



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	骨格筋における死後硬直の解除機構に関する研究 : アクチン-ミオシン相互作用の死後変化
Author(s)	中村, 富美男
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第1678号
Issue Date	1981-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/32749
Type	doctoral thesis
File Information	1678.pdf



骨格筋における死後硬直の解除
機構に関する研究

— アクチン—ミオシン相互作用
の死後変化 —

北海道大学大学院農学研究科

畜産学専攻 博士課程

中村 富美男

目 次

第一章	序 論	1
第二章	フラメントの解離性からみた アクチン-ミオシン相互作用	7
第三章	アクチン-ミオシン相互作用 に影響を及ぼす蛋白質因子 の同定	51
第四章	アクチン-ミオシン相互作用 に影響を及ぼす蛋白質因子 ・偽トロポミオシンの諸性質	90
第五章	偽トロポミオシンとトロポミ オシンの比較	126
第六章	結 論	167
	謝 辞	170
	引用文献	171

第一章 序 論

家畜および家さんの生産物である肉、乳、卵を動物性蛋白質源として摂取することは、自然界における窒素サイクルの利用に他ならない。その中で、食肉は乳や卵と異なり、動物の死という経路を辿った後に食用に供せられるので、この食肉特有の死後の変化を科学的に説明することは畜肉および家さん肉の有効利用のために重要な意義を有する。

我々が利用している食肉は高等脊椎動物の骨格筋であるが、食肉の性状は生筋とは大きく異なっている。筋肉の死後変化過程で起る筋細胞内の諸々の生化学的变化が筋肉の物性に大なる変化をもたらし、その最も顕著な変化は筋肉の硬化現象、すなわち死後硬直である。動物の死後、筋肉が死後硬直に至るまでの生化学的变化については1950年代にBate-SmithおよびBendallによって詳細に研究され⁽¹⁻⁹⁾、硬直時の筋肉の性状が生筋と全く異なるのは、主として(1) ATPの消失および(2)グリコーゲンの分解によって産生される乳酸の蓄積により筋肉のpHが酸性(5.5附近)に移行しているこ

この二点によってであることが明らかになった。さらに、Bendall⁽⁷⁾は骨格筋の死後硬直が筋原線維の収縮によって惹起されることを明らかにしたが、死後筋肉における筋原線維の収縮は Ca^{2+} 濃度の上昇に起因している。すなわち、死後の筋細胞内でATPが減少し、pHが低下すると筋小胞体およびミトコンドリアが Ca^{2+} 蓄積能を失うために^(10,11) Ca^{2+} が筋細胞内に漏出し、細胞内 Ca^{2+} 濃度が $1 \times 10^{-6} M$ 以上⁽¹²⁾になると筋原線維は収縮し、硬直が起こると報告されている^(1,7,9)。死後の筋肉で起る収縮と生筋の収縮は現象的には同一で⁽¹³⁻¹⁵⁾、2種類のフィラメントの滑り⁽¹⁶⁻¹⁹⁾によって短縮が起るが、生筋においてはATPの存在下で素早い収縮が繰り返し起こり得るのに対して、死後の筋肉における収縮は緩慢で、しかも一過性である所に両者の相違点がある。死後筋肉では、この一過性の収縮でATPを使い果たしてしまふので収縮が完了した時点では筋肉内にATPはもはや存在しなくなっており^(1,9)、筋肉は収縮したままの硬い状態、すなわち死後硬直を呈している。

通常食用に供せられる食肉は屠殺直後の家畜の筋肉ではなく、屠殺後の一定期間熟成し

てはじめて利用される。従って、食肉は死後硬直後さらに時間を経過した骨格筋である。硬直時には硬かった筋肉が、熟成期間中の時間の経過とともに徐々に軟化することから硬直後の食肉の軟化は一般に“死後硬直の解除”と呼ばれている。死後筋肉の硬直が解除するにつれて筋肉組織が軟化し、食用に適した状態に変化するということ事は、食用に依する際のヒトの咀嚼という機械的力に対して肉組織が抵抗性を失うことであり、肉組織が脆弱化することの意味している。死後硬直の解除期に筋肉組織が脆弱化する要因として3種類の現象が高橋らによって見い出されている。すなわち第一は、筋原線維の連続的構造が脆くなり、機械的衝撃を加えると容易に切断されるようになる事⁽²⁰⁾であり、第二は、弾性蛋白フィブリンの構造が熟成中に脆くなる事⁽²¹⁾であり、第三は、筋原線維の構造単位である筋節の長さが静止長へ復元する事⁽²⁰⁾である。これらの種類の現象の内部機構が解明されれば、死後硬直の解除、すなわち熟成中の食肉の軟化が何故起るのか、ということにより一層明らかにすることができると考えら

れる。第一の問題は筋原線維の小片化と呼ばれ、筋原線維が切断される部位はその構造単位である筋節を縦方向に連結しているZ線である⁽²²⁻²⁴⁾。熟成中に起る食肉の軟化と筋原線維の小片化の間には密接な関連のある事が確立されている⁽²⁵⁻²⁸⁾が、筋原線維の小片化、すなわちZ線の崩壊の機構について高橋⁽²⁹⁾および服部と高橋⁽³⁰⁾は以下のように説明している。死後の筋肉内でATPが消失し、かつpHが低下すると筋小胞体はその Ca^{2+} 蓄積能力を喪失するため^(10, 11, 31)、 Ca^{2+} は筋小胞体から細胞形質内へ漏出し、死後の筋細胞内の遊離 Ca^{2+} 濃度は $2 \times 10^{-4} M$ 程度に上昇する⁽³²⁾。高濃度となった Ca^{2+} はZ線構成成分に結合し、その結果Z線の高次構造にゆるみを生じる。さらに、死後硬直の収縮の際に発生した張力によって、Z線の高次構造のゆるみはよりいっそう増大し、筋原線維は機械的な衝撃によって容易に小片化する、としている。第二の問題は弾性蛋白質コネクチンに関するものである。コネクチンは丸山ら⁽³³⁾によって発見され、筋原線維から太いフラメント、細いフラメントあるいはZ線などの構造を除去してもなお残存する不溶

性で、高い弾性をもった蛋白質である^(34, 35)。
また、コネクチンは筋原線維の全長にわたって連続的な網目構造を呈して、筋構造の連続性と生筋の収縮時に発生する張力の伝播に寄与していることが明らかにされており、生筋が示す高い弾性はコネクチンによるところが大きい^(34, 36, 37)。死後の筋肉は貯蔵時間とともに弾性を失って、熟成した食肉では歪みを与えた後に外力を除いても元の状態には戻らず、可塑性となる。この物性の変化は食肉の軟化と密接な関係があり、高橋と斎藤⁽²¹⁾は死後筋肉の弾性の消失がコネクチンの溶解性の変化と一致することを明らかにした。

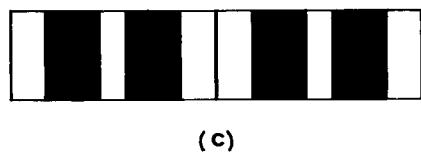
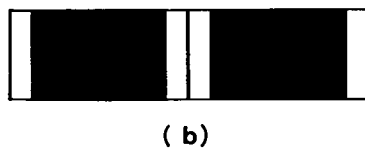
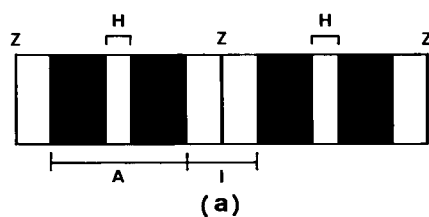
第三の問題である硬直時に短縮した筋節が静止長へ復元するという現象について、Sjöromer⁽²³⁾は電子顕微鏡による観察から太いフィラメントと細いフィラメントの滑りによって起る事を明らかにした。この事実に基づいてGoll⁽³⁸⁾は、ATPの消失とともに形成される細いフィラメントの主構成蛋白質であるアクチンと太いフィラメントの主構成蛋白質であるミオシン間の結合によって死後硬直が起る⁽³⁹⁻⁴¹⁾が、その後の時間経過に伴いアクチン-ミオシン

相互作用に何らかの変化が生じて、両方ラメント間に滑りが起る、筋節長の復元が起ると仮定した。一方、生化学的方法を用いた研究において、藤巻ら⁽⁴²⁾は熟成した筋肉から調製したアクトミオシンを解離させるのに必要なATP量は屠殺直後の筋肉から調製したアクトミオシンを解離させるのに必要なATP量よりも少なくつよい、という実験結果から、熟成期間中にアクトン-ミオシンの結合が脆弱化していることを提唱したが、最近 Wolfe と Samejima⁽⁴³⁾ はこれを否定する結果を報告している。したがって、死後筋肉の硬直期に形成されたアクトン-ミオシンの結合が食肉の熟成中もそのまま維持されているのか、或いは変化するのかについてはいまだ明確な実証はなされていない。本論文は、アクトン-ミオシン相互作用の死後変化という観点から硬直解除の機構、すなわち食肉の軟化機構を明らかにする事を目的として研究を行なったものである。

第二章 フィラメントの解離性からみたア クチン-ミオシン相互作用

第一節 序

死後変化における筋原線維の状態変化を位相差顕微鏡下で追跡すると、筋原線維の構造単位である筋節の長さの変化を認めることが出来る⁽²⁰⁾。屠殺直後の筋肉からえられる筋原線維では、筋節の状態は弛緩時の筋肉と同様に静止長であり、A帯、I帯などの横紋構造を明瞭に認めることが出来る。第一回は死後



の状態変化を模式的に示したもので(a)は屠殺直後の状態である。硬直時の筋肉から調製した筋原線維は(b)のようであり、H帯が見えず、I帯の幅が狭く、Z線間の距離が短くなって、短縮している。死後硬直が解除した筋

肉からえられる筋原線維の場合には(c)に示す

ように、屠殺直後の(a)と同様の横紋構造が再び観察されるようになる。これらの変化から、硬直時に短縮した筋節が硬直の解除にともなって再び元の静止長に復元することが明らかである。これらの変化は筋節内部の微細構造の変化に基づいている。微細構造は電子顕微鏡によって観察することが出来る^(18,19,25)が、第二回は微細構造の変化を第一回に対応させた模式図である。



(a)



(b)



(c)

筋節は2種類のフラメントから成っており、一つはA帯に存在している太いフラメントで他はZ線から両側にのびている細いフラメントで、両フラメントが規則正しく配列して横紋を呈している^(16,17)。

第二回

太いフラメントはミオシン分子の重合体であり⁽³⁹⁾、細いフラメントはアクチンの重合体トコポミオシンおよびトコポニンが結合して構成されている^(12,44,45)。筋節が収縮する時に

は、この二種類のフラメントが互いに滑り合
い^(18,19)、細いフラメントの先端が筋節の中央
に向かってはいり込んでいく⁽⁴⁶⁾。この時、太
いフラメントの表面に存在するミオシン分子
の頭部がATPをエネルギー源^(47,48)としてアウ
タインと反応し、滑りを引起し、筋肉が収縮
する、すなわち第二図の(a)から(b)への変化が
起る。 (b)ではZ線間の間隔が狭くなっており
、この集積が筋全体の収縮を生み出している
。屠殺直後の筋肉の微細構造は(a)であり、死
後筋肉が硬直する際には(a)→(b)の変化を辿る
が、硬直時にはもはやATPが存在しないので
、(b)の状態のミオシンとアウタインは堅
く結合して“硬直複合体”⁽⁴⁰⁾を形成している
。枝肉の状態で熟成した場合に長さが復元し
た筋節の微細構造は(c)に示すように、見かけ
上屠殺直後の微細構造(a)と区別出来ない。筋
肉の硬直解除期に起る(b)から(c)への形態的変
化は、硬直複合体におけるアウタインとミオシ
ンの堅い結合が脆弱化することを示唆してい
る。また、枝肉で熟成した場合にこの変化が
起るのは、筋肉の両端が骨格に連結しており
、硬直時に発生した張力によって引張られて

いるためにアクトン・ミオシン間の結合が脆弱化すれば(C)の状態になると理解される。

筋肉の死後変化の過程で、アクトン・ミオシン間の結合の強さに変化するだろうことは1960年から予測され⁽⁹⁾、硬直→硬直解除→食肉の軟化、という一連の死後変化を説明するため有効な手段として多くの研究者によって研究が行なわれてきた^(42, 43, 49-55)。しかし、現在まで死後硬直の解除に対応するアクトン・ミオシン間の結合の変化は実証されていない。その理由の最も大きなものは、死後筋肉から抽出したミオシンあるいはミオシンとアクトンの複合体であるアクトミオシンを用いて実験するという手法がとられていたことによると考えられる。死後時間を追ってミオシンの抽出量^(53, 54)、あるいはアクトミオシンの抽出量^(52, 53)を調べたり、抽出されたミオシン^(42, 51, 53, 55)やアクトミオシンの性質^(42, 49, 50, 51, 53, 55)を調べることによっては死後筋肉中のアクトンとミオシンの結合状態を正確に知る事が困難である。それは、ミオシンやアクトミオシンを抽出するためには0.3ないし0.6 M KClという比較的高濃度の非生理的塩溶液で筋肉を処理し、筋原線維の

構造，特にミオシンから成る太いフラメントの構造を破壊しなければならぬことによると考えられる。

筋原線維から太いフラメントと細いフラメントを破壊せずにそのまゝの形状で取り出す方法⁽³⁹⁾が確立しているので，本章ではこの方法を用いて，アウケン-ミオシン相互作用の死後変化とフラメントの解離量の変化としてとらえることを試みた。先づ，全筋について死後硬直の解除に対応するアウケン-ミオシン間の結合の変化を明らかにした上で，その原因を説明するため，筋肉模型である筋線維束⁽⁴⁴⁾および筋原線維⁽⁵⁶⁾を供試した。前者は生筋と同じ構造を持ちながら，外的条件の制御が容易であるし，後者では筋原線維以外の蛋白質はほとんど含まれていない。筋肉模型をさらに簡素化するため，筋肉から抽出したミオシンBあるいは単離精製したアウケンとミオシンから成る合成アウトミオシンを供試した。

第二節 実験材料および方法

1 筋肉および筋肉模型の調製

全筋；鶏および家兎を放血屠殺後内臓を除去し，筋肉を骨格に付けたまま 5°C に冷蔵した。鶏の浅脇筋および家兎脛最長筋を供試した。

筋線維束；屠殺直後の家兎大腓筋から Szent-Györgyi の方法⁽⁴⁴⁾ によって調製した。すなわち，直径約 2mm ，長さ 8cm の筋線維束が静止長となるように，その両端を竹コゴに保定した。これを 5°C のリンゲル溶液 (120mM NaCl , 5mM KCl , 1.2mM MgCl_2 , 1.3mM CaCl_2 および $26\text{mM Na phosphate buffer pH 7.4}$) あるいは EDTA を含むリンゲル溶液 (120mM NaCl , 5mM KCl , 5mM EDTA および $26\text{mM Na phosphate buffer pH 7.4}$) に浸漬し，ゆっくり攪拌しながら貯蔵した。

筋原線維；家兎脛最長筋から Etlinger の方法⁽⁵⁷⁾ によって調製した。新鮮な挽き肉に5倍量の pyrophosphate relaxing buffer (P. R. B: 0.1M KCl , 2mM MgCl_2 , 2mM EGTA , $2\text{mM Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ および $10\text{mM Tris-maleate buffer pH 6.8}$) を加え Virtis ホモゲナイザー (The Virtis Company, Inc.) で $14,000\text{rpm}$ ，60秒間ホモゲナイズし， $2,200\text{rpm}$ で10分間

遠心分離した。沈殿に5倍量の $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ を含まない溶液を加え、上記同様45秒間ホモゲナイズし、2,200 rpm で10分間遠心分離した。沈殿を同様に30秒間ホモゲナイズし、遠心分離し、その後、同上液にて上清に蛋白質がなくなるまで4~6回洗って筋原線維をえた。

2 蛋白質の調製

ミオシンB; Szent-Györgyi の方法⁽⁴⁴⁾により調製した。新鮮な家兎脳最長筋の挽き肉に5倍量の Weber-Edsall 溶液 (0.6 M KCl, 0.01 M Na_2CO_3 , および 0.04 M NaHCO_3) を加え 4°C で24時間抽出を行なった。24時間後に等量の 0.6 M KCl を加え 2,000 rpm で20分間遠心分離し、上澄液を三重にしたがーゼで濾過した。濾液を冷水で6倍に希釈し、2,000 rpm で20分間遠心分離した。沈殿物を 0.6 M KCl とし、攪拌して充分に溶解させた。この溶液を 10,000 rpm で30分間遠心分離してえた上澄液を冷水で3倍に希釈して 0.2 M KCl とし、5,000 rpm で20分間遠心分離した後、沈殿を採取し、0.6 M KCl として溶解した。この操作を2度繰り返した後、最後に 0.6 M KCl のミオシンB溶液を 15,000 rpm で60分間遠心分離し、上澄液を精製ミオシンBとした。

ミオシン; Perryの方法⁽⁵⁸⁾により調製した。
新鮮な家兎腓最長筋の挽き肉に3倍量の冷却
したStraub溶液⁽⁵⁹⁾ (0.3 M KCl, 0.15 M K phosphate buffer
pH 6.5) を加え, 4°Cで10分間攪拌しながら抽出
した後, 2,200 rpm で15分間遠心分離した。上
澄液を三重にかけたガーゼで濾過し, 濾液を冷
水で希釈し, 0.02 M KCl とし 4°C に放置し,
沈殿が生じてから上清を捨て, 2,500 rpm で20
分間遠心分離した。沈殿物を0.5 M KCl pH 6.8 (10
mM K phosphate buffer) としてよく溶解後, 0.3 M KCl
となるよう冷水を加えた。この溶液を30,000
rpm で60分間遠心分離し, 上澄液を三重に
かけたガーゼで濾過した。濾液を0.03 M KCl とする
よう冷水で希釈した後, 3,000 rpm で30分間遠
心分離して沈殿部を回収し, それを0.5 M KCl
として溶解させた。完全に溶解後, 40,000 rpm
で120分間超遠心分離し, 上澄液を0.5 M KCl に対
して透析し, 精製ミオシンをえた。

アクトン; Straubの方法⁽⁵⁹⁾によりアセトン
粉末の調製を行なった。ミオシンを抽出した
残渣を5倍量の冷水で洗い, 固くしぼった後
に冷却した5倍量の0.4% NaHCO₃ で20分間づつ
2回処理した。ついで, 10倍量の冷水で2回

洗った後冷却したアセトン中に4回浸漬して脱脂，脱水した。第1回目は発熱を防ぐために多量のアセトン中でよく攪拌した後直ちにアセトンを除去した。第2回目から第4回目までは一時間おきにアセトンととり替えて，脱脂，脱水の完全を期した。室温で一晩放置して乾燥させた後にデシケーターに入れて -20°C に保存した。

G-アウチンは上記のようにして調製したアセトン粉末より Rees と Young の方法⁽⁶⁰⁾により調製し，Spudich と Watt の方法⁽⁶¹⁾で精製した。アセトン粉末の約20倍量の冷却した溶液 (0.2 mM CaCl_2 , $0.5\text{ mM } \beta\text{-mercapto ethanol}$, 0.5 mM ATP , $\text{pH } 7.5$ with NaOH) で30分間， 4°C で抽出し，直ちにガーゼで硬くしぼって濾過した。濾液を $30,000\text{ rpm}$ で60分間遠心分離し，上澄液を 0.1 M KCl , 1 mM MgCl_2 として 25°C で2時間，アウチンを重合させた後に $30,000\text{ rpm}$ で2時間遠心分離した。沈殿として得られた H-アウチンを抽出液と同じ組成の溶液に溶解させ，テフロンホモゲナイザーでホモゲナイズした後同溶液に対して透析し，脱重合させた。一晩透析した後 $40,000\text{ rpm}$ で2時間超遠心分離し，上澄液を 0.6

MKClとし、25℃で60分間放置した後、30,000 rpmで2時間遠心分離した。沈殿物は上記同様にホモゲナイズ後透析した。2昼夜以上透析した透析内液を40,000 rpmで2時間超遠心分離し、上澄液として精製G-アークチンを得た。得られたG-アークチンを2mg/mlとし、0.1MKClで30分間25℃で重合させてH-アークチンを得た。

トロポミオシン; Bailey法⁽⁶²⁾を改良した方法^(63, 64)によって調製した。アセトン粉末よりアークチンを抽出した残渣100gを700mlの1MKCl pH7.0(NKOHで調整)に浸漬し、4℃で15時間放置した後ガーゼでしぼって、粘性のある抽出液を集め10,000 rpmで20分間遠心分離して上澄液を採った。この上澄液に10mM β -mercapto ethanolを加え5分間室温に放置した後、1NHClを加えてpH4.5に調整しゆっくり攪拌しながら室温に1時間放置した。pHを4.5に再度調整した後10,000 rpmで20分間遠心分離して沈殿部分を回収した。沈殿物に約10倍量の冷脱イオン水を加え1NKOHを用いてpH7.0に調整してテフロンホモゲナイザーでホモゲナイズした。30分間氷冷した後10,000 rpmで20分間遠心分離し

1) 上澄液を採り, その蛋白質濃度が 1.2 mg/ml 以下となるように冷水で希釈した。希釈した溶液に $10 \text{ mM } \beta\text{-mercapto ethanol}$ を加え $\text{pH } 7.0$ の飽和硫酸液 (濃アソニエ水で pH を調整) を 0.7 倍量加えゆっくり攪拌しながら 4°C に 30 分間放置した。これを $12,000 \text{ rpm}$ で 30 分間遠心分離して得た上澄液 (4% 飽和) が 70% 飽和になるよう硫酸粉末を加え, 濃アソニエ水で pH を 7.0 に調整し, 30 分間氷冷した後 $12,000 \text{ rpm}$ で 30 分間遠心分離した。沈殿物を少量の冷脱イオン水に溶解した後大量の脱イオン水に対して透析し, 完全に脱塩した。透析終了後, 1 M KCl , $10 \text{ mM } \beta\text{-mercapto ethanol}$ とし, 蛋白質濃度が 1.2 mg/ml 以下となるように調整し, 等電点沈殿と硫酸分画をさぶに 2 回繰り返した。ただし, 2 回目および 3 回目の硫酸分画は硫酸飽和度 $50 \sim 60\%$ の範囲で行なった。えられた精製トロポニン は 1 mM DTT を加え使用時まで -20°C に凍結保存した。

トロポニン; 江橋らの方法⁽⁶⁵⁾によりミオシン抽出残渣より調製した。ミオシンを抽出した残渣を冷却した 3 倍量の 50 mM KCl , 0.3 mM NaHCO_3 とともに 5 分間よく混和した後ガーゼ

でしぼって濾過した。この操作を3回繰り返
し、次に3倍量の冷1mM NaHCO₃を加え5分間
よく混和して濾過した。この操作を2度行な
った。残渣に少量の12M LiClを加え充分に攪
拌した後5,000rpmで10分間遠心分離し、え
られた沈殿物に0.4M LiClを加えて懸濁し、沈
殿物が楽に攪拌出来るようになるまで0.4M Li
Clを加えた。その後1NHClを加えてpH4.5とし
て、1時間毎にpHを4.5に再度調整して3時間
室温に放置した。この溶液を5,000rpmで10分
間遠心分離し、上澄液をナイロンゴースで濾
過し、濾液を1N NaOHと0.1N NaOHを用いてpH7.5
とした。中和した抽出液100mlに対して30gの固
形硫酸を加えて溶解後pH7.0として20分間氷冷
後12,000rpmで30分間遠心分離した。上澄液の
少量の飽和硫酸をゆっくりと加えpH7.0に調整
して30分間氷冷した。この溶液を12,000rpmで
30分間遠心分離し、遠心管壁に付着した透明
な沈殿物を1mM NaHCO₃で溶解させ、1mM NaHCO₃
に対して透析した。充分に透析(約18時間)
した後に40,000rpmで2時間超遠心分離し、
上澄液の上部約1/2を駒込ピペットで採取し、
精製トロポニンを得た。トロポニンは使用時

まで 1mM DTT , 1mM NaHCO_3 pH 7.0 とし -20°C に凍結保存した。

α -アークニン; 真崎と高市の方法⁽⁶⁶⁾によつて家兎胸最長筋より調製した。新鮮な挽き肉を3倍量の Hasselbach-Schneider 溶液 (0.6M KCl , $10\text{mM Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$, 1mM MgCl_2 , および $0.1\text{M K phosphate buffer pH 6.4}$) により1時間以上、室温で抽出した。抽出後 $6,000\text{rpm}$ で15分間遠心分離し、沈殿を同溶液で再度抽出した。この操作を4回繰り返してえられた沈殿物を 0.6M KCl で洗い、次いで 0.3M NaHCO_3 で完全に膨潤するまで洗った。残渣に 1mM NaHCO_3 を等量加え、さらにペニシリン (5U/ml) を加え室温で一晩放置した。 $5,000\text{rpm}$ で30分間遠心分離してえた上澄液 100ml に対して 15g の固形硫酸を加えて pH 7.0 に調整後、30分間氷冷した。 $12,000\text{rpm}$ で30分間遠心分離してえられた上澄液に 17g/dl となるように固形硫酸を加えて pH 7.0 に調整後30分間氷冷した後には $12,000\text{rpm}$ で30分間遠心分離した。沈殿物を 1mM NaHCO_3 に溶解し、同液に対して透析した。約20時間透析した後には $15,000\text{rpm}$ で30分間遠心分離し、上澄液を精製 α -アークニンとした。

3 合成アークトミオシンの作成

0.5 M KCl に溶解したミオシン (6 mg/ml) と 2 mg/ml の F-アクトニン (0.1 M KCl) を等量ずつ攪拌しながら混合し, 30 分以上氷冷⁽⁶⁷⁾した後に緩衝液を用いて 0.1 M KCl となるように希釈し, 合成アクトミオシン懸濁液を作成した。トロポミオシンおよびトロポニンを含む場合には, トロポミオシンとトロポニンの複合体を F-アクトニンと予め混合し (いづれも 0.1 M KCl 下) 15 分以上氷冷⁽⁶⁷⁾した後にミオシンと混合した。α-アクトニンはアクトニン-ミオシン複合体に 0.3 M KCl 溶液中で加えた。

4 太いフラメントおよび細いフラメントの分離

貯蔵した筋肉あるいは筋線維束から Etlinger の方法⁽⁵⁷⁾で調製した筋原線維, あるいは新鮮な筋肉から調製した筋原線維を Ca^{2+} 処理したものを供試した。後者の場合, Ca^{2+} 処理後 Virtis ホモゲナイザーで 10,000 rpm, 1 分間ホモゲナイズしてから 3,000 rpm で 10 分間遠心分離した。筋原線維はさらに 5 倍量の 0.1 M KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM K phosphate buffer (pH 7.0) の溶液で 2 回洗い蛋白濃度を 10 mg/ml に調整して, 等量の 0.2 M KCl, 10 mM ATP, 2 mM EGTA, 10 mM K phosphate buffer

(pH 7.0) の溶液を加えた。従って、混和液の最終組成は筋原線維 5mg/ml, 0.15M KCl, 5mM $MgCl_2$, 5mM ATP, 1mM EGTA, 10mM Kphosphate buffer (pH 7.0) となり、この組成は Huxley の "relaxing medium"⁽³⁹⁾ と同一である。この混和液をフロンホモゲナイザーで 1,400rpm で 100秒間に氷筒を 5 回上下させてホモゲナイズした。その後直ちに 3,000rpm で 10 分間遠心分離し、上澄液の蛋白質濃度を biuret 法で測定した。操作は全て 5°C 以下で行なった。この方法を基本として、筋原線維の Ca^{2+} 処理する際の Ca^{2+} 濃度、pH あるいは温度が太いフラメントおよび細いフラメントの解離性におよぼす影響を調べた。

5 分分離したフラメント標品中のミオシンの部分精製

分離した太いフラメントおよび細いフラメントを含む溶液に 1.05M KCl, 5mM ATP, 5mM $MgCl_2$, 1mM EGTA, 10mM Kphosphate buffer (pH 7.0) の溶液を等量加えて静かに攪拌後 40,000rpm で 60 分間超遠心分離して得た上澄液を 0.04M KCl に対して透析した。一晚透析した後 5,000rpm で 10 分間遠心分離し、沈殿を部分精製したミオ

シンとして、少量の $0.1N NaOH$ に溶解して biuret 法でその蛋白質量を測定した。

6. 小片化の測定

小片化の測定は高橋らの方法⁽²⁰⁾によって行なった。Virtis ホモゲナイザーでホモゲナイズした筋原線維懸濁液を位相差顕微鏡下で1,500倍で観察した。筋節が1-4個に小片化したものの数を $[F]$ 、全体の数を $[Z]$ として、 $[F]/[Z]$ で表示した。ただし、 $[Z]$ は500以上とした。

7 電子顕微鏡による観察

カーボン補強した支持膜に試料を付着させた後、1% 酢酸ウランウムで負染色を施した⁽⁴⁰⁾。日立11-B型電子顕微鏡を用い、加速電圧が kV で観察した。

8 SDS (sodium dodecyl sulfate) ポリアクリルアミドゲル電気泳動

Weber と Osborn の方法⁽⁶⁸⁾によって、5% のアクリルアミドゲルを用いて行なった。試料は $10mM Na$ phosphate buffer ($pH 7.0$) 溶液に透析後、1% SDS, 1% β -mercaptoethanol として $98^{\circ}C$ で2分間処理した。泳動は内径 $5mm$ の円形カラムを用い、1本 $8mA$ で約4時間室温で行なった。

泳動緩衝液は 0.1% SDS を含む 0.1M Na phosphate buffer (pH 7.2) を用いた。泳動後直ちにゲルを取り出し、coomassie brilliant blue で 1 時間染色した後、5% 酢酸、5% メタノール溶液により脱色した。

9 蛋白質量の測定

蛋白質濃度は biuret 法⁽⁶⁹⁾ および Folin 法⁽⁷⁰⁾ で測定した。いずれの場合も Micro-Kjeldahl 法によって予め検量線を作成した。

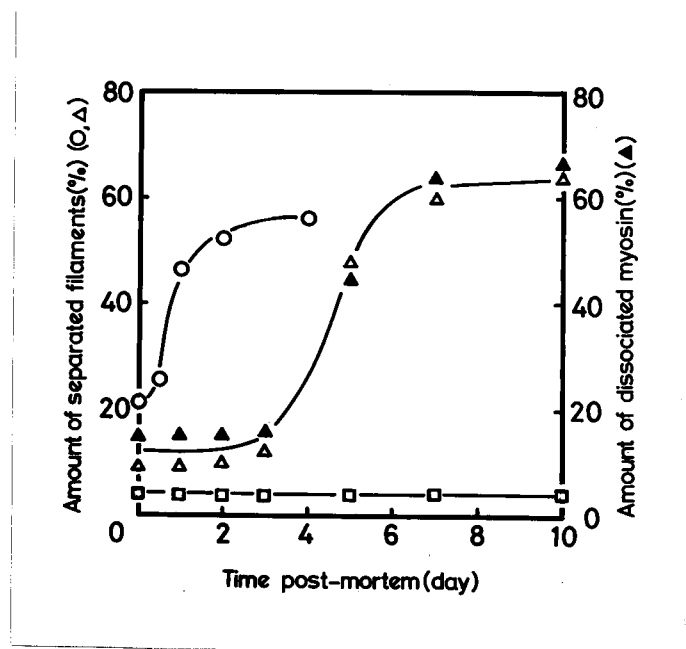
第三節 結 果

第一項 太いフィラメントおよび細いフィラメントの解離量

1. 全筋の場合

死後一定時間を経過した筋肉より Ellinger の方法⁽⁵⁷⁾ によって筋原線維を調製し、ATP によって解離するフィラメント量を測定した。第 1 図は家兎胸最長筋および鶏浅胸筋について調べた結果である。ATP が存在しないと筋原線維からはほとんど蛋白質は解離しないが、5mM ATP の存在下では屠殺後の経過時間が硬直期を過ぎる時期、すなわち家兎では 3 日目以後、鶏では 12 時間以降からフィラメントの解離量が増大した。家兎では 7 日目、鶏では 2 日目には解離するフィラメント量は最大に達し、それ以後は一定となり変化しなかった。ここで得られたフィラメント溶液から部分精製したミオシン量の変化はフィラメントの解離量の変化と全く同様であった。

ATP によって筋原線維から解離したフィラメント標品を電子顕微鏡を用いて観察した結果が第 2 図である。この電子顕微鏡写真は屠殺後 10 日間を経た全筋より得られたフィラメント



第1図 フラメント解離量の死後変化

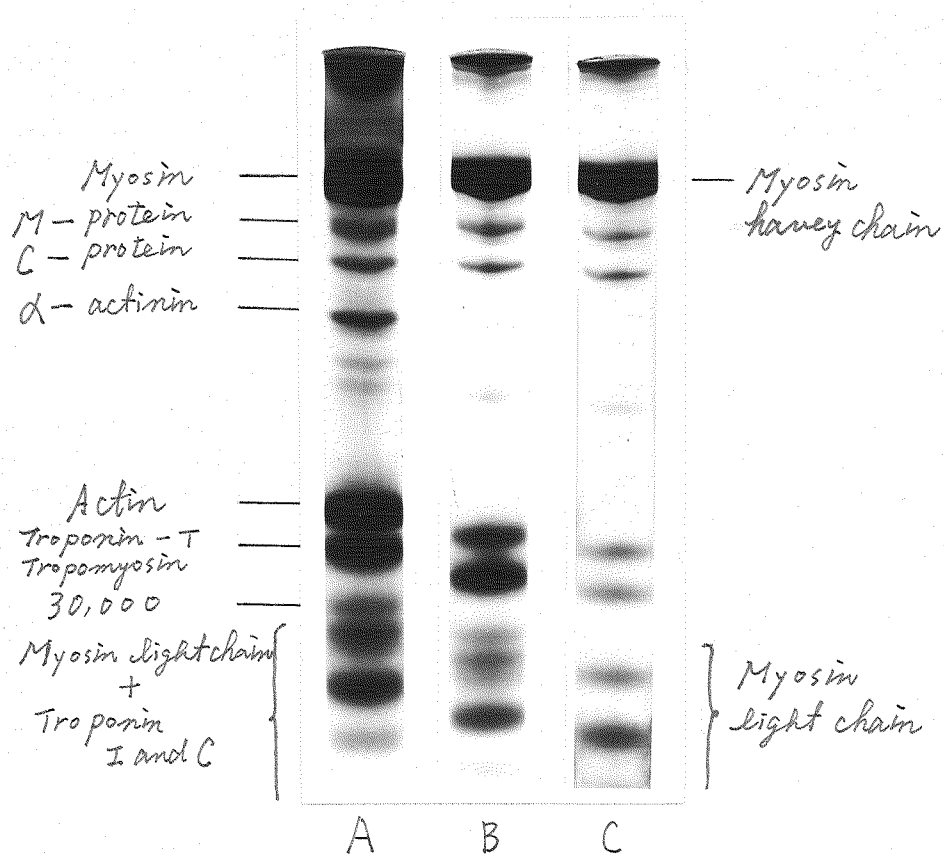
骨格に付けて貯蔵した家兔胸最長筋あるいは鶏浅胸筋より Etlinger 法⁽⁵⁷⁾によって筋原線維を調製し、5mM ATP の添加によって解離するフラメント量を定量した。○, 鶏浅胸筋。△, 家兔胸最長筋。□, 家兔胸最長筋 ATP 無添加。左側縦軸は筋原線維の全蛋白質に対するフラメントの割合を、右側縦軸は筋原線維中のミオシン含量を55%とし⁽⁷¹⁾, それに対する割合を示す。▲, 家兔胸最長筋からえられたフラメント標品について、ミオシンの部分精製を行なった場合。



第2図 解離したフィラメントの電子顕微鏡像

5℃で10日間貯蔵した筋肉から調製したフィラメント標品。1%の酢酸ウラニウムで染色した。倍率：48,000X

であるが、新鮮な筋原線維から調製した太いフラメントおよび細いフラメントと全く同じ構造を示すことが明らかである。したがって、筋肉の貯蔵中に蛋白質分解酵素によって両フラメントが分解されて、筋原線維から解離したのではないと思われる。この事を確認するためにATPによって解離したフラメント標品についてSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行なった。第3図に示すように、10日間貯蔵した筋肉から調製したフラメント標品はミオシンとアクチンを主体とし、M-蛋白質、C-蛋白質、 μ -アクチニン、トロポミオシンおよびトロポニンなどの既知の蛋白質が含まれていた。新鮮な筋原線維から得られたフラメント標品をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけた場合とのうがいは、30,000ダルトンに相当するバンドの出現だけであって、アクチンおよびミオシンのバンドには何らの変化も認められなかった。部分精製したミオシンの場合(第3図C)には全体の約90%がミオシンからなっている事が判る。したがって、ATPを添加することにより筋原線維から解離するフラメントはアクチンとミオシンを



第3図 フラメント標品および部分精製したミオシンのSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動像

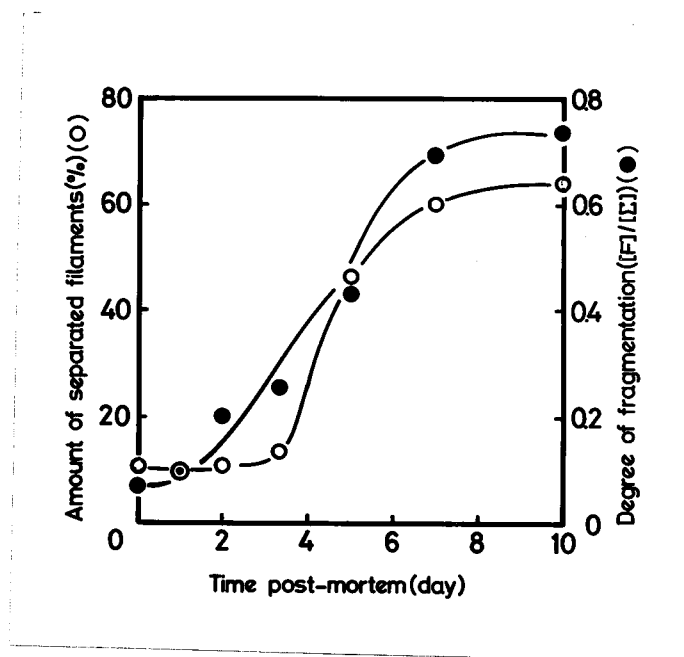
5℃で10日間貯蔵した筋肉から調製したフラメント標品およびフラメント標品から部分精製したミオシンについて5%ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動を行なった。A, フラメント標品。B, フラメント標品を0.6M KCl, 5mM ATP, 5mM $MgCl_2$ 存在下で超遠心分離してえられた上清。C, 部分精製したミオシン標品。

主体としたものであり、死後硬直の解除にもなつて了うとミオシンが解離しやすくなつてゐる事を示している。蛋白質の定量結果とSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動でえられた結果を合せると、屠殺後一週間以上経過した家兔胸最長筋においては、筋原線維に含まれるミオシンの約60%が解離してゐる事となる。

全筋におけるフラメントの解離量と筋原線維の小片化の関係を調べた結果が第4図である。小片化の割合は屠殺直後から徐々に増加し、一週間経過後には最大値に達した。この変化の傾向はフラメントの解離量の変化と非常によく似てゐるが、小片化の方が早い時期から増加しはじめることが判る。したがって、これら兩者の間には何らかの関連がある事を示唆してゐるように思われる。

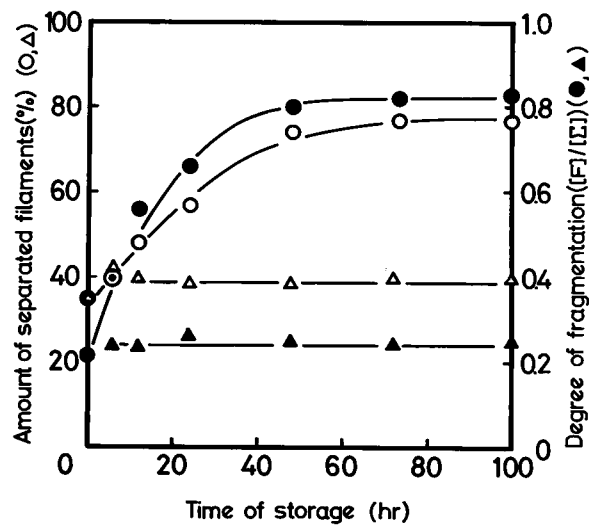
2. 筋線維束の場合

筋肉模型である筋線維束をリンゲル液に浸漬し、ATPによつて解離するフラメントの量と筋原線維の小片化の割合を調べた結果が第5図である。 Ca^{2+} を含むリンゲル液に浸漬したものは時間の経過とともにフラメントの解離



第4図 フラメントの解離量と筋原線維の小片化の関係

5°C に貯蔵した家兔脳最長筋より *Etlinger's* の方法⁽⁵⁷⁾ で筋原線維を調製し、フラメントの解離量(○)と小片化の割合(●)を測定した。左側縦軸にあるフラメントの解離量は筋原線維の全蛋白質量に対する割合である。



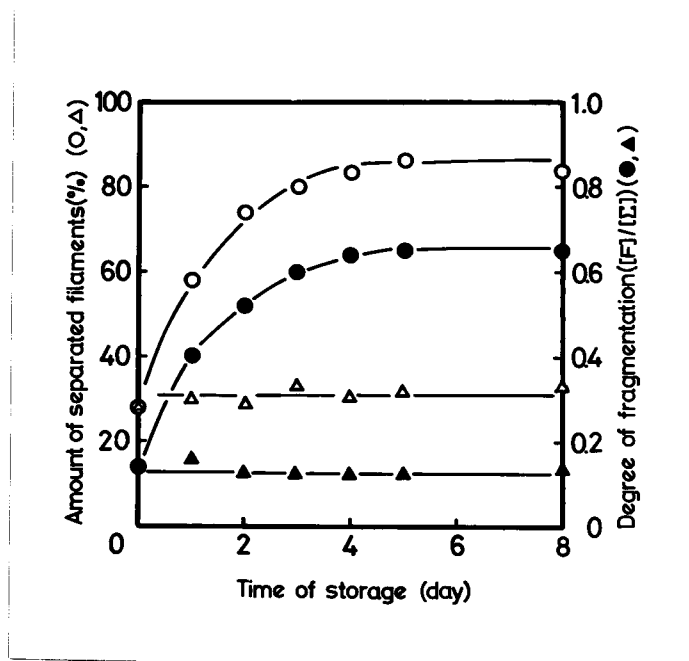
第5図 筋線維束におけるフラメントの解離量と筋原線維の小片化におよぼす Ca^{2+} の影響

屠殺直後の家兔大腰筋より筋線維束を調製し、リンゲル液に浸漬した後、Fahlingerらの方法⁽⁵⁷⁾によって筋原線維を調製しフラメントの解離量(O, Δ)と小片化の割合(●, ▲)を測定した。O, ●: リンゲル液に浸漬した場合。Δ, ▲: リンゲル液中の $CaCl_2$ と $MgCl_2$ を5mM EDTAにおき替えた場合。

量および小片化の割合が増加し、50時間以降では一定値を示すようになった。フラメントの解離と小片化の増加は全筋の場合と同様に一致して起こっており、ここでも両者の間に密接な関連がある事とうかがわせる結果であった。一方、 Ca^{2+} をEDTAでおお替えた場合にはこのような変化はみられず、フラメントの解離量および小片化の割合は浸漬開始時の値のまま推移した。したがって、フラメントの解離や小片化の割合が全筋の場合と同様の変化を示すためには Ca^{2+} が重要な役割をはたしているものと考えられる。

3. 筋原線維の場合

Ecklingerらの方法⁽⁵⁷⁾で調製した筋原線維を用いて Ca^{2+} の効果を明らかにすることを試みた。第6図に示したように、 Ca^{2+} が存在する場合、3日目まではATPによって解離するフラメント量および小片化の割合は増加し、その後は一定値となった。 Ca^{2+} のかわりにEDTAが存在する場合には、フラメントの解離量および小片化の割合は共に変化がなく、7日目まで一定値のままであった。したがって、ATPの添加によって太いフラメントと細いフラメントが



第6図 筋原線維におけるフラメントの解離量と小片化におよぼす Ca^{2+} の影響

Etlinger らの方法⁽⁵⁷⁾によって調製した新鮮な筋原線維を $0.1M KCl$, $10mM CaCl_2$, $1mM DTT$, $1mM NaN_3$, $10mM Tris-maleate$ buffer pH7.0 の溶液に $10mg/ml$ となるよう浸漬して $5^{\circ}C$ でゆっくり攪拌し、一定時間経過後にフラメントの解離量 (○) と小片化の割合 (●) を調べた。また, $10mM CaCl_2$ の替りに $5mM EDTA$ を含む溶液に浸漬して同様にフラメントの解離量 (Δ) と小片化の程度 (▲) を調べた。

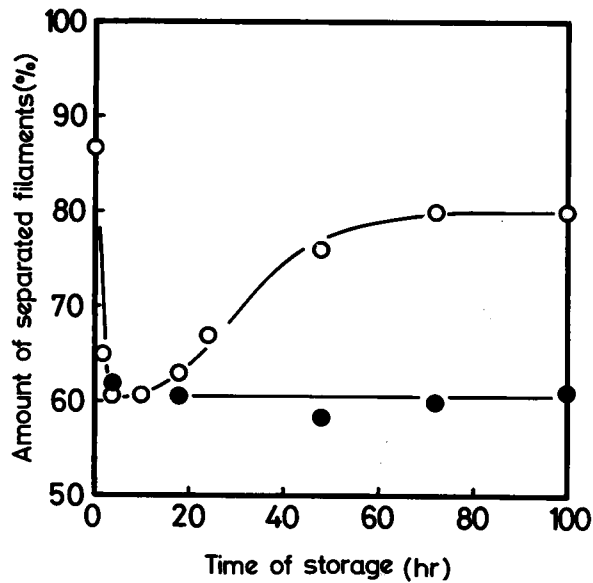
解離するためには Ca^{2+} の存在が必須であり、筋原線維の小片化、すなわちZ線の崩壊と密接な関連のある事が明らかである。

4, ミオシンBの場合

超沈殿の全過程でATP添加によって解離するフラメント量の変化を調べた。結果は第7図に示すように Ca^{2+} が存在する場合には超沈殿後の時間経過とともにフラメントの解離量が増加する事が明らかである。超沈殿を起こして1時間後には解離するフラメント量は0時間の透明化期に比してすでに20%以上減少しており、4時間目には最低値となり、この値は10時間後まで続いた。18時間目からATPによって解離するフラメント量は増加し、72時間目まで増えつづけた。一方、EGTAが存在する場合にはATPによるフラメントの解離量は低下したままで、貯蔵時間が経過しても増加することはない。

5, 合成アクトミオシンの場合

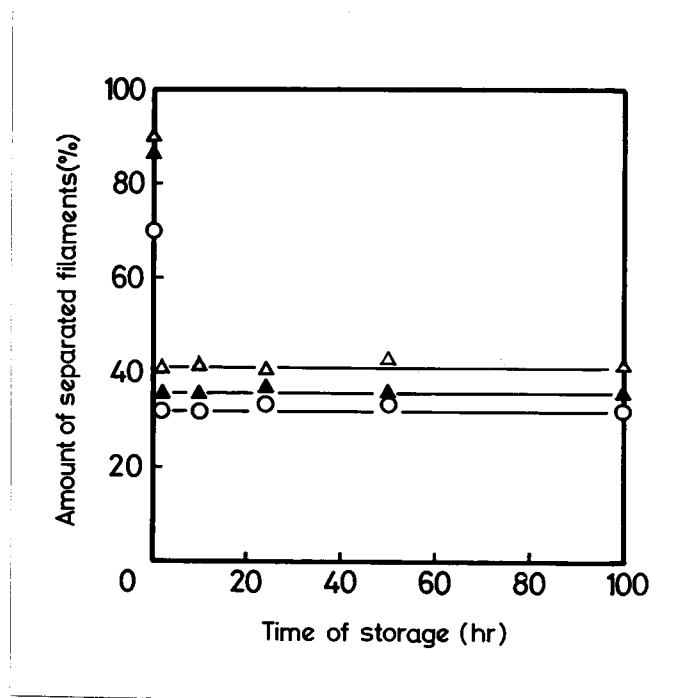
フラメントの解離性におよぼす既知蛋白質の関与を明らかにするためにアクチンとミオシンから再構成した合成アクトミオシンの超沈殿を死後硬直のモデルと考え、実験を行な



第7図 超沈殿を起こしたミオシンBにおけるフラメント解離量の変化におよぼす Ca^{2+} の影響

25℃においてミオシンB懸濁液(1mg/ml ミオシンB, 0.1MKCl, 5mM $MgCl_2$, 20mM imidazol-HCl pH7.0)に1mM ATPを添加して超沈殿を起こさせ、濁度が最大値に達してから10分後に4℃に貯蔵した。経時的に5mM ATPを添加して、6,000 rpmで10分間遠心分離し、上澄液をフラメントの解離量としてFolin法で測定した。○, 超沈殿後に0.1mM $CaCl_2$ を加えたもの。●, 同様に5mM EGTAを加えたもの。

った。第8図に明らかのように、アークニンとミオシンだけから成る合或アークトミオシンの場合は超沈殿後の貯蔵時間におけるフラメントの解離量の増加は認められなかった。アークニンとミオシンの混合比を重量比で1:1から1:5まで変化させたが、解離するフラメントの量に変化はなかった。上記合或アークトミオシンにトロポミオシンおよびトロポニンを加えた場合には全般的にATPによって解離するフラメント量は増加するが、超沈殿後の経過時間による変化はみられなかった。尚、加えたトロポミオシンおよびトロポニンの量は合或アークトミオシンに含まれているアークニン量に対して充分量（筋肉中の含量比以上）であった。この系に γ -アークニンが加わると合或アークトミオシン懸濁液の超沈殿が起こるまでの時間が短縮し、超沈殿時の濁度が増し、全体的にATPの添加によるフラメントの解離量が低下した。しかし、超沈殿後の経過時間による変化はみられなかった。死後の筋肉においてミ線構成成分である γ -アークニン⁽⁷⁴⁾がアークニンとミオシンの相互作用に影響をおよぼすとするれば硬直後であり、本モデル実験に



第8図 超沈殿を起こした合成アクトミオシンにおけるフラメント解離量の変化

種々の合成アクトミオシンを作成し, $0.1M$ KCl , $5mM$ $MgCl_2$, $0.1mM$ $CaCl_2$, $20mM$ $imidazol-HCl$ $pH7.0$, $25^\circ C$ の条件下で $0.5mM$ ATP を添加して超沈殿を起こさせた。その後 $4^\circ C$ に貯蔵し, $5mM$ ATP の添加によって解離するフラメント量を測定した。

○, $0.25mg$ アクテン, $0.75mg$ ミオシン/ ml 。 △, $0.25mg$ アクテン, $0.75mg$ ミオシン, $0.07mg$ トロポミオシン, $0.08mg$ トロポニン/ ml 。

▲, $0.25mg$ アクテン, $0.75mg$ ミオシン, $0.07mg$ トロポミオシン, $0.08mg$ トロポニン, $0.1mg$ α -アクチニン/ ml 。尚, トロポミオシン-トロポニン複合体は予備実験において, Ca^{2+} 感受性^(63, 72)を有している事と, α -アクチニンは超沈殿を促進させる作用のある事を確認後に実験に供した。

あつては超沈殿後に相当するものと考えられるので、超沈殿を起こした合成アクトミオシン- μ -アクトニンを加えてみたが、その後の経過時間による変化は認められなかった。さうして、筋原線維の構造蛋白質であることを知られてゐるM-蛋白質およびC-蛋白質についても同様の実験を行なつたがいづれの場合にもミオシンBで見られた様なアクトン-ミオシン相互作用の変化を示す現象はみられなかった。

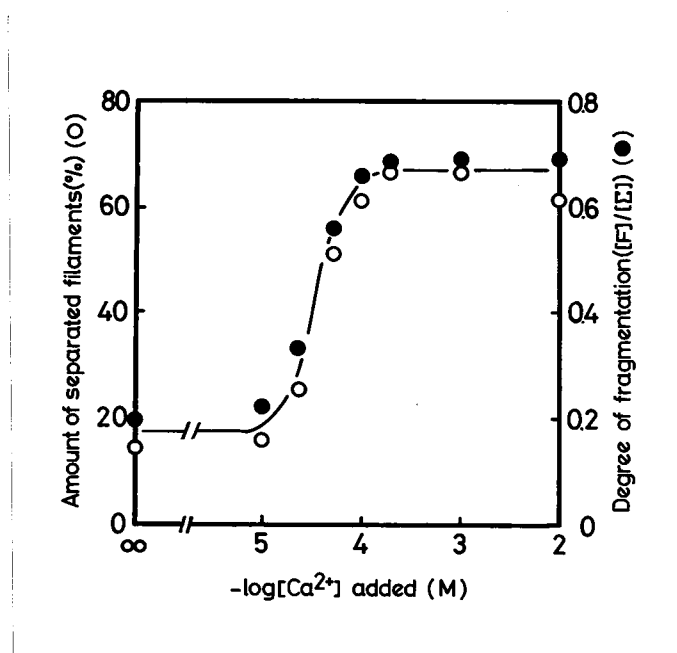
第二項 フラメントの解離性におよぼす諸要因

1, Ca^{2+} の影響

新鮮な筋原線維を Ca^{2+} 濃度の異なる塩溶液に浸漬し、ゆっくり攪拌しながら3日間貯蔵したもののについて、ATPによつて解離するフラメント量および筋原線維の小片化を調べた結果が第9図である。 Ca^{2+} 濃度が $1 \times 10^{-5} \text{M}$ 以上になるとATPによつて解離するフラメントの量および小片化の割合はともに増加しはじめ、 $1 \times 10^{-4} \text{M}$ 以上の濃度では一定値となつた。

2, pHの影響

Ca^{2+} 存在下で筋原線維をpHの異なる塩溶液に



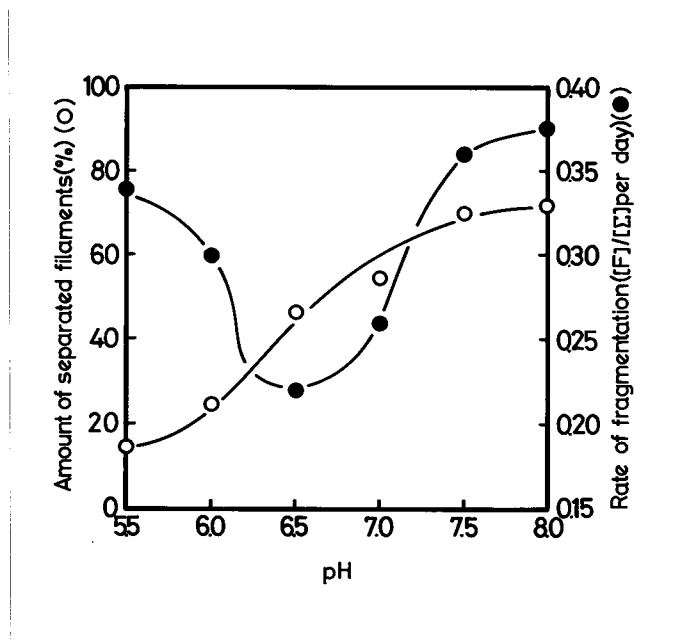
第9図 フラメントの解離量および筋原線維の小片化におよぼす Ca^{2+} 濃度の影響

Eklinger の方法⁽⁵⁷⁾によって調製した新鮮な筋原線維 (10mg/ml) を Ca^{2+} 濃度の異なる溶液 (5mM EGTA $\sim 10^{-2}$ M CaCl_2 , 0.1M KCl, 1mM DTT, 1mM NaN_3 , 10mM Tris-maleate buffer, pH 7.0) で洗浄後に同液に浸漬して 5°C で3日間ゆっくり攪拌した試料について、フラメントの解離量 (○) と小片化の程度 (●) を調べた。

浸漬し、2日間ゆっくり攪拌した後、ATPによって解離するフラメント量および筋原線維の小片化の程度を調べた。第10図に明らかのようにATPによって解離するフラメント量と小片化の割合は異なった変化を示した。フラメントの解離量はほぼpHの増加とともに増え、pHが高い程フラメントの解離量も多かった。一方、筋原線維の小片化の速度はpHの低い所では高い値を示すが、pH6.5の時に最低値となって、逆ベル型のpH依存性を示した。尚、pH5.0以下あるいは8.5以上では筋原線維は膨潤して異常な形態となり、顕微鏡観察には不適當であった。

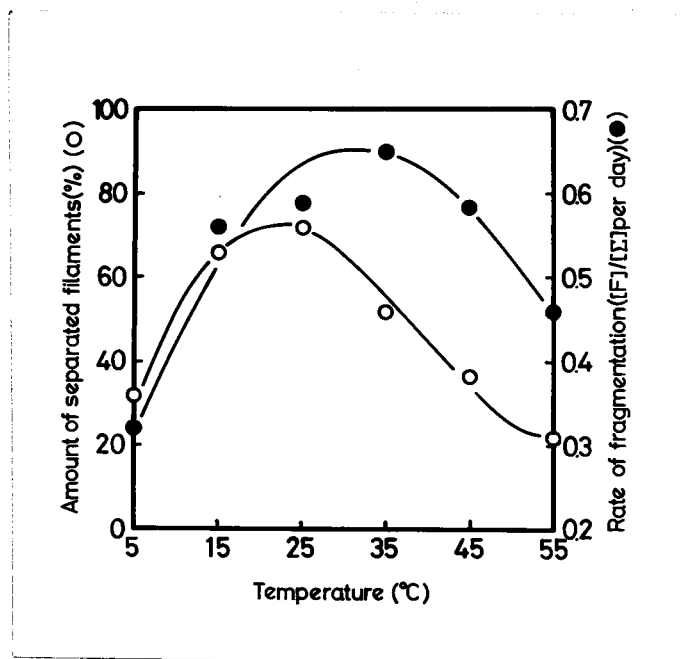
3. 温度の影響

フラメントの解離量および筋原線維の小片化におよぼす温度の影響を調べた結果が第11図である。貯蔵温度が25℃まではフラメントの解離量は温度の上昇とともに増えて増加するが、それ以上に温度が高くなると増加量が減少した。小片化の速度は35℃までは温度の上昇とともに増加するが、さらに高温になると減少した。顕微鏡下での筋原線維の形態は35℃までは無処理のものとの間に差異はみとめ



第10図 フラメントの解離量と筋原線維の小片化におよぼすpHの影響

筋原線維 (10mg/ml) を pH の異なる溶液 (20 mM Tris-maleate buffer, pH 5.5~8.0, 0.1M KCl, 10mM CaCl₂, 1mM DTT, 1mM NaN₃) で洗浄後, 同溶液に浸漬して 5℃ で2日間ゆっくり攪拌した試料について, フラメントの解離量 (○) と小片化の程度 (●) を調べた。尚, 小片化は1日当りの増加量で示した。



第11図 フラメントの解離量と筋原線維の小片化におよぼす温度の影響

筋原線維 (10mg/ml) を 0.1M KCl, 10mM CaCl₂, 1mM DTT, 1mM NaN₃, 10mM Tris-maleate buffer, pH 7.0 の溶液で洗浄後, 同溶液に浸漬し, 温度を調整した恒温槽中で12時間ゆっくり攪拌しながら保持し, フラメントの解離量 (○) と小片化の割合 (●) を調べた。小片化は第10図同様に1日当りの増加割合で表示した。

られなかったが、45℃以上では筋節内に塊状の物質が観察されるようになり、筋原線維蛋白質が熱変性を起したものである。

第四節 考 察

死後硬直時に短縮した筋節はその後の時間経過とともに静止長へ復元するが、この時点では筋肉中のATPは完全に消失しているのだから、死後筋肉における筋節長の変化はATP存在下で起る生筋の収縮弛緩とは異なった機構によると考えなければならぬ。すなわち、硬直後の死後筋肉において太いフィラメントと細いフィラメント間に滑りが起って筋節長が復元するとすれば、その原因は、両フィラメント間の結合が弱まることによるかあるいは両フィラメントを構成するアクチンとミオシンが蛋白質分解酵素の作用によって状態変化を起すことによるかのいずれかが考えられる。

全筋を用いた実験結果(第1回)から明らかのように、ATPを加えないとフィラメントはほとんど解離しないが、ATPを添加した場合には死後硬直後の時間経過とともに、フィラメントの解離量が増大することは、両フィラメントを構成するアクチンとミオシン間の結合にATPが作用し、両者が解離しやすくなるためと考えられる。筋原線維から解離するフィラメントの量は鶏浅脳筋では屠殺後12時間以上、

家兔胸最長筋では3日間以上経過した筋肉において急速に増加するが、この経過時間は硬直が解除する時期とよく合致する。また、フラメント標品から部分精製したミオシンの量もこれらと同様の傾向を示した。

屠殺後10日間を経た筋肉から調製したフラメントについて電子顕微鏡を用いて観察した結果(第2図)から、太いフラメントおよび細いフラメントの形態は新鮮な筋原線維から調製したものと全く同じであり、屠殺後の貯蔵期間中に蛋白質分解酵素の作用を受けた徴候は全く認められない。この事をさらに明らかにするため屠殺後10日目の筋肉から調製したフラメント標品についてSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行なった結果(第3図A)においてモイクシンおよびミオシンに由来するバンドは屠殺直後の新鮮な筋肉から調製したフラメント標品との間に何らの差異も認められず、ただ、トロポニン-Tの分解産物とみなされている30,000ダルトンのバンド(75)の出現に差異が認められるのみであった。

したがって、死後筋肉の貯蔵期間中にモイクシンとミオシンは蛋白質分解酵素の影響は受け

ていないものと考えられる。部分精製したミオシンの SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動像(第3図C)にはミオシンの重鎖と3本の軽鎖が見られ、ミオシンが完全な状態で保たれていることがさらに明瞭である。この標品では全蛋白質中の約90%をミオシンが占めている。

死後筋肉におけるフラメントの解離性は筋原線維の小片化、すなわちZ線の崩壊と密接に関連している。すなわち、全筋(第4図)、筋線維束(第5図)および筋原線維(第6図)のいずれの場合においても、Z線の崩壊がやや先行する形で進み、次いで、太いフラメントと細いフラメント間の解離を誘起しているように見受けられる。ただし、ATPによって解離するフラメント量と筋原線維の小片化のpH依存性(第10図)および温度依存性(第11図)においては両者は同様の傾向を示さない。しかし、pHの上昇によって筋原線維性蛋白質が可溶化されることが考えられること、および加熱に対する安定性が解離するフラメントでは小さくなると考えることによりフラメントの解離量と筋原線維の小片化の間の不一致は

はよく説明できる。

フラメントの解離量および筋原線維の小片化の程度が増加するためには Ca^{2+} が必須のものであり、 Ca^{2+} は死後硬直の解除において非常に重要な役割をはたしている事が判明した。フラメントの解離およびZ線の崩壊に必要な Ca^{2+} 濃度は $1 \times 10^{-4} \text{ M}$ (第9図)であり、この濃度は死後筋肉において Ca^{2+} 濃度は $2 \times 10^{-4} \text{ M}$ 程度に増大するという条件⁽³⁷⁾によく合致している。Bush⁽¹⁷⁶⁾ が報告したCAFによるZ線の崩壊にもこの Ca^{2+} 濃度は適しているが、pH依存性(第10図)に見られる様にCAFの至適pHである7.0においてZ線の崩壊は促進されず、死後筋肉の最終pHである5.5~6.0において筋原線維の小片化の割合が増大していることは、フラメントの解離およびZ線の崩壊は Ca^{2+} によって活性化されるCAFによるのではなく、むしろ Ca^{2+} が直接作用していると考えた方が妥当である。

試験管内の筋収縮と見なされているミオシンBの超沈殿を死後硬直のモデルと考え、超沈殿後におけるフラメントの解離性について調べると、 Ca^{2+} 存在下では10時間以上貯蔵するとATPによって解離するフラメントの量が増

加するのに反し、 G^{2+} 不在下ではこの現象は観察されない（第7図）。この事實は、ミオシンBの超沈殿の際に形成されたアクチンとミオシン間の固い結合が、 G^{2+} 存在下では、その後の時間経過とともに弱くなる事を示している。このようにミオシンBの超沈殿後におけるフラメントの解離量の時間変化および G^{2+} 依存性は左筋、筋線維束および筋原線維の場合とよく一致しており、ミオシンBの超沈殿を筋収縮モデルと見なす事の妥当性が明らかになった。一方、第8図に示したように、アクチンとミオシンだけから成る合成アクトミオシンは超沈殿後、フラメントの解離性には変化を生じない。アクチンとともに細いフラメントを形成しているトロポミオシンおよびトロポニンを加えた場合、Z線の構成々分である α -アクチニン⁽⁷⁴⁾を加えた場合、ミオシンフラメントの格子構造を維する役割をになっているM線に存在するM-蛋白質⁽⁷⁷⁾を加えた場合あるいは、ミオシンフラメント上に存在するC-蛋白質⁽⁷⁸⁾を加えた場合にはいづれも合成アクトミオシンの超沈殿後の経過時間によってフラメントの解離量が増加するという事はな

かった。このように、筋原線維に存在すること
が明らかにされている種々の蛋白質を添加
しても、ミオシンBの場合に観察された超沈
殿後の時間経過とともにフラメントの解離量
が増大するという現象がみられない。この差
異は、上記各種合成アクトミオシンとミオシ
ンBでは構成蛋白質に相違があることによる
と解される。因みに、ミオシンBには筋原線
維の構成蛋白質のほとんど全てが含まれてい
ると考えられており、この中には両フラメン
ト間の解離に関与する未知の蛋白質が存在す
る可能性がある。

本章で述べた実験結果から、死後硬直時に
短縮した筋節がその後静止長へ復元するのは
、硬直時に形成されたアクトンとミオシン間
の堅い結合が硬直解除期に脆弱化するためだ
と結論することができよう。アクトンお
よびミオシンは死後筋肉の貯蔵中も完全な状
態で保たれているのであるから、アクトンと
ミオシン間の結合の脆弱化が両蛋白質自体の
変化に起因しているとは考え難い。ミオシン
Bで観察される現象が種々の合成アクトミオ
シンでは観察されないという事実は、ミオシ

ンB標品中に含まれてゐる何らかの蛋白質因子の介在を示唆するものであり、 Ca^{2+} 存在下でこの蛋白質因子によつてアウチンとミオシン間の結合が修飾され、両者の結合が脆弱化すると考えた方が妥当であると思われる。また、アウチンとミオシン間の結合の脆弱化と筋原線維の小片化がほぼ平行して起るという事實は、筋原線維を Ca^{2+} で処理することによつて惹起されるZ線の崩壊時に筋原線維から遊離する蛋白質がアウチンとミオシン間の結合を修飾する可能性を示唆してゐると考えられる。

第三章 アクチン-ミオシン相互作用に 影響をおよぼす蛋白質因子の同定

第一節 序

第二章で述べた結果から、死後硬直時に短縮した筋節がその後静止長へ復元するのは、硬直時に形成されたアクチンとミオシンの堅い結合が硬直解除期に脆弱化するためと考えられるが、アクチンおよびミオシンは死後筋肉の貯蔵中も完全な状態が保持されている。従って、アクチン・ミオシン間結合の脆弱化は両蛋白質自体の変化に起因しているとは考えられない。さらに、ミオシンBで観察された現象が種々の合成アクチン・ミオシンにおいては観察されないという事実は、ミオシンB標品中に含まれている何らかの蛋白質因子の存在を示唆しているように思われるし、また、アクチンとミオシン間結合の脆弱化と筋原線維の小片化がほぼ平行して起るという事実は、筋原線維を Ca^{2+} で処理することによって惹起されるZ線の崩壊時に筋原線維から遊離する蛋白質がアクチン・ミオシン間の結合を修飾する可能性を示唆しているように思われる。腹部

と高橋は⁽³⁰⁾筋原線維を Ca^{2+} で処理することによって惹起される筋原線維の小片化について、 Ca^{2+} 処理によるZ線の崩壊はpH 6.6で最低値となる逆ベル型のpH依存性を示すこと、および35℃で最大値となるベル型の温度依存性を示すことを明らかにした。また、 Ca^{2+} を含む溶液で筋原線維を処理した後ホモゲナイズすれば筋原線維の小片化の程度と遊離する蛋白質量は処理時間の経過とともに増加し、最終的には筋原線維の全蛋白質量の10%内外の蛋白質が遊離されるが、遊離蛋白質には分子量75,000および55,000の未知の蛋白質や35,000の分子量を持つ蛋白質が含まれている事を報告している。 Ca^{2+} 存在下では、アークン・ミオシン間結合の脆弱化と筋原線維の小片化の割合および遊離蛋白質量の増加がほぼ平行して起るという事実から、この Ca^{2+} 処理によって筋原線維から遊離する蛋白質群がアークンとミオシン間の結合を修飾している可能性は大きいと思われる。従って、本章においては、 Ca^{2+} 処理によって筋原線維から遊離する蛋白質について、アークン-ミオシン相互作用におよぼす影響を明らかにすることを目的とした。また、本

論文においては、 Ca^{2+} 処理によって筋原線維から遊離する蛋白質群を“筋原線維の Ca^{2+} -抽出物”と定義した。

第二節 実験材料および方法

1, 筋原線維の調製

筋原線維は実験の目的に応じて, Perry と Grey の方法⁽⁵⁶⁾あるいは第二章で述べた Ecklinger の方法⁽⁵⁷⁾により調製した。Perry と Grey の方法では新鮮な家兎胸最長筋の挽き肉を5倍量の 25 mM KCl, 5 mM EDTA, 39 mM borate buffer (pH 7.1) 溶液とともに60秒間 Virtis ホモゲナイザーでホモゲナイズした後 2200 rpm で10分間遠心分離した。沈殿を5倍量の 0.1 M KCl, 5 mM EDTA, 39 mM borate buffer (pH 7.1) 溶液とともに45秒間 Virtis ホモゲナイザーでホモゲナイズして 2,200 rpm で10分間遠心分離した。沈殿を同様に30秒間ホモゲナイズして 2,200 rpm で10分間遠心分離した。この後, 沈殿を5倍量の 0.1 M KCl, 10 mM Tris-maleate buffer (pH 7.0) 溶液でホモゲナイズし, 次いで遠心分離して, 上澄液に蛋白質がなくなるまで4~6回繰り返し洗浄操作を行なって筋原線維を得た。

2, CAF (calcium activated sarcoplasmic factor) の調製

粗CAF標品を Busch の方法⁽⁷⁶⁾によって調製した。新鮮な家兎胸最長筋の挽き肉に6倍量

の 4 mM EDTA (pH 8.4) を加えて 60 秒間 Virtis ホモゲナイザーでホモゲナイズした後に 7,000 rpm で 40 分間遠心分離し、上澄液をガーゼで濾過した。1 N 酢酸を用いて濾液の pH を 6.15 に調整し、10 分間氷冷してから 7,000 rpm で 30 分間遠心分離した。この上澄液を 1 N 酢酸で pH 4.9 とし 10 分間氷冷した後に 7,000 rpm で 20 分間遠心分離した。挽き肉の 1 kg 分に相当する沈殿物を 70 ml の 4 mM EDTA, 0.1 M Tris-HCl (pH 8.2) 溶液に懸濁して pH を 7.0 に調整した。次いで、懸濁液を 200 ml とするよう冷水で希釈し、40,000 rpm で 120 分間超遠心分離した。上澄液を採取し、40% 飽和となるよう固形硫酸を加え pH 7.0 に調整して 30 分間氷冷した後に 12,000 rpm で 30 分間遠心分離した。得られた沈殿を 2 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl (pH 7.0) 溶液に溶解して、4 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl (pH 7.0) 溶液に対して透析した。約 20 時間の透析後に透析内液を 30,000 rpm で 60 分間超遠心分離し、上澄液を粗 CAF 標品とした。

3. 筋原線維の Ca^{2+} 処理

Perry と Grey の方法⁽⁵⁶⁾によって得られた筋原線維を服部と高橋の方法⁽³⁰⁾に従って 0.1 M KCl, 10

mM CaCl_2 , 1mM DTT, 1mM NