アカザラガイ横紋閉殻筋ミオシンの加熱による調節軽鎖の可逆的解離

誌名	日本水産學會誌
ISSN	00215392
著者名	尾島,孝男 西田,清義
発行元	日本水産學會
巻/号	49巻8号
掲載ページ	p. 1257-1264
発行年月	1983年8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

Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries 49(8), 1257–1264 (1983)

アカザラガイ横紋閉殻筋ミオシンの加熱による調節軽鎖の可逆的解離*1

尾島孝男・西田清義

(1982年11月22日受理)

Reversible Dissociation of the Regulatory Light Chain from Akazara Striated Adductor Myosin by Heat Treatment

Takao OJIMA*2 and Kiyoyoshi NISHITA*2

Mg-ATPase of the striated adductor myosin of akazara scallop *Chlamys nipponensis akazara* was studied at various temperatures and calcium ion concentrations. At lower temperatures than 15°C, the myosin ATPase activity was totally sensitive to Ca^{2+}. Above 20°C, however, the activity was increased at Ca^{2+} concentrations lower than 10^{-6} M, resulting in the loss of Ca-sensitivity.

This phenomenon was attributable to the dissociation of the regulatory light chains from the myosin molecule during heat treatment.

The dissociation rate and extent of the light chains were affected by several factors; the temperature and ionic strength of reaction mixture, the concentration of divalent cations such as Ca^{2+} and Sr^{2+}, and the concentration of F-actin.

The heat-treated myosin was able to regain its full content of regulatory light chain as well as its full Ca-sensitivity of the Mg-ATPase activity and of the superprecipitation ability of actomyosin. The heat treatment was demonstrated to be useful as a new device to desensitize akazara myosin, even in presence of the physiological concentration of Mg^{2+}.

A. G. SZENT-GYÖRGYI ら[1,2]は，ホタテガイ横紋閉殻筋のCa-調節たん白質は，ミオシンに結合している分子量約17,000の軽鎖，すなわち調節軽鎖であることを明らかにした。また彼ら[3]は，ホタテガイのミオシンや筋原線維を0°Cにおいて EDTA-洗浄し Ca^{2+} や Mg^{2+} を除くと，ミオシン1モルに結合している2モルの調節軽鎖のうち1モルが解離し，Ca感受性を完全に失なうことを報告した。しかし著者らは，アカザラガイ横紋閉殻筋ミオシンは低温 (0～4°C) における EDTA-洗浄によって容易に2モルの調節軽鎖を失ない。同時にCa感受性を完全に失なうことを見出した。[4] これと同じ事実はその後，ホタテガイ横紋閉殻筋，[5] ハマグリ斧足筋，[6] さらにアカザラガイ平滑閉殻筋およびウバガイ平滑斧足筋[7]の各ミオシンで報告された。

また，最近になり，CHANTLER ら[8]は，ホタテガイ横紋閉殻筋筋原線維を高い温度 (30～35°C) で EDTA-処理すると，ミオシンの2モルの調節軽鎖は全て解離することを見出した。しかし，彼らは完全に調節軽鎖を除いた脱感作筋原線維は負の Ca 感受性を示し，また再結合によって Ca^{2+} 非存在下の Mg-ATPase 活性は軽鎖結合量に対して二相的に低下すると報告している。これらの結果はミオシンで得られた著者ら[4]の結果とは相違している。著者ら[9]は，アカザラガイ横紋閉殻筋ミオシンを30°Cで加熱すると，Mg-ATPase の Ca 感受性が低下することをすでに報告した。本研究では，その原因についてさらに詳細に検討した。

実験方法

アカザラガイ横紋閉殻筋ミオシンは前報と同様の方法で調製した。[4]

アカザラガイ横紋閉殻筋ミオシン調節軽鎖 (regulatory light chain: R-LC と略す) は次の方法で調製した。すなわち，アカザラガイのミオシンを 40 mM KCl, 10 mM potassium phosphate (pH 7.0), 10 mM EDTA 中 4°C で洗浄した後，遠心分離を行ない上清を得た。この上清を DEAE-Sephadex A-50 に吸着させ，batch 法により，0.1～1 M KCl で溶出される画分を集めた。この画分から 45～75% 硫安飽和で沈殿するたん白質を，40 mM KCl, 10 mM potassium phosphate (pH 7.0) に溶解し，同液に対し透析した後，最後に Sephadex

*1 本研究の大要は昭和55年度日本水産学会春季大会において発表した。

*2 北海道大学水産学部高分子化学講座 (Laboratory of Biopolymer, Faculty of Fisheries, Hokkaido Univ., Hakodate 041, Japan).

