HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	凍結融解による myosin-A の変性
Author(s)	花房, 尚史
Citation	低温科學. 生物篇, 22, 119-131
Issue Date	1964-10-20
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/17687
Type	departmental bulletin paper
File Information	22_p119-131.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

Naofumi HANAFUSA 1964 Denaturation of Myosin-A resulting from Freeze-Thawing.
Low Temperature Science, Ser. ***B, 22.*** (With English Summary p. 131)

凍結融解による myosin-A の変性*

花房尚史
(低温科学研究所　医学部門)

(昭和39年7月受理)

I. 緒　　言

著者は，さきに myosin-B について，凍結融解によって，冷却速度及び凍結温度の双方に依存して，ATPase 活性の減少と粘度の低下がみられること，又 myosin-A については，やはり凍結融解によって ATPase 活性の減少と共に粘度の増加がみられること，そしていずれの場合も超遠心的には均一であることから，この粘度の変化は，分子の三次構造が部分的にこわれていることを示すものと報告[1]した。

今回の論文は，蛋白分子の凍結融解による三次構造の変化の機構を明らかにするため，凍結融解した myosin-A について，粘度，酵素活性，超遠心法と共に，主として旋光分散測定による helix content の測定と，紫外差スペクトルの測定から hydrophobic group の挙動を指標にして，molecular conformation の変化をみたものである。 myosin-B は溶液が不透明で旋光測定が不可能なため用いることは出来なかった。

この結果，myosin-A についても，myosin-B と同じく，凍結温度への依存性がみられ，粘度，酵素活性の変化と対応して helix content が減少することが明らかになった。

又，凍結融解による変性に対する防護効果をみるために，いくつかのいわゆる helical forming agent として知られている有機溶媒の影響と，pyrophosphate の共存効果を調べた。

更に又，全体としての分子形態の違いによる凍結変性の差から，蛋白の凍結変性の機構の一端を推定出来るのではないかと考え，myosin-A を trypsin 分解して得られる H- と L-mero myosin について，主として旋光分散と差スペクトルによって凍結融解による変性を調べた。

以上の結果から，myosin の凍結融解による変性とその機構について考察を試みたものである。

II. 材料および方法

1. 材　　料

myosin-A の抽出，精製については前報[1]と同様で，蛋白濃度 2～3%，0.5 M KCl 溶液として 0°C で保存，抽出後 14 日以内に使用した。

---

* 北海道大学低温科学研究所業績　第687号
この研究は，「蛋白質と水」という共同研究課題の一つとして，阪大蛋白質研究所において，昭和38年度共同研究員として滞在中行なった。

H- と L-meromyosin の抽出，精製は Szent-Györgyi の方法[2] に従った。即ち，Borate buffer を用い pH 8.8 とした 1 % myosin-A 0.5 M KCl 溶液に 0.1% trypsin を加え 12 分間反応させた後，0.1% trypsin inhibitor を加え反応を停止させ，5 日間放置後，透折して H- と L- を分離した。その後の精製も同法によった。H-meromyosin は水溶液として，L-meromyosin は 0.5 M KCl 溶液として 0°C で保存，いずれも 14 日以内に使用した。

2. 方　法

粘度および酵素活性：粘度は水流下時間 37 秒の Ostwald 粘度計を用い，温度 26°C で測定した。酵素活性は，蛋白濃度 0.08%，0.5 M KCl 溶液 pH 7.0 Tris buffer, Ca 1 mM，基質 ATP 1 mM, 26°C として split される Pi を Fiske-Subarrow 法により，波長 660 mμ で日立分光光度計で比色定量する。尚，蛋白濃度は micro-Kjelderl 法と Büret 法を用いた。

旋光分散：測定は Rudolph Model 200 で 10 cm セルを用い，Hg 光源を使用して 5 点の波長で測定した。温度は室温 (20°C) で補正はしなかった。各波長について得られる比旋光度 $[\alpha]$ を Moffit-Yang の式に入れて

$$[\alpha]=\left(\frac{100}{M_0}\right)\left(\frac{n^2+2}{3}\right)\left[\frac{a_0\lambda_0^2}{\lambda^2-\lambda_0^2}+\frac{b_0\lambda_0^4}{(\lambda^2-\lambda_0^2)^2}\right] \tag{1}$$

$$\therefore \frac{\lambda^2-\lambda_0^2}{\lambda_0^2}[\alpha]=\left(\frac{100}{M_0}\frac{n^2+2}{3}\right)\left[a_0+\frac{b_0\lambda_0^2}{\lambda^2-\lambda_0^2}\right] \tag{2}$$

$[\alpha](\lambda^2-\lambda_0^2)/\lambda_0^2$ を $\lambda_0^2/(\lambda^2-\lambda_0^2)$ に対してプロットすると直線が得られる。この直線の勾配から高分子，蛋白の helix content に寄与し，それに比例する値 b_0 が得られ，又この直線の切片から，やはり helical conformation に寄与はするが，溶媒効果も関与すると考えられている a_0 が求められる。

