

アカザラガイ横紋閉殻筋ミオシンの加熱変性

誌名	日本水産學會誌
ISSN	00215392
著者	横本, 敬紀 西田, 清義
巻/号	53巻3号
掲載ページ	p. 451-456
発行年月	1987年3月

アカザラガイ横紋閉殻筋ミオシンの加熱変性

横本 敬紀, 西田 清義

(1986年7月7日受理)

Heat Denaturation of Akazara Striated Myosin

Keiki Yokomoto* and Kiyoyoshi Nishita*

When akazara striated adductor myosin was heat-treated at various pHs, inactivation of Ca-ATPase activity proceeded more slowly at pH 7.0 to 8.0 than in higher or lower pH range. Then, heat-inactivation rates of akazara myosin were determined in 0.6 M KCl at pH 7.0, using Ca-ATPase, Mg-ATPase, actin-activated Mg-ATPase and superprecipitation activities as parameters.

The results obtained showed that superprecipitation activity was most susceptible, and that the latter three activities decreased in two steps consisting of a fast and a slow change.

魚類ミオシンが変性しやすいことはアクトミオンや筋原繊維の Ca-ATPase 活性を指標とした多くの研究により明らかにされて来た。しかし、同活性を指標としたミオシンの加熱変性の研究は比較的少なく、¹⁻⁷⁾ その一方、最近では Mg-ATPase 活性や自動集合能の変化に注目した研究も見られるようになった。⁸⁻¹⁰⁾

一方、海産軟体動物ではホタテガイおよび数種の貝類のアクトミオシンの加熱変性、¹¹⁻¹³⁾ 魚類やホタテガイのミオシンとアクチンから再構成したアクトミオシンの加熱変性、¹⁴⁾ あるいは各種貝類ミオシンの加熱による調節軽鎖の解離¹⁵⁻¹⁷⁾ などの研究がある。しかし貝類ミオシンの加熱変性の研究例は非常に少ないことから、本研究ではそれらを詳細に研究するために、まずアカザラガイ横紋閉殻筋のミオシンの各種 ATPase 活性および超沈殿活性の失活速度を求め比較検討を行なった。

実験方法

アカザラガイ *Chlamys nipponensis akazara* 横紋閉殻筋のミオシンは既報の方法¹⁵⁾に従って調製した。ウサギ *Oryctolagus cuniculus* 骨格筋ミオシンおよびアクチンは、それぞれ Perry の方法¹⁸⁾と Spudich and Watt の方法¹⁹⁾に従って調製した。

ミオシンの各種 pH での加熱処理は次のように行なった。ミオシンの 0.6 M KCl, 50 mM Tris-maleate (pH 7.0) 溶液に 100 mM の Tris-maleate (pH 5.5~7.0), Tris-HCl (pH 8.0) または glycine-NaOH (pH 9.0) を含む 0.6 M KCl 溶液を 3 倍容量加えてミオシン濃度

を 5 mg/ml に調整した後、pH を測定して加熱処理時の pH とした。次に、このミオシン溶液を所定の温度で加熱し、経時的に分取して氷水中で急冷した後 4 倍容量の 0.6 M KCl, 50 mM Tris-maleate (pH 7.0) を加えて pH を 7.0 に戻し、その一定量を反応混液に加えて諸活性の測定を行なった。

ATPase の反応条件は図の説明文中に示したが、反応開始後、経時的に一定容量の反応混液を分取し、終濃度 6.6% のトリクロル酢酸で反応を停止したのち、その反応液中の無機リン酸を Youngburg and Youngburg 法²⁰⁾によって比色定量した。

超沈殿活性は Ebashi の方法²¹⁾に準じて 660 nm の吸光度により濁度変化を測定した。

たん白質濃度の測定は、牛血清アルブミン (フラクション V) を標準たん白質とし、ビウレット法で比色定量した。

加熱変性速度定数 (k_D) は $k_D = (\ln C_0 - \ln C_t) / t$ (s^{-1}) に従って算出した。ただし、 C_0 と C_t はそれぞれ加熱前と加熱開始 t 秒後における ATPase の比活性 (相対値) である。

実験結果

ミオシン Ca-ATPase 活性の失活におよぼす温度と pH の影響 まず、アカザラガイミオシンを pH 5.7, 6.2, 7.0, 8.0 および 8.7 において 30°C で加熱処理した後、Ca-ATPase 活性を測定し、その相対活性の対数値と加熱時間の関係を Fig. 1(A) に示した。また、

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

略語: EGTA, ethyleneglycol-bis (β -aminoethylether)-N, N', N', N'-tetraacetate.

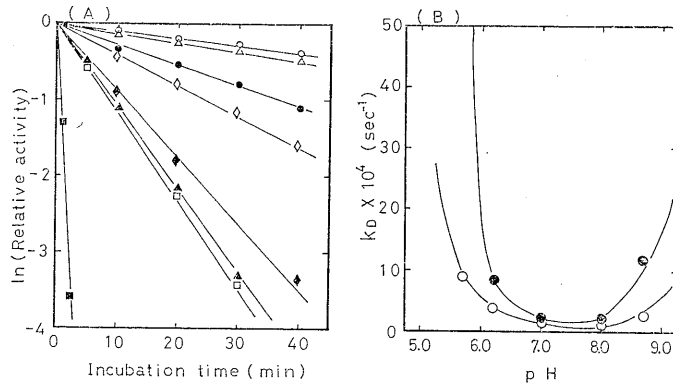


Fig. 1. Inactivation of Ca-ATPase activity of myosin during heat-treatment at various pH values.

Myosin solution (20 mg/ml) in 0.6 M KCl, 50 mM Tris-maleate (pH 7.0) was diluted with 3 volumes of 0.6 M KCl containing 100 mM of either Tris-maleate, Tris-HCl, or glycine-NaOH of required pH. Then, the myosin solution was pipetted into tubes and incubated at 30°C. At a definite intervals, the tubes were transferred in ice-water, immediately neutralized by adding 4 volumes of 0.6 M KCl, 100 mM Tris-maleate (pH 7.0), and then used for Ca-ATPase assay. (A) Ca-ATPase activity was measured at 15°C in a medium containing 0.6 M KCl and 50 mM Tris-maleate (pH 7.0), 5 mM CaCl_2 , 1 mM ATP and 0.1 mg/ml myosin. (■, □) Tris-maleate pH 5.7, (◆, ◇) Tris-maleate pH 6.2, (●, ○) Tris-maleate pH 7.0, (▲, △) glycine-NaOH pH 8.7. Closed symbols, akazara myosin; open symbols, rabbit myosin.

(B) The pH dependence of the inactivation rate constant of akazara myosin and rabbit myosin. The data used were derived from the (A). (●) akazara myosin, (○) rabbit myosin. Tris-HCl, pH 8.0.

対照としてウサギミオシンについても同様に検討して示した。その結果、いずれの pH においても両者の間には直線関係が見られたので、その勾配からミオシン Ca-ATPase 活性の k_D を求め、次にそれらの値とミオシンの加熱時の pH との関係を図 1 (B) に示した。この結果から、アカザライミオシンの Ca-ATPase 活性は pH 7.0~8.0 において比較的安定であり、その範囲を超えると急激に不安定になることがわかる。すなわち、pH 7.0 で加熱した場合の k_D に比較して pH 5.7 では約 100 倍 ($k_D=117 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$), pH 6.2 では約 4 倍 ($k_D=8.2 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$), また、pH 8.7 では 6 倍 ($k_D=12.2 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$) の値を示し、それだけ不安定であることが推定される。一方、対照のウサギミオシンでは pH 7.0 で加熱した場合に比べて pH 5.7 では 10 倍、pH 6.2 では 2 倍と酸性側では不安性を示したものの、アルカリ性側ではかなりの安定性を示しており、pH 8.7 では pH 7.0 とほぼ同じ k_D を示した。また、各 pH におけるアカザライミオシンの k_D をウサギミオシンのそれと比較すると pH 5.7 では約 5 倍、pH 6.2~8.0 では約 2 倍、pH 8.7 では約 6 倍で全般にアカザライミオシンの方が不安定であった。

