



Title	凍結融解による Myosin B の変性
Author(s)	花房, 尚史; HANAFUSA, Naofumi
Citation	低温科学. 生物篇, 20, 81-94
Issue Date	1962-12-20
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/17664
Type	departmental bulletin paper
File Information	20_p81-94.pdf



凍結融解による Myosin B の変性

花房尚史

(低温科学研究所 医学部門)

(昭和37年8月受理)

I. 緒言

種々な物理化学的要因による蛋白質の変性については現在まで多くの研究がなされているが、凍結融解による変性(以下凍結変性と略記する)については余り知られていないように思われる。特に酵素蛋白については、catalase^{1),2)}、魚肉の myosin ATPase^{3),4)}等について、いくつかの報告があるに過ぎない。

凍結融解が、溶媒としての水の急激な物理的状态変化であることから、蛋白分子がその周囲に配向した水和水(結合水)を持つために何らかの影響を受けるであろうことが予想される。又、生体を構成する基本的な高分子物質の一つとしての蛋白の凍結変性は、生体の凍結障害の機構を考える上で一つの重要な要因であると思われる。

著者は、このような目的で、筋蛋白中の大部分を占める myosin B(actomyosin)を用い、その粘度、ATP添加時の粘度変化のパターン(ATP反応性)、ATPase活性について、いくつかの凍結条件を与えてその変性を検討した。特に myosin Bを用いたのは、この蛋白が、非常に fibrous な構造で、ATPase活性を持つと共に基質である ATPによって分子構造自体の physicochemical な変化を示す特徴のある蛋白であることから、その変化の追跡が比較的簡単であり、酵素蛋白の構造、機能の双方の点について、考察しやすいと考えられたからである。更に、myosin Bを構成する蛋白である actin と myosin A についても、いくつかの条件でその変性を検討した。又、凍結変性の対照として、熱変性、尿素変性についても検討し、あわせて考察した。

II. 材料および方法

1. 材料 材料の抽出には、ウサギ骨筋筋を用いた。myosin BはWeber Edsal液で24時間抽出、稀釈沈澱法で精製する⁵⁾。myosin AはStraub液で15分間抽出、同じく稀釈沈澱法で、混在する myosin B と分離、精製する⁵⁾。いずれも蛋白濃度 20~30 mg/ml、0.6 M KCl 溶液として保存する。actinは myosin A 抽出残渣をアセトン乾燥末として水抽出後、精製する⁶⁾。蛋白濃度約 5 mg/ml の、G-actin 水溶液とする。全て氷室に保存し、抽出後 10~14

* 北海道大学低温科学研究所業績 第623号

日以内に使用した。

2. 方 法 粘度の測定は、水の流下時間 6.5 秒のオストワルド型粘度計を用い、28°C で測定した。ATP 反応性は終濃度 1 mM になるように、ATP 10 mM tris buffer 溶液を加えて粘度の時間的変化を測定する。ATPase 活性は、基質濃度 ATP 1 mM のときに分解される末端燐を Fiske-Subarrow 法によりベックマン型分光光度計で比色定量し、単位時間当り P 分解量としてあらわす。いずれも反応時の条件は、終濃度 KCl 0.5 M, 0.1 M tris buffer pH 6.9, CaCl_2 1 mM である。

沈降係数はスピコン E 型超遠心機で 56,100 r.p.m., 0°C で測定した。

凍結融解の方法としては、myosin B の場合、中試験管(径 1.6 cm, 長さ 17 cm)に試料 4 ml をとり、中央部に熱電対を挿入して、ドライアイス又は液体窒素で凍結させる。myosin A, actin の場合は試料 10 ml を 50 ml 三角コルペンにとり、中央部に熱電対を挿入して同様に凍結処理を行なう。凍結速度の調節は、ドライアイス量を変えることにより、又は二重管の使用で行なった。融解は、この実験では全て 25°C の温水に浸して、一定(約 100°C/min)の加温速度のもとで行なった。尚、電子管式記録計により、凍結、融解の処理時の温度を記録した。凍結速度は凍結曲線上で plateau を過ぎて直線になる部分について算出した。

III. 実験結果

1 myosin B

第 1 表は、myosin B 4 ml を -30°C (低温室), -79°C (ドライアイスアルコール), -196°C (液体窒素) で充分温度平衡に達したと思われるまで凍結した後融解し、これを二回くり返した試料についての、ATPase 活性、ATP 反応性、比粘度を測定した結果である。凍結融解後の試料は、定性的には対照と同じように再び溶解し、沈澱はみられない。

第 1 表にみられるように、比粘度、ATPase 活性共大体平行して数 10% 低下し、凍結融解によって明らかに変性が起こることが示される。

myosin B の変性が、蛋白濃度とどのような関係になるかについて -30°C の低温室中で凍結された試料についての結果を粘度についてみると、濃度の増加と共に変性の程度は小さくな

第 1 表 凍結融解による myosin B 0.6 M KCl 溶液の変性

凍 結 温 度	粘 度			ATPase 活性	
	初 期 粘 度 (η_{sp})	%	ATP 添加に よる粘度低下 (η_{sp})	$\sim P \tau / \text{min}$	%
Control	0.87	100	0.27	3.4	100
- 30°C	0.48	55	---	1.4	41
- 79°C	0.58	67	0.32	2.0	59
-196°C	0.63	72	0.30	2.2	66

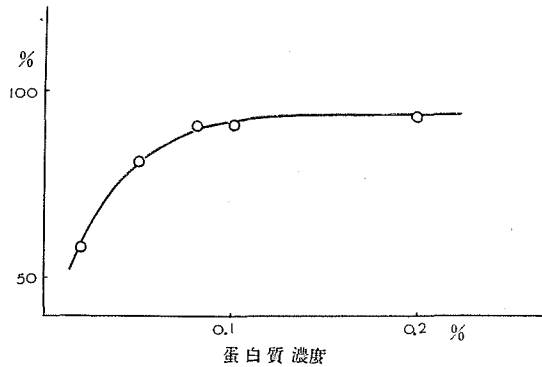
* 凍結処理はそれぞれ低温室(-30°C), ドライアイスアルコール(-79°C), 液体窒素(-196°C)で行った。凍結融解は二回くり返した。凍結速度は一定ではない。

り, 0.1% 以上で濃度と無関係にほぼ一定となる。以下に示す実験では, 蛋白濃度は全て 0.1% 以上に調整して行なった。

Catalase の酵素活性について, 小川¹⁾は, 凍結速度の小さいほど酵素活性が低下することを報告しているが, 第1表の結果も, 凍結速度又は到達温度との関係を暗示している。この点について更に検討するため, 融解速度一定の条件下で, 凍結の最終温度を一定にして凍結速度を変えた場合について実験を行なった。第2, 3, 4, 5図はその結果を示す。

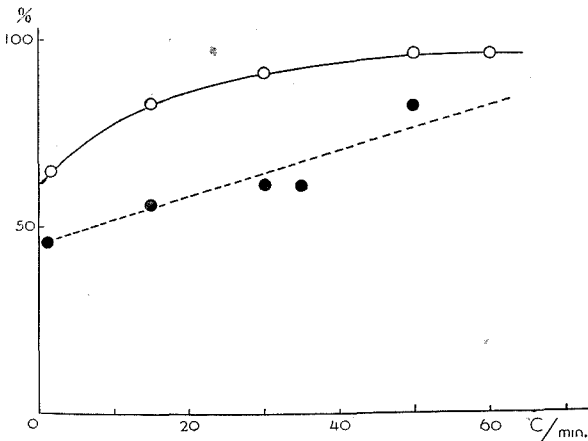
凍結融解の処理を行なう時の試料量が 4 ml でかなり多量なので, 試料各部位での温度平衡の問題が考えられるが, 相対的な値としては差支えないと考える。

凍結速度との関係については, catalase の場合¹⁾と同様, ATPase 活性は速度が小さいほど, 直線的に低下する。粘度もほぼこれに対応して低下するが, 速度が小さくなると急激に低下する傾向がみられる。一方, 到達温度を変えた場合, 温度が低いほど変性は大きくなり, ATPase 活性は直線的に低下し, 粘度は -120°C 付近までは低下は小さいがそれ以下の低温で急激に低下する。山崎等²⁾の報告したような変性が大きくなるような温度領域はこの条件ではみられなかった。後に考察するように, 変性が凍結速度の低下に依存して増大するのは興味ある事実と思われる。



