

ミオシンおよびミオシンサブフラグメントの熱変性

川 上 英 之

(広島大学水畜産学部食品工業化学科)

Thermal Inactivation of Myosin and It's Subfragments.

Hideyuki KAWAKAMI

*Department of Food Chemistry and Technology, Faculty of Fisheries
and Animal Husbandry, Hiroshima University, Fukuyama*

(Figs. 1-15; Table 1; Plate 1)

目 次

I 緒 論	161
II 実験材料および実験方法	167
III 実験結果	172
IV 考 察	184
V 結 語	189
VI 要 約	190
VII 参 考 文 献	190
VIII Summary	192

I. 緒 論

人類の誕生以来、食料資源として現在なお主要な地位を占めているものの1つに食肉としての脊椎動物の骨格筋がある。当初人類はこれをそのままの形すなわちその場かぎりの食肉として利用していた。しかしその後、人類文化の発展と共にこの食肉としての骨格筋をより有効に、かつ風味、形、色などの面からより変化に富んだ食品として利用することを考えるようになって来た。その代表的なものとしてソーセージやハムがあり、また水産資源に富んだ国においては魚肉を利用した加工食品すなわち日本の場合にはカマボコ、チクワといった練り製品として広く親しまれるようになって来た。

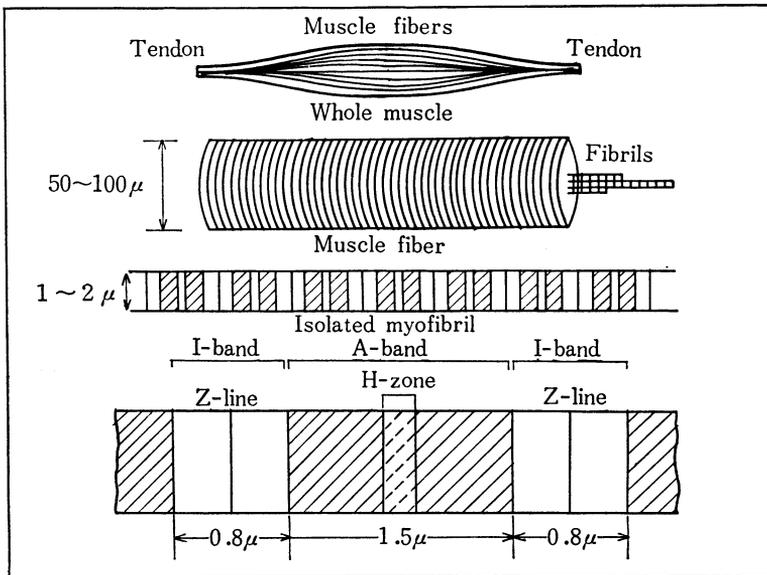
これらの加工食品で共通して言えることは、その原料が脊椎動物の骨格筋であること、製造工程で必ず加塩、細碎混和それに加熱という工程があり、製品としてキメの細かい弾力性に富んだ、すなわち保水性、結着性に富んだ凝固物を形成するということである⁶⁸⁾。ところがこれらの製造工程の中、塩(実際には NaCl)を加えないで細碎混和、加熱したり、また、原料肉が新鮮さを欠いていたり、不適当な取扱いを受けるといくら NaCl を加えてもソーセージあるいはカマボコといった弾力性に富んだキメの細かい凝固物を形成しない⁶⁸⁾。このような経験的事実に基づいて加塩、細碎混和という操作によって原料肉中の何かが性状の変化を生じ製品の弾力性すなわち結着性やキメの細かさすなわち保水性を現わすようになると考えられる。

生筋は大体 75% 前後の水を含んでいるが加熱調理された時、この水をできるだけ多く含んだままであることが肉質の良否を決定する因子となっている⁶⁸⁾。そのため、肉が水を保持する性質が問題となって来る。ソーセージやカマボコのような練り製品の場合 NaCl が添加されると保水性は飛躍的に増し

てくる⁶⁹⁾。そしてそれと同時に細砕された塩漬肉は粘稠となり一定の形に詰めこまれて加熱されたるたがいくつつきあってその形を保って凝固する。この性質を結着性と称し練り製品の場合には保水性は常に平行して現われる⁶⁹⁾。

練り製品の製造にあたって大切なことは原料肉が付加された水や脂肪を必要かつ十分に抱えこむこと、すなわちエマルジョンを形成し加熱凝固したのちまでこれがそのまま保たれているということである。筋肉中であって肉の保水性や結着性を現わす原因となっているものは加熱という操作によって水や脂肪が弾力性に富んだ凝固物を作ることは考えられないことから、肉の中で結着性や保水性を現わす因子はタンパク質成分であることは容易に想像される。

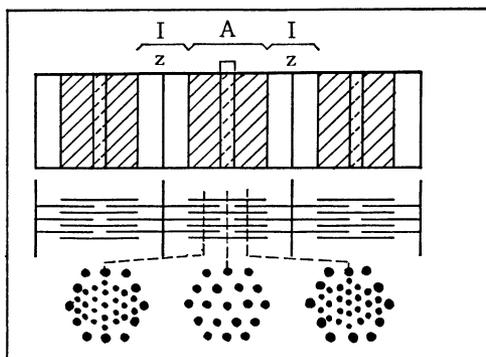
筋肉は筋原線維 (myofibril) がより集まってできた筋線維 (muscle fiber) からできている⁷⁰⁾ Ref. Fig. 1 この筋原線維は直径 $1\sim 3\mu$ の長い糸状で、明暗の縞が交互に連続して横紋をなしている⁷⁰⁾ Ref. Fig. 1. これらは常光では明るく偏光で暗く見える Isotropic band (I帯) と逆に常光では暗く偏光で明るく見える Anisotropic band (A帯) である。I帯の中央に細く吸光度の高い Z-membrane (Z線) があり、このZ線とZ線の間を1つの単位としてサーコメアと呼んでいる⁷⁰⁾ Ref. Fig. 1.



Ref. Fig. 1, The structure of the striated muscle⁷⁰⁾.

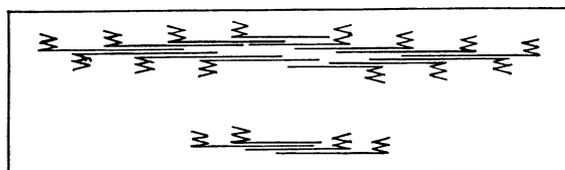
したがってA帯はサーコメアの中央部に位置している。休止状態の筋原線維ではA帯の中央部にやや明るい H-zone (H部) がある⁷⁰⁾。さらにこのサーコメアは2種類のフィラメントからできており、1つはA帯に見られる太いフィラメントで Thick filament と言われ⁷⁰⁾、もう1つはZ線から両側に伸びてA帯のはじまる所まで達する細いフィラメントで Thin filament と言う⁷⁰⁾。

太いフィラメントは直径 $100\sim 120\text{Å}$ 、長さ $1.5\sim 1.6\mu$ 、細いフィラメントは直径 $60\sim 70\text{Å}$ 、長さ 1μ である⁷⁰⁾。筋原線維の横断面を見るとI帯では細いフィラメントのみ、H部では太いフィラメントのみが見られ、A帯では両者が存在する⁷⁰⁾。またこれらの空間的配置は1本の太いフィラメントを中心として6本の細いフィラメントが正六角形をなして取囲み、1本の細いフィラメントは3本の太いフィラメントが作る正三角形の中心に位置している (Ref. Fig. 2)。



Ref. Fig. 2. The structure of the myofibril⁷⁰⁾.

太いフィラメントでは両端が細くなり、1本につき200~220個の突起が出ている⁶⁾。この突起は直径40 Å、長さ180 Å であるがフィラメントの中央部 0.2 μ には存在しない⁶⁾ (Ref. Fig. 3)。



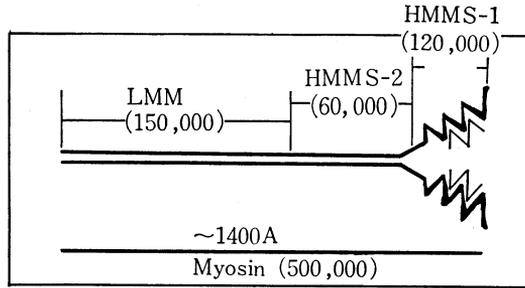
Ref. Fig. 3. Diagrammatic representation of the mode of aggregation of myosin molecules to form filaments whose structural polarity reverses at the midpoint⁶⁾.

細いフィラメントは F-アクチンと同様に二重らせん構造をしており Z 線を境にして細いフィラメントの極性は逆転している。

筋原線維を Hasselbach-Schneider 溶液⁷²⁾ (0.6 M KCl, 10 mM ピロリン酸, 1m M MgCl₂, pH 6.4) で処理すると A 帯が消失し、抽出されるタンパク質はミオシンであることが判った。このようにしてミオシンを抽出した残りの筋原線維を F-アクチンを脱重合させることのできる 0.6 M KI で処理すると I 帯が消失する⁷³⁾。さらにこの Hasselbach-Schneider 溶液で処理した筋原線維には太いフィラメントはなく細いフィラメントのみが存在することが電子顕微鏡で確かめられている⁷³⁾。以上のようなことから A 帯にある太いフィラメントはミオシンで I 帯にある細いフィラメントはアクチンで構成されていると考えられる。

この中ミオシンは筋肉構造タンパク質の約 60% を占め、ひき肉から Straub 溶液 (0.3 M KCl, 0.06 M K₂HPO₄, 0.09 M KH₂PO₄, pH 6.5) で 15 分間低温で抽出して得られる^{16), 17)}。そしてイオン強度を上下して (0.6~0.05) 溶解、沈澱をくり返して精製する^{16), 17)}。電子顕微鏡による観察では 200×40 Å の頭部に、長さ 1300~1400 Å×20 Å の尾部のついた形をしており^{6), 12)}、また最近では頭部が2つに分れていることも明らかにされている^{7), 71)} (Ref. Fig. 4)。分子量は約 50 万である⁷⁴⁾。

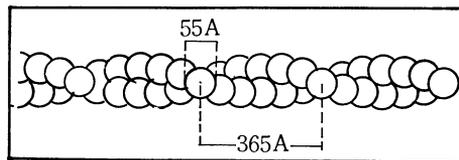
ミオシンをタンパク質分解酵素の 1 種であるトリプシンで処理すると^{8~13)}、ミオシン分子の頭部を含む ATPase 活性およびアクチンとの結合能を持つ Heavymyosin (HMM, M_w=32 万¹¹⁾ とミオシン分子の尾部を成す 100% α-ヘリックス構造を持つ Lightmeromyosin (LMM, M_w=15 万⁷⁵⁾ に分離することが出来、低イオン強度で沈澱し高イオン強度で溶解するという特性は LMM により発現される。HMM をさらにトリプシンで分解すると HMM Subfragment-1¹⁴⁾ (S₁, M_w=12 万⁴²⁾) および



Ref. Fig. 4. Schematic representation of the myosin molecule^{7), 71)}.

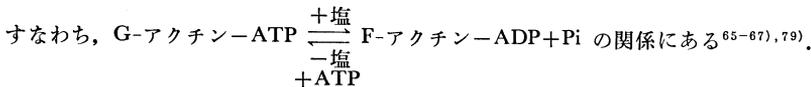
80% が α -ヘリックス構造を持つ HMM Subfragment-2 (S-2, $M_w = 6 \times 10^4$) に分離することが出来る⁴²⁾。ミオシンの持つ生物活性である ATPase 活性点およびアクチンとの結合点は S-1 に局在し、この S-1 はさらに分子量 2 万をもつ g-サブユニット (Light Chain) と分子量 8 万の Heavy Chain に分離することが出来⁶³⁾、Heavy Chain, が S-1 から離脱すると生物活性は失われるが再結合によって部分的に回復することが知られている⁶³⁾。

一方、アクチンはミオシンとともに主な筋肉構造タンパク質で、ミオシンを抽出したあとのひき肉残渣から水で抽出される⁶⁴⁾。抽出されたアクチンは球状タンパク質の性質を有し、Globular アクチン (G-アクチン) と呼ばれる。分子量は約 5×10^4 で直径約 55 Å の球状タンパク質である^{77), 78)}。この G-アクチン溶液に KCl 等の中性塩を加えると重合して F-アクチンに変換する⁶⁴⁾。そして電子顕微鏡による観察から直径 55 Å の G-アクチンが数珠状につながり 365 Å の周期で二重らせん構造を形成していることが明らかとなった^{77), 78)} (Ref. Fig. 5)。G-アクチンに中性塩を加えると F-アクチンに変

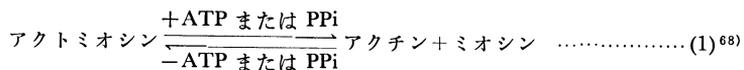


[Ref. Fig. 5. Diagram of the arrangement of G-actin monomers in actin filaments, derived from X-ray diffraction and electron microscope observations⁷⁸⁾].

換する⁶⁴⁾。この時 G-アクチン 1 分子に 1 分子結合している Adenosine triphosphate (ATP) は脱リン酸されて Adenosine diphosphate (ADP) になる⁷⁹⁾。また F-アクチンを ATP の存在下で透析して脱塩すると脱重合して G-アクチンにもどる^{65-67), 79)}。

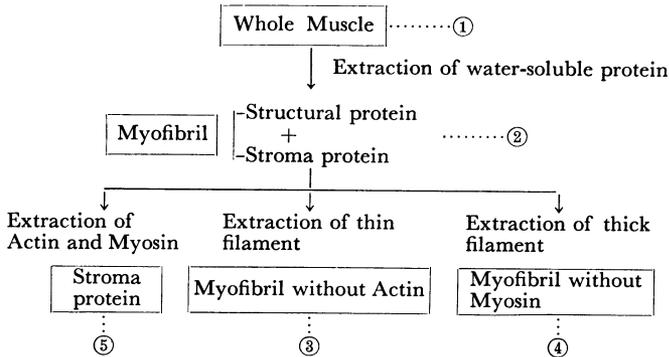


前述の如く、ミオシンには ATPase 活性とアクチンと結合してアクトミオシンを形成する能力がある。その代表的な形態はアクチンフィラメントにミオシン分子がヒゲのようについたものとなる⁷⁸⁾。このアクトミオシンは高い塩濃度で ATP が存在すると、たがいに解離し、ATP がなくなると再びくっつくという性質がある⁶⁸⁾。そしてこの性質は無機のポリリン酸であるピロリン酸を用いてもみとめられる⁶⁸⁾。



ここで PPI はピロリン酸をしめす。

以上の諸事実から筋肉中において保水性や結着性の要因となっているのは構造タンパク質であろうということは容易に想像できる。しかし、これらの構造タンパク質の中どれが決定的要因となっているかということは明らかでない、そこで段階的に筋肉からタンパク質を抽出しながらどの部分が結着性、保水性の決定的要因となるかが調べられた⁶⁸⁾。Ref. Fig. 6 にしめすように原料肉から順次タンパク質フラクションを取り除いたモデルを調製し (Ref. Fig. 6⁶⁸⁾) これに実際に使用される程度の NaCl (2.5%) を加えて実験的にソーセージを作って結着性、保水性を発現するタンパク質フラクションを捕捉する試験がおこなわれたのである⁶⁸⁾。

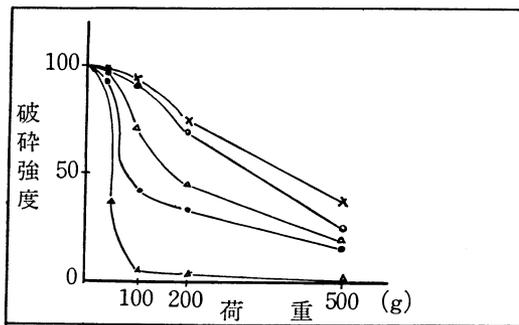


Ref. Fig. 6. Extracted samples from whole muscle⁶⁸⁾.

その結果、Ref. Table 1 と Fig. 7 にしめされるように筋肉からのタンパク質の抜け方と ATPase 活性の消失の仕方は一致せず、モデルソーセージの結着性は ATPase 活性の消失とほぼ平行すること

Ref. Table 1. The property of each sample.⁶⁸⁾

Sample No.	Remaining protein (%)	Remaining ATPase activity (%)	Binding quality of sausage
1	100.0	100.0	+
2	71.4	97.4	+
3	45.4	92.6	+
4	55.2	24.9	±
5	28.8	9.3	-



Ref. Fig. 7. The resistance of each sample against load.⁶⁸⁾

(×)…① (○)…② (△)…③ (●)…④ (▲)…⑤

がしめされた。このことは③のモデルはアクチンのみが抽出され、④のモデルはミオシンのみが抽出されているので、③のモデルの方が抽出されないで残っているタンパク質の量が少くても ATPase 活性はほとんど変わらずに残っていることを意味する。

一方、これら5つの試料について結着性を調べてみると (Ref. Table 1, Fig. 7), 水溶性タンパク質やアクチンを除いた試料は水を含んだままの凝集物を作って荷重に対する抵抗性もかなり高い値をしめしている。一方、ミオシンの部分を除いたもの、ミオシンとアクチンの両方のタンパク質を除いたものは結着性や保水性がほとんどかあるいは全くなくなってしまうことがわかる⁶⁸⁾。以上の実験事実から肉および肉製品にとって重要な性質である保水性、結着性の要素は筋肉構造タンパク質中のミオシンの部分であることが判る。

一般に NaCl や KCl のような中性塩を加えてタンパク質を抽出する場合には、ト殺直後の筋肉からはミオシンが多く⁶⁸⁾、その後経過時間が長くなるにつれてミオシンとアクチンの結合した複合アクトミオシンが多く抽出されるようになる⁶⁹⁾。一般に食用として使用する筋肉は多くの場合死後硬直期を経過したものであるから NaCl を加えて抽出されるタンパク質の中にはこのアクトミオシンが多いと考えられる⁶⁸⁾。アクトミオシンは塩濃度が 0.25 M 近辺では溶解せず、0.4 M 以上で初めて完全に溶解するがミオシンの方は 0.1 M 位の塩濃度で溶解する⁶⁸⁾。ソーセージの中に含まれている NaCl の量は大体 2.5% である⁶⁸⁾。これを筋肉中の水分を考慮に入れると 1.0 M⁶⁸⁾ 近辺の濃度になるのでソーセージ等の製造時の塩濃度はアクトミオシンやミオシンを抽出するのに十分な濃度である。したがって筋肉からのアクトミオシンおよびミオシンの抽出操作なしにソーセージの製造は考えられない。それ故、筋肉の内部では一般に凝集して不溶 (gel) であるタンパク質を可溶 (sol) の形に変化させることが結着性、保水性の付与に必要となる。ソーセージ等の練り製品の製造時においてサイレントカッターなどで細碎混和の工程でピロリン酸塩を含むポリリン酸塩を結着剤として添加するのは (1) 式の平衡反応からリン酸塩が ATP の代用としてアクトミオシン+アクチン+ミオシンという反応を促進させる効果のあることを利用してミオシンの相対量を増やすことを目的としている。溶けた形にしてとり出したタンパク質は熱処理を受けると変性凝固する⁶⁸⁾。水溶性部分のタンパク質やアクチンは加熱されるとタンパク濃度が高い場合でも凝集をおこして水を放出して沈澱する。一方ミオシンやアクトミオシンはタンパク濃度が低いと沈澱をおこすがある程度濃度が高くなると水分をほとんど放出しないでゲル化する。Trautman⁶⁰⁾ はこの熱によるゲル化に必要な濃度をいろいろな pH で調べた。その結果 pH 5.8 で最少値をしめし、それよりも酸およびアルカリ側ではさらに多量のタンパク質を必要とした。一方、加熱によって出来たゲルを電子顕微鏡で観察するとタンパク質同志がつながった網状構造⁶⁸⁾をなし、その中に水をかかえこんでいることがはっきりとうかがえる。したがって溶けた状態で抽出されたミオシンやアクトシンが熱によって変性凝固する際にタンパク質分子が網状構造を作ることが結着性、保水性の発現に不可欠であることが明らかである。

以上述べて来たようにソーセージ等の練り製品の製造に際して生物活性 (ATPase 活性およびアクチンとの結合能) を十分持ったミオシンが不可欠である。ところがミオシンを単離すると非常に不安定で哺乳動物⁶⁸⁾ の体温に近い温度 (35°C) あるいは低い pH (6.0) では簡単に失活変性してしまう。ミオシンが加熱凝固する前に変性してしまうと十分な結着性や保水性をもった製品は期待できない。それ故、肉および肉製品の製造および品質管理の上からミオシンの性質を知ることが必要であるし、タンパク質化学の上からも興味ある問題である。

過去の研究結果^{1~5)}から、ミオシン ATPase の熱による失活は一次反応に従い、この失活にともなうミオシン分子の溶解性の変化や DEAE-Cellulose Column Chromatography の変化をしめすようになる³⁾。不可逆的凝集反応すなわち変性をピロリン酸、ポリヒドロキシアルコールおよび糖類を加えることにより阻止することが出来る⁴⁾。さらに有機溶媒などとは機構的に異ってはいるが F-アクチンを加えることによっても阻止することが出来る⁵⁾。こうしたミオシン分子独特の挙動はミオシン分子そのものの形あるいは複雑な構造に由来すると考えられる^{6), 7)}。

前にも述べたように、ミオシン ATPase 活性やアクチンとの結合能を維持する上で完全な形のミオシン分子を必要としない。近年八木ら¹⁵⁾ はナガーゼ (Nagarse) による S_1 の処理から完全な ATPase 活性をもつより小さな球状のサブフラグメントの分離に成功した。それでミオシンの ATPase の失活の機作、それにともなって生ずる不可逆的な凝集反応の機作を解き明かす目的でいろいろのイオン強度、pH、温度等の条件下でその挙動を調べ検討を加えた。

II. 実験材料および実験方法

ミオシンの調製；

家兔の骨格筋から Perry の方法¹⁶⁾ の改良法¹⁷⁾ により調製した。家兔をト殺後毛皮、内臓を除去し骨格筋を取り出し細切したのち 0°C に冷却しておいた Straub の溶液 (0.3 M KCl, 0.06 M K_2HPO_4 , 0.09 M KH_2PO_4 , pH 6.5) を3倍量加えて 0°C で15分間抽出し、 $3,000\times g$ で20分遠心分離する。この上澄液をガーゼで濾過して集めこれに14倍量の冷水 (0°C) を加えて KCl 濃度を 0.021 M まで下げ、ミオシンを沈澱させる。30分~1時間放置して十分沈澱させたのち上澄液を静かに除去し沈澱部分を $3,000\times g$ で20分遠心分離して集め KCl を加えて 0.5 M 溶液 (pH 6.8) として完全に溶解する。次いで KCl 濃度を 0.3 M まで下げて、 $77,500\times g$ で1時間遠心分離し混在するアクトミオシンを除去する。このあと再び沈澱、溶解をくり返し最終的に 0.5 M KCl 溶液 (pH 6.8) とする。

ミオシンの精製；

こうして得たミオシンを DEAE-Cellulose Column で精製する^{3), 18)}。上記の方法で得たミオシン溶液 (0.5 M KCl, pH 6.8) を 10 mg/ml, 0.3 M KCl, 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.8) として、あらかじめ同じ KCl 溶媒で平衡にしておいた DEAE-Cellulose Column (2×30 cm) につめる。このあと同一溶媒 (0.3 M KCl, 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.8)) を 500 ml 流すとミオシンが溶出してくる。この溶出ミオシン分画中 $280\text{ m}\mu$ の波長の吸光度の読みから最大吸収をしめす部分およびその両側の部分を取り出して試料とした。こうして精製したミオシンは $E_{280}/E_{260}=1.7$ の値をしめし核酸は除去されていると判定することが出来る。

HMM-5 および HMM-10 の調製；

上記の方法で調製した新鮮なミオシンを Szent-Györgyi の方法¹¹⁾ でトリプシンを用いて酵素分解する。すなわち、10 mg ミオシン/ml, 0.5 M KCl, 20 mM Phosphate buffer (pH 7.0), 25°C の条件でミオシンの量の 1/200 の量のトリプシンで5分 (HMM-5) および10分 (HMM-10) 分解したのちトリプシンの1.3倍量の大豆トリプシンインヒビターを加えて反応を止める。その後直ちに 0°C の冷水中で冷却する。ミオシンのトリプシン分解物を10倍量の 10 mM Phosphate buffer (pH 7.0) に1晩透析すると LMM は水に溶けないで沈澱し HMM は上澄部に溶存する。この LMM を除去するために $14,000\times g$ で30分遠心分離し、上澄液を集めて最終濃度が 60% 飽和になるように硫酸 (pH 7.0) を加えて1時間位放置すると HMM は沈澱する。この沈澱を $5,000\times g$ で30分遠心分離して集め少量の 0.15 M KCl, 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.8) に溶かし10倍量の同じ溶液に一度透析したのち10倍量の 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.8) に硫酸が完全に除去されるまで外液を交換しながら透析する。

HMM の精製；

上記の方法で調製した HMM をミオシンの時と同様に DEAE-Cellulose Column で精製する²⁰⁾。10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.8) で平衡にしておいた DEAE-Cellulose Column (2×30 cm) に HMM を吸着させ初めに 0.13 M KCl, 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.8) 300 ml を流すと S_1 および低分子量のトリプシン分解物が溶出してくる。このあと 0.25 M KCl, 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.8) 300 ml を流すと HMM が溶出してくる。この HMM 分画中 $280\text{ m}\mu$ の吸光度の読みから最大吸収をしめす部分およびその両側の部分を試料とした。この HMM は超遠心分析で単一の峰をしめし Lowey

& Holtzer¹⁹⁾ のしめしたような不純物 (より軽い小成分) はみとめられなかった。

S_1 の調製;

HMM をさらにトリプシンで分解する²⁰⁾。10 mg HMM/ml, 0.1 M KCl, 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.8), 25°C の条件で重量比で HMM の量の 1/20 の量のトリプシンで 10 分間分解したのちトリプシンの 1.3 倍量の大豆トリプシンインヒビターで反応を止め直ちに 0°C の冷水中で冷却する。この HMM のトリプシン分解物を 10 倍量の 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.8) に 1 晩透析して低分子量の分解産物を除去する。

S_1 の精製;

10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.8) を流して平衡にしておいた DEAE-Cellulose Column (5×30 cm) に HMM のトリプシン分解物を吸着させ 0.13 M KCl, 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.8) を 1 l 流すと S_1 が溶出してくる。この S_1 分画の中 280 m μ の波長の吸光度から最大吸収をしめす部分およびその両側の部分を取り最終濃度が 60% 飽和になるように硫酸を加えて約 1 時間放置して沈澱させたのち 5,000×g で 30 分遠心分離して沈澱を集める。このあと、硫酸を除去するために 0.15 M KCl, 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.8) の溶液 10 倍量に約 10 時間透析したのち Sephadex G-200 Column で精製する²⁰⁾。初めに 0.15 M KCl, 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.8) で平衡にしておいた Sephadex G-200 Column (2.6×100 cm) に S_1 を充填し同じ溶液 (0.15 M KCl, 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.8)) で溶出する。こうして得た S_1 を 280 m μ の波長の吸光度の読みから最大吸収をしめす部分とその両側の部分を取り前記の方法で硫酸で濃縮し最終的に 10⁵×g で 2 時間遠心分離してその上澄部分を試料とした。

S_{1-n} の調製;

八木らの方法¹³⁾ の改良法によりミオシンをナガーゼで分解する。10 mg ミオシン /ml, 0.5 M KCl, 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.8), 25°C の条件で重量比で ミオシンの量の 1/100 の量のナガーゼで 10 分間分解したあと 4×10⁻⁴M DFP (Diisopropylfluorophosphate) で反応を止め直ちに 0°C の冷水中で冷却する。このナガーゼ分解物を 10 倍量の 5 mM Tris-HCl buffer (pH 7.8) に 1 晩透析したあと 5,000×g で 30 分遠心分離して沈澱物を除去する。この上澄液に最終濃度 60% 飽和になるように硫酸を加えて約 1 時間放置したのち 5,000×g で 30 分遠心分離して沈澱を集め 5 mM Tris-HCl buffer (pH 7.8) に透析する。

S_{1-n} の精製;

この S_{1-n} を S_1 の時と全く同様の方法で精製して試料とする。

以上の方法で調製した S_1 および S_{1-n} はいずれも遠超心分析では単一の峰をしめし、均一であることをしめしている。そこで Archibald 法によって分子量を求めると、 S_1 の M_w は 1.14×10⁵ (Fig. 1), S_{1-n} のそれは 1.02×10⁵ であった。また、同じ S_1 を使って $S_{20w}^0=5.74\times 10^{-13}\text{sec.}$, $D_{20w}=4.176\times 10^{-7}\text{cm}^2/\text{sec.}$, を用いて Sedimentation-Diffusion 法により分子量を計算するとその M_w は 1.20×10⁵ であった。

トリプシン (Trypsin);

Sigma Chemical Co. 製の 2 回結晶化した Type III を用いた。使用にあたっては必要量を精密天秤で秤量し少量の水 (5 ml 位) に溶かして用いた。

大豆トリプシンインヒビター (Soybean Trypsin Inhibitor);

Sigma Chemical Co. 製の大豆から調製し 2 回結晶化した Type 1-S をトリプシンと同じく水溶液として用いた。

ATP (Adenosin Triphosphate);

Sigma Chemical Co. 製の 2-ナトリウム塩を用いた。260 m μ の波長の吸光度の読み (この時の分子吸光係数 $E_{1\text{cm}}=14,900$ である) から 20 mM/l, pH 7.0 に調整し水溶液として -20°C に保存した。

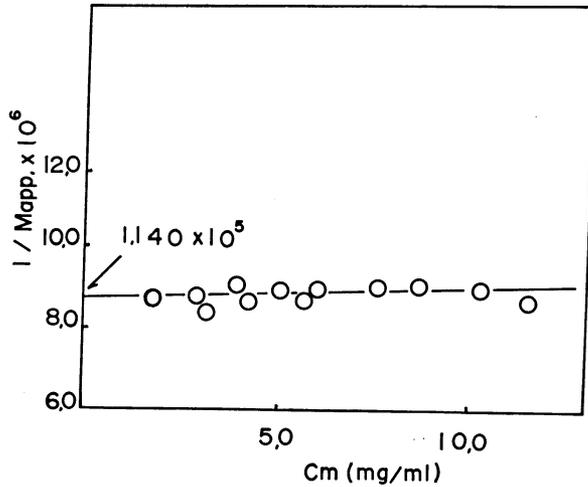


Fig. 1. Dependence of apparent molecular weight of S_1 on meniscus concentration. Reciprocal apparent molecular weight was plotted against meniscus concentration (C_m). The initial concentration of S_1 was 13.54 mg/ml in 0.15 M KCl and 20 mM phosphate buffer (pH 7.5). The run was performed at 5°C. Graph is a least square plot. Equation; $1/M_{app} = 0.0237 C_m + 8.773$.