次に、種々の温度における Ca-ATPase 活性の k_D の対数値を加熱温度 (絶対温度) の逆数 ($1/T$) に対してアレニウス・プロットし Fig. 2 に示した。その結果、いずれの pH で加熱した場合でも、アカザライミオン

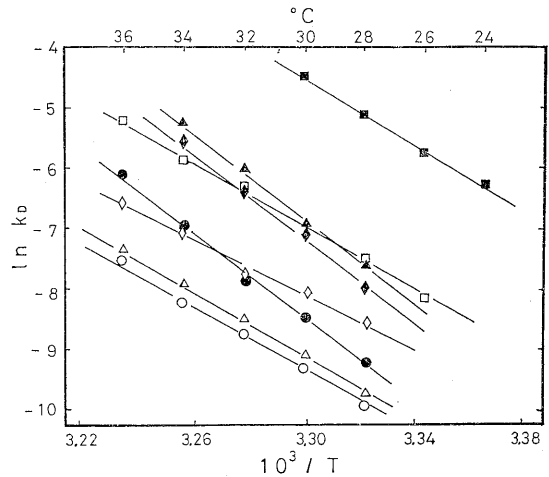


Fig. 2. Arrhenius plots of apparent rate constants for inactivation of myosin Ca-ATPase activity at various pH values. The data used in this figure were derived from Fig. 1. The symbols are the same as in Fig. 1 (A).

とウサギミオシンの $\ln k_D$ と $1/T$ の間には直線関係が成立した。また、それぞれのミオシンでは各直線の傾きはほぼ等しく、Ca-ATPase 活性の変性についての活性化エネルギー (E_a) を計算すると、アカザライミオンでは 68.7~70.3 kcal/mol, ウサギミオンでは約 54 kcal/mol となった。

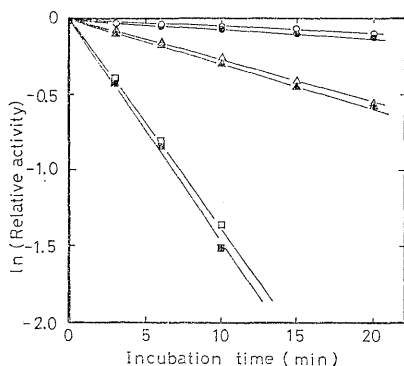


Fig. 3. Inactivation of myosin Ca-ATPase and Mg-ATPase activities during heat-treatment of akazara myosin.

Akazara myosin was incubated at (○, ●) 28°C, (△, ▲) 32°C and (□, ■) 36°C in a medium containing 0.6 M KCl and 50 mM Tris-maleate (pH 7.0). The Ca-ATPase activity was measured at 15°C in a medium containing 0.6 M KCl, 5 mM CaCl₂, 50 mM Tris-maleate (pH 7.0), 1 mM ATP and 0.1 mg/ml myosin (open symbols). The Mg-ATPase activity was measured at 15°C in a medium containing 30 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 0.3 mM CaCl₂, 0.2 mM EGTA, 25 mM Tris-maleate (pH 6.8), 1 mM ATP and 0.1 mg/ml myosin (closed symbols).

加熱によるミオシンおよび再構成アクトミオシン Mg-ATPase 活性の失活 一般に、脊椎動物骨格筋のミオシンは非常に低い Mg-ATPase 活性を示すが、海産軟体動物筋肉のミオシンは単独で比較的高い比活性を示すことが知られている。そこでミオシンの加熱による

Mg-ATPase 活性の失活速度を Ca-ATPase 活性の場合と比較した (Fig. 3)。それによると、ミオシン Mg-ATPase 活性は Ca-ATPase 活性と同様に相対活性の対数値と加熱時間が直線関係を示しており、一次反応に従って失活することがわかった。さらに、その直線の傾きが両活性でよく一致していることから k_D が等しいことも明らかである。