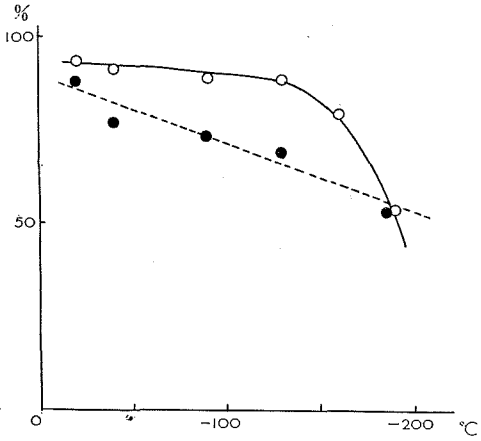
第1図 myosin B の凍結変性と myosin 濃度との関係

縦軸, 比変性 対照を 100 とした場合の比粘度の値



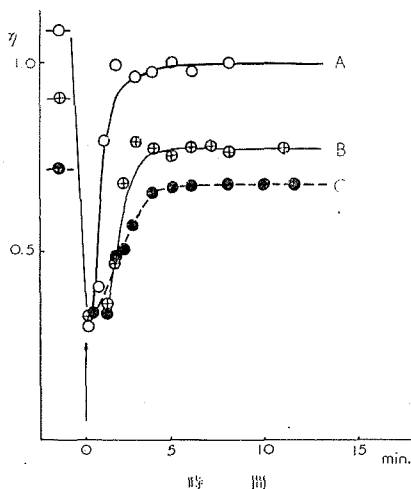
第2図 myosin B の変性に対する凍結速度の影響

縦軸は対照に対する比
横軸は凍結速度 ○ 比粘度
● ATPase 活性 最終到達温度は -50°C



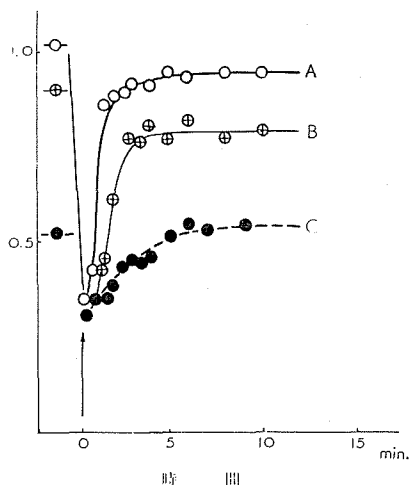
第3図 myosin B の変性に対する最終到達温度の影響

横軸は到達温度 凍結速度 $20^{\circ}\text{C}/\text{min}$
他は第1表と同じ



第4図 myosin B の ATP による粘度変化

縦軸 比粘度
横軸 ATP 添加後の時間
A…対照
B…凍結速度 15°C/min
C…凍結速度 1°C/min
到達温度 -50°C
矢印は ATP 添加を示す



第5図 myosin B の ATP による粘度変化

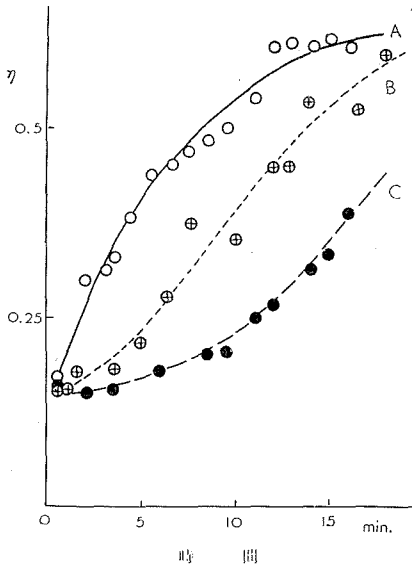
A…対照
B…最終到達温度 -40°C
C…最終到達温度 -190°C
凍結速度 20°C/min
矢印は ATP 添加を示す

同じ試料について、ATPを加えた時の粘度変化のパターンをみると(第4, 5図), 初期の粘度は凍結融解によって低下しているに拘らず, ATP添加直後の粘度の最小値はほとんど変化せず, 又時間とともに大体初期の粘度近くまで回復する。このことは, 凍結融解が myosin B の, $\text{myosin B} \rightleftharpoons \text{myosin A} + \text{actin}$ の解離に関与する機構, 少なくとも actin と myosin の結合点にはほとんど影響しないことを示すものと考えられる。又, 変性が大きいほど, ATP添加時の粘度変化において, 粘度の回復の傾斜がゆるくなり, ATPase 活性の低下と非常によく対応している。

2 actin の重合能, actin-myosin の結合能に及ぼす影響

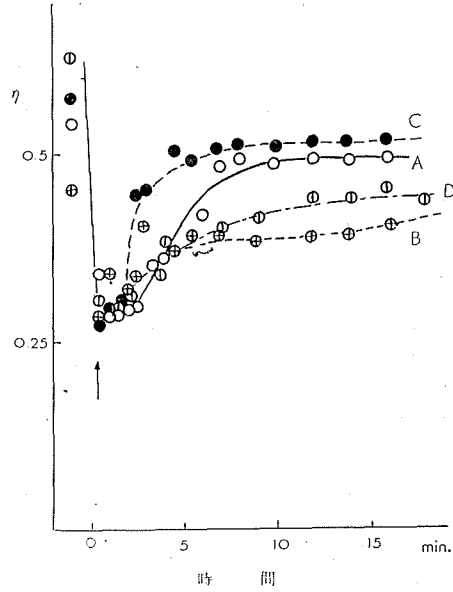
凍結融解による変性が実際に actin-myosin の結合点に影響するかどうかを更に検討するため, G-actin, myosin A を別々に凍結融解したのち, actin の重合能 (G→F 転換), myosin A の粘度, ATPase 活性およびこの actin と myosin を結合させた合成 actomyosin についての ATP 反応性および ATPase 活性を検討した。これらの結果を一括して第2, 3表に示す。

第6図は, 凍結融解した G-actin 溶液に, 終濃度 0.1 M KCl を加えた時の, G→F 転換の時間的経過を示したものである。この結果からみられるように, 凍結速度一定のとき, 到達温度の低いほど粘度の上昇, 即ち重合の速度が低下する傾向がみられるが, 最終の到達する粘度は対照とほとんど同じか, 又はわずかに低いのみであり, G-actin の凍結融解による変性は極めてわずかであると考えられる。



