

熱安定性の異なる魚類ミオシンのカルパイン感受性の比較

誌名	日本水産學會誌
ISSN	00215392
著者	村元, 学 山本, 裕子 関, 信夫
巻/号	55巻5号
掲載ページ	p. 917-923
発行年月	1989年5月

熱安定性の異なる魚類ミオシンのカルパイン感受性の比較

村元 学, 山本 裕子, 関 伸夫

(1988年12月7日受付)

Comparison of Calpain Susceptibility of Various Fish Myosins in Relation to Their Thermal Stabilities

Manabu Muramoto,*¹ Yuko Yamamoto,*¹ and Nobuo Seki*¹

When myosins prepared from the skeletal muscles of seven different fish species and rabbit were incubated with calpain in the low salt solution at various temperatures, a myosin rod-like fragment ($M_r=150,000$ protein band on SDS-PAGE) was preferentially formed in all myosins examined and increased proportionally to the cleavage of myosin heavy chain. It was found that rabbit myosin, the most thermally stable of myosins was used, the most stable to proteolysis; and enhanced cleavage of fish myosins at lower temperatures. The calpain susceptibility of fish myosins was found to increase in species adapted to colder environmental temperatures. The apparent rate constants for cleavage of each myosin heavy chain at various temperatures were closely correlated with those for thermal inactivation of the ATPase of the same myosin, suggesting that the cleavage rates are a reflection of the conformational state in the head region, subfragment-1, of myosin molecule. Therefore, the stability of each myosin to thermal denaturation may be followed by this proteolysis.

カルパイン [EC 3.4.22.17] によるコイミオシンの分解部位とその速度はミオシンの存在状態によって著しく影響される。^{1,2)} 例えば、高塩濃度下でミオシンが単量体として存在しているときは、ミオシンは heavy meromyosin (HMM) と light meromyosin (LMM) 様の2断片に容易に限定分解される。しかし、低塩濃度下 (0.05 M NaCl) においてはミオシンはカルパインの作用をほとんど受けない。²⁾

一方、加熱変性ミオシンに対するカルパイン分解は低塩濃度下においても容易におこり、SDS-PAGE³⁾ によると $M_r=150,000$ を示す成分 (150 K 成分) が生成する。著者ら³⁾ はこの成分がミオシンのロッド様断片であることを明らかにした。

坂本ら³⁾ および関と高田⁴⁾ によると、150 K 成分は未変性ミオシンからの分解物ではなく、カルパインとのインキュベーション中に徐々に生成される熱変性ミオシンのカルパイン分解物であることが示されている。従って、過剰のカルパインの存在下におけるミオシンの分解 (150 K 成分の生成) 反応は、ミオシンの変性が律速段階となるために、150 K 成分の生成速度はミオシンの変性速度に

等しいことになる。

すでに魚類ミオシンの熱安定性は魚種による相違が著しく、魚の棲息環境温度と相関していることがミオシンや筋原繊維の ATPase の熱安定性、ミオシンの凝集速度などの測定から知られている。⁵⁻⁷⁾ 即ち、冷水域に棲む魚のミオシンは暖水域のものよりも不安定に変性しやすい。そこで棲息温度域の異なる数種の魚類からミオシンを調製し、過剰のカルパインの存在下でインキュベートすれば、ミオシンの安定性に依りてカルパインによるミオシンの分解 (150 K 成分の生成) が起こることが推測される。本研究はこのような推測に基づいて、ミオシンの安定性とカルパインによる分解速度の関係を明らかにしようとした。

実験方法

試料 実験には次の魚およびウサギを用いた。ティラピア *Tilapia mossambica*, カツオ *Euthynnus pelamis*, コイ *Cyprinus carpio*, シログチ *Agyrosomus argenteus*, マダイ *Chrysophrys major*, ホッケ *Pleurogrammus azonus*, およびニジマス *Salmo gairdnerii irideus*。カツオは

*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; EGTA, ethyleneglycol-bis (2-amino-ethylether) tetra-acetic acid