G-100 カラム (2.5 cm×75 cm) によりゲル沪過して精製した。

ウサギ骨格筋アクチンは SPUDICH and WATT の方法[10]により調製した。

ATPase (EC 3.6.1.3) の測定条件は，各図の説明文中に記したが，反応は特にことわらない限り 15°C で行ない，終濃度 6.7% のトリクロル酢酸を加えることにより反応を停止し，生成した無機リン酸を YOUNGBURG and YOUNGBURG の方法[11]によって比色定量した。なお反応混液中の遊離の Ca^{2+} 濃度は Ca-EGTA* 緩衝液[11]によって調節した。すなわち 0.1 mM EGTA と種々濃度の $CaCl_2$ を反応混液中に加え，Ca-EGTA 複合体の見かけの安定度定数を $5\times10^5\ M^{-1}$ [12] とし，次式[13]に従って遊離の Ca^{2+} 濃度を計算した。

$$[EG]_{total}=([Ca]_{total}-[Ca]_{free})\frac{1+K'[Ca]_{free}}{K'[Ca]_{free}}$$

ただし $[EG]_{total}$ は加えた EGTA の濃度 (M)，$[Ca]_{total}$ は加えた $CaCl_2$ の濃度 (M)，$[Ca]_{free}$ は遊離の Ca^{2+} の濃度 (M) である。また遊離 Sr^{2+} 濃度も，Sr-EGTA 複合体の見かけの安定度定数，$2\times10^2\ M^{-1}$ [11] を用いて同様にして求めた。

尿素ゲル電気泳動および SDS ゲル電気泳動はそれぞれ PERRIE ら[14]および WEBER and OSBORN[15] の方法に従い，8 M 尿素，7.5% ポリアクリルアミドゲルまたは 0.1% SDS, 8% ポリアクリルアミドゲルを用いて行なった。泳動後のゲルは 0.1% Coomassie Brilliant Blue R-250, 0.3% Amido Black 10 B または 0.5% Acid Fast Green の 50% メタノール・10% 酢酸溶液に浸漬して染色した後，7% 酢酸・5% メタノール溶液によって脱色した。ミオシンに含まれている 2 種類の軽鎖成分，すなわち R-LC と SH 基を有する必須軽鎖 (以下 SH-LC と略す) の組成分析は，尿素ゲル泳動図上のバンドの染色濃度を Shimadzu CS-900 デンシトメーターで測定することによって行なった。あらかじめ未処理ミオシンを用いて検討した結果，R-LC の染色率は SH-LC のそれに比べ約 5% 低いことが明らかになったので，染色密度比から軽鎖のモル比を計算するときは，これを補正した。

たん白質濃度は牛血清アルブミンフラクションVを標準たん白質とし Biuret 法[16]で比色定量した。

結果および考察

ミオシンおよび再構成アクトミオシンの Mg-ATPase 活性におよぼす温度の影響 ASADA ら[17]は，ハマグリミオシン Mg-ATPase はアクチンが共存しなくとも Ca 感受性を示すことを明らかにしたが，著者らはアカザラガイミオシン Mg-ATPase 活性を 15°C で測定すると高い Ca 感受性を示すが，25°C で測定すると Ca 感受性は低くなることを見出した。

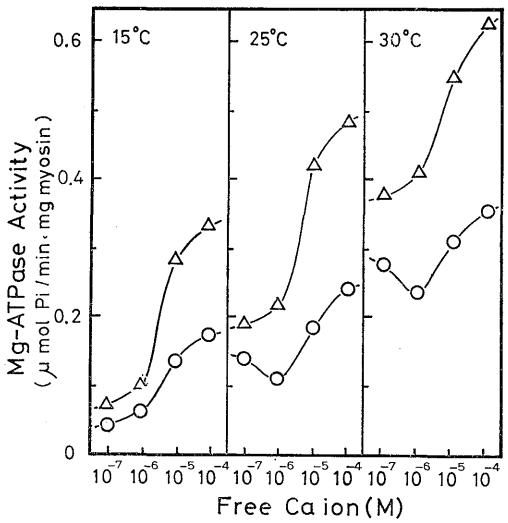

Fig. 1. Effect of temperature on Mg-ATPase activity of akazara adductor myosin and rabbit acto-akazara myosin at various Ca^{2+} concentrations.

Mg-ATPase activity was measured at 15°C, 25°C and 30°C in a medium containing 30 mM KCl, 20 mM Tris-maleate (pH 6.8), 2 mM $MgCl_2$, 1 mM ATP, 0.1 mM EGTA and various concentrations of $CaCl_2$, and 0.1 mg/m*l* akazara myosin (○) or 0.1 mg/m*l* akazara myosin plus 0.05 mg/m*l* rabbit F-actin (△). Free Ca^{2+} concentration was fixed with Ca-EGTA buffer[11].

そこでこの原因を明らかにするために，まず，アカザラガイミオシンの Mg-ATPase 活性およびアカザラガイミオシンとウサギアクチンから再構成したアクトミオシンの Mg-ATPase 活性を種々の濃度の Ca^{2+} 存在下で 15, 25°C および 30°C において測定した。その結果は Fig. 1 に示したように 15°C においては Ca^{2+} 濃度が 10^{-7} M から 10^{-4} M に増加するに従ってミオシン ATPase の場合もアクトミオシン ATPase の場合も次第に活性化された。一方，25°C および 30°C ではミオシンの活性は 10^{-6} M Ca^{2+} のときが，10^{-7} M や 10^{-5} M Ca^{2+} のときよりもむしろ低く，極小値を示した。また，10^{-7} M Ca^{2+} における活性値に対する 10^{-4} M Ca^{2+} における活性値の比も低下した。これは低い Ca^{2+} 濃度 (10^{-7} M) における活性が特異的に上昇したせいであるよ

* EGTA, Ethyleneglycol-bis (β-amino ethylether)-*N, N, N', N'*-tetraacetic acid.

うに考えられた。しかし，アクトミオシンの場合にはこのような現象は余り顕著ではなかった。この事実から，アカザラガイミオシン単独の Mg-ATPase 活性は 10^{-7} M Ca^{2+} 濃度下，高温では何らかの特異的変化を受けるが，アクチンはこの変化を抑制していることが推察された。

30°C 処理によるミオシン Mg-ATPase 活性の上昇におよぼす低濃度の Ca^{2+} および Sr^{2+} の影響　低い Ca^{2+} 濃度においてミオシン Mg-ATPase 活性が上昇する現象は，15°C で測定したときは認められないが，25°C および 30°C では明確に認められる。このことから，ミオシンを種々の Ca^{2+} 濃度で，あらかじめ 30°C，5 分間加熱した後急冷し，直ちに 15°C で ATPase 活性の Ca^{2+} 濃度依存性を測定した。その結果を Fig. 2(A) に示した。なお対照として，ミオシンを 30°C で加熱することなく 15°C で活性を測定した場合の結果も示した。また，上と同様に Ca^{2+} のかわりに種々の濃度の Sr^{2+} 存在下で活性を測定して，Fig. 2(B) に示した。その結果から，ミオシンを加熱処理することによって，低い濃度の Ca^{2+} または Sr^{2+} 存在下で，，Mg-ATPase 活性は上昇することが明らかになった。そこで加熱による ATPase 活性の増加量とイオン濃度との関係を Fig. 2(A) と (B) の結果から求め Fig. 2(C) に示した。それによると，Ca^{2+}，Sr^{2+}，いずれの場合においても，その濃度が上昇するにともない活性の変化量が小さくなるという類似の傾向を示したが，その活性上昇を抑制するためには Sr^{2+} の方が Ca^{2+} よりもおおよそ 10 倍高濃度を必要とした。以上の結果から，アカザラガイミオシンの Mg-ATPase 活性は既報[9] の Mg^{2+} と同様に，その測定温度と Ca^{2+}，Sr^{2+}，のような二価金属イオンの濃度によって影響を受けることが明らかになった。また低い Ca^{2+} 濃度下でミオシンを 30°C で加熱した後，0°C で放置したところ，加熱によって上昇した活性は 1～2 時間はそのままであったが，20 時間後には再び低下し，Ca 感受性も回復した。[9] したがって，上記の現象は可逆的であることが示唆されたが，Ca 感受性の回復する反応の速度はこの実験条件下では非常に遅いと考えられた。

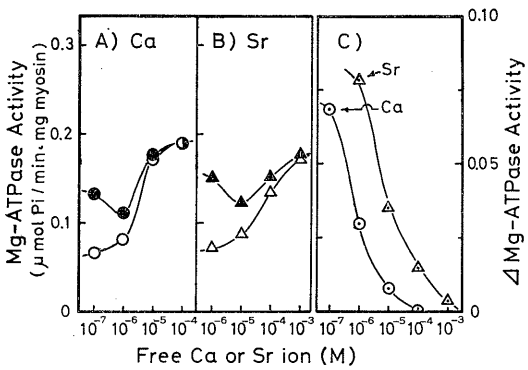

Fig. 2. Changes in Ca^{2+} or Sr^{2+} concentration dependence of akazara myosin Mg-ATPase activity by heat-treatment.

Akazara myosin was incubated at 30°C for 5 min, in the same Mg-ATPase assay medium as in Fig. 1, except that ATP was omitted. Immediately after cooling, Mg-ATPase activity of heat-treated (●, ▲) and untreated (○, △) myosin was measured at 15°C. Free Ca^{2+} or Sr^{2+} concentration was varied between 10^{-7} M -10^{-4} M (A), or 10^{-6} M-10^{-3} M (B), respectively. ΔMg-ATPase activity (C) indicates the difference between the Mg-ATPase activities before and after heat-treatment of myosin.

調節軽鎖の解離と ATPase の Ca 感受性の関係　次に，活性測定温度と Mg-ATPase 活性および Ca 感受性との関係をさらに詳細に検討し，結果を Fig. 3 に示した。その結果，アラザラガイミオシン Mg-ATPase 活性は生理的濃度の Ca^{2+} が存在する (10^{-4} M) 場合も，存在しない (10^{-7} M) 場合も，高温になるに従って上昇するが，Ca 感受性は 5～15°C の間でほぼ一定であり，20°C 以上になると急激に低下することが示された。Ca 感受性がこのように急激に低下する理由として，ミオシンの脱感作，すなわち R-LC の解離[4] が考えられたの

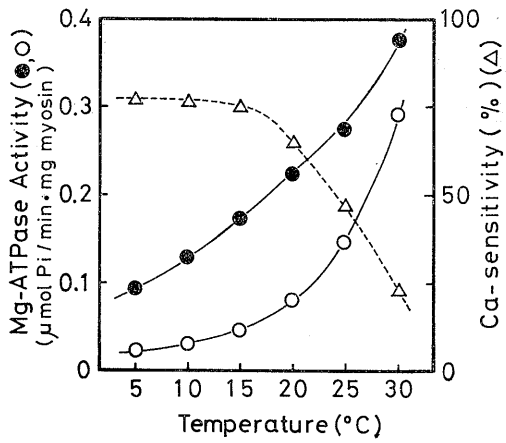

Fig. 3. Effect of temperature on the Mg-ATPase activity and Ca-sensitivity of akazara myosin.