次に、加熱処理したミオシンに等重量のウサギ純 F-アクトチンを加えて再構成したアクトミオシンについて Mg-ATPase 活性を測定し、加熱時間と活性の関係を Fig. 4(A) に示した。また、アカザラガイミオシンはかなり高い Mg-ATPase 活性を示すので、アクトミオシン Mg-ATPase 活性の比活性からミオシン Mg-ATPase 活性を差し引いた値、すなわち、アクトチン活性化 Mg-ATPase 活性と加熱時間との関係についても Fig. 4(B) に示した。一般に、この活性が超沈殿活性とよく相関すると考えられている。²⁸⁾ その結果、アカザラガイミオシンの場合にはアクトミオシン Mg-ATPase 活性およびアクトチン活性化 Mg-ATPase 活性は、ともに、初期に速く後期に遅い二段階の速度から成る一次反応様式に従って減少した。この結果は既にウサギミオシンで報告されている加熱初期における変性様式⁸⁾と同様であった。

ミオシンの加熱による超沈殿能の変化 次に、Fig. 4 の場合と同じ条件でアカザラガイミオシンを加熱した後、再構成したアクトミオシンの超沈殿反応の経時変化を検討した。まず、Fig. 5(A) に示したように、アカザラガイミオシンを 30°C で種々の時間加熱した後、等重量のウサギ純 F-アクトチンを加えて再構成したアクトミオ

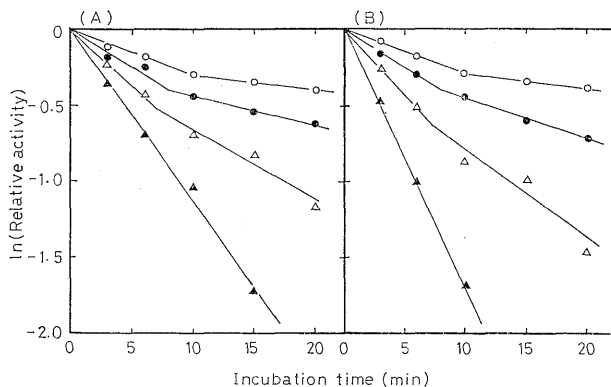


Fig. 4. Inactivation of actomyosin Mg-ATPase activity and actin-activated Mg-ATPase activity during heat-treatment of akazara myosin.

Akazara myosin was incubated at (○) 28°C, (●) 30°C, (△) 32°C and (▲) 34°C in a medium containing 0.6 M KCl and 50 mM Tris-maleate (pH 7.0). The ATPase activity was measured in the same conditions for Mg-ATPase activity as in Fig. 3 except that 0.1 mg/ml myosin and 0.1 mg/ml actin were used. (A) actomyosin Mg-ATPase activity, (B) actin-activated Mg-ATPase activity.

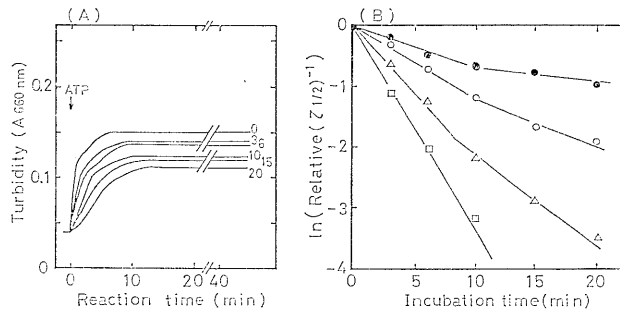


Fig. 5. Effect of heat-treatment of myosin on superprecipitation activity.

(A) Time course of superprecipitation reaction. Akazara myosin (5 mg/ml) was incubated at 30°C for 0, 3, 6, 10, 15, and 20 min in a medium containing 0.6 M KCl and 50 mM Tris-maleate (pH 7.0). Superprecipitation reaction was induced at 15°C by adding 0.2 mM ATP to actomyosin suspension in a medium containing 60 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 20 mM Tris-maleate (pH 7.8), with 0.1 mg/ml myosin and 0.1 mg/ml of rabbit actin. Numbers in figure (A) indicate the incubation time of akazara myosin at 30°C.