第6図 actin の G-F 転換におよぼす凍結融解の影響

縦軸 比粘度
横軸 KCl 添加後の時間
actin 濃度 2.5 mg/ml
A...対照 B...到達温度 -50°C
C...到達温度 -170°C
凍結速度 $50^{\circ}\text{C}/\text{min}$



第7図 actin-myosin 結合能におよぼす凍結融解の影響

縦軸 比粘度
横軸 ATP 添加後の時間
A...対照 B...AM*
C...A*M D...A*M*
* は凍結融解の処理を受けた試料
actin と myosin の濃度比は約 1:1

第2表 凍結融解による actin, myosin A の変性および actin-myosin 結合能への影響 (I)

No. 1 凍結速度 $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 到達温度 -50°C

	粘 度		反 能 性		ATPase 活性	
	初 期 粘 度		ATP 添加による粘度低下 (η_{sp})	KCl 添加による到達粘度 (η_{sp})	$\sim P7/\text{min}$	%
	η_{sp}	%				
A (cont.)	0.34	100	—	0.52	—	—
A*	0.32	94	—	0.34	—	—
M (cont.)	1.69	100	—	—	4.2	100
M*	1.98	117	—	—	3.4	81
A·M (cont.)	0.72	100	0.31	—	6.7	100
A·M*	0.69	96	0.31	—	6.1	91
A*·M	0.74	102	0.31	—	6.4	95
A*·M*	0.71	99	0.32	—	6.4	95

A...actin, M...myosin A, A·M...actin と myosin A を結合させた合成 actomyosin を示す。

* は凍結融解の処理をあらはす。

No. 2 凍結速度 50°C/min 到達温度 -50°C

	粘 度				ATPase 活性	
	初 期 粘 度		反 応 性		~Pr/min	%
	η_{sp}	%	ATP添加による粘度低下 (η_{sp})	KCl添加による到達粘度 (η_{sp})		
A (cont.)	0.34	100	—	0.52	—	—
A*	0.31	91	—	0.52	—	—
M (cont.)	1.69	100	—	—	4.2	100
M*	1.77	105	—	—	3.6	86
A·M (cont.)	0.74	100	0.31	—	7.3	100
A·M*	0.75	101	0.31	—	4.8	66
A*·M	0.75	101	0.28	—	6.5	89
A*·M*	0.66	89	0.31	—	5.3	72

第3表 凍結融解による actin, myosin A の変性および actin-myosin 結合能への影響 (II)

No. 3 到達温度 -50°C 凍結速度 50°C/min

	粘 度				ATPase 活性	
	初 期 粘 度		反 応 性		~Pr/min	%
	η_{sp}	%	ATP添加による粘度低下 (η_{sp})	KCl添加による到達粘度 (η_{sp})		
A	0.33	100	—	0.57	—	—
A*	0.22	97	—	0.57	—	—
M	0.62	100	—	—	7.0	100
M*	0.62	100	—	—	6.7	96
A·M	0.54	100	0.28	—	6.7	100
A·M*	0.46	85	0.29	—	6.2	93
A*·M	0.55	102	0.29	—	6.7	100
A*·M*	0.57	103	0.35	—	6.2	93

No. 4 到達温度 -170°C 凍結速度 50°C/min

	粘 度				ATPase 活性	
	初 期 粘 度		反 応 性		~Pr/min	%
	η_{sp}	%	ATP添加による粘度低下 (η_{sp})	KCl添加による到達粘度 (η_{sp})		
A	0.33	100	—	0.57	—	—
A*	0.31	94	—	0.48	—	—
M	0.62	100	—	—	7.0	100
M*	0.63	101	—	—	7.0	100
A·M	0.54	100	0.28	—	6.4	100
A·M*	0.46	85	0.29	—	6.4	100
A*·M	0.58	89	0.28	—	6.5	100
A*·M*	0.62	115	0.28	—	5.6	88

第2, 3表の結果にみられるように, myosin B は凍結変性によって粘度が低下するのに対して myosin A の場合は, myosin B の変性の大きい条件でも, 粘度はほとんど変化しないか, わずかに増加する。又, ATPase 活性の低下も myosin B と比較して小さい。従って, myosin A は凍結融解による変性は, この条件ではわずかであると考えられる。