凍結魚を解凍して使用したが、それ以外は即殺または鮮度良好の氷蔵魚を用いた。

カルパインおよびミオシンの調製と活性の測定 カルパイン (II 型) はコイの背筋肉 (白筋) より、またミオシンは各動物の背筋肉より、いずれも坂本¹⁾ の報告に従って調製した。

カルパインのカゼイン分解活性¹⁾は、カゼイン (5 mg/ml)-5 mM CaCl₂-10 mM 2-メルカプトエタノール-0.1 M Tris·acetate (pH 7.0) から成る反応混液を用い、25°C で測定した。反応は終濃度 1.67% の過塩素酸を添加して停止し、これを 1,000×g で 20 分間、20°C で遠心分離し、上清の 278 nm の吸光値を測定した。この吸光値を 1 時間当たり 1.0 増大させる活性を 1 unit とした。

ミオシンの ATPase [EC 3. 6. 1. 3.] 活性は、Ca-ATPase 活性を 1 mM ATP-0.5 M KCl-20 mM Tris·maleate (pH 7.0)-5 mM CaCl₂ およびミオシンから成る反応混液を用い、25°C で測定した。生成した無機リン酸量を Fiske-Subbarow 法⁹⁾ (還元剤は *p*-methylaminophenol sulfate を用いた) で求め比活性を計算した。またミオシンの EDTA-ATPase 活性は反応混液中の CaCl₂ の代わりに 5 mM EDTA を用いて同様に測定した。

カルパインによるミオシンの分解 カルパインとミオシンの反応は低塩濃度下において、次の反応混液を用い、反応温度 5~40°C の範囲の一定温度で攪拌しながら行った。即ち、2 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-20 mM Tris·acetate (pH 7.0) に 0.5 unit/ml のカルパインを添加して反応を開始

し、終濃度 10 mM EGTA を添加して反応を停止させた。なお、ここで用いたカルパインの量はインキュベート中に生成する変性ミオシンを分解するには過剰量に当たるので変性ミオシンは直ちに分解されると思われる。²⁾

SDS-PAGE によるミオシン重鎖の定量 カルパインで消化したミオシンの SDS-PAGE を Weber と Osborn⁹⁾ の方法により、5% アクリルアミドゲルを用いて行った。染色は Coomassie brilliant blue R-250 で行った。脱色後、ミオシン重鎖および生成したタンパク質バンドの染色強度を島津 CS-910 型デンストメーターにより 640 nm と 700 nm の吸光値の差から求めた。¹⁾ ゲルカラム当たり 0~10 μg ミオシン量と染色強度が比例したのでこの範囲内で定量を行った。

ミオシン重鎖の分解速度 カルパインによるミオシン重鎖の分解は見掛けの一次反応に従うので、²⁾ これに基づいて速度定数を求めた。なお、タンパク質量はビウレット法¹⁰⁾によりウシ血清アルブミンを標準にして測定した。

実験結果

カルパインによる各種ミオシン重鎖の分解様式 数種の魚から調製したミオシンに 5°C~40°C の範囲の一定温度でカルパインを作用させた後、ミオシン重鎖の分解様式を SDS-PAGE によって分析し、比較した (Fig. 1)。

まずコイのミオシンとカルパインの反応を 20°C で行った場合 (Fig. 1, a), ミオシン重鎖は徐々に減少し、それに伴って 150 K 成分が主として増加、蓄積された。カ