Mg-ATPase activity of akazara myosin was measured at various temperatures in the presence of 10^{-7} M Ca^{2+} (○) or 10^{-4} M Ca^{2+} (●) as in Fig. 1. The Ca-sensitivity (△) was calculated using the following equation.

$$\text{Ca-sensitivity} = \left(1 - \frac{\text{Activity at } 10^{-7}\text{ M } Ca^{2+}}{\text{Activity at } 10^{-4}\text{ M } Ca^{2+}}\right) \times 100\ (\%)$$

で，加熱処理ミオシンの R-LC 含量を測定した。

まず，ミオシンを 30 mM KCl, 20 mM Tris-maleate (pH 6.8), 2 mM $MgCl_2$, 10^{-7} M Ca^{2+} または 10^{-4} M Ca^{2+} の溶液中で，30°C，5 分間加熱した後，氷水中で急冷し，ただちに遠心分離 (10000×g, 5 分) してミオシンを沈殿させた。次いでそのミオシンの R-LC の含量を尿素-ゲル電気泳動法で調べた。同時に遠心分離した上清を凍結乾燥し，尿素-ゲル電気泳動および SDS-ゲル電気泳動分析によってサブユニット組成を調べた。その結果，Fig. 4 (A) (B) のように，アカザラガイミオシンを Ca^{2+} 非存在下 (10^{-7} M Ca^{2+}) で加熱すると，2 mM の $MgCl_2$ が存在していても，R-LC が著しく解離することが明らかになった (b, b′, d, d′)。一方，Ca^{2+} 存在下 (10^{-4} M Ca^{2+}) で加熱した場合には，R-LC の解離はほとんど起こっていないことが示された (c, c′, e,e′)。また，いずれの場合にも加熱によって調節軽鎖以外の軽鎖すなわち SH-軽鎖は解離していなかった (b′, c′, d′, e′)。

一方，加熱処理ミオシンを尿素－ゲル電気泳動し，ゲル (Fig. 4 (B), b′, c′) 上の R-LC と SH-LC の染色濃度

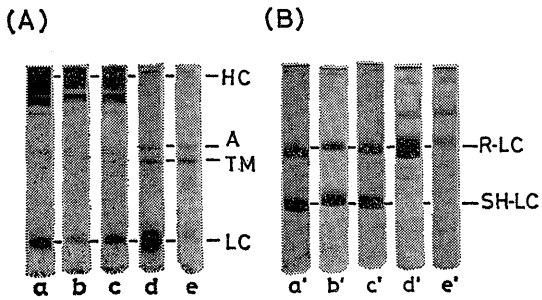

Fig. 4. SDS- and urea-gel electrophoretic patterns of heat-treated myosin and heat-released regulatory light chain (R-LC).

(A) SDS-gel electrophoresis, (B) Urea-gel electrophoresis.

Akazara myosin was incubated at 30°C for 5 min as in Fig. 2, and centrifuged at 10000×*g* for 5 min. The untreated myosin (a, a′), the precipitate (b, b′) and supernatant (d, d′) obtained from heat-treated myosin in 10^{-7} M Ca^{2+}, and the precipitate (c, c′) and supernatant (e, e′) obtained from heat-treated myosin in 10^{-4} M Ca^{2+}, were analyzed by SDS- or urea-gel electrophoresis. To each gel rod was applied 100 μg (a), 150 μg (a′, b′, c′), 50 μg (b, c, d, d′) and 5 μg (e, e′) of protein. HC, heavy chain: A, actin: TM, tropomyosin: R-LC, regulatory light chain: SH-LC, sulfhydryl light chain: LC, mixture of R-LC and SH-LC.

Table 1. Light chain composition of akazara myosin before and after heat treatments

Molar ratio of R-LC/SH-LC of heat-treated myosin (30°C, 12 min) was densitometrically determined on urea-gel rod, taking the molar ratio of R-LC/SH-LC of untreated myosin as 1.0.

	Molar Ratio of R-LC/SH-LC*
Untreated myosin	1.0
Heat-treated myosin (in 10^{-4} M Ca^{2+})	0.95
Heat-treated myosin (in 10^{-7} M Ca^{2+})	0.23

* Refer to the legend in Fig. 4 for abbreviations.

をデンシトメーターで測定して相対含量を求め，Table 1 に示した。それによると，Ca^{2+} 非存在下で加熱したミオシンはコントロール (非加熱) ミオシンの約 23% の R-LC を含有するにすぎなかったが，Ca^{2+} 存在下で加熱したミオシンは約 95% を含有していた。以上の結果から，高温で活性を測定した場合に Ca 感受性が低下した (Fig. 3) のは，ミオシンから R-LC の解離が起こったことによるものと推定された。

そこで次に，アカザラガイミオシンの加熱による R-LC の解離量と Mg-ATPase 活性との関係を検討した。すなわち 30 mM KCl, 20 mM Tris-maleate (pH 6.8) 2 mM $MgCl_2$, 10^{-7} M Ca^{2+} 溶液にミオシンを 0.5 mg/ml になるように加え，30°C で 0～12 分間加熱した。次いで，ミオシンを遠心分離で集め，0.6 M KCl, 50 mM Tris-maleate (pH 7.0), 0.5 mM DTT* に溶解し，同溶液に透析して加熱処理ミオシンを調製した。この加熱処理ミオシンの Mg-ATPase 活性の測定と尿素-ゲル電気泳動とを行ない，結果を Fig. 5 (A)～(C) に示した。これらの結果からミオシンの加熱時間に比例して R-LC 含量は低下し (Fig. 5 (A))，それにともない 10^{-7} M および 10^{-6} M Ca^{2+} 存在下の活性が上昇して 10^{-5} M および 10^{-4} M Ca^{2+} 存在下における活性値に近づき，Ca 感受性が低下することが示された (Fig. 5 (B))。また R-LC の解離量と Ca 感受性の低下との間には明らかな比例関係が認められた (Fig. 5 (C))。これらの結果から，高温でミオシン Mg-ATPase の Ca 感受性が低下する原因は，主として R-LC が解離したために起こる脱感作現象であると結論された。

加熱によるミオシン R-LC の解離におよぼす F-アクチンの影響 加熱によるミオシン R-LC の解離には，温度と Ca^{2+}, Mg^{2+}, または Sr^{2+} の濃度が影響するこ

* DTT, Dithiothreitol.

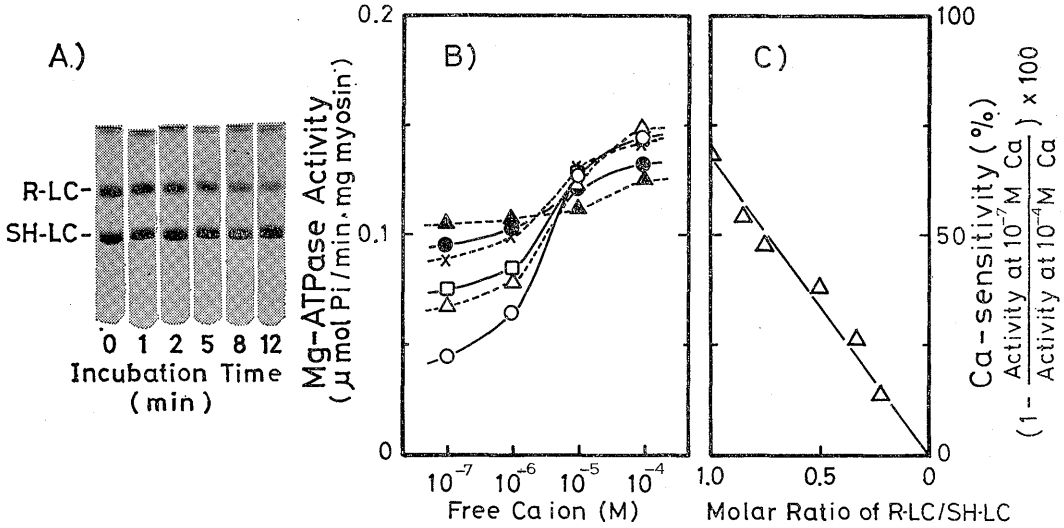

Fig. 5. Dissociation of R-LC and concomitant decrease in Ca-sensitivity of akazara myosin by heat-treatment at various Ca^{2+} concentrations.

Akazara myosin was incubated at 30°C for various times (0–12 min) as in Fig. 2, and centrifuged at 10000×*g* for 5 min. The myosin precipitate was dissolved in 50 mM Tris-maleate (pH 7.0) containing 0.6 M KCl and 0.5 mM DTT, and dialyzed against the same solution.

A) Decrease in R-LC content on urea-gel electrophoretic patterns.

B) Changes in Mg-ATPase activity.

Mg-ATPase activity of unteated myosin (○) and heat-treated myosin (1 min, △: 2 min, □: 5 min, ×: 8 min, ●: 12 min, ▲) was measured at 15°C as in Fig. 1.

C) Linear relationship between Ca-sensitivity and R-LC content, as derived from the results of A) and B).

とは前述したが，さらに他の要因についても検討した。

まず，アクチンは低 Ca^{2+} 濃度下の加熱によるミオシン Mg-ATPase 活性の特異的な上昇を抑制する事実 (Fig. 1) があることから，R-LC の解離におよぼす F-アクチンの影響を調べた。すなわち，アカザラガイミオシンまたはアクトミオシン (アカザラガイミオシンにウサギ骨格筋 F-アクチンを 2:1 の重量比で加えて再構成した) を反応混液に加えて 0～20 分間にわたり 30°C で加熱し，氷冷後ただちに 15°C で Mg-ATPase 活性を測定し，Ca 感受性の変化を調べた。アカザラガイミオシンをこの条件で加熱すると，Ca^{2+} 存在下 (10^{-4} M Ca^{2+}) では加熱失活によると思われる活性低下がわずかに認められるものの，ほぼ一定の活性を保持し，一方 Ca^{2+} 非存在下 (10^{-7} M Ca^{2+}) の活性は著しく上昇しており，その結果，加熱 10 分後には Ca 感受性は約 10% にまで低下した (Fig. 6(A))。ところがアクトミオシンの場合，Mg-ATPase 活性はアクチンによって著しく活性化されているのでミオシン単独 (A) の場合に比べて高い活性を示しているのは当然であるが，20 分間加熱しても Ca^{2+} 非存在下の活性はミオシン単独の場合のように Ca^{2+} 存在下の活性値までは上昇せず，そのため Ca 感受性はなお 50% を示していた (Fig. 6(B))。この事実から，加熱による R-LC の解離をアクチンが抑制すると考えられたので，次にミオシンおよびアクトミオシンの R-LC 含量と加熱時間との関係を検討した。その結果，Fig. 7 に示すようにミオシンを単独で加熱した場合，5～6 分後に 90% 近くの R-LC が解離してしまうが，アクトミオシンでは 50% 程度が解離するにすぎないことが明らかになった。このことは F-アクチンが約半分の R-LC の解離を抑制することを示している。また，図示はしなかったが，この R-LC の解離に対する F-アクチンの保護効果はミオシンとアクチンの重量比が 5:1 (モル比で 1:2) になると最大に達することから，ミオシン分子とアクチン分子との間に形成される結合によって HC 上の R-LC 結合 site 付近の高次構造が変化し，R-LC が解離し難くなったのではないかと考えられる。

加熱によるミオシン調節軽鎖の解離におよぼす KCl および NaCl の影響　アカザラガイミオシンを 0.03～0.4 M の KCl を含む 20 mM Tris-maleate (pH 6.8), 2 mM $MgCl_2$, 10^{-7} M Ca^{2+} 溶液中，30°C で種々の時間加熱し，加熱時間とミオシンの R-LC 含量の関係を測定して Fig. 8 に示した。ただし，0.15 M より高濃度の

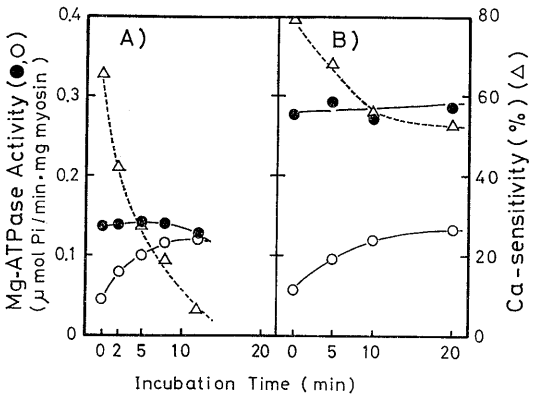

Fig. 6. Changes in the Mg-ATPase activity and Ca-sensitivity of akazara myosin and of acto-myosin during heat-treatment.

Akazara myosin (A) and rabbit acto-akazara myosin (B) reconstituted from rabbit skeletal F-actin and akazara myosin in a weight ratio of 1 : 0.5, were incubated at 30°C for various times (0–20 min) in 20 mM Tris-maleate (pH 6.8) containing 30 mM KCl, 2 mM $MgCl_2$, and 10^{-7} M Ca^{2+} (○) or 10^{-4} M Ca^{2+} (●). Then the Mg-ATPase activity of heat-treated myosin or actomyosin was measured at 15°C.

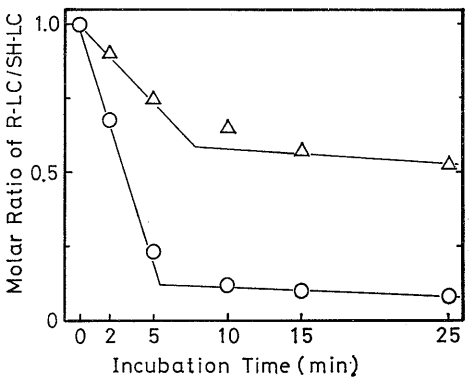

Fig. 7. Effect of F-actin on the release of R-LC from akazara myosin during heat-treatment.

Akazara myosin (○) and rabbit acto-akazara myosin (△) were incubated separately at 30°C for various times (0–25 min) in 10^{-7} M Ca^{2+} as in Fig. 2. The heat-treated myosin and acto-myosin were collected by centrifugation and used for analysis of R-LC content by urea-gel electrophoresis.

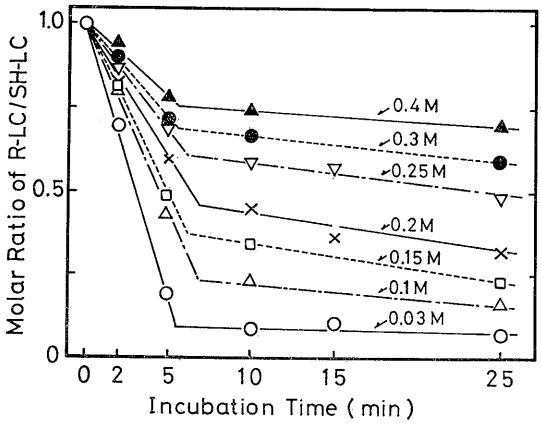

Fig. 8. Effect of KCl concentration on the release of R-LC from akazara myosin during heat-treatment.

Akazara myosin was incubated at 10^{-7} M Ca^{2+} as in Fig. 2, except that KCl concentration was varied. The heat-treated myosin was then precipitated by adding cold water to make KCl concentration below 0.06 M. The precipitate was collected by centrifugation, and used for analysis of R-LC content by urea-gel electrophoresis.

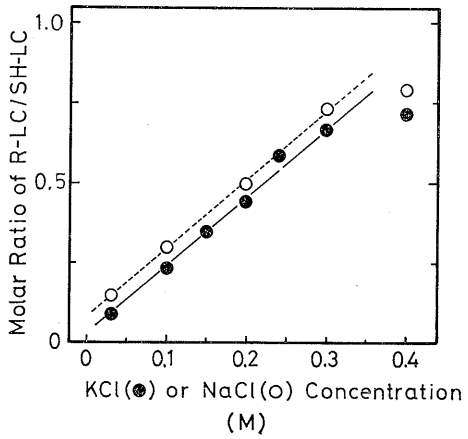

Fig. 9. Effect of KCl- or NaCl-concentration on the change in R-LC content of akazara myosin during heat-treatment.