(B) Inactivation of actomyosin superprecipitation activity during heat-treatment of akazara myosin at (●) 28°C (○) 30°C, (△) 32°C and (□) 34°C. The rate of superprecipitation reaction is expressed in $(\tau_{1/2})^{-1}$, which is the time (seconds) required for the turbidity of the actomyosin suspension to reach its half-maximum value after the addition of ATP.

Table 1. Apparent rate constants for various ATPase activities and superprecipitation activity. The k_D -values were obtained from the results described in Figs. 3-5

Temperature °C	Ca- ATPase activity	Mg- ATPase activity	Actomyosin Mg-ATPase		Actin-activated Mg-ATPase activity		Superprecipitation activity	
	k_D	k_D	k_{Df}	k_{Ds}	k_{Df}	k_{Ds}	k_{Df}	k_{Ds}
	($\times 10^4$)	($\times 10^4$)	($\times 10^4$)		($\times 10^4$)		($\times 10^4$)	
28	1.0	1.2	5.0	1.5	4.7	1.8	11.3	3.6
30	2.1	2.2	8.0	3.0	8.3	4.5	19.7	13.6
32	4.4	4.4	12.7	7.7	14.6	9.7	37.3	25.3
34	9.3	8.6	18.9	—	28.7	—	58.3	—
36	23.8	25.3	—	—	—	—	—	—

シンの超沈殿反応は、加熱時間が長くなるに従って遅く起るようになり、また、濁度も低下する傾向を示した。ここで、最大濁度の 1/2 を示す時間 ($\tau_{1/2}$) の逆数を超沈殿活性として各温度における加熱時間との関係を Fig. 5(B) に示した。その結果、アカザラガイミオシンの超沈殿活性は、アクトミオン Mg-ATPase 活性およびアクチン活性化 Mg-ATPase 活性と同様に加熱初期に速く、後期に遅いという二段階の一次反応様式に従って失活した。この結果もまたウサギミオンで報告されている結果⁵⁾ と類似していた。

これまで求めた 5 種類の活性すなわちアカザラガイミオン Ca-ATPase 活性、Mg-ATPase 活性、アクトミオン Mg-ATPase 活性、アクチン活性化 Mg-ATPase 活性および超沈殿活性の各加熱温度における k_D の値を Table 1 にまとめた。それによるとミオシンの ATPase 活性部位の変性速度を示していると考えられる Ca- お

よび Mg-ATPase の k_D の値はほぼ等しいが、それに比べるとアクトミオン Mg-ATPase 活性の初期の失活から求められる k_D すなわち k_{Df} は、約 4~5 倍の大きな値を示したのに対して、後期の遅い変性の速度定数 k_{Ds} は、Ca- および Mg-ATPase の k_D とほぼ同程度から約 2 倍の値であり、アクチン活性化 Mg-ATPase 活性の k_{Df} , k_{Ds} もまた同様であった。これに対して超沈殿活性では、 k_{Df} が約 6~10 倍、また、 k_{Ds} は約 3~6 倍の大きい値となり、超沈殿活性からみた変性速度は他の性質のそれに比べ大きいことが示された。これらの結果から、アカザラガイミオンを加熱すると上記の 5 種類の活性のうち、超沈殿活性が最も速やかに失活することが明らかになった。

次に、アカザラガイミオシンの各種活性について変性速度定数の対数値を加熱温度 (絶対温度) の逆数に対してプロット (アレニウス・プロット) し、Fig. 6 に示