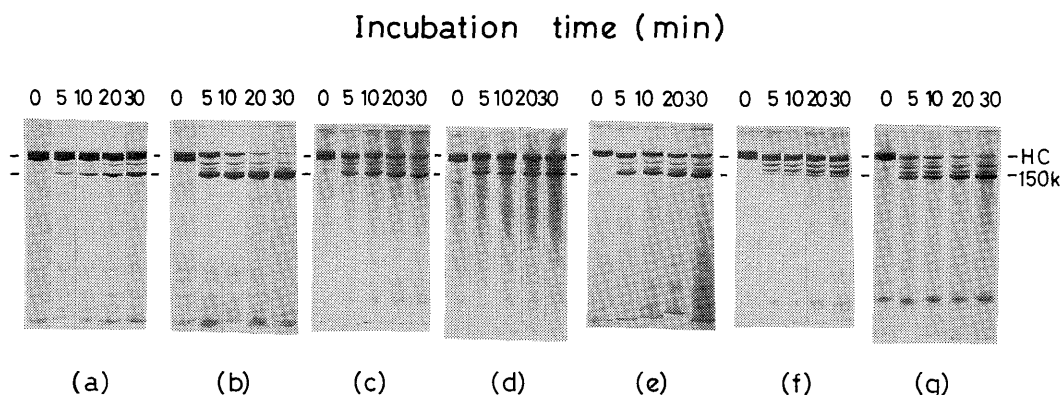


Fig. 1. Comparison of the fragmentation patterns of various fish myosins by calpain treatment. Myosin (2 μM) was incubated at different temperatures with calpain (0.5 unit/ml) in the medium containing 0.05 M NaCl, 5 mM CaCl₂, 5 mM 2-mercaptoethanol, and 20 mM Tris·acetate (pH 7.0). Calpain concentration used in this experiment was sufficient to obtain the maximum cleavage rate of myosin heavy chain. SDS-PAGE was performed on 5% acrylamide gel containing 0.1% SDS.

(a) carp myosin incubated at 20°C; (b) carp myosin incubated at 29°C; (c) skipjack tuna myosin incubated at 35°C; (d) tilapia myosin incubated at 35°C; (e) atka mackerel myosin incubated at 10°C; (f) white croaker myosin incubated at 20°C; (g) rainbow trout myosin incubated at 20°C; HC, myosin heavy chain; 150 k, Mr=150,000 protein band.

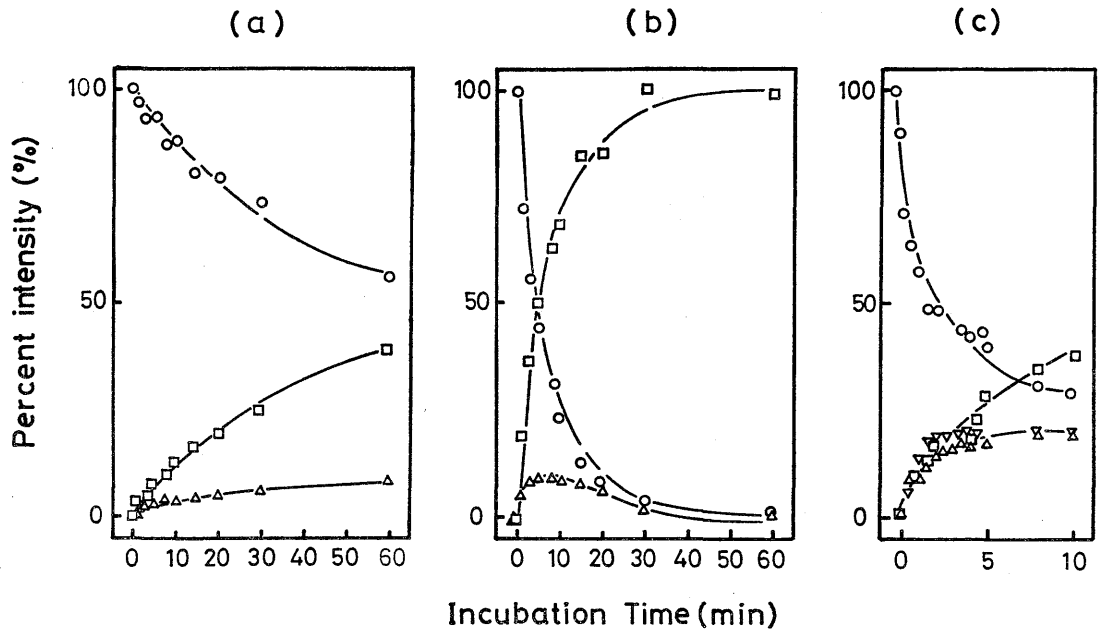


Fig. 2. Time course of the changes in myosin heavy chain and its fragments during calpain treatment.

Myosin was incubated with calpain under the same conditions as shown in the legend of Fig. 1. After SDS-PAGE, the amount of remaining myosin heavy chain and its fragments formed were estimated by quantitative densitometry. Percent intensity = (Intensity of each protein band / Intensity of the initial myosin heavy chain) \times 100

(a) carp myosin incubated at 20°C; (b) carp myosin incubated at 29°C; (c) rainbow trout myosin incubated at 20°C.

O, myosin heavy chain; Δ , Mr=170,000 protein band; ∇ , Mr=160,000 protein band; \square , Mr=150,000 protein band.

カルパインとの反応温度を 29°C に高めた場合 (b) は重鎖の減少速度は 20°C の場合よりも著しく速くなったが、主として 150 K 成分が蓄積される傾向は変わらなかった。Fig. 1, (a) (b) について、ミオシン重鎖と分解生成物の変化を定量的に SDS-PAGE の染色強度の相対値 (カルパインとの反応前の重鎖の染色強度に対する相対値) として求め Fig. 2, (a) (b) に示した。この図によるとカルパインによるミオシン重鎖の減少は主として 150 K 成分の増加量と対応していることが示された。次にカツオとティラピアのミオシンについて同様の実験を行った。カルパインとの反応を 25°C 以下で行った場合、これらのミオシン重鎖はコイと異なり、ほとんど分解されなかった。そこで、35°C で反応させた時のミオシン重鎖の変化をそれぞれ Fig. 1, (c) (d) に示した。両ミオシン重鎖ともコイの場合と似た変化を示し、主として 150 K 成分が生成蓄積された。なお、45°C 以上ではカルパインの失活が著しいために検討出来なかった。

一方、ホッケのミオシン重鎖の分解はカツオやティラピアのミオシンとは対照的に、カルパインとの反応を

10°C で行った場合にも容易に検出できた (Fig. 1, e)。ホッケの場合にも重鎖の減少に伴って主として 150 K 成分が生成、蓄積され、重鎖の分解様式はコイの場合と類似していた。なお、マダイミオシンの場合もコイミオシンの結果と同じ傾向を示した。

シログチとニジマスのミオシンをそれぞれ 20°C でカルパインと反応させた場合の SDS-PAGE の結果を Fig. 1, (f) (g) に示した。これらの図は (a)~(e) の図に比較すると、ミオシン重鎖の減少に伴って、150 K 成分の他に量的にかなり多くの 170 K と 160 K 成分が検出される点で異なっていた。シログチでは 150 K 成分の染色強度よりも 170 K と 160 K 成分の方が多少濃く染色されているように見える。ニジマスのミオシンはホッケのミオシンと同様に 10°C におけるカルパインとの反応においても容易に分解された。カルパインによるニジマスミオシン重鎖の減少と分解生成物の各タンパク質バンドの染色強度の変化を Fig. 2, (c) に示した。コイのミオシンの場合と比較して反応初期に 170 K と 160 K 成分の量が多いことが示されたが、約 4 分後には最大値に達

し、その後あまり変化しなかった。一方 150 K 成分はカルパイン反応に伴って増大が続いた。シログチミオシンの場合も同様の傾向を示した。

以上の結果から、カルパインによる各種ミオシン重鎖の分解様式はよく似ており、重鎖の減少に伴って主として 150 K 成分が生成された。一方、シログチとニジマスのミオシンでは 150 K 成分の他に反応初期に 170 K と 160 K 成分の生成量が多い傾向にあることが明らかになった。

カルパインによるミオシン重鎖の分解速度 Fig. 1 に示した結果からカルパインによる 150 K 成分の生成はミオシン重鎖の消失に対応することが示された。また、ミオシン重鎖の分解速度は魚種による相違があり、反応温度に強く依存しているように見える。坂本ら²⁾によるとコイのミオシン重鎖の分解は見掛けの一次反応に従うことが報告されているが、本研究においてもミオシン重鎖の分解は見掛けの一次反応になることが分かった。しかしコイのミオシン重鎖と分解様式が多少異なる結果が得られたシログチとニジマスについては 150 K 成分の生成とミオシン重鎖の減少との対応が問題となるので、反応の時間経過を Fig. 3 に示した(シログチはニジマスと類似しているのここには示さなかった)。ニジマスのミオシンは反応の初期に重鎖の極めて速い減少がみられた。この速い減少の原因を推測すると、Fig. 2 (c) に示したように反応初期に 170 K と 160 K 成分がコイなどに比べて大量に生成されることに基づいていると考えられる。しかし、170 K と 160 K 成分の生成量はおよそ 5 分以内にほぼ最大値に達しそれ以上増加しない。150 K 成分はその後も増大するので重鎖の遅い減少と、その後生成される 150 K 成分の生成とが対応しているように思われる。そこでニジマスとシログチではミオシン重鎖の減少速度定数を求める際に、遅い反応の部分から求めることにした。