The plots were made with the R-LC content of myosin after 10 min heat-treatment (see Fig. 8, as for the case of KCl).

KCl 溶液中ではミオシンは溶解しているので，この場合は加熱を停止すると同時に冷水を加えて塩濃度を 0.06 M 以下に下げ，遠心分離してミオシンを集めて測定に供した。その結果，KCl 濃度が高くなるに従って R-LC の解離量は次第に減少することが明らかになった。また図示しなかったが，KCl のかわりに NaCl を用いた場合でもほとんど同様の結果を得た。そこで加熱 10 分後における R-LC 含量を塩濃度に対してプロットしたところ，Fig. 9 に示したように，0.03～0.3 M の塩濃度範囲で R-LC の解離量と塩濃度との間には直線関係があることがわかった。このことから加熱による R-

Table 2. Resensitization of akazara heat-desensitized myosin by recombination with R-LC
Akazara myosin was desensitized by either heat-treatment at 30°C for 12 min, or EDTA-washing[4] at 0°C for 10 min (repeated 3 times). Desensitized myosin was dissolved in 0.6 M KCl, 4 mM $MgCl_2$, 50 mM Tris-maleate (pH 7.0), 0.5 mM DTT, and to it was added akazara R-LC in various weight ratios. The uncombined R-LC was removed by dilution and centrifugation. Refer to the legends in Fig. 1 and Table 1, for the determination method of Mg-ATPase activity and R-LC content of akazara myosins, respectively.

Myosin	R-LC*	Molar Ratio of R-LC bound/SH-LC	Mg-ATPase activity (μmol Pi/min·mg myosin)		Ca-sensitivity (%)
			$-Ca^{2+}$	$+Ca^{2+}$	
Untreated		1.0	0.05	0.15	67
Heat-desensitized		0.23	0.11	0.13	15
	+EDTA-released (1)	0.50	0.09	0.13	31
	+EDTA-released (2)	1.02	0.04	0.13	69
	+Heat-released (1)	0.60	0.07	0.12	42
	+Heat-released (2)	0.98	0.04	0.14	71
EDTA-desensitized		0.06	0.14	0.14	0
	+EDTA-released (1)	0.48	0.08	0.13	38
	+EDTA-released (2)	1.10	0.04	0.13	69
	+Heat-released (1)	0.42	0.10	0.13	23
	+Heat-released (2)	1.0	0.04	0.13	69

* Akazara R-LC was prepared by either heat-treatment (Heat-released R-LC) or EDTA-washing (EDTA-released R-LC), and was added to desensitized myosin in weight ratios of myosin to R-LC as 1: 0.03 (1) and 1: 0.1 (2).

LC の解離には，陽イオンの種類の違いよりも，むしろイオン強度が強く影響していると推定される。なお，イオン強度はミオシンのフィラメント形成に影響することから，ミオシンのフィラメント形成能と R-LC の解離の関係を検討したが，両者には相関性は認められなかった。

加熱によるミオシン調節軽鎖の解離の可逆性 これまでの結果から，アカザラガイミオシンはおだやかな加熱によって R-LC を解離することが明らかになった。しかも，この反応は可逆的であることはすでに示唆されている。[8] そこで，R-LC の解離反応についての可逆性を検討した。すなわち，30°C で 12 分間加熱して R-LC を失なった脱感作ミオシンに対して，別に単離しておいた R-LC を加え，この R-LC の再結合および Ca 感受性の回復（再感作）について検討した。なお，アカザラガイ R-LC は，ミオシンを EDTA 処理 (0°C),[4] または加熱処理 (30°C) の 2 方法で解離して調製した標品を使用した。また対照として EDTA 処理によって調製した脱感作ミオシン[4,7] についても同様に再感作実験を行ない比較した。その結果は Table 2 に示すように，脱感作の方法や R-LC の単離の方法の相違に関係なく，脱感作ミオシンには未処理ミオシンと同程度の含量にまで R-LC が再結合し，Ca 感受性を完全に回復した。

次に，これら加熱処理したミオシンとウサギアクチンから再構成したアクトミオシンの超沈殿反応を Fig. 10(A) に，また EDTA 処理 (0°C) したミオシンを用