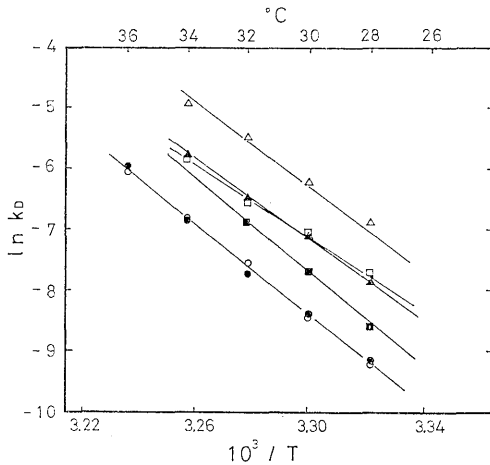


Fig. 6. Arrhenius plots of apparent rate constants for inactivation of myosin Ca- and Mg-ATPase activities, actin-activated Mg-ATPase activity and superprecipitation activity on heat-treatment of akazara myosin.

The data used in this figure are derived from Table 1 and Figs. 3-5. (○) Ca- and (●) Mg-ATPase activities of myosin alone, (□) the early fast inactivation of actin activated Mg-ATPase (k_{Df}), (■) the later slow inactivation of actin-activated Mg-ATPase (k_{Ds}), (△) the early fast inactivation of superprecipitation (k_{Df}) and (▲) the later slow inactivation of superprecipitation (k_{Ds}).

した。それによると、いずれの活性についても両者の間に直線関係が成立した。そこで、これらの直線関係から各変性について活性化エネルギー (E_a) を計算した結果、Ca- および Mg-ATPase 活性は、70.3 kcal/mol、アクトミオシン Mg-ATPase 活性の k_{Df} と k_{Ds} ならびに超沈殿活性の k_{Df} と k_{Ds} の場合は、60.1~66.1 kcal/mol であり、この値は、すでに報告されているスルメイカ外套膜筋ミオシンの Ca- および Mg-ATPase 活性、アクトミオシン Mg-ATPase 活性の変性の E_a (65~79 kcal/mol⁹⁾) とほぼ一致していた。さらに、これらの結果は Ca- および Mg-ATPase 活性の場合と同様に、 k_D が相対的に小さいにもかかわらず変性の E_a は、必ずしも大きくないことを示している。このような関係はスルメイカのアクトミオシン Mg-ATPase 活性の場合にも報告されており、⁹⁾ その理由については現在までのところ不明である。

考 察

アカザラガイミオシンの Ca-ATPase 活性の変性速度を 0.6M KCl 溶液中において種々の pH で測定した結果、pH 7.0~8.0 ではウサギミオシンの k_D の約 2

倍程度と比較的安定であることが示された。一方、pH 8.7 では、やや急激な k_D の上昇を示し、不安定性の増すことが示されたが、ウサギミオシンでは比較的安定のままであった。一方、酸性側では、両ミオシンともに著しく不安定になることが示された。従って、アカザラガイミオシンの安定性は、ウサギミオシンの場合に比べると、温度ばかりではなく、pH にも影響されやすく、また、安定性を保持できる pH 領域も狭いことが明らかになった。本研究では、アカザラガイミオシンを加熱する場合には、比較的安定な領域にある pH 7.0 を採用した。ミオシンを種々の pH と温度で加熱処理して得られた k_D についてアレニウス・プロットした結果、pH が同じであれば低温になる程ウサギミオシンの k_D との差は小さくなること、すなわち、安定性が接近することになり、アカザラガイミオシンを低温で扱うことの有利性を示している。

アカザラガイミオシンの加熱によって、Ca-ATPase 活性と Mg-ATPase 活性がほぼ同じ速度によって失活していくことは、ミオシン頭部の ATPase 活性部位の高次構造の同一変化に起因するものと考えられる。一方、アクトミオシン Mg-ATPase 活性またはアクトン活性化 Mg-ATPase 活性が、Ca- および Mg-ATPase 活性の失活速度に比べて加熱初期において数倍 (2~7 倍) 速やかに失活することは、ATPase 活性部位の不可逆的構造変化に比べてアクトン結合部位、あるいは、その部位から ATPase 活性部位までのアクトン結合情報伝達に与する領域 (部位) の構造の方が速やかに変性を受けるものと考えられる。超沈殿活性にはこれらの要因のほか、ミオシン分子間の相互作用、すなわち、フィラメント形成能などさらに多くの要因が関与するものと推定されることから、この活性が最も速やかに失活することは考えうることもかもしれない。