カルパインによる各魚種のミオシン重鎖の減少速度定数 (k) を各インキュベート温度ごとに求めて Table 1 に示した。これによると、例えば 29°C においてはティラ

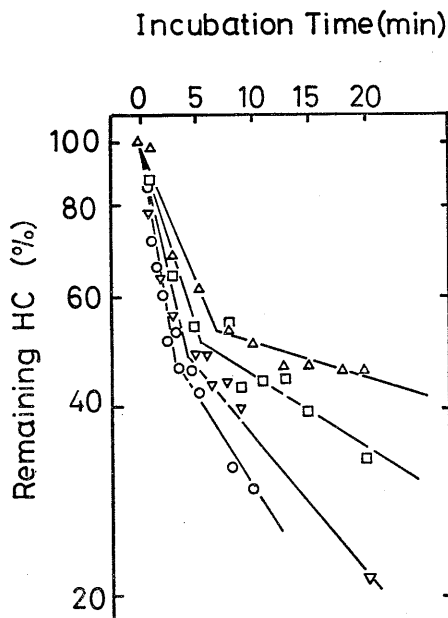


Fig. 3. Semilogarithmic plots of the decrease in myosin heavy chain versus incubation time with calpain.

Rainbow trout myosin was incubated under the same conditions as shown in Fig. 1 except for incubation temperature.

△, incubated at 5°C; □, incubated at 10°C; ▽, incubated at 15°C; ○, incubated at 20°C.

ピアのミオシン重鎖の分解速度定数に比較してカツオでは 3 倍、グチとコイのミオシンでは 30 倍、マダイで約 40 倍大きくなっており、これらの順にカルパインで分解され易いことを示している。すなわち、カルパインとのインキュベートの温度が同じでも魚種によるミオシンの分解速度は著しく相異することが明らかになった。

次に、温度の影響をみると、カルパインとの反応を種々の温度でおこなった場合、コイのミオシン重鎖の分解速度定数は 15°C で $0.5 \times 10^{-4} \cdot s^{-1}$ であるが 20°C では 3.2 倍に、25°C では 12.6 倍に、29°C では 49 倍と温

Table 1. Cleavage rates for various fish myosin heavy chains by calpain treatment at different temperatures. The assays were carried out as described in the legend of Fig. 1

Myosin	Rate constant $k \times 10^4 \cdot s^{-1}$							
	5°C	10°C	15°C	20°C	25°C	29°C	35°C	40°C
Rabbit						0.5	2.8	11.3
Tilapia						0.8	7.5	22.7
Skipjack tuna							2.6	12.8
Carp			0.5	1.6	6.3	24.5		
White croacker			0.8	2.2	6.4	23.5		
Red sea bream			2.0	4.7	12.2	31.7		
Rainbow trout	4.5	6.8	10.7	22.3				

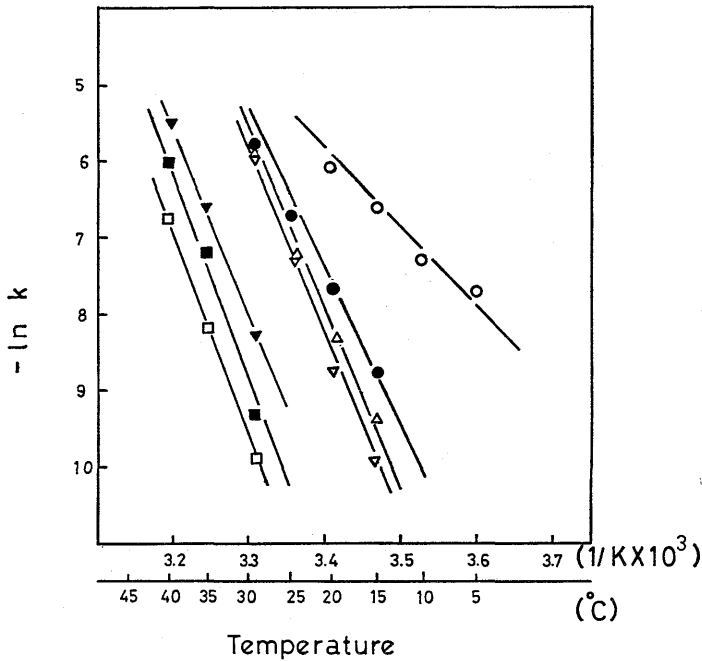


Fig. 4. Arrhenius plots of the cleavage of various fish myosin heavy chains by calpain treatment. Data are quoted from Table 1.

□, rabbit; ■, tilapia; ▼, skipjack tuna; ▽, carp; △, white croaker; ●, red sea bream; ○, rainbow trout.

Table 2. Activation energy for the formation of 150 k fragment from various myosins by calpain treatment. The activation energy was calculated from the slope of the each line indicated in Fig. 4

	Activation energy (kcal·mol ⁻¹)
Rabbit	54.5
Tilapia	50.5
Skipjack tuna	49.5
Carp	42.6
White croaker	41.1
Red sea bream	35.7
Rainbow trout	17.8

度の上昇と共に指数関数的に大きくなることが示された。このような傾向はコイ以外のミオシンについても同じであることが明らかである。

Table 1 の結果をアレーニウス・プロットにして Fig. 4 に示した。この図からカルパインによるミオシン重鎖の分解に及ぼす温度の影響は魚種ごとに異なり、ウサギ、ティラピア、カツオ、コイ、シログチ、マダイ、ニジマスの各ミオシンの順に低温下においても分解され易いことが示された。この反応の活性化エネルギーを Fig. 4 の直線の勾配から求めて Table 2 に示した。すなわち、ウ

サギのミオシンから 150 K 成分を生じる反応では 54.5 kcal·mol⁻¹ と大きく、次いでティラピア、カツオの順となり、コイとシログチはほぼ等しく約 42 kcal·mol⁻¹、マダイでは更に小さく、ニジマスのミオシンでは約 18 kcal·mol⁻¹ である。

以上の結果から、暖水域に棲息する魚で熱安定性の高いミオシンほどカルパイン分解を受け難く、冷水域に棲息する魚のミオシンは分解され易いことが示唆された。

ミオシンの Ca-ATPase の熱安定性 次に本研究に用いた各ミオシンの Ca-ATPase の熱安定性をカルパインとの反応 (0.05 M NaCl-5 mM CaCl₂-5 mM 2-メルカプトエタノール-20 mM Tris·acetate (pH 7.0)) と同じ条件で加熱後、常法により Ca-ATPase 活性を測定して Fig. 5 に示した。なお、ニジマスのミオシンの場合は失活が速く Ca-ATPase 活性のレベルが低くなり測定が困難となるために、EDTA-ATPase 活性で示してある。図のように各ミオシン ATPase の失活に及ぼす温度依存性からウサギ、ティラピア、カツオ、コイ、シログチ、マダイ、ニジマスの各ミオシンの順に不安定であることが明らかである。

Fig. 4 の結果は Fig. 5 の結果と傾向的に良く似ているので、カルパインによるミオシン重鎖の分解速度は、ミオシンの Ca-ATPase の熱変性速度と非常に強く相関