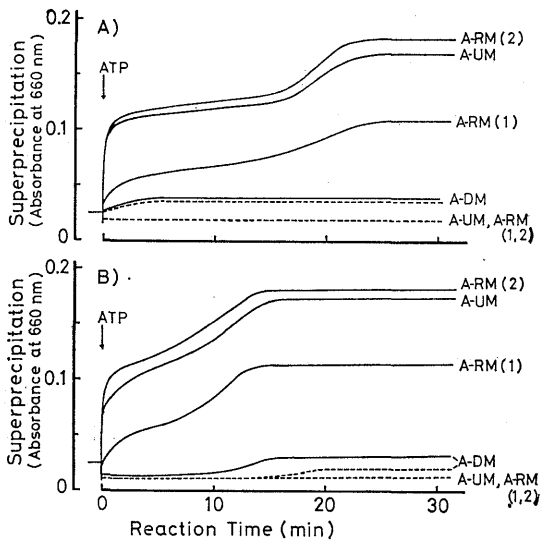

Fig. 10. Effect of recombination of R-LC with heat-desensitized myosin on the superprecipitation ability of actomyosin.
Akazara myosin was desensitized by heat-treatment (A) or EDTA-treatment (B), and the desensitized myosin was resensitized by adding the isolated R-LC in weight ratios of 1: 0.03 (A-RM (1)) and 1: 0.1 (A-RM (2)). Superprecipitation reaction was measured under the same conditions as in Fig. 6, in the presence (——) or absence (------) of 10^{-4} M Ca^{2+}. A-UM, rabbit acto-akazara untreated myosin: A-DM, acto-desensitized myosin: A-RM, acto-resensitized myosin.

いた場合の超沈殿反応を Fig. 10(B) に示したが，両者ともまったく同様の結果を与えた。すなわち，いずれの脱感作ミオシンを用いたアクトミオシンも超沈殿反応を示さなくなるが，再感作することにより，脱感作する前のアクオミオシンと同程度にまでその反応性を回復した。また，超沈殿活性を完全に回復するためにはミオシン1モル当り2モルの R-LC の再結合が必要であることも全く同様であった。

これらの結果は，加熱処理によるアカザラガイミオシンの脱感作法も EDTA 処理による脱感作法と全く同様に可逆的であることを示している。ミオシンの重鎖と調節軽鎖の結合には，二価金属イオンが関与しており，[8,9] EDTA-洗浄によってこの二価金属イオンを除くと，調節軽鎖は重鎖から解離すると報告されている。[8] 本加熱法によれば，この解離しやすさを速度および量(extent)として定量的に表わすことができた。さらに本法により，Mg^{2+} 存在下でも R-LC を解離させることができるため，ミオシン重鎖と調節軽鎖の結合性に対する生理的条件下での Ca^{2+} の効果，あるいは Ca 調節作用における R-LC の役割を研究する上で有効な手段となると思われる。

現在，数種の貝類横紋筋および平滑筋ミオシン，ウサギ等の脊椎動物骨格筋ミオシンについても，加熱による R-LC の解離性を検討しているが，総じて貝類平滑筋ミオシンの R-LC は同横紋筋ミオシンの場合よりも解離しがたく，ウサギ骨格筋ミオシンの場合はほとんど解離しなかった。その詳細については次報にゆずる。

本研究は文部省科学研究補助金によって行なわれた。ここに記して感謝する。

また，本研究を行なうに当り，御指導いただいた群馬大学・渡辺静雄教授，多大の御支援をいただいた本学辻野 勇教授，本論文の御校閲をいただいた新井健一助教授に感謝申し上げる。また，試料の採取と蓄養に当り，上磯漁協，函館漁協，北海道立函館水産試験場並びに本学臼尻水産実験所各位の御協力をいただいた。ここに深謝する。

文　献

1) J. KENDRICK-JONES, W. LEHMAN, and A. G. SZENT-GYÖRGYI: *J. Mol. Biol.*, **54**, 313–326 (1970).
2) A. G. SZENT-GYÖRGYI, E. M. SZENTKIRALYI, and J. KENDRICK-JONES: *J. Mol. Biol.*, **74**, 179–203 (1973).
3) J. KENDRICK-JONES, E. M. SZENTKIRALYI, and A. G. SZENT-GYÖRGYI: *J. Mol. Biol.*, **104**, 747–775 (1976).
4) K. NISHITA, T. OJIMA, and S. WATANABE: *J. Biochem.*, **86**, 663–673 (1979).
5) K. KONNO, K. ARAI, and S. WATANABE: *J. Biochem.*, **86**, 1639–1650 (1979).
6) G. ASHIBA, K. HARAKI, and S. WATANABE: *J. Biochem.*, **91**, 1795–1804 (1982).
7) 引地 聡・尾島孝男・角舘 覚・西田清義: 日水誌, **49**, 141–148 (1983).
8) P. D. CHANTLER and A. G. SZENT-GYÖRGYI: *J. Mol. Biol.*, **138**, 473–492 (1980).
9) T. OJIMA, K. NISHITA, and S. WATANABE: *J. Biochem.*, **89**, 1333–1335 (1981).
10) J. A. SPUDICH and M. N. WATT: *J. Biol. Chem.*, **246**, 4866–4871 (1971).
11) G. E. YOUNGBURG and M. N. YOUNGBURG: *J. Lab. Clin. Med.*, **16**, 158–166 (1930).
12) Y. OGAWA: *J. Biochem.*, **64**, 255–257 (1968).
13) 小川靖男・北沢俊雄: 生化学実験講座, **15**, 筋肉, 東京化学同人, 東京, 1975, pp. 325–327.
14) W. T. PERRIE, L. B. SMILLIE, and S. V. PERRY: *Biochem. J.*, **135**, 151–164 (1973).
15) K. Weber and M. OSBORN: *J. Biol. Chem.*, **244**, 4406–4412 (1969).
16) A. G. GORNALL, C. S. BARDAWILL, and M. N. DAVID: *J. Biol. Chem.*, **177**, 751–765 (1949).
17) T. ASADA, G. ASHIBA, and S. WATANABE: *J. Biochem.*, **85**, 1543–1546 (1979).