木村らはウサギミオシンを加熱処理した後にアクトンを加えて再構成したアクトミオシンの Mg-ATPase 活性と超沈殿活性が初期に急速に失活し、その後遅く進行するという二段階の変性を示す現象を発見し、その加熱初期の失活はミオシンのアクトン結合能の変化とは相関しておらず、むしろ、ミオシン分子のフィラメント形成能の変化および分子集合を反映しているミオシン懸濁液の濁度増加の速度と相関していると報告している。⁸⁾ 本研究において、アカザラガイミオシンの加熱の場合にも同様の二段階の変性が観察されたが、しかしアクトミオシンの Mg-ATPase 活性と超沈殿活性の失活速度は互に異なっており、前者は後者の約 2 倍であった。従って、現在、アカザラガイミオシンの場合についてもフィラメント形成能の変化について詳細に検討している。

本研究の一部は文部省科学研究費補助金によって行な

われたので記して謝意を表します。

文 献

- 1) H. Buttkus: *J. Fish. Res. Bd. Canada*, **23**, 563-573 (1966).
- 2) 高士令二: 日水誌, **39**, 197-205 (1973).
- 3) 木村郁夫, 室塚剛志, 新井健一: 日水誌, **43**, 315-321 (1977).
- 4) I. Kimura, K. Arai, and S. Watanabe: *J. Biochem.*, **86**, 1629-1638 (1979).
- 5) S. Watabe and K. Hashimoto: *J. Biochem.*, **87**, 1491-1499 (1980).
- 6) S. Watabe, K. Hashimoto, and S. Watanabe: *J. Biochem.*, **94**, 1867-1875 (1983).
- 7) S. Kanoh, S. Watabe, and K. Hashimoto: *Nippon Suisan Gakkaishi*, **49**, 757-763 (1983).
- 8) I. Kimura, K. Takahashi, K. Arai, and S. Watanabe: *J. Biochem.*, **88**, 1703-1713 (1980).
- 9) 田中晴生, 木村郁夫, 新井健一, 渡辺静雄: 日水誌, **48**, 445-453 (1982).
- 10) 松浦 基, 吉岡武也, 田中晴生, 新井健一: 日水誌, **51**, 2007-2012 (1985).
- 11) 西田清義: 日水誌, **41**, 1003-1008 (1975).
- 12) 西田清義, 福山龍次, 石原義雄: 日水誌, **43**, 229-235 (1977).
- 13) 西田清義: 日水誌, **43**, 335-341 (1977).
- 14) 山下敬子, 新井健一, 西田清義: 日水誌, **44**, 485-489 (1978).
- 15) K. Nishita, T. Ojima, and S. Watanabe: *J. Biochem.*, **86**, 663-673 (1983).
- 16) 尾島孝男, 西田清義: 日水誌, **49**, 1257-1264 (1983).
- 17) 尾島孝男, 市川 寿, 西田清義: 日水誌, **52**, 839-845 (1986).
- 18) S. V. Perry: in "Methods in Enzymology", (ed. by S. P. Colowick and N. O. Kaplan.) Vol. 2, Academic Press, New York, 1955, pp. 582.
- 19) J. A. Spudich and S. Watt: *J. Biol. Chem.*, **246**, 4866-4871 (1971).
- 20) G. E. Youngburg and M. N. Youngburg: *J. Lab. Clin. Med.*, **16**, 158-166 (1930).
- 21) S. Ebashi: *J. Biochem.*, **50**, 236-244 (1961).
- 22) A. G. Gornall, C. S. Bardawill, and M. M. David: *J. Biol. Chem.*, **177**, 751-765 (1949).
- 23) H. Suzuki, S. Suzuki, and S. Watanabe: *J. Biochem.*, **89**, 871-878 (1981).