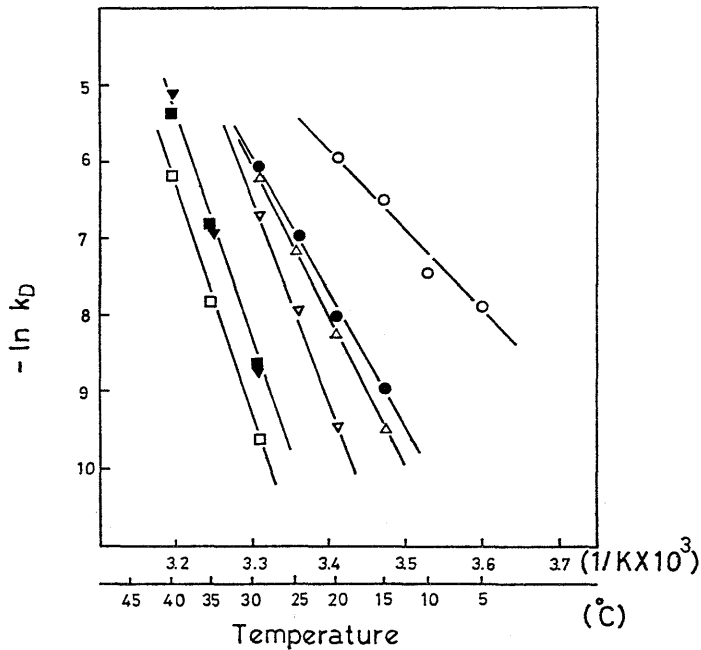


Fig. 5. Arrhenius plot of the rates of thermal inactivation of various fish myosin ATPases.

Myosin was pre-incubated without calpain at various temperatures under the same conditions as calpain treatment described in the legend of Fig. 1. Ca-ATPase activity remaining after various periods of pre-incubation was measured at 25°C in the medium containing 1 mM ATP, 0.5 M KCl, 20 mM Tris-maleate (pH 7.0), and 5 mM CaCl₂. In the case of rainbow trout myosin, EDTA-ATPase activity was measured instead of Ca-ATPase activity. Symbols for fish species are the same as in Fig. 4.

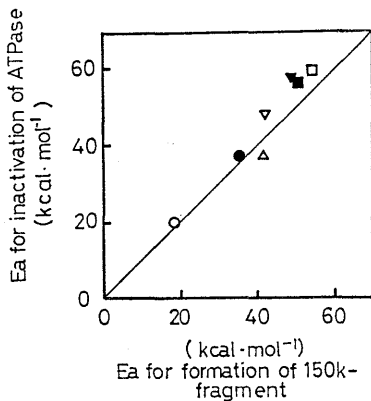


Fig. 6. The relationship between the activation energies for the inactivation of ATPase and for formation of 150 k fragment by calpain treatment.

Data were quoted from Figs 4 and 5.

Symbols for fish species are the same as in Fig. 4.

Ea, activation energy.

していることが推定できる。そこで、Fig. 5 からミオシン ATPase の失活における活性化エネルギーを求め、先に Table 1 に示したカルパイン分解から求めた活性化エネルギーとの関係を Fig. 6 に示した。これによると、ミオシンの ATPase の失活の活性化エネルギーの方が僅かに大きい傾向にあるが、ミオシンのカルパイン分解性との間には高い相関があることが認められた。

考 察

坂本ら²⁾ および関と高田⁴⁾ によると、コイのミオシンを低塩濃度下でカルパインとインキュベートしたときに生成される 150 K 成分は未変性ミオシンではなくインキュベート中に生成される熱変性ミオシンのカルパイン分解物であることが明らかにされている。本研究ではコイ以外の数種のミオシンについて同様の検討をおこなったところ、Fig. 1 に示したように、ティラピア、カツオ、ホッケおよび図示していないがマダイの各ミオシンについてはいずれもカルパインとのインキュベート中に主として 150 K 成分が生成されることから、コイと同じ傾向が認められた。しかし、シログチとエジマスのミオシンでは (Fig. 1, 2), 150 K 成分の他に 170 K 成分と 160 K

成分の生成が他の魚のミオシンよりもかなり多いことから、これらのミオシンは低塩濃度下においても HMM-LMM の結合部位¹⁾が露出していることが推測される。しかし、Fig. 2 (c) に示したように 170 K と 160 K の生成は反応の初期に限られており、インキュベーション時間が長くなると生成されなくなるところから、インキュベーション中にミオシンの変性により HMM-LMM 結合部位が隠蔽されるのであろう。一方 150 K 成分はインキュベーションの時間に伴って増大した。これらの結果から魚のミオシンは熱変性によりカルパインに特異的に分解される部位が露出するようになることが考えられる。著者ら²⁾は前報でこの部位はコイミオシンの subfragment-1 (S-1) 上にあることを明らかにしているので、S-1 部位の熱による構造変化とカルパインによる分解が密接に関連していることが示唆された。

