

# 豚骨格筋6S $\alpha$ -アクチニンが筋タンパク質の 死後変化に及ぼす影響について

加 香 芳 孝

(1972年8月31日受理)

## Effect of Porcine Skeletal Muscle 6S $\alpha$ -actinin on the Post Mortem Changes in Muscle Proteins

Yoshitaka KAKO

(Animal Products Processing Research Laboratory)

### 目 次

第1章 緒 論	スクレオチドの影響
第2章 実験材料および試料調製法	1. 実験方法
1. 実験材料	2. 実験結果および考察
2. 試料調製法	(1) 濁度に及ぼす影響
(1) 6S $\alpha$ -アクチニン	(2) 粘度に及ぼす影響
(2) アクチニン	(3) 電子顕微鏡による観察
(3) ミオシン	(4) 6S $\alpha$ -アクチニンと F-アクチンの相互作用の ATP による抑制機構
(4) トロポニン	3. 要 約
(5) トロポミオシン	第6章 細いフィラメントと 6S $\alpha$ -アクチニンとの相互作用
(6) 筋小胞体 ATPase	1. 実験方法
第3章 試料の理化学的性状および活性	2. 実験結果および考察
1. 実験方法	(1) 細いフィラメントの粘度に及ぼす環境因子の影響
2. 実験結果および考察	(2) 電子顕微鏡による細いフィラメントの観察
(1) 理化学的性状	3. 要 約
(2) 活 性	第7章 6S $\alpha$ -アクチニンが細いフィラメントと太いフィラメントによる超沈殿に及ぼす影響
3. 要 約	1. 実験方法
第4章 6S $\alpha$ -アクチニンと F-アクチンの相互作用に及ぼす環境因子の影響	2. 実験結果および考察
1. 実験方法	(1) 細いフィラメントと太いフィラメントによる超沈殿
2. 実験結果および考察	(2) F-アクチンと太いフィラメントによる超沈殿に及ぼす各種因子の影響
(1) 6S $\alpha$ -アクチニンと F-アクチンの相互作用	(3) 細いフィラメントと太いフィラメントによる超沈殿に及ぼす 6S $\alpha$ -アクチニンの影響
(2) 塩濃度の影響	3. 要 約
(3) ATP とリン酸塩の影響	総 括
(4) ATP 濃度の影響	文 献
(5) ATP とタンパク比による影響	英文要約
(6) Mg <sup>2+</sup> と Ca <sup>2+</sup> の影響	
(7) pH の影響	
(8) タンパク比の影響	
(9) トロポミオシンの影響	
(10) 温度の影響	
3. 要 約	
第5章 6S $\alpha$ -アクチニンと F-アクチンの相互作用に及ぼす	
	筋タンパク質に関する研究は、従来主として筋生理学の分野において、特に生筋の収縮弛緩機構の解明を

### 第1章 緒 論

筋タンパク質に関する研究は、従来主として筋生理学の分野において、特に生筋の収縮弛緩機構の解明を

主題としてすすめられてきている。すなわち、SZENT-GYÖRGYI<sup>(1)</sup>によって、筋収縮は、基本的にはアクチンとミオシンがATPを介して相互作用がたかめられた状態で、*in vitro*におけるアクトミオシンの超沈殿を起こした状態に相当するものであるとする、分子レベルにおける解析がなされて以来、この3種の筋タンパク質については、多くの研究が行なわれ、微細構造上の特性や、特異な生化学的作用などが次第に詳しく知られるようになった。

また、生筋の収縮弛緩の神経支配機構に関しては、MARSH<sup>(2)</sup>およびEBASHI et al.<sup>(3)</sup>によって筋小胞体によるCa<sup>2+</sup>（カルシウムイオン）濃度の調節がそのKeyとなるという説が提出され、筋小胞体のもつATPase活性との相関において、Ca<sup>2+</sup>の取込みと放出がなされ、それによって生理的に随時収縮弛緩が起こされ得るという仕組みが解明されてきている。すなわち、神経性の刺激により筋小胞体で、Ca<sup>2+</sup>の放出もしくは取込みが起こり、筋原線維内でCa<sup>2+</sup>濃度が10<sup>-5</sup>~10<sup>-7</sup>Mのレベルで変化する。その場合、このような変化を直ちに感受する部分がなければならないが、これについては特にEBASHI et al.<sup>(4,5,6)</sup>によって検討され、その実体は頭初“活性トロポミオシン”といわれていたところの、トロポニン-トロポミオシン複合体で、この複合体は、筋原線維中の細いフィラメントに含まれ、二重ラセンの線維構造をもつF-アクチンの上に、一定の規則性をもって局在配置されており、元来それ自体は細いフィラメントと太いフィラメント間の反応を抑制しているが、そこにCa<sup>2+</sup>が放出され、10<sup>-5</sup>M程度の濃度となると極めて大きい親和性をもってCa<sup>2+</sup>はトロポニンに結合し、トロポニンはある種の構造変化を受けるが、その変化をトロポミオシンを介してF-アクチンに伝へ、構造変化を起こさせるという、いわゆるアロステリック効果<sup>(7)</sup>を発現し、その結果太いフィラメント中のミオシンのクロスブリッジと、細いフィラメント中のF-アクチンの結合位置との間での反応が促進され、筋組織内では筋収縮、試験管内では超沈殿として現われるが、逆にCa<sup>2+</sup>濃度が筋小胞体への吸着のため低下すると、反応は抑制されて弛緩状態が現出するものであるという見解が支持されるようになってきている。

さらに、この活性トロポミオシンならびにトロポニンの発見の過程で、存在量は微量ながら特異な調節機能をもったタンパク質がEBASHI<sup>(8)</sup>、MARUYAMA<sup>(9)</sup>、MASAKI et al.<sup>(10)</sup>によって発見された。その一つは $\alpha$ -アクチニンであって、このタンパク質の特性として現

在知られているところは、F-アクチンの側面会合による凝集またはゲル化を起こさせ、またアクトミオシンの超沈殿を促進するというものである。この $\alpha$ -アクチニンは、さらにNONOMURA<sup>(11)</sup>によって超遠心法により6S、10S、25Sの3成分に分離されたが、上記の活性を示すのは、6S成分のみである<sup>(12)</sup>と現在では考えられている。

筋原線維は、主としてミオシンからなる太いフィラメントと、アクチン、トロポミオシン、トロポニンからなる細いフィラメントで構成され、細いフィラメントの部に、やや暗い線状として観察されるZ線(Z Line)と呼ばれている部分があり、Z線とZ線の間を筋節(Sarcomere)と名付け、この筋節が筋原線維の構成単位と考えられている。

上述の6S成分は、現在のところ生筋の筋原線維中ではZ線に局在していると考えられているが<sup>(13)</sup>、動物の死後、筋組織の死後変化の進行に伴い、Z線の部分から消失してゆき、これと同時にZ線の部分の構造が弱まり、弱い衝撃によっても筋原線維がこのZ線の部分で切断され易くなると報告されている<sup>(14)</sup>。

また、他の一つは $\beta$ -アクチニンであるが、このタンパク質はG-アクチンが重合してF-アクチンを形成する時、F-アクチンの長さを調節する作用を示し、また、F-アクチンの側面会合を抑制する性質を有すると報告されているほか、動物の発生初期において、筋線維が形成される段階で必要な調節性タンパク質であろう<sup>(15)</sup>と説明されている。この $\beta$ -アクチニンの局存性はまだ明らかではないが、現在のところ、おそらく細いフィラメントの部分に存在しているであろうと考えられている。

さらに太いフィラメントの構成成分の一つとしてM-タンパク質も見出されており、このタンパク質の特性は、太いフィラメントの側面会合による凝集を促進する性質であり、太いフィラメント上のM線に局在すると報告<sup>(16)</sup>されている。

以上述べた各種筋タンパク質の筋原線維タンパク質中の含有率ならびに細いフィラメントの構造を第1-1表、第1-1図に示した。

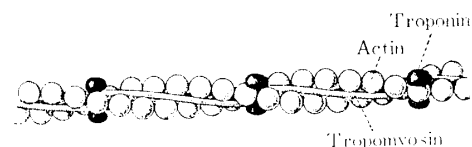


Fig. 1-1. A model for the fine structure of the thin filament.

From MARUYAMA and EBASHI<sup>(16)</sup>

Table 1—1. Protein composition of myofibrils\*

	Localization	% of the total myofibrillar protein
Myosin	Thick filament	55
Actin	Thin filament	20
Tropomyosin	Thin filament	5
Troponin	Thin filament	3
6 S $\alpha$ -actinin	Z line	2
10 S $\alpha$ -actinin	?	5
$\beta$ -actinin	Thin filament	<1
M protein	M line	<1

\* MARUYAMA and EBASHI (16)

一方、動物の筋肉は、生理学的に生体の運動機能と密接に関連し、その収縮弛緩は筋肉本来の機能として極めて重要であるが、同時に、動物、特に家畜は死後その筋肉が食用として利用され、人類の栄養源、特にタンパク質給源として重要な意義をもっている。さらに筋肉が食用に供せられる場合、通常と殺解体後、死後硬直、硬直解除、熟成という一連の死後変化の過程を経て、はじめて利用されるので、筋肉の死後変化に関連する種々の問題の解明は、食品科学的な面から非常に重要な意義をもっている。

この筋肉の死後変化についても、すでに多くの研究がなされている。すなわち、最近における死後硬直と関連性のあるものとしては、動物の死後、筋小胞体に吸着されていた  $Ca^{2+}$  の放出されることが観察され、この  $Ca^{2+}$  が筋原線維内に拡散し、ミオシン ATPase を活性化し、さらに細いフィラメントと太いフィラメントとの間の相互作用を促進して、死後硬直を促進させる可能性のあることが考えられている (BUSCH<sup>(17)</sup>, EASON<sup>(18)</sup>.)

この事実は神経支配を全く失った筋肉組織内でも、 $Ca^{2+}$  は無作為的な反応促進の効果をもつことを意味しており、換言すれば、死筋においても  $Ca^{2+}$  と細いフィラメント系とは、やはり密接な関係にあるらしいことを示しており、極めて興味深い。

また、死後硬直の解除、すなわち、解硬現象と関連性のあるものとしては OKITANI et al.<sup>(19)</sup> の、死後硬直の際、筋肉内に形成されたアクトミオシンにおいては、アクチンとミオシンの結合が弱くなっているため非常にわずかな量の ATP (0.1mM 以下) によっても容易に解離するようになるという報告、ならびに BUSCH<sup>(17)</sup> の、 $Ca^{2+}$  が存在すると、Z 線が次第に消失し、筋原線維が Z 線の部分で切れ易くなる事実を観察している報告、などが特に興味深い。この場合、Z

線から遊離消失する物質については同定されていないようであるが、Z 線局在物質であるところの 6S  $\alpha$ -アクチニンである可能性は大きいと思われる。

また、HERRING et al.<sup>(20)</sup> は、従来、肉の中にアクトミオシン量が多いと肉が硬くなり、アクトミオシンがアクチンとミオシンに解離した量が多くなると肉は軟らかくなるという考え方があがあるが、肉の硬さは、このようにアクトミオシン、アクチン、ミオシンなどの筋タンパク質の肉中における分布割合のみならず、特に硬い肉のアクトミオシンには、 $\alpha$ -アクチニンのような調節性タンパク質因子が、より多く含まれている可能性があることを推論している。

このように、6S $\alpha$ -アクチニンをめぐる論議は、すでにいくつかの面で現れているが、特にその死後変化の特異性のために、まだこのタンパク質が、筋タンパク質全般の死後変化に及ぼす影響については不明の点が多い。

従来、6S $\alpha$ -アクチニンに関しては、供試動物のと殺方法がその収率に著るしく影響するといわれている<sup>(8)</sup> ために、普通、麻酔と殺法がとられている関係から大動物についてはあまり実験されかおらず、兎<sup>(6,21)</sup> と鶏<sup>(12)</sup> の筋肉から分離精製されたものについて研究が行なわれているが、その主な生化学特性としては、分子量  $16 \times 10^4$ <sup>(16)</sup>、沈降定数  $S_{20}^w \cdot 6.23$  (兎)<sup>(11)</sup>、6.8 (鶏)<sup>(12)</sup>、吸光度  $E_{278}^{1\%}$  : 10.0<sup>(16)</sup> 同比  $E_{278}/E_{255}$  : 1.9、ヘリックス含量 : 41%、真正粘度 : 0.14<sup>(16)</sup>、塩による弱い凝集性<sup>(12)</sup>、4~8M 尿素溶液中で解離した場合の沈降定数  $S_{20}^w$  : 4<sup>(11)</sup>、であることなどが報告されている。

また生物学的活性に関しては、つぎのような報告が発表されている。

(1) G-アクチンには結合しない<sup>(22)</sup> が、F-アクチンには強い親和性を示し、F-アクチン 1 に対し 0.41

- の比まで結合する<sup>(21)</sup>, F-アクチンの側面会合による凝集を促がし, ついには沈殿を形成させる<sup>(23)</sup>,  $\beta$ -アクチニンと共に F-アクチン線維の長さを調節する (特に伸長させる機能がある) がミオシンとは反応しない<sup>(8)</sup>.
- (2) アクトミオシンの超沈殿の生成を促進する<sup>(8)</sup>, このとき同時にアクトミオシン ATPase 活性を増強する<sup>(22,24)</sup>.
- (3) F-アクチンに結合する際, トロポミオシンと競合するが<sup>(25)</sup>, 0°C 付近では 6S $\alpha$ -アクチニンの方が優先する<sup>(21)</sup>.
- (4) 100°C, 1時間の加熱で  $S_{20}^w$  の値には変化がないが超沈殿増強性を失活する<sup>(11)</sup>.
- (5) Z線上に局在し<sup>(26)</sup>, 細いフィラメントをZ線において接合させる作用があり<sup>(27)</sup>, その存在量は筋原線維全タンパク質量の1~2%<sup>(21)</sup>で, また6S $\alpha$ -アクチニンは骨格筋のほか, 心筋, 平滑筋にも存在<sup>(25)</sup>している,

現在, 6S $\alpha$ -アクチニンは, 生筋中ではZ線の部分に局在すると考えられているが, 動物の死後変化と共に, すでに他の研究者らによっても指摘されているように, その局在位置から他の筋肉組織の部分に移動し, その結果, 死後最大の変化の一つである死後硬直の発現, すなわち, 細いフィラメントと太いフィラメント間の相互作用のたかまりに対して, 何らかの影響をもつ可能性が存在するであろうと考えられるので, もしそのような事実があるとすれば, 6S $\alpha$ -アクチニンは, 肉の硬さ, すなわち, 肉の Tenderness と呼ばれている問題と密接に関連することになるので, これは特に食品科学の面から興味深い問題であると考えられる.

そこで, これらの点を明らかにしてゆくための手がかりを得るため, まず豚骨格筋から6S $\alpha$ -アクチニン, アクチン, ミオシン, トロポニン, トロポミオシン, 筋小胞体 ATPase を分離精製し, それぞれの性状を調査し, これらの各種精製試料を用いて本研究を実施した.

すなわち, まず6S $\alpha$ -アクチニンとF-アクチンとの相互作用に及ぼす塩濃度, ATPとリン酸塩, ATP濃度, ATPとタンパク比, Mg<sup>2+</sup>とCa<sup>2+</sup>, pH, タンパク比, トロポミオシン, 温度, 各種スクレオチドなどの影響を調査し, つぎにF-アクチンとトロポミオシンとトロポニンを用いて, 細いフィラメントを調製し, この細いフィラメントと6S $\alpha$ -アクチニンの相互作用を, 主として粘度の測定と電子顕微鏡による観察

で調査し, さらに細いフィラメントと太いフィラメントによる超沈殿に及ぼす6S $\alpha$ -アクチニンの相互作用を, 主として濁度の測定と電子顕微鏡による観察により追究し, 特に6S $\alpha$ -アクチニンが, 筋タンパク質の死後変化および肉の硬さに及ぼす影響について調査したので, 現在までの実験結果から得られた知見を, とりまとめて報告したいと思う.

## 第2章 実験材料および試料調製法

### 1. 実験材料

本研究において使用した豚骨格筋は, すべて福岡市枝肉市場内, 食肉センターでと殺された6~9カ月齢のランドレース雑種豚と体から, と殺後3~5時間以内 (冷蔵前) に, ハム部 (内転筋: *M.adductores* を主とする) を1~2Kgの肉塊として採取した. 採取後, 直ちに2°Cの低温実験室内で脂肪組織, 結合組織を速かに除去し, 肉ひき機で3回 (3mm, 2mm, 1mmプレートで各1回ずつ) 細切して使用した.

### 2. 試料調製法

上記のように処理した豚骨格筋を用いて, 各種のタンパク質を分離, 精製したが, それらの方法はつぎの通りである.

#### (1) 6S $\alpha$ -アクチニン

$\alpha$ -アクチニンは, EBASHI and EBASHI<sup>(8)</sup> によって発見されたが, その後NONOMURA<sup>(11)</sup> によって6S, 10S, 25Sの3種の沈降定数をもつ成分が含まれていることが見出された. このうち, 生物学的活性の最も強いものは, 6S成分であり, 25S成分は6S成分の重合体と考えられるようになり<sup>(12)</sup>, 10S成分は活性が微弱であるところから検討された結果, 変性アクチンではないかと推定されている<sup>(12)</sup>. 従って現在では, 6S成分のみが $\alpha$ -アクチニンの本体であろうと考えられている.

本実験においては, MASAKI and TAKAITI<sup>(12)</sup> が鶏骨格筋から $\alpha$ -アクチニンを分離精製した方法を一部変更して豚骨格筋 $\alpha$ -アクチニンを調製した.

しかし, このようにして調製した試料について超遠心分析を行なってみると, 10S成分と思われる異種の成分を若干含んでいた (第2-1図参照), さらにNONOMURAの方法<sup>(11)</sup>を準用し, これを40,000rpm (105,000 $\times$ g), 0°Cで5時間遠心分離すると, その上澄液から純粋と思われる6S成分の得られることがわかったので, この方法によって6S $\alpha$ -アクチニン (以



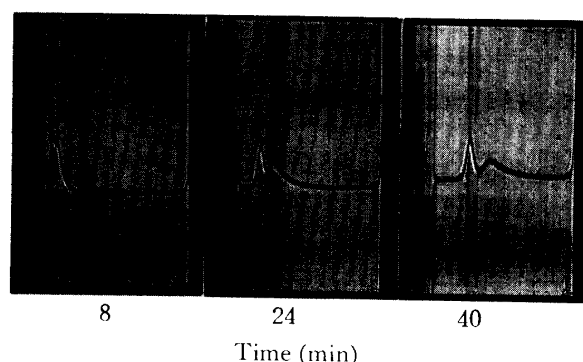


Fig. 2-1. Sedimentation patterns of crude 6S  $\alpha$ -actinin prepared from porcine skeletal muscle according to the method of MASAKI and TAKAI<sup>(12)</sup>. Photographs were taken at intervals indicated, after reaching the steady speed 52, 640 rpm, 20°C.

Final concn. : 6mg/ml, 1 mM NaHCO<sub>3</sub> (pH 7.2).

下6Sと略記)を調製することとした。

## (2) アクチン

STRAUB type のアクチン<sup>(28)</sup>には、トロポミオニン<sup>(23)</sup> および  $\alpha$ -アクチニン<sup>(29)</sup>が含まれているので、この両者を出来るだけ取除いたアクチンを調製して使用することが本研究では必要であるため、この目的にかなう調製法として本実験では EBASHI and MARUYAMA の<sup>(29)</sup>、いわゆる EBASHI type アクチンの調製法に準じてアクチンを調製した。但し、本実験においては、活性トロポミオニン<sup>(4)</sup>、 $\alpha$ -アクチニンを含む“粗抽出液”を抽出除去する段階での抽出温度と時間を、原法では 20°C、8 時間としているのを、25°C、12 時間とした点、抽出液の分離法も、原法ではろ紙でろ過しているのを、12,000 $\times g$ 、4°C、10 分間の遠心分離法に変更した点、さらに原法ではアセトン粉末から得られる G-アクチン溶液中には、微量の  $\alpha$ -アクチニンが混入してくるため、3M KCl 処理をする必要があると述べているが、本実験においてディスク電気泳動法を用いて調査した結果、 $\alpha$ -アクチニンの混入は認められなかったので(第3—2 図参照)、3M KCl 処理を省略した点などが、それぞれ原法と異なるところがある。

F-アクチンは、G-アクチン溶液(5mg/ml 以下の濃度)に 2M KCl 溶液を加えて、終濃度 0.1M KCl とし、光線を避けて 20°C で 3 時間、以後 4°C に 1 夜放置して十分重合させ調製した。

なお、アクチンは G-F 変換による、これ以上の精製は行なわなかったため、この F-アクチン試料中には  $\beta$ -アクチニンが若干含まれている可能性がある。

## (3) ミオシン

本研究で使用したミオシン(以下Mと略記)は、TONOMURA et al.<sup>(30)</sup>の方法により豚骨格筋から分離精製した。

## (4) トロポニン

本研究で使用したトロポニンは、EBASHI et al.<sup>(6)</sup>の方法により、活性トロポミオニンから分離精製した。但し、筋原線維からの抽出液の分離は、原法のろ紙でろ過する方法によらず、12,000 $\times g$ 、4°C、10 分間の遠心分離法によって行なった。

## (5) トロポミオシン

トロポミオシンの調製法としては、BAILEY の方法<sup>(31)</sup>が広く使用されているが、本実験では、前記のトロポニンの調製と同時にこなえる便宜上から、EBASHI et al. の方法<sup>(6)</sup>によって活性トロポミオニンから調製した。

## (6) 筋小胞体 ATPase

本研究に供した筋小胞体 ATPaseは、EBASHI and LIPMANN の方法<sup>(3)</sup>により、まず豚骨格筋から筋小胞体を取り出し、MASORO and YU の方法<sup>(32)</sup>により、高イオン強度溶媒で筋原線維タンパク質を抽出除去してから、1% TritonX-100, 5mM ヒスチジン, pH7.8, 10 $\mu$ M EDTA, 10 $\mu$ M DTT(ジチオスライトール)溶液で溶解抽出する MCFARLAND and INESI の方法<sup>(33)</sup>によって調製した。

なお、これらの試料の調製に当っては、すべて、2 回脱イオンした蒸留水を使用し、pH の測定は、日立堀場 H-5 型 pH メーターを、また、超遠心分離には佐久間製作所製 Marusan 50 S-2 型調製用超遠心分離機を、それぞれ使用した。

## 第 3 章 試料の理化学的性状および活性

第 2 章にのべた方法で調製した各試料について、その理化学的性状ならびに活性を調査したので、まず、その方法と結果についてのべる。

### 1. 実験方法

#### (1) 試料

本実験に使用したすべての試薬は、市販の特級試薬で、ATP は Sigma 社製 5'-ATP ナトリウム塩を用いた。

#### (2) ディスク電気泳動

ポリアクリルアミドゲルを用いたディスク電気泳

動（以下 PA ゲル泳動と略記）は ORNSTEIN<sup>(34)</sup> and DAVIS<sup>(35)</sup> により考案された方法に従い、7%の PA ゲルおよび、これに 7 M の尿素を添加したゲル（以下尿素添加ゲルと略称）を用いて実験を行なった。泳動用緩衝液としては、トリス-グリシン緩衝液 (pH 8.6) を用い、装置は東洋科学産業 K.K. 製のものを使用した。

### (3) 超遠心分析

超遠心分析に使用した装置は、Spinco Model E 型超遠心分離機で、沈降分析は 20°C 付近で行なった。得られた沈降図から沈降定数を、SCHACHMAN の方法<sup>(36)</sup> により算出した。

### (4) 粘 度

本実験では、粘度をオストワルド粘度計（蒸留水落下速度約 25 秒）を用い、25°C で測定した。結果は比粘度として示した。

### (5) 濁 度

6 S の活性、アクトミオシン（以下 AM と略記）の超沈殿<sup>(8)</sup> の測定は、660 m $\mu$  における吸光度の変化、すなわち濁度変化により測定した。使用装置は日立製作所製 124 型ダブルビーム自記分光光度計で、これに循環式恒温装置を付属させて使用した。なお、この場合、超沈殿の測定用には EBASHI and EBASHI<sup>(8)</sup> の方法に準じて調製した合成 AM を使用した。

### (6) 電子顕微鏡

F-アクトチンの線維構造を検討するため、電子顕微鏡を用いて観察した。使用装置は日本電子 JEM7A 型電子顕微鏡で、2%酢酸ウラニルによるネガティブ染色を行ない、直接鏡検法によった。また使用マイクログリッドは FUKANI and ADACHI の方法<sup>(37)</sup> によって調製した。

### (7) ヌクレオチドの薄層クロマトグラフィー

MCFARLAND and INESI の方法により、筋小胞体から Triton X-100 を用いて調製した ATPase 画分は、複雑な内容をもつように思われたので、実際に ATP を基質として反応させた場合、生成するヌクレオチドならびにヌクレオチドを検討することにより、含まれる酵素系の内容を推定した。その場合の実験方法はつぎの通りである。

反応条件は、0.1 M KCl, 20 mM トリス-酢酸緩衝液で pH 7.0 に調整し、これにそれぞれの終濃度が 10 mM ATP, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mg/ml 筋小胞体 ATPase となるように添加し、25°C で反応させた。

ATP の水解により生成するヌクレオチドの抽出は、

反応混液より、各所定前間経過後、2 ml ずつとり、これに 10%過塩素酸 2 ml を加え、10 分間放置後、遠沈 (3,000 rpm, 20 分間, 10°C) し、上澄液全量を他の試験管に移し、これを 10 N KOH および 1 N KOH を用いて pH 6.6 に調整すると多量の白沈を生ずるのでこれを水冷してからろ紙（東洋ろ紙 No. 5A）でろ過し、このろ液について、POTTHAST and HAMM<sup>(38)</sup> の方法を適用し薄層クロマトグラフィーで分析した。

### (8) そ の 他

各種タンパク質溶液の濃度が低い場合、Amicon Ultrafiltration Cell (Model 400) に Diaflo membrane UM-1 を装着し、N<sub>2</sub> ガスで加圧して 2°C で限外ろ過し、濃度を調整した。試料タンパク質溶液の濃度は、すべてマイクロケルダール法によって窒素を定量し、これに 6.25 を乗ずる方法で求めた。

ATPase 活性の測定は、遊離する無機リン酸を FISKE-SABBAROW 法<sup>(39)</sup> により、比色定量する方法によった。

アミノ酸分析は、6 S についてののみ行なったが、分析は常法に従い、Yanaco SLC-5S 型アミノ酸自動分析装置（柳本製作所）を用いて実施した。

## 2. 実験結果および考察

第 2 章で述べた方法で調製した各タンパク質試料の理化学的性状および活性は、つぎの通りであった。

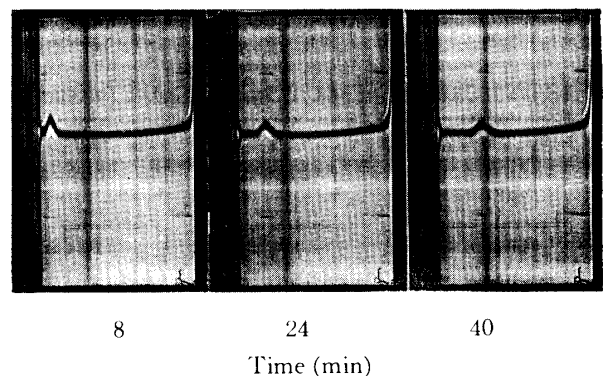


Fig. 3-1. Sedimentation patterns of purified 6 S  $\alpha$ -actinin prepared from porcine skeletal muscle according to the method of NONOMURA<sup>(41)</sup>. Photographs were taken at intervals indicated, after reaching the steady speed of 52,640 rpm, 20°C.

Final concn. ; 2.88 mg/ml, 1 mM NaHCO<sub>3</sub> (pH 7.2).

### (1) 理化学的性状

#### a) 6 S $\alpha$ -アクトニン

6 S の超遠心分析の結果では、第 3-1 図より明ら

Table 3—1. Amino acid composition of skeletal muscle 6 S  $\alpha$ -actinin from various kinds of animal

Kind of amino acid	Residues per 10 <sup>3</sup> g of protein		
	Rabbit	Chicken	Porcine
	(a)	(b)	
Asp	90	85	88
Thr	38	43	40
Ser	39	41	38
Glu	108	116	146
Pro	44	40	32
Gly	64	46	45
Ala	78	67	78
Cys/2	—	—	7
Val	51	41	42
Met	20	22	36
lLeu	34	50	56
Leu	63	71	80
Tyr	15	22	28
Phe	28	25	40
Lys	42	50	50
His	16	22	20
Arg	43	48	57
Try (NH <sub>3</sub> )	—	—	—
		(89)	(120)

(a) : EBASHI and EBASHI <sup>(8)</sup>(b) : MASAKI and TAKAITI <sup>(12)</sup>

かなように、定速後 40 分間までのパターンにおいて、左右対称な単一ピークのみが認められた。この図から沈降定数を求めると 7.07 S となり、従来の報告値である、兎 6 S の 6.23 S よりも、また鶏 6 S の 6.8 S よりやや大きい値を示した。

豚 6 S のアミノ酸組成の分析結果は、兎、鶏の 6 S の分析結果と共に第 3—1 表に示したが、三者を比較してみると、豚の 6 S のアミノ酸組成中、グルタミン

酸、メチオニン、フェニールアラニン、アルギニンが兎、鶏の 6 S よりも多く、逆にプロリンがやや少ない傾向がみられる。しかし、いずれの場合も分析例が少なく、またその分離精製法にもいろいろ問題点があると思われるので、動物の種類による 6 S のアミノ酸組成に関する比較は、今後における、さらに詳細、正確な分析結果に基づいて検討されるべきであろう。

つぎにディスク電気泳動による分析結果は、第 3—

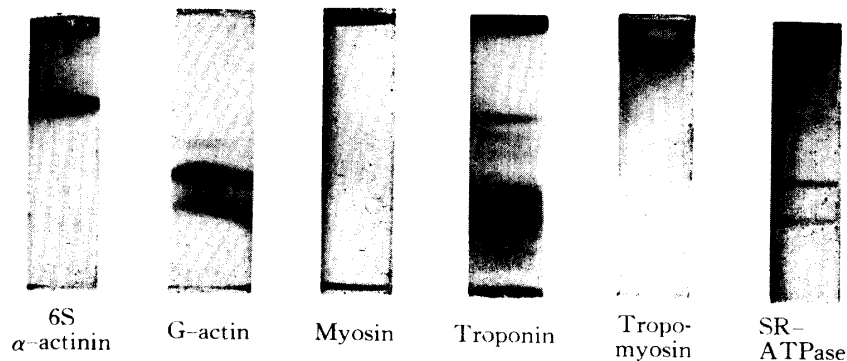


Fig. 3—2. Disc-electrophoretic patterns of various protein preparations from porcine skeletal muscle. All electrophoreses were carried out in Tris-glycine buffer (pH 8.6), employing 7% polyacrylamide gel (5×60-mm), 3mA/column, stained with 1% of Amido Black 10B in 7% acetic acid.

Between 100 $\mu$ g and 200 $\mu$ g of protein was used in each run.

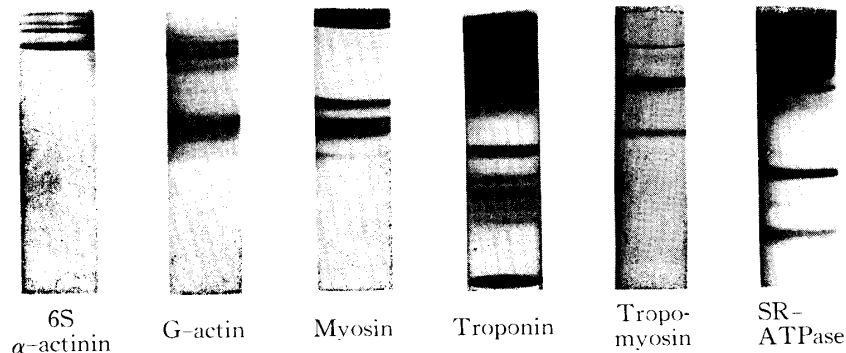


Fig. 3-3. Disc-electrophoretic patterns of various protein preparations from porcine skeletal muscle. All electrophoreses were carried out in Tris-glycine buffer (pH 8.6), employing 7% polyacrylamide gel containing 7M Urea (5×60 mm), 3mA/column and stained with 1% of Amido Black 10B in 7% acetic acid.

Between 100 $\mu$ g and 200 $\mu$ g of protein was used in each run.

2, 3-3 図に PA ゲルおよび尿素添加ゲルを用いた場合をそれぞれ示した。図より明らかな通り、PA ゲルによる分析結果からは、一部重合体を形成しているが、大部分は均一な成分であると思われるパターンを示し、尿素添加ゲルによる分析結果からは、尿素により解離したと思われる 3 本のバンドを含むパターンを示した。これらの点は NONOMURA の報告<sup>11)</sup>しているところとほぼ一致すると思われる。

なお、6S の収量は少なく、200mg~300mg/kg 程度であった。

また、豚 6S は一度凍結すると、線維状の沈殿となるので、凍結保存は不可能であり、従って、チモールを加えて 0°C に保存し、調製後 10 日以内に使用し

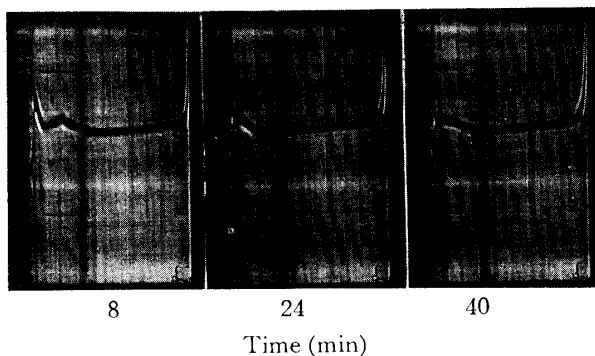


Fig. 3-4. Sedimentation patterns of G-actin prepared from porcine skeletal muscle according to the method of EBASHI and MARUYAMA<sup>(29)</sup>. Photographs were taken at intervals indicated, after reaching the steady speed of 52, 640 rpm, 20°C.

Final concn. : 3.05mg/ml G-actin in 20mM Tris-acetate buffer, pH 7.0.