DFP (Diisopropylfluoro Phosphate);

Sigma Chemical Co. 製のものをを用いた。使用にあたっては pH 7.0 に調整し、 4×10^{-4} M の最終濃度で用いた。

DTNB (Dithionitrobenzoic acid);

Calbiochem Inc. 製のものをを用い 10 mM, 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0) の条件で低温に保存し 0.1 mM に希釈して用いた。

ナガーゼ (Nagarse);

大阪大学の殿村雄治教授より寄贈されたものをを用いた。使用にあたっては精密天秤で必要量を秤量し粉末の状態で使用した。

以上の試薬以外の試薬はいずれも国産品の特級品を使用した。

実験方法

ATPase 活性の測定；

活性測定の条件は特別の場合を除き次のようである。反応混液は全量 2 ml とし、タンパク質濃度は 1 ml あたり 0.2 mg, 塩濃度は 0.1 および 0.5 M KCl, 活性修飾剤としては 5 mM $CaCl_2$ あるいは 1 mM $MgCl_2$ を用いた。pH は 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.8) あるいは 50 mM Tris-maleate buffer (pH 7.0) を用いて調製し、これに ATP 溶液を最終濃度が 1 mM となるように添加した。測定は 25°C の恒温槽中でおこなった。また、反応は反応混液と等量の 10% TCA (Trichloro acetic acid) を加えることによって停止させた。

無機リン酸の定量；

Martin & Doty の方法²²⁾ でイソブチルアルコール-ベンゼン混合液によって酵素反応によって遊離した無機リン酸を抽出して塩化第一スズで発色させ 660 m μ の波長で比色定量した。

ミオシンおよびミオシンサブユニットの ATPase の失活反応；

ミオシンおよびミオシンサブユニットの ATPase の失活は 1 ml あたり 2~10 mg のタンパク濃度，0~1 M KCl，pH 6.0~10.3，35°C の条件で観察された。これらの詳しい諸条件は本文中の図表に示されている。35°C に保持された反応混液から経時的に一定量 (0.2 ml) 採取し，0°C に冷却しておいた ATPase 活性測定用の反応混液と良く混和し 10 倍に希釈すると同時に失活反応を停止させた。

SH 基の定量；

ミオシンおよびミオシンサブユニットの ATPase の失活にともなう SH 基の量的変化は Ellman の方法²³⁾ で測定された。DTNB (Dithionitrobenzoic acid) の保存液を 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0) に希釈して 1 mM 溶液としたものを 0.2 ml，室温で尿素を飽和させた溶液で作った 0.2 M Borate buffer (pH 8.0) を 2.5 ml，それに試料 1 mg を混和し総量を 4 ml とする。この反応混液を室温に 20~30 分放置すると試料の SH 基と DTNB の反応で黄色を呈す。415 m μ 波長で比色定量し分子吸光係数を 13,500 として次の式に従って 10⁵ g あたりの SH 基の数を求めた。

$$\Delta O. D._{415} \times 1/13,500 \times \text{Total Vol. (ml)} \times 1/1000$$

粘度変化の測定；

ミオシンおよびミオシンサブユニットを 1 ml あたり 2 mg のタンパク濃度，0.1 M および 0.5 M KCl，20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.8) の条件で 35°C に保持した時の粘度変化を 20°C で Ostwald 型の粘度計を用いて経時的に測定した。ミオシンに対しては 30 秒の Flow time をもつ容量 4 ml の粘度計を，HMM-5 および HMM-10 に対しては 200 秒の Flow time をもつ容量 2 ml の粘度計を，さらに S₁ および S_{1-n} に対しては 480 秒の Flow time をもつ容量 2 ml の粘度計を用いた。

旋光分散の測定；

ミオシンおよびミオシンサブユニットを 1 ml あたり 2 mg のタンパク濃度，0.1 M あるいは 0.5 M KCl，20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.8) の条件で 35°C に保持した時の旋光分散の変化を室温で，JASCO, Model ORD/UV-5 の旋光分散記録装置，10 mm セルを用いて水銀，キセノンランプを光源として 3,500~5,000 Å の波長で測定した。この結果から α -ヘリックスの量を反映する $-b_0$ 値²⁵⁾ を Moffit & Yang²⁴⁾ の式； $[m'] = \frac{3[R]_l}{n^2 + 2} = \frac{a_0 \lambda_0^2}{\lambda^2 - \lambda_0^2} + \frac{b_0 \lambda_0^4}{(\lambda^2 - \lambda_0^2)^2}$ を用いて計算した。

$$\text{ここで } [R]_l = \frac{[\alpha] \times \text{平均残基重量 (115)}}{100}$$

n ； 溶媒の屈折率

a_0 ； 求める定数

b_0 ； 求める定数

λ_0 ； 2,100 Å

λ ； 観察した波長 (Å)

$$\alpha = \frac{1,000\chi}{c \times d}$$

c ； タンパク濃度 g/dl

d ； セルの長さ

χ ； 旋光計の読み

$[m']$ ； 還元平均残基旋光度

をしめす。

Sephadex G-200 Column によるゲル濾過；

2 mg S₁/ml，0.1 M KCl，20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.8) の条件で総量 5 ml ずつ試験管に分注し，35°C に 0, 60, 120 分保持した。これを 0.1 M KCl，20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.8) で平衡しておいた Sephadex G-200 Column (2.6×100 cm) につめ同じ KCl 溶液 (0.1 M KCl，20 mM

Tris-HCl buffer (pH 7.8) を 1 時間に 10 ml の速さで流し分別濾過し, S_1 が加熱によってどのような挙動をしめすかを調べた。分別濾過されて出て来た溶液を 10 ml ずつ試験管にとり 280 m μ の波長で吸光度を測定し図示した (Fig. 13)。この図から各峰のタンパク量を測定する代りにそこに描かれた峰の面積を半値巾法³⁷⁾を用いて計算し比較検討した。マーカーとして用いた Blue dextran および馬のミオグロビンの峰の位置はそれぞれ 660 m μ と 500 m μ の波長の吸光度の読みから決定した。

電子顕微鏡による観察；

HMM-5 を 35°C に保持した時の凝集の様相を観察した。この場合 2 mg HMM-5/ml, 1 M 酢酸アンモニウム溶液 (pH 7.8) が試料として用いられた。この溶液中における加熱変性の様相は 0.5 M KCl, 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.8) の溶液中における HMM-5 のそれと ATPase 的にも粘度的にも一致することが確かめられた上で使用された。これを 35°C に 0, 30, 120 分加熱し観察した。上記の方法で調製された試料は 0.04 mg HMM-5/ml の濃度まで 1 M 酢酸アンモニウム溶液で稀釈され雲母と結合させたあと速やかに高圧粉霧器かあるいは Vaponefrin neblizer でメッシュに吹きつけられた。これをさらに白金蒸気で水平方向に対して 10:1 の角度から陰づけし、炭素で Coating したのち試料を蒸着させたメッシュを水面上に浮かして過剰の炭素を除去した。

こうして調製された試料は Hitachi HU-11B 型の電子顕微鏡を用いて 75 KV の電圧で加速させ直径 50 μ の対物レンズで 29,000 倍に拡大して観察された。

超遠心分析；

HMM-5 および S_1 を 1 ml あたり 2~10 mg のタンパク濃度, 0.1 M KCl および 0.5 M KCl, 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.8) の条件で 35°C に保持した時の沈降定数および沈降にともなって形成されるシュリーレンカーブの面積と位置さらに生のタンパク質の拡散定数, 分子量を位相板角度 80 度, シュリーレン光学系を持つ Hitachi UCA-1 型分析用超遠心装置を用いて測定した。使用したセルは一重型および二重型セル (沈降速度測定用) それにバルブ型合成界面セル (Archibald 法における初濃度測定用) である。

拡散定数はローター温度 20°C, ローターの回転数 7,060 rpm で測定し沈降界面曲線の変化²⁶⁾ から求められた。沈降定数はローター温度 20°C, ローターの回転数 60,000 rpm で測定しこの時のシュリーレン図の峰の面積は Radial dilution 効果を補正して求められた。分子量はローター温度 5°C, ローターの回転数 6,020 rpm と 14,400 rpm で 12 時間遠心して Mueller の方法³¹⁾に従って Archibald 法を用いて重量平均分子量をメニスカスのタンパク濃度をゼロに外そうして求められた (Fig.1)。この時の試料の偏比容は 0.728 ml/g と仮定して計算した。

拡散定数⁸¹⁾は一般に混合時に体積変化をとまわず、流れ (拡散) の間に化学反応を起さない 2 成分系の (溶質-溶媒) 溶液を考える時、その流れ (拡散) は溶質の濃度勾配に比例しガウス分布曲線をしめす。これは単位時間における溶質の濃度の変化量 dc/dx と溶質が同じ単位時間に流れた (拡散した) 距離 x との関係として; $\left(\frac{dc}{dx}\right)_t = \frac{-C_0}{(4\pi Dt)^{1/2}} \cdot e^{-x^2/4Dt}$ で表わされる。ここで dc/dx と x の関係の曲線は $x=0$ の時に最大値をしめし、 $x=0$ の点の両側で対称である。 t のいかにかわからず $[DC]_{x \rightarrow +\infty}^{x \rightarrow -\infty} = C_0$ であるからガウス分布曲線がかこまれた峰の面積はいつも同じで時間の経過とともに dc/dx と x の関係の曲線は低く巾広くなる。 dc/dx と x の関係の曲線の最大値においては; $\left(\frac{dc}{dx}\right)_{\max} = \frac{-C_0}{(4\pi Dt)^{1/2}}$ である。一般に 2 成分系の屈折率は溶質の濃度の一次関数で表わされる。すなわち、 $\Delta n = C_0 \cdot dx/dc$ で Δn は溶質を含む溶液の濃度 C_0 の屈折率と溶媒のそれとの差である。そこでガウス分布曲線の最大値において $(dn/dx)_{\max} = -\Delta n/(4\pi Dt)^{1/2}$ となりこれから拡散定数 “D” を求めると: $D = (\Delta n)^2/4\pi t (dn/dx)_{\max}^2$ となる。この方法で “D” を求める時屈折率の差のみを補正するだけで C_0 は知る必要はない。

一方、沈降定数⁸¹⁾は $dr/dt = S\omega^2 r \dots (1)$ の式で定義される。ここで “ ω ” は角速度, “ $\omega^2 r$ ” は遠心

加速度, “S” は沈降定数である. この(1)式を時間ゼロにおけるメニスカス “ r_0 ” から時間 “ t ” における沈降界面 “ r_b ” までを積分すると; $\ln(r_b/r_0) = S\omega^2 t \dots (2)$ となる. 沈降定数は移動してゆく沈降界面を測定して “ $\ln r$ ” を時間に対してプロットして求められる. この時の直線の傾斜が “ $S\omega^2 r$ ” であるが “ ω^2 ” は既知の値であるから “S” 値を求めることができる. こうして求められる “S” 値はセル中の沈降界面から Bottom までの濃度一定領域の濃度に対応する. “S” の濃度依存性に関する理論は確立されていないが 2 成分系に関しては実験式 $S = S^0 \cdot (1 - KC)$ が考えられこの実験式から濃度ゼロにおける沈降係数 S^0 を外そうすることができる. すなわち “ S^0 ” は各濃度における “S” を濃度 “C” に対してプロットして得られる直線の切片から求められる. こうして求められた “ S^0 ” 値は一般に 20°C の水と同じ密度および粘度を持つ溶媒中のものに換算することができる. すなわち; $S_{20W}^0 = S^0 \cdot \frac{\eta_T}{\eta_{0T}} \cdot \frac{\eta_{20W}}{\eta_{0W}} \cdot \frac{(1 - \bar{v}_2 \rho)_{20W}}{(1 - \bar{v}_2 \rho)}$ である. ここで “ η ” は粘度, “ ρ ” は密度, \bar{v}_2 は溶質の偏比容をしめす.

沈降平衡法⁸¹⁾による分子量の測定

沈降平衡法においては沈降と拡散による溶質の流れがちょうど等しくなるような濃度分布が生じる. この時の溶質の濃度分布を調べるにより分子量を求めることが出来る. 平衡が達成されると溶質の実質的な流れはなくなる. すなわち; $J = C \frac{dr}{dt} - D \frac{dc}{dr} = 0 \dots (3)$ 故に $C \frac{dr}{dt} = D \frac{dc}{dr}$ となる. ここで $C \frac{dr}{dt}$ は溶質の遠心による流れ, $D \frac{dc}{dr}$ は拡散による流れをしめす. この(3)式の dr/dt の項に Svedberg の式; $M = \frac{RT_s [1 + d(\ln r)/d(\ln C)] \cdot dr/dt}{D(1 - \bar{v}_2 \rho) \omega^2 r} \dots (4)$ を代入して整理すると;

$M = \frac{RT[1 + d(\ln r)/d(\ln C)] \cdot 2d(\ln C)}{\omega^2 (1 - \bar{v}_2 \rho) d(r^2)} \dots (5)$ が得られる. 2 成分系で無限稀釈状態において(5)式の分子の [] 内は 1 に近づくから拡散係数は消えて分子量 (M) は沈降平衡における絶対濃度の測定の結果から直接求められる. 平衡状態に達した時 “ r^2 ” に対して “ $\ln C$ ” をプロットして得られる直線の傾斜を(5)式に代入すると重量平均分子量が求められる.

Archibald 法⁸¹⁾による分子量の測定;

沈降平衡法においてセルのメニスカスと Bottom の間に溶質の流れは存在しない. すなわち; $J = C \frac{dr}{dt} - D \frac{dc}{dr} \dots (6)$ と $\frac{dr}{dt} = S\omega^2 r \dots (7)$ から $J = cs\omega^2 r - D \frac{dc}{dr} \dots (8)$ 式を得る. 今メニスカスと Bottom では常に溶質の流れがなく, 常に平衡状態と同じ条件をみたしていると考えられるから, $J_m = J_b = 0$ (J_m はメニスカスにおける溶質の流れ, J_b は Bottom における溶質の流れ) となる. 従って; $C_m S\omega^2 r_m = D(dc/dr)_m \dots (9)$ および, $C_b S\omega^2 r_b = D(dc/dr)_b \dots (10)$ となる. この(9)式と(10)式それらに先の Svedberg の式(4)からメニスカスにおける分子量; $M_m = \frac{RT[1 + d(\ln r)/d(\ln C)] \cdot (dc/dr)_m}{(1 - \bar{v}_2 \rho) \omega^2 C_m r_m}$ および Bottom における分子量; $M_b = \frac{RT[1 + d(\ln r)/d(\ln S)] \cdot (dc/dr)_b}{(1 - \bar{v}_2 \rho) \omega^2 C_b r_b}$ を得る. なお, 本論文では分子量は凝集反応を計りこまないように Archibald 法のメニスカスにおける $M_{w \text{ app}}$ (平均分子量) のみを求めている.