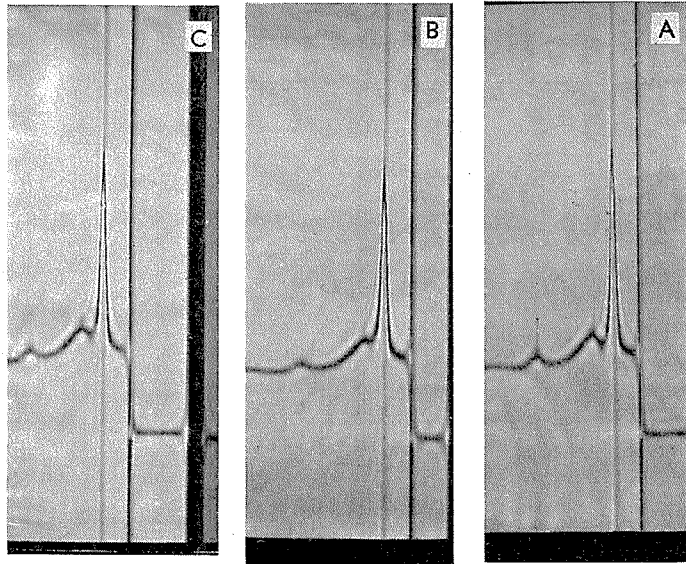
actin-myosin の結合能への影響をみるために, 各々凍結融解の処理をした actin と myosin の組合せ (合成 actomyosin) をつくり, その ATP 反応性および ATPase 活性を測定した (第2, 3表および第7図)。ATP 反応性は, そのパターンからみて, どのような組合せでも ATP 添加による粘度低下がほとんど同じであることから, 差がみられない。又, 初期粘度, ATPase 活性も, 組合せ方との明確な相関はみられない。このことから, 凍結融解が actin-myosin の結合能に対してはほとんど影響を及ぼさないことはほぼ明らかである。ただ, 処理した myosin を結合させたものは, ATPase 活性の低下が著しい傾向があるという事実は予想された処であるが, myosin A ATPase 活性の低下率より合成 actomyosin 活性の低下率が大きい傾向があることは, myosin B ATPase 活性に対して, 酵素の活性中心のみでなく分子全体の構造が大きな要因となっていることを暗示している。

3 沈降測定

既に示されたように, myosin B は凍結融解により著しい粘度の低下がみられるが, 粘度は一般に分子形態に依存するので, この事実から, myosin B 分子が凍結融解により断裂して subunit を放出する結果, 粘度の低下を示すのではないかということが考えられる。それで, 凍結融解した試料について, 沈降係数 S と, これと平行して, 粘度を固有粘度 $[\eta]$ ($[\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} \frac{\eta_{sp}}{c}$, c は溶媒 100 g 中の溶質の g 数) として測定した。第4表にその結果を示す。又, 第8図は

第4表 固有粘度および沈降係数

試料 (凍結法)	固有粘度 [η]	沈降係数 (S)		
		Peak 1	Peak 2	Peak 3
myosin B				
control	20	5.2	7.6	18
1°C/min で -50°C	15	5.2	7.1	18
急速に -80°C (>10°C/min)	17.5	5.0	7.1	17
				(C→0)
myosin A				
control	4.2		5.0	
急速に -80°C	5.7		4.6	
				(C=0.5%)
G-actin				
control	0.32		4.8	
急速に -80°C	0.60		5.0	
				(C=0.25%)
F-actin				
control	1.60		4.6	
急速に -80°C	0.70		4.5	
				(C=0.25%)



第8図 凍結融解した myosin B の沈降図

A…対 照 B…凍結速度 1°C/min -50°C
 C…比較的急速 (>10°C/min)-80°C
 0°C, 24 分後 蛋白濃度 0.8% r.p.m.=56100

myosin B の沈降図である。

この結果にみられるように、myosin B において、固有粘度は、前に比粘度で示した場合と同様、10 数%~数 10% 低下するのに対し、 S の値にはほとんど差がみられない。又、沈降図にもほとんど差がみられない。この結果から、myosin B の凍結融解による粘度の低下は、分子の断裂でなく、分子が部分的に unfold した結果の部分的形態変化によるものと考えられる。

myosin A においても、固有粘度は僅かな増加を示しているにも拘らず、 S にはほとんど差がみられない。

actin において、第 2, 3 表の結果に示すように、比粘度としての値では凍結融解により粘度の僅かな減少がみられたにも拘らず、固有粘度としては明らかに粘度の増加がみられる。分子形態に関与する要因としては固有粘度の方がより正しい値であるので、そちらをとると、G-actin が球状蛋白であることから unfolding によって粘度が増加することが考えられ、やはり分子形態の変化を示していると考えられる。F-actin は、 S はほとんど変化がみられないが、粘度が減少しているが、これは、fibrous な分子であることから、やはり myosin B と同様な部分的変形を示しているものと思われる。

4 熱変性、尿素変性との比較

凍結変性が、物理的過程であると考え、同様な物理的過程の一つとしての熱変性と比較するのは興味がある。又、凍結変性が水と関連した物理的要因で起るとすると、当然水素結合が問題になるので一般に水素結合に特異的に働くとされている尿素による変性と比較するこ

第5表 myosin B の熱変性

	初期粘度		ATPase 活性	
	η_{sp}	%	$\sim Pr/min$	%
Control	0.61	100	3.6	100
15°C 10時間	0.68	111	—	—
30°C "	0.72	118	1.3	36
50°C 1分間	0.72	118	2.1	55
70°C "	0.21	30	—	—

第6表 尿素による myosin B の変性

尿素濃度 (M)	粘度			ATPase 活性	
	初期粘度		ATP添加による粘度低下 (η_{sp})	$\sim Pr/min$	%
	η_{sp}	%			
0 (control)	0.65	100	0.37	3.3	100
0.1	0.62	95	—	3.1	94
0.5	0.60	92	—	—	—
1.0	0.58	89	0.32	3.1	94
2.0	0.34	52	0.28	1.26	36
3.0	0.31	48	0.25	0.6	17

* 処理時間 6時間

第7表 actin, myosin A および actin-myosin 結合能に及ぼす尿素の影響

	粘度			ATPase 活性	
	初期粘度		ATP添加による粘度低下	$\sim Pr/min$	%
	η_{sp}	%			
A (control)	0.39	100	—	—	—
A*	0.7	230	—	—	—
M (control)	1.85	100	—	2.2	100
M*	2.0	110	—	1.8	82
A·M (control)	1.2	100	0.42	9	100
A·M*	1.08	90	0.41	8	89
A*·M	0.74	62	0.35	9.2	102
A*·M*	0.46	38	0.35	9.2	102

* は 1 M 尿素で 6 時間処理させた合成 actomyosin

A···actin, M···myosin A, A·M は actin と myosin A を結合

とも意味があると考えられる。myosin の熱変性、尿素変性についてはすでに多くの報告^{7),8),9)}があるが、この実験で用いた試料について追試し、凍結変性の場合と比較する。

第7表は、いくつかの条件下での myosin B の熱変性の結果を示したもので、ATPase 活

性の低下と共に、粘度の著しい増加がみられる。これは既に報告された結果⁷⁾と同様で、分子の aggregation によるものと考えられ、myosin A でも同様な粘度の増加が知られている⁸⁾。

myosin B の尿素変性においては、第6表に示したように、凍結変性の場合と同様に ATPase 活性の低下と共に、粘度の著しい低下が認められる。但し、この場合も、初期粘度は低下するが、ATP 添加による到達粘度には差はみられない。第7表にみられるように、actin、myosin A の結果でも、凍結変性の場合と同じく myosin A の粘度の増加がみられる。又、actin は著しい粘度の増加がみられ、球状蛋白の unfolding であることが推察される。actin-myosin 結合能には差はみられない。即ち、現象的に、粘度測定の結果でみる限りにおいて、凍結変性は尿素変性に類似しているように思われる。

IV. 考 察

一般に、蛋白質が変性すると粘度が増加することはよく知られているが、これは蛋白の三次構造が崩れ、ほぐれる……unfolding……ことによるとされている。先に述べた結果にみられるように、myosin B においては、凍結融解によって、尿素変性の場合と同様、酵素活性の低下と共に著しい粘度の減少が認められた。myosin B は分子量 40~60 万、軸比約 100、長さ 11600 Å の細長い fibrous な構造を持つことが知られている⁹⁾。myosin B の、凍結変性による粘度の低下は、このように分子形態が非常に fibrous な構造を持つことによる分子形態の部分的変形であろうと考えられる。この場合、分子の断裂が起っていないことは、沈降係数、沈降図に差がみられないことから明らかなので、myosin B のように非常に軸比の大きい分子の場合、分子の一部が unfold すると、全体として軸比が小さくなって、*S* には比較的影響しなくても、粘度には非常に効いてくるものと考えられる。このことは、例えば actin の場合、球状蛋白である G-actin は、凍結変性による粘度の変化が比較的少ないに拘わらず、fibrous な構造の F-actin は非常に粘度が減少していることも同様な説明が出来る。myosin A は、myosin B と同様、分子量約 80 万、軸比 80~100 の fibrous な構造⁹⁾であるにも拘わらず、myosin B と同じ凍結条件でも、変性の程度が小さく、粘度はむしろ僅かに増加している。このことは上の考えでは説明がつかないが、myosin B の場合、actin と結合していることによって、全体として構造的に弱い状態になっているのではないかと思われる。myosin A は尿素変性に於いて、subunit を遊離するのに長時間を要することが知られている⁹⁾ように、myosin B より構造的には比較的安定な状態であると思われる。G-actin は、重合の速度が低下する傾向がみられるが、粘度、myosin との結合能に比較的影響が少ないことから、変性の程度は小さいと考えられ、分子形態が球状であるため比較的稳定であると思われる。

myosin B の凍結変性に於いて、特定の影響を受け易い site があるかどうかということ、例えば ATPase 活性が低下することから、活性中心が影響され易いのではないかという問題については、同一条件で myosin A の ATPase 活性の低下が myosin B に比較して比較的小さいことや、myosin B の ATP 反応性への影響がみられないことから、ATPase 活性中心及び

actin-myosin 結合 site への直接の影響は少ないものと考えられる。この事は又魚肉の myosin B に於いて、凍結保存中に ATPase の活性中心とされている -SH 基の変動がみられないにも拘わらず ATPase 活性の低下が認められるという報告⁹⁾からも支持される。従って、凍結変性による ATPase 活性の低下は、分子全体の構造的変形による二次的影響と考えられる。