た。

#### b) アクチン

本報では EBASHI and MARUYAMA の方法<sup>(29)</sup>に準じてアクチンを調製したが、まず G-アクチンは超遠心分析を行なってみると、少量の極めて急速に沈降する成分と、遅く沈降する成分が含まれていることが第 3-4 図から観察される。本報では G-F 変換による精製は行なわれなかったため、調製した G-アクチン中には急速に沈降する若干の F-アクチンが含まれていることが容易に推定される。

PA ゲル電気泳動の結果では、G-アクチンは比較的幅広い 2 つのゾーンとして現れるが、トロポミオンや 6S に相当するバンドやゾーンは全く認められないので、これらのものは殆んど含まれていないと考えられる。

尿素添加ゲル電気泳動の結果では、移動度の遅い、多数のバンドに別れた泳動図を示し、高濃度尿素溶液中では、アクチンは種々の段階に解離するものと思われる。

この G-アクチンを 0.1M KCl 中で十分重合させて調製した F-アクチンについて超遠心分析を行なった結果は、第 3-5 図に示した通りで、ほぼ均一な沈降図となるが、これは EBASHI and MARUYAMA<sup>(29)</sup>の結果とよく一致している。

なお、F-アクチンは特異な線維構造をとることが知られているので、電子顕微鏡によりこの構造を検討した。その結果は Plate I に示した通りで、その典型的な構造が認められた。

#### c) ミオシン (M)

TONOMURA et al. の方法<sup>(30)</sup>に準じて調製した M は

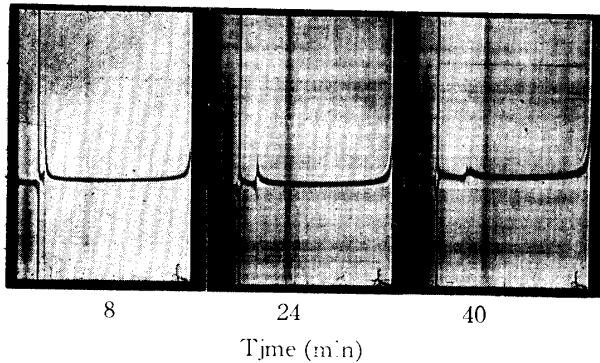


Fig. 3-5. Sedimentation patterns of F-actin prepared from porcine skeletal muscle according to the method of EBASHI<sup>(39)</sup> and MARUYAMA<sup>(40)</sup>. Photographs were taken at intervals indicated, after reaching the steady speed of 20,410rpm, 20°C.

Final concn. : 2.47mg/ml F-actin, 0.1M KCl, 20mM Tris-acetate buffer (pH 7.0).

第3—6図に示した超遠心分析の結果では、均一であることを示している。

また、Mはイオン強度が0.1程度の環境下におかれると、凝集して線維構造をとるようになることが知られているので、その形態を電子顕微鏡により観察した結果をPlate IIに示した。図から明らかなように、中央部を除いた部分に、クロスブリッジをもった、典型的な形態を示すMフィラメントが観察される。

ディスク電気泳動法による分析の結果は第3—2, 3—3図に示した通りである。第3—2図にはPAゲルを用いた場合の分析結果を示してあるが、DEYL et al.<sup>(40)</sup>の報告を参照すると、本報で調製したMは、わ

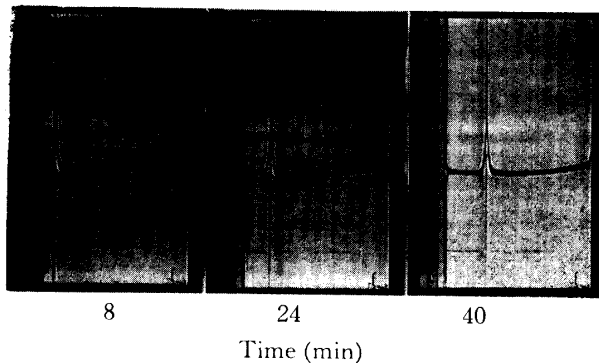


Fig. 3-6. Sedimentation patterns of myosin prepared from porcine skeletal muscle according to the method of TONOMURA et al.<sup>(40)</sup>. Photographs were taken at intervals indicated, after reaching the steady speed of 56,100rpm, 20°C.

Final concn. : 5.11mg/ml, 0.5M KCl, 20mM Tris-acetate buffer (pH 7.0).

ずかに重合体を含むが殆んどがモノマーのMであることが推定される。

また、尿素添加ゲルを用いて分析した第3—3図に示した結果では、7M尿素中では、Mは少なくとも4つのサブユニットに解離することを示しているように思われる。

Mのサブユニットとしては、さきにトリプシンによる部分水解処理により、H-, L-メロミオシンの得られることがよく知られており、さらに最近、M-メロミオシンはトリプシンによる部分水解によりサブフラグメント1と2とに分画されることが報告されている<sup>(41,42)</sup>。しかし、今回得られた泳動図の4つのサブユニットの性状については調査を行なわなかったため、その詳細は不明である。

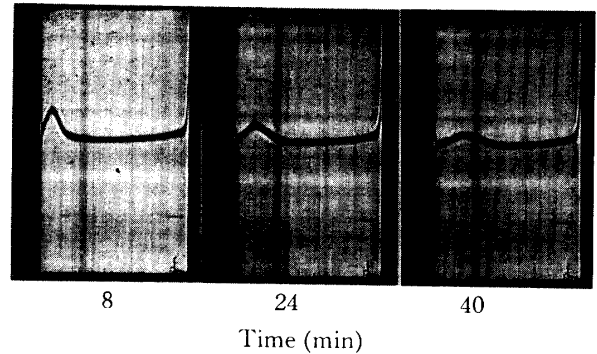


Fig. 3-7. Sedimentation patterns of troponin prepared from porcine skeletal muscle according to the method of EBASHI et al.<sup>(6)</sup>. Photographs were taken at intervals indicated, after reaching the speed of 52,640rpm, 20°C.

Final concn. : 5.20mg/ml troponin, 0.1M KCl, 20mM Tris-acetate buffer (pH 7.0).

#### d) トロポニン

EBASHI et al.<sup>(6)</sup>の方法で調製したトロポニンの超遠心分離像は第3—7図に示した通りで、図中にみられるピークは単一ではあるが、かなり幅の広がった形になっている。

ARAI and WATANABE<sup>(43)</sup>は、トロポニンにトロポミオシンが混入すると、超遠心図中のトロポニンのピークの幅がせまく鋭くなることを報告しているし、また、WAKABAYASHI and EBASHI<sup>(44)</sup>は、Ca<sup>2+</sup>を10<sup>-5</sup>M程度の濃度となるよう加えると、トロポニンの超遠心像はやはり幅のせまい、鋭いピークとなることが報告されているので、今回得られたトロポニンの超遠心像が、かなり幅の広い形態を示しているのは、分離精製したトロポニンの純度は高いが、共存するCa<sup>2+</sup>

の濃度も低かったためではないかと考えられる。

このトロポニンディスク電気泳動により分析した結果は第3-2, 3-3図に示してあるが、いずれの場合も、泳動図の内容が複雑で、これらの泳動図から明らかな特性を見出すことは困難で、このように、トロポニンの電気泳動図の内容が複雑なことは、すでに多くの研究者が観察しており<sup>(45,46,47,48,49)</sup>、このこととは超遠心分析の結果得られたピークが広がった形となっている点と符合しているように思われる。

また、トロポニンは  $\text{Ca}^{2+}$  に対する感受性が強く、大きな親和性をもって結合し、構造上の変化を生ずるばかりでなく、一面プロテアーゼの作用を受け易いので、その調製物の内容は複雑なものとなり易いであろうと考えられる。

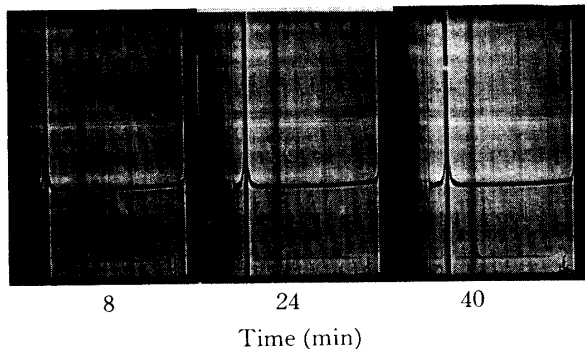


Fig. 3-8. Sedimentation patterns of tropomyosin prepared from porcine skeletal muscle according to the method of EBASHI et al.<sup>(6)</sup> Photographs were taken at intervals indicated, after reaching the steady speed of 52,640rpm, 20°C.

Final concn. : 2.52mg/ml tropomyosin, 0.1 M KCl, 20 mM Tris-acetate buffer (pH 7.0).

#### e) トロポミオン

EBASHI et al.<sup>(6)</sup> の方法により調製したトロポミオンを超遠心分離法により検討した結果は第3-8図に示したが、明らかに鋭い、単一ピークを示している。

つぎにディスク電気泳動法により分析した結果を第3-2, 3-3図に示した。PAゲルによる分析結果をみると、この分析条件の0.1 M KClの環境下で、トロポミオンが重合した棒状分子の状態にある<sup>(50)</sup>ことを示すようなゾーンの形成が認められるが、尿素添加ゲルを用いた分析結果では、さきにWOODS<sup>(51)</sup>が観察したものと同様に、明瞭な単一なバンドを示している。

以上の結果より、本実験で調製したトロポミオンはかなり高純度であろうと思われる。

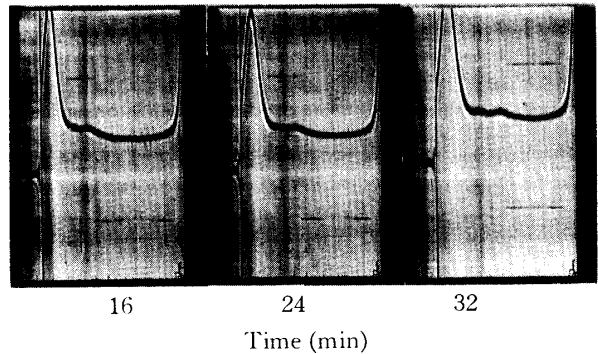


Fig. 3-9. Sedimentation pattern of sarcoplasmic reticulum (SR) ATPase prepared from porcine skeletal muscle according to the method of MCFARLAND and INESI<sup>(33)</sup>.

Photographs were taken at intervals indicated, after reaching the steady speed of 52,640 rpm, 20°C.

Final concn. : 4.01 mg/ml SR-ATPase, 1% Triton X-100, 10  $\mu\text{M}$  EDTA, 10  $\mu\text{M}$  Dithiothreitol, 5 mM Histidine (pH 7.8).

なお、トロポニン、トロポミオンは凍結して-20°Cに保存し、必要に応じて解凍使用した。

#### f) 筋小胞体 ATPase

MCFARLAND and INESIの方法<sup>(33)</sup>により Triton X-100を用いて可溶化し調製した筋小胞体 ATPaseの超遠心分析の結果を第3-9図に示した。図中の初期界面近くに存在する著しく大きなピークは、使用した Triton X-100のミセルの像であるから、これは除外して考えねばならない。これより速く沈降するピークが筋小胞体 ATPaseで、これは単一ピークとして現れているが、後に述べるように、この ATPaseは5'-AMPデアミナーゼ活性を相当強く保有していると思われるので、その内容は必ずしも単一なものではない可能性があるが、原法に示された結果とはほぼ一致している。ディスク電気泳動による分析結果は第3-2, 3-3図に示したが、いずれの場合も類似した泳動パターンを示した。すなわち、いずれも明瞭な2成分の存在を示すと思われるバンドのほか、移動度の小さい多数の小成分を可成り含んでいることを示している。従って、この調製物は純粋な ATPaseのみではなく、5'-AMPデアミナーゼその他のものも含んでいると思われる。

## (2) 活 性

a) 6S  $\alpha$ -アクチニン6Sの生物学的活性としては、まずF-アクチンの側面会合による凝集、沈殿効果が知られている。そこで濁度、粘度の測定、および電子顕微鏡による観察によって、6Sのこれらの活性

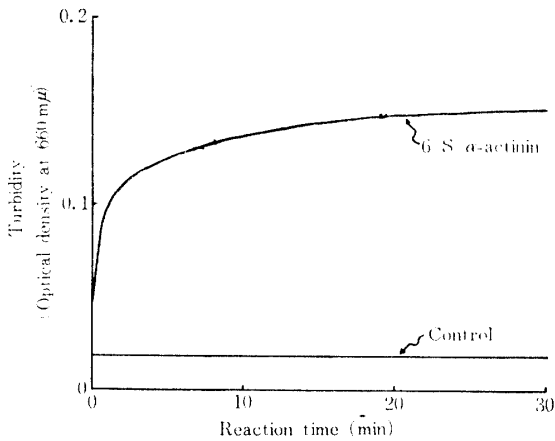


Fig. 3-10. Effect of 6S  $\alpha$ -actinin on the turbidity of F-actin at 25°C.

Final concn. : 0.8mg/ml F-actin, 0.2mg/ml 6S  $\alpha$ -actinin 0.1 M KCl, 20mM Tris-acetate buffer (pH 7.0).

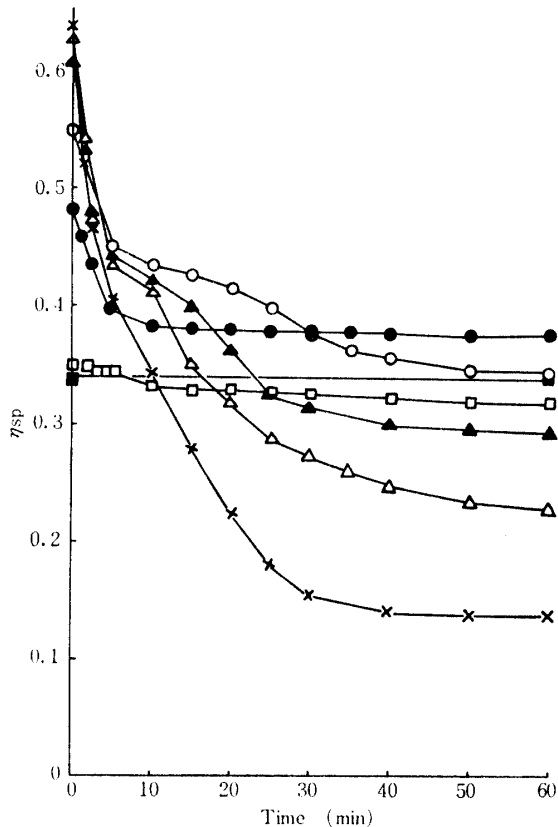


Fig. 3-11. Effect of 6S  $\alpha$ -actinin(6S) on the viscosity of F-actin(FA) at 25°C.

Final concn. 1.0mg/ml FA(■), FA + 22  $\mu$ g/ml 6S(□), FA + 44  $\mu$ g/ml 6S(●), FA + 66  $\mu$ g/ml 6S(○), FA + 88  $\mu$ g/ml 6S(▲), FA + 110  $\mu$ g/ml 6S( $\Delta$ ), FA + 132  $\mu$ g/ml 6S( $\times$ ), 0.1 M KCl, 20 mM Tris-acetate buffer, pH 7.0).

を検討した。

濁度変化に関する調査結果は第3—10図に示した通りで、その変化する程度は小さいが、6S添加により濁度は再現性よく、明らかに上昇した。

粘度変化に及ぼす効果については DRABIKOWSKI and NOWAK<sup>(23)</sup>の方法に準じて検討し、その結果を第3—11図に示した。すなわち、F-アクチン溶液に6Sを加えると、瞬間的にゲル化現象が起こり、その結果として急激な粘度上昇を来たすが、その後時間の経過と共に粘度が低下してくる。しかもその粘度は、6SとF-アクチンとの量比が約10:1以上となると、対照のF-アクチンのみの溶液の粘度よりも低下してくる。この原因は、供試溶液中の溶質の凝集して白い沈殿を生じてくるばかりでなく、この沈殿が細かく分散浮遊した状態になるので、もはや溶液ではなく、懸濁液と化してしまった結果であろうと考えられる。このような現象は DRABIKOWSKI and NOWAK<sup>(23)</sup>も認めており、6Sの特異的な特性の一つである。

6Sの添加により生ずるF-アクチンの凝集体もしくは沈澱は、E-アクチンの側面会合によるものであるといわれているので<sup>(52)</sup>、この点を電子顕微鏡により観察した。その結果はPlate IIIに示した通りで、KAWAMURA et al.の報告<sup>(52)</sup>とよく一致しており、F-アクチンは互いに側面会合して太い束状の凝集体を形成する性質を示すことがわかる。

また、兎6Sは、合成AMの超沈澱を増強する効果を有することが EBASHI and EBASHI<sup>(6)</sup>によって報告され、この兎6Sの特性は、その後多くの研究者によ

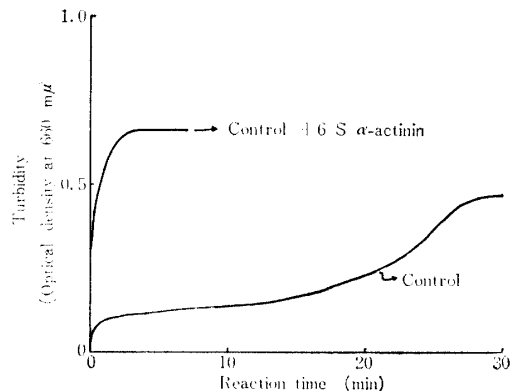


Fig. 3-12. Effect of 6 S  $\alpha$ -actinin on the superprecipitation of reconstituted actomyosin.

Final concn. : 0.4mg/ml reconstituted actomyosin, 0.06mg/ml 6 S  $\alpha$ -actinin, 0.1 M KCl, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM ATP, 20mM Tris-acetate buffer (pH 7.0).

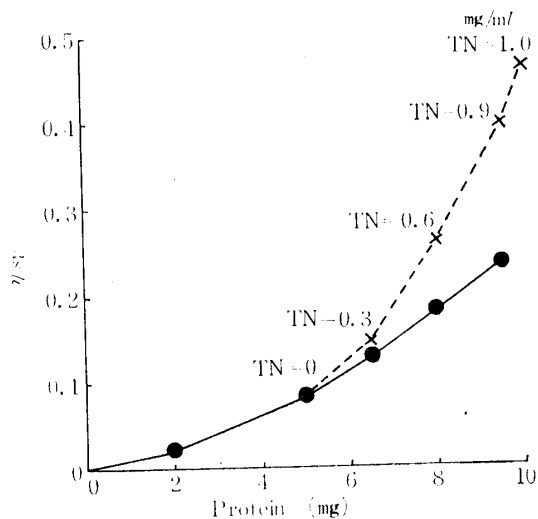


Fig. 3-13. Effect of troponin on the viscosity of tropomyosin.

Five milliliters of mixture contained: tropomyosin alone (●), tropomyosin 5mg + troponin(TN) mg as indicated (×), 0.1M KCl, 20mM Tris-acetate buffer (pH 7.0).

っても観察されているので、今回豚6Sについて検討した結果を第3—12図に示した。

図より明らかな通り、本研究において調製した豚6Sも、兎6Sと同様に、合成AMの超沈殿を促進する特性を有することが認められた。

b) トロポニン

生筋中の筋原線維の収縮弛緩を調節するタンパク質であるトロポニンは、トロポミオシンと密接な関係にあり、この両者の混合物は特異な粘度上昇を示す<sup>(33,43)</sup>

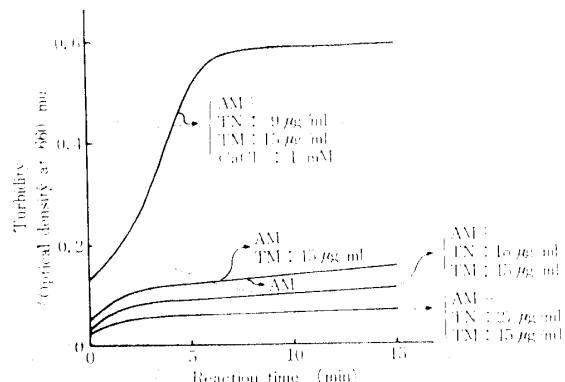


Fig. 3-14. Effect of troponin (TN), on the super-precipitation of actomyosin (AM) co-existing with tropomyosin (TM).

Final concn.: AM 0.15mg/ml, TN and TM μg as indicated/ml, 0.1M KCl, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM ATP, 20mM Tris-acetate buffer (pH 7.0), and 1mM CaCl<sub>2</sub> when added.

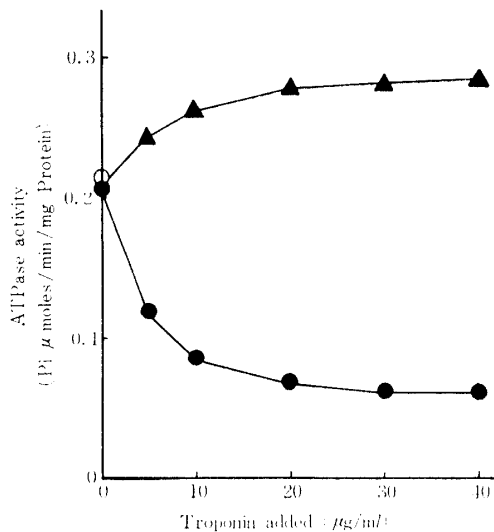


Fig. 4-15. Effect of troponin(TN) on actomyosin (AM) ATPase activity at 25°C.

Final concn.: AM 0.15mg/ml, tropomyosin 0.06 mg/ml, TN μg as indicated/ml(●), 0.1M KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM ATP, 20mM Tris-acetate (pH 7.0), 1mM CaCl<sub>2</sub> when added(▲).

ATPase activity of AM alone is indicated as(○).

ことが知られている。そこでこの点を本実験で調製した豚骨格筋トロポニン、トロポミオシンについても検討したが、その結果は第3—13図に示した通りで、トロポミオシンに対するトロポニンの割合が増加するにつれて粘度が大となる傾向が明らかに示されている。

また、トロポニンはトロポミオシンと共存する場合、Ca<sup>2+</sup>の共存する量が少ないと、AMの超沈殿を抑制し、同時にAM・ATPase活性をも抑制するが、Ca<sup>2+</sup>が十分に供給されると逆にAMの超沈殿を増強し、AM・ATPase活性をも増強する<sup>(6,43)</sup>ことが報告されているので、この点についても検討し、第3—14、3—15図にその結果を示した。

まず、第3—14図に示したように、トロポニンがトロポミオシンと共存する場合、トロポニンの割合が増加するにつれてAMの超沈殿を抑制するようになる傾向が明らかに認められた。また、Ca<sup>2+</sup>を1mM加えると、AMの超沈殿が明らかに増強されることも認められた。

これらの点から、トロポニンがトロポミオシンと共に、F-アクチンへのアロステリック効果をもつことが理解される。

なお、このようにしてAMの超沈殿の増強ならびに抑制がみられる場合、その反応系中のAM・ATPaseが同時に活性化されたり、抑制されたりすること



が、第3—15図の結果から推察される。そしてこの場合、トロポミオシン単独では、AMの超沈殿にも、またAM・ATPase活性にも殆ど影響しないことが同時に観察され、この事実は、ARAI and WATANABE<sup>(44)</sup>の得ている結果ともよく一致している。

### c) ATPase活性

本研究では2種類のATPase活性を有するタンパク質を調製している。すなわち、その一つはMであり、もう一つは筋小胞体ATPaseで、共に筋収縮弛緩と筋肉の死後変化に密接に関連していると考えられているものである。後者は特に、その内容、性質等は未だあまり明らかにされていない酵素タンパク質であるが、その挙動は非常に興味深いものがある。そこで、この2種のATPaseについて、その活性を検討すると共に、両者の性質の差異についても若干比較検討した。

#### i) ミオシンATPase

M・ATPaseについては、すでに多くの研究があるが、本実験で調製した豚MのATPase活性を測定した結果は0.41  $\mu$  moles P/mg/minであった。この場合における反応条件はつぎの通りであった。すなわち、0.1M KCl, 20mM トリス-酢酸緩衝液 (pH 7.0), 1mM ATP, 5mM CaCl<sub>2</sub>, M : 1.2mg/ml, 25°Cの条件で5分間加水分解した。

#### ii) 筋小胞体ATPase

本実験で調製した筋小胞体ATPaseは、MCFARL-

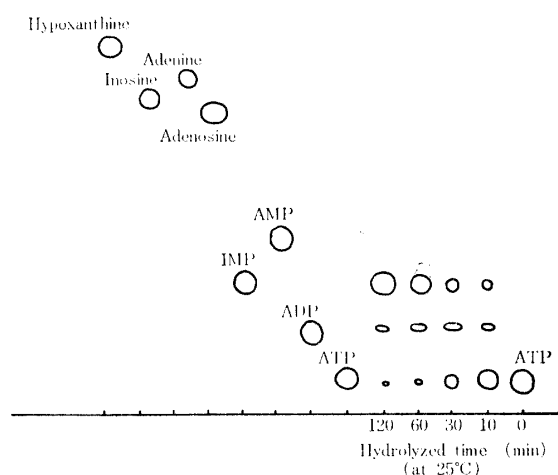


Fig. 3-16. Thin layer chromatogram of degradation products from ATP hydrolyzed by sarcoplasmic reticulum ATPase from porcine skeletal muscle.

Amounts applied : samples and standard preparations 2 $\mu$ l/2mM each.

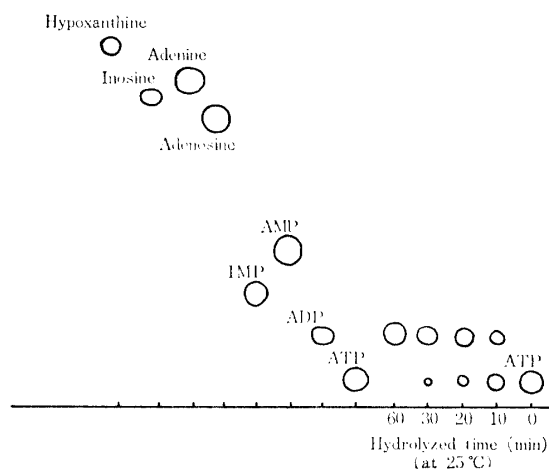


Fig. 3-17. Thin layer chromatogram of degradation products from ATP hydrolyzed by myosin ATPase from porcine skeletal muscle.

Amounts applied : samples and standard preparations 2 $\mu$ l/2mM each.

AND and INESI<sup>(33)</sup>の方法によって調製したもので、Ca<sup>2+</sup>により活性化されると報告されている。また、SELINGER et al<sup>(54)</sup>によれば、筋小胞体には現在知られている精製法で精製しても5'-AMPデアミナーゼが残留するといわれている。このことは、前述の理化学的性状のところですでに述べておいたように、筋小胞体ATPaseが電気泳動的に単一なバンドを示さず、複雑な内容のパターンを示したことから十分推察される。

そこでまず、今回調製した筋小胞体ATPaseとM・ATPaseを共にATPに作用させ、それぞれの分解生成物について、薄層クロマトグラフィーを用いて検討した。その結果は第3—16, 3—17図に示した通りである。すなわち、M・ATPaseはATPの分解生成物としてADPを生ずるのみであるが、筋小胞体ATPaseは、まずATPの分解生成物としてADPを生ずるが、これからさらにIMPを生ずるようになる。この場合、ADPのスポットは、分解時間の経過と共に大きくなることはなく、IMPのスポットのみが次第に大きくなってゆく。

ADPは、ADP  $\rightarrow$  AMP  $\rightarrow$  IMPという経過をたどってIMPに変化することは、すでによく知られており、この場合、ADP  $\rightarrow$  AMPの過程にはミオキナーゼが関与し、AMP  $\rightarrow$  IMPの過程にはAMPデアミナーゼが関与することもよく知られているので、この筋小胞体ATPaseには、ATPaseばかりでなく、ミ

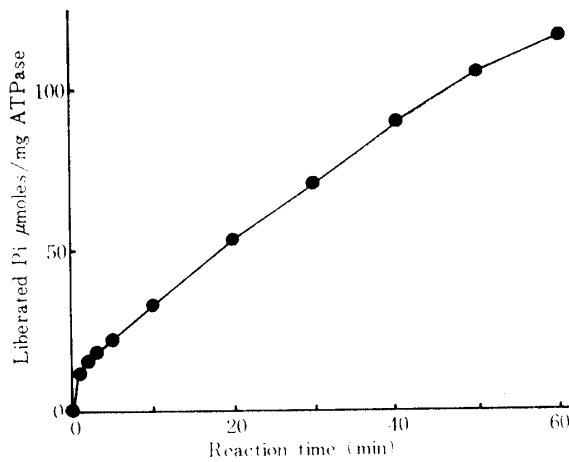


Fig. 3-18. Effect of reaction time on the liberated amount of inorganic phosphate from ATP hydrolyzed by sarcoplasmic reticulum ATPase at 25°C.

Final concn. : 1mg/ml sarcoplasmic reticulum ATPase, 10mM ATP, 3mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1mM CaCl<sub>2</sub>, 0.1 M KCl, 20mM Tris-acetate buffer (pH 7.0).

オキナーゼおよび AMP デアミナーゼが含まれているであろうと考えられる。

このように複雑な内容をもつ筋小胞体 ATPase ではあるが、その ATPase 活性を、ATP を用い、常法により遊離する無機リン酸量を定量して追跡してみた。その結果は第 3—18 図に示した通りである。図より明らかな通り、1 時間反応させた初期において、特に急速に反応が進行しているが、その後も遊離リン酸量は直線的に増加している。

この活性を MCFARLAND and INESI<sup>(33)</sup> と同様、最初の 10 分間の分解量をもって示すと、2.41 μ moles Pi/min/mg となる。

### 3. 要 約

本研究において豚骨格筋から調製した各種筋タンパク質試料の理化学的性状ならびに活性について調査し、つぎのような結果を得た。

#### (1) 理化学的性状

a) 6S は超遠心分析の結果、均一であり、その沈降定数は 7.07S であった。電気泳動による分析結果でもほぼ均一性を示した。

アミノ酸組成は、既報の兎、鶏の 6S よりも、グルタミン酸、メチオニン、フェニールアラニン、アルギニンが多く、プロリンがやや少ない傾向が認められたが、その他のアミノ酸については、明らかな差異を認

め難かった。

b) 本研究で調製した G-アクチンは、G-F 変換法による精製を行なわなかったため、F-アクチンを若干含んでいるようであったが、トロポミオンおよび 6S の混在を除去することはほぼ達成されているようであった。

この G-アクチンを重合させて F-アクチンを調製し、これについて超遠心分析を行なってみると、ほぼ均一性を示し、電子顕微鏡により、典型的な F-アクチンの線維構造が観察された。

c) M も超遠心分析の結果均一性を示し、これを凝集させ、M フィラメントとして電子顕微鏡により観察したところ、この場合も M 凝集体の典型的な線維構造を示していた。電気泳動による分析結果からは、殆どの M はモノマーであるが、少量の M 重合体を含むことが観察された。

d) トロポニン は超遠心分析の結果、広がったピークとして現れ、Ca<sup>2+</sup> とトロポミオンを含んでいないようであった。電気泳動による分析結果からは、複雑な内容であることが示され、既報の文献にのべられている事実とほぼ一致していた。

e) トロポミオンは、超遠心分析の結果、鋭い単一ピークとして現れ、また、尿素添加ゲル電気泳動の結果からも、他成分、特にトロポニンを含まぬことを示す単一のバンドとして現れたことから均一であると思われる。

f) 今回調製した筋小胞体 ATPase は、超遠心分析の結果からも、また電気泳動による分析結果からも、その内容の複雑さが暗示された。

#### (2) 活 性

1) 6S が F-アクチンに作用して、側面会合による凝集、沈殿を起こさせる生物学的活性を、濁度および粘度を測定して検討したところ、豚 6S も明らかに上記の活性を有することが認められた。また、この場合、生成した F-アクチンの凝集体を電子顕微鏡によって観察したところ、既報の文献にのべられているものとはほぼ同様の凝集体が形成されていることが観察された。

さらに 6S は、AM の超沈殿増強性を有することが知られているので、この点についても検討したが、その結果豚 6S も明らかに AM の超沈殿を促進する効果を示した。

2) トロポニンはトロポミオンと結合して複合体を形成し、粘度上昇をもたらすことが知られているの

で、この点について検討した結果、本研究で調製した豚骨格筋トロポニン、トロポミオンにもこのような活性の存在することが認められた、さらにこの複合体は、Ca<sup>2+</sup>が存在しないとAMの超沈殿を抑制するが、これにCa<sup>2+</sup>を添加すると、この抑制作用がなくなり、AMの超沈殿を増強する活性を有することも認められた。また、この超沈殿の抑制、増強にともない、AM・ATPase活性も同時に抑制、増強されることが認められた。

3) M・ATPaseと筋小胞体ATPaseとの活性を比較したところ、M・ATPase活性は、0.41 $\mu$ moles P/mg/min、筋小胞体ATPase活性は2.41 $\mu$ moles Pi/min/mgであった。なお、筋小胞体ATPaseは、検討の結果、その内容は複雑で、ATPaseのほかにも、少なくともミオキナーゼ、AMPデアミナーゼなどが混在しているようであった。

#### 第4章 6S $\alpha$ -アクチニンとF-アクチンの相互作用に及ぼす環境因子の影響

6Sは、生筋中では筋節の接合点であるZ線付近に局在していると考えられているが、筋肉の死後変化が進行するにつれて、Z線付近から遊離し、拡散してゆくものと推定される。筋原線維の構造上、Z線に接している部分はI帯であり、このI帯は細いフィラメントのみから成立している。従って、6Sがその局在位置から遊離してまず最初に作用するのは、細いフィラメントの部分であろうと考えられる。そして6Sと相互作用を起こした細いフィラメントと、太いフィラメントとが相互に作用する結果として、いわゆる死後硬直現象が現れるのではないかと考えられる。

従ってまず、細いフィラメントの主成分であるF-アクチンと6Sとの相互作用におよぼす、死後の筋組織内の主な環境変化に関与すると考えられる種々の因子の影響について検討した。

##### 1. 実験方法

本実験に使用した実験試料は、第2章に述べた方法により調製したものである。

本実験では、反応混合液の混合方法はつぎのように行なった。すなわち、すべての試料および試薬を反応条件である25°Cに温め、まず、分光光度計のガラスセルに、F-アクチンを所定量加え、ついで必要試薬を添加してから一旦、パラフィルムをかぶせて保定し、

10回転倒してよく内容を混和する。ついで6Sを加え、再びパラフィルムをかぶせて保定し、10回転倒混和し、これを直ちに分光光度計の所定の位置にセットし、自記記録計を連動させて濁度変化を記録させる方法によった。

#### 2. 実験結果および考察

##### (1) 6SとF-アクチンの相互作用

0.1MKClを含むF-アクチン溶液に6Sを加えると、前者に6Sが結合するとともに、F-アクチンの側面会合による凝集が起こり、時間の経過に伴い沈殿を生じてくることは前章において述べたが、このような両者の相互作用に及ぼす種々の因子の影響については、現在まであまり検討されていないようであるので、本報では、濁度変化を追跡する方法を主な手段として、つぎのような種々の因子による影響を検討した。

##### (2) 塩濃度の影響

筋組織内のイオン強度は、従来0.2~0.25程度であるといわれているが、生理学的な観点から、筋原線維内の環境は、0.1~0.125程度である<sup>(2)</sup>という意見もある。そこでまず、6SとF-アクチンの相互作用に対して、どの程度のイオン強度が最もよい環境であるのかについて検討した。その結果は第4-1図に示した通りである。

すなわち、この両者の相互作用は、0.1MKCl(イ

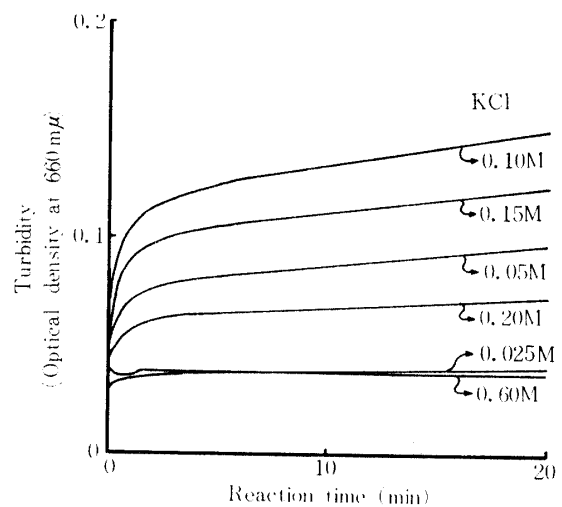


Fig. 4-1. Effect of KCl concentration on the interaction of 6S  $\alpha$ -actinin at 25°C.

