された。溶出位置からおおよその多量化の程度を推定すると 2~5 量体であった。なお, 同じく加熱したコイおよびウサギ S-1 を遠心分離して得た上清を用いてもそのゲル濾過溶出図形はほとんど変わらないことから, 加熱によって生じた多量体は 0.5 M KCl (pH 7.5) に可溶性である。

以上の結果から, コイ S-1 では, 加熱変性に伴って直ちに 0.5 M KCl に可溶な多量体 ( $V_0$  画分) を生成するのに対し, ウサギ S-1 では二量体に相当する位置に溶出される変性 S-1 が検出されるので, この二量体から多量体への反応がかなりゆっくりとした速度で起こると推定された。ただウサギ S-1 でも, 長時間加熱して濁度を生じたものを遠心分離して不溶性画分を除き, ゲル濾過によって分析すると, この二量体に相当する成分は認められず, 多量体を生成していることを認めている。

コイとウサギの S-1 はその凝集の速度は異なるが, 上記したゲル濾過法で Ca-ATPase 活性が認められる S-1 単量体について, 加熱によって起こる経時変化を Sepha-

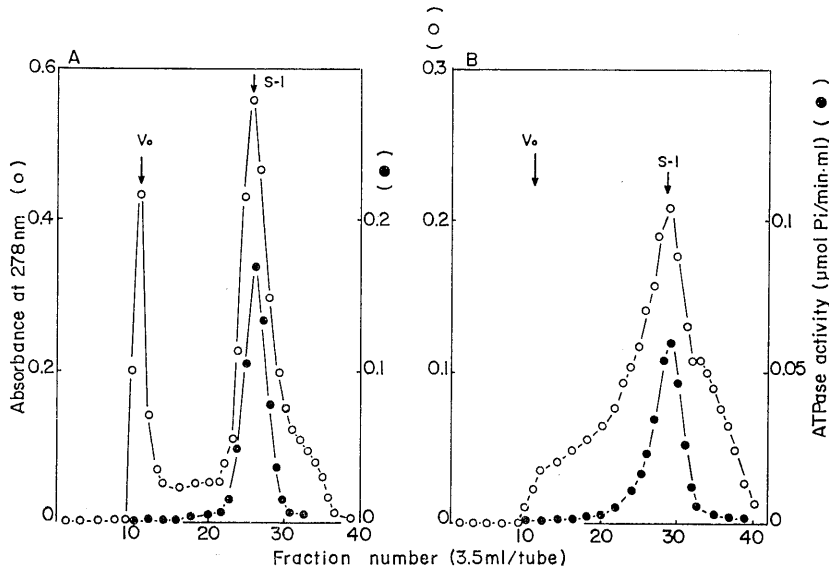


Fig. 5. Gel filtration profile of heated S-1 on Sepharose CL-4B.

Myosin S-1 was incubated for 10 min under the same conditions as described in Fig. 1 (at 30°C for carp, and at 40°C for rabbit), and was applied directly to Sepharose CL-4B column (1.5 × 56 cm) equilibrated and eluted with 0.5 M KCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5). The flow rate was 20 ml/h, and a fraction of 3.5 ml was collected. The Ca-ATPase activity (●) of each fraction was also measured.  $V_0$  (void volume) and the elution volume of S-1 monomer was separately determined.

(A); carp S-1 (B); rabbit S-1.

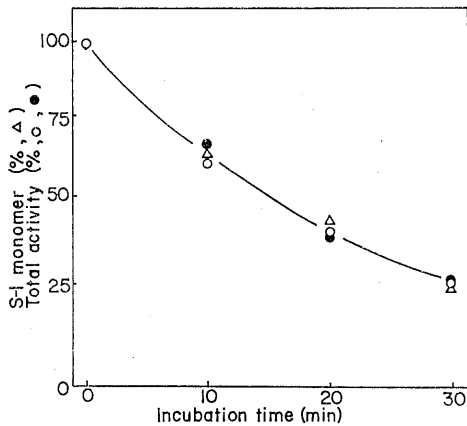


Fig. 6. Changes in the Ca-ATPase activity and the amount of S-1 monomer during heat-treatment.

Carp S-1 was incubated at 30°C as described in Fig. 1, and the clear supernatant was obtained by centrifugation as in Fig. 4. The total Ca-ATPase activity of turbit whole S-1 solution (○) and that of the supernatant (●) were obtained. Ca-ATPase was assayed as in Fig. 1. The remaining S-1 monomer (Δ) during heat-treatment was estimated from elution profile of heated S-1 on Sepharose CL-4B as described in Fig. 5.