但し，上式で n は溶媒の屈折率，M_0 は平均残基量，λ は測定に用いた波長である。λ_0 としては通常用いられている 212 mμ を用いた。尚，b_0 を −600 で割るといわゆる helix content が得られるが，ここではそれに比例するので，b_0 の値をそのまま用いた。

紫外吸収差スペクトル：myosin-A, H- と L-meromyosin はいずれも tryptophan, tyrosine を持っているので，250〜320 mμ の波長域で，native な試料を対照として直接差スペクトルを測定した。用いた装置は Cary Model 14 自記記録式分光光度計である。

超遠心：蛋白濃度 0.3%，0.5 M KCl 溶液 pH 7.0 Tris buffer の試料について，Spinco Model E を用い，56,100 r.p.m, 20°C で沈降速度を測定した。

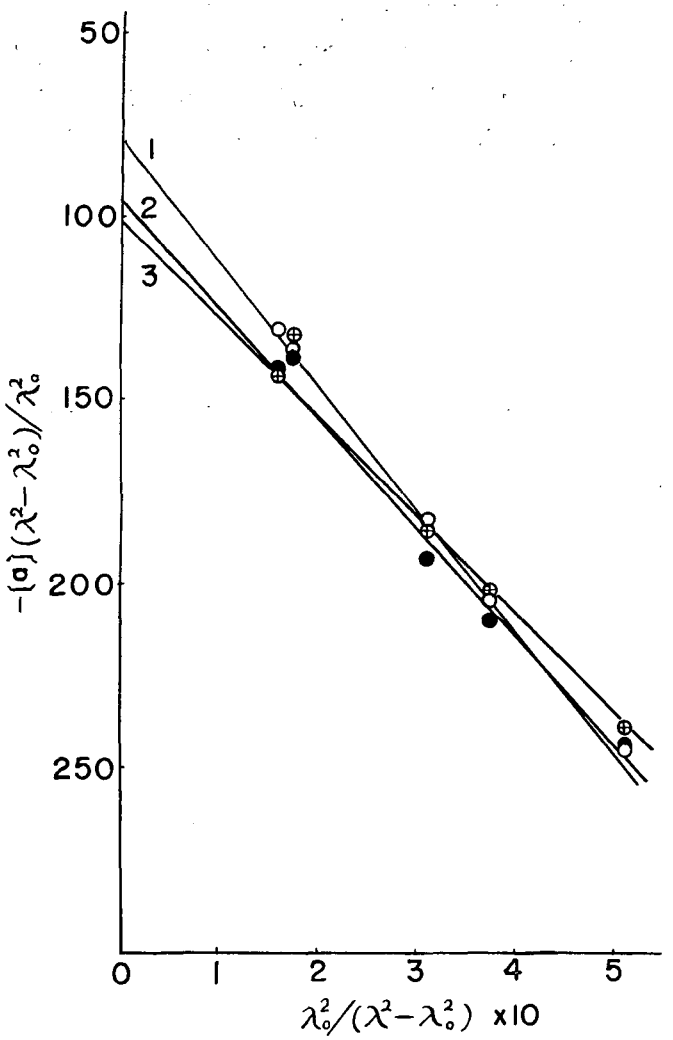
凍結融解：試料は全て 5 mℓ ずつを中試験管にとり，それぞれの温度の bath に入れ，15 分間放置して凍結させた。寒剤としては，0°C〜−120°C では propyl alchol-liq. N_2, −150°C で isopentane-liq. N_2, −196°C で liq. N_2 を用いた。各凍結温度の試料について，凍結の途中の履歴をできるだけ等しくするため，全ての試料を −10°C の bath から順次低い温度の bath に移してゆき，途中それぞれの温度で試料をとり融解した。融解は全て 30°C の water bath 中で振りながら行なった。

III. 結　　果

myosin-A

1) 旋光分散，粘度，および酵素活性

第1図は各温度で凍結融解した myosin-A 0.5 M KCl 溶液 (0.05 M Tris buffer pH 7.0 蛋白



第 1 図　凍結融解した myosin-A の旋光分散による Moffit-yang プロット

1. 対　　照　　$-a_0=80$　　$-b_0=326$
2. −20°C で凍結　　〃　97　　〃　292
3. −196°C 〃　　〃　101　　〃　268