III. 実験結果

I. ATPase 失活の速度論的検討;

ミオシン ATPase の失活は一次反応に従うことが知られている¹⁻⁵⁾. 安井らは中性, 低塩濃度 (0.14 M KCl, pH 7.0) の条件ではこの ATPase の失活の速度は MgCl_2 を加えるとおそくなるが CaCl_2

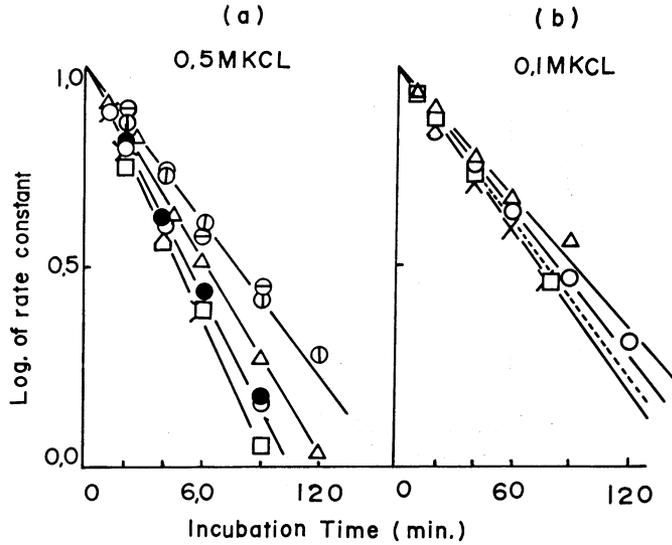


Fig. 2. Decrease in ATPase activity of myosin and its subunits as a function of time during storage in 0.5 M KCl (a) or 0.1 M KCl (b) with 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.8).

Incubation was carried out at pH 7.8 and 35°C and the reaction mixture contained 0.5 or 0.1 M KCl, 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.8) and 2 mg/ml protein.

- , myosin with 1 mM MgCl₂,
- , myosin without 1 mM MgCl₂,
- △—, HMM-5,
- , HMM-10 with 1 mM MgCl₂
- , HMM-10 without 1 mM MgCl₂,
- ×—, S₁,
- , S_{1-n},

A broken line in (b) represents the decrease in ATPase activity of HMM-10 in 0.14 M KCl with or without 1 mM MgCl₂.

ATPase measurements were conducted in the following mixture at pH 7.8 and 25°C, 0.5 M (a), 0.1 M (b) or 0.14 M (for the broken line in (b)) KCl, 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.8), 5 mM CaCl₂, 1 mM ATP, 0.2 mg/ml protein and 0.1 mM MgCl₂ (when 1 mM MgCl₂ was used in the incubation mixture. The activity was expressed as logarithm of percentage of the original one.

では変わらないと報告している⁵⁾。しかしFig. 2(a)にしめすようにミオシンを DEAE-cellulose Column で精製して用いると 10 mM MgCl₂ を加えても失活の一次反応速度は変わらない。また、ミオシンをトリプシンで加水分解して得られるミオシンサブフラグメント、HMM-5, HMM-10, S₁, S_{1-n} も同じ条件の下でミオシンと同様に MgCl₂ の有無にかかわらず ATPase の失活の速度は一定である (Fig. 2 (a), (b)). さらに Table 1 にしめすようにミオシンの分解が進み、より小さいサブフラグメントになるにつれて失活の速度は速くなる。しかし分解がある一定の段階まで進むと (S₁, S_{1-n}) 失活の速度は変わらない。0.1 M KCl においてミオシン ATPase の失活は pH と温度の双方に影響を受け、pH には影響されないが加熱した温度に影響されるいわゆる熱変性と、温度には影響されないが酸あるいはアルカリの程度に依存する酸あるいはアルカリ変性とから成っていることが報告されている^{1), 3), 27), 28)}。Fig. 3 では低塩濃度 (0.1 M KCl) においてミオシンおよびミオシンサブフラグメントの失活がどのよ

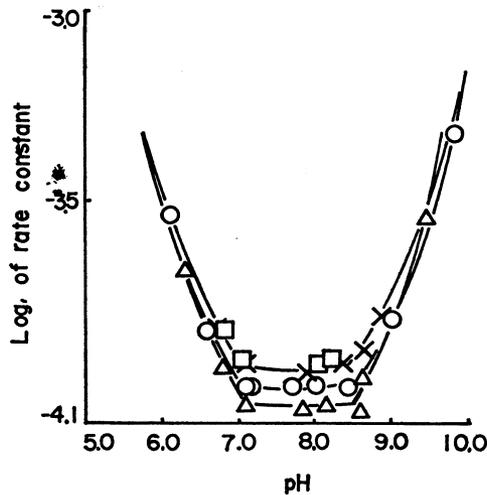


Fig. 3. Incubation constant, K (in sec^{-1}) of myosin subfragments as a function of pH at 35°C . For measurements of K , HMM-5 (Δ) HMM-10 (\circ), S_1 (\times) and S_{1-n} (\square) were incubated in 0.1 M KCl and 20 mM Tris-maleate buffer from pH 6.0–7.6, Tris-HCl buffer from pH 7.6–8.6 or glycine-KOH buffer above pH 8.6.

ATPase assay was the same as in Fig. 2, b.

うに影響されるかその依存性について pH 6.0~9.8 の間で調べた。この図から明らかのように4つのミオシンサブフラグメントのみかけの失活の速度に対する pH 依存性はほとんど同じ傾向をしめしており、pH 7.0~8.5 の間では失活の速度は大体一定であるが pH 7.0 以下および pH 8.5 以上では pH に大きく依存する。この結果はミオシンについて報告³⁾されたものと一致し、さらに失活反応速度の増大はミオシンの加水分解の程度と関係があることをしめしている。

pH 7.8, 0.1 M KCl, の条件でミオシンおよびミオシンサブフラグメントの ATPase の失活の温度依存性を Arrhenius の式; $\text{Log } k = \frac{-E}{2.3RT} + C$ を用いて計算して図示すると Fig. 4 に見られるような直線が得られる。この傾斜から活性化エネルギー (E) を求め Eyring Theory²⁹⁾ から 35°C における HMM-5, HMM-10, S_1 および S_{1-n} に対する活性化エンタルピーを求めるとそれぞれ $\Delta H^* = 58.2, 57.0, 56.4$ それに 55.5 Kcal/mole が得られた。さらに活性化エントロピー変化を計算により求めると $\Delta S^* = 118, 115, 113, 110$ cal/dg/mole となった。

次に pH 7.8, 35°C の条件でミオシンおよびミオシンサブフラグメントの ATPase の失活に及ぼす KCl 濃度の影響を調べた。その結果は Fig. 5 にしめすようにミオシンを除いて4つのサブフラグメント共 $\sqrt{I} = 0.315 \sim 0.320$ の点で最も失活の速度がおそく、これよりも \sqrt{I} が高くても低くても失活の速度は増し、 $I = 0.1$ 以上の正の傾斜では4つのサブフラグメント共大体同じ値をしめし 1.11 であった。この結果から次のことが考えられる。高塩濃度では正の傾斜をしめし失活反応が荷電物質間の近接によることを示唆している。一方塩濃度が低いと傾斜は逆転して負となり、失活を進める荷電状態は相互反発的な状態にあることをしめしている。一般にイオン強度はミオシンおよびミオシンサブフラグメントの荷電状態に影響し ATPase の失活に影響を及ぼす。ミオシンの正の傾斜が (0.46) トリプシン分解によってミオシン分子の尾の部分が全くないかほとんどない状態のミオシンサブフラグメントの傾斜 (1.11) に比べて非常にゆるやかであることは興味深い現象である^{7), 14), 15), 30)}。

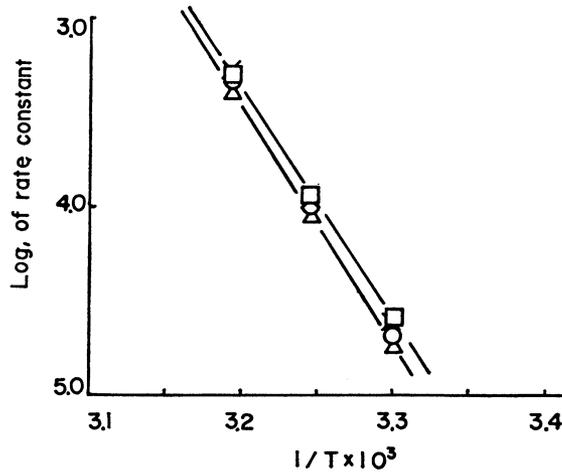


Fig. 4. Temperature dependence of the apparent rates of denaturation of HMM-5, HMM-10, S_1 and S_{1-n} .

Incubation was carried out at pH 7.8 and the reaction mixture contained 0.1 M KCl, 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.8) and 2 mg/ml HMM-5 (Δ), HMM-10 (\circ), S_1 (\times) and S_{1-n} (\square).

ATPase assay was the same as in Fig. 2, b.

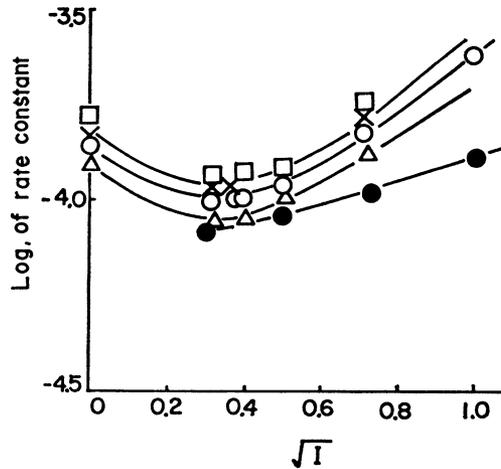


Fig. 5. Dependence on ionic strength of apparent rates of denaturation of myosin and its subfragments at pH 7.8 and 35°C.

I was adjusted by varying KCl concentrations in the incubation media.

ATPase was assayed as described in Fig. 2, b, except that reaction media for ATPase assay contained the same concentration of KCl as in the incubation ones.

- , myosin,
- △—, HMM-5,
- , HMM-10,
- ×—, S_1 ,
- , S_{1-n} ,

II. 物理的・化学的性質の検討；

これまで述べて来た結果からミオシンおよびミオシンサブフラグメントの ATPase の失活に関係する因子として温度、pH、KCl 濃度を挙げて来た。それで pH 7.8, 35°C, 0.1 M KCl および 0.5 M KCl の条件でこれらタンパク質の物理的および化学的变化を ATPase の失活の過程を通じて調べた。

安井らも報告^{1),2)}しているようにミオシンの ATPase の失活と対応してミオシン溶液の粘度は急速に上り相対粘度が 2.0 で大体一定となる。この傾向は pH 7.8, 0.5 M KCl の条件で 35°C に保った時の HMM-5, HMM-10 でも同じである (Fig. 6 (a))。しかし 0.1 M KCl 中ではこれとは異なった傾向をしめす (Fig. 6 (b))。HMM よりもさらにトリプシン分解の進んだ S_1 , S_{1-n} は KCl 濃度が高くてまた低くてもミオシンの様な大きな粘度変化は見られないけれども ATPase の失活が進むにつれてゆるやかな勾配で直線的に粘度が増す (Fig. 6 (a), (b))。この結果から ATPase の失活と共に現われるミオシンの特異的な粘度変化はミオシン分子の異常な形態に由来するものと考えられる。それでこの分子の形が単純な球状に近づくにつれて粘度が直線的に増加する。このことはとりもなわず変性時間と共に凝集体が連続的に形成されてゆくことをしめしていると考えられる。電子顕微鏡による分子レベルにおける観察結果も pH 7.8, 0.5 M KCl の条件で 35°C に加熱する前と後とは HMM-5 は明らか

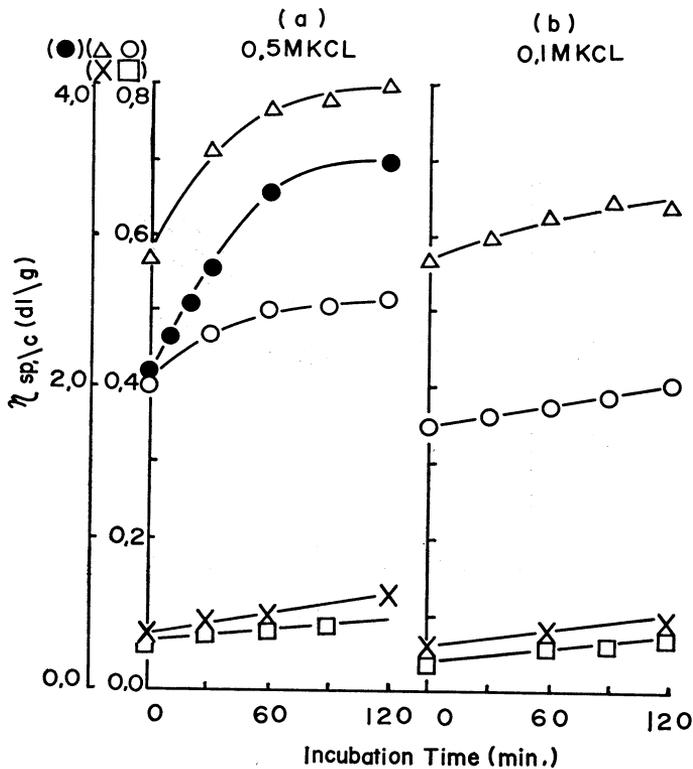


Fig. 6. Course of changes in the reduced viscosities of myosin and its subfragments. Conditions were the same as in Fig. 2.

- ; myosin,
- △—; HMM-5,
- ; HMM-10,
- ×—; S_1 ,
- ; S_{1-n} ,

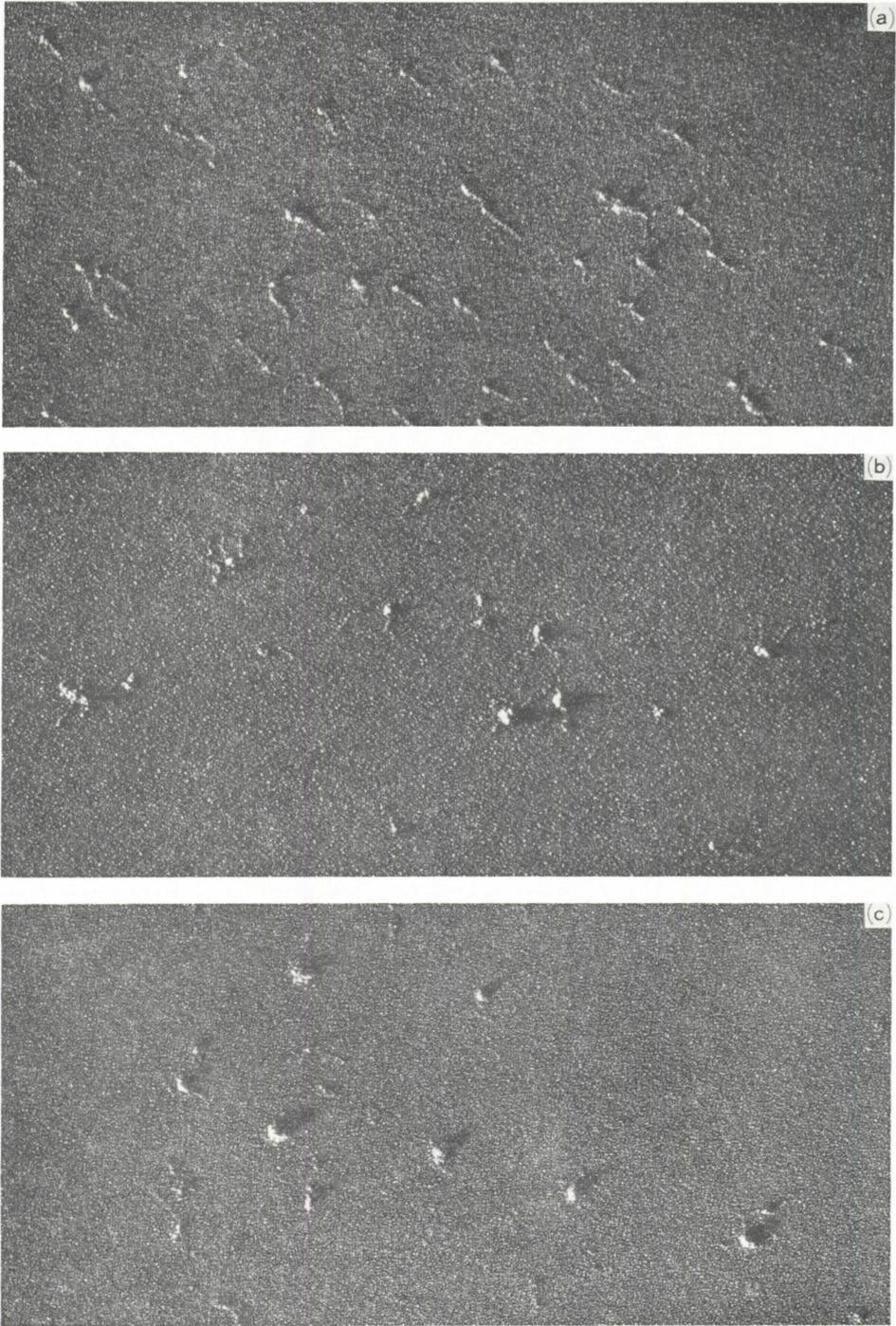


Plate 1. Electron micrograph of HMM-5 before (a) and after 30 min-(b) and 120 min incubation (c) at pH 7.8.

Conditions were the same in Fig. 2, a.

に不可逆的凝集反応を起していることをしめしている (Plate 1 (a), (b), (c)). 生の HMM-5 分子 (Plate 1 (a)) は 35°C に 30 分加熱すると近くにある分子同志が無法的に凝集してゆき次第に大きな凝集体を形作ってゆく (Plate 1 (b), (c)) ことがしめされている。

ミオシンの ATPase 活性には SH 基が関与し³¹⁾ 同時に SH 基が酸化して -S-S- 架橋を組むことはミオシンの失活にともなう凝集反応にも関与している³²⁾ と思われるので遊離の SH 基の変化を Ellman の方法²³⁾ を用いて定量的に検討した。ミオシンの場合 0.5 M KCl では変性の初期の段階で 1~2 moles/10⁵g の SH 基が減少し (Fig. 7 (a)), 0.1 M KCl の条件下でも同じ現象が見られる。しかしミオシンサブフラグメントの場合 0.1 M KCl, pH 7.8 の条件で 35°C に 2 時間まで保持しても SH 基の数はほとんど変化しない (Fig. 7 (b)). この時の ATPase 活性は生の時の 30% 以下まで減少する (Fig. 2 (b)). そしてこれらのサブフラグメントが凝集した状態は超遠心分析 (Fig. 9) でも電子顕微鏡観察 (Plate 1) でも観察することが出来る。したがってこれらのサブフラグメントの場合, ATPase の失活も凝集反応も SH 基の酸化をとまわらないことをしめしている。

pH 7.8, 0.1 M KCl あるいは 0.5 M KCl, 35°C の条件で保持した時のミオシンおよびミオシンサブフラグメントの旋光分散の変化を経時的に調べ他の性質と比較検討した。旋光分散の変化から Moffit & Yang の式²⁴⁾ を用いて b_0 値の変化を生じたミオシンおよびミオシンサブフラグメントのそれを 100% として経時的に現わした (Fig. 8). ミオシンがトリプシンにより分解され、より小さいサブフラグメントになるにつれてその $-b_0$ 値は減少してゆく (Table 1). また 35°C に 2 時間まで保持すると 0.5 M KCl, pH 7.8 の条件ではミオシンの $-b_0$ 値はせいぜい 15% 位までしか減少しないが S_1 の $-b_0$ 値は 25% 以上も減少する。この傾向は 0.1 M KCl, pH 7.8 の場合にもみとめられる (Fig. 8(a), (b)).

次に超遠心分析法を用いて 35°C に 30 分保持した時の HMM-5 および S_1 の挙動を調べた。その結果 HMM-5 では 0.1 M および 0.5 M KCl のいずれの場合もミオシンの場合、二量体であるといわれている³²⁻³⁵⁾ 明らかに早く沈降する重い峰と一量体と考えられる 2 つの峰に分裂することが観察された (Fig. 9). 一方 S_1 の場合はミオシンや HMM-5 に見られたようなはっきりとした 2 つの峰は現われず、もとの S_1 の峰に相当する主峰と急速に沈降してゆく幾つかの重い成分がみとめられた。おそらくこれは凝集した S_1 は急速にその大きさが増し即座に沈降してゆくためと考えられる。従って S_1 の場合にはこの超遠心の図から一量体の形成する峰の沈降定数を計算することができ、さらに Radial dilution 効果の補正だけをしてこの界面の面積を計算することによって S_1 の屈折率濃度を求める試みをした。この峰を形成する S_1 の濃度を測定するためには峰の面積を求め、この面積を遠心時間の逆数に対してプロットするとそのタテ軸との交点から遠心時間を無限大に外そうした時の S_1 の濃度を得ることが出来る (Fig. 10). この S_1 の峰の面積は加熱時間を延長するにつれて次第に減少する。この減少する速度は Fig. 12 にしめすように同じ条件で測定した時の ATPase の失活の速度の理論曲線とよく一致する (Fig. 12).

次に 0.1 M KCl, pH 7.8, 35°C の条件に保持した時の S_1 の沈降定数 " S_{20w} " のタンパク濃度依存性を S_1 の濃度をいろいろ変えて測定して図示すると Fig. 11 のようになる。この結果を最少自乗法を用いて計算すると S 値とタンパク濃度の間には次の式にしめすような関係があることが判る。

$$S = S^0 - KC$$

$$= 5.74 - 0.036C$$

一定時間 35°C で加熱した時の S_1 の主峰がしめす S 値を計算してその時のタンパク濃度を Fig. 10 より求めてプロットするとその濃度依存性は Fig. 11 にしめすように生の S_1 のそれと非常によく一致する。

生の S_1 と加熱した時の S_1 の沈降定数をタンパク濃度ゼロに外そうした時の S 値すなわち S_{20w}^0 はともに 5.74 ± 0.03 であった。

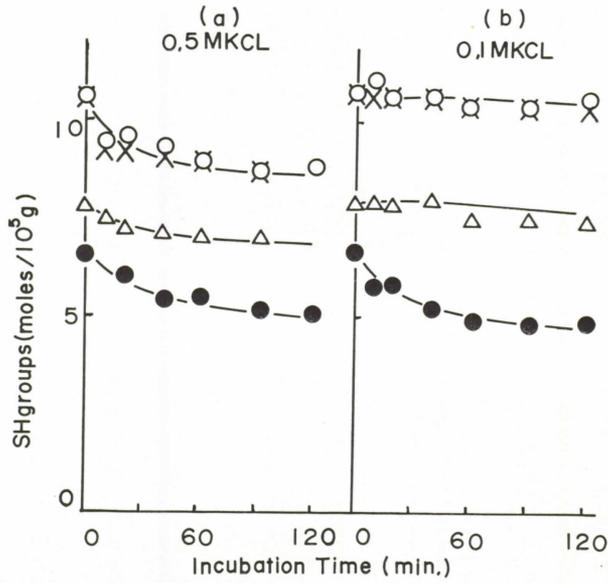


Fig. 7. Course of changes in sulphhydryl concentration of myosin (●), HMM (△), HMM-10 (○) and S₁ (×). Conditions were the same as in Fig. 2.

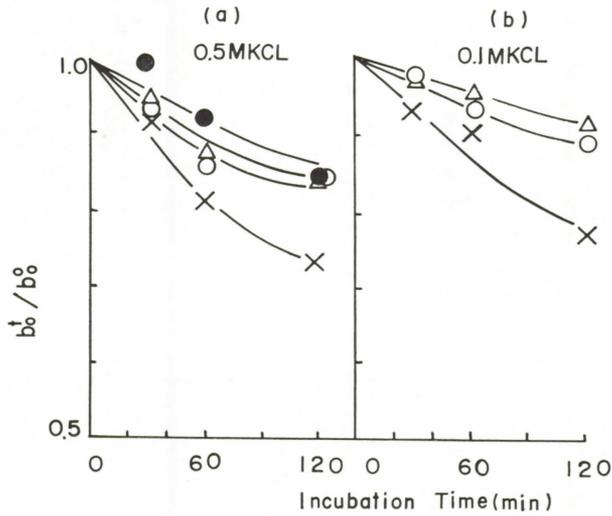


Fig. 8. The ratio of b_0 value of myosin (●), HMM-5 (△), HMM-10 (○) and S₁ (×) at $t-h$ after incubation at pH 7.8 and 35°C ($-b_0^t$) to b_0 value at the start ($-b_0^0$) as a function of t . Conditions were the same as in Fig. 2.

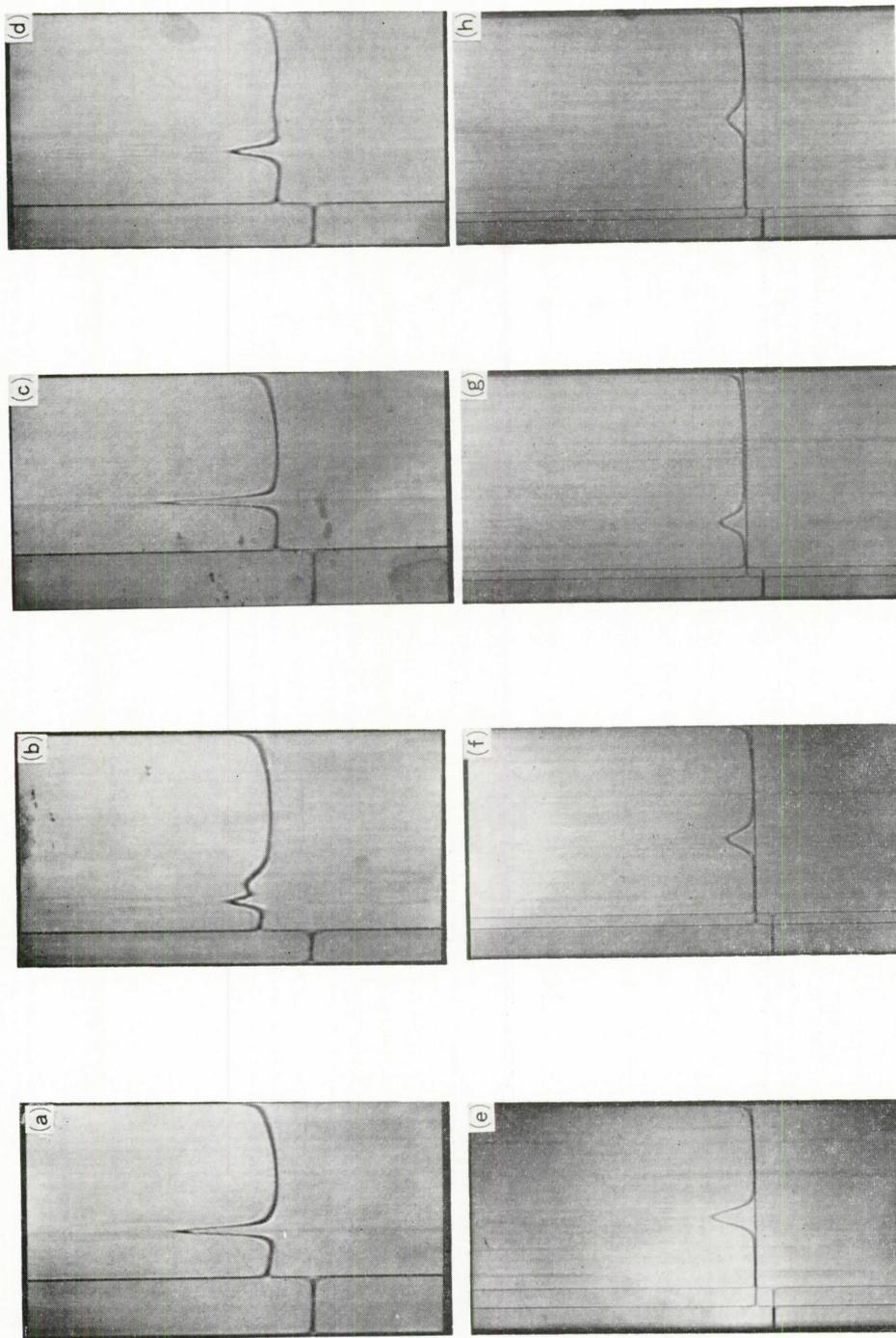


Fig. 9. Sedimentation of HMM-5 and S_1 before and after incubation at pH 7.8 and 35°C. Speed of centrifuge 60,000 rpm. at 20°C. (a); HMM-5 (5 mg/ml) before incubation in 0.5 M KCl and 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.8). A picture after 36 min at top speed. (b); HMM-5 (5 mg/ml) after 30 min-incubation in 0.5 M and 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.8). A picture after 21 min at top speed. (c); HMM-5 (5 mg/ml) before incubation in 0.1 M KCl and 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.8). A picture after 36 min at top speed. (d); HMM-5 (5 mg/ml) after 30 min-incubation in 0.1 M KCl and 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.8). A picture after 30 min at top speed. (e); S_1 (9 mg/ml) before incubation in 0.1 M KCl and 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.8). A picture after 51 min at topspeed. (f); S_1 (9 mg/ml) after 40 min-incubation in 0.1 M KCl and 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.8). A picture after 51 min at top speed. (g) and (h); S_1 (9 mg/ml) after 80 min-incubation. Pictures after 30-(g) and 60 min (h) at top speed. Ultracentrifuge was performed in the ones used for incubation.

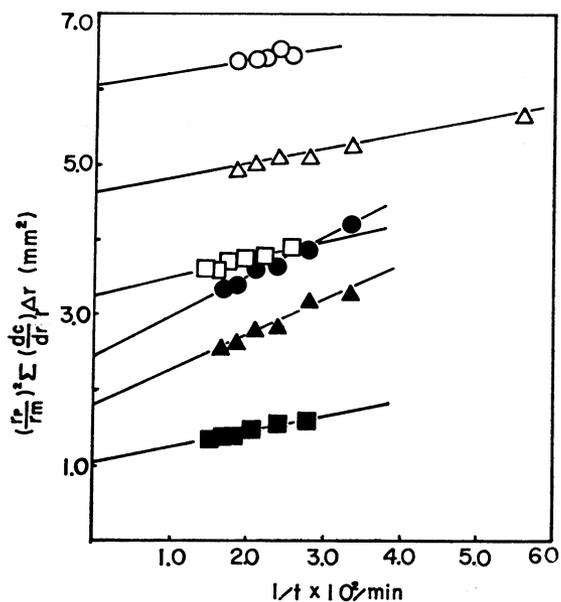


Fig. 10. Area under the schlieren peak of S_1 denatured at pH 7.8 and 35°C in 0.1 M KCl and 20 mM Tri-HCl buffer (pH 7.8) as a function of reciprocal centrifugation time.

Incubation times were for Omin (\circ), 20 min (\triangle), 40 min (\square), 60 min (\bullet), 80 min (\blacktriangle) and 100 min (\blacksquare), and initial protein concentration was 9 mg S_1 /ml.

$\left(\frac{r_p}{r_m}\right)^2 \sum \left(\frac{dc}{dr}\right)_r \Delta r$; represents the area under the schlieren peak corrected for radial dilution, in which r_m and r_p are, respectively, the distance from the axis of rotation to the meniscus and peak, $\left(\frac{r_p}{r_m}\right)^2$ is correction term for radial dilution, $\left(\frac{dc}{dr}\right)_r$ denotes the protein concentration gradient at the arbitrary distance r from the axis of rotation and Δr represents a unit width of measured fractions of the peak.

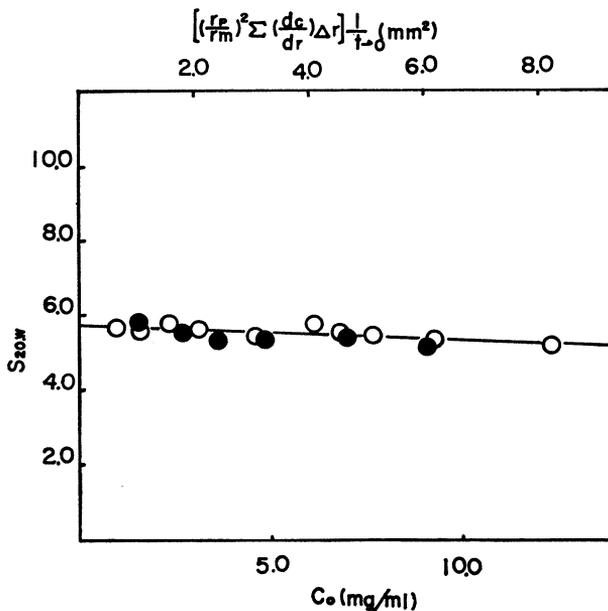


Fig. 11. Effect of concentration on the sedimentation co-efficients of native (○) and the main peak of denatured (●) S_1 . C_0 denotes initial concentrations for denaturation of concentration dependence of $S_{20,w}$ of native S_1 .

$\left[\left(\frac{r_p}{r_m} \right)^2 \sum \left(\frac{dc}{dr} \right)_r \Delta r \right]_{1/l-0}$ indicates area of main peaks at infinite centrifugation time of monomer after various times of incubation (Fig. 10). Ultracentrifuge was performed at 20°C and 60,000 rpm in 0.1 M KCl and 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.8).

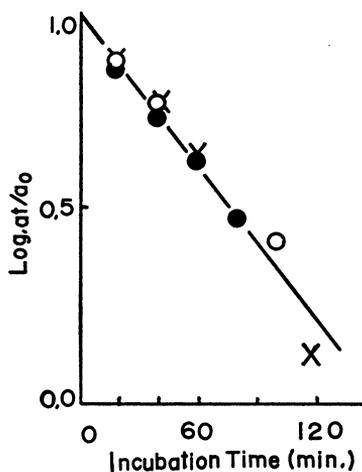


Fig. 12. First-order plot of the inactivation and aggregation of S_1 at pH 7.8 and 35°C.

The solid line is a theoretical curve given by $a_t = a_0 e^{-2.53 \times 10^{-4} t}$ (Fig. 2, b. and Table 1).

- ; inactivated S_1 (9 mg/ml),
- ; concentration of S_1 monomer after various times of incubation in schlieren diagram (Fig. 10),
- ×—; concentration of S_1 monomer after various time of incubation in Sephadex G-200 column elution profile (Fig. 13),

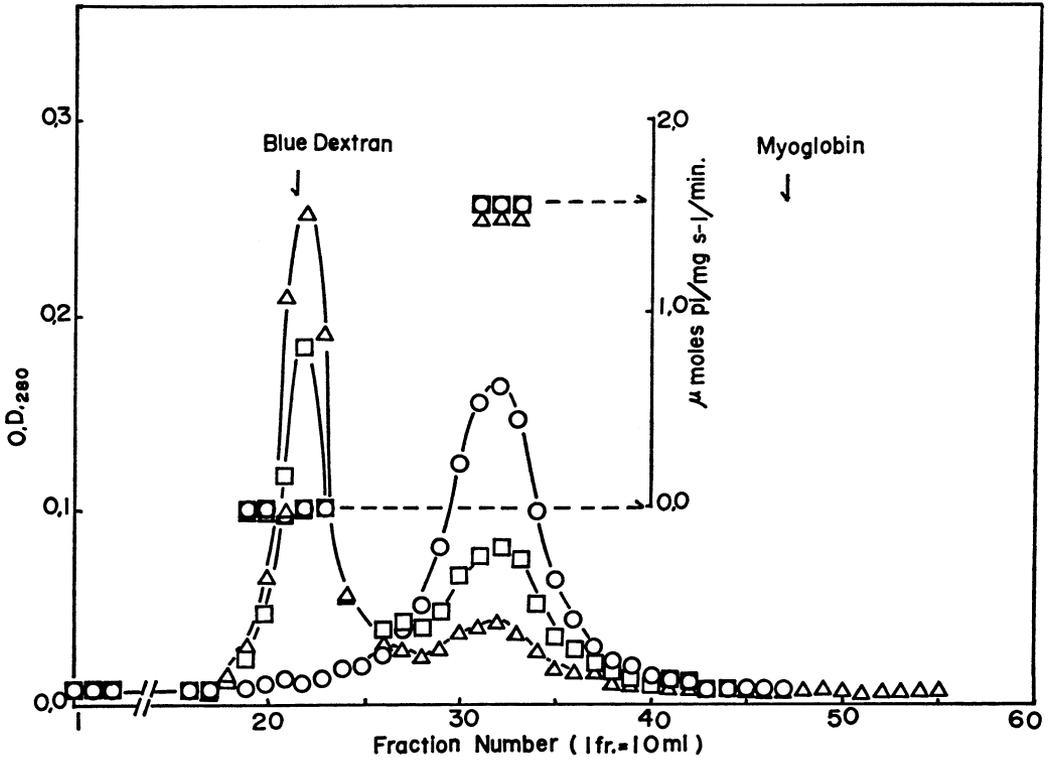


Fig. 13. Elution profile of S_1 incubated for 0 (○), 60 (□) and 120-min (△) on a Sephadex G-200 column (2.64 × 100 cm).

Conditions for incubation were the same as in Fig. 2, b.

A 5 ml sample (2 mg S_1 /ml) was applied to the column and eluted with 0.1 M KCl and 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.8).

Flow rate was 20 ml/h and 10 ml fractions were collected.

Vertical arrows indicates, respectively, positions of peak-tops of blue dextran (M.W. 2×10^6) and horse myoglobin (M.W. 1.68×10^4). Horizontal arrows correspond to the scale on the right of the specific ATPase activity.

さらに 0.1 M KCl, 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.8) の条件で 35°C に加熱した時の S_1 を Sephadex G-200 Column によるゲル濾過法によって経時的に分割すると、Fig. 13 にしめすように未変性の S_1 の峰の経時的減少と、変性したより高分子量の S_1 の峰の経時的増加が明らかにみとめられる。しかもこの2つの峰の ATPase 活性は前者においてはほとんど変わらず、後者の場合には常にゼロに近いことがしめされている。生の S_1 がしめす峰の面積が減少する割合を生の S_1 それを 100 として反応時間に対してプロットすると ATPase 活性の失活および超遠心分析法によって求められた峰の面積の減少の割合と完全に一致することがみとめられた (Fig. 12)。

III. ピロリン酸の影響；

安井ら²⁾は pH 7.0, 30°C でミオシンの Ca-および EDTA-ATPase の熱による失活は 10 mM ピロリン酸を加えることで抑制されると報告している。そこでミオシンおよびミオシンサブフラグメントの変性に対するピロリン酸の効果を調べ検討した。その結果、Fig. 14 (a) にしめすように CaCl_2 の存在下で 10 mM ピロリン酸を加えて pH 7.0, 0.5 M KCl, 35°C に保持して経時的に ATPase 活性を測

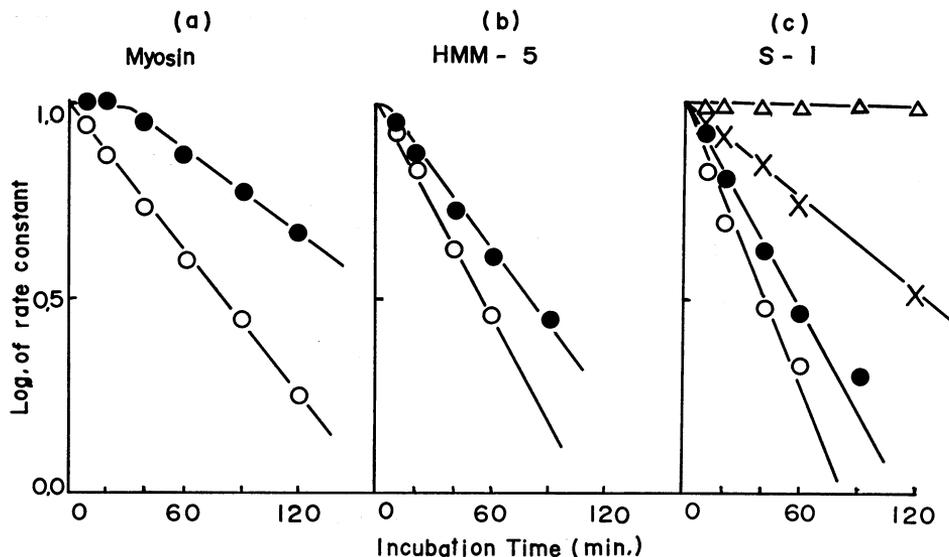


Fig. 14. Effect of PPI on denaturation of myosin-(a) and HMM-ATPase (b) and effects of PPI, ATP and glucose on the denaturation of S_1 -ATPase (c).

Incubation was carried out at 35°C and in 0.5 M KCl, 50 mM Tris-maleate buffer (pH 7.0), 2 mg/ml protein.

(a)

—○—; myosin without 10 mM PPI,

—●—; myosin with 10 mM PPI and 0.1 mM CaCl_2 ,

(b)

—○—; HMM-5 without 10 mM PPI,

—●—; HMM-5 with 10 mM PPI and 0.1 mM CaCl_2 ,

(c)

—○—; S_1 without 10 mM PPI,

—●—; S_1 with 10 mM PPI and 0.1 mM CaCl_2 ,

—×—; S_1 with 3 mM ATP and 0.4 mM MgCl_2 ,

—△—; S_1 with 2 M glucose,

ATPase activity was measured in 0.5 M KCl, 1 mM ATP, 50 mM Tris-maleate buffer (pH 7.0), 5 mM CaCl_2 and at 25°C.

定した。ミオシンの場合、はじめの30分はほとんど100%活性が保たれているが、その後は一次反応に従って減少した。この結果は先の安井²⁾らの報告と良く一致する。しかしミオシンが次第に分解されてより小さいサブフラグメントになるにつれてATPaseの失活に対する保護効果が失われてゆくとが判る (Figs. 14 (b), (c)).

IV. 考 察

DEAE-Cellulose Column によって十分精製したミオシンおよびミオシンサブフラグメント、HMM-10のATPaseの失活の速度は MgCl_2 を加えてもおそくはならなかった (Figs. 2(a), (b)). この結果は先に報告⁵⁾されたものとは異っている。しかしアクトミオシンの変性に対する MgCl_2 の保護効果はMaruyama & Ishikawa によって実際にみとめられている⁸⁾。したがって先にみとめられた MgCl_2 の変性に対する保護効果はミオシンが精製されていなかったため少量のアクチンが混在していたことによ

るものと考えられる。また DEAE-Cellulose Column で精製したミオシンの場合¹⁹⁾と同様にミオシンをトリプシンで分解して得られるサブフラグメントを加熱してもいわゆるスモールサブフラグメント^{39), 63)}の遊離はみとめられなかった (Figs. 9, 13)。従ってこの熱による ATPase の失活の過程は安井ら²⁾および Johnson & Rowe³⁵⁾ によって主張されて来た反応形態よりも単純な反応であると考えられる。今回検討した ATPase の失活の速度はミオシンがより小さいサブフラグメントに分解されてゆくにつれて^{7), 30)} 次第に速くなることが明らかとなった (Figs. 2, 3, 5)。この関係は Table 1 にミオシンおよびミオシンサブフラグメントの物理的および化学的パラメーターとの関連においてしめされている。

Table 1. Rates of Denaturation of Myosin and Its subfragments in Relation to Their Physical-Chemical Parameters Rates were measured at 35°C and pH 7.8. All values listed in this table are the average of duplicate experiments on at least two samples from different sources.

Concn. of KCl (M)	Myosin in		HMM-5 in		HMM-10 in		S ₁ in		S _{1-n} in	
	0.5	0.1	0.5	0.1	0.5	0.1	0.5	0.1	0.5	
Rates (half-life time of ATPase activity, min)	45	58	38	49	31	45	25	43	25	
Rate constants* (sec ⁻¹) × 10 ⁴	2.56	2.05	3.06	2.30	3.55	2.53	3.82	2.61	3.82	
η red (dl/g, protein concn., 2 mg/ml)	2.055	0.575	0.575	0.350	0.400	0.065	0.075	0.035	—	
Rotatory dispersion constant, b ₀	373	355	363	303	359	240	205			
Molecular wt. × 10 ⁻³	458 ~510**		320~362***			114**** ~121*****		102****	—	

* Calculated by the equation: $a_t = a_0 e^{-kt}$, where a_t and a_0 represent ATPase activities of myosin and its subfragments at t and 0 time of incubation, respectively, k is the rate constants, and t is the time of incubation.

** Quoted from refs. 40 and 45.

*** Quoted from ref. 40.

**** Measured by the present authors by Archibald technique in 0.15 M KCl and at pH 7.6 and 5°C.

***** Measured by the present authors by sedimentation-diffusion technique in 0.15 M KCl and at pH 7.6 and 20°C.

このように反応速度の増加はミオシン分子の大きさ、分子構造を保持しようとする力の強さ、分子の非対称性の減少に起因するよう見受けられる。すなわち反応速度はミオシン分子のいわゆる尾の部分の長さが短くなるにつれて速くなり、尾の部分なくなると (S₁) 反応速度はもはやそれ以上酵素分解が進んでも (S_{1-n}) 速くならない (Fig. 2, Table 1)。さらに別に単離された LMM を HMM-5 の失活反応に際して加えても、失活の速度は抑制されないことが判っているので (Fig. 15)、生のミオシン分子のもつ安全な尾部が ATPase の失活の反応に何らかの役割を果していることが想像される。fig. 5 にしめすように4つのミオシンサブフラグメントの KCl 濃度に対する ATPase の失活の速度の正の傾斜がいずれも約 1.11 であるのに対してミオシンの場合は約 0.46 であることから考えてもこのことを裏付けている。このことはミオシン ATPase の失活においてミオシン分子の尾の部分が重要な役割を演じていることを意味している。そしてこの尾の部分は生理的条件でミオシン分子の特異的な可逆的凝集反応

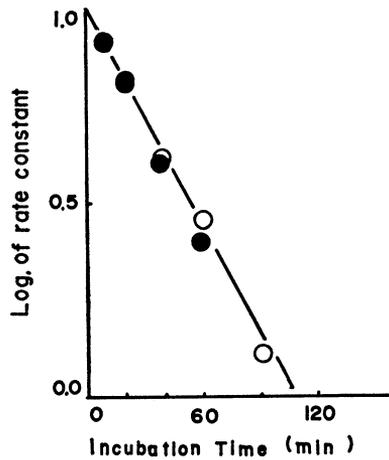


Fig. 15. Effect of LMM on the denaturation of HMM-5. Incubation was carried out in 0.5 M KCl, 0.1 mM CaCl₂, 50 mM Tris-maleate buffer (pH 7.0), 4.7 mg LMM/ml and 2 mg HMM-5/ml (HMM-5/LMM=1M/1M) and at 25°C.

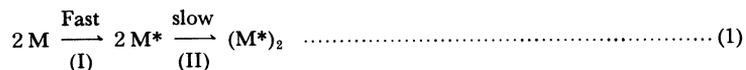
ATPase activity was measured in 0.5 M KCl, 3 mM CaCl₂, 50 mM tris-maleate buffer (pH 7.0), 1 mM ATP, 0.47 mg LMM/ml, and 0.2 mg HMM-5/ml and at 25°C.

—○—; without LMM,
—●—; with LMM,

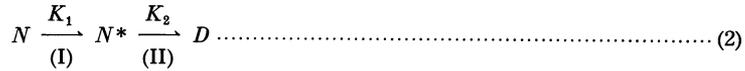
を可能にしている。ミオシンの比較的大きいサブフラグメントつまり HMM-5, HMM-10 がその他のより小さいサブフラグメントつまり S₁, S_{1-n} と同じようなイオン強度に対する挙動をしめすということは球状の頭の部分にくっついている尾の一部分, すなわち水溶性の S₂⁴²⁾ が水溶液中での変性の過程で ATPase の失活の速度をおそくするという以外にはほとんど影響しないということをしめしている。タンパク質分子の大きさ, 形, 二次構造に基づいた熱に対する感受性がちがうにもかかわらずミオシンおよびミオシンサブフラグメントは ATPase 活性に関する限り生理的条件下で最も安定であることは非常に興味ある事実である。

これまでに検討して来たことはミオシンおよびミオシンサブフラグメントが 35°C で溶液中で不可逆的に失活するというものであった。そして, ミオシンおよびミオシンサブフラグメントの ATPase の不可逆的な失活の特徴はタンパク質分子の凝集をとまなうということである。Fig. 7 にしめすようにある特定の条件下では SH 基の数は 35°C に 2 時間保持してもほとんど変化しなかった。しかし一方では ATPase の失活と分子同志の凝集は実際におこっている (Figs. 2, 9, 13, Plate 1)。それ故 ATPase の失活と凝集には SH 基は関与していないと結論できよう。この結果は従来提出されている他の報告^{2), 34), 43)}とも一致する。

変性すなわち ATPase の失活と不可逆的凝集という特異的な現象は広くウサギのミオシン^{1), 2), 4), 5), 33), 35)}あるいはタラのミオシン^{34), 36)}について研究されている。この凝集反応の機構を説明するために 2 つのステップが考えられている³³⁻³⁶⁾。すなわち (I) 式で説明されるように, はじめミオシンの一量体 (M) が賦活化された形すなわち分子構造が重合しやすい形 (M*) に変化し, ついで重合体 ((M*)₂) を形成するという考え方である。



安井ら²⁾はピロリン酸がミオシン ATPase の加熱による失活を抑制するという現象を速度論的に解析し、この反応機構が (2) 式によってうまく説明されるということを提唱した。



ここで N および D は生および変性したミオシン、 N^* は変性過程におけるミオシンの中間体、 K_1 、 K_2 は変性の一次反応速度定数をしめす。この (2) 式で (II) が (I) に比べて非常に速いならば ($K_1 \ll K_2$)、たとえばピロリン酸が存在しないならばこの時の反応は一次反応式に従う。もし (I) と (II) が同じ程度の速さならば ($K_1 \geq K_2$)、すなわちピロリン酸が存在する条件下では、この反応は初期の段階で明らかに一次反応式に従わなくなる²⁾ (Fig. 14 (a))。貯蔵中のミオシンの凝集に関する過去の研究³⁴⁻³⁶⁾では、凝集反応は二次反応速度に従うことが報告されている。それで超遠心分析から得た図の峰の面積を求めるという方法でミオシンの凝集反応の速度が (1) 式に従うことを考えようとするならば、先ず ATP、ピロリン酸の存在する系で二量体形成反応速度がこれらのリン酸化合物によって (1) 式中の (II) の段階で影響を受けるということ^{35), 36)}にならなければならない。同じような機構が Lowey & Holzer³³⁾によって提出された。彼らは凝集体の沈降定数は $S_{2,0}^0 = 10.0$ でこの値は長軸にそって側面重合した二量体として計算した理論値とよく一致するというをしめした。さらに部分的には Connell³⁴⁾の意見と一致するが Johnson & Rowe³⁵⁾、Mackie³⁶⁾の説とは異なり、2つの濃度のちがう試料 (0.02 g/100 ml, 0.05 g/100 ml) を用いて光散乱法により分子量を測定したところ、重量平均分子量が同じであったことから、Over-all reaction は一次反応にしたがうことを明らかにした。このような凝集反応の速度論的な取扱いに関する意見の食い違いは次のような事実に由来するのである。すなわち、(1) 式に基づく速度論的取扱いの結果として、もし超遠心分析により測定された成分がすべて一量体であると仮定すると、その一量体のしめす峰の消失速度は当然一次反応的にならなければならないにもかかわらず、実験的にはこの事実は観察されていない³⁴⁻³⁶⁾。従って ATPase の失活と不可逆的な凝集反応は相ともなっているという幾つかの実験的事実¹⁻²⁾が提示されているが、これら両反応が同時に同一反応次数で起るということを断言するにはさらに多くの実験事実が必要であると考えられて来た。そしてまた測定手法の相違は凝集反応と失活反応を分離して追跡しているという可能性も指摘され、このために凝集反応は二次反応的に、失活反応は一次反応的に進行するという考え方も存在して来た。このようなミオシンの上記 (1) 式および (2) 式にしめされる変性機構をめぐっての矛盾や混乱、さらに相反する論争はミオシンそのものを試料として用いる限り両者間の妥協は成立しないであろう。何故ならばミオシン分子の特殊な形と複雑性によってミオシンはその大部分が不可逆的と考えられる自然発生的な分子間凝集を起すばかりでなく生理的な pH 環境で高塩濃度という条件下においてさえも一量体⇌多量体の平衡状態にある^{44), 45)}ことがしめされているからである。この後者の可逆的凝集反応はミオシンの生物活性の喪失をとまわず、主としてミオシン分子の尾部の作用によって引き起される^{6), 7), 41), 42), 43), 44)}。この事実を考慮に入れると、低温におけるタラのミオシンや室温における家兎のミオシンの凝集の度合が超遠心法で測定された場合、これが必ずしも ATPase 活性の消失の度合とは一致しないということは当然と考えてよいであろう。もちろん超遠心分析法は粒子の凝集の度合を他の如何なる方法よりも意図的に測定できるすぐれた方法である。しかしこの流体力学的方法は実際にどのような種類の凝集反応が起っているかという情報を我々に伝えてくれないのが欠点である。

電子顕微鏡による観察では HMM-5 の変性は初期の段階では必ずしも長軸にそった側面重合の仕方はしていないし、変性時間の経過とともにより大きな重合体へと融合成長してゆく過程がよく判る (Plate 1)。しかし、超遠心分析の結果では、HMM-5 はミオシンと同じように挙動し明らかに変性して重合していると思われる峰と未変性の一量体と思われる峰とが分れてゆく。HMM-5 がミオシン分子の尾の一部分をもっていることからこの残存する尾の存在ですら変性反応の解析を困難にする要因となり得ることがこの事実からも判る。それで、ミオシンの球状の部分だけであると考えられている S_1 を

試料として用いると解析は極めて容易となる。Fig. 2 にしめした一次反応の理論曲線と超遠心分析において、未変性と思われる峰の面積の経時的変化とがよく一致する (Fig. 12). そしてこの峰の沈降定数は $S_{20,0}^0 = 5.74$ で生のもと同じである (Fig. 11). さらに失活と凝集反応の一致は Sephadex G-200 Column によるゲル濾過法によって得られた結果からも確認された (Figs. 12, 13). 以上の結果から S_1 を試料として用いる限りでは (1) 式と (2) 式の間の食い違いは取り除かれ統一された反応機構を (2) 式によって説明することが可能になる. (2) 式の中でミオシンおよびミオシンサブフラグメントが N^* の形に変化し、それから変性へと進む過程の中に含まれる変化については判っていない. Figs. 6, 8, にしめすようにミオシンおよびミオシンサブフラグメントの粘度や $-b_0$ 値が増加してゆくことからおそらく三次構造の変化が関与していると考えられる. さらに $-b_0$ 値が増加する度合はサブフラグメントの分子量が減少するにつれて増大することをしめしている (Fig. 8). これらの一連の結果から考えると (2) 式の機構中の中間体 N^* に関しては次の2つの可能性が示唆される. すなわち①分子内構造の微細かつ迅速な組替が変性に先行して起っている. あるいは②変性それ自体が分子構造の乱れをもたらす傾向がある. 現時点では上記2つの可能性の中、いずれがより確からしいかということを明らかにすることは出来ない. しかし ATPase の活性点はミオシンの球状部分に局在していることはわかっているので ATPase 活性の顕著な変化が分子の局部的構造変化によって誘発されると予想することは妥当な考え方であろう.

一方、反応生成物は凝集した分子によって形成される巨大なかたまりであることが電子顕微鏡によって観察されている (Plate 1). この凝集塊はおそらく分子相互の融合ないしは接合によって生成され、その結果として ATPase の活性点のマスクングを引き起すのであろう. このような分子間凝集反応を引き起す力については疎水結合あるいはイオン結合が考えられる. ミオシンを含む系においては特に可逆的凝集反応の場合、イオン結合が凝集の過程に重要な役割を演じているように見受けられる. その理由は形成された凝集体であるミオシンフィラメントの安定性は塩の添加によって著しく減少し、またこの安定性は温度と無関係であることによる⁴⁶⁾.

しかし、本論文ではミオシンおよびミオシンサブフラグメントの熱変性はいつも塩を加えると促進され (Figs. 2, 5, 6), そして明らかに温度依存性をしめす (Fig. 4). これらの事実は不可逆的な凝集は主に分子間の疎水結合によってもたらされるという考えに有利な事実を提供している. 一般に電解質の濃度を上げると溶媒中の極性が増し、非極性基の溶解度が減少する結果として疎水結合を強める. また、変性のエントロピー変化は温度に関係なく常に正の寄与を ΔS^0 に対しておこなう構造的エントロピー変化に加えて、分子の折れたみ様式のほぐれによって露出する疎水性基のエントロピー変化が主体的な変化要因となっており、この後者のエントロピー変化は低温では負の寄与を ΔS^0 に対しておこなっているが温度が上昇するにつれてより正の寄与をおこなうようになることが知られている⁴⁷⁾.

ミオシンは不溶性のメタル-ミオシアネートにアニオンが結合することで可溶性になることが報告されている⁴⁸⁾. そしてピロリン酸はミオシンの ATPase 活性部位と特異的な相互作用をもつ⁴⁹⁾ 他に一般的な分子上のアニオン結合部位に置きかわることが出来る^{50), 51)}. ミオシンおよびミオシンサブフラグメント (HMM-5, HMM-10) のアミノ酸分析の結果⁷⁾ はイオン性側鎖を持っている残基はミオシン分子の尾の部分に濃縮されており、それ故非特異的なアニオン結合部位の数はミオシンをトリプシンで加水分解する過程で減少してゆくであろう. 一方疎水結合部位を持ったものは球状の部分により多く局在している. ミオシンの熱変性に対する 10 mM ピロリン酸の保護効果は明らかにミオシンのトリプシン分解の進行につれて低下する (fig. 14 (a), (b), (c)).

以上の結果から ATP とは異なって、ピロリン酸はミオシンの活性部位に結合してミオシンを安定化するのではなく、単に分子間の静電的反発力の増大によって (2) 式の中の (II) の段階における速度がおそくなるだけであることが示唆される. このことは Goodfrey & Harrington が溶液中での分子量を測定した時に、オルトリン酸緩衝液はいろいろの形の二量体 (dimer) あるいは多量体 (n-mer) の形成を阻害するという報告^{44), 45)} とよく一致する. ミオシン分子の尾部を欠いているサブフラグメント

(S_1) についてはピロリン酸はほとんどその変性保護効果を発揮しない (Fig. 14 (c)). このような現象はミオシンの球状部分間の疎水結合反応が主要な役割を演じているという観点と一致するものと考えられる。

中性の有機溶媒, グルコースおよび基質 ATP は(2)式の(I)の速度に明らかに影響することから, S_1 の熱変性に対して前者は強力な, 後者は温和な変性阻害剤として作用することが判った (Fig. 14 (c)). これらの変性阻害剤の中, 中性有機溶媒, グルコースの変性抑制の機作については過去に報告⁴⁾がある。一方 ATP は変性条件に対してミオシンだけで存在するよりもより安定であると考えられている酵素-基質複合体の形でミオシンの安定性に寄与していると^{53), 54), 55)}考えられる。

それでは何故ピロリン酸が ATP と同じような変性阻害剤として作用しないかという疑問が生じてくる。これまでしばしば ATP とピロリン酸はアクトミオシン系に対して同じような挙動をしめすということから変性阻害剤としても同じように考えられ, またこれら2つのリン酸化合物は家兎のミオシンと良く結合するし, ミオシン1モルあたり1~2個の結合点をもっていることも明らかである^{50-52), 56), 57)}。また ATP, ピロリン酸は DNP (2,4-dinitrophenol) および NEM (*n*-ethylmaleimide) のような変性剤によるミオシン ATPase の失活を阻害する^{58), 59)}。さらに旋光分散, 紫外部差スペクトル^{57), 61), 62)}による ATP, ピロリン酸の結合に対する高次構造の変化も追及されている。しかし, ATP, ピロリン酸といったポリリン酸の結合のメカニズムはまだ説明することは出来ないが, これらのポリリン酸はミオシン ATPase の失活を阻害するように分子構造を修飾することは推測出来る。そして ATP を用いた今回の実験結果からも同じような構造上の変化が熱変性に対してミオシンおよびミオシンサブフラグメントを保護する上で役立っていると考えられる (Fig. 14 (c)).

注意しなければならないこととして, 上記の一連の過去における研究は^{50-52), 56-62)} $MgCl_2$ の存在する系でおこなわれているという事実が指摘される。

これら一連のミオシンの ATP あるいはピロリン酸の結合部位に関する保護作用とは対照的に, 本論文における実験 (Fig. 14) においてはミオシンの変性に対するピロリン酸の抑制効果に関する限りは Mg^{++} の存在は必要ではないことがしめされ, この点に関しては安井らの報告²⁾も同様の結果をしめしている。さらにタラのミオシンの不可逆的凝集に対するピロリン酸の抑制作用が $MgCl_2$ の濃度の増加につれて減少することが Mackie³⁶⁾ によって報告されている。これらの諸結果はミオシン ATPase の変性に及ぼすピロリン酸の保護効果は前述の ATP による保護効果とは若干異なった機構に従って発揮されていることを示唆している。

V. 結 語

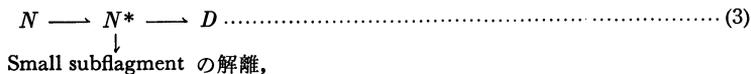
以上の論議ともに本実験により得られた結果を総括すると次のことが考えられる。

すなわちミオシンの ATPase の失活をとまなう不可逆的凝集反応すなわち変性は分子の球状部分の融合によるものであり, 分子の尾部は本実験におけるような温和な条件下にある溶液状態においてはむしろ静電反発的に働き, 全体の変性作用に対しては抑制的な効果をもつものである。そしてピロリン酸の変性抑制効果はこの後者の抑制効果を強めるものであって, Mg^{++} -ピロリン酸系においてみられる活性部位あるいは結合部位に結合して酵素-基質複合体を形成することによってミオシン ATPase を安定化するという可能性は少ない。

35°C, 中性という温和な条件下でおこなわれた本実験が筋肉構造タンパク質を原料とする肉製品の保水性や結着性と直接的に関連するかという点は未だ明確には断言できないが, より高温 (60~70°C), より酸性側 (pH 5.5~6.5) で肉製品のゲル化現象が構造タンパク質中のミオシンによる網状構造形成によることはほぼ明らかであることからこの酵素タンパク質の活性点が局在する部位を選択的に分離し, その不可逆的凝集反応の機作を部分的にでも解明できたことは前記の肉製品の製造工程についての基本的な理論形式の一助となるであろう。しかし実際製造加工条件下でおこる網状構造形成の機構は本

論文ではふれられていない分子の尾部（棒状部分）の熱変性の機構解明を待ってその全豹が初めて明らかにされるであろう。

また一方、タンパク質、酵素化学的見地からみるならば安井ら²⁾、Johnson & Rowe³⁵⁾ が提出していた機構は本研究では否定されている。



アルカリ変性⁶⁸⁾ や変性剤の使用によって上記 (3) 式は現在ミオシン分子の球状部分の活性点そのものとして多くの研究者⁶⁸⁾ によって研究されその存在の確からしさは明らかにされつつある。しかし、中性および哺乳動物の体温に近い条件でのミオシンの熱変性は活性点の離脱をとまわず、分子内高次構造の変化に起因する分子間結合による凝集のみを起し結果として活性点はマスクされてしまうというごく一般的な変性過程を考えることが妥当であることを本実験はしめしている。

要 約

1. DEAE-Cellulose Column によって精製したミオシンと生物活性をもったミオシンサブフラグメント (HMM-5, HMM-10, S_1 , S_{1-n}) についていろいろな条件で変性の状態を検討した。
2. ミオシンサブフラグメントの ATPase の失活の中、pH, 温度依存性はほとんど同じであったが、反応速度はより小さいサブフラグメント (S_1 , S_{1-n}) になるにつれて速くなった。
3. ATPase の失活にイオン強度依存性はミオシンおよびミオシンサブフラグメントとも生理的条件下 ($I=0.1$) 最も安定であった。また、ミオシン分子の安定性に尾の部分が大きく貢献していることが判った。
4. ATPase の失活にともなう分子の不可逆的な凝集反応は本研究で検討した全ての変性反応にみとめられたが遊離の SH 基は本反応とは全然無関係であることが確認された。
5. 熱変性の過程で HMM や S_1 から小さなサブユニット (g-サブユニット) の遊離は確認出来なかった。
6. S_1 を試料として用いた場合、超遠心による沈降速度の分析および Sephadex G-200 によるゲル濾過の結果から測定した変性の一次反応速度定数は ATPase の失活の速度定数と良く一致した。
7. グルコースと ATP はミオシンおよびミオシンサブフラグメントの ATPase の失活の阻害剤として作用したがピロリン酸の阻害効果はミオシンがしだいに小さなサブフラグメントに分解されるにつれて減少した。
8. ミオシンの変性におよぼすピロリン酸の影響および変性過程における分子間の相互作用等に関する可能な機構についての考察がおこなわれた。

本論文を終えるにあたり、終始懇切でいねいな御指導をいただきました安井勉教授、有馬俊六郎教授、深沢利行助教授、高橋興威助手、森田潤一郎助手、長橋隆雄技官、理学部化学第二学科生物有機化学教室の八木康一教授、内田倅僖助教授、盛田フミ助手、矢沢洋一助手に心から感謝の意を表します。

本論文は J. Biochem., Vol. 10, No. 4 (1971)⁸²⁾ に掲載された論文に未発表の Data を加えて、総説として発表するものであり、北海道大学審査学位論文である。

VII. 参 考 文 献

- 1) YASUI, T., FUKAZAWA, T., HASHIMOTO, Y., KITAGAWA, S., and SASAKI, A. T., *J. Biochem., Tokyo*, **45**, 717-724 (1958).

- 2) YASUI, T., HASHIMOTO, Y., and TONOMURA, Y., *Arch. Biochem. Biophys.*, **87**, 55-62 (1960).
- 3) TAKAHASHI, K., YASUI, T., HASHIMOTO, Y., and TONOMURA, Y., *Arch. Biochem. Biophys.*, **99**, 45-51 (1962).
- 4) YASUI, T., MORITA, J., and TAKAHASHI, K., *J. Biochem., TOKYO*, **60**, 303-316 (1966).
- 5) YASUI, T., KAWAKAMI, H., and MORITA, F., *Agr. Biol. Chem., TOKYO*, **32**, 225-233 (1968).
- 6) HUXLEY, H. E., *Science*, **164**, 1356-1366 (1969).
- 7) LOWEY, S., SLAYTER, H. S., WEEDS, A. G., and BAKER, H., *J. Mol. Biol.*, **42**, 1-29 (1969).
- 8) PERRY, S. V., *Biochem. J.*, **48**, 257-265 (1951).
- 9) GERGELY, J., *J. Biol. Chem.*, **200**, 543-550 (1953).
- 10) MYHALYI, E., and SZENT-GYÖRGYI, A. G., *J. Biol. Chem.*, **201**, 189-196 (1953).
- 11) SZENT-GYÖRGYI, A. G., *Arch. Biochem. Biophys.*, **42**, 305-320 (1953).
- 12) RICE, R. V., in GERGELY, J., *Biochemistry of Muscular contraction*, Little Brown Co., Boston, p. 41-58 (1964).
- 13) RICE, R. V., BRADY, A. C., DEPUE, R. H., and KEILLY, R. E., *Biochem. Z.*, **345**, 370-394 (1966).
- 14) MUELLER, H., and PERRY, S. V., *Biochem. J.*, **85**, 431-439 (1962).
- 15) YAGI, K., YAZAWA, Y., and YASUI, T., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **29**, 331 (1967).
- 16) PERRY, S. V., in COLOWICK, S. P., and KAPLAN, N. D., *Methods in Enzymology*, Vol. 11, Academic Press Inc., New York, p. 582 (1955).
- 17) TONOMURA, Y., TOKURA, S., SEKIYA, K., and IMAMURA, K., *Arch. Biochem. Biophys.*, **95**, 229-236 (1961).
- 18) TAKAHASHI, K., HASHIMOTO, Y., and TONOMURA, Y., *J. Biochem. TOKYO*, **54**, 550-552 (1963).
- 19) LOWEY, S., and HOLTZER, A., *Biochim. Biophys. Acta*, **34**, 470-484 (1959).
- 20) YAGI, K., and YAZAWA, Y., *J. Biochem. TOKYO*, **60**, 303-316 (1966).
- 21) MUELLER, H., *J. Biol. Chem.*, **239**, 797-804 (1964).
- 22) MARTIN, J. B., and DOTY, D. M., *Anal. Chem.*, **21**, 965-967 (1949).
- 23) ELLMAN, G. L., *Arch. Biochem. Biophys.*, **82**, 70-77 (1959).
- 24) MOFFIT, W., and YANG, G. T., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **42**, 596 (1959).
- 25) COHEN, C., and SZENT-GYÖRGYI, A. G., *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 248 (1957).
- 26) KAWAHARA, K., *Biochem.*, **8**, 2551-2557 (1969).
- 27) PELLETIER, G. E., and OUELLET, L., *Canad. J. Chem.*, **39**, 265-272 (1961).
- 28) PENNY, I. F., *Biochem. J.*, **104**, 609-615 (1967).
- 29) GLASSTONE, S., *Textbook of Physical Chemistry*, 2nd ed., Macmillan and Co Ltd., London, p. 1098 (1948).
- 30) ZOBEL, C. R., *Biochim. Biophys. Acta*, **140**, 222-230 (1967).
- 31) BAILLY, K., and PERRY, S. V., *Biochim. Biophys. Acta*, **1**, 506-516 (1947).
- 32) JOLY, M., *A Physico-chemical Approach to the Denaturation of Proteins*, Academic Press, New York, p. 137 (1965).
- 33) LOWEY, S., and HOLTZER, A., *J. Am. Chem. Soc.*, **81**, 1378-1383.
- 34) CONNELL, J. J., *Biochem. J.*, **75**, 530-538 (1960).
- 35) JOHNSON, P., and ROWE, A. J., *Biochim. Biophys. Acta*, **53**, 343-360 (1961).
- 36) MACKI, I. H., *Biochim. Biophys. Acta*, **115**, 160 (1965).
- 37) HARDY, C. J., and POLLARD, F. H., *J. Chromatog.*, **2**, 1-43 (1959).
- 38) MARUYAMA, K., and ISHIKAWA, Y., *J. Biochem. Tokyo*, **57**, 712-714 (1965).
- 39) GERSHMAN, L. C., and DREIZEN, P., *Biochem.*, **9**, 1677-1693 (1970).
- 40) PERRY, S. V., in BUTLER, J. A. V., and HUXLEY, H. E., *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, Vol. 17, Pergamon Press, Oxford and London, P. 327 (1966).
- 41) COHEN, C., LOWEY, S., HARRISON, R. G., KENDRICK-JOHNES, J., and SZENT-GYÖRGYI, A. G., *J. Mol. Biol.*, **47**, 605-609 (1970).
- 42) LOWEY, S., and GOLDSTEIN, L., *J. Mol. Biol.*, **23**, 287-304 (1967).
- 43) HAMM, R., and HOFFMAN, K., *Nature*, **207**, 1296-1271 (1965).
- 44) GODFREY, J. E., and HARRINGTON, W. F., *Biochem.*, **9**, 886-893 (1970).
- 45) GODFREY, J. E., and HARRINGTON, W. F., *Biochem.*, **9**, 894-908 (1970).

- 46) JOSEPHS, R., and HARRINGTON, W. F., *Biochem.*, **7**, 2773-2774 (1968).
- 47) BRANDTS, J. F., in TIMASHEFF, S. M., and FASMAN, G. D., *Structure and Stability of Biological Macromolecules*, Part 11, Macel Dekker Inc., New York, p. 213 (1969).
- 48) SZENT-GGYÖRGYI, A. G., *Chemistry of Muscular Contraction*, Academic Press, New York, (1952).
- 49) BRAHMS, J., and REZNER, J. B., *Arch. Biochem. Biophys.*, **95**, 219 (1961).
- 50) TONOMURA, Y., and MORITA, F., *J. Biochem. TOKYO*, **46**, 1367-1378 (1959).
- 51) KIELLY, B., and MARTONOSI, A., *J. Biol. Chem.*, **243**, 2273-2287 (1968)
- 52) NAUS, K. N., KITAGAWA, S., and GERGELY, J., *J. Biol. Chem.*, **244**, 755-765 (1969).
- 53) OUELLET, L., LAIDER, K. L., and MORALES, M. F., *Arch. Biochem. Biophys.*, **39**, 37 (1952).
- 54) POGLASOV, B. F., BILUSHI, V., and BAEV, A. A., *Biochimiya*, **23**, 269 (1958).
- 55) BLUM, J. J., *Arch. Biochem. Biophys.*, **87**, 104-119 (1960).
- 56) SCHLISELEFLD, L. H., and BARANY, D. M., *Biochem.*, **7**, 3206-3213 (1968).
- 57) MORITA, F., *Biochim. Biophys. Acta*, **172**, 319-327 (1969).
- 58) LEVY, H. M., LEBER, P. D., and RYAN, E. M., *J. Biol. Chem.*, **238**, 3654-3659 (1963).
- 59) MARTONOSI, A., and MEYER, H., *J. Biol. Chem.*, **239**, 640-647 (1964).
- 60) TONOMURA, Y., SEKIYA, K., IMAMURA, K., and TOKIWA, T., *Biochim. Biophys. Acta*, **69**, 305-312 (1963).
- 61) MORITA, F., *J. Biol. Chem.*, **242**, 4501-4506 (1967).
- 62) MORITA, F., *Biochim. Biophys. Acta*, **172**, 319-327 (1969).
- 63) STRACHER, A., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **35**, 515 (1969).
- 64) MOMMAERTS, W. F. H., *J. Biol. Chem.*, **188**, 559 (1951).
- 65) HUXLEY, H. E., and BROWN, W., *J. Mol. Biol.*, **30**, 383 (1967).
- 66) DEPUE, R. H., and RICE, R. V., *J. Mol. Biol.*, **12**, 302-303 (1965).
- 67) OOSAWA, F. et al. in EBASHI, S. et al., *Molecular Biology of Muscular Contraction*, p. 56 (1965).
- 68) 安井 勉, 缶詰技術, **8**, 466~474 (1967).
- 69) 橋本吉雄編著, 畜肉の科学と製造, 養賢堂, 東京 p. 149 (1966).
- 70) HUXLEY, H. E., *Muscle cells in the cell: Biochemistry, Physiology, Morphology. Vol. 1111 Specialised cells: Part 1*, p. 369 and 375. ed. by BRACHEY, J. and MIRSKY, A., Academic Press, New York, (1960).
- 71) SLAYTER, H. S., and LOWEY, S., *Pro. N. A. S.*, **58**, 1611 (1967).
- 72) HASSELBACH, W., and SCHNEIDER, G., *Biochem. Z.*, **321**, 462 (1951).
- 73) HANSON, J., and HUXLEY, H. E., *Biochim. Biophys. Acta*, **23**, 250-260 (1957).
- 74) TONOMURA, Y., APPEL, P., and MORALES, M., *Biochem.*, **5**, 515-521 (1966).
- 75) LOWEY, S., and COHEN, C., *J. Mol. Biol.*, **4**, 293-308 (1962).
- 76) JOHNSON, P., HARRIS, C. I., and PERRY, S. V., *Biochem. J.*, **105**, 361-370 (1967).
- 77) JOHNSON, J., and LOWEY, J., *J. Mol. Biol.*, **6**, 46-60 (1963).
- 78) HUXLEY, H. E., *Scientific American*, **18**, 213-223 (1965).
- 79) 関根隆光, 山下辰久, 蛋白質, 核酸, 酵素, **11**, 302~308 (1966).
- 80) TRAUTMAN, J. C., *J. Food Sci.*, **31**, 409-418 (1966).
- 81) MARTIN, R. B., 著, 野田春訳, 生物物理化学, 東京化学同人, p. 127~155 (1966).
- 82) KAWAKAMI, H., MORITA, J., TAKAHASHI, K., and YASUI, T., *J. Biochem. TOKYO*, **10**, (1971), in the print.

SUMMARY

1. Denaturation of purified myosin and its enzymically active subfragments, heavy meromyosin, subfragment 1 and subfragment 1-n have been studied under the various conditions.
2. Although the dependence on pH and temperature of denaturation of myosin subfragments has been shown to be almost the same as those of the parent protein, the rate of the reaction increases gradually until myosin molecules are fragmented to globular heads.
3. The dependence on ionic strength of the rates of denaturation particularly indicates that

myosin is stabilized at higher ionic strength, suggesting that the rod region of myosin molecule plays some role for the stability of the protein in solution.

4. Aggregation which accompanies denaturation has been found in all denaturation reactions examined, and free sulphhydryl groups on and in the protein molecules have been confirmed to have nothing to do with this phenomenon.

5. No liberation of small subunit (*g*-subunit) from heavy meromyosin and subfragment 1 was detectable during the course of thermal denaturation.

6. The first-order rate constant determined from analyses of sedimentation velocity diagrams and gel-filtration profiles has coincided with that determined from loss of ATPase activities with time of incubation under the same conditions, only when the subfragment 1 was used as material.

7. While glucose and ATP act as inhibitors of denaturation reaction of myosin and its subfragments, a protective effect of 10 mM P_{Pi} has been depleted as myosin is fragmented into smaller subfragments.

8. The influence of this anion on the denaturation of myosin and the possible mechanism and intermolecular interactions among molecules in the denaturation process are discussed.