Final concn. : 0.2mg/ml 6S  $\alpha$ -actinin, 0.8mg/ml F-actin, KCl as indicated, 20mM Tris-acetate buffer (pH 7.0).

オン強度 0.1) 付近で最も起こり易いことが認められた。イオン強度がこれより低くても、高くても反応は起こり難い。

この塩濃度環境を食品科学的な面から考察すると、筋肉を肉製品の原料肉として利用する場合、特にドイツでは、家畜をと殺直後、まだ肉が温かい状態にあるときに 2~3% の食塩 (0.4~0.5 M NaCl) を加えて、いわゆる温加塩という処理を施すことが広く行なわれているが、このような処理を施すと死後極めて早い時期に塩濃度を高めてしまうことになるので、6S の活性を中心として考えてみると、6S は塩濃度が高すぎるため、6S の一部が Z 線から遊離しはじめていたとしても、細いフィラメントの主成分である F-アクチンとの反応は抑制されるので、死後硬直が起こり難くなるのではないかと考えられる。温加塩法により調製された肉製品は発色、保水性、風味等が良好であるといわれているが、その原因はいろいろあると考えられるが、その一つとして上述のように、高い塩濃度のために、6S と F-アクチンとの相互作用が阻害されることが、温加塩肉の保水性をよくする一因をなすのではないかとと思われる。

### (3) ATP とリン酸塩の影響

BATE-SMITH and BENDALL<sup>(55)</sup>によれば、と殺直後の牛筋肉中には、いわゆる acid labile リンが 12 $\mu$ g/g 程度含まれているという。生筋中にはアデニン系ヌクレオチド、特に ATP が多量に含まれており、その他クレアチンリン酸もかなりの量含まれていることが知られているので、これらの有機リン酸が 6S と F-アクチンとの相互作用に何らかの影響をもつのではないかと考えられる。

そこで、特に筋収縮と関連の深い ATP を、生筋中に存在する量に近いであろうと推定される 10mM を反応系に添加してみたところ、6S と F-アクチンとの相互作用は殆んど完全に抑制されるようであった (第 4-2 図)。

このような効果は、あるいはリン酸根による効果ではないかと考えられたので、つぎに 3 種の無機リン酸塩を用いて実験を試みた。

この実験に使用した無機リン酸塩はオルトリン酸塩、ピロリン酸塩、トリポリリン酸塩であるが、オルトリン酸塩としては、第 1 リン酸カリウム—第 2 リン酸カリウムを、ピロリン酸塩としては、酸性ピロリン酸ナトリウム ( $\text{Na}_2 \text{H}_2 \text{P}_2 \text{O}_7$ )—ピロリン酸ナトリウム ( $\text{Na}_4 \text{P}_2 \text{O}_7$ ) を、トリポリリン酸塩としては、トリポ

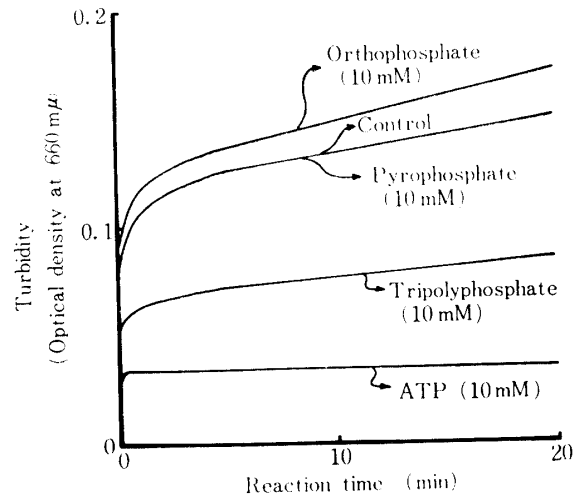


Fig. 4-2. Effects of ATP and various phosphates on the interaction of 6S  $\alpha$ -actinin and F-actin at 25°C.

Final concn. : 0.2mg/ml 6S  $\alpha$ -actinin, 0.8mg/ml F-actin, 0.1M KCl, 20mM Tris-acetate buffer (pH 7.0).

リン酸ナトリウム ( $\text{Na}_5 \text{P}_3 \text{O}_{10}$ ) と酢酸を用い、それぞれ pH0.7 に調整し、終濃度 10mM (リン酸根として) なるように反応系に添加して実験した。得られた結果は第 4-2 図に示した通りで、オルトリン酸塩はやや反応を促進する傾向が認められたが、ピロリン酸塩は殆ど対照と変らず特に効果は認められなかった。

これに対して、トリポリリン酸塩は、明らかに抑制効果を示し、ATP の約 50% の抑制効果を示した。このように、供試した無機リン酸塩中、最も ATP に類似した構造をもつトリポリリン酸塩が、ATP と同様に抑制効果を示した事実は興味深い。肉製品加工上、保水性改良剤として各種リン酸塩が用いられているが、その中の一つとして用いられているトリポリリン酸塩の、肉の保水性をよくする一つの根拠が、上述のような点にも存在しているとすれば、これは実際問題との関連において重要性をもつことになるものと思われる。

### (4) ATP 濃度の影響

前述の実験結果より、筋組織の常成分の一つである ATP が、著しく 6S と F-アクチンの反応を抑制することがわかったので、この抑制は、ATP の濃度により、どのように変化するものであるかを知ることは、死後の筋肉においては、ATP は急速に減少して<sup>(56,57)</sup> ゆくものであることが知られているので重要である。そこで、ATP 濃度を漸次 10mM より低下させていっ

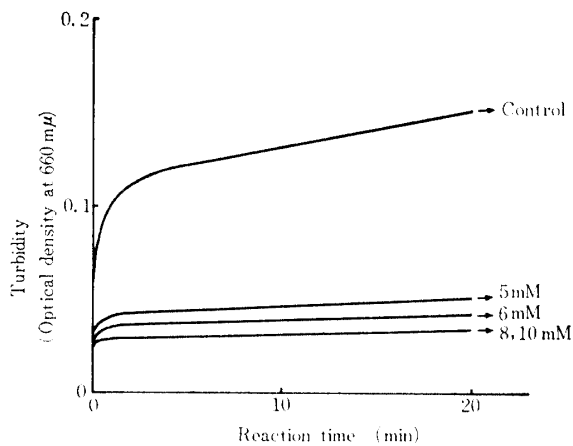


Fig. 4-3. Effect of ATP concentration on the interaction of 6 S  $\alpha$ -actinin and F-actin at 25°C.

Final concn. : 0.2mg/ml 6 S  $\alpha$ -actinin, 0.8mg/ml F-actin, ATP as indicated, 0.1 M KCl, 20mM Tris-acetate buffer (pH 7.0).

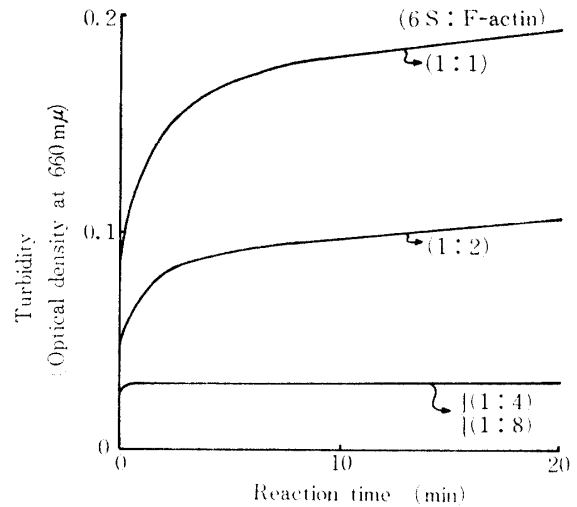


Fig. 4-4. Effect of protein-ratio in the presence of 10mM ATP on the interaction of 6 S  $\alpha$ -actinin and F-actin at 25°C.

In each sample, the concentration of F-actin was 0.8mg/ml, and the protein-ratio of 6 S  $\alpha$ -actinin to F-actin was adjustde as shown in brackets.

た場合の反応の起こり方について検討した。その結果は第4—3図に示した通りで、8mM までは10mMの場合と同じく、ほぼ完全に抑制しているが、8mM 以下では反応が起こってくるのがわかる。5mM でもまだかなりの抑制を示しているところから、この反応は、少なくとも ATP 濃度が5mM 以下に低下しなければ急激には起こらないようである。

#### (5) ATP とタンパク比による影響

動物の死後、6S は Z 線の部分から次第に離れ、まず細いフィラメントの F-アクチンと反応する可能性が大である。筋原線維全タンパク質中の含有率は6S 約2%、アクチン約20%<sup>(16)</sup>となっており、6S に対しアクチン含量は約10倍である。そこで、この2種のタンパク質の比率が、両者の反応に対しどのような影響を及ぼすものであるかを調査するため、F-アクチン量に対する6Sの量比を変化させて、10mM ATP の存在下で検討した。その結果は第4—4図に示した通りであり、6S と F-アクチンの比が1:8~1:4では、10mM ATP により反応は完全に抑制されているが、1:2となるとかなり強く反応が現れてくるし、1:1となると殆ど抑制効果は認められなくなってくる。

以上の結果よりつぎの2つの推定がなされる。すなわち、ATP のこのような抑制効果は、ATP が6S に作用し、その結果として、F-アクチンとの相互作用が阻害される。これは一定量の F-アクチンと、一定濃度の ATP 存在下で6S だけが増加した場合、抑制効

果がなくなるという事実から想定される場所である。しかし見方を変えれば、つぎのような考え方が生れてくる。すなわち、ATP は F-アクチンに作用しているが、6S も F-アクチンに作用する能力を有するので、6S の濃度が上昇してくると、F-アクチンに対する ATP と6S の作用が、F-アクチン上で競合することになり、高濃度の6S の作用能力が ATP よりも優位となってくるため、6S の比率が高まると凝集反応が顕著に起こってくるのではないかというものである。このいずれの推定が正しいかは、次章において検討することにした。

#### (6) Mg<sup>2+</sup> と Ca<sup>2+</sup> の影響

筋原線維を構成するタンパク質の活性は、2価金属イオンの影響を受けるものが多い。F-アクチンもその一つで、分子内には6×10<sup>4</sup>g 当り1モルの Ca<sup>2+</sup> が含まれており<sup>(58)</sup>、また Mg<sup>2+</sup> によって G-アクチンから F-アクチンへの重合が促進されることはよく知られている。

そこでこれらの2価金属イオンの、6S と F-アクチンとの相互作用に対する影響について検討を行なった。その結果は第4—5図に示した通りであり、Ca<sup>2+</sup> は殆どなんらの影響を示さなかったが、Mg<sup>2+</sup> はこの反応を促進する効果があることが認められた。

#### (7) pH の影響

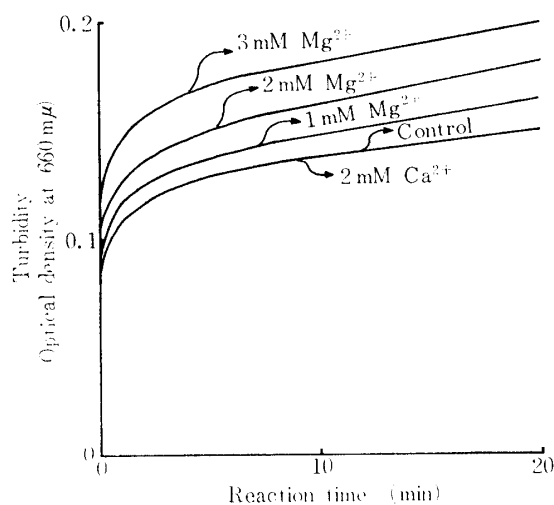


Fig. 4-5. Effects of  $Mg^{2+}$  and  $Ca^{2+}$  on the interaction of 6 S  $\alpha$ -actinin, and F-actin at 25°C.

Final concn. : 0.2 mg/ml 6 S  $\alpha$ -actinin, 0.8 mg/ml F-actin,  $CaCl_2$  and  $MgCl_2$  as indicated, 0.1 M KCl, 20mM Tris-acetate buffer (pH 7.0).

筋肉の死後変化のうち、pHの急激な変化は最も著しい変化の一つとしてよく知られている。最近のMcLOUGHLIN<sup>(59)</sup>の豚肉に関する報告によれば、麻酔と殺、放血と殺、銃殺など、そのと殺の方法によってと殺直後のpHがそれぞれ異なるが、麻酔と殺したものは最も高いpH7.2という値を示し、他の方法でと殺したものは、これよりも低いpH値を示した。しかしいずれも6時間以内に極限pH付近、すなわちpH5.5付近の値を示すようになったことを報告している。

このように豚筋肉のpHの変化は急速であるから、6SとF-アクチンとの相互作用に及ぼすpHの影響についても検討する必要があると思われる。そこでpH7.5からpH5.5までの範囲で検討を行なった結果を第4—6図に示した。図より明らかな通り、pHが低下するにつれて反応が増強されることがうかがわれるが、pH7.5～6.5の範囲では、pHの変化による顕著な影響は認め難いが、pH6.5以下になると、急激にpHの変化による影響が増強されるようである。ただし、EBASHI and EBASHI<sup>(8)</sup>によれば、6SはpH5.6～5.8の間で沈殿を形成するという。つまり等電点がこの付近にあることを示しているのであって、この反応系の環境pHが6以下となれば、6Sの等電沈殿が起こってくるわけで、この濁度上昇は6Sの等電沈殿による白濁も加わっている点に留意されなければならないから、6Sの等電点付近では正確な判断は困難であ

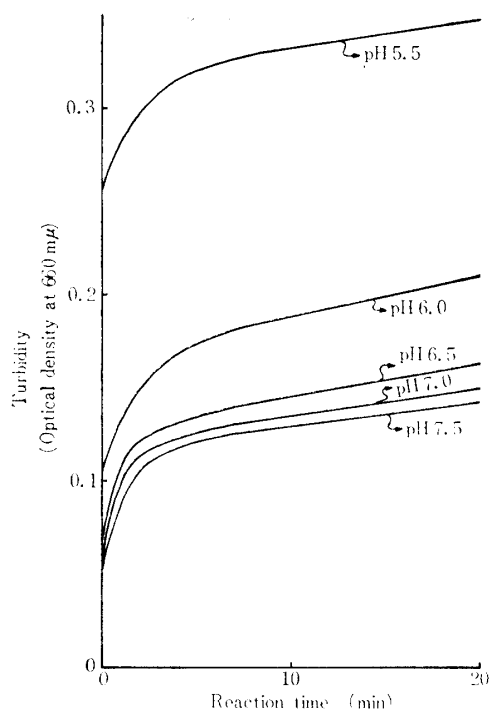


Fig. 4-6. Effect of pH on the interaction of 6 S  $\alpha$ -actinin and F-actin at 25°C.

Final concn. : 0.2 mg/ml 6 S  $\alpha$ -actinin, 0.8 mg/ml F-actin, 0.1 M KCl, 20mM Tris-acetate buffer, pH as indicated.

る。しかし、pH6.5～6.0の範囲において、この6SとF-アクチンとの相互作用はpHの低下によって促進される傾向があるように思われる。

#### (8) タンパク比の影響

さきに(5)において、ATPの存在下における6SとF-アクチンの量比が、両者間の反応に及ぼす影響を調査したが、ここでは、ATPが存在しない場合、6SとF-アクチンとの量比が、両者間の相互作用に及ぼす影響について検討を行ない、その結果を第4—7図に示した。この場合、真にF-アクチンと結合している6Sの量的割合が混合比と一致しているか否かは問題であるが、6Sの割合を増加させる程、1:1の比率までの範囲で、濁度が増加する傾向が認められた。最近ROBSON et al.<sup>(60)</sup>は、詳細にF-アクチンと6Sの結合量について調査を行なっているが、その結果によると、F-アクチンの41%程度の6Sが、F-アクチンに結合すると述べている。しかしこの結合量は反応混合液を超速心分離することによってF-アクチンを沈殿させ、残った上澄液中のタンパク質量を測定して求めているので、反応系中のゆるい結合体は測定操作中に破壊さ

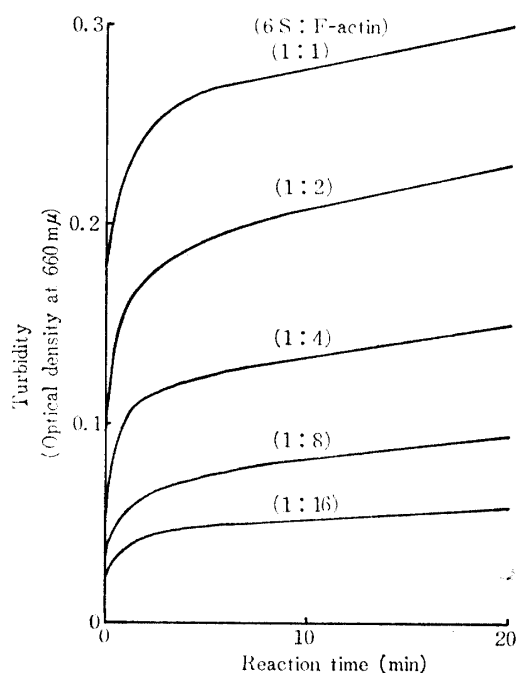


Fig. 4-7. Effect of protein-ratio on the interaction of 6S  $\alpha$ -actinin and F-actin at 25°C.

Final concn. : 0.1M KCl, 20mM Tris-actaete, buffer (pH 7.0), 0.8mg/ml F-actin protein-ratio of 6S  $\alpha$ -actinin to F-actin was adjusted as shown in brackets.

れることも考えられるので、ここに示された6SのF-アクチンへの結合量の値は、さらに再検討する必要があるように思われる。

#### (9) トロポミオシンの影響

DRABIKOWSKI and NOWAK<sup>(23)</sup>により、6SとF-アクチンの相互作用は、トロポミオシンの添加によって抑制されることが報告されている。そこで本報で調製した試料についてもこの点を検討したところ、第4—8図に示したように、6Sの1/4、F-アクチンの1/16量のトロポミオシンでも反応は殆ど抑制されることが認められた。

この抑制効果の原因については、DRABIKOWSKI et al.<sup>(25)</sup>によって、つぎのように説明されている。すなわち、トロポミオシンは6Sと同じようにF-アクチンに対して強い親和性を有して結合するが、6Sが結合した場合のように沈殿を形成することはなく、可溶性の複合体を形成する。そして6Sと共に存在した場合は、F-アクチン分子上の同一もしくは近傍の結合位置で互いに競合し合うため、6SのF-アクチンへの結合が阻害されるようになるが、これは室温の条件下で起こる現象で、0°C付近の低い温度では、逆に

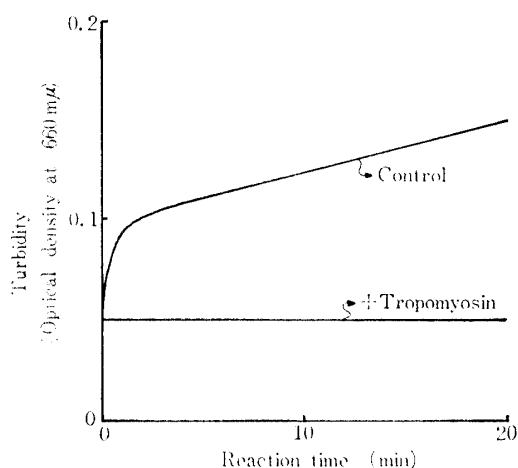


Fig. 4-8. Effect of tropomyosin on the interaction of 6S  $\alpha$ -actinin and F-actin at 25°C.

Final concn. : 0.2mg/ml 6S  $\alpha$ -actinin, 0.8mg/ml F-actin, 0.05mg/ml tropomyosin, 0.1 M KCl, 20mM Tris-acetate buffer (pH 7.0).

F-アクチンへの6Sの結合が優先するようになるため、トロポミオシンの結合は阻害され、結果として白濁、沈殿を生ずるようになるといっている。

#### (10) 温度の影響

動物は死後、体温が徐々に低下し、冷蔵された場合は冷蔵温度へ冷却されてゆくが、このような死後における温度変化が、6SとF-アクチンの相互作用に及ぼす影響を検討した。その結果は第4—9図に示した通りで、低温になるに従って反応は強くなる傾向を示し、体温付近では殆ど反応が進行しないことがわか

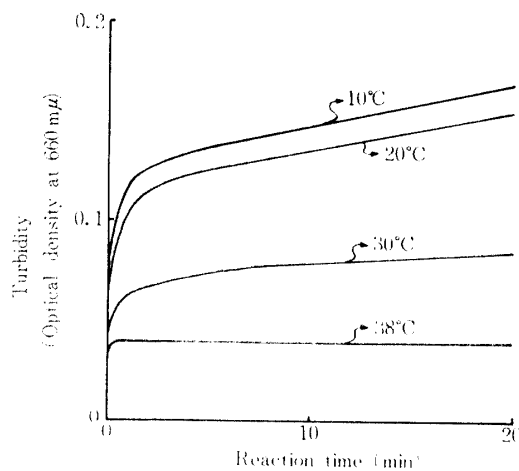


Fig. 4-9. Effect of temperature on the interaction of 6S  $\alpha$ -actinin and F-actin.

Final concn. : 0.2mg/ml 6S  $\alpha$ -actinin, 0.8mg/ml F-actin 0.1 M KCl, 20mM Tris-acetate buffur (pH 7.0).

る。従って温度の低下も、死後 6S と F-アクチンの相互作用を促進する因子の一つとなるように考えられる。

### 3. 要 約

豚骨格筋から調製した 6S と F-アクチンとの相互作用に及ぼす、種々の環境変化の影響について濁度法を用いて検討し、つぎのような結果を得た。

1) 塩濃度の影響を、KCl を用い、0.025 ~ 0.6M の範囲にわたって検討した結果、0.1M 付近で最も反応が起こり易く、それより高濃度でも、低濃度でも反応は抑制された。

2) ATP を 10mM の濃度で添加すると、反応は著るしく抑制された。これに対してオルトリン酸塩、ピロリン酸塩、トリポリリン酸塩などの無機リン酸塩を、10mM の濃度で添加して検討したところ、トリポリリン酸塩が ATP の約 50% 程度の抑制効果を示したが、そのほかのリン酸塩には明らかな影響が認め難かった。

3) ATP 濃度の影響を検討したところ、6S と F-アクチンの比が 1 : 4 の場合、ATP 濃度が 10mM ~ 8mM ではほぼ完全に抑制するが、ATP 濃度がそれ以下になると、反応が起こってくることを認めた。

4) 10mM ATP により、6S と F-アクチンの量比が 1 : 4 以下では抑制されるが、1 : 2, 1 : 1 となると、10mM ATP による抑制効果は失なわれて、反応が起こってくるのが認められた。

5)  $Mg^{2+}$  と  $Ca^{2+}$  の影響について検討したところ、 $Ca^{2+}$  は殆ど影響がないが、 $Mg^{2+}$  はその添加量 3mM までの範囲で、添加量が増加するとともに反応の促進されることが認められた。

6) pH の影響を検討したところ、6S と F-アクチンの反応は、pH6.5 ~ 6.0 の範囲内において、pH の低下に伴い促進増強される傾向が認められた。

7) タンパク比の影響を検討するため、6S と F-アクチンの比を 1 : 8 から 1 : 1 まで変化させてみたが、F-アクチンに対する 6S の割合が大となる程、反応は促進される傾向が認められた。

8) トロポミオシンの影響について検討したところ、従来の報告にのべられている通り、極めて微量のトロポミオシンの添加によっても著るしい反応の抑制が認められた。

9) 温度の影響を、38 ~ 10°C の範囲で検討したところ、温度が低下する程、反応が促進されることが認められた。

## 第 5 章 6S $\alpha$ -アクチニンと F-アクチンの相互作用に及ぼすヌクレオチドの影響

第 4 章において、F-アクチニンと 6S の相互作用におよぼす種々の因子の影響について検討したが、その中で、ATP に顕著な抑制効果のあることが観察された。そこでこの事実をより詳細にとらえるために、筋肉中に存在する、特に ATP と関連の深い各種ヌクレオチドについて広く検討を加えることにした。すなわち、ATP は筋組織の常成分で、しかも動物の死後急速に分解減少してゆくことはよく知られている事実である。ATP には 6S と F-アクチンとの相互作用を抑制する効果のあることが、本研究の第 4 章の実験結果から認められたので、その ATP の分解産物である ADP, AMP, IMP などが、6S と F-アクチンの相互作用に対し、どのような影響を及ぼすかについて検討した。

### 1. 実験方法

(a) 濁度変化と粘度変化は前章で示した方法で測定した。

(b) ヌクレオチド

本実験に使用したヌクレオチドは、5'-ATP, 5'-ADP, 5'-AMP, 5'-IMP であり、すべて市販の高純度ナトリウム塩を購入し 1M のトリスまたは酢酸で pH7.0 に調整した 40mM 水溶液として使用した。

(c) 電子顕微鏡

各ヌクレオチドを、それぞれ終濃度で 10mM とするよう添加混合した反応混合液は、直ちに一部をとり、2% 酢酸ウラニル溶液で直接ネガティブ染色して鏡検した。

(d) F-アクチン結合ヌクレオチドの定量

10ml 容高速遠心用遠沈管に、2.0mg/ml の濃度の F-アクチン溶液、1.6ml をとり、これに終濃度が 0.1 M KCl, 20mM トリス酢酸緩衝液 (pH7.0), ヌクレオチドをそれぞれ所定濃度となるように調整して、4ml の供試溶液を調製した。これを 4°C 冷蔵庫内に所定時間冷蔵した後、直ちに 40,000rpm (105,000×g), 0°C で 60 分間遠心分離し、ペレット状の沈殿を形成させる。ついで上澄液をすて去り、代りに 0.1M KCl 20mM トリス酢酸緩衝液 (pH7.0) を約 8ml 加え、5 秒間放置してから静かに上澄液をすて去る。この操作を 5 回繰返して遊離のヌクレオチドを洗滌し去ってか



ろ紙上に各遠沈管を倒立させて十分に洗滌液を除去し、つぎに5%過塩素酸溶液5mlを加え、細いガラス棒を用いてペレットをつきくずすようにして2分間攪拌し、直ちに東洋 No.5A ろ紙を用いてろ過し、ろ液の紫外吸収を、5%過塩素酸溶液を対照として測定した。この吸収からヌクレオチドを算出するには、アデニン系ヌクレオチドに対しては分子吸光係数として  $E_{258} : 14.6$  を、イノシン酸については、 $E_{252} : 12.2$  を用いた。

(e) 超遠心分析は前章で示した方法で行なった。

(f) リンの定量も前章で示した方法で行なった。

## 2. 実験結果および考察

従来の報告に示されている、生筋中に含まれていると考えられる ATP の含有量は兎腰筋  $8.5 \mu\text{ moles/g}^{(56)}$ 、また、と殺直後の ATP 含量は鶏胸筋  $8.5 \mu\text{ moles/g}^{(57)}$ 、牛筋肉  $5.5 \mu\text{ moles/g}^{(61)}$ 、豚筋肉  $2.5 \mu\text{ moles/g}^{(57)}$  などとなっている。

一般に、動物をと殺する際の条件が、肉の ATP 含量に大きな影響を及ぼすことがよく知られているので、生筋中の ATP 含量を、死後の動物の筋肉中の ATP 含量から正確にとらえることは困難であるが、ATP は分解する際、化学量論的に筋肉中に ADP, AMP, IMP, イノシン, ヒポキサンチンなどを生成すると考えられているから、と殺直後の筋肉中に残存する ATP およびその分解生成物のモル数の合計から生筋中に含まれる ATP の大体の量を推定することが可能のように思われる。

そこで、このようにして豚骨格筋の生筋中に含まれる ATP の推定濃度を求めてみると、9mM に近い値を示すように思われる。

そこで今回、各種ヌクレオチドが 6S と F-アクチンとの相互作用に及ぼす影響を調査する場合、それぞれのヌクレオチドの濃度を、この 9mM に近い 10mM の濃度として検討した。

また、実験に使用したヌクレオチドの種類は、ATP および筋肉中における ATP の分解生成物と考えられる ADP, AMP, IMP で、それぞれの効果について比較検討した。

### (1) 濁度に及ぼす影響

各種ヌクレオチドを終濃度 10mM となるように反応系に加え、pH7.0 に緩衝化した環境下で反応を起こさせ、その濁度変化を経時的に追跡した結果を第 5-1 図に示した。図より明らかな通り、添加ヌクレオチ

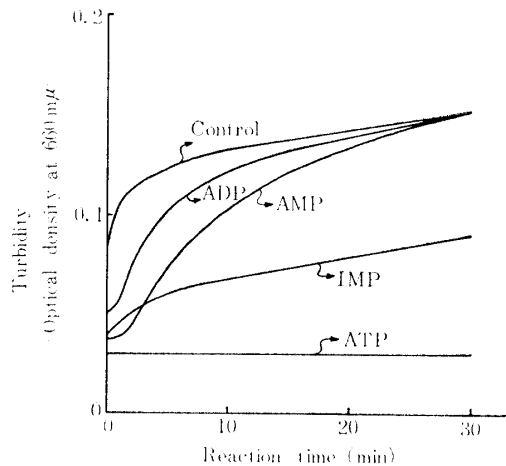


Fig. 5-1. Effects of various nucleotides on the interaction of 6S  $\alpha$ -actinin and F-actin measured by turbidity at 25°C.

Final concn. : 0.2mg/ml 6S  $\alpha$ -actinin, 0.8mg/ml F-actin, 10mM nucleotides each, 0.1 M KCl, 20mM Tris-acetate buffer (pH 7.0).

ドの効果は、ATP 以外のものは比較的少ないことがわかる。すなわち、AMP は反応初期において、ADP よりもややその抑制効果が大であるが、30分間経過後においては、両者の示す効果に殆ど差がなくなるとともに、この両者の抑制効果そのものが殆ど認められなくなる。これに対し、IMP は ADP, AMP よりも明らかに抑制効果が大で、30分間経過後においても、ATP による抑制効果の約 40% 程度の抑制効果を示すことが認められた。筋肉中で ATP が死後、急速に分解され IMP が生成すること、またこの IMP は比較的長期間残存して肉の風味を良好にしているといわれているが、この IMP にこのような効果のあることが認められたことは、非常に興味深い、新しい事実であると思われる。

### (2) 粘度に及ぼす影響

つぎに、各種ヌクレオチドが粘度変化に及ぼす影響を調べた。結果は第 5-2 図に示した通りで、各ヌクレオチドは、粘度変化にそれぞれ特有の影響を与えることがわかった。

すなわち、まず 6S を F-アクチンと混合した対照反応系では、混合直後は急激な粘度の上昇を来たすが、その後急速に低下し、同時に白濁、生成したゲルの懸濁化が認められることは第 2 章において述べた通りである。

つぎに ATP を添加した反応系の粘度は、反応初期にわずかに低下するが以後は最も高い粘度を示し、60

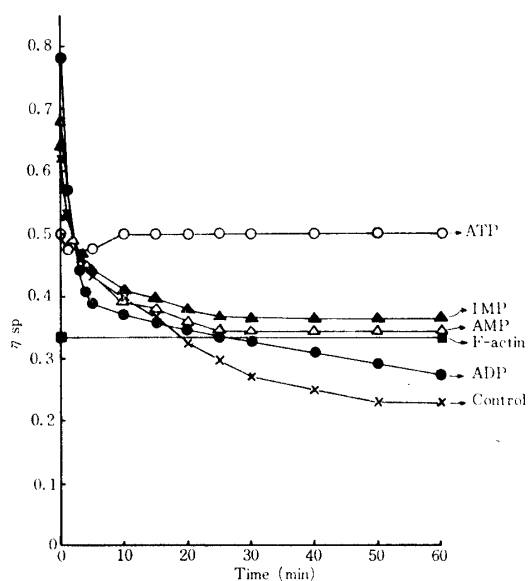


Fig. 5-2. Effects of various nucleotides on the interaction of 6S  $\alpha$ -actinin and F-actin measured by viscosity at 25°C.

Final concn. : 0.11 mg/ml 6S  $\alpha$ -actinin, 1.0 mg/ml F-actin, 10mM nucleotides each, 0.1M KCl, 20mM Tris-acetate buffer (pH 7.0).

