

コイ筋原線維を出発材料としたミオシン・サブフラグメント-1 の簡便な調製法

誌名	日本水産學會誌
ISSN	00215392
著者	今野, 久仁彦 加藤, 早苗 江湖, 正育
巻/号	56巻11号
掲載ページ	p. 1885-1890
発行年月	1990年11月

コイ筋原線維を出発材料としたミオシン・サブフラグメント-1 の簡便な調製法

今野久仁彦, 加藤早苗, 江湖正育

(1990年5月10日受付)

Rapid Method for Isolation of Myosin Subfragment-1 from Carp Myofibrils

Kunihiko Konno,* Sanae Kato,* and Masayasu Eko*

A rapid method for isolation of myosin subfragment-1 (S-1) from carp myofibrils (Mf) was developed. For preparation of S-1, Mf were digested by α -chymotrypsin in a medium of 0.05 M KCl (pH 7.0) containing 1 mM EDTA, cleaving at a head-tail junction of the myosin molecule. S-1 was dissociated from F-actin upon Mg-pyrophosphate addition. Crude S-1 was obtained in the supernatant after centrifugation, then purified by $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ fractionation between 40 and 50% saturation, and by Sephacryl S-300 gel filtration. Since the amount of S-1 produced from thermally treated Mf was proportional to the remaining Ca-ATPase activity of Mf, it was concluded that S-1 was produced only from native myosin contained in Mf. Therefore, partially denatured muscle such as frozen or stored muscle can be used as a starting material for S-1 preparation. This also suggests the possibility that the native myosin content in muscle can be estimated from the amount of S-1 produced by the chymotryptic digestion of Mf.

熱安定性の異なる魚類ミオシンの構造をミオシンの頭部サブフラグメント-1 (S-1) を用いて研究し、加熱に伴う立体構造の変化においても差が見いだせることを報告した。¹⁻³⁾ 目的によってはミオシンそのものを用いるより、水溶性の S-1 を用いる方が都合がよい場合がある。しかし、S-1 は従来ミオシンから調製されているが、その出発材料であるミオシンを、不安定な魚種から調製するだけでも非常に困難であることが既に知られている。⁴⁾ そこで、本研究ではミオシンの代わりに筋原線維 (Mf) を出発材料として用いて、不安定な魚種からも可能な S-1 の調製法を開発しようとした。この S-1 調製法の原理は既にウサギでよく知られているが、^{5,6)} それを魚類に応用し、さらにこの方法の有用性についても明らかにした。そしてミオシンの消化条件を変えるとヘビメロミオン (HMM) も調製可能であることも見いだした。

実験方法

コイ *Cyprinus carpio* (約 1 kg) は活魚を入手し、Mf は加藤らの方法に準じて調製したが、⁷⁾ α -キモトリプシ

ン消化のため、0.05 M KCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.0) に懸濁した。Mf からの S-1 単離の原理は、⁸⁾ i) EDTA 中で Mf を α -キモトリプシン消化し、ミオシン分子を S-1, ロッドの接続部位で選択的に切断する, ii) ピロリン酸 (PPi)-Mg により S-1 をアクチンからの解離をさせる, そして, iii) 硫酸分画および Sephacryl S-300 ゲル濾過法で精製する。詳細は結果の項で述べる。また、Mf からの HMM の調製は Mf の消化条件を 0.5 M KCl, pH 7.0, 1 mM CaCl_2 とし、HMM-ライトメロミオン (LMM) 部位で選択的に切断することを除けば、^{5,8)} 他は S-1 の調製法とほぼ同じである。

SDS-PAGE は 10% ポリアクリルアミドを用いて前報に準じて行った。⁹⁾ また消化物中の各生成物はクーマシーブルー R250 で染色の後、各バンドの染色強度を島津 CS-910 TLC Scanner を用いて定量した。

結 果

Mf からの S-1 の単離法の確立 すでに前報においてコイミオシンのキモトリプシン消化性について検討し、ウサギミオシンと同じく、フィラメント状態のミオシン

* 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).

略号: SDS-PAGE, sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis; PMSF, phenylmethylsulfonyl fluoride; DTT, dithiothreitol; DTNB, 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoic acid.

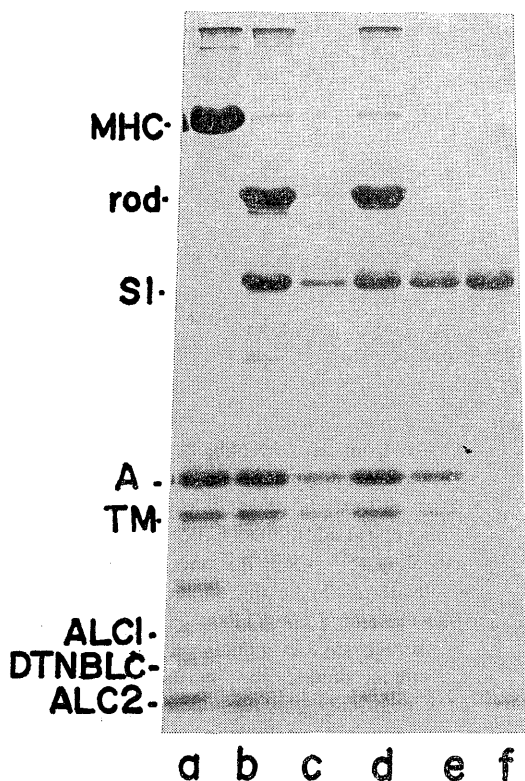


Fig. 1. Preparative steps of S-1 from carp myofibrils.

SDS-PAGE pattern of each preparative step of S-1 was analyzed. (a), carp myofibrils, (b), α -chymotryptic digest of myofibrils (digestion: 1/500, w/w, 20°C, 30 min), (c), soluble fractions of the digest, (d), insoluble fraction of the digest, (e), crude S-1 released from the digest, and (f), purified S-1 by $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ fractionation. SDS-PAGE was conducted with 10% polyacrylamide in the presence of 0.1% SDS. MHC, rod, S-1, A, TM, ALC1, DTNB-LC, and ALC2 are myosin heavy chain, myosin rod, subfragment-1, actin, tropomyosin, alkali light chain 1, DTNB light chain, and alkali light chain 2, respectively.

では EDTA 存在下での消化で S-1 と尾部に選択的に切断されることを述べた。⁹⁾ Mf のキモトリプシン消化によるミオシンからの S-1 の生成を SDS-PAGE により検討したところ, 1/500 (w/w) のキモトリプシンを用い, 20°C で 60 分消化すれば, ミオシンはほとんど消失し, S-1 になることを認めた (Fig. 1)。消化を 0.3 mM PMSF で停止後, 20,000×g 20 分遠心分離し, 水溶性画分を除き, 沈殿に S-1 を含む画分を集めた。この条件では S-1 を含む画分を集めた。この条件では S-1 はアクチンに結合しているの, 沈殿に回収され, 上澄みにキモトリプ

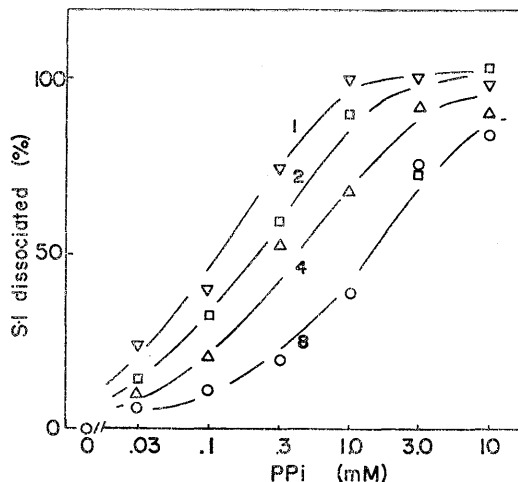


Fig. 2. Release of S-1 from α -chymotryptic digest upon addition of Mg-PPi.

Carp myofibrils were digested as in Fig. 1. S-1 in the digest was allowed to release upon addition of various concentrations of PPi with 10 mM MgCl_2 . S-1 released and recovered in the supernatant after centrifugation was estimated from the staining intensity of S-1 heavy chain band. Concentrations of myofibrils digest used are 1 mg/ml (Δ), 2 mg/ml (\square), 4 mg/ml (∇), and 8 mg/ml (\circ). A relative ratio to the S-1 in the digest was plotted.

シンや低分子量成分を除くことができる。同じ溶液に懸濁した沈殿に, 10 mM MgCl_2 存在下, PPi を加え, 20,000×g 30 分遠心分離し, アクチンから解離した S-1 を上澄みに回収した (Fig. 1)。この PPi による S-1 の解離の程度は Mf 濃度と PPi 濃度に依存することを認め, 両者の関係を Fig. 2 に示した。解離した S-1 の量は遠心分離で得た上澄み中の S-1 重鎖 (HC) の量を SDS-PAGE により定量し, Mf 消化物中の S-1 HC 量に対する割合として示した。この結果によると, S-1 の解離に必要な PPi 濃度は Mf 濃度にはほぼ比例し, 50% 解離を引き起こす PPi 濃度で比べると, 1 mg/ml の Mf では約 0.1 mM であるのに対し, 10 mg/ml の Mf では約 1 mM であり 10 倍高濃度の PPi を必要とした。すなわち, よく知られているように, ミオシンのアクチンからの解離はミオシンへの PPi 化学量論的な結合が必須であることを示している。⁹⁾ 実際の S-1 の調製では PPi-Mg の溶解度の事を考慮し, 10 mg/ml 程度の Mf を用い, 10 mM PPi-Mg を用いた。また PPi-Mg の代わりに ATP-Mg も試みたが, 途中で分解されること, あまり高濃度 (10 mM) の添加ではミオシン尾部まで溶解してしまうことを見いだしたので, PPi の方が好ましいと判断した。この上澄みの S-1 画分には不純物として少量のア

Table 1. Ca-ATPase activity of S-1 prepared from various types of material with different digestion periods

Muscle	Digestion time (min)	Ca-ATPase activity ($\mu\text{mol Pi}/\text{min}/\text{mg}$)
Fresh	5 (17)	0.43
	10 (32)	0.44
	30 (68)	0.55
	60 (90)	0.51
	90 (97)	0.43
Frozen	15	0.48
	30	0.49
Stored	15	0.41
	30	0.42
	60	0.41

Myofibrils were prepared from fresh, frozen (-20°C for 6 months), and stored (0°C for 1 month) muscles, and were digested by using α -chymotrypsin (1/500, w/w) at 20°C for various period. S-1 was isolated from the digest as in Fig. 1, and its Ca-ATPase activity was assayed. The assay conditions are 0.5 M KCl, 25 mM Tris-maleate (pH 7.0), 5 mM CaCl_2 , and 1 mM ATP at 25°C . Numbers in the parenthesis are degree of myosin digested.

クチンとトロポミオシンが検出されたが (Fig. 1), 40~50% 飽和硫酸画分を集めるとアクチンは 40% 未満に、トロポミオシンは 50% 以上に除くことができた。この硫酸を透析で除くより、短時間で終了すること、調製中に生じる可能性のある S-1 凝集物をも同時に除くことができるゲル透過の方が優れていた。少量の 0.1 M KCl, pH 7.5, 0.1 mM DTT に溶解した後、同液で緩衝化した Sephacryl S-300 に供した。Sephacryl S-300 のゲル透過溶出図から判断すると、コイ S-1 については 95% 以上のタンパク質は S-1 単量体の位置に得られ、凝集体などは非常に少ないと判断した。

この調製法の有効性を知るため、Mf の消化時間を変えたり、鮮魚以外に凍結、氷蔵魚についても検討した。表 1 にその結果を示す。まず 5 分から 90 分に至るまで消化時間を変え、得られた S-1 の Ca-ATPase 活性を比較した。消化時間の違い、すなわち Mf 中ミオシンの消化率が変わっても活性値に大きな差はなく、特に短時間消化した方が高い活性値が得られる訳ではなかった。なお、Mf 中のミオシンの消化の程度は消化 Mf のミオシン HC の残存量から算出した。この場合、約 30 分の消化でミオシンの約 70% が消化されていた。また、表 1 には -20°C で約 6 ヶ月凍結した筋肉、あるいは 1 ヶ月氷蔵した筋肉から Mf を調製し、それを出発材料として S-1 を調製した場合も示したが、その Ca-ATPase 活性にはあまり差は認められなかった。またゲル透過溶出図形もほとんど変わらないので、S-1 にはこれら材料の差が反映されないことが結論された。またこの Ca-ATPase 活性の値は新鮮なミオシンから調製したものと

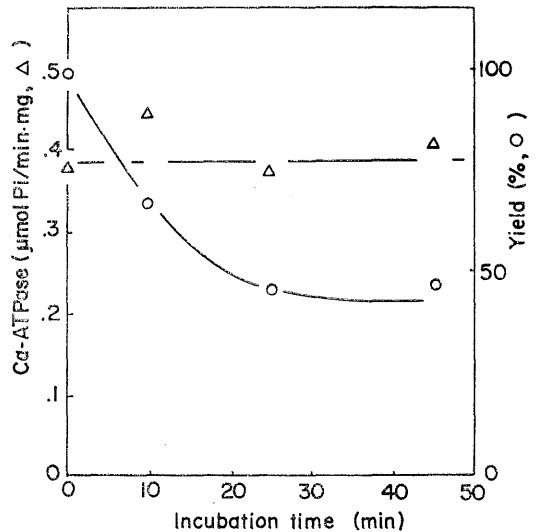


Fig. 3. Yield and Ca-ATPase activity of S-1 isolated from heated myofibrils.

Carp myofibrils (10 mg/ml, 20 ml) were heated at 40°C , and S-1 from each thermal treated myofibrils was isolated as in Fig. 1. The relative yield of S-1 (\circ) to that from control myofibrils and Ca-ATPase activity of S-1 (Δ) were both measured.

も差がないことを認めている。

Mf の変性と S-1 の生成 この方法で調製された S-1 にはその出発材料の変性の度合いが反映されない可能性が高いことが推定された。それを確かめるため、新鮮肉から調製した Mf (10 mg/ml) を 40°C で 45 分に至るまで加熱した後、S-1 を調製した。得られた S-1 の収量と、Ca-ATPase 活性を Fig. 3 に示した。Mf の加熱処理から S-1 の調製までかなりの段階があり、収量に関しては定量的な取り扱いが難しいが、Sephacryl S-300 ゲル透過で単量体として得られた S-1 画分の収量は加熱時間が長いほど少なく、30 分の加熱でその収量は約 1/2 になった。しかし、Ca-ATPase 比活性には出発材料の加熱の影響は認められなかった。これらの結果は出発材料である Mf 中のミオシンの一部が変性していても、そこから得られた S-1 は未変性であることを強く示唆する。言い換えると、S-1 は Mf 中に残存していた未変性ミオシンからしか生成されることが示された。

そこで S-1 生成量とミオシン変性の関係をより定量的に検討しようとした。まず、コイ Mf を 40°C で種々の時間加熱し、Ca-ATPase の失活を促した。その後、EDTA 中でミオシン HC が消失する程度までキモトリプシン消化した。

この消化物に見いだされるミオシン由来の S-1 HC とロッド、および消化を受けずに残存するアクチン量に注

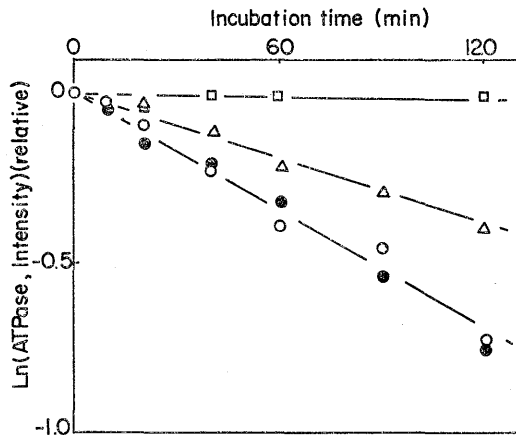


Fig. 4. Change in the amount of S-1 production from heated carp myofibrils.

Carp myofibrils (2 mg/ml) in 0.1 M KCl, pH 7.5 were thermally treated at 40°C. Thus heated myofibrils were digested by chymotrypsin under the conditions of 0.05 M KCl, pH 7.0, 1 mM EDTA using 1/500 (w/w) of chymotrypsin for 30 min at 20°C. The amount of S-1 (○), rod (△), and actin (□) survived in the digest were estimated from SDS-PAGE of the digest. The relative amount to that from unheated myofibrils in logarithmic values were plotted. The remaining Ca-ATPase of myofibrils was also measured (●).

目し, SDS-PAGE により定量した。そして未加熱 Mf の消化物で検出される量に対する相対値として表し, その対数値を加熱時間に対してプロットした。Fig. 4 に示すように, いずれの量の変化も加熱時間に対して, 直線となり, 一次反応として解析可能であることがわかった。Fig. 4 中に Mf の Ca-ATPase 失活の経時変化も示したが, S-1 生成量の減少速度は Ca-ATPase の失活速度と一致した。それゆえ S-1 は Mf に残存する未変性ミオシンから定量的に生成されるという推定は支持された。なお, 先にコイ S-1 で加熱変性するとトリプシン感受性が高まり, S-1 HC はすべて小断片化されることを報告している⁸⁾ので, 変性ミオシンの S-1 部分はキモトリプシンにより同様に小断片化されたと思われる。ミオンロッドに相当するバンドの減少速度は, S-1 の減少速度より小さく, 約 1/2 であったが, 加熱によりミオン頭部のみならずミオシンの尾部も構造変化を起こしていることが推定され, 先の報告¹⁰⁾と一致した。またアクチンも変性して高次構造が破壊されるとキモトリプシンにより小断片化されることが知られているが,¹¹⁾ 加熱 Mf の消化物のアクチン量はほとんど減少していないので, この条件の加熱では Mf 中のアクチンには変性がほ

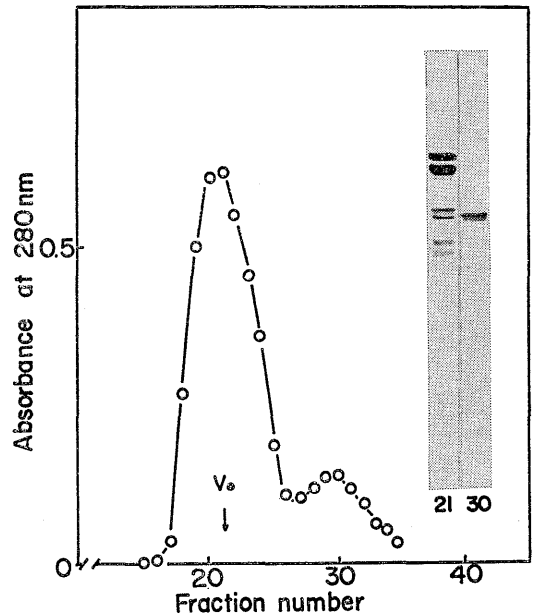


Fig. 5. Sephacryl S-300 elution profile of heavy meromyosin from carp myofibrils.

Carp myofibrils in 0.5 M KCl, pH 7.0, 1 mM CaCl₂ were digested by chymotrypsin (1/400, 10 min at 20°C). KCl concentration was diluted to 0.05 M by addition of 10 mM MgCl₂, and HMM bound to F-actin was collected in the pellet, and HMM was leached upon PPI-Mg addition (10 mM). Crude HMM fraction was collected by ammonium sulfate fractionation between 40 and 50% saturation. Finally, HMM was purified on Sephacryl S-300 column (1×50 cm, 1 ml/tube) equilibrated with 0.1 M KCl, pH 7.5, containing 0.1 mM DTT. Two fractions appeared were analyzed by SDS-PAGE, and are shown in the figure.

とんど起こらないことが推定された。

Mf からの HMM の調製 S-1 の調製法を応用して Mf から HMM の簡便な調製法も確立することができた。すでに前報で, 0.5 M KCl に溶解したコイ単量体ミオシンを Ca 存在下, キモトリプシンで消化すると HMM と LMM 部分で主に切断が起こることを述べた。⁸⁾ まず Mf に KCl を加えて, 0.5 M KCl, pH 7.0, 1 mM CaCl₂ 溶液とした。キモトリプシン消化 (1/500, 20°C, 10 分) した後, 10 mM MgCl₂ を加えて KCl 濃度を 50 mM まで低下させアクチン-HMM を沈殿に集めた。この沈殿を同溶液に懸濁させ, 10 mM PPI-Mg を添加して遠心分離し, アクチンから解離した HMM を上澄みに得た。硫酸分画 (40~50% 飽和) で部分精製した後, Sephacryl S-300 のゲル透過に供した。溶出図形を

Fig. 5 に示すが, Vo に検出される大きなピークと遅れて小さなピークが得られた。ATPase 活性および, SDS-PAGE の結果から Vo は HMM, 二番目のピークは S-1 に相当すると結論した。HMM の Ca-ATPase 比活性は, 0.5 M KCl, 25°C の条件で約 0.155 $\mu\text{mol Pi}/\text{min}/\text{mg}$ であった。これをミオシン頭部当たりの活性に計算し直すと, 0.458 となり S-1 のそれに近い値であった。HMM の SDS-PAGE から, この HMM 標品はトリプシンによる HMM と異なり,²⁾ その内部開裂の程度が少ないことが特徴であり, ミオシンから得たものと一致した。⁸⁾ すでに我々はコイミオシンでは十分量の Ca があっても S-1 とロッドの部分でかなりの切断が起こり, この部分の構造が弱いと推定したが, ここでもそれが支持された。⁹⁾ それゆえ, HMM の純化にはゲル濾過の操作は省けなかった。

考 察

すでに我々はミオシン S-1 を用いてミオシン頭部の内部構造を比較生化学的に検討したところ, 熱安定性がかなり違うのに非常に共通していることを明らかにした。^{2,9)} これを多くの魚種について検討しようとする時, 問題が生じて来る。すなわち, S-1 を調製するためにはまずミオシンを調製する必要があるが, いわゆる不安定な魚種ではミオシンの調製さえ困難な場合がある。⁴⁾ この問題を解決するため, 本報告ではミオシンより安定で調製の容易な Mf を出発材料とし, ミオシンを経由しないで S-1 を短時間で調製できる簡便で実用的な方法を開発した。参考にしたのはウサギでの知見, コイミオシンのキモトリプシン消化性である。今回開発した方法を用いれば, ゲル濾過を行っても一日で S-1 の単離精製が可能であり, ミオシンそのものの調製よりも短時間 (約 8 時間) で終了した。また大量の S-1 (~100 mg) が必要な場合は, Sephacryl S-300 でのゲル濾過に大型のカラム (2×90 cm) を用いる必要があったが, それでも翌朝には精製 S-1 として使用可能であった。今回用いたコイの場合には, Sephacryl S-300 のゲル濾過による精製操作を除いても純度的には問題がなかったため, 硫酸を除くためには Sephadex G-25 のゲル濾過による脱塩でも, また透析による方法でも可能であった。

魚類タンパク質で常に問題となるのは, 出発材料および生成物が変性していないかということであるが, 表 1 や Fig. 3, 4 に示すように S-1 は Mf 中の未変性ミオシンからしか生成されないということが明らかとなった。これは鮮魚が入手できない場合や変性が起こっている可能性のある魚肉からでも未変性の S-1 が単離でき, それを用いれば未変性のミオシン頭部の性質が検討できることを示しており, S-1 調製の範囲が広がったと思われる。

また木村は, スケトウダラすり身からミオシンの単離を行った場合, Ca-ATPase 全活性とミオシンの収量は相関が高く, しかも, 得られたミオシンの Ca-ATPase 活性には差がなく, ミオシンとして調製されるのは未変性ミオシンであると述べている。⁴⁾ S-1 の場合もキモトリプシンが変性および未変性を区別をしていることが知られた。また Mf のキモトリプシン消化物の SDS-PAGE から S-1 の生成量を推定することができるが, この量は肉中の未変性ミオシンの量と比例するので魚肉の変性程度の目安になる可能性がある。我々は凍結条件の悪いマグロ, 市販のイワシから Mf を調製し, S-1 をとるべくキモトリプシン消化し, その消化物を SDS-PAGE で調べたところ, ミオシン HC が分解消失量に比べ S-1 HC の生成量が非常に少ないことを認めており, 肉中でミオシンの変性がかんり進行し, 加熱筋原線維同様に S-1 が生成されずに小断片化されていることが推定された。魚肉の変性の程度を知る指標として, Ca-ATPase 活性はよい指標で, すり身の品質との高い相関があることが知られている。¹³⁾ ところが, 魚種によって Ca-ATPase 比活性が異なることが知られているので,¹⁴⁾ 異魚種間での比較や, 情報の全くない魚種では, Ca-ATPase の比活性の大小から変性の程度を類推することはできない。今回見いだしたキモトリプシン消化により Mf から生成する S-1 の量を SDS-PAGE により解析する方法は, この欠点を補うと思われるので, 今後応用できる可能性が高いと思われる。

目的によっては HMM も同様に調製可能であった。この標品の SDS-PAGE には HMM HC として 2~3 本のバンドが検出されるのみでトリプシン HMM より内部開裂が少なく優れた HMM 標品であることが明らかとなった。しかしミオシン頭部の内部構造を検討するには切断される箇所が多いので, S-1 を用いた場合より複雑になることが予想される。

本研究の遂行に当たり終始討論いただいた本学部新井健一教授に深謝致します。

文 献

- 1) 山本康博, 碓谷敏紀, 今野久仁彦, 新井健一: 日本誌, **55**, 727-732 (1989).
- 2) 浜井昌志, 吉岡武也, 今野久仁彦, 新井健一: 日本誌, **55**, 1283-1288 (1989).
- 3) M. Hamai and K. Konno: *Comp. Biochem. Physiol.*, **95B**, 255-259 (1990).
- 4) I. Kimura, M. Takahashi, E. Nagahisa, and T. Fujita: *Nippon Suisan Gakkaishi*, **48**, 251 (1982).
- 5) A. G. Weeds and B. Pope: *J. Mol. Biol.*, **111**, 129-157 (1977).
- 6) J. Borejdo and M. Werber: *Biochemistry*, **21**,

- 549-555 (1982).
- 7) 加藤 登, 野崎 恒, 小松一宮, 新井健一: 日水誌, **45**, 1027-1032 (1979).
 - 8) 加藤早苗, 今野久仁彦: 日水誌, **56**, 1877-1883 (1990).
 - 9) T. Yasui, T. Fukazawa, K. Takahashi, M. Sakanishi, and Y. Hashimoto: *J. Agric. Food Chem.*, **12**, 399-404 (1964).
 - 10) 今野久仁彦, 上田陽一: 日水誌, **55**, 1457-1462 (1989).
 - 11) K. Konno: *J. Biochem.*, **103**, 386-393 (1988).
 - 12) 木村郁夫, 高城茂展, 高橋康弘, 新井健一: 日水誌, **46**, 571-581 (1980).
 - 13) 川島孝省, 新井健一, 齋藤恒行: 日水誌, **39**, 525-532 (1973).
 - 14) 木村郁夫, 室塚剛志, 新井健一: 日水誌, **43**, 315-321 (1977).