但し，$\lambda_0=212\ m\mu$

蛋白濃度　0.8%

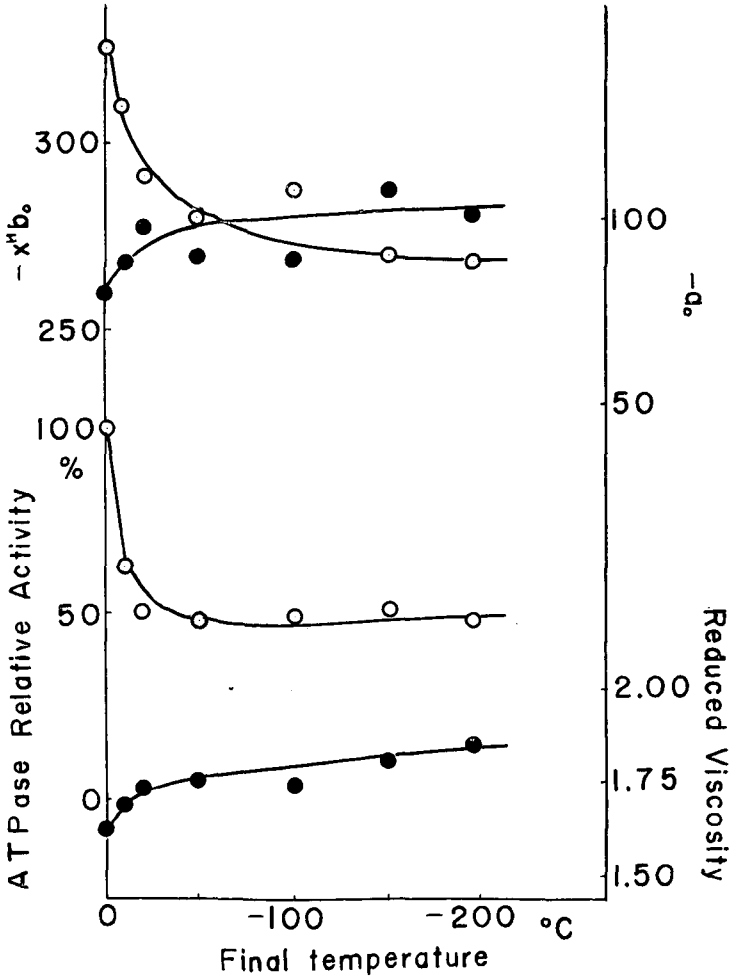
溶媒　0.5 M KCl　0.02 M Tris buffer　pH 7.0

温度　20°C

濃度 0.8%) について旋光分散を測定し，Moffit-Yang のプロットとして示したものである。この図から見られるように凍結温度が低いものほど直線の傾斜が小さくなっている。直線の勾配から helix content に比例する値として b_0 が，切片からやはり helix content に寄与すると共に溶媒効果も関与していると考えられている項 a_0 が求められる。

一般に，native な myosin-A の b_0 は −340～−350 とされているが，ここで用いた試料は −320～−330 でやや低い値である。しかし大体一致した値と考えられる。

第 2 図は，同じ試料について，旋光分散の結果とともに，還元粘度 (η_{SP}/c, c は溶媒 100 g 中の溶質の g 数) と ATPase の比活性を測定し，凍結温度に対してプロットしたものである。この結果から，b_0 値，a_0 値，粘度，酵素活性の全てが −50°C まで温度と共に変化し，その後



第 2 図　凍結融解した myosin-A の変性と凍結温度との関係

上欄　—○—　$-b_0$ 値　　—●—　$-a_0$ 値

下欄　—○—　ATPase 比活性　　—●—　還元粘度

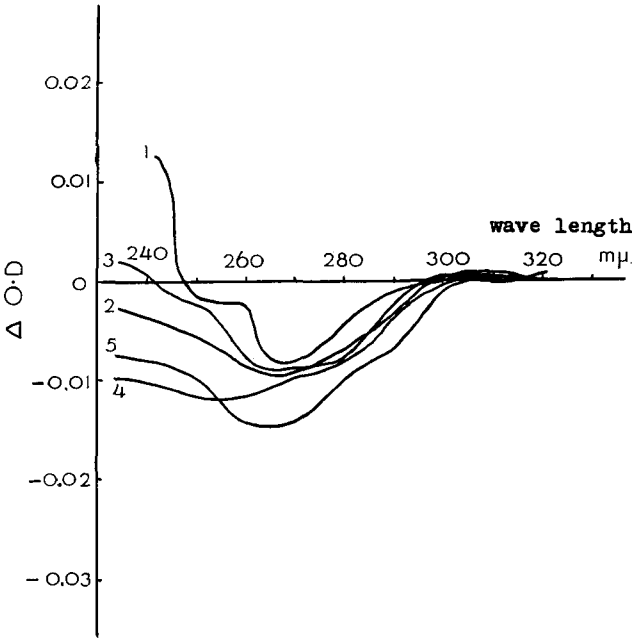
ほぼ一定になることがわかる。

粘度の増加と対応して，$-b_0$ 値が減少し，$-a_0$ 値が増加しているが，これは典型的な α-helix 型の蛋白の transconformation を示す pattern であり，α-helix の一部分が random coil になったことを示している。但し，酵素活性が 50% ほどに低下しているのに比べると，$-b_0$ の変化は高々 20～30% ほどでそれほど大きくはないが，しかしこの結果によって，凍結融解した myosin-A はその helix の一部がこわれ tronsconformation が起ることが明らかにされた。