分間経過後においてもこの高い粘度が殆ど変化しなかった。

他のヌクレオチドが粘度変化に及ぼす影響をみると、ADPが最も粘度低下の抑制効果が少なく、AMPはADPよりはやや抑制効果が大き、さらにIMPはAMPよりもわずかではあるが抑制効果が大きであった。

この場合、IMPの抑制効果は、ATPの抑制効果の約45%程度であった。

以上のように、濁度法によっても、粘度法によっても、各種ヌクレオチドが6SとF-アクチンの相互作用に及ぼす影響は、ほぼ同様な傾向を示し、その反応抑制効果の順位はATP > IMP > AMP > ADPとなることが認められた。このように、ADPの抑制効果が最も小さかったことは注目すべき点であろう。この理由は明らかでないが、恐らく、F-アクチンには通常ADPが結合しているため、このF-アクチンに結合しているADPと、添加したADPとの間の反発効果が、このような結果をもたらした一因をなしているのではないかと推定される。

### (3) 電子顕微鏡による観察

前述の通り、6SとF-アクチンの相互反応は、筋組織内に存在するヌクレオチドによって、種々の程度の抑

制をうけることが観察されたので、つぎにこの現象は形態的にはどのような変化としてあらわれるかを、電子顕微鏡によって観察した。

F-アクチンが6Sの作用によって側面会合し、束状に凝集することはすでに第3章に示した。そこでこの側面会合による凝集が、濁度変化ならびに粘度変化の主因であろうことは容易に推定されるので、この凝集に対して、各種のヌクレオチドがどのように作用しているかを電子顕微鏡で観察し、得られた結果をPlate IV, Plate Vに示した。Plate IVは、10mM ATPが加えられて凝集反応が抑制された状態にある反応系についての写真であるが、側面会合による会合は全く認められず、F-アクチンフィラメントは、非常によく分散している様子が認められる。

つぎにADP, AMP, IMPをそれぞれ10mM添加した場合の写真をPlate Vに示したが、ADPを添加した場合は、明らかに側面会合が起り、F-アクチンフィラメントが太い束状になっている状態が認められる。しかし、AMPとIMPを添加した場合は、多少様子が異なり、AMP → IMPの順位で、F-アクチンの側面会合による凝集が起り難くなっている状態が推察される。

### (4) 6S $\alpha$ -アクチニンとF-アクチンの相互作用のATPによる抑制機構

6SとF-アクチンとの相互作用に及ぼす種々の環境因子のうち、ヌクレオチド、特にATPによる抑制効果は極めて顕著であり、かつATPが生筋内に常在する成分であるところから、この効果は特に筋肉の死後変化の内容を追究する上において、重要な意味を有すると考えられるので、このATPによる抑制機構の究明を試みた。

まずATPを添加した反応系にATPaseを作用させ、ATP濃度を実験的に低下させた場合の影響を検討することを企画した。

この場合必要なATPaseであるが、筋肉中には数種のATPaseの存在が知られており、M-ATPase、ミトコンドリアATPase、筋小胞体ATPaseなどがある。このうち、M-ATPaseは、この実験に使用する反応系の中にMを加えた場合、条件次第では超沈殿現象を起す可能性が考えられるので適当でなく、またミトコンドリアATPaseはATPの分解により生成するADPによって特異的に阻害をうける<sup>(62)</sup>性質があると報告されているので、これを用いることも筋肉の死後変化の環境形成には不適當と思われた。そこで結局、

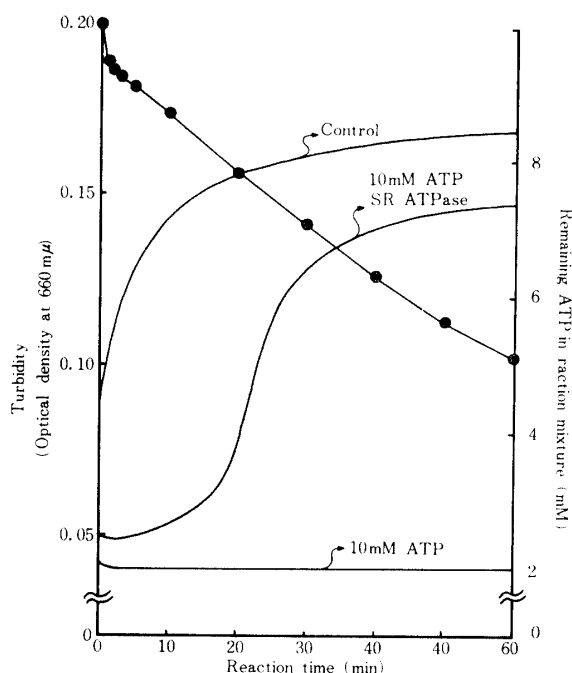


Fig. 5-3. Effect of sarcolemmic reticulum ATPase on the interaction of 6 S  $\alpha$ -actinin and F-actin measured by turbidity and the decomposition of ATP at 25°C.

Final concn. : 0.2mg/ml 6 S  $\alpha$ -actinin, 0.8mg/ml F-actin, 10mM ATP, 3mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1mM CaCl<sub>2</sub>, 0.12mg/ml sarcoplasmic reticulum ATPase in 1% Triton X-100, 10  $\mu$ M EDTA, 10  $\mu$ M Dithiothreitol, 0.1 M KCl, 20mM Tris-acetate buffer (pH 7.0).

筋小胞体 ATP ase を用いて検討することにした。

a) 筋小胞体 ATP ase による ATP 分解の影響

筋小胞体 ATP ase を, 10 M ATP を添加し, ほぼ完全に反応が抑制されている系に作用させた場合, 果して ATP による抑制が除かれてくるかどうかについて, 濁度法を用いて検討した. その結果は第 5-3 図に示した通りである. 図より明らかな通り, 10mM ATP により完全に抑制されていた反応系の濁度は, ATP ase 添加後約 5 分間経過すると, すでに徐々にではあるが上昇を開始する. ここで, この筋小胞体 ATP ase は前述した通り (第 3 章), ミオキナーゼを含むようであるから, 遊離してくる無機リン酸の定量値は, その総てが ATP の分解により生じた量を示すものとは言えないが, 一応遊離無機リン酸の定量値にもとづき ATP の減少量を算出し, これも第 5-3 図に示した.

第 5-3 図に示された結果をみると, ATP の分解は, ATP ase 添加後, 最初の約 5 分間は極めて急速であって, 5 分後には残存する ATP の濃度は約 9 m M となっている. さらに 12 分後には 8.5mM に, 18

分後には, 第 4 章において見出された本実験条件での臨界濃度とみられた 8mM 程度に減少する. 濁度はそのころになると急激に上昇をはじめ, 約 30 分後まで急激な上昇が続くが, その後は再び上昇は緩やかになる. このように残存 ATP 濃度が 8mM を割ると, 急激に反応が進行する点は, 第 4 章における実験結果とほぼ一致し, 非常に興味深い事実である. その後 60 分後までの濁度変化は, ATP の分解が図中の残存量からみて進行しているにもかかわらず, あまり上昇してこないが, その原因は, おそらく, 形成される IMP の量が漸次高まってくる結果として, 前述したように, 弱いながらも IMP がもつ, 抑制効果が, その濃度の上昇と共に発現してきているためであろうと思われる. 結局 60 分後における濁度の回復は, 約 80% 程度になると考えられ, これはかなり高い数値であり, 筋肉の死後変化の進行に伴う顕著な変化の一つである死後硬直の開始との関連において考慮するとき, かなり重要な意義をもつもののように思われる.

b) ATP による 6S と F- アクチンとの反応抑制機構

ATP による 6S と F- アクチンとの相互作用の抑制機構について検討した報告はまだ見当たらないようである. アクチンに対して ATP がかなりの親和性を有する事実はすでに報告<sup>(63,64)</sup> されているが, 6S と ATP との親和性についてはまだ報告がないように思われる.

第 4 章で行なった, ATP の存在下における 6S と F- アクチンの相互作用に対するタンパク比の影響についての検討結果から, 6S と ATP との間にも親和性があるように思われるので, まず 6S と ATP の相互作用について検討した.

b-1) 6S $\alpha$ - アクチニンと ATP の相互作用

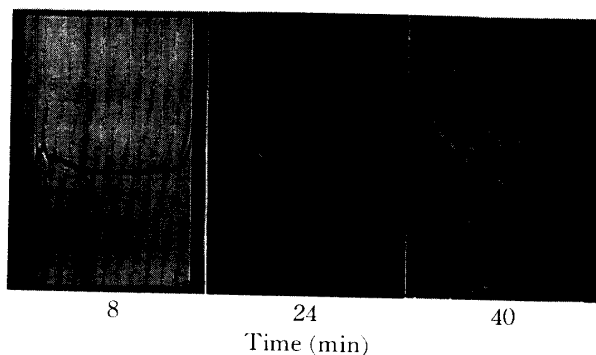


Fig. 5-4. Sedimentation patterns of 6S  $\alpha$ -actinin in 0.1 M KCl, 10mM ATP, 20mM Tris-acetate buffer (pH 7.0). Photographs were taken at intervals indicated, after reaching the steady speed of 52,640 rpm, 20°C

Final concn. : 2.51 mg/ml 6 S  $\alpha$ -actinin.

## (i) 超遠心分析

6S と ATP の相互作用を検討するため、6S に ATP を加えた場合と加えない場合とについて超遠心法によって比較分析を行なった。その結果は第5—4, 5—5 図に示した通りで、そのピークのあらわれ方は両図とも殆ど相異がないようであった。また、それぞれのピークについて沈降定数を算出してみると、ATP を加

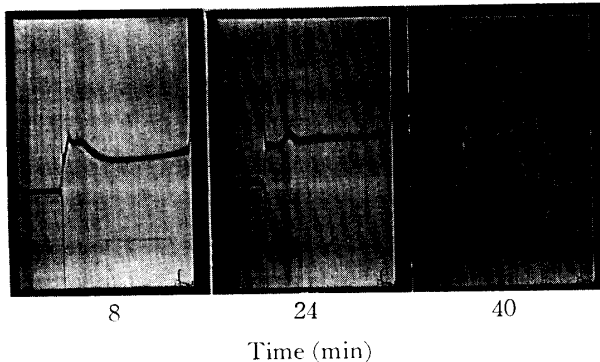


Fig. 5-5. Sedimentation patterns of 6 S  $\alpha$ -actinin in 0.1M KCl, 20mM Tris-acetate buffer (pH 7.0). Photographs were taken at intervals indicated, after reaching the steady speed of 52,640 rpm, 20°C.

Final concn. : 2.51 mg/ml 6 S  $\alpha$ -actinin.

えぬ方のピークは 6.23 S, 加えた方のピークは 6.20 S で、ほぼ等しい数値となっていることから、おそらく 6S と ATP は殆んど結合しないように考えられる。

## b—2) F-アクチンと ATP の相互作用

アクチンとヌクレオチドとの相互関係については、多くの研究があり、F-アクチンには ADP が、アクチン  $6 \times 10^4 g$  当り 1 モルの割合で結合している事実はよく知られている。また F-アクチンと ATP の結合についても検討され、SEIDEL et al.<sup>(64)</sup> によってその親和定数は  $2 \times 10^7 M^{-1}$  であることが報告されている。本研究においては、10mM の濃度の ATP を用いており、この濃度はかなり高濃度であるので、F-アクチンの G-アクチンへの変換が起るのではないかと、換言すれば、F-アクチンの脱重合が高濃度 ATP によって惹き起こされているのではないかとという疑問が起る。

GOLL<sup>(22)</sup> et al. は、6S は、G-アクチンとは直接反応しないことを超遠心法を用いて観察しているのも、もし、F-アクチンが本実験の条件下で G-アクチンへ脱重合されていけば、反応の抑制が ATP の添加によって起るのでは、脱重合により G-アクチンが生じたためではないかとも考えられるので、まずこの点を明らかにするために超遠心分析を行なった。

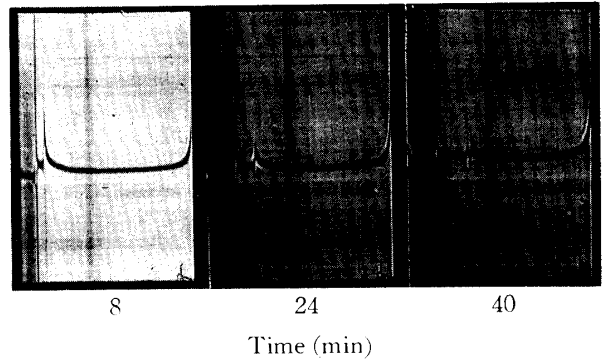


Fig. 5-6. Sedimentation patterns of F-actin in 0.1 M KCl, 10mM ATP, 20mM Tris-acetate buffer (pH 7.0). Photographs were taken at intervals indicated, after reaching the steady speed of 20,410 rpm, 20°C.

Final concn. : 2.47 mg/ml F-actin.

## (i) 10mM ATP 存在下における F-アクチンの超遠心分析

F-アクチンは、2~3mM の ATP 水溶液 (中性または微アルカリ性) に対して透析すると、F-アクチンに結合している ADP が ATP と交換して脱重合し、ATP の結合した G-アクチンとなることはよく知られている事実である。本実験は 0.1M KCl の塩濃度で実施しているが、この塩濃度環境は、G-アクチンを F-アクチンに変換させるのに十分な環境である。そこで、このような塩濃度環境下で高濃度の ATP を共存させた場合、F-アクチンが脱重合を起こすか否かを検討するため、まず超遠心分析を行なった。

第5—8 図に示した 10mM ATP を共存させた場合の沈降図と、さきに第3章第3—2 図に示した F-アクチンのみの沈降図とを対比してみると、両者の間には殆ど差異がなく、単一ピークを示すことがわかる。またそれぞれの場合の沈降定数を算出してみると、ATP を共存させないものでは 34.5S, 10mM ATP を共存させたものでは 34.7S で、沈降定数の上でも殆ど差異のないことがわかる。そしてまた、10mM ATP を添加した場合、G-アクチンの存在を示す、より遅く沈降するピークの存在は全く認められなかった。従って、F-アクチンは 0.1M KCl の存在する条件下では、10mM 程度の ATP が加えられても、脱重合することはないと考えられる。

## (ii) 10mM ATP 存在下における F-アクチンの電子顕微鏡による観察

超遠心分析により得られた結果をさらに確認する目

的で、同一実験条件下の試料について電子顕微鏡による観察を行なった。得られた結果は Plate V に示した通りで、この写真から F-アクチンの線維構造は殆ど破壊されていないことが認められる。しかし、第 3 章 Plate I を参照の上、よく観察すると、F-アクチン線維はところどころで、ある程度の長さを保ちながら切断されていることが認められる。このように、0.1 M KCl の存在下で、F-アクチン線維をある程度の長さをもつ短い線維に切断する効果を有するものは、MARUYAMA<sup>(65)</sup> が見出したところの、 $\beta$ -アクチニンではないかと考えられる。本研究で使用しているアクチニンには、EBASHI and MARUYAMA<sup>(29)</sup> によれば、 $\beta$ -アクチニンの存在が推定されており、さらに、MARUYAMA<sup>(66)</sup> によって、 $\beta$ -アクチニンのこのような効果は、ATP の存在によって幾分増強されることが報告されているので、これらの点を総合して考えると、 $\beta$ -アクチニンの存在ならびにその効果によって、上述のような現象が現われるのであろうと考えられる。

### (iii) F-アクチンと各種スクレオチドの結合

本章 2 の(1)と(2)で述べたように、6S と F-アクチンの相互作用に対し、各種スクレオチドがそれぞれ異なる効果を示したので、その理由を解明してゆくための手がかりを得るため、まず F-アクチンと各種スクレオチドの結合量について検討した。

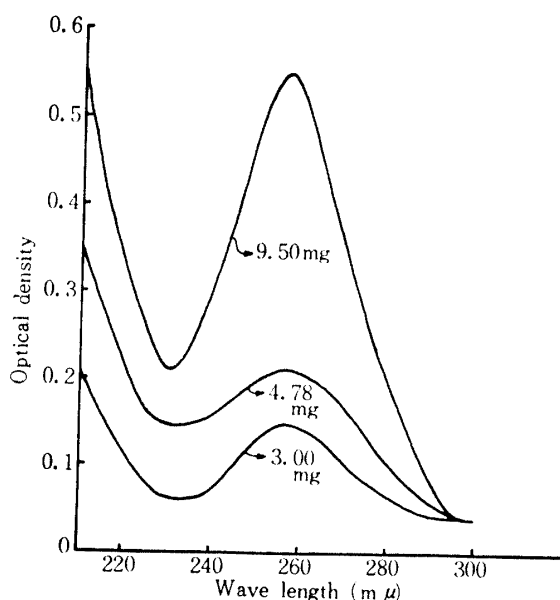


Fig. 5-7. Ultraviolet spectra of bound-ADP to F-actin.

The ultraviolet spectrum of each sample solution was measured after the bound-ADP to each amount of F-actin indicated above had been liberated by treating with perchloric solution,

### (i) F-アクチン結合 ADP 量

前述したように、F-アクチンには、その分子内に ADP を結合していることが知られているので、まずこの研究に使用した F-アクチンに結合している ADP の定量を試みた。すなわち、F-アクチンをそれぞれ、3.0, 4.78, 9.5 mg とり、SEIDEL et al.<sup>(64)</sup> の方法に準拠して処理し、それぞれの酸抽出液の紫外吸収曲線を第 5—7 図に示した。その極大吸収を示す 258 m $\mu$  での吸光値から計算すると、タンパク質 6 $\times$ 10<sup>4</sup> g 当り、ほぼ 1 モルの ADP を含むこととなり、従来の文献値と大体一致した。

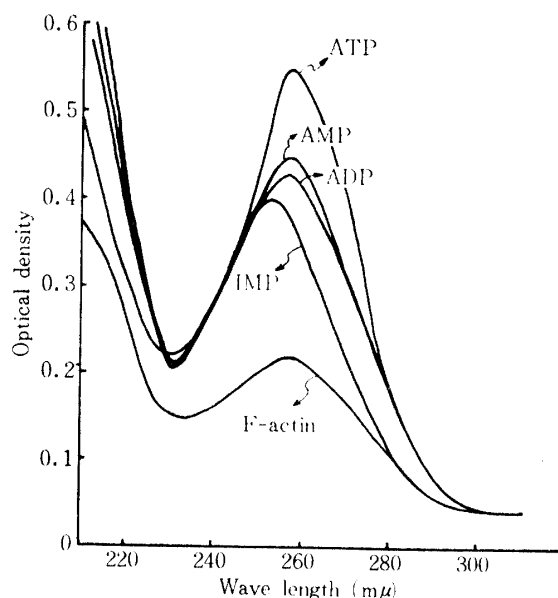


Fig. 5-8. Ultraviolet spectra of various nucleotides bound to F-actin.

After 4.78 mg of F-actin had been treated with 10 mM of each nucleotide for 30 min at 4°C, each nucleotide bound to F-actin was liberated in the same manner as described in Fig. 5-7, and then the ultra-violet spectrum of the resulting sample solution containing each nucleotide was measured.

### (ii) 各種スクレオチドの結合量

つぎに各種スクレオチドの結合量を求めるため、F-アクチン量を一定 (4.78 mg) とし、これに各種スクレオチドを終濃度で 10 mM となるように添加し、0.1 M KCl を含む環境下で、4°C、30 分間放置後、SEIDEL et al.<sup>(64)</sup> の方法に準拠して処理し、得られた酸抽出液についてそれぞれの紫外吸収曲線を取り、第 5—8 図に示した。この図からそれぞれの極大吸収波長における吸光値にもとづいて結合量を算出して、その数値を第 5—1 表にまとめた。表より明らかな通り、アデニ

Table 5—1. The amounts of bound-nucleotides to F-actin

Kind of nucleotide	Measurement		Approximate amount* of bound-nucleotide to F-actin moles/60.000g F-actin
	Wave length (m $\mu$ )	Optical density	
Control ADP**	252	0.21	1.00
	258	0.22	
AMP	258	0.23	1.04
ADP	258	0.22	1.02
ATP	258	0.33	1.50
IMP	252	0.41	1.40

\* Each amount was calculated on the basis of the finding for optical density given in Fig. 5—8 and the approximate molar extinction coefficient, 14.6 for adenine nucleotide and 12.2 hypoxanthine nucleotide, respectively.

\*\* Bound-ADP to F-actin, before being treated with 10 mM ADP.

ン系ヌクレオチドの結合量は、F-アクチンと6Sとの相互作用抑制順序とほぼ一致しており、同一条件での結合量の順位は ATP > AMP > ADP となる傾向がみられる。

なお、IMP は、筋肉の死後変化の進行に伴い、AMP が脱アミノされて生ずるヒポキサンチン系ヌクレオチドで、その極大吸収波長は、アデニン系ヌクレオチドのそれよりもやや短波長側にずれた、252m $\mu$ であるが、F-アクチン結合 ADP の 252m $\mu$ での吸光値を求めて補正を行ない、IMP の結合量を求めてみると、F-アクチン 6 $\times$ 10<sup>4</sup>g 当り 1.4 モルとなり、ATP の F-アクチン 6 $\times$ 10<sup>4</sup>g 当り 1.5 モルという値に次ぐ量 (1.4 モル) となった。この結果と、本章 2 の (1) と (2) で前述した F-アクチンと 6S の相互作用に対する各種ヌクレオチドの抑制効果の順序とを合わせて考慮する

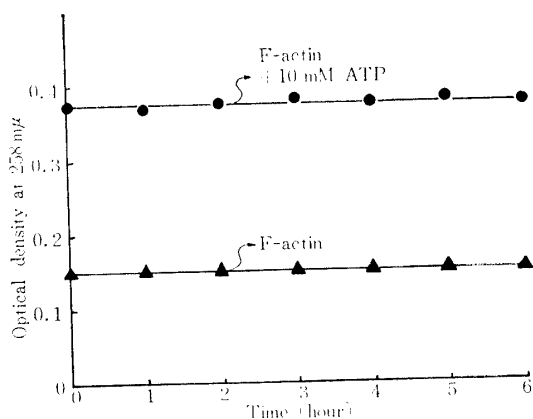


Fig. 5-9. Change in the amount of bound-ATP to F-actin during course of 6 hours at 4°C.

Concentration in reaction mixture : 0.75mg/ml F-actin, 10mM ATP, 0.1 M KCl, 20mM Tris-acetate buffer (pH 7.0).

とき、各種ヌクレオチドによるこの抑制効果の発現程度の順位は、これら各種ヌクレオチドの F-アクチンへの結合量順位とほぼ一致しており、この両者の間に密接な関連性が認められることは興味深い。

#### (v) 結合 ATP 量の経時的変化

上記の実験から、4°C、30 分間の反応条件で、10mM ATP が存在すると、F-アクチン 6 $\times$ 10<sup>4</sup>g 当り、1.5 モルの ATP が結合することが認められたが、これをさらに長時間反応させた場合における結合量の経時の変化について検討した。得られた結果は第 5—9 図に示した通りであり、反応時間 6 時間以内では経時的な変化は全く見受けられなかった。

#### (vi) 結合 ATP 量の ATP 環境濃度による影響

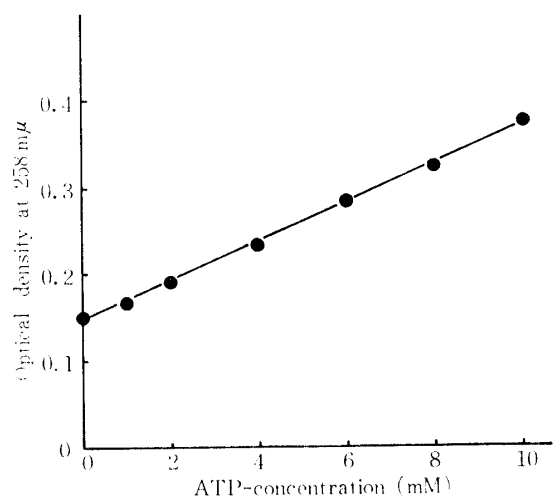


Fig. 5-10. Amount of bound-ATP to F-actin at varied ATP concentrations.

Concentration in reaction mixture : 0.75mg/ml F-actin, 0.1 M KCl, 20mM Tris-acetate buffer (pH 7.0), various concentrations of ATP as indicated in graph,

ATP 濃度が動物の死後、筋肉内で起こる死後変化の進行に伴い減少していった場合、この結合 ATP 量に変化があるかないかは、6S と F-アクチンとの相互作用の抑制の有無と関連してくると考えられるので、ATP 0~10 mM の環境濃度における結合 ATP 量を測定し、その結果を第5—10 図に示した。図より明らかな通り、ATP 環境濃度が低下するにつれて結合量も急速に低下することがわかる、換言すれば、ATP の F-アクチンに対する親和力は、環境の ATP 濃度に支配されているということになる。この種の検討は SEIDEL et al.<sup>(64)</sup> によってもなされており、ほぼ同様な傾向が得られているようである。

動物の死後、筋肉内の ATP 含有量は ATPase の作用により、急激に低下するが、それに伴って、F-アクチンに対する ATP の親和性が低下し、結合量が急激に減少するものと考えられる。従ってこのように死後、筋肉中の ATP 量が減少した場合に 6S が共存していれば、6S と F-アクチンとの相互作用がたかまり、凝集反応を起こすようになるのではないかと思われる。

第5—3 図に示した、筋小胞体 ATPase を ATP を含んだ系に作用させて、ATP 濃度を低下させた場合の濁度曲線の変化は、ATP による抑制の解除であり、

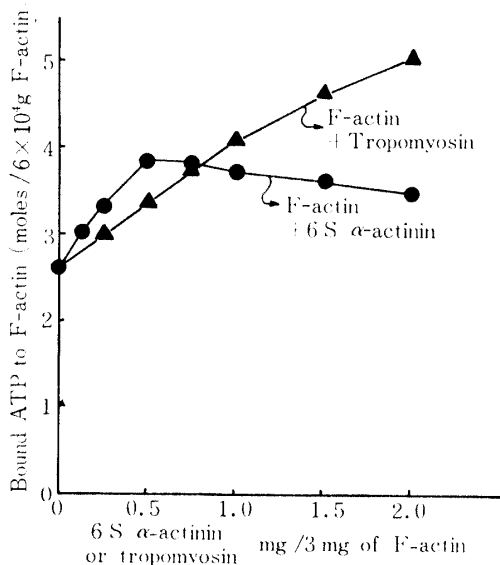


Fig. 5-11. Amount of bound-ATP to F-actin in the presence of 10mM ATP at 4°C at varied concentrations of 6S  $\alpha$ -actinin or tropomyosin.

Concentration in reaction mixture : 0.75mg/ml F-actin, 6S  $\alpha$ -actinin or tropomyosin as indicated, 0.1M KCl, 10mM ATP, 20mM Tris-acetate buffer (pH 7.0).

その結果起こってきた 6S と F-アクチンとの相互作用による凝集体の形成に起因するものであろうことが、上記の実験結果からも推察できるであろう。

#### (iv) F-アクチンと結合する ATP 量と 6S $\alpha$ -アクチニン量

つぎに F-アクチンに結合する ATP 量と 6S 量との関係について検討した。すなわち、ATP を一定濃度 (10mM) を存在させた系で、6S 濃度を漸次高めていった場合、結合 ATP 量がどのように変化するかを検討し、その結果を第5—11 図に示した。まず F-アクチンには、ATP 濃度が 10 mM の環境下では約 1.5 モルの ATP が結合しているが、6S を漸次増加して加えてゆくと、はじめのうちは ATP の結合量が増加してくるが、6S の添加量が F-アクチン量 (3mg) の 1/6 (0.5mg) に達すると、結合 ATP 量の増加は停止し、以後 6S の添加量を F-アクチン量の 2/3 まで増加させても、結合 ATP 量の増加は認められず、むしろわずかではあるが減少する傾向が認められた。この事実を説明するための一つの考え方を述べればつぎの通りである。

すなわち、F-アクチンは本来線維構造をもっているが、高濃度 ATP の添加によって、その線維構造上の特定の位置に ATP を結合させるようになる。そこに 6S が F-アクチンの 1/6 以上加えられてくると、6S は結合している ATP とほぼ同じ位置で競合し、恐らく、ATP と F-アクチンとの結合は弱いので、これをおしよけて切り離すので、結合 ATP 量は次第に減少し、6S 自からがその位置に結合し同時に F-アクチン線維の側面会合を誘起させる。しかし、6S の添加量が少ない間は、F-アクチンに結合しているすべての ATP の結合位置に作用し得ないので、部分的に側面会合によって線維束を形成するとき、物理的に若干の ATP を内部に包み込んでしまうため、1:6 の比までは結合 ATP 量が増加した形で定量されてくるのではあるまいか。従って F-アクチンのみについて考えると、結合 ATP 量は、6S の添加量が増加すると、次第に減少する傾向を示すのではないかと思われる。

#### (v) F-アクチンと結合する ATP 量とトロポミオン量

F-アクチンと安定な形で結合する筋タンパク質としては、6S のほかにトロポミオンがある。すなわち、DRABIKOWSKI et al.<sup>(25)</sup> によれば、トロポミオンは F-アクチンと結合しても 6S のように凝集、沈殿を生ぜしめる作用はなく、可溶性の複合体を形成する

というところが、このトロポミオシンと6Sが共存してF-アクチンに作用する場合は、6Sとトロポミオシンとの間に直接の相互作用は起こらないが、F-アクチンと6Sとの相互作用を、トロポミオシンが阻害し、F-アクチンのゲル化や沈殿形成を抑制すると報告されている。

そこで、このトロポミオシンのF-アクチン結合ATPに対する影響を、さきの6Sについて行なった場合と同様の実験方法で検討し、その結果を第5—11図上に併記した。トロポミオシンの場合には、6Sの場合と異なり、添加トロポミオシン量を増加させると、その増加量と殆ど比例的に結合ATP量が増加した。

このような事実は、ATPが添加したトロポミオシンに結合するか、あるいは添加したトロポミオシンとF-アクチンが複合体を形成し、この複合体にATPが結合することなどに基づくものではないかと考えられるが、正確な詳しいことは、今後の研究により明らかにされる必要がある。

### 3. 要 約

各種のヌクレオチドがF-アクチンと6Sとの相互作用に及ぼす影響について検討したが、その結果の要点はつぎの通りである。

1) ATP, ADP, AMP, IMP について、いずれも10mMの濃度において、濁度および粘度の測定、電子顕微鏡による観察によって、6SとF-アクチンの相互作用に及ぼす影響を比較検討したところ、濁度、粘度測定の結果はよく一致し、根相互作用を抑制する強さの順序はATP > IMP > AMP > ADPとなったが、特にATPの抑制効果は、他のヌクレオチド類に比して著しく強く、ついでIMPがATPの約50%程度の抑制効果を示したが、その他のヌクレオチドの抑制効果は微弱であった。電子顕微鏡により観察した結果では、ATPにより根相互作用が殆ど完全に抑制された状態の反応系では、F-アクチン線維は側面会合による凝集は全くみられず、よく分散していた。しかし、その他のヌクレオチドの場合は、IMP, AMP, ADPの順位で、次第に強くF-アクチンが会合を起こす傾向が認められた。

2) ATPによる、6SとF-アクチンの根相互作用の抑制機構の解明を試みた。まず、10mM ATPの存在により、反応が殆ど完全に抑制された系に筋小胞体ATPaseを添加し、ATP濃度を低下させたところ、ATPの抑制作用が減少し、ATPを添加しない対照の

場合の80%まで相互作用が回復した。この際、ATP濃度が8mM以下となると、急速に相互作用が起こること、また分解の結果生成するIMPによって弱いが抑制を受けるため、80%程度にとどまるのであることが推察された。これらの結果から、ATPの環境濃度が低下すれば相互作用が起こることが明らかになった。

3) つぎにATPによる相互作用抑制の機構について種々の角度から検討を加え、つぎのような結果が得られた。

(i) ATPは6Sと殆ど結合しないようである。

(ii) F-アクチンは、高濃度のATPの存在下でも、生理的イオン強度のもとでは、G-アクチンへ脱重合することはなく、電子顕微鏡で観察すると、ある程度の長さで、F-アクチン線維がところどころで切断されているのが認められた。これはおそらく、今回の実験に使用したF-アクチンに混在するβ-アクチニンの作用のためであろうと考察された。

(iii) ATPならびにその他の各種ヌクレオチドのF-アクチンへの結合量を検討したところ、その結合量は、6SとF-アクチンとの相互作用抑制効果の強いものほど結合量が多く、その結合量の多い順位は、ATP > IMP > AMP > ADPとなり、これは相互作用抑制効果の強さの順位とほぼ一致した。

また、このF-アクチンと結合したATP量は、4°Cで6時間保持しても変化しなかったが、ATPの環境濃度が低下すると、ATP結合量が減少することがわかり、前述の筋小胞体ATPaseによる、ATP濃度の減少が結合ATP量を減少させ、その結果として抑制効果が失われてくるものと考えられた。

(iv) F-アクチン結合ADP量と6S量との相互関係を調べた結果、6Sが、ATPと結合しているF-アクチンに対して量的に少ない間は、ATP結合量はやや増加するが、その量がF-アクチンの量の1/6を起えると、ATP結合量がやや減少してくる傾向が認められた。

また、トロポミオシンについて6Sの場合と同様な調査を行なったところ、全く趣きを異にし、トロポミオシンの添加量に比例して、ATP結合量の増加する傾向が認められた。

以上の結果から、生筋内では、ATPが高濃度に存在するので、F-アクチンまたは細いフィラメントには、ATPが結合した形で存在し、そのために6Sは、F-アクチンと相互作用を起こし得ない状態にあるが、死後の筋肉内では、ATPaseの作用によりATPが分



解されて減少し、ATPの環境濃度が低下すると、6SとF-アクチンとの相互作用が起こり得る状態になることが推察された。

## 第6章 細いフィラメントと6S $\alpha$ - クチニンとの相互作用

筋線維内に存在する筋原線維は、いわゆる細いフィラメントと太いフィラメントの規則性のある交互の配列によって構成されていることが知られているが、この筋原線維は、筋節が単位となっていて、その筋節間の接合部にはZ線があり、このZ線に局在している6Sが死後変化の進行に伴うZ線の消失と共に筋原線維内へ拡散してゆくことが推定されるが、この6Sの影響をまず最初に受けると考えられる部分は、Z線の近傍に位置するところの、I帯を構成する細いフィラメントであろうと考えられる。

本研究においては、前章においてこの細いフィラメントの基本的骨格ともいべきF-アクチンと6Sとの相互作用の起こる生理的環境因子の影響について、系統的な検討を行ない、その相互作用の内容ならびに本質について、ある程度の知見を得ることが出来たと考える。しかしながら、筋線維内にある筋原線維では、F-アクチンが細いフィラメントとして存在しているので、実際には、6Sはこの細いフィラメントと相互作用を起こすと考えなければならない。そこで本章では、この細いフィラメントと6Sとの相互作用と、さらにその相互作用に関係する諸因子の影響について検討を行なった。

F-アクチンに対してトロポミオシンが3:1程度の比となるまで結合すること、また、このトロポミオシンの結合によって、単独では比較的脆弱な様相を呈しているF-アクチン線維は、強靱な長い線維構造となる<sup>(67)</sup>こと、また、このトロポミオシンの結合は、F-アクチンと6Sとの相互作用を抑制してしまうことなどは、すでに知られている。また、EBASHI<sup>(46)</sup> et al.によれば、細いフィラメント中には、トロポニンとトロポミオシンが一定の規則性をもって常在し、これがCa<sup>2+</sup>の影響により、F-アクチンへのアロステリック効果をもたらし、ミオシンを主成分とする太いフィラメントとの反応を促進することもすでによく知られて事実である。

そこで、これまで種々検討してきた6SとF-アクチンとの相互作用に関する実験結果を基礎として、まず、6Sと細いフィラメントとの相互作用について検討

することにした。

しかし、この問題と関連した研究報告はまだ極めて少ないようで、その主なものとしてDRABIKOWSKI<sup>(25)</sup> et al.が、F-アクチン-トロポミオシン-6S系において、これらの各成分が、或る濃度比にある場合に、粘度の上昇が認められることを報告したものなどがある。

そこで、本研究においては、筋原線維を構成している既知の各種の構成成分を出来るだけ精製し、その特性や活性を確かめた上で、出来るだけ自然の状態に近い量比に混合した反応系を用いて実験を行なえば、かなり実際に即した実験結果が得られるのではないかと考えた。

最近、筋原線維構成タンパク質の分布比率がかなり詳しく報告されているので(第1章、第1-1表<sup>(46)</sup>)、その数値にできるだけ一致させるように各構成成分を混合した反応系を用い、種々検討することにした。

ただし、6Sについては、死後その局在位置であるZ線から遊離拡散するものと考えられるので、それが他の構成成分と接触して相互作用を起こす場合には、かなり幅のひろい濃度範囲で作用する可能性が考えられるため、文献に示された数値の1~5倍くらいの濃度範囲で実験を実施することにした。

### 1. 実験方法

本章で行なった実験は、粘度測定、電子顕微鏡による観察であるが、その実験方法はすでに第3章で述べた通りである。

本章において使用した細いフィラメントは、つぎのように調製した。すなわち、所定量のF-アクチン、トロポミオシン、トロポニンをよく混合し、ついで所定の終濃度となるようKCl、トリス-酢酸緩衝液(pH 7.0)を加え、水を加えて定容とする順序で混合調製した。ただし、Ca<sup>2+</sup>を加えるためCaCl<sub>2</sub>を加える場合は、F-アクチンにトロポミオシン、トロポニンを加えた後に添加し、また6Sを添加する場合は、あらかじめ他の試料を混合後、最後に添加した。

### 2. 実験結果および考察

#### (1) 細いフィラメントの粘度に及ぼす 環境因子の影響

細いフィラメントの構成成分であるトロポミオシンにトロポニンを漸次量を増して加えてゆくと、粘度の上昇を来たすことは、すでに第3章の活性の項で説明したが、このトロポミオシン-トロポニンを、筋原線維内存在比に混合したものをF-アクチンに加えた場

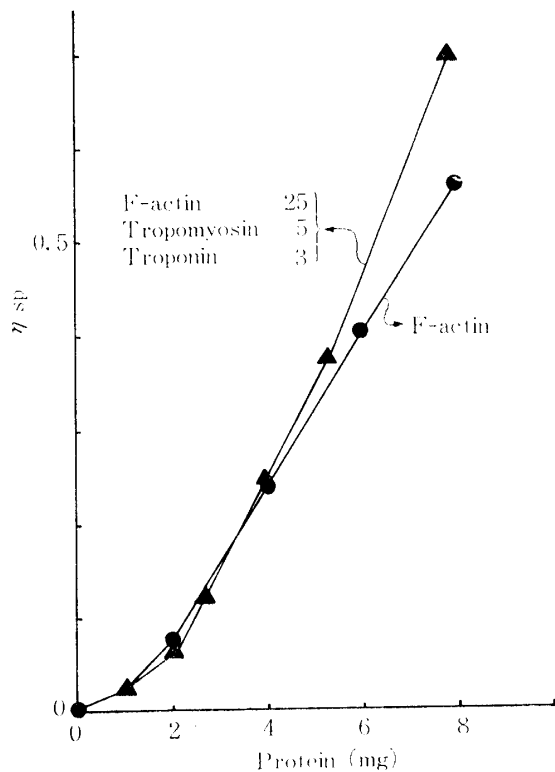


Fig. 6-1. Effect of troponin and tropomyosin on the viscosity of F-actin at 25°C.

Final concn. : 0.1M KCl, 20mM Tris-acetate buffer (pH 7.0), proteins were premixed at the ratio as indicated.

合、F-アクチンの粘度は、加えないものよりも上昇してくるが、その状態を第6—1図に示した。この結果はEBASHI and KODAMA<sup>(68)</sup>が得ている結果とよく一致する。

つぎに細いフィラメントの(F-アクチン、トロポミオシン、トロポニン3者の複合体)に $Ca^{2+}$ を終濃度1mM程度加えれば、 $Ca^{2+}$ はトロポニンに結合し、一種の構造変化を起こすが、この変化はトロポミオシンを経てF-アクチンに伝達されるという、いわゆるアロステリック効果が起こるはずである。この時の変化が粘度として捉えられないか再三実験してみたが、このアロステリック効果を受けたと思われる細いフィラメントは、中性の条件下ではあまり粘度変化を生じないようであった。

そこで、つぎに筋肉の死後変化の結果として生ずるpHの低下を一因子として、この系に対する影響を検討することとし、中性より極限pHといわれるpH 5.5までの範囲でpHを低下させてみると同時に、 $Ca^{2+}$ ならびにEGTA(エチレンジグリコール、ビス(β-アミノ

エチルエーテル)N, N', 四酢酸)添加の効果を加味して粘度法により追跡してみたところ、第6—2図に示したような結果を得た。すなわち、 $Ca^{2+}$ の有無にかかわらず、pHの低下と共に粘度は上昇するが、その場合、 $Ca^{2+}$ を1mM加えた場合と、 $Ca^{2+}$ の選択的キレート剤であるEGTAを1mM加えて、 $Ca^{2+}$ をほぼ完全に系から除いた場合とについて比較してみると、両者の間にはかなりの差が生じてくることがわかった。すなわち、pHの低下と共に $Ca^{2+}$ が十分存在する系では、粘度は常に対照より高い値を保って上昇する傾向があり、一方EGTAで $Ca^{2+}$ を系から除いた場合は、粘度は常に対照より低い値を保ちながら上昇するという経過をたどりながら変化する。

つぎにこのような細いフィラメントの挙動に及ぼす6Sの影響を調査するため、 $Ca^{2+}$ の存在する系に6Sを添加してみたところ、粘度は、中性のpHではやはり変化しないが、pHの低下と共に $Ca^{2+}$ のみ含まれる系よりもさらに粘度が高まる傾向が認められた(第6—2図)。

ただし、この効果はpH 6.5~5.7の範囲でみられ、pH 5.7以下ではむしろ $Ca^{2+}$ のみを添加した場合よりも低下する傾向を示した。この原因は兎6Sの等電点がEBASHI and EBASHI<sup>(69)</sup>によってpH 5.7~5.8付近

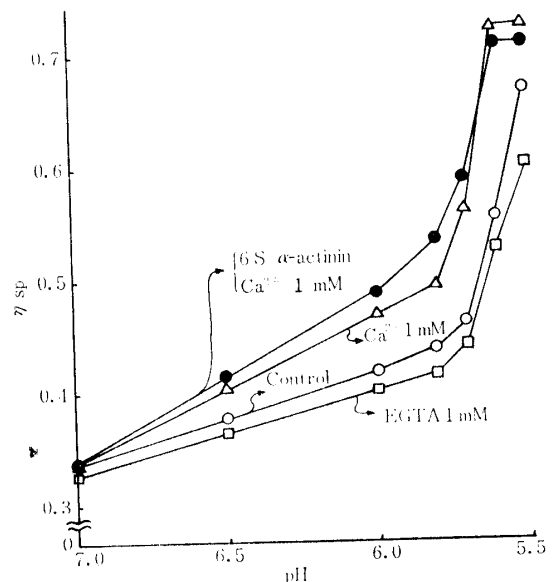


Fig. 6 2. Effects of pH,  $Ca^{2+}$ , EGTA and 6 S  $\alpha$ -actinin on the viscosity of thin filament at 25°C.

Final concn. : 1.25mg/ml F actin, 0.25mg/ml tropomyosin, 0.15mg/ml troponin, 0.10mg/ml 6 S  $\alpha$ -actinin, 1mM  $CaCl_2$ , 1mM EGTA, 0.1M KCl, pH was adjusted with 20mM Tris acetate buffer.

であると報告されているので、豚 6S もほぼ同一の等電点をもつものとするれば、pH がこの近傍となると、等電沈殿を生じ、不活化するようになるのではないかと考えられる。

## (2) 電子顕微鏡による細いフィラメントの観察

つぎに、F-アクチンと細いフィラメントの形態的相異、また細いフィラメントの特性である  $Ca^{2+}$  によるアロステリック効果の影響をとらえる目的で、電子顕微鏡による観察を試みた。

まず対照として F-アクチンについて観察したところ、本研究で使用した F-アクチンの線維は、MARUYAMA<sup>(66)</sup> が述べているように、ねじれたり、脆弱な感じを与える線維と、割合にすっきりとのびた線維との両者が観察された (Plate VI)。

つぎに、F-アクチンにトロポミオシンのみをほぼ筋原線維に含まれている割合で加えた場合、全体的にすっきりしまった感じを与える線維となる傾向がうかがえる (Plate VII)。

さらにトロポニンを加えて、細いフィラメントの形としたものは、トロポミオシンのみを加えたものとあまり変化はないようであるが、全般に線維が非常に長くなっていくようである (Plate IX)。

つぎに細いフィラメントに、その生物学的活性を発現させる最大の因子である  $Ca^{2+}$  を添加したのについて観察したが、その形態には殆ど変化は認め難かった (Plate X)。

これに対して、EGTA を加えて  $Ca^{2+}$  を取除いた場合のものは、幾分線維の幅がせまくなり、やや引締った感じの外見になるようである (Plate XI)。

最後に、細いフィラメントに  $Ca^{2+}$  を加え、いわゆるアロステリック効果の生じたと思われるものに 6S を加えた場合について観察した。6S を加えてみたところ、側面会合による凝集の生じている形跡は認め難く、線維は分散しており、ただ気付かれる点は、細いフィラメントのみの場合 (Plate X) に比較して、線維がやや緩んで太くなっている感じと、線維の表面全般にわたり、丸い感じの粒子状のものが表面に付着しているような感じを与えている点で、この付着物は、おそらく 6S であろうと推定された (Plate XII)。

## 3. 要 約

本章では、まず細いフィラメント (トロポニン、トロポミオシン、F-アクチンの複合体) を調製し、この細いフィラメントと 6S との相互作用、ならびにその

相互作用に影響する因子について検討した。得られた結果の要点はつぎの通りである。

1) F-アクチンにトロポニン、トロポミオシンを、文献に示された筋原線維内分布割合にできるだけ一致するように混合すると、粘度がわずかながら上昇する。

2) 細いフィラメントに中性の環境で  $Ca^{2+}$  や 6S を添加しても、粘度変化には殆ど影響が認められなかった。しかし、pH を 7.0 から 5.5 へと漸次低下させてゆくと、粘度に変化を生じ、その場合 pH の低下により粘度が変化してゆく過程で、EGTA で  $Ca^{2+}$  を完全に除いたものが最低、ついで対照、 $Ca^{2+}$  添加、 $Ca^{2+}$  と 6S 添加の順に高い粘度を示した。

3) 電子顕微鏡により F-アクチンと細いフィラメントを観察したが、F-アクチンは脆弱な感じの外見をもつが、これにトロポミオシンを加えると、すっきりとのびた強靱な感じの外見となり、さらにこれにトロポニンを加えると、線維が長くなる傾向が認められた。

つぎに細いフィラメントに  $Ca^{2+}$  を添加してアロステリック効果を与えてみたが、この場合も形態的に特に変化は認め難かった。しかし、 $Ca^{2+}$  の選択的キレート剤である EGTA の添加は、線維の幅をせまめる効果があるように感じられた。最後に 6S を  $Ca^{2+}$  と共に加えてみたところ、側面会合を生じた形跡は認め難かったが、線維の表面全般にわたり、丸い粒子状のものが付着している感じを与えるように変化し、これはおそらく、アロステリック効果をうけた細いフィラメントの表面に 6S が結合したものであろうと推定された。

## 第 7 章 6S $\alpha$ -アクチニンが細いフィラメントと太いフィラメントによる超沈殿に及ぼす影響

SZENT GYÖRGYI<sup>(1)</sup> が *in vitro* においてアクチンと M は ATP の存在下で相互作用し、その結果として超沈殿現象を起こすことを発見して以来、生体内における筋収縮現象の主体をなすものは、この *in vitro* における超沈殿に相応する現象であろうと考えられてきている。一方生筋中における筋収縮弛緩機構の生理学的な制御因子として  $Ca^{2+}$  の重要性が明らかにされ、またその制御機構にはトロポニンおよびトロポミオシンが関与し、 $Ca^{+} \rightarrow$  トロポニン  $\rightarrow$  トロポミオシン  $\rightarrow$  F-アクチンという一連のアロステリック効果によって、ATP の存在下で細いフィラメントと太いフィラメン

トとの相互作用が促進されて筋収縮が起こり、またこの系から  $\text{Ca}^{2+}$  が筋小胞体にとりこまれて除かれた場合、逆に両フィラメント間の相互作用が抑制されて筋の弛緩が起こるのであるというところが次第に明らかにされてきた。

動物の死後においても、生筋中におけるこの筋収縮に似た現象が起こり、その結果として、いわゆる死後硬直が起こってくると考えられるが、この硬くなった硬直筋も、時間の経過と共に、次第に軟らかくなってくるものであって、これを解硬と称している。この解硬後の筋肉が、通常肉として食用に供されるが、この解硬後の肉の硬さは非常にまちまちであって、いろいろな程度の硬さ、あるいは軟らかさを示すものである。そして、この肉の硬軟の生ずる原因は、おそらく筋収縮弛緩に関与する筋タンパク質の、死後における相互作用が密接な関連性を有すると考えられ、HERRING et al.<sup>(20)</sup> によって、このような因子の一つとして、 $\alpha$ -アクチニンの関与する可能性が指摘されている。

そこで、本章においては、細いフィラメントと太いフィラメントの間の相互作用として現われる超沈殿に対する 6S の作用効果を主として追究した。

## 1. 実験方法

本章において行なった実験は濁度測定、ATP ase 活性の測定、電子顕微鏡による観察、ゲル容積の測定である。ゲル容積の測定方法を除く他の実験方法は、第3章で述べた通りである。

まず細いフィラメントは前章に示した方法で調製した。

つぎに、太いフィラメントは精製した M を 0.5 M KCl 溶液として保存し、これを希釈し、0.1 M KCl 溶液として M の凝集体を形成させ、これを太いフィラメントとして使用した。

超沈殿に関する実験は、循環式恒温装置付きの分光光度計を用い、予め 25°C で 5 分間予温した細いフィラメントの入っているセルに、Mg-ATP を加え、ついで太いフィラメントを加え、セルの口にパラフィルムを当てて 10 回転倒することによって混合し、直ちに分光光度計にセットし、自記記録装置を連動して測定を行なった。

実際に実験する場合の各試薬および試料の濃度は図中に示した。

ゲル容積の測定は BRISKEY et al.<sup>(69)</sup> の方法に準じて行なったが、その詳細については後述する。

## 2. 実験結果および考察

### (1) 細いフィラメントと太いフィラメントによる超沈殿

本章においては、筋原線維内に存在する形の細いフィラメントと太いフィラメント間の相互作用として超沈殿をとらえて実験を進めることにしているが、既報の文献には主として合成 AM および天然 AM (ミオン B) を用いた検討結果が示されているが、ここではまず F-アクチンと太いフィラメントによる超沈殿について調査を行ない、そのあとで細いフィラメントと太いフィラメントとの超沈殿について調査を行なった。

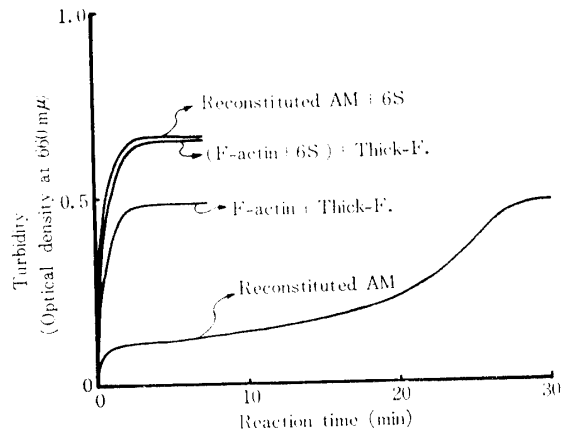


Fig. 7-1. Effect of 6S  $\alpha$ -actinin (6S) on the superprecipitation of reconstituted actomyosin (AM) and F-actin-thick filament (Thick-F.) system at 25°C.

Final concn. : 0.4mg/ml reconstituted actomyosin, 0.08mg/ml F-actin, 0.32mg/ml thick filament, 0.0192mg/ml 6S  $\alpha$ -actinin, 1mM ATP, 1mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.1M KCl, 20mM Tris-acetate buffer (pH 7.0).

#### (a) F-アクチンと太いフィラメントによる超沈殿

つぎに前述したように、予め合成 AM は調製しないで、別々に精製した F-アクチンと太いフィラメントの混合系について、さきの合成 AM の超沈殿の場合 (第3—12 図) と同一の条件で超沈殿に関する調査を行ない、その結果を第7—1 図中に、第3—12 図の結果と共に示しておいた。この結果をみると、F-アクチンと太いフィラメントの混合系の場合における超沈殿は、合成 AM の超沈殿よりもはるかに短時間で急速に起こってくることが認められた。

#### (b) 6S $\alpha$ -アクチニンで予め凝集させた F-アクチンと太いフィラメントによる超沈殿

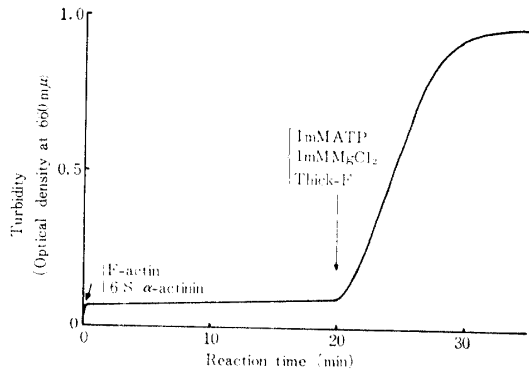


Fig. 7-2. Superprecipitation of laterally associated F-actin by 6 S  $\alpha$ -actinin and thick filament system at 25°C.

Final concn. : 0.047mg/ml 6 S  $\alpha$ -actinin, 0.185mg/ml F-actin, 0.74mg/ml thick filament, 1mM ATP, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 M KCl, 20mM Tris-acetate buffer (pH 7.0).

F-アクチンに6Sを作用させると、明らかにF-アクチンの凝集体が生じ、急激な濁度の上昇を示すことは、すでに述べた通りであるが、このF-アクチン凝集体が太いフィラメントと、接触した場合、超沈殿を起こすか否かについて検討したところ、第7-2図に示された結果からわかるように、明らかに超沈殿を起こすことが認められた。

## (2) F-アクチンと太いフィラメントによる超沈殿に及ぼす各種因子の影響

### (a) トロポミオシン、トロポニンの影響

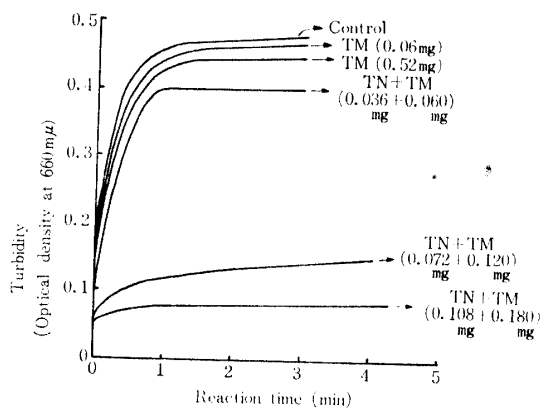


Fig. 7-3. Effects of tropomyosin and troponin-tropomyosin complex on the superprecipitation of F-actin and thick filament system at 25°C.

Final concn. : 0.075mg/ml F-actin, 0.3mg/ml thick filament, troponin and tropomyosin as indicated, 1mM ATP, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 M KCl, 20mM Tris-acetate buffer (pH 7.0).

第4章において検討した結果より、DRABIKOWSKI et al.<sup>(25)</sup>の報告に述べられているように、トロポミオシンは、6SとF-アクチンとの相互作用を阻害する事実が認められたが、このトロポミオシンの存在は、超沈殿に対してはどのような影響をもつものであるかについて検討した。

筋原線維内に自然の状態分布するトロポミオシンの量は、F-アクチン量の約5/1であると報告されているので、まずこの量を加えてみたところ、超沈殿を示す濁度曲線は、第7-3図に示したように全くトロポミオシンを加えていない対照の場合と殆ど変らなかった。そこで、この量の約10倍量を添加してみたが、この場合も殆ど変化がなかった。この点について従来の文献を調べてみると、ARAI and WATANABE<sup>(43)</sup>も同様な結果を得ていることから、トロポミオシンは、少なくともこの反応系においては超沈殿に対して殆ど影響をもたないものと考えられる。

つぎに、このトロポミオシンにトロポニンを、文献値に基づき、筋原線維に存在する割合となるように混合した場合について検討した。この両者の混合物を文献値に示された割合になるようにF-アクチンに混合すると、いわゆる細いフィラメントが形成されるわけであるが、このようにF-アクチンにトロポミオシンとトロポニンを加えると、F-アクチンにトロポミオシンだけを加えた場合よりも、超沈殿の生成は幾分抑制されてくる。さらにこのトロポミオシンとトロポニンの添加量を2倍、3倍と増加させて加えると、この抑制作用はますます強められてくることが認められた。

この事実は、細いフィラメントにおいては、Ca<sup>2+</sup>がアロステリックエフェクターとしてまずトロポニンに作用し、トロポミオシンを媒体としてF-アクチンへ構造変化をもたらし、その結果、太いフィラメントとの相互作用の促進を促す結果超沈殿が起こると考えられているから、超沈殿を促進するためにトロポミオシンだけを加えても効果のないのは当然であろうし、また、トロポニンの添加量を増加すれば、そのアロステリックエフェクターとして必要なCa<sup>2+</sup>量をも増加させなければ超沈殿の生成を促進する効果が現れないであろうことが推察できるが、この実験の場合、反応系には特にCa<sup>2+</sup>を添加していないので、結局Ca<sup>2+</sup>が不足した状態となり、その結果として超沈殿の生成が抑制されたのであろうと思われる。

### (b) 6S $\alpha$ -アクチニンの影響

6Sが合成AMの超沈殿に対し顕著な増強性を有することはすでに述べたが(第3章, (2), (a)), 6Sは筋

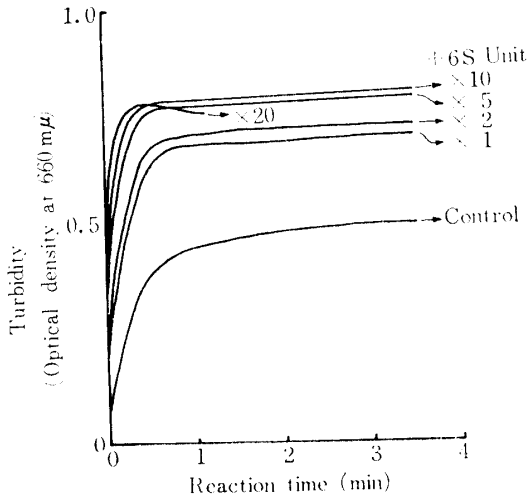


Fig. 7-4. Effect of the amount of 6 S  $\alpha$ -actinin (6S) added on the superprecipitation of F-actin and thick filament system at 25°C.

Final concn. : 0.075mg/ml F-actin, 0.3mg/ml thick filament, 1mM ATP, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 M KCl, 20mM Tris-acetate buffer (pH 7.0).

6 S  $\alpha$ -actinin (6S) was added as indicated, where 1 unit corresponding to 0.0075mg/ml 6S, which is considered as an approximate amount of 6S naturally existing in myofibrils.

肉の死後変化の過程で、Z線から遊離し、拡散してくるものであると仮定すれば、細いフィラメントの一部について考慮するならば、6SとF-アクチンが、かなり幅のひろい量比で互に作用する可能性がある。そこで全く6Sを含まないF-アクチンと太いフィラメントの

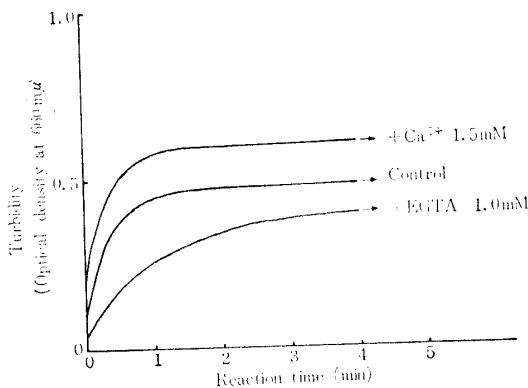


Fig. 7-5. Effects of Ca<sup>2+</sup> and EGTA on the superprecipitation of F-actin and thick filament system at 25°C.

Final concn. : 0.075mg/ml F-actin, 0.3mg/ml thick filament, 1mM ATP, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 M KCl, 20mM Tris-acetate buffer (pH 7.0).

CaCl<sub>2</sub> or EGTA was added as indicated before thick filament was added to the reaction mixture.

混合系を対照とし、これに6Sを、文献値に基づき筋原線維内の分布量である、F-アクチンの1/10量を1単位として、この20倍量まで添加して実験を行なった。得られた結果は第7-4図に示した通りで、6Sの添加量が上昇するにつれて超沈殿を示す濁度曲線も上昇した。この濁度曲線の上昇度は、文献値による6S量の約10倍でほぼその最上限に達するが、同時に、6S添加量が増加するにつれて超沈殿の起こる速度も大となる傾向が認められる。

#### (c) Ca<sup>2+</sup> および EGTA の影響

G-アクチンには、その固有の成分としてATPと共にCa<sup>2+</sup>が6×10<sup>4</sup>g当り1モルの割合で含まれており<sup>(58)</sup>、このCa<sup>2+</sup>はG-アクチンの失活変性と深い関係をもっていることが知られている。また、トロポニン、トロポミオンを含むF-アクチンフィラメント、すなわち、細いフィラメントは、Ca<sup>2+</sup>によって大きな影響を受けることが知られている。そこで、ここではF-アクチンと太いフィラメントの混合系の超沈殿に対するCa<sup>2+</sup>の影響を調査し、その結果を第7-5図に示した。その結果によると、対照に対し、1.5mM CaCl<sub>2</sub>を加えた場合は、濁度が約20%程度増加したが、一方、EGTAを1mM加えると、約20%程度減少した。この濁度増減の程度は、後述の細いフィラメントに対するCa<sup>2+</sup>およびEGTAの効果に比較すると少ないものであったが、Ca<sup>2+</sup>濃度が明らかに影響することが認められた。

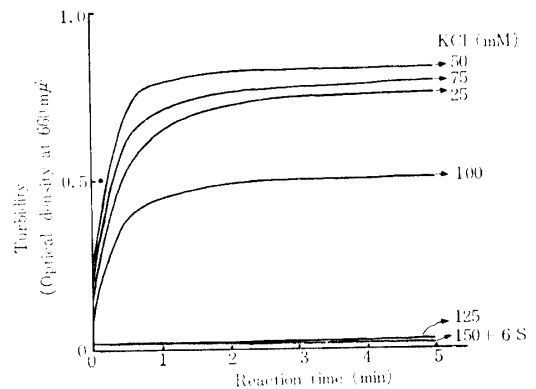


Fig. 7-6. Effect of KCl concentration on the superprecipitation of F-actin and thick filament system at 25°C.

Final concn. : 0.075mg/ml F-actin, 0.3mg/ml thick filament, 1mM ATP, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 0.015 mg/ml 6 S  $\alpha$ -actinin (6S), 20mM Tris-acetate buffer (pH 7.0).

KCl was added as indicated before thick filament was added to the reaction mixture.

## (d) 塩濃度の影響

第4章において、6SとF-アクチンとの相互作用には、塩濃度の影響が強くあらわれることを述べておいたが、SERAYDARIAN et al.<sup>(24)</sup>により合成AMの超沈殿においても、塩濃度により比較的大きな影響をうけることが報告されている。そこで本研究においては、F-アクチンと太いフィラメントの混合系の超沈殿に及ぼす塩濃度の影響について検討した。その結果は第7—6図に示した通りである。すなわち、本実験の条件下では、0.05M KCl程度の濃度で、超沈殿を示す濁度は最高値を示し、これより高い濃度でも低い濃度でも、その濁度は低下することが観察された。

また、いわゆる生理的塩濃度といわれる0.1M KCl程度の濃度条件では、本実験の結果によると、濁度が、最高値を示す0.05M KCl濃度の場合の約60%程度の値を示し、さらに0.15M KCl濃度ではほぼ完全に超沈殿の反応は抑制されてしまうようであった。以上のような傾向は既報の合成アクトミオシンに関する結果と<sup>(24)</sup>ほぼ一致している。

つぎに、0.15M KClを加え、超沈殿の完全に抑制された系に、6Sを文献値の2倍量加えてみたが、超

沈殿反応は全く起こらなかった。

以上の結果より、F-アクチンと太いフィラメントの混合系の超沈殿も塩濃度に対して敏感であり、0.15M KCl以上の塩濃度では、超沈殿が起らないばかりでなく、6Sの超沈殿増強効果も発現しないことが観察された。

## (e) pHの影響

筋肉の死後変化の特徴の一つである。pHの変化がF-アクチンと太いフィラメントの混合系の超沈殿に及ぼす影響を調査し、得られた結果を第7—7図に示した。図より明らかな通り、pHの低下と共に超沈殿生成が抑制される傾向が認められた。

(3) 細いフィラメントと太いフィラメントによる超沈殿に及ぼす6S $\alpha$ -アクチニンの影響

前項までに、主としてF-アクチンと太いフィラメントの混合系の超沈殿に対するトロポミオシン、トロポニンと、Ca<sup>2+</sup>、KCl濃度、pH、および6Sなどの影響について種々検討した結果について述べてきた。しかし、トロポニン-トロポミオシン-F-アクチン系、すなわち、細いフィラメントと太いフィラメントとによる超沈殿に対して、6Sがどのような影響を及ぼすかについては、これまでのところ、まだ詳しい研究報告が殆ど見当たらないように思われる。

そこで、この点を明らかにしてゆく手がかりを求めするため、つぎのような実験を実施して種々検討することとした。

(a) 細いフィラメントと太いフィラメントによる超沈殿に対する6S $\alpha$ -アクチニンの効果

上述のように、細いフィラメントと太いフィラメントの超沈殿に対する6Sの効果を検討するため、まず、6Sを文献値量(筋原線維全タンパク質の2%、F-アクチンの1/10)加えて、実験した結果を第7—8図に示した。図より明らかな通り、6Sを加えない対照より超沈殿の起こり方はやや遅れるが、超沈殿の生成はわずかながら増強されることが認められた。

すでにしばしば述べておいたように細いフィラメントにはCa<sup>2+</sup>がアロステリックエフェクターとして有効なことが知られているので、1mM CaCl<sub>2</sub>を、細いフィラメントに加えてから超沈殿を起こさせると、図中にみられるように、Ca<sup>2+</sup>量の増加のみでもかなりの超沈殿の増強がみられる。つぎに細いフィラメントに1mM CaCl<sub>2</sub>を加えて混合後、さらに6Sを文献値の5倍量添加してから超沈殿を起こさせると、Ca<sup>2+</sup>のみの増強効果よりも、さらに著しい増

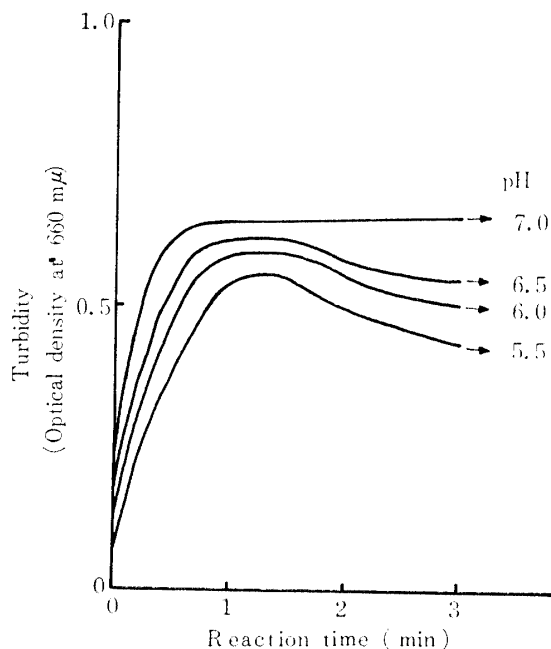


Fig. 7-7. Effect of pH on the superprecipitation of F-actin and thick filament system at 25°C.

Final concn. : 0.075mg/ml F-actin, 0.3mg/ml thick filament, 1mM ATP, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 M KCl,

pH was adjusted with 20mM Tris-acetate buffer as indicated,

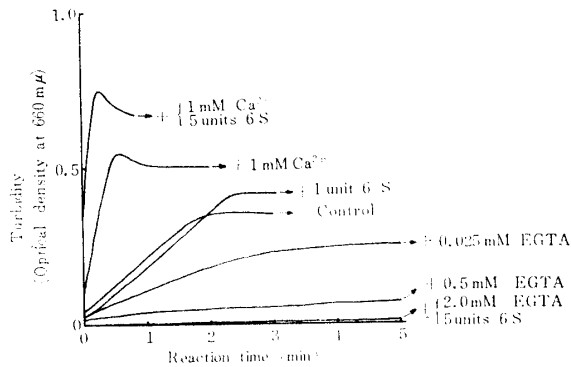


Fig. 7-8. Effects of  $\text{Ca}^{2+}$ , EGTA and 6S  $\alpha$ -actinin on the superprecipitation of thin filament and thick filament system at  $25^\circ\text{C}$ .

Final concn. : 0.075mg/ml F-actin, 0.015mg/ml tropomyosin, 0.009mg/ml troponin, 0.3mg/ml thick filament, 1mM ATP, 1mM  $\text{MgCl}_2$ .

$\text{CaCl}_2$ , EGTA and 6S  $\alpha$ -actinin (6S) were added as indicated, where 1 unit 6S is quite the same amount of 6S as described in Fig. 7-4.

強効果が現われてくることが認められた。

以上の結果から、6Sは細いフィラメントと太いフィラメントの混合系に対しても明らかに超沈殿増強能を有することが認められたが、この場合6Sは、 $\text{Ca}^{2+}$ が十分に存在する場合にのみ増強効果があるのか、 $\text{Ca}^{2+}$ が皆無の場合でも増強効果があるのか、正確なことが不明であるので、 $\text{Ca}^{2+}$ の選択的キレート剤であるEGTAを2mMまで加えて、 $\text{Ca}^{2+}$ による増強効果を皆無にした状態で6Sを文献値の5倍量まで添加してみたが、全く超沈殿の増強は認められなかった。

以上の結果を総合してみると、6Sは細いフィラメントと太いフィラメントによる超沈殿に対しては、細いフィラメントのアロステリックエフェクターである $\text{Ca}^{2+}$ が存在するときは増強効果を発現し得るが、 $\text{Ca}^{2+}$ が皆無の場合には、このような増強効果を発現出来ないことがわかる。最初の実験で、 $\text{Ca}^{2+}$ を特に添加していない系でも6Sによる増強効果がわずかながら認められたのは、反応系中に、主として供試タンパク質に由来すると思われる微量の $\text{Ca}^{2+}$ が混在していたために現われた現象であろうと思われる。

本実験で得られた結果に基づき、筋肉の死後変化について考察してみると、まず、動物の死後、筋肉では、その死後変化に伴い、筋小胞体から $\text{Ca}^{2+}$ の放出の起こる<sup>(18,70,71,72)</sup>ことが知られてきたので、この放出された $\text{Ca}^{2+}$ が種々の役割を果しているものと思われる。

すなわち、BUSCH<sup>(17)</sup>によれば、1mM程度の $\text{CaCl}_2$ 溶液でと殺直後の筋肉切片を処理すると、筋原線維中

のZ線に局在する物質は死後9時間以内に溶出されてしまうと報告しているし、また筋小胞体から死後放出された $\text{Ca}^{2+}$ は、細いフィラメントに対してアロステリックエフェクターとして作用することも知られてきたので、死後筋小胞体から放出された $\text{Ca}^{2+}$ が細いフィラメントにアロステリック効果を惹き起こすものと思われる。このような状態になっているとき、6SがZ線から溶出拡散してA帯の部分に到達すると、超沈殿が惹き起こされるようになり、その結果いわゆる死後硬直が開始するという、一連の考え方が可能となるように思われる。

また、肉の硬軟が現われる原因は、おそらく肉によって、この6SがZ線の部分から遊離拡散する状態が種々異なること、ならびに、肉によって、超沈殿に關与する種々の環境因子の条件が、それぞれ異なること、などの、複雑な要因により影響をうけるためであろうと考えられる。

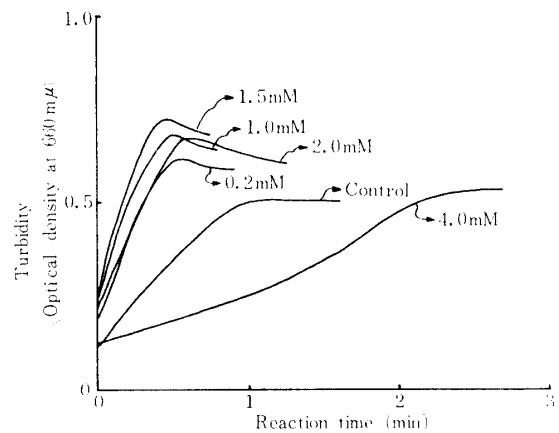


Fig. 7-9. Effect of  $\text{Ca}^{2+}$  concentration on the superprecipitation of thin filament and thick filament system at  $25^\circ\text{C}$ .

Final concn. : Concentrations of proteins were quite the same as those described in Fig. 7-8,  $\text{CaCl}_2$  was added as indicated.

#### (b) 細いフィラメントと太いフィラメントによる超沈殿に及ぼす $\text{Ca}^{2+}$ 濃度の影響

上述の実験結果から、 $\text{Ca}^{2+}$ により超沈殿が増強されることが認められたので、この $\text{Ca}^{2+}$ 濃度が超沈殿に及ぼす効果を検討した。得られた結果は第7—9図に示した通りである。図より明らかな通り、超沈殿を最強ならしめる $\text{Ca}^{2+}$ 濃度は1.5mMであり、それより濃度が高くても低くても、 $\text{Ca}^{2+}$ の効果は低下することが認められた。



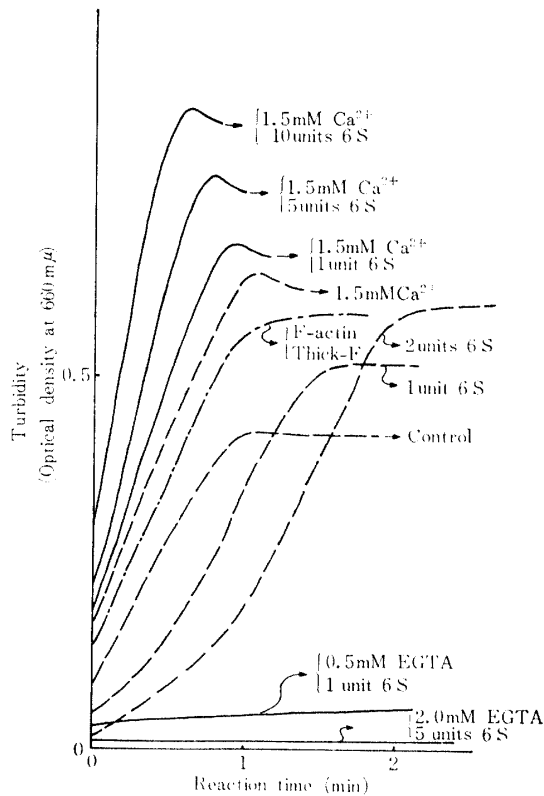


Fig. 7-10. Effects of  $\text{Ca}^{2+}$  and 6 S  $\alpha$ -actinin on the superprecipitation of thin filament and thick filament system at 25°C.

Concentrations of proteins and reagents other than  $\text{Ca}^{2+}$  and 6 S  $\alpha$ -actinin (6S) were quite the same as those described in Fig. 7-8,  $\text{Ca}^{2+}$  and 6 S were added as indicated.

(c) 細いフィラメントと太いフィラメントに及ぼす 6S  $\alpha$ -アクチニン量の影響

以上の実験結果から、細いフィラメントが  $\text{Ca}^{2+}$  によってアロステリック効果をうけると、6S によって超沈殿強度がさらに増強されることが認められたが、この点をより詳細に検討したいと考え、前述の実験結果より見出された、最高の効果を示す  $\text{Ca}^{2+}$  濃度 (添加量として 1.5mM) における 6S の作用効果を、文献値の 10 倍量まで添加して検討し、その結果を第 7-10 図に示した。

図より明らかな通り、6S の効果は、この系においては、濁度の上昇程度ならびに上昇速度が、本実験に使用した 6S 量の範囲では、6S を加える量が多い程、いずれも大となる傾向が認められた。

なお、2mM EGTA を添加すると、6S を添加しても全く超沈殿は起こらず、従って増強効果も見出されなかった。

以上の結果を総合して考えるとき、アロステリック

効果をうけた細いフィラメントと太いフィラメントによる超沈殿におよぼす 6S の量的関係は、その作用量が多ければ多い程、超沈殿が増強される傾向が見出された。

(d) 細いフィラメントと太いフィラメントによる超沈殿に及ぼす pH の影響

これまでの実験結果から、細いフィラメント構成タンパク質の生物学的活性は、pH によってそれぞれに種々の影響をうけることが見出された。従って、細いフィラメントと太いフィラメントによる超沈殿の場合も、pH により、何らかの影響をうけることが推測されるので、その点について検討を加え、得られた結果を第 7-11 図に示した。

まず細いフィラメントと太いフィラメントのみの混合系の超沈殿の場合は、pH 7.0 ~ 5.5 の範囲で、pH が低下するにつれて、その超沈殿は増強される傾向がみられた。この点は第 6 章において検討した細いフィラメントの粘度が pH の低下と共に増大する傾向があったが、この傾向と一致していた。

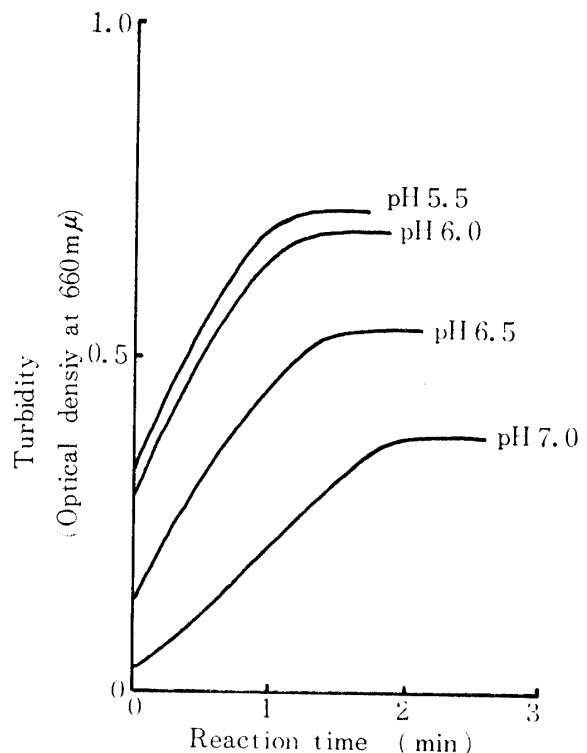


Fig. 7-11. Effect of pH on the superprecipitation of thin filament and thick filament system at 25°C.

Reaction system was quite the same as described in Fig. 7-8, except that pH was adjusted with 20 mM Tris-acetate buffer as indicated before thick filament had been added.

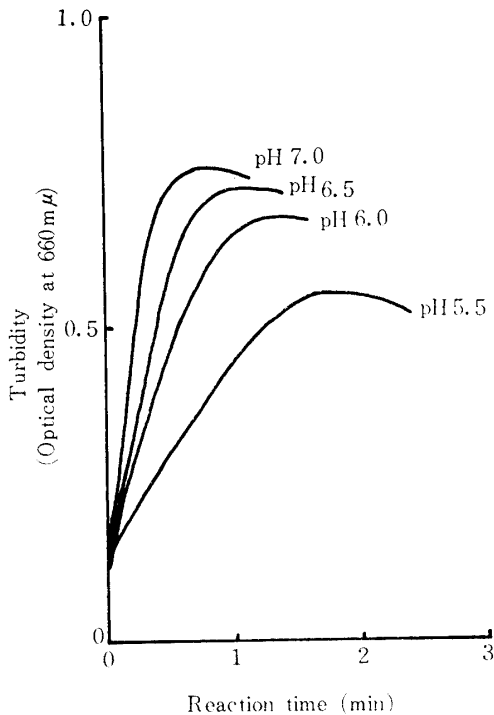


Fig. 7-12. Effect of pH on the superprecipitation of thin filament and thick filament system at 25°C in the presence of  $\text{Ca}^{2+}$  and 6 S  $\alpha$ -actinin.

Reaction system was quite the same as described in Fig. 7-11, except that 1mM  $\text{CaCl}_2$  and 1 unit 6 S  $\alpha$ -actinin (0.0075mg/ml) was added before thick filament had been added to the reaction mixture.

これに対し、1mM  $\text{Ca}^{2+}$ の添加によってアロステリック効果をうけた細いフィラメントと太いフィラメントの混合系に6Sを文献値だけ加えたものについて検討した結果を第7-12図に示したが、図より明らかな通り、逆の経過をたどり、pHの低下に伴って超沈殿が抑制される傾向がみられた。

このように  $\text{Ca}^{2+}$  および 6S の添加の有無によって全く逆の傾向をたどることは興味深い現象で、今後の研究により、その理由の解明が望まれる問題の一つであろう。

(e) 細いフィラメントと太いフィラメントから得られたアクトミオシンの ATP ase 活性に及ぼす  $\text{Ca}^{2+}$  および 6S  $\alpha$ -アクチニンの影響

$\alpha$ -アクチニンは AM の超沈殿を増強するばかりでなく、形成された AM の ATP ase の活性をも高める<sup>(24)</sup>ことが知られているので、この点についても一応検討した。

得られた結果は第7-1表に示した。表より明らかな通り、細いフィラメントと太いフィラメントから得られた AM の ATP ase 活性は、 $\text{Ca}^{2+}$  の添加、それにさらに 6S の添加を行えば、それぞれ段階的にその活性が高まることが明らかに認められる。

(f) 細いフィラメントと太いフィラメントによる超沈殿の電子顕微鏡による観察

細いフィラメントと太いフィラメントの混合系に  $\text{Ca}^{2+}$  を加えた系と、これにさらに 6S を加えた系の超沈殿には、明らかに強度、速度の点に相異がみられ、さらに形態的な相異を検討するため、電子顕微鏡による比較を行なった。

本実験では超沈殿初期の状態をとらえて鏡検し、得られた写真は Plate XIII, Plate XIV に示した。Plate XIII には  $\text{Ca}^{2+}$  のみを添加した場合の超沈殿像を、Plate XIV には  $\text{Ca}^{2+}$  と共に 6S を文献値の 5 倍量添加した場合の超沈殿像を示した。

両者の写真を比較するとかなり顕著な差異が認められる。すなわち、まず低倍率写真について比較すると、 $\text{Ca}^{2+}$  と共に 6S を添加した場合は、凝集体から伸びているヒゲ状の線維が非常に細く長く、かつ濃密であるのに対し、 $\text{Ca}^{2+}$  のみを添加した方は、割合に太く

Table 7-1. Effects of  $\text{Ca}^{2+}$  and 6 S  $\alpha$ -actinin on the actomyosin ATPase activity of the superprecipitate from thin filament and thick filament system

	Reaction condition		
	none	with $\text{Ca}^{2+}$	with 6 S $\alpha$ -actinin
Actomyosin ATPase activity	0.59	1.68	2.22

Concentrations in reaction mixture: 0.03mg/ml F-actin, 0.06 mg/ml tropomyosin, 0.036 mg/ml troponin, 0.12 mg/ml thick filament, 1mM ATP, 1mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.1 M KCl, 20 mM Tris-acetate buffer (pH7.0).

$\text{CaCl}_2$  and 6 S  $\alpha$ -actinin were added to the reaction mixture to give a final concentration of 1mM and 0.024mg/ml, respectively, before thick filament had been added.

短い、一見針状結晶のような線維が、比較的希薄に存在しているように見える特徴がある。

さらに高倍率写真について見ると、Ca<sup>2+</sup>と6Sを共に添加した場合の超沈殿像は、やはり極めて細く長い線維から成立っており、しかもそれらが粘着性をもって互いからみ合っているような様相を呈しているが、Ca<sup>2+</sup>のみを添加した場合の超沈殿像は、太く短い線維が比較的個立して分散したように存在している点が明瞭に認められる。

このように、Ca<sup>2+</sup>のみを添加した場合よりも、Ca<sup>2+</sup>と共に6Sを添加した場合の方が、超沈殿像が明らかに、より緻密な感じの形態を示し、かつその分布密度も明らかに大となっており、6Sの添加による超沈殿の増強効果が形態上からも観察することが出来た。

つぎに、上記のような差異が生ずる原因について従来の報告を参照して考察すると、つぎのような点が推察される。

まず、Ca<sup>2+</sup>のみを添加した場合、太く短い線維が形成される点については、KAWAMURA and MARUYAMA<sup>(67)</sup>によると、MフィラメントはATPの存在下でF-アクチン線維と共存した場合、F-アクチン線維を一定の長さに切りそろえる性質をもっていると報告されているので、Ca<sup>2+</sup>のみが加えられた系では、超沈殿の初期の段階で細いフィラメントは一旦ある長さに切られて短くなり、その後Mフィラメントと側面会合するために、このような結果となるのではないかと考えられる。これに対して、Ca<sup>2+</sup>と6Sが共に添加された系では、Ca<sup>2+</sup>によるアロステリック効果をうけた細いフィラメントには、第5章でのべたように、6Sが結合するようであるが、その結果として、超沈殿

の初期段階での上記のような切断が起らなくなり、そのままの状態Mフィラメントと側面会合し、いわゆる超沈殿を起すため、細く長い、ヒゲ状の線維の集合体となるのではないかと考えられる。

一方、ミオシンBの超沈殿像<sup>(27,73)</sup>についてはすでに報告があるが、それらによると、超沈殿の初期段階では、Mフィラメントに沿って細いフィラメントが配列し、側面会合しているが、より進行した段階になると、大きな塊となり、その塊から多くの細長いヒゲ状の線維が出ているような状態になるとのべられている。

このミオシンBについての観察結果は、本実験で観察したCa<sup>2+</sup>と6Sを共に添加した場合の細いフィラメントと太いフィラメントによる超沈殿像の示す傾向と類似しているように思われる。最近、ARAKAWA et al.<sup>(74)</sup>によれば、ミオシンB中には $\alpha$ -アクチニンが含まれていると報告されており、これは本実験において導かれたところの、Ca<sup>2+</sup>と6Sを含む系の超沈殿ゲルは、ミオシンBの超沈殿ゲルとほぼ同様なものではないかという推定を裏付けているものと思われる。

さらに、従来、生筋における筋収縮は、筋肉組織内での、細いフィラメントと太いフィラメントとの、Ca<sup>2+</sup>のみの関与した相互作用にもとづく超沈殿に相当するものと考えられているが、死後硬直時に形成されるミオシンBの超沈殿は、Ca<sup>2+</sup>と6Sとが共に関与した相互作用にもとづく超沈殿と推定され、両者の超沈殿像の間には形態的にかかなりの差異があることが推定されることは興味深い。

(g) 細いフィラメントと太いフィラメントから形成される超沈殿ゲル容積に及ぼす6S $\alpha$ -アクチ

Table 7-2. Gel volume of superprecipitate from thin filament and thick filament system

Composition of reaction mixture	Gel volume of superprecipitate obtained by centrifugation at 1,500 rpm for 2min at room temperature
Thin filament and thick filament(I)	0.4(ml)
(I) + 1mM EGTA	0
(I) + 1mM CaCl <sub>2</sub>	0.6
(I) + $\left\{ \begin{array}{l} 1mM CaCl_2 \\ 6S\alpha\text{-actinin} \\ (10 \text{ units}) \end{array} \right.$	0.9

Concentration in reaction mixture : 3mg/10 ml F-actin, 0.36mg/10 ml troponin, 0.60mg/10 ml tropomyosin, 12 mg/10 ml thick filament, 0.1 M KCl, 20mM Tris-acetate buffer (pH 7.0), 1mM ATP, 1 mM MgCl<sub>2</sub>.

EGTA, CaCl<sub>2</sub> and 6 S  $\alpha$ -actinin were added as indicated.

Gel volume of superprecipitate was estimated by centrifugation after being kept at 25°C for 30 minutes.

## ニンの影響

## (i) ゲル容積

細いフィラメントと太いフィラメントから形成される超沈殿は、ゲルの状態で得られるので、この生成した超沈殿のゲルの量を BRISKEY et al. (69) の方法に従い、遠心分離法によって得られるゲル容積を測定して求めた。その結果は第7—2表に示した通りである。

この結果はほぼ濁度法により測定した結果と同じような傾向を示し、 $Ca^{2+}$ 、6Sの効果もゲル容積の大小で示し得るものと思われる。

## (ii) 加熱ゲル容積

このようにして得られたゲルは、加熱した場合、容積に変化を生じないか否かを検討するため、上に述べた遠心分離法により、得られたゲルの沈殿のみを残して上澄液をすて去り、代りに0.1M KCl, 20mM トリス—酢酸緩衝液 (pH 7.0) を5ml 加え、管口をビニール布で密封し、75°C, 1時間加熱してから流水で30分間冷却後、細いガラス棒を用いて沈殿の凝固体をよく砕いてから、1,500rpm で2分間遠沈して、沈殿物の容積を測定した。

その結果得られた数値は殆ど加熱前のゲル容積と変らなかった。

以上の実験結果を総合すると、細いフィラメントと太いフィラメントから形成される超沈殿のゲルは、その構造が緻密であって、加熱処理を施しても殆ど収縮しないため、加熱後も加熱前のゲル容積と殆ど変化がない。そして、このような性状を示す超沈殿の形成が促進される程、肉は硬くなるものではないかと考えられる。6Sは、このような性状を示す超沈殿の形成を促進する効果があるので、この6Sがその局在位置から死後、遊離して筋原線維内に拡散してゆく状態により、上記のような性状を示す超沈殿の生成量が異なってくるが、肉によって、その硬さが異なる一因をなすものではないかと考える。

## 3. 要 約

本章においては、細いフィラメントと太いフィラメント間の相互作用として超沈殿現象をとらえ、これに対する6Sの効果について追究した。

そこでまず、F-アクチンと太いフィラメントとの相互作用として起こる超沈殿に及ぼす、種々の因子の影響を調査した。得られた結果の要点はつぎの通りである。

1) まず、予め6Sを作用させて凝集したF-アクチンと太いフィラメントとにより超沈殿が起こるか否か

を調査したところ、明らかに超沈殿の起こることが認められた。

2) トロポミオシンは6SとF-アクチンの相互作用を阻害するが、F-アクチンと太いフィラメントによる超沈殿は阻害しないことが認められた。

3) トロポニン—トロポミオシン複合体は、F-アクチンと太いフィラメントによる超沈殿を抑制する。これは既報の知見と一致している。

4) 6Sは、F-アクチンと太いフィラメントによる超沈殿を明らかに増強する効果が認められた。

5)  $Ca^{2+}$  濃度のこの系の超沈殿に及ぼす影響は、比較的小さかった。

6) 塩濃度は、この系の超沈殿に対しては、0.05M KClが至適で、これより塩濃度が高くて低くても抑制されることが認められた。

7) pHを7.0から5.5まで低下させると、pHが低くなる程、この系の超沈殿を弱くではあるが抑制した。

つぎに細いフィラメントと太いフィラメントによる超沈殿に及ぼす6Sの影響を検討した。得られた結果はつぎの通りである。

1) 細いフィラメントと太いフィラメントによる超沈殿は、 $Ca^{2+}$ が存在するときのみ、6Sによって増強された。これは細いフィラメントが $Ca^{2+}$ のアロステリック効果により、構造変化をうけている場合にのみ、6Sの超沈殿増強効果が発現され得ることを意味するものと思われる。

2) 細いフィラメントと太いフィラメントによる超沈殿の発現が $Ca^{2+}$ のみで最大となるのは、 $Ca^{2+}$ の添加濃度が1.5mMの場合であった。

3) 細いフィラメントと太いフィラメントによる超沈殿に及ぼす、6Sの量的関係を知るため、1.5mMの $Ca^{2+}$ を加えた系に、6Sを文献値の10倍量まで加えて実験してみたところ、この実験条件下では、6Sの添加量が多い程、超沈殿に対する増強効果が大きかった。

4) 細いフィラメントと太いフィラメントによる超沈殿に及ぼすpHの影響を検したところ、 $Ca^{2+}$ と6Sを加えた系では、pHを7.0から5.5へ低下させるにつれて、超沈殿の生成程度と速度が低下したが、 $Ca^{2+}$ と6Sを、いずれも全く加えなかった系では、これと逆の傾向を示した。

5) 細いフィラメントと太いフィラメントから形成される超沈殿のAM ATPase活性を測定したところ、その活性は $Ca^{2+}$ と6Sを加えた場合が最高で、 $Ca^{2+}$

のみを加えた場合がこれにつき、Ca<sup>2+</sup>と6Sを、ともに全く加えなかった場合が最低であった。

6) 細いフィラメントと太いフィラメントの混合系にCa<sup>2+</sup>のみを加えた場合に生成する超沈殿と、Ca<sup>2+</sup>と共に6Sを加えた場合に生成する超沈殿を、電子顕微鏡により比較観察したところ、6Sの添加により、超沈殿は、より緻密な感じの形態を示すようになり、かつその分布密度も大となる傾向を示すことが認められた。

7) 細いフィラメントと太いフィラメントから形成された超沈殿ゲルの容積を遠心分離法によって測定したところ、Ca<sup>2+</sup>のみを加えた場合よりも、これにさらに6Sを加えた場合の方がゲル容積は大であった。

さらに、得られたゲルを加熱して、その容積の変化を調査したが、殆ど変化が認められなかったので、この超沈殿ゲルの構造は緻密なものであらうと推定された。

以上の結果から6Sは、上記のような性状を示す超沈殿の生成を促進する効果があり、また、このような性状を示す超沈殿の生成量が多い程、肉は硬くなるのではないかと考えられるので、このような関連性において、6Sは肉の硬さに関与する一因をなすものではないかと考えられる。

## 総 括

筋タンパク質に関する研究は、従来主として筋生理学に関する分野から進められ、筋収縮弛緩機構がかなり詳しく説明されつつある。その研究の過程において、新たに種々の調節性タンパク質が見出されてきたが、その一つが本研究でとり上げた6S $\alpha$ -アクチニンである。このタンパク質は、生筋中ではZ線に局在していると考えられているが、おそらく死後局在しているZ線の部分から遊離し、筋組織内に拡散して、他の筋タンパク質およびその他の筋組織中の成分などと相互作用し得るようになるのではないかと考えられる。この6S $\alpha$ -アクチニンの、現在知られている特性の一つは、F-アクチンに結合し、F-アクチンの側面会合を促進して凝集体を生ぜしめる性質であるが、この特性は、細いフィラメント中に常成分として存在するトロポミオシンによって阻害されることが知られている。

著者は、生筋中における6S $\alpha$ -アクチニンの機能に関する従来知見を基礎にして、特に食品科学的見地から、動物の筋タンパク質の死後変化との関連におい

て、この6S $\alpha$ -アクチニンの、食用に利用される肉の品質、特に肉の硬さに及ぼす影響を解明しようと考え、つぎのような研究を行なった。

食品科学的見地からみると、豚肉は最も重要な肉資源の一つであるが、豚の骨格筋の6S $\alpha$ -アクチニンについては、まだ殆ど検討されていないように思われるので、まず豚の骨格筋から6S $\alpha$ -アクチニン、アクチン、ミオシン、トロポミオシン、トロポニン、筋小胞体ATPaseを分離精製し、それぞれの性状を検討し、これらを実験試料として、6S $\alpha$ -アクチニンの特性である、F-アクチン凝集作用に対する、死後の筋肉内の環境因子の影響と、細いフィラメントに対する作用効果を調査し、これらの結果に基づいて、さらに細いフィラメントと太いフィラメントとの間の相互作用としての超沈殿に及ぼす影響について検討した。得られた結果は概要つぎの通りである。

1. 豚の6S $\alpha$ -アクチニンを、抽出分離はMASAKI and TAKAITI<sup>(12)</sup>の方法、精製はNONOMURA<sup>(14)</sup>の方法によって調製したが、得られた6S $\alpha$ -アクチニンの性状を超遠心分析、アミノ酸分析などにより調査したところ、既報の兎、鶏の6S $\alpha$ -アクチニンと、その性状がほぼ類似しており、また高純度であり、このタンパク質特有の活性も具備しているようであった。

2. 6S $\alpha$ -アクチニンとF-アクチンの相互作用に及ぼす、死後の筋肉内での環境因子について検討したところ、つぎのような点が明らかになった。この相互作用の環境至適塩濃度は、KClで0.1M付近であった。ATPおよび各種無機リン酸塩をそれぞれ10mMの濃度で、中性の条件で作用させると、6S $\alpha$ -アクチニンとF-アクチンの比が1:4のとき、ATPでは完全に抑制され、トリポリリン酸塩では、ATPの約50%程度の抑制効果が認められたが、オルトリン酸塩とピロリン酸塩の影響は微弱であった。

ATPによる抑制効果は、その濃度が8mM以下で弱まり、漸次反応が起こってくるが、この濃度は生体内濃度に近く、興味深い結果である。2価金属イオンについては、Ca<sup>2+</sup>は殆ど影響しないが、Mg<sup>2+</sup>は反応を促進する効果があることを示した。pHについては、死後変化域であるpH7.0~5.5の範囲で、pHが低下するにつれて反応が促進される傾向がみられた。トロポミオシンは、微量でも反応を顕著に抑制した。また温度については、38°~10°Cの範囲で検討したところ、温度が低下するにつれて反応が促進される傾向がみられた。

3. ATPの反応抑制効果は、他の因子に比べて、

特に顕著であるので、動物の筋組織中に生成するとみられる、各種ヌクレオチドについて、その影響を検討したところ、この反応抑制効果は、10mMの濃度で作用させた場合、ATP > IMP > AMP > ADP という順序で大きいことがわかった。このうち、IMPは、ATPの抑制効果の約50%程度の抑制効果を示し、比較的顕著であったが、他は微弱であった。

つぎにATPの反応抑制機構について検討した結果、ATPは6S  $\alpha$ -アクチンとは反応しないように思われ、F-アクチンには結合するようであるが、この場合、0.1M KClの存在下にあるので、高濃度のATPの存在によってもF-アクチンは容易に脱重合してG-アクチンに変換することはない。しかし、その線維の中には、ところどころで切断されて、短かくなっているものも存在することが観察された。これは本研究で使用了F-アクチンに含まれる $\beta$ -アクチニンの効果のためであろうと考えられた。ATPとF-アクチンとの結合は、ATPの環境濃度によって支配され、高濃度環境ほど多量のATPがF-アクチンに結合するようであるが、結合量の経時的变化は認められなかった。さらにF-アクチンへのATPの結合と、6S  $\alpha$ -アクチンとの結合は、互いに競合するものようであるが、これに対し、トロポミオシンのF-アクチンへの結合は、ATPの結合とは競合しないようであった。

このことから、生筋中では、ATPが細いフィラメントに結合して存在している可能性が考えられ、死後におけるATPの環境濃度が低下すると、6S  $\alpha$ -アクチンとの相互作用が起り易い状態となるものと考えられる。この点は筋小胞体ATPaseを用い、実際に10mM ATPによって反応が抑制されていた系のATP濃度を低下させた実験の結果、ATP濃度がほぼ8mM以下となると、反応が急速に起こってくることから、その可能性が推察された。

4. 細いフィラメント(トロポニン、トロポミオシン、F-アクチンの複合体)に対する6S  $\alpha$ -アクチニンの作用を検討したところ、細いフィラメントにはpHを低下させると粘度が上昇する傾向があるが、6S  $\alpha$ -アクチニンは、 $Ca^{2+}$ と共存する場合、この粘度上昇をさらに増強する効果のあることが認められた。これは細いフィラメントに $Ca^{2+}$ によるアロステリック効果が現れたことを示すものと考えられ、この効果が現れると、細いフィラメントは6S  $\alpha$ -アクチンによって、その粘度をpHの低下と共に増強されるようになるという特性があることは注目し値する。しかし、6S  $\alpha$ -アクチニンは、F-アクチンを凝集させるのと同じ

ように細いフィラメントを凝集させる効果は示さなかった。電子顕微鏡で観察すると、おそらく6S  $\alpha$ -アクチンであろうと思われる丸い粒子状のものが、細いフィラメントの表面全般にわたり、付着しているように思われた。

5. 超沈殿現象を細いフィラメントと太いフィラメントとの相互作用という形でとらえ、6S  $\alpha$ -アクチニンの、この作用に対する影響を追究した。

まず、F-アクチンと太いフィラメントの混合系の超沈殿に及ぼす諸因子の影響を検討したところ、この系の超沈殿には、トロポミオンは何ら影響を与えなかったが、トロポニン-トロポミオン複合体は、この系の超沈殿を抑制した。6S  $\alpha$ -アクチニンは、この系の超沈殿を増強するが、その増強効果は、6S  $\alpha$ -アクチンを筋原線維中の文献値量(筋原線維全タンパク質量の2%、F-アクチンの1/10量)の10倍量加えた場合が最高で、それ以上加えても、増強効果は増大しなかった。

また、この系への $Ca^{2+}$ およびEGTA添加の影響は比較的小さく、塩濃度は0.05MKClの場合が至適で、これより塩濃度が高くては低くても反応は抑制された。pHの低下は、この系の超沈殿を幾分抑制する傾向が認められた。

つぎに細いフィラメントと太いフィラメントとの相互作用による超沈殿について検討した。その結果はつぎの通りである。

細いフィラメントと太いフィラメントの混合系の超沈殿は、 $Ca^{2+}$ が作用しているときのみ、6S  $\alpha$ -アクチニンの増強効果が現れることが認められた。換言すれば、細いフィラメント中で、 $Ca^{2+}$ がトロポニンに結合したために起こる、アロステリック効果をうけている場合にのみ、6S  $\alpha$ -アクチニンの超沈殿増強効果が発現されるようであった。このことは、EGTAを反応系に加えると、超沈殿は全く起こらず、また6S  $\alpha$ -アクチンを加えても増強効果は全く現れなかったことが観察された事実からも裏付けられたと考えてよいであろう。

この系が、 $Ca^{2+}$ の添加のみで最大の超沈殿を発現するのは、 $Ca^{2+}$ 添加量が1.5mMのときであった。

つぎに $Ca^{2+}$ が1.5mM添加されたこの系に対する、6S  $\alpha$ -アクチニンの超沈殿増強効果が最大となる量を求めるため、文献値の10倍量まで添加してみたが、この実験条件下では、6Sの添加量が多い程、超沈殿の程度を調査する手段として用いた濁度の測定値が高い値を示した。

つぎにこの系の超沈殿に及ぼす pH の影響を検討したところ、この系に  $\text{Ca}^{2+}$  と 6S $\alpha$ -アクチニンとの両者共加えた場合、pH が低下すると、超沈殿の強度も低下した。これに対し、この系に  $\text{Ca}^{2+}$  も 6S も共に全く加えない場合は、pH 低下と共にむしろ超沈殿強度は上昇する傾向がみられた。

細いフィラメントと太いフィラメントから形成された超沈殿の AM-ATPase 活性を測定してみると、 $\text{Ca}^{2+}$  と 6S $\alpha$ -アクチニンを共に加えた場合の活性が最高で、 $\text{Ca}^{2+}$  のみを加えた場合がこれにつぎ、 $\text{Ca}^{2+}$  も 6S $\alpha$ -アクチニンも共に全く加えなかった場合が最低であった。

この系の超沈殿ゲルの電子顕微鏡による観察から、この系に  $\text{Ca}^{2+}$  のみを加えた場合と、これにさらに 6S $\alpha$ -アクチニンを加えた場合とでは、生成する超沈殿の形態に明らかな差が認められた。すなわち、 $\text{Ca}^{2+}$  のみを添加した場合よりも、 $\text{Ca}^{2+}$  と共に 6S $\alpha$ -アクチニンを添加した場合の方が、超沈殿の形態が、より緻密な感じの外観を示し、かつその分布密度が明らかに大であった。

超沈殿はゲル状の沈殿として得られるので、遠心分離して沈殿させた超沈殿ゲルの容積を比較したところ、なにも添加しなかった対照よりも、 $\text{Ca}^{2+}$  を添加したのも、さらにこれに 6S $\alpha$ -アクチニンを添加したものの順位で、得られた超沈殿ゲルの容積は大であった。

また、このゲル状の超沈殿を 75°C、1 時間加熱してみたが、その容積変化は殆ど認められなかったことから、この超沈殿ゲルの構造は緻密なものであろうと推察された。

そして、このような性状を示す超沈殿の生成量が多い場合程、肉は硬くなるのではなかろうかと考えられる。

従って、 $\text{Ca}^{2+}$  が存在する場合、6S $\alpha$ -アクチニンの作用する程度の差によって、上述のような性状を示す超沈殿の生成量に差を生ずることが、肉の硬さに差を生ずる一因をなすものではないかと考えられる。

本研究を遂行するに当って終始御懇篤な御指導と御鞭撻を賜った前九州大学農学部安藤則秀教授に対し、深甚な感謝の意を表す。また、超遠心分析については、九州大学農学部筒井亮毅氏に、電子顕微鏡写真撮影については、同長尾記明氏に、アミノ酸分析については、鹿児島大学農学部福永隆生講師に御援助頂いたので、ここに感謝の意を表す。

さらに、本研究全般にわたり種々御助言、御便宜を頂いた、鹿児島大学農学部小島正秋教授、九州大学農学部永田致治氏、同伊藤肇窮氏に対し厚く御礼申し上げます。

## 文 献

- 1) SZENT GYÖRGYI, A., *Chemistry of Muscular Contraction*, 2nd ed., Academic Press, New York (1951).
- 2) MARSH, B. B., *Nature*, **167**, 1065 (1951).
- 3) EBASHI, S. and F. LIPMANN, *J. Cell Biol.*, **14**, 389 (1962).
- 4) EBASHI, S. and F. EBASHI, *J. Biochem.*, **55**, 604 (1964).
- 5) EBASHI, S. and A. KODAMA, *ibid*, **60**, 733 (1966).
- 6) EBASHI, S., A. KODAMA and F. EBASHI, *ibid*, **64**, 465 (1968).
- 7) TONOMURA, Y., S. WATANABE and M. MORALES, *Biochemistry*, **8**, 2171 (1969).
- 8) EBASHI, S. and F. EBASHI, *J. Biochem.*, **58**, 7 (1965).
- 9) MARUYAMA, K., *Biochim. Biophys. Acta*, **102**, 542 (1965).
- 10) MASAKI, T., O. TAKAITI and S. EBASHI, *J. Biochem.*, **64**, 909 (1968).
- 11) NOMOMURA, Y., *ibid*, **61**, 796 (1967).
- 12) MASAKI, T. and O. TAKAITI, *ibid*, **66**, 637 (1969).
- 13) MASAKI, T., M. ENDO and S. EBASHI, *ibid*, **62**, 630 (1967).
- 14) FUKAZAWA, T. and T. YASUI, *Biochim. Biophys. Acta*, **140**, 534 (1967).
- 15) MARUYAMA, K., M. KAWAMURA and T. OBINATA, *Sci. Papers Coll. Gen. Educ., Univ. Tohyo*, **18**, 247 (1968).
- 16) BRISKEY, J. E., R. G. CASSENS and B. B. MARSH, *The Physiology and Biochemistry of Muscle as a Food*, 2, University of Wisconsin Press, Madison, Wisconsin (1970).
- 17) BUSCH, W. A., *Ph. D. Thesis, Iowa State Univ., Ames, Iowa* (1969).
- 18) EASON, B. A., *Ph. D. Thesis, Iowa State Univ., Ames, Iowa* (1969).
- 19) OKITANI, A., O. TAKAGI and M. FUJIMAKI, *Agr. Biol. Chem.*, **31**, 439 (1967).
- 20) HERRING, H. K., R. G. CASSENS, T. FUKAZAWA and E. J. BRISKEY, *J. Food Sci.*, **34**, 389 (1969).
- 21) ARAKAWA, N., R. M. ROBSON and D. E. GOLL, *Biochim. Biophys. Acta*, **200**, 284 (1970).
- 22) GOLL, D. E., W. F. H. M. MOMMAERTS, M. K. REEDY and K. SERAYDARIAN, *ibid*, **175**, 174 (1969).
- 23) DRABIKOWSKI, W. and E. NOWAK, *European J. Biochem.*, **5**, 209 (1968).
- 24) SERAYDARIAN, K., E. J. BRISKEY and W. F. H. M. MOMMAERTS, *Biochim. Biophys. Acta*, **133**, 399 (1967).
- 25) DRABIKOWSKI, W., Y. NONOMURA and K. MARUYAMA, *J. Biochem.*, **63**, 761 (1968).
- 26) EBASHI, S., H. IWAKURA, H. NAKAJIMA, R. NAKAMURA and Y. OOI, *Biochem. Zeitsch.*, **345**, 201 (1966).
- 27) 真崎知生・若林健之・高市雄之, *科学*, **39**, 268 (1969).

- 28) MOMMAERTS, W. F. H. M., *J. Biol. Chem.*, **198**, 445 (1952).
- 29) EBASHI, S. and K. MARUYAMA, *J. Biochem.*, **58**, 20 (1965).
- 30) TONOMURA, Y., S. TOKURA, K. SEKIYA and K. IWAMURA, *Arch. Biochem. Biophys.*, **95**, 229 (1961).
- 31) BALLEY, K., *Biochem. J.*, **43**, 271 (1948).
- 32) MASORO, E. J. and B. P. YU, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **34**, 686 (1969).
- 33) MCFARLAND, B. D. and G. INESI, *ibid*, **41**, 239 (1970).
- 34) ORNSTEIN, L., *Ann. New York Acad. Sci.*, **121**, Art 2, 321 (1964).
- 35) DAVIS, J., *ibid*, Art 2, 404 (1964).
- 36) SCHACHMAN, H. A., *Methods in Enzymology*, **4**, pp. 32 (1957).
- 37) FUKAMI, A. and A. ADACHI, *J. Electron Microscopy*, **14**, 112 (1965).
- 38) POTTHAST, K. and R. HAMM, *J. Chromatog.*, **42**, 558 (1969).
- 39) FISKE, C. H. and J. SABBAROW, *J. Biol. Chem.*, **66**, 375 (1925).
- 40) DEYL, Z., V. PELOUCH and H. MALKOVA, *J. Chromatog.*, **41**, 423 (1969).
- 41) MUELLER, H. and S. V. PERRY, *Biochim. Biophys. Acta.* **50**, 599 (1969).
- 42) LOWEY, S., L. GOLDSTEIN and S. LUCK, *Biochem. Z.*, **345**, 248 (1966).
- 43) ARAI, K. and S. WATANABE, *J. Biol. Chem.*, **243**, 5670 (1968).
- 44) WAKABAYASHI, T. and S. EBASHI, *J. Biochem.*, **64**, 731 (1968).
- 45) ARAI, K. and S. WATANABE, *ibid*, **64**, 69 (1968).
- 46) HARTSHORNE, D. J. and H. MUELLER, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **31**, 647 (1968).
- 47) SCHAUB, M. C. and S. V. PERRY, *Biochem. J.*, **115**, 993 (1969).
- 48) GREASER, M. L. and J. GERGELY, *Federation Proc.*, **29**, 463 (1970).
- 49) EBASHI, S., T. WAKABAYASHI and F. EBASHI, *J. Biochem.*, **69**, 441 (1971).
- 50) TSAO, T. C., K. BALLEY and G. S. ADAIR, *Biochem. J.*, **49**, 27 (1951).
- 51) WOODS, E. F., *J. Biol. Chem.*, **242**, 2859 (1967).
- 52) KAWAMURA, K., *J. Biochem.*, **68**, 577 (1970).
- 53) EBASHI, S. and A. KODAMA, *ibid*, **58**, 107 (1965).
- 54) SELINGER, Z. M. KLEIN and A. AMSTERDAM, *Biochim. Biophys. Acta*, **183**, 19 (1969).
- 55) BATE, SMITH, E. C. and J. R. BENDALL, *J. Physiol.*, **106**, 177 (1947).
- 56) BENDALL, J. R. and C. L. DAVEY, *Biochim. Biophys. Acta*, **26**, 93 (1957).
- 57) TERASAKI, M., M. KAIWARA, E. FUJITA and K. ISHII, *Agr. Biol. Chem.*, **29**, 208 (1965).
- 58) CHRAMBACH, A., M. BARANY and F. FINKELMAM, *Arch. Biochem. Biophys.*, **93**, 456 (1961).
- 59) McLOUGHLIN, J. V., *J. Food Sci.*, **35**, 717 (1970).
- 60) ROBSON, R. M., D. E. GOLL, N. ARAKAWA and M. H. STROMER, *Biochim. Biophys. Acta*, **200**, 296 (1970).
- 61) HAMM, R. and J. Van Hoof, *Fleischwirtschaft*, **50**, 125 (1970).
- 62) PULLMAN, M. E., H. S. PENEFSKY, A. DATTA and E. RACKER, *J. Biol. Chem.*, **235**, 3322 (1960).
- 63) PERRY, S. V., *Biochem. J.*, **51**, 495 (1952).
- 64) SEIDEL, D. T., D. VON CHAK and H. H. WEBER, *Biochim. Biophys. Acta*, **140**, 93 (1967).
- 65) MARUYAMA, K., *ibid*, **94**, 208 (1965).
- 66) MARUYAMA, K., *J. Biochem.*, **69**, 369 (1971).
- 67) KAWAMURA, M. and K. MARUYAMA, *ibid*, **67**, 437 (1970).
- 68) EBASHI, S. and A. KODAMA, *ibid*, **59**, 425 (1966).
- 69) BRISKEY, E. J., K. SERAYDARIAN and W. F. H. M. MOMMAERTS, *Biochim. Biophys. Acta*, **133**, 412 (1967).
- 70) GREASER, M. L., R. G. CASSENS and W. G. HOEKSTRA, *J. Agr. Food Chem.*, **15**, 1112 (1967).
- 71) GREASER, M. L., R. G. CASSENS, E. J. BRISKEY and W. G. HOEKSTRA, *J. Food Sci.*, **34**, 120 (1969).
- 72) GREASER, M. L., R. G. CASSENS, E. J. BRISKEY and W. G. HOEKSTRA, *ibid*, **34**, 125 (1969).
- 73) 高橋興威, 蛋白質・核酸・酵素, **12**, 61 (1967).
- 74) ARAKAWA, N., D. E. GOLL and J. TEMPLE, *J. Food Sci.*, **35**, 703 (1970).

## Resume

In the present work, the effect of 6 S  $\alpha$ -actinin (6 S) on the post mortem changes observable in muscle proteins was investigated, using the purified 6 S, prepared from porcine skeletal muscle.

Recently, isolation of  $\alpha$ -actinin, one of the regulatory proteins in myofibrils, from rabbit muscle was made by EBASHI and EBASHI, which was followed by the separation, from this protein, of the three components, 6 S, 10S and 25S, through ultracentrifugal analysis, by NONOMURA.

At present, of the above mentioned three components, separated 6 S is considered to be the only component capable of displaying the biological activities, ..... binding to F-actin, associating F-actin laterally, leading F-actin to gelation, and promoting the superprecipitation of actomyosin.

Besides, tropomyosin, whose location in the thin filament in myofibrils has been confirmed, is known to be capable of inhibiting the binding of 6 S to F-actin as well as the gelation of F-actin.

Although it has been observed that 6 S is located in Z-line in myofibrils, it seems presumably possible that



this protein may be dispersed in almost all the muscle tissues after its liberation from Z-line, and may play some important role in the post mortem changes in muscle proteins.

It goes without saying that pork is one of the most important sources of meat in daily life, therefore, in the present work, purified 6 S, myosin, actin, tropomyosin, troponin, sarcoplasmic reticulum ATPase and the thin filament and thick filament of myofibrils were prepared from porcine skeletal muscle, and then, some investigations concerning the characteristics of this purified 6 S, the interactions of 6 S and other protein preparations described above and the effect of 6 S on the superprecipitation taking place by the interaction of thin filament and thick filament of myofibrils which may be considered as one of the most important factors having close relation to the tenderness of meat, were performed.

The results obtained were as follows :

1. The 6S prepared from fresh porcine skeletal muscle according to the method of MASAKI and TAKAITI, and then purified according to the method of NONOMURA, was found, in some physicochemical properties, to be homogeneous with and approximately similar to the 6S from rabbit and chicken, seeming to have its proper biological activities.

2. As the results of some fundamental investigations of the effects of several environmental factors upon the interaction of 6 S and F-actin, the following items were clarified:

(1) The optimal neutral salt concentration for the interaction of 6 S and F-actin was found to be 0.1M KCl.

(2) Ten millimoles of ATP inhibited this interaction completely and the inhibitory effect of 10mM of tripolyphosphate on this interaction was nearly 50% of that of ATP, while orthophosphate and pyrophosphate exhibited only a slight inhibitory effect in a reaction-system containing 4 parts of F-actin and 1 part of 6 S by weight.

(3) The inhibitory effect of ATP on this interaction apparently decreased when ATP concentration decreased below 8mM.

(4) No calcium ion seemed to enhance this interaction, while magnesium ion enhanced it considerably.

(5) Decrease in pH value from 7.5 to 5.5 enhanced the progress of this interaction.

(6) Tropomyosin remarkably inhibited this interaction.

(7) This interaction was enhanced with the decrease of temperature from 38°C to 10°C.

3. In comparison with the other agents, the inhibitory effect of ATP on the interaction of 6S and F-actin was most conspicuous, and so the inhibitory effects of all nucleotides appearing in muscle by the degradation of ATP during post mortem change on this interaction were investigated at a concentration of 10mM, respectively.

The results showed that, the inhibitory effect was greater in the order given below; ATP > IMP > AMP > ADP.

Among these, IMP showed an unexpectedly remarkable inhibitory effect, about 50% of that of ATP, whereas those of the other two were insignificant.

Further, in an effort to clarify the mechanism of the inhibitory effect of ATP on this interaction the following results were obtained.

(1) ATP seemed not to interact with 6 S, but was found to be bound to F-actin.

(2) The amount of bound-ATP to F-actin increased with the concentration of ATP, but the amount of bound-ATP to F-actin showed no change with the lapse of time.

(3) Some presumable competition of ATP with 6S in binding to F-actin was assumed, while no competition of ATP with tropomyosin in binding to F-actin was observable.

It may quite reasonably be assumed that in living muscle in general, ATP may exist in a relatively large amount, and may be binding to F-actin, but it is a well known fact that in the post mortem muscle the amount of ATP decreases rapidly by ATPase existing in muscle tissue, hence the assumption that 6 S may be in possession of the faculty of binding to F-actin readily in post mortem muscle.

This seems to have been confirmed by the fact that, when sarcoplasmic reticulum ATPase was added to a system containing 6 S, F-actin and 10mM ATP, the interaction of 6 S and F-actin was remarkably promoted as ATP concentration decreased below 8mM by sarcoplasmic reticulum ATPase.

4. From the results of investigations into the effect of 6 S on thin filament, i. e., troponin-tropomyosin-F-actin complex, it was found that, the viscosity of thin filament increased as pH value decreased from 7.0 to 5.5, and the addition of  $\text{Ca}^{2+}$  resulted in the increase in viscosity, and the addition of both  $\text{Ca}^{2+}$  and 6 S re-

sulted in further increase in viscosity, while the addition of 1mM EGTA significantly decreased the viscosity, making it less than that of the control containing thin filament alone.

The increase in viscosity by the addition of  $\text{Ca}^{2+}$  seemed to be due to the allosteric effect of  $\text{Ca}^{2+}$  on thin filament, and the fact that the addition of 6 S to thin filament to which  $\text{Ca}^{2+}$  having been added resulted in further increase in viscosity, suggested that 6 S was probably capable of binding to the thin filament having undergone allosteric effect by  $\text{Ca}^{2+}$ , and there, on the basis of the observation by electron microscope, 6S seemed to be binding to almost whole the surface of the thin filament having undergone allosteric effect by  $\text{Ca}^{2+}$ .

5. At present, it is considered that superprecipitation may be brought forth by the interaction of thin filament and thick filament in the presence of ATP, therefore, an investigation of the effects of several factors on the superprecipitation brought about by the interaction of thin filament and thick filament has been performed in the present work.

From the results, it was found that 6 S was capable of enhancing this superprecipitation only in the following case, where the presence of  $\text{Ca}^{2+}$  was absolutely necessary, while  $\text{Ca}^{2+}$  may have bound itself to the troponin existing in thin filament first, and then this thin filament may have undergone the allosteric effect by bound- $\text{Ca}^{2+}$ .

This seems to have been confirmed from the fact that the promoting effect of 6 S on this superprecipitation was completely inhibited by the addition of 2mM of EGTA, a  $\text{Ca}^{2+}$ -chelating agent.

The enhancing effect of 6 S on this superprecipitation increased, as the amount of 6 S added increased up to 10 times as large as an approximate amount of 6 S, reported to be naturally existing in muscle tissue.

As to the effect of pH on this superprecipitation, decrease in pH value from 7.0 to 5.5 resulted in a gradual progress in this superprecipitation in the absence of  $\text{Ca}^{2+}$  and 6 S, while in the presence of  $\text{Ca}^{2+}$  and 6 S it led to a gradual retrogression in this superprecipitation.

Actomyosin ATPase activity of this superprecipitate increased significantly by the addition of  $\text{Ca}^{2+}$  alone and much more intensively by the addition of both  $\text{Ca}^{2+}$  and 6 S.

On the basis of the electron microscopic observation the structure was ascertained to be more compact and the dispersion density, larger, and further it was confirmed that the gel volume measured by centrifugation was greater in the superprecipitate formed in the presence of  $\text{Ca}^{2+}$  and 6 S, as compared with those formed in the presence of  $\text{Ca}^{2+}$  alone.

Moreover, the gel volume of this superprecipitate obtained by centrifugation showed no appreciable change by heat treatment at 75°C for one hour.

From these results the structure of the superprecipitate formed in the presence of  $\text{Ca}^{2+}$  and 6 S was assumed to be compact, with the suggestion that the larger is the amount of such compact superprecipitate formed in the presence of  $\text{Ca}^{2+}$  and 6 S contained in meat, the harder may be the meat.

In such connections, it was suggested that 6 S seemed to play some important role in the tenderness of meat.

## Explanation of plates

Aliquots of the sample solution containing each final concentration as described below, were directly taken for electron microscopy.

Plate I. Electron micrographs of F-actin filament.

Final concn.: 0.4 mg/ml F-actin, 0.1 M KCl, 0.01 M Tris-acetate buffer (pH 7.0).

Magnification : A ;  $\times 20,000$ , B ;  $\times 50,000$ .

Plate II. Electron micrograph of myosin filament.

Final concn.: 0.4 mg/ml myosin, 0.1 M KCl, 0.01 M Tris-acetate buffer (pH 7.0).

Magnification :  $\times 30,000$ .

Plate III. Electron micrograph of the aggregate of F-actin formed by 6 S  $\alpha$ -actinin.

Final concn. : 0.4 mg/ml F-actin, 0.05 mg/ml 6S  $\alpha$ -actinin, 0.1 M KCl, 0.01 M Tris-acetate buffer (pH 7.0). Magnification :  $\times 20,000$ .

Plate IV. Electron micrographs of F-actin-6 S  $\alpha$ -actinin mixture in the presence of 10 mM ATP.

Final concn. : 0.05 mg/ml 6S  $\alpha$ -actinin, 0.4 mg/ml F-actin, 0.1 M KCl, 0.01 M Tris-acetate

- buffer (pH 7.0). Magnification : A ;  $\times 20,000$ , B ;  $\times 50,000$ .
- Plate V. Electron micrographs of F-actin - 6 S  $\alpha$ -actinin complex in the presence of 10 mM ADP, AMP and IMP each.  
Final concn.: 0.05 mg/ml 6 S  $\alpha$ -actinin, 0.4 mg/ml F-actin, 0.1 M KCl, 0.01 M Tris-acetate buffer (pH 7.0). Magnification :  $\times 20,000$  each.
- Plate VI. Electron micrographs of F-actin in the presence of 10 mM ATP.  
Final concn.: 0.4mg/ml F-actin, 10 mM ATP, 0.1 M KCl, 0.01 M Tris-acetate buffer (pH7.0).  
Magnification : A ;  $\times 20,000$ , B ;  $\times 50,000$ .
- Plate VII. Electron micrographs of F-actin.  
Final concn. : 0.4 mg/ml F-actin, 0.1 M KCl, 0.01 M Tris-acetate buffer (pH 7.0).  
Magnification : A :  $\times 20,000$ , B ;  $\times 50,000$ .
- Plate VIII. Electron micrograph of F-actin - tropomyosin complex.  
Final concn. : 0.08 mg/ml tropomyosin, 0.4 mg/ml F-actin, 0.1 M KCl, 0.02 M Tris-acetate buffer (pH 7.0). Magnification :  $\times 20,000$ .
- Plate IX. Electron micrographs of thin filament (F-actin-troponin-tropomyosin complex).  
Final concn. : 0.048 mg/ml troponin, 0.08 mg/ml tropomyosin, 0.4 mg/ml F-actin. The others were quite the same as described in Plate VIII.  
Magnification : A ;  $\times 20,000$ , B ;  $\times 50,000$ .
- Plate X. Electron micrographs of thin filament in the presence of 1 mM  $\text{Ca}^{2+}$ .  
To the sample in Plate IX,  $\text{CaCl}_2$  was added to give a final concentration of 1 mM. The others were quite the same as described in Plate VIII.  
Magnification : A ;  $\times 20,000$ , B ;  $\times 50,000$ .
- Plate XI. Electron micrographs of thin filament in the presence of 1 mM EGTA.  
To the sample in Plate IX, EGTA was added to give a final concentration of 1 mM. The others were quite the same as described in Plate VIII.  
Magnification : A ;  $\times 20,000$ , B ;  $\times 50,000$ .
- Plate XII. Electron micrographs of thin filament in the presence of 1 mM  $\text{Ca}^{2+}$  and 6 S  $\alpha$ -actinin.  
To the sample in Plate X, 6 S  $\alpha$ -actinin was added to give a final concentration of 0.032mg/ml. The others were quite the same as described in Plate VIII.  
Magnification : A ;  $\times 20,000$ , B ;  $\times 50,000$ .
- Plate XIII. Electron micrographs of the superprecipitate from thin filament and thick filament system in the presence of 1 mM  $\text{Ca}^{2+}$ .  
Other conditions were quite the same as those described Fig. 7-8.  
Magnification : A ;  $\times 3,000$ , B ;  $\times 30,000$ .
- Plate XIV. Electron micrographs of the superprecipitate from thin filament and thick filament system in the presence of 1.5 mM  $\text{Ca}^{2+}$  and 0.0375mg/ml 6 S  $\mu$ -actinin.  
Other conditions were quite the same as those described in Fig. 7-8.  
Magnification : A ;  $\times 3,000$ , B ;  $\times 30,000$ .

Plate I

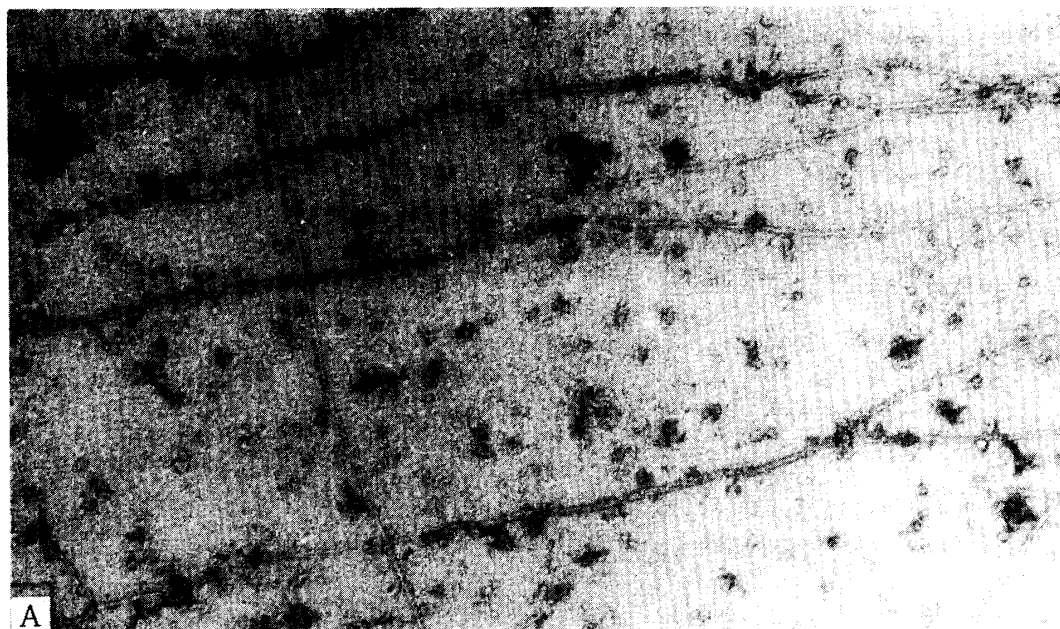


Plate II



Plate III





Plate IV.

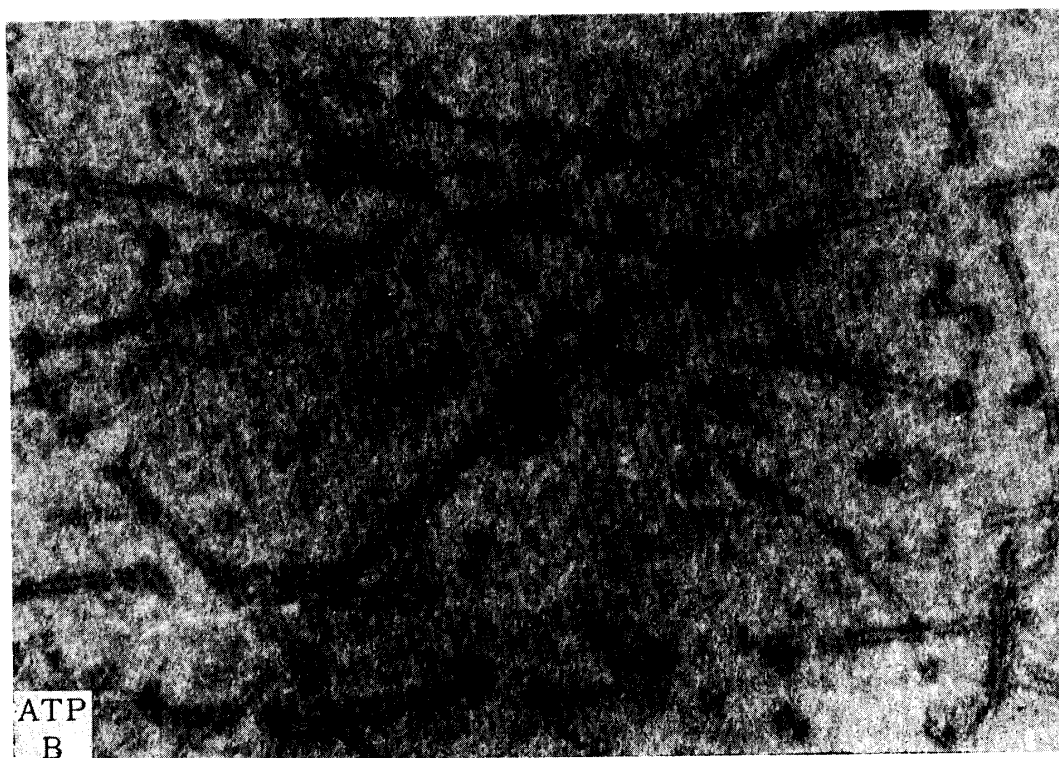
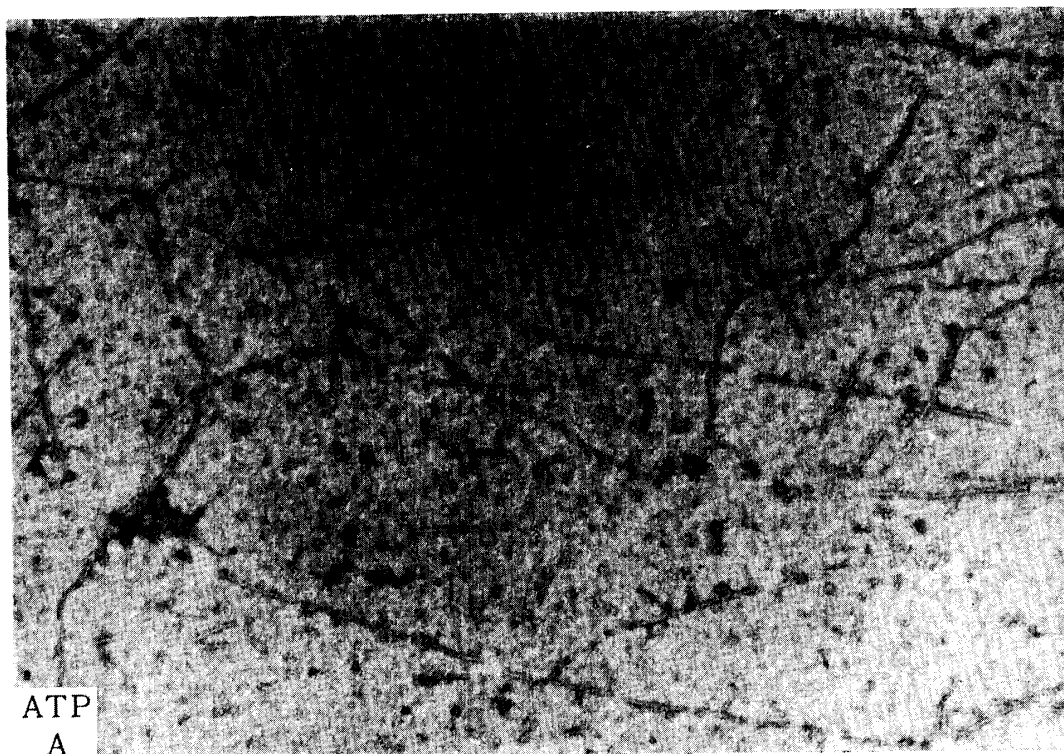
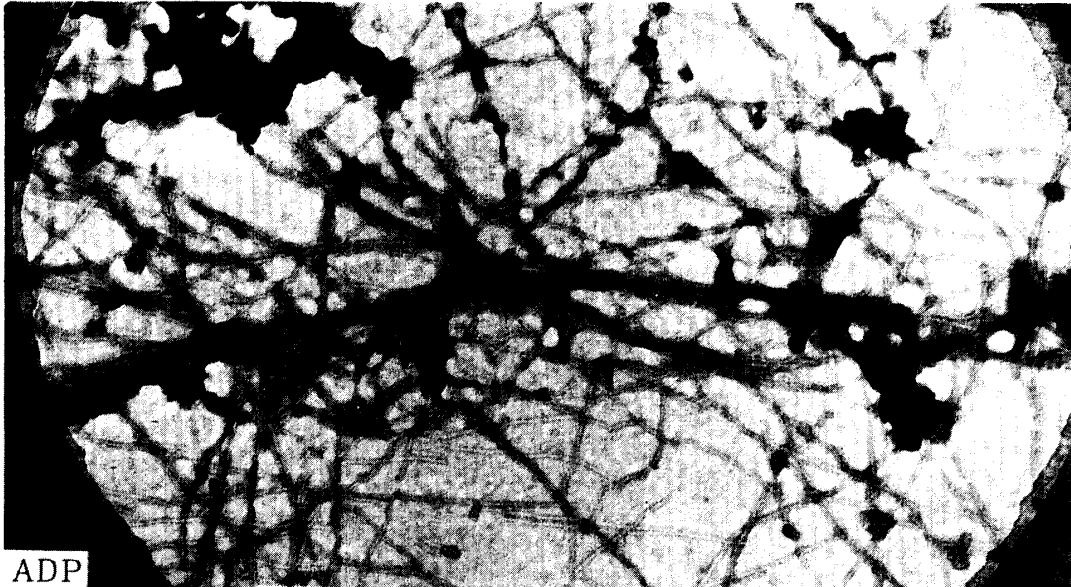
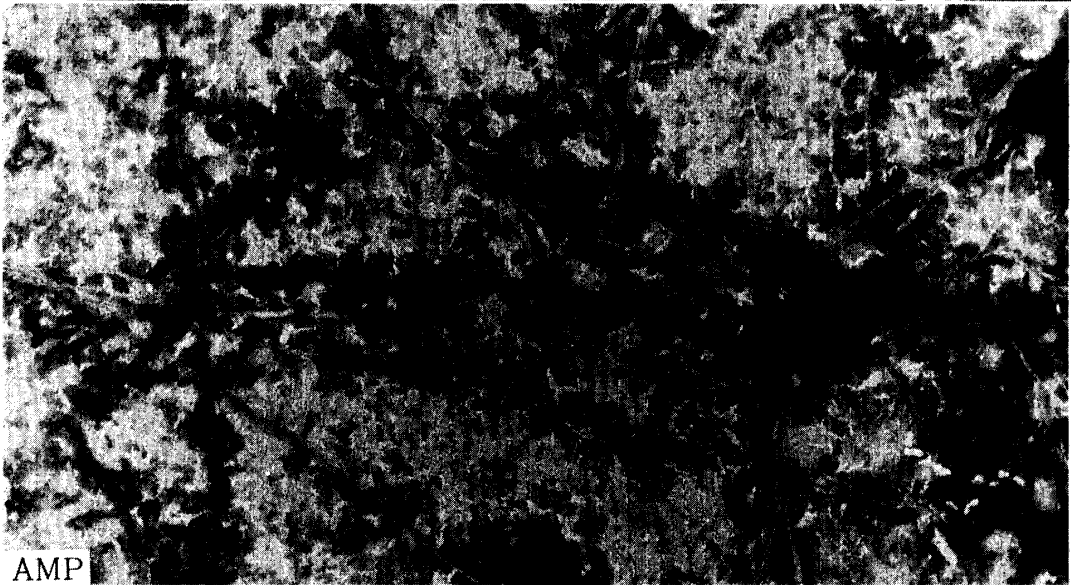


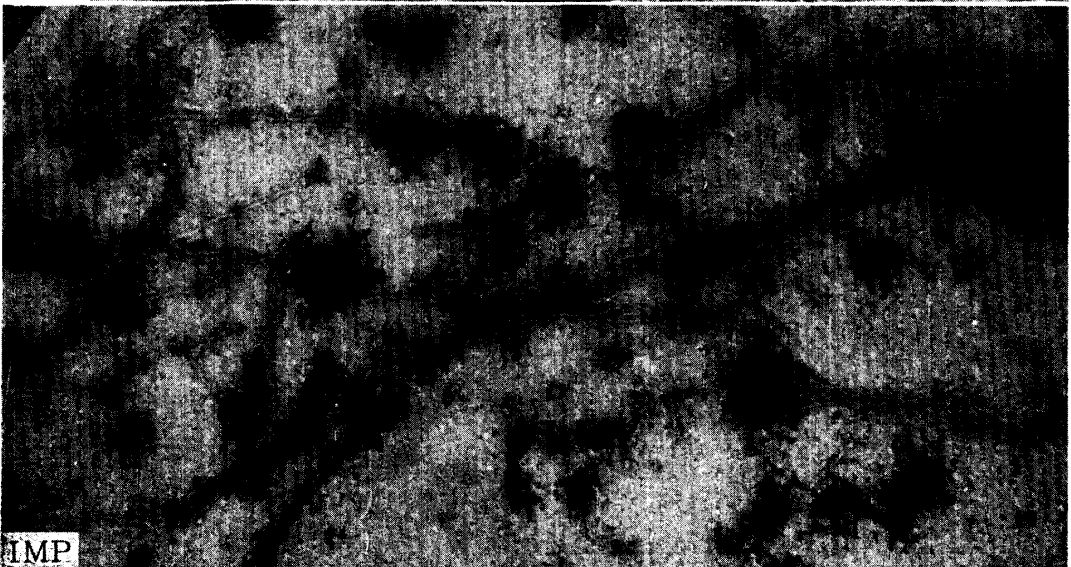
Plate V



ADP



AMP



IMP

Plate VI

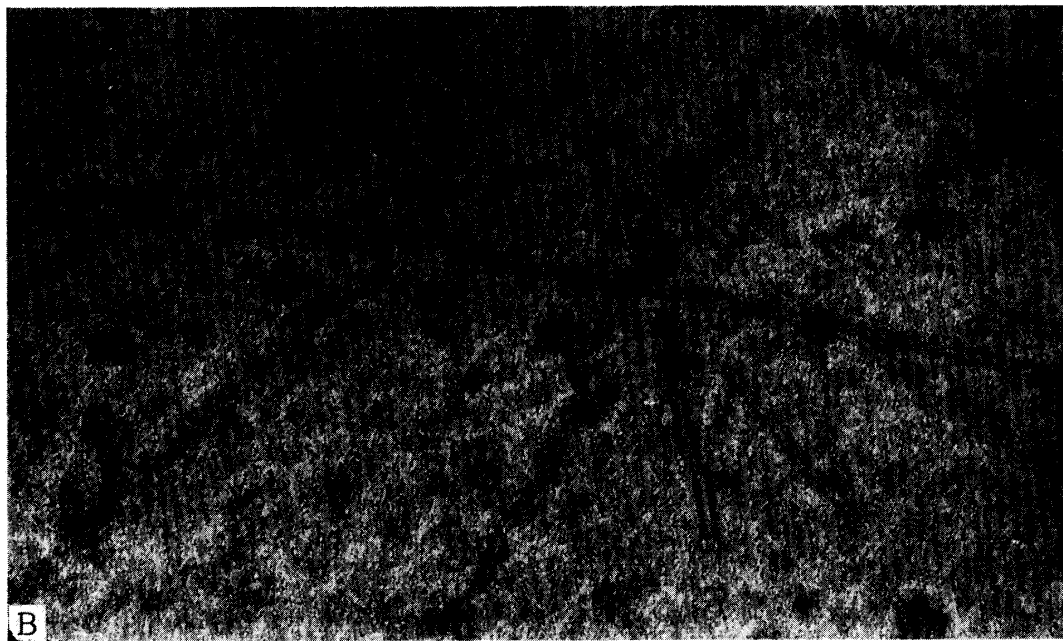
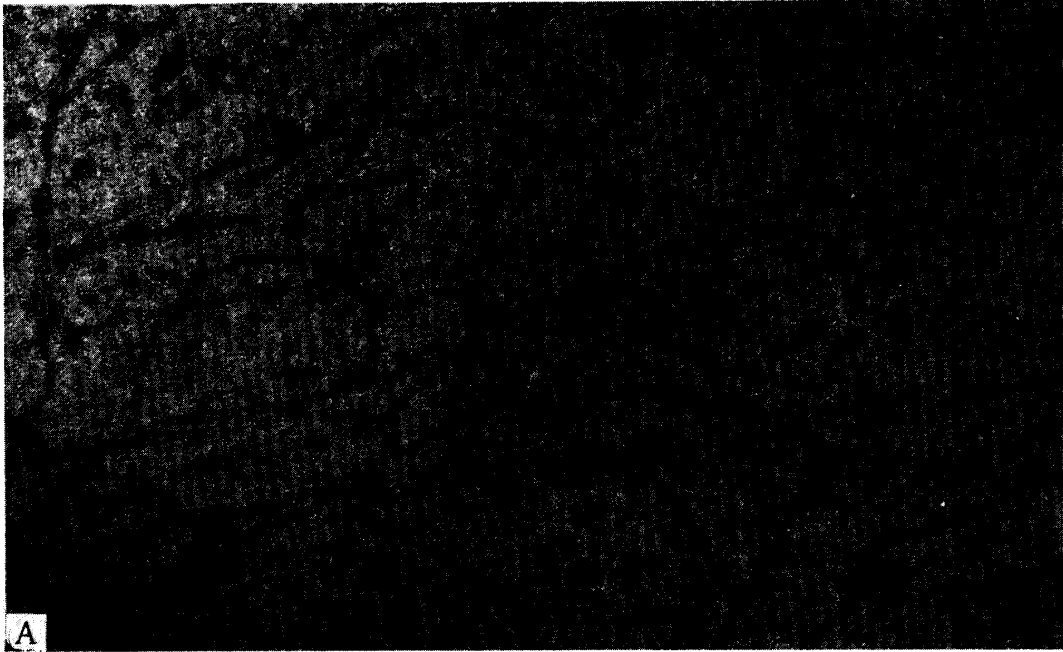




Plate VII

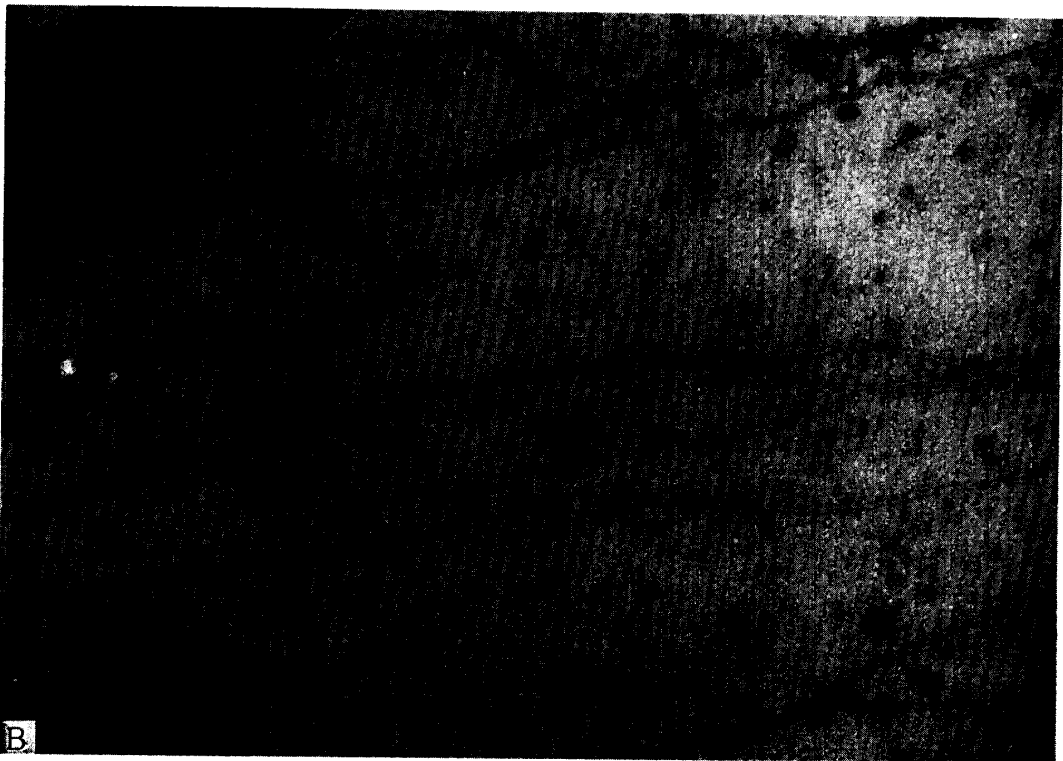
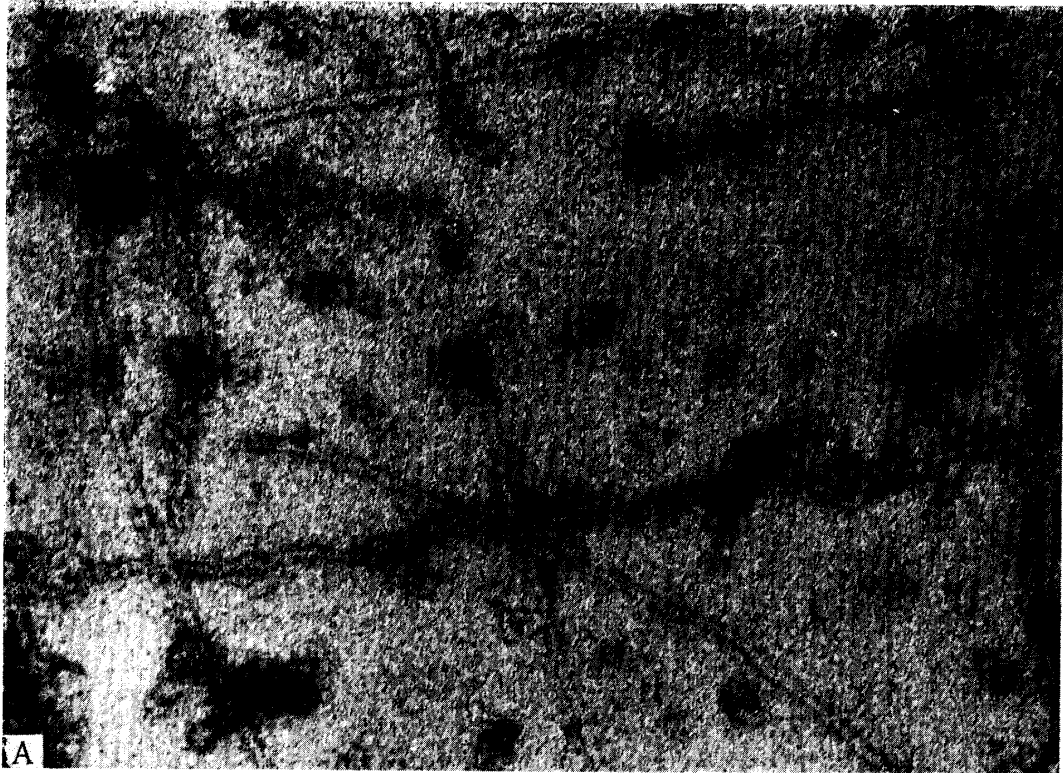


Plate VIII

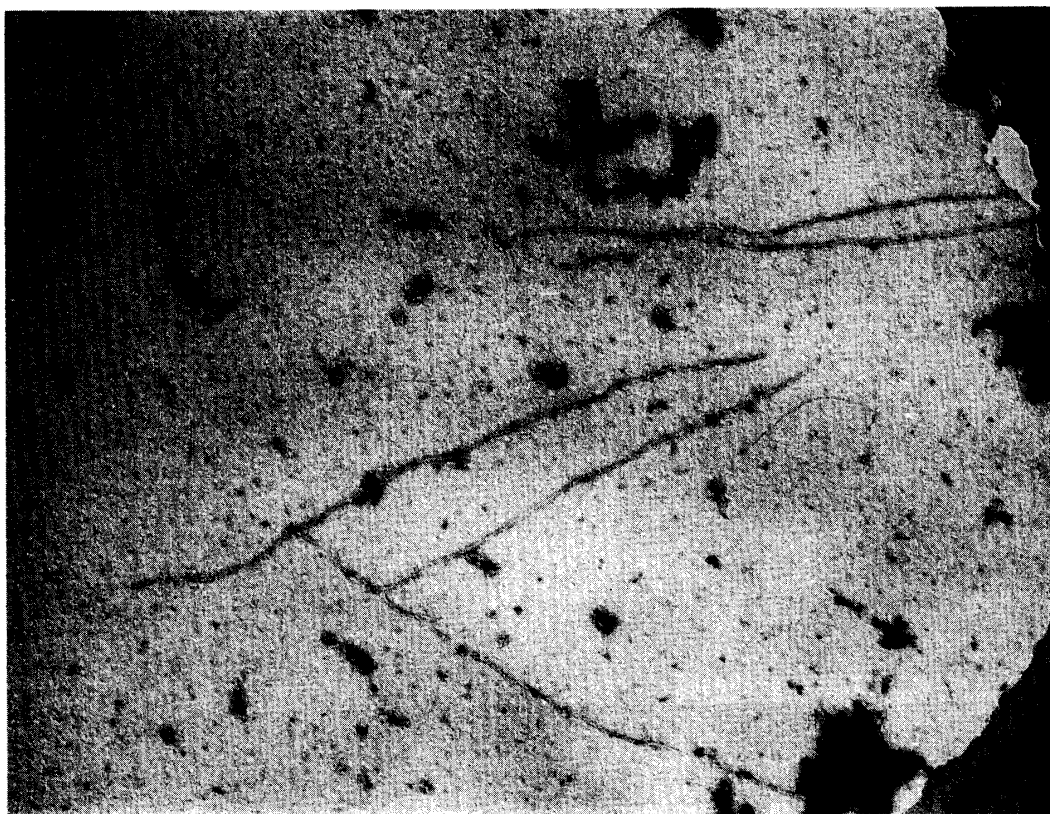


Plate IX

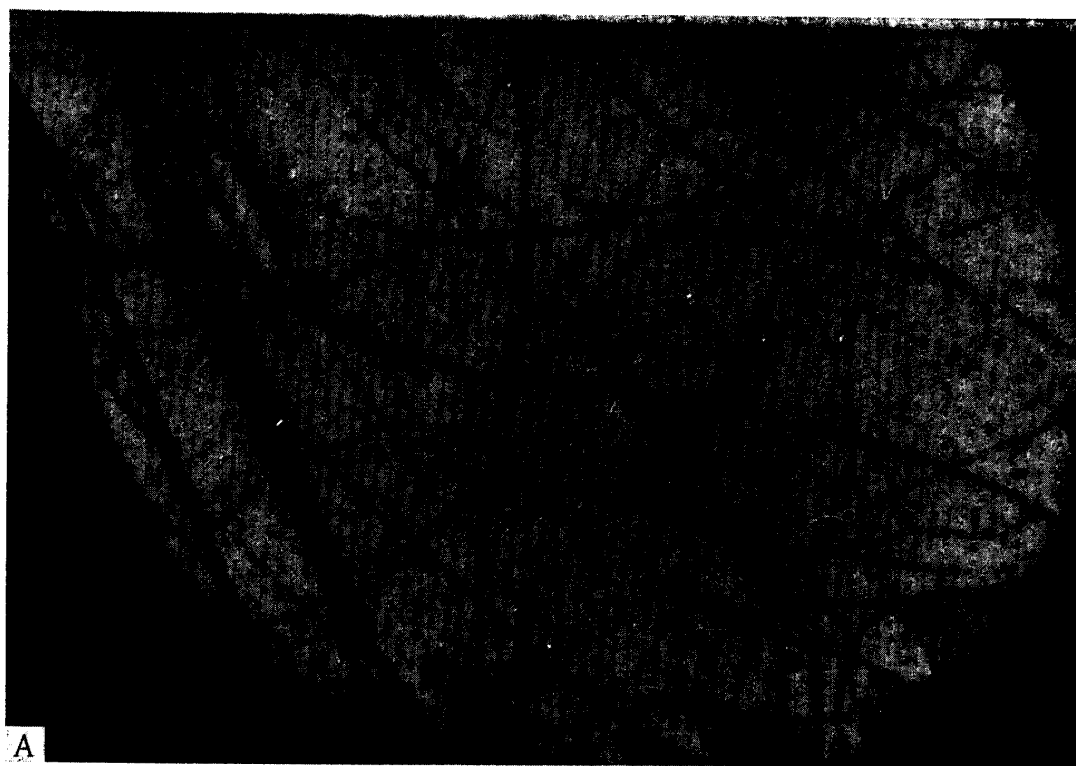


Plate X

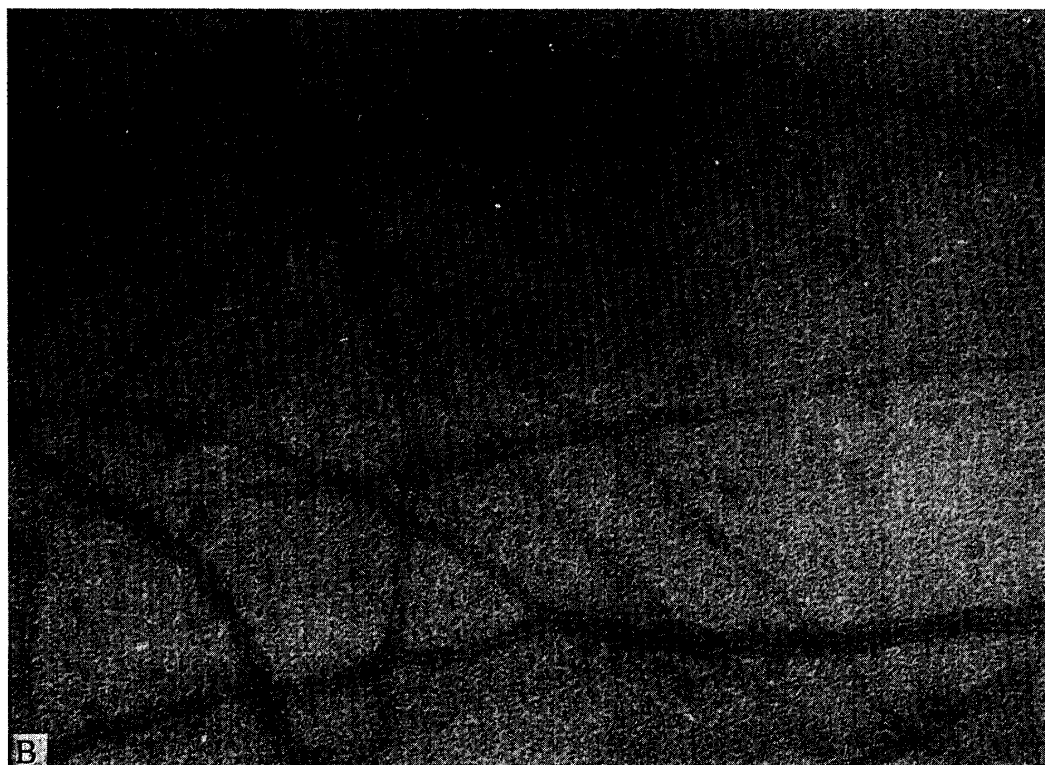
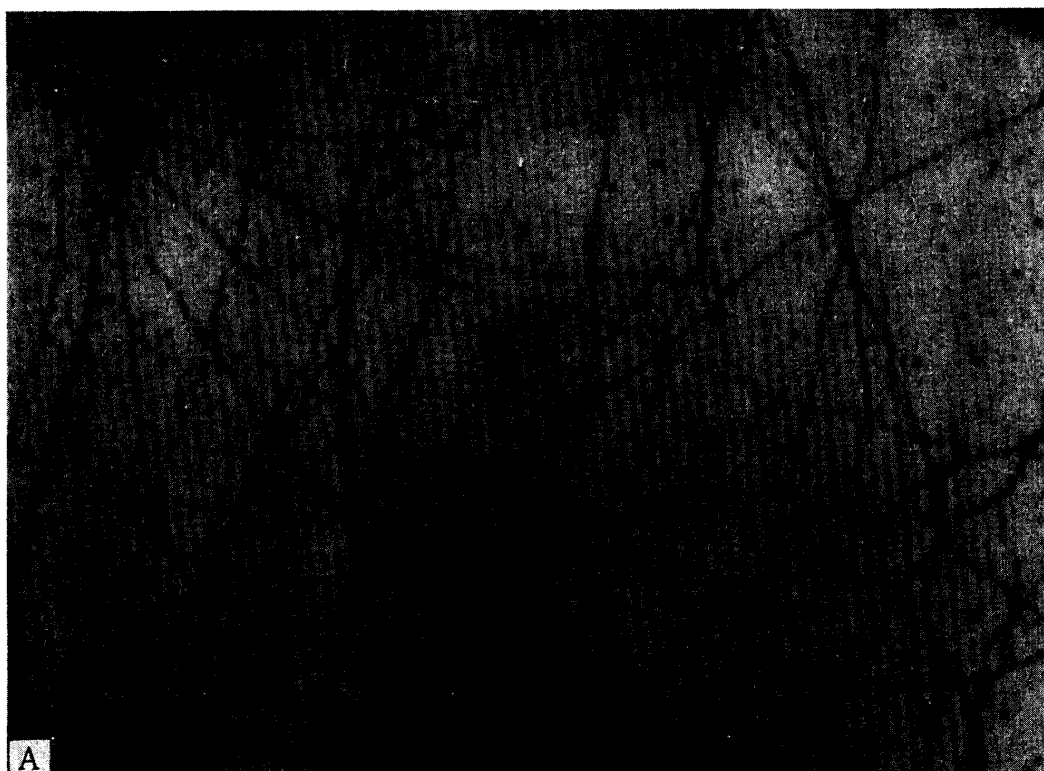


Plate XI

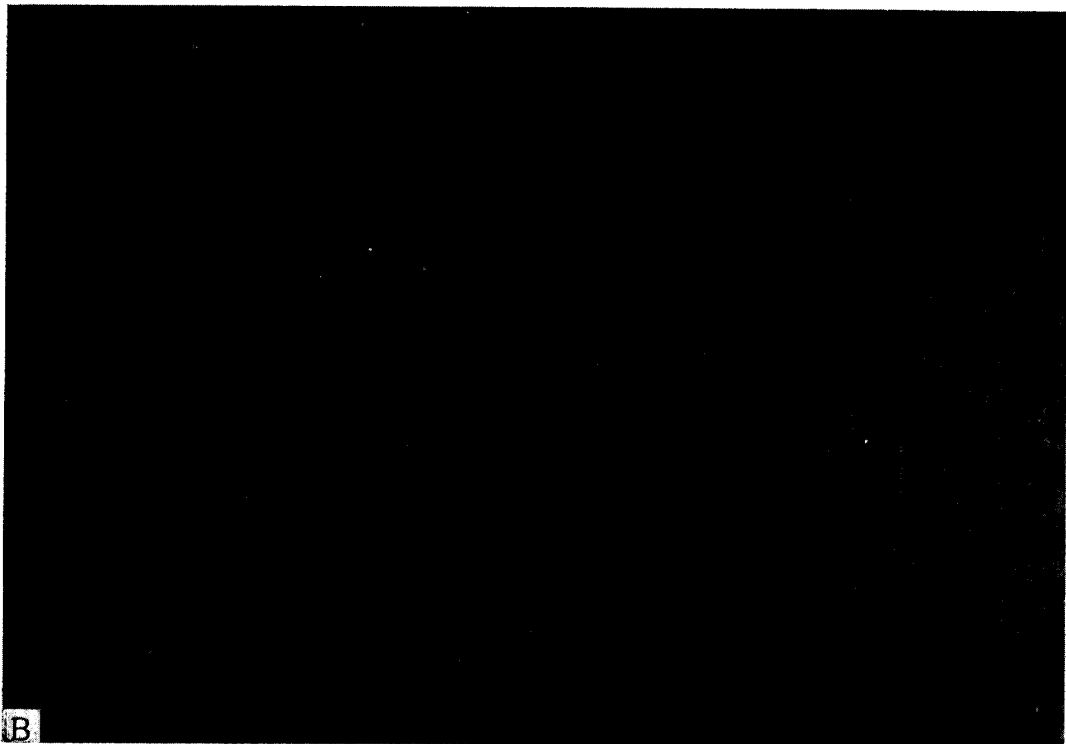
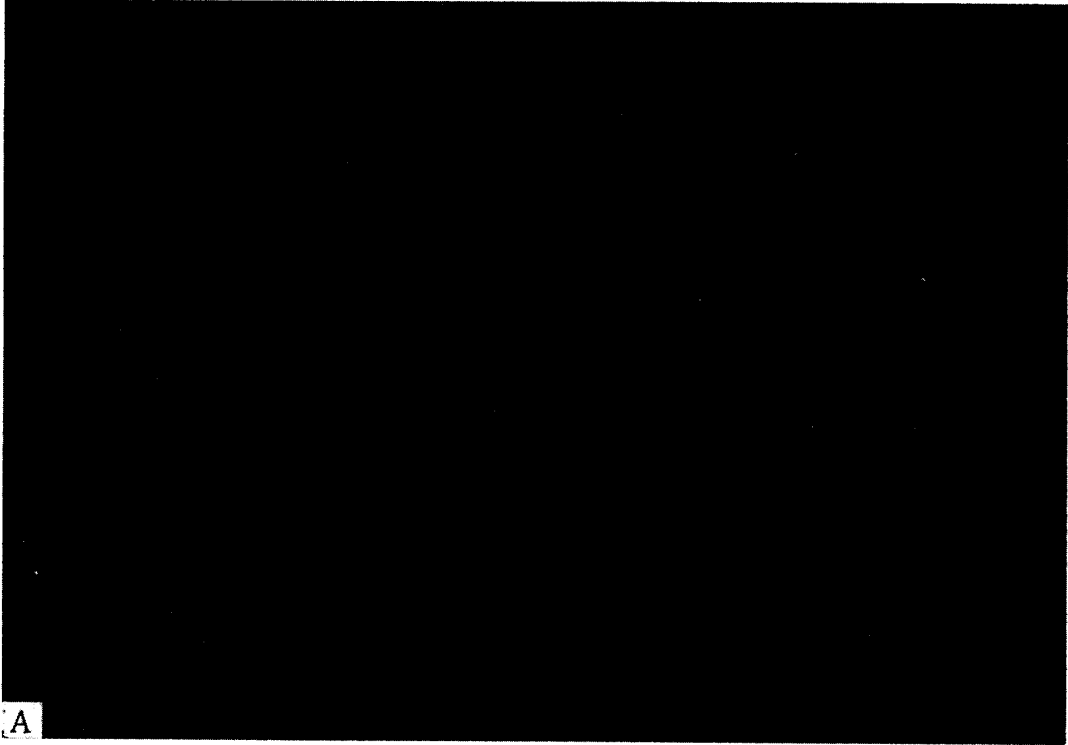


Plate XII

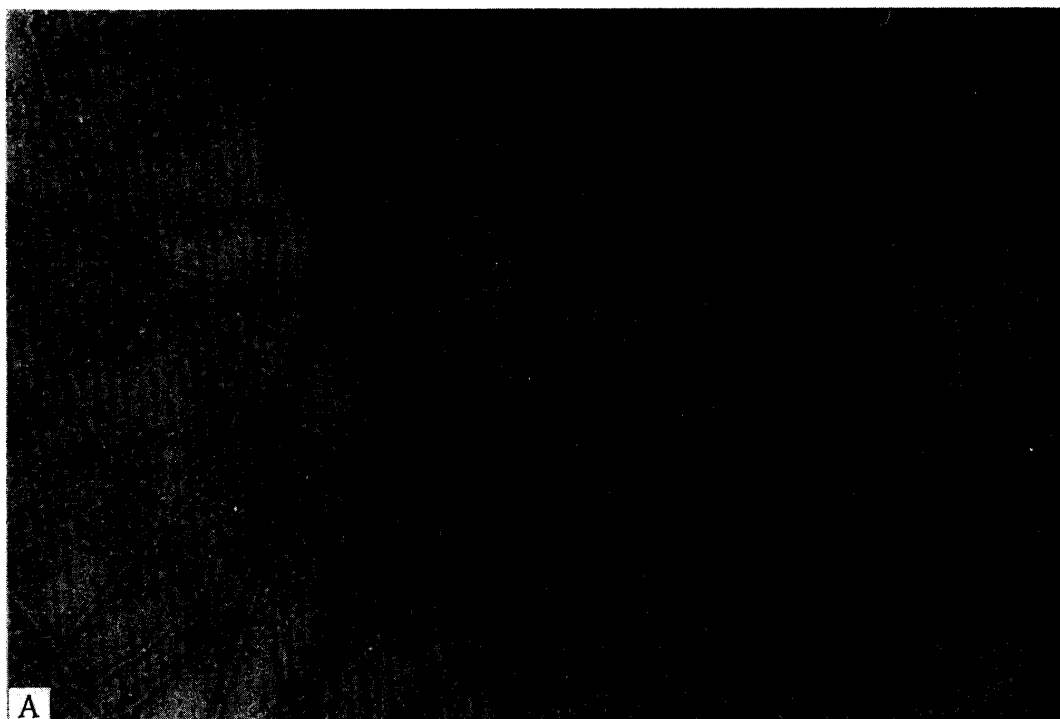


Plate XIII

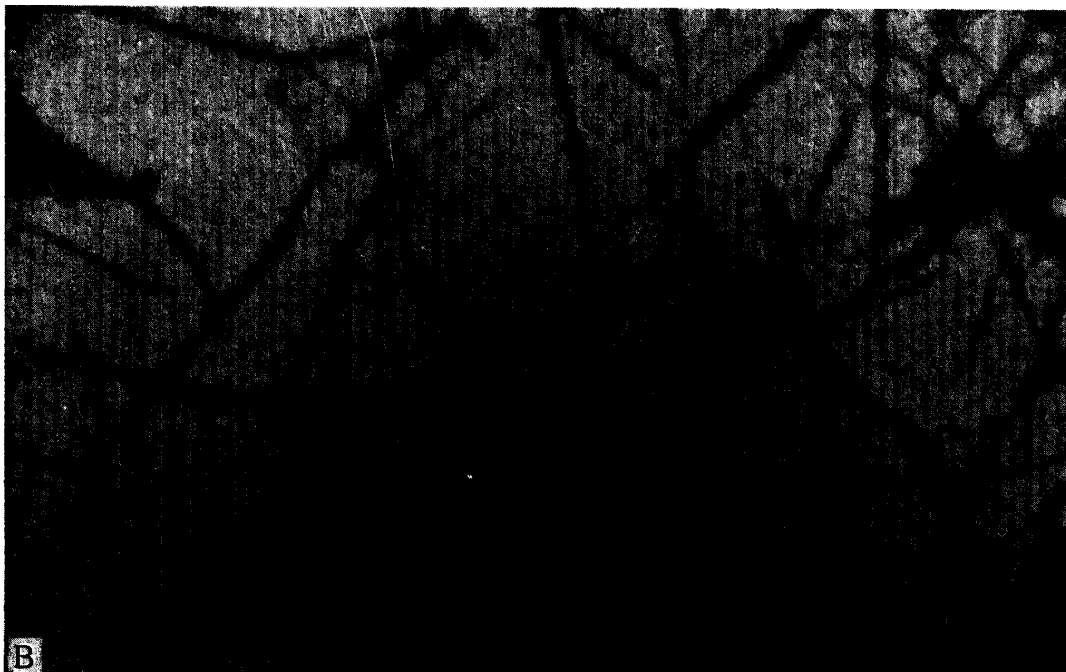
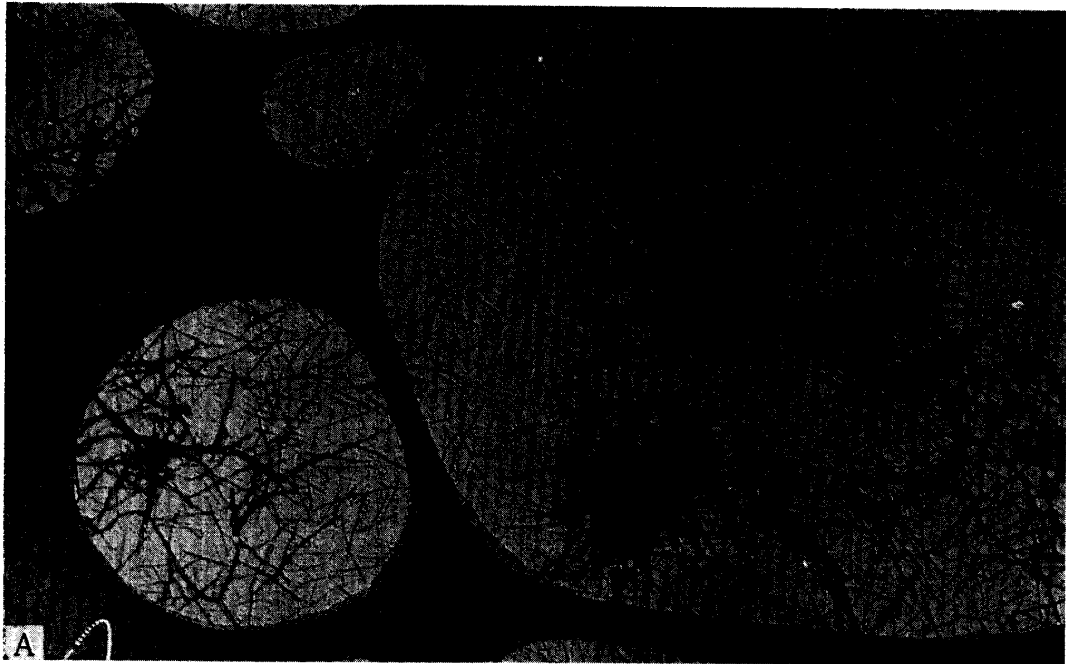


Plate XIV