ここで用いた魚のミオシンからのカルパインによる 150 K 成分の生成速度はミオシン重鎖の減少速度に近似でき、さらに 150 K 成分の生成反応はミオシンの変性段階が律速であるので、ミオシン重鎖の減少速度はミオシンの変性速度にほかならない。即ちミオシン重鎖の減少速度からミオシンの変性速度が測定できることになる。これによれば Fig. 4 に示したようにウサギ、ティラピア、カツオ、コイ、シログチ、マダイ、ニジマス³⁾の順に暖水域に棲息する魚のミオシンの方が冷水域のものよりもカルパインで分解され難く、即ち熱変性に対しても安定であることが示された。

各ミオシンのカルパイン分解速度 (Fig. 4) から推定した熱変性速度とミオシンの ATPase 失活速度を指標として求めた熱変性速度の温度依存性が似ていること、また両者の活性化エネルギーが良く相関している (Fig. 6) ことから、ATPase の失活を引き起こすようなミオシンの高次構造変化の速度と、カルパインで分解を受け易いような高次構造への変化速度は殆ど同じであることが明らかとなった。すなわち、カルパイン分解部位と ATPase 活性部位は共にミオシン頭部 (S-1) に存在しているので熱による S-1 の高次構造変化を同じように受けるのであろう。

ニジマスやシログチについては反応の初期に多量の 170 K と 160 K 成分の生成があるにもかかわらず、

ATPase 活性の低下は見掛け上、一次反応になっているという事実は、これらの成分が ATPase 活性をもつことを示唆している。事実、坂本⁴⁾によると 170 K 成分 (HMM 様断片に相当する) は ATPase 活性を保持していることが既に知られている。本研究の結果によると 150 K 成分の生成速度 (即ちミオシン重鎖の減少速度) を指標にして魚類ミオシンの変性速度が測定できる可能性が示された。換言すれば魚を貯蔵したり、利用、加工中に 150 K 成分が検出されるようなとき*には、すでに肉中のミオシンの一部は変性を受けており、また同時にプロテアーゼが存在している可能性を示している。しかし肉中で生成される 150 K 成分と本研究で述べた 150 K 成分が同一のミオシン分解物であるという証明はまだされていないので今後の検討が必要である。また、150 K 成分がカルパインによる変性ミオシンの特異的分解物であるのか、あるいは多くのプロテアーゼに共通の生成物であるのか明らかでないので、現在、多種類のプロテアーゼによる変性ミオシンの分解様式について検討を行っている。

本研究の一部は文部省科学研究費補助金によっておこなったので記して感謝する。

文 献

- 1) 坂本慎一, 関 伸夫: 日水誌, **51**, 1551-1557 (1985).
- 2) 坂本慎一, 高田早苗, 関 伸夫: 日水誌, **53**, 439-444 (1987).
- 3) 村元 学, 関 伸夫: 日水誌, **54**, 1055-1061 (1988).
- 4) 関 伸夫, 高田早苗: 日水誌, **53**, 457-463 (1987).
- 5) 橋本昭彦, 小林章良, 新井健一: 日水誌, **48**, 671-684 (1982).
- 6) J. J. Connel: *Biochem. J.*, **80**, 503-509 (1961).
- 7) I. A. Johnston and Goldspink: *Nature*, **257**, 620-622 (1961).
- 8) C. H. Fiske and Y. Subbarow: *J. Biol. Chem.*, **60**, 375-400 (1925).
- 9) K. Weber and M. Osborn: *J. Biol. Chem.*, **244**, 4406-4412 (1969).
- 10) A. G. Gornall, C. J. Bardawill, and M. M. David: *J. Biol. Chem.*, **177**, 751-766 (1949).

* 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. 277.