rose CL-4B のゲル濾過法で測定した。その結果を Fig. 6 に示す。なお、この実験では S-1 溶液に濁度が生じた場合は遠心分離で除いてからゲル濾過に供した。その結果から 30°C における S-1 単量体の減少速度は Ca-ATPase の失活の速度、および、遠心分離で得られた上清中の同 ATPase 全活性の減少速度と一致した。また、この結果はウサギの S-1 の加熱変性の場合も同じであったが (結果は図示せず)、同様の結果は既に Kawakami らによっても報じられている。<sup>18)</sup> したがって Ca-ATPase 活性は S-1 単量体の量に依存し、濁度の本体である凝集体は云うまでもなく可溶化している多量体および二量体は、S-1 の変性の結果であることが確かめられた。逆に ATPase 活性の失活は S-1 単量体の減少を反映していることにもなる。

考 察

Mf タンパク質の Ca-ATPase 活性の熱安定性が魚類の環境水温に強くかかわっている事実が知られているので、本研究ではコイとウサギの S-1 の Ca-ATPase の熱変性速度がほぼ近似する条件下で、変性機構を比較検討した。そして、S-1 溶液 (0.5 M KCl pH 7.5) を加熱すると、いずれの S-1 の場合も濁度を生成するが、その生成にかかわる成分は S-1 の HC であり、LC を遊離した

HC 多量体が濁度の本体であることが明らかになった。コイに比べてウサギ S-1 の場合の方が加熱初期における濁度生成の速度が小さく, lag (遅滞) phase が検出されるのが特徴であった。なおウサギの S-1 の加熱初期における濁度生成が非常に緩慢な理由は, ゲル濾過の結果より, 0.5 M KCl に可溶性の S-1 二量体から多量体, さらに凝集体へ変化する速度が小さいためであるように推定される。

加熱によって濁度を生じた S-1 溶液では, S-1 HCl が重合して多量化し, 不溶化してゆくことが示されたが, このとき LC は解離して上清中に残る。本実験に用いた両 S-1 は二種のアルカリ軽鎖を含むが, 多少 LC-1 のほうが加熱による解離の程度が大きい傾向が認められた。

以上の事実から, コイ S-1 の熱変性においては, ATPase 活性を有している S-1 単量体が, 失活と同時に多量体に変わっていくが, その中間体と考えられる二量体の生成は極めて少なく, また, たとえ二量体が形成されたとしても多量体への変化が急速におこるものと推定した。この多量体は初め 0.5 M KCl に可溶であるが, さらに多量体から凝集体への反応が進むと, HC から LC が遊離し, HC どちらの凝集が濁度上昇をひき起こすと推定した。一方ウサギ S-1 では加熱に伴う二量体から多量体への変化がコイ S-1 に比べてかなり遅く, このことが濁度上昇の遅延に関与していると判断した。

#### 文 献

- 1) Y. Tonomura: in "Muscle Proteins, Muscle Contraction and Cation Transport", Univ. Tokyo Press, Tokyo, 1972, pp. 27-28.
- 2) 碓谷敏紀, 木村郁夫, 新井健一: 日水誌, **47**, 947-955 (1985).
- 3) 高士令二: 日水誌, **39**, 179-205 (1973).
- 4) J. J. Connell: *Biochem. J.*, **80**, 503-509 (1961).
- 5) A. Hasnain, I. Kimura, K. Arai, and T. Yasui: *Nippon Suisan Gakkaishi*, **42**, 687-695 (1976).
- 6) 高士令二, 室塚剛志, 新井健一: 日水誌, **40**, 1033-1041 (1974).
- 7) T. Tsuchiya and J. J. Matsumoto: *Nippon Suisan Gakkaishi*, **41**, 1319-1326 (1975).
- 8) 橋本昭彦, 小林章良, 新井健一: 日水誌, **48**, 671-684 (1982).
- 9) A. Hashimoto and K. Arai: *Nippon Suisan Gakkaishi*, **50**, 853-864 (1984).
- 10) 高士令二, 新井健一, 斎藤恒行: 日水誌, **36**, 169-172 (1970).
- 11) J. J. Connell: *Biochem. J.*, **58**, 360-367 (1954).
- 12) A. G. Weeds and B. Pope: *J. Mol. Biol.*, **111**, 129-157 (1977).
- 13) 新井健一, 川村久美子, 林千恵子: 日水誌, **39**, 1077-1085 (1973).
- 14) V. K. Laemmli and M. Favre: *J. Mol. Biol.*, **80**, 579-599 (1973).
- 15) A. G. Gornall, S. S. Bardwill, and M. M. Darid: *J. Biol. Chem.*, **177**, 751-766 (1949).
- 16) 副島正美, 菅原 潔: 生物化学実験法, 蛋白質の定量法, 東京大学出版会, 東京, 1971, pp. 79-85.
- 17) F. J. Kezdy and E. T. Kaizer: in "Methods in Enzymology" (ed. by G. E. Perlmann and L. Leonard), Vol. 19, Academic Press, New York, 1970, p. 73.
- 18) H. Kawakami, J. Morita, K. Takahashi, and T. Yasui: *J. Biochem.*, **70**, 635-648 (1971).