凍結融解による変性の機構そのものについて考察すると、特にここで使用した myosin B の場合、0.6 M KCl 溶液の状態での処理することから、最初に考えられるのは、凍結中の塩の濃縮化による変性が考えられる。しかし、この実験は、全て KCl の共融点である -12°C 以下で行っており、又、変性が凍結温度に依存すること及び凍結中の少なくとも共融点に到達するまでの時間が比較的短いことから、塩濃縮による変性は考えられない。従って、溶媒の水自体の物理的状態変化が主要な要因であると考えてよいと思われる。

蛋白が、分子の周囲に水和した水を有し、水素結合で蛋白分子と結合して、且つ、蛋白の構造を維持する上に重要な役割を持つことが知られているが、これは蛋白の凍結変性の機構を考える上に重要な手がかりを与えるものと思われる。近年、水和水が ice like (icebergs) の構造を持ち、蛋白の構造や機能の維持に密接な関係があることを示すいくつかの報告がある^{10),11)}。又、尿素等の、今迄直接蛋白の三次構造の結合に作用すると考えられていた変性剤が、溶媒の水の構造を変える、いわゆる structural breaker として、水和水の構造に影響を及ぼすことによって間接的に蛋白の変性を起すのではないかという考え方¹¹⁾は興味ある問題である。

蛋白の凍結変性に於いて、このような知見から推論して、凍結の過程で溶媒としての水の氷晶化の進行が水和水に影響を及ぼすのではないかと予想されるが、蛋白の水和水の状態、氷の物性が充分明らかでない現在は明確な説明を与えることはできない。四釜¹²⁾は、catalase, myosin A, B を比較的急速な凍結条件で凍結融解した場合の変性に於いて、変性が比較的大きい温度領域 (-20°C ~ -100°C) が存在し、その温度限界が氷晶の結晶形の転移点と考えられている温度¹³⁾と一致することから、氷晶の結晶形が急速に水和水の構造 (iceberg) と同じになれば変性が少ないという考えを提出した。著者の実験では、凍結速度がそれと比べ比較的緩慢で、そのような温度領域は見出せなかったが、先に述べた結果から、凍結速度一定の時に変性が温度に依存して増加するという事実は、単なる氷晶形の転移点のみでは説明できない。凍結速度が比較的小さい場合に、周囲の氷晶化の進行に伴い、氷分子と水和水との相互作用が起り、水和水の結合や配向の状態に変化が起るのではないかと想像される。到達温度一定の時に、凍結速度の小さいほど変性が大きくなるということは、小川¹⁾が catalase についても同様な結果を得ているが、これは氷晶化がゆっくりと進行するため水和水と氷晶との相互作用を仮定すれば、その時間が長くなる結果、水和水への影響が大きくなるためと想像される。又、変性が到達温度が低いほど大きい、即ち、温度に依存するという事実は、水和水の付近にある溶媒としての水は比較的凍結し難く、温度を非常に低くすると始めて凍結し得るような状態にあるのではないかという可能性が考えられる。従って、到達し得る温度が低いほど水和水と接している部分の氷晶化が進行して、その結果相互作用が大きくなり、変性が增大するのではないかと想像さ

れる。第3図の温度依存の場合、粘度の曲線の傾斜が、 -150°C 前後から急激に大きくなるのは、ここで考えた二つの要因が加重されたためと考えることが出来る。

結局、凍結変性の機構として、先に述べた実験結果および諸種の知見から、凍結の過程で起る水の状態変化のため、水和水の結合、配向状態に変動が起り、その結果蛋白分子の弱い部分(恐らく蛋白の三次構造を支える水素結合と思われる)が破壊され、融解の過程で分子の一部に unfolding を起して分子形態が部分的に変化し、それに伴う二次的影響として酵素活性が低下するものと考えられる。尿素変性の結果が現象的に凍結変性に類似することはこのような考えを支持するものと思われる。

今後は、実験的に凍結中の蛋白の水和水の挙動を追跡することが必要であり、それによって、蛋白の凍結変性の機構をより具体的に明らかにし得ると期待される。

終始御鞭撻を賜った根井教授並に種々御批判を戴いた研究室員諸氏に感謝の意を表する。

摘 要

凍結融解による蛋白質の変性を検討するため、fibrous な蛋白の例として myosin B をとりあげ、凍結融解した試料について、ATPase 活性、ATP 反応性、粘度、沈降係数を測定した。又それと関連して、myosin A, actin について、凍結融解後の ATPase 活性、actin の重合能、actin-myosin 結合能をしらべた。

得られた結果は次のようである。

1) 凍結融解により myosin B の粘度、ATPase 活性は低下し、明らかに変性していることを示すが、ATP 反応性は変わらない。融解速度一定のとき、凍結温度が一定であると凍結速度の小さいほど変性が大きく、凍結速度一定なら凍結温度の低いほど変性が大きい。

2) myosin A は凍結融解によって僅かに粘度が増加し、ATPase 活性の低下は同一凍結条件で myosin B より小さい。

3) actin の G \rightarrow F 転換の重合の速さは凍結融解によって低下するが、到達する粘度は対照と変わらない。

4) 各々凍結融解した actin と myosin A との諸種な組合せによる合成 actomyosin の ATP 反応性が、差がみられないことから、actin-myosin 結合能には影響がないと考えられる。

5) 沈降係数および沈降図は、凍結融解した試料について差がみられない。この場合、myosin B の固有粘度は明らかに減少している。

6) 凍結変性は現象的に尿素変性に類似している。

以上の実験事実から、myosin B の凍結変性は、溶媒としての、蛋白の周囲の水の状態変化…氷晶化…による間接的な影響として、分子内の三次構造を構成する水素結合が破壊され、部分的 unfolding の結果、部分的な分子変形が起ることによるものと考えられ、この場合に蛋白の水和水が重要な役割を果すのではないかと想像される。

文 献

- 1) 小川忠人 1953 酵母のカタラーゼに及ぼす低温の影響 (III). 低温科学, **10**, 191-199.
- 2) Shikama, K. and Yamasaki, I. 1961 Denaturation of Catalase by freezing and thawing. *Nature* **190**, 4770, 83-84.
- 3) Connell, J. J. 1960 Changes in the Adenosinetriphosphatase activity and sulphhydryl groups of Cod flesh during frozen storage. *J. Sci. Food. Agric.* **11**, May, 245-249.
- 4) Connell, J. J. 1960 Changes in the Actin of Cod flesh during storage at -14°C . *J. Sci. Food. Agric.* **11**, Sept. 515-519.
- 5) 松宮弘幸 1957 蛋白質精製法. 蛋白質核酸酵素, **2**, No. 6, 455-462.
- 6) 永井寅男・小西和男 1958 Actomyosin, ATP系酵素研究法 III. 602-604, 朝倉書店.
- 7) 安井 勉 1959 ミオシン ATPase の変性. 蛋白質核酸酵素, **4**, No. 5, 339-340.
- 8) Johnson, D. and Rowe, A. S. 1961 The spontaneous transformation of myosin. *Biochim. Biophys. Acta.*, **53**, 343-359.
- 9) 殿村雄治 1957 筋肉の構造蛋白質. 蛋白質化学, **5**, 168-233, 共立出版.
- 10) Klotz, I. M. 1958 Protein hydration and behavior. *Science* **128**, 815-822.
- 11) 浜口浩三・黒野朝子・後藤幸雄 1961 蛋白質及び核酸の構造に於る水の役割. 生物物理, **1**, No. 3, 40-44.
- 12) 四釜慶治 1962 凍結融解による蛋白質の変性. 第72回低温科学研究所談話会講演.
- 13) 関 集三 1959 氷および水. 物性物理学講座, **11** p. 135-220, 共立出版.

Résumé

In order to investigate the denaturation of protein caused by freezing and thawing, enzymatic activity and some other physico-chemical properties of certain frozen-thawed materials such as myosin-B, myosin-A and actin were examined.

The results obtained were as follows:

- 1) ATPase activity and viscosity of myosin-B in 0.6 M KCl solution were reduced by freeze-thawing. Based on this fact it is recognized that myosin-B was denatured by freeze-thawing, although no change was observed in ATP sensitivity. The lower the final freezing temperature of the materials at a constant rate of cooling and the slower the rate of cooling during freezing to a given temperature, the more the denaturation becomes evident.
- 2) Slight rise in viscosity of myosin-A in 0.6 M KCl solution was observed. ATPase activity of myosin-A decreased less than that of myosin-B under the same freezing condition.
- 3) The rate of G-F transformation of actin was lowered, but its viscosity finally reached the same value as in the control.
- 4) There seems to be no change in the binding ability of actin to myosin, since the ATP sensitivity was never affected.
- 5) There was no remarkable change in sedimentation coefficient and sedimentation pattern, though the intrinsic viscosity of myosin-B was reduced obviously.
- 6) The denaturation of myosin by freeze-thawing was closely similar in nature to that by urea.

From the results described above, it is considered that the denaturation of myosin-B

caused by freeze-thawing may be due to the alteration in molecular configuration of protein, a part of which is unfolded by breaking of intramolecular hydrogen bonds as a result of the change of physical state of water surrounding protein.

It might be also supposed that the behavior of hydration water of protein during freezing is the most important factor on the protein denaturation by freeze-thawing.