紫外差スペクトル

蛋白分子が何等かの原因で transconformation を起すと，内部に組み込まれてその構造を維持するのに寄与している tryptophan, tyrosine 等の hydrophobic group が外に裸出する。従って native な試料を対照として 250～320 mμ で直接吸収の差をとると吸収が短波長にずれるためいわゆる blue shift がみられる。逆にいえば，blue shift が観察されることは，transconformation が起っていることを示すことになる。

第 3 図は，旋光分散により transconformation のみられた myosin-A について，250～320mμ の波長域について差スペクトルを測定した結果である。



第 3 図　凍結融解した myosin-A の紫外差スペクトル
1 …… −20℃, 2 …… −50℃, 3 …… −100℃, 4 …… −150℃,
5 …… −196℃ でそれぞれ凍結したもの

図に見られるように，通常の変性剤による変性の場合に得られる差スペクトルの結果より非常に小さく，ブロードであるが，270 mμ 附近にピークを持つ blue shift がみられることから tyrosine 残基に主として変化が起っているのではないかと考えられる。又，270 mμ のピーク

及び 285～290 mμ の吸収 (tryptophan) は凍結温度の低いものほど大きくなっており，先の第2図の結果と同様な傾向を示している。このことからも，凍結融解によって，helical conformation が変化しているという考えが支持される。

尚，この場合に blue shift が他の変性の結果より小さいことについてはのちに考察する。

超 遠 心

同様に凍結融解した試料 (−100°C) で超遠心法により沈降図形を調べた結果，前に報告した結果[1] と同様，native な試料との差はほとんどみられず，先に示したような粘度の変化などの現象が，myosin-A の解離会合によるものではないことが確認された。

有機溶媒およびピロ燐酸の影響

有機溶媒のなかで，polypeptide や randomcail 状の蛋白に helix をつくらせる働きのあるものがいくつか知られているが，凍結融解してこわれた myosin-A の helix がこのような有機溶媒によって復元しないかということ，或いは一緒に加えて凍結した場合に保護効果を持たないかということを旋光分散によって調べた。

又，pyrophosphate (PPi) が myosin-ATPase の熱変性に対して保護効果があることが知られている[3] ので，凍結融解に対しても同様な効果があるかどうかについても調べた。

myosin-A のこれらの溶媒に対する溶解性について調べた結果，2-chloro-ethanol 3%，Dioxane 11%，Dimethyl formamide 10% までしか溶解しないことが判ったので，myosin-A 1% に終濃度で上記の濃度の有機溶媒及び 0.5 M KCl, 0.05 M Tris buffer, pH 7.0 として，前と同じ方法で −100°C まで凍結して融解すると，完全に gel 化して非可逆的な変性がおこるのがみられた。これは凍結の過程での有機溶媒の濃縮化のため濃度が高まった結果と考えられる。但し初めにこれに 1m M PPi を加えておくと，やはり融解後は不溶性の沈澱を生じたが，有機溶媒のみの場合よりは mild な変性ではないかと思われるような結果を示した。PPi の共存効果については，Tonomura ら[4] が myosin-A に10% dioxane を加えた時の変旋光でやはり効果がみられることを報告しているが，この結果からも，PPi が共存することによって何等かの保護効果があるらしいことが推察される。

更に，凍結融解した myosin-A への復元作用をみるために，凍結融解して $-b_0$ 値の減少がみられた myosin-A に上記濃度でこれらの有機溶媒を加えると，native な myosin-A では完全に溶解するようなこの濃度でも沈澱を生じ，完全に不可逆的な変性が起っていることが推察された。しかし，上記濃度の有機溶媒と共に 1 m M PPi を加えると完全に溶解した。

第1表は，その結果で，−100°C で凍結融解した試料に 1 m M PPi と各種の有機溶媒を加えて直ちに旋光分散を測定して得られた結果である。結果にみられるように，PPi のみでは全く添加試薬のない場合とほとんど変らないが，2-chloro-ethanol 又は dioxane + PPi の場合は，native 又はそれ以上の値まで $-b_0$ が増加している。これは一度 random になった部分が再び helix を形成したのではないかという可能性を示している。dimethyl-formamide+PPi ではほとんど影響はみられなかった。

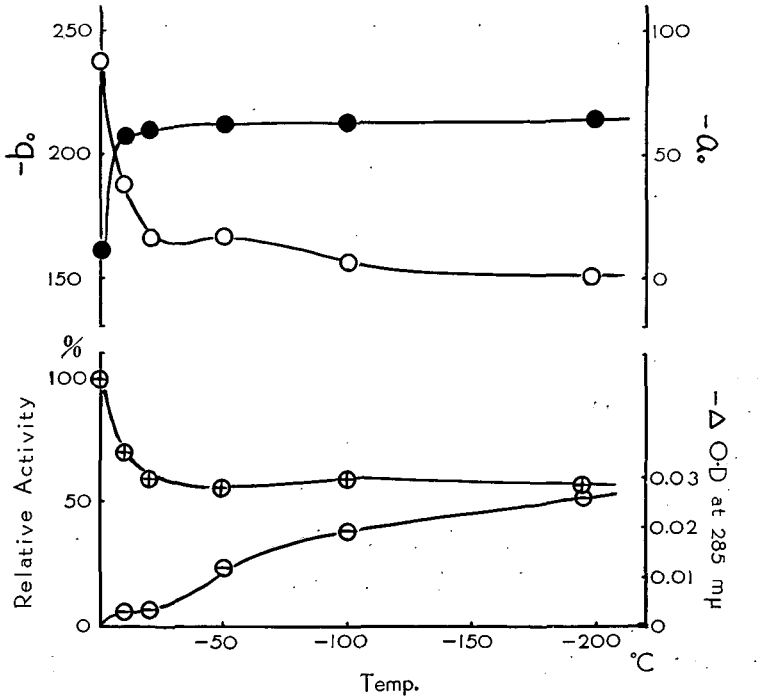
第 1 表　凍結融解した myosn-A に対する有機溶媒と pyrophosphate の影響

	$-a_0$	$-b_0$
対　照　(未　凍　結)	80	320
試　薬　な　し	75	210
1 mM pyrophosphate (PPi)	69	180
3 % 2-chloro-ethanol　1 mM PPi	31	328
10% dioxane　1 mM PPi	43	302
10% dimethyl formamide　1 mM PPi	57	214

凍結温度　−100°C

2. meromyosin

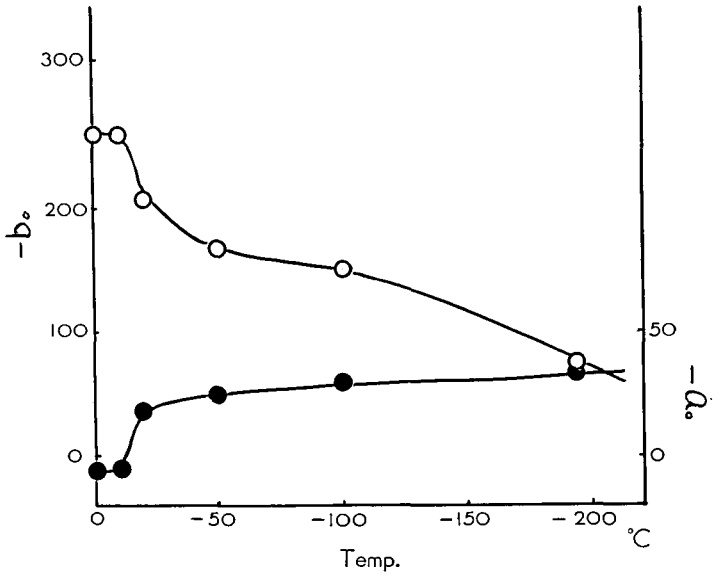
myosin-A が凍結融解により変性し易いということを，その構造の特異性のため，即ち，α-helix 型で helix content が多く且つ軸比が大きい fibrous な形であるため不安定な構造であるからと考えると，同一蛋白より得られる二つの異なった type, 即ち globular な部分と fibrous な部分の凍結変性を比較することによってそれが確かめられると思われる。又，myosin-A で $-b_0$ 値が減少しているにも拘らず差スペクトルで blue shift がそれほど明らかでない理由が後



第 4 図　凍結融解した H-meromyosin の変性と凍結温度との関係

—○—　$-b_0$ 値　　—●—　$-a_0$ 値，

—⊕—　ATPase 比活性　　—⊖—　差スペクトルによる 285 mμ での高さ



第 5 図 凍結融解した L-meromyosin の変性と凍結温度との関係
—○— $-b_0$ 値 —●— $-a_0$ 値

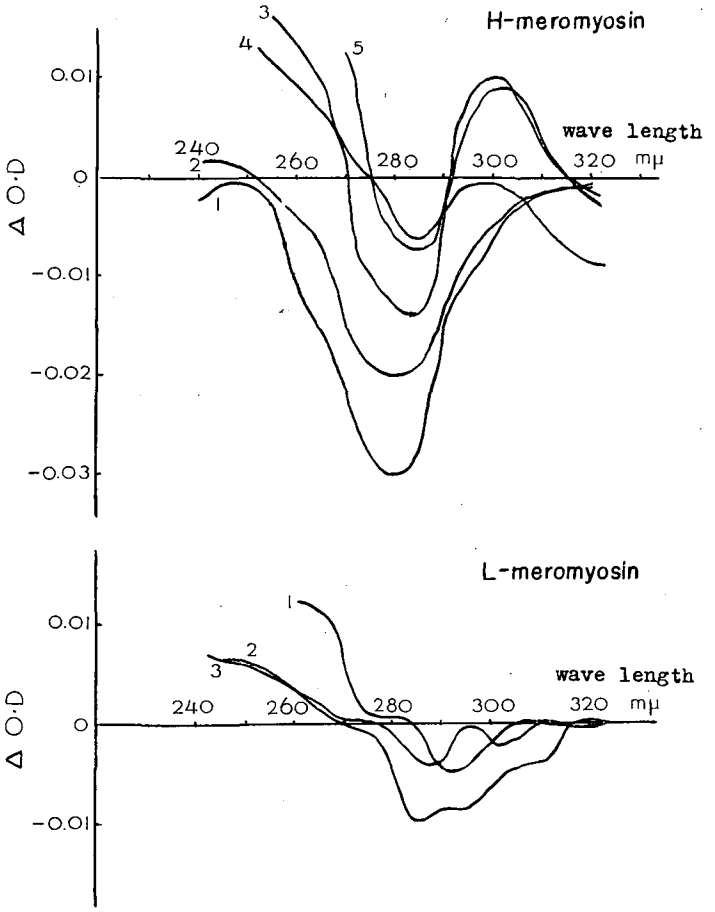
に考察で述べるような理由であるとするならば，この点についても上の二つの比較で或る程度いえると思われる。

このような意味で myosin-A を trypsin 分解して得られる H-meromyosin (α-helix, globular type) と L-meromyosin (α-helix, fibrous type) について凍結変性を比較した。

第 4 図，第 5 図は，H-meromyosin (H-M) と L-meromyosin (L-M) を同時に同じ条件で凍結融解の処理をした試料について，旋光分散および H-M については ATPase 活性の測定結果を，凍結温度についてプロットしたものである。又，双方について差スペクトルを測定した結果を示したのが第 6 図である。

この結果にみられるように，H-M, L-M 共に myosin-A と同様に凍結温度に依存して $-b_0$ 値の減少と $-a_0$ 値の増加と共に酵素活性の低下がみられる。そして b_0 値についてみると H-M の方は最大 70～75% 程度までしか減少しないにも拘らず，L-M の方は 35% 程度まで減少することから，明らかに L-M の方が transconformation が大きいと考えられる。H-M の ATPase 活性は −20℃ 以下ではほぼ一定で 60% 程度に低下している。L-M で −10℃ で b_0 が変らないのは，溶媒が 0.5 M KCl のためこの温度では完全に凍結していないのではないかと考えられる。

紫外差スペクトルの結果についてみると，hydrophobic group についてはほぼ同じ order の濃度であり，且つ b_0 値の変化は明らかに L-M が大きいのにも拘らず，myosin-A, L-M に比べて H-M ではかなり明瞭な blue shift がみられる。又，285 mμ 附近の tryptophan 残基によると考えられる peak の値は，旋光分散その他の結果と同じく，温度とともに増加している。



第 6 図　凍結融解した H- と L-meromyosin の紫外差スペクトル
上. H-meromyosin, 1：−196°C, 2：−100°C,
3：−50°C, 4：−20°C, 5：−10°C でそれぞれ
凍結したもの
下. L-meromyosin, 1：−20°C, 2：−50°C,
3：−196°C で凍結

以上の旋光分散および差スペクトルの結果から，H-M, L-M 共に凍結融解によって transconformation が起っていることが判るが，b_0 値でみる限り，fibrous type の L-M の方がより大きい変化を起しているのではないかと考えられる。又，H-M では明らかにみとめられる差スペクトルの blue shift が L-M で非常に小さいということは，後に考察で述べる考えを支持するものと思われる。

IV. 考　　察

以上述べた結果にみられるように，凍結融解した myosin-A において，酵素活性の低下，粘度の増加と共に，これと対応して，一般に α-helix 型の蛋白の transconformation において

みられるような $-b_0$ 値の減少と $-a_0$ 値の増加がみられ，又これと共に紫外差スペクトルにおいて弱いながらも blue sift がみられるということから，凍結融解によって myosin 分子の helical conformation が，部分的にこわれて random 状態になることが明らかになった。しかし，この粘度，b_0 値の変化は，他の種々の変性剤による変性の場合より比較的小さく，b_0 値は高々 20～30% 減少するだけであることから，変性の要因としては比較的穏和な条件であることは確かである。

しかし，myosin-B の場合と同様に，酵素活性，粘度，旋光分散，差スペクトル等の全ての値が，凍結温度が低くなるほど（但し −50°C 以下ではゆるやかになるが）大きく変化することは，前報で述べたように凍結融解による変性が溶媒の水の凍結状態の変化が一次的な原因になっていることを示していると思われる。Shikama[5] が myosin-A について示したような，変性が特に大きくなるような，氷の結晶形の転移点と結びつくような特定の温度領域があるということは，今回の著者の結果からも認められなかったが，これは主として凍結方法の違いによる凍結条件の差によるものと思われる。

凍結処理による酵素活性の低下が，分子全体の conformational な変化に起因するかどうかという問題については，myosin-A および H-M の結果にみられるように $-b_0$ 値の減少が 80～70%の減少であるのに対し，酵素活性の低下は 50～60% であって必ずしも 1:1 の対応でないことと，b_0 値は −50°C 以下の温度でも次第に温度と共に低下するが，酵素活性はほぼ一定になるという事実から各々別個の現象と考えた方がよいと思われる。Tonomura[4] 等も述べているように，全体の conformational な変化と同時に起るであろう active site 附近のちょっとした structural な変動が原因であると考えてよいと思われる。

myosin-A において，差スペクトルの blue shift がそれほど強くないということは，最も大きい理由としては，この蛋白濃度での tryptophan, tyrosine の濃度がそれほど大きくないということ，b_0 値からみた conformation の変化は 20% 程度でそれほど大きくないということが考えられるが，これと共に，myosin-A のように軸比が大きく helix の多い fibrous な分子の場合，hydrophobic group が初めから溶媒と接しているためこの程度の conformational な変化では globular protein の場合ほど差が出ないのではないかということが考えられる。これは H-M の場合，L-M に比較して b_0 値の変化と逆に比較的大きな blue shift がみられることからも支持されると思われる。

いくつかの有機溶媒の影響をみた結果からわかるように，一度凍結融解によって減少した b_0 値が，3 % 2-chloro-ethanol 又は 10% dioxane によって再び native に近い値に戻るということ，この時 PPi が必要であるという事実は興味のある問題である。PPi が myosin-ATPase に対して保護効果を持つことはすでに知られているが，これは PPi が ATP analogue として active site に結合して site を保護するものと考えられている。全体の conformation に対しての PPi 及び有機溶媒の影響については，Tonomura 等が，native な myosin-A において，PPi のみでは b_0 は減少するが，PPi + ATP で b_0 が増加する[7] ということと，10% dioxane によって 10% ほど b_0 が増加し，この時 PPi が共存すると b_0 の時間的な減少が阻止される[4] ことを

報告しているが，この場合の PPi の役割については明らかではない。著者の結果，即ち PPi＋有機溶媒で，凍結融解で減少した b_0 が再び増加するということが，凍結融解によって random になった部分が再び helix を形成したという事であれば，有機溶媒のみではその濃度が低くて，その hydrophobic interaction が弱いため，こわれて random coil になっている部分を再び helix を巻かせるのに必要な程度に接近させるために，PPi の electrostatic interaction が作用するのではないかということが考えられる。この問題は，今後更に詳細な検討を要する興味ある問題と思われるが，b_0 の増加が helix の復元だとしても，一度 random になった部分が実際に helix を形成したのか，全く別な random であった部分が新らしく helix を形成したのかいまの所明らかでない。

同一凍結条件で，同じ蛋白から得られる二つの部分，即ち helix の多い，軸比の大きい L-M と，どちらかといえば globular type に近い H-M を比べて，L-M が H-M より conformational な変化が大きいのではないかと考えられる結果が得られた。即ち $-b_0$ 値をみると，−100°C で対照に対して H-M では 70%，L-M では 60% まで減少し，−196°C で H-M は 65%，L-M では 35% まで減少している。これは helix が多く，fibrous な構造が凍結融解に対してより不安定な構造であることを示しているとともに，このことから，凍結による変性の機作が一次的には溶媒の水—蛋白の水和水間の相互作用ないしはその状態の変動であることを支持していると考えられる。すでに Szent-Geörgyi[8] は，myosin-A が非常に水和水に富む構造であり，凍結融解によって，その構造を維持すべき水和水が失なわれるために変性するのではないかという説を述べている。myosin-A, L-M のように α-helix 型の helix の多い，且つ fibrous な構造の蛋白の場合，globular で compact な構造の蛋白より，溶媒に接する部分がはるかに多いことから，水和水の構造，配列の状態が蛋白全体の構造に対して大きな影響を持つであろう事は容易に想像し得るところである。ゆえに，溶媒の水の氷晶化の進行に伴って，蛋白の水和水の配向状態に何等かの変動が起きるならば，fibrous な蛋白の方が，少なくとも transconformation という意味からは，より変性を起しやすいであろうと考えられる。

この点に関して，globular protein の凍結融解による変性の機構を明らかにすることが今後必要であると思われる。

globular protein の凍結融解による変性については，Yamazaki & Shikama[5], Shikama[6] 等の，catalase の酵素活性について調べた仕事，Tanford[9] 等の，catalase が 4 個の subunit に解離するという報告，Merkert[10] の，Lactic dehydrogenase の isozyme について，subunit の recombination が起るという報告などがある。これらの，subunit の解離の問題は，分子の三次構造の変化の問題と別に，一次構造の問題として別な機作を考えねばならないのではないかと思われる。

共同研究員として滞在中，終始いろいろと御教示，御助言ならびに御批判下さった，阪大蛋白質研究所の伊勢村教授，浜口助教授および，いろいろ御援助をいただいた同研究室の方々と，終始御鞭撻を賜わった根井教授に厚く感謝の意を表します。

V. 要　　約

凍結融解による myosin-A の変性が，どのような機構で起っているかを検討するために，いろいろな温度で凍結融解した myosin-A について，酵素活性，粘度と共に，旋光分散，紫外差スペクトルによって，主として分子の conformational な変化を調べた。

又，凍結融解による変性に対する有機溶媒と pyrophosphate の影響と H- と L-meromyosin の凍結融解による変性についても調べた。

その結果，次のような事が判った。

1) 凍結温度が低くなるほど，それに対応して，旋光分散から得られる $-b_0$ 値は減少し，$-a_0$ 値は増加する。又，同時に粘度が増加し，ATPase 活性は低下すると共に，差スペクトルからは，かすかな blue shift がみられる。

2) 凍結融解した myosin-A に，1 mM pyrophosphate と共に，2-chloro-ethanol 又は 10% dioxane を加えると，一度減少した b_0 値は再び対照と同じ程度まで回復する。

3) 凍結融解した H- と L-meromyosin についてみると，凍結温度が低くなるとやはりそれに対応して $-b_0$ 値は減少し，$-a_0$ 値は増加する。H-meromyosin の ATPase 活性も低下する。H-meromyosin については，L-meromyosin より明瞭な blue shift がみられるが，旋光分散の結果から考えて，L-meromyosin の変性が大きい。

これらの結果から，myosin-A, meromyosin 共々，凍結の温度に依存して変性し，この時，分子の helix の一部分がこわれ，部分的に random な部分が増加していることが判った。又，この時，fibrous な分子が globular な分子より helical conformation の変化は大きいのではないかと考えられる。

文　　献

1) 花房尙史 1962 凍結融解による myosin-B の変性．低温科学，生物篇，***20***, 81–94.
2) Szent-Györgyi, A. G. 1953 Meromyosin, the Subunit of Myosin. *Arch. Biochem. Biophys.*, ***42***, 305–320.
3) 安井　勉 1959 ミオシン ATPase の変性．蛋白質・核酸・酵素，***4***, 339–340.
4) Tonomura, Y., Sekiya, K. and Imamura, K. 1963 The Optical-Rotatory Dispersion of Myosin-A. II Effect of Dioxane and P-Chloromercuribenzoate. *Biochim. Biophys. Acta*, ***69***, 269–305.
5) Shikama, K. and Yamazaki, I. 1961 Denaturation of Catalase by Freezing and Thawing. *Nature*, ***190***, 83–84.
6) Shikama, K. 1963 Denaturation of Catalase and Myosin by Freezing and Thawing. *Sci. Rep. Tohoku Univ.*, Ser. 4, (Biol.), XXIX, ***2***, 91–106.
7) Tonomura, Y., Sekiya, K., Imamura, K. and Tokiwa, T. 1963 The Optical-Rotatory Dispersion of Myosin-A. III. Effect of Adenosine Triphosphate and Inorganic Pyrophosphate. *Biochim. Biophys. Acta*, ***69***, 305–312.
8) Szent-Györgyi, A. G. 1957 Bioenergitics, Academic Press Inc., New York, 143 pp.
9) Tanford, C. and Lovrien, R. 1961 Dissociation of Catalase in to Subunit. *J. Am. Chem. Soc.*, ***84***, 1892–1896.

10) Merkert, C. L. 1963 Lactic Dehydrogenase Isozyme: Dissociation and Recombination of Subunit. *Science*, ***140***, 1429-1430.

Summary

In order to investigate the mechanism of denaturation of myosin-A by freeze-thawing which was reported in a previous paper, changes in molecular conformation and enzymatic activity of myosin was examined by optical rotatory dispersion, ultra-violet difference spectrum, viscosity and ATPase activity. Denaturation of meromyosin by freeze-thawing and the effect of some organic solvents on the frozen-thawed myosin-A was also examined.

The results obtained were as follows:

1) In rotational dispersion, the lower the final freezing temperature, the greater the decrease in the b_0 value and the greater the increase in the a_0 value. The reduced viscosity increased and ATPase activity decreased. A light blue shift was observed in the differenced spectrum.

2) The b_0 value of myosin-A which was reduced by freeze-thawing, could be returned close to the initial value by adding 3% 2-chloro-ethanol or 10% dioxane, both with 1 mM pyrophosphate.

3) The b_0 values of H- and L-meromyosin and ATPase activity of H-meromyosin were also reduced by freeze-thawing. The blue shift was more obvious in H-meromyosin than in L-meromyosin, but the denaturation observed by rotational dispersion was greater in the latter.

The results described above prove that, during freeze-thawing, some change took place in the molecular conformation of myosin-A and meromyosin i. e., partial unfolding by destruction of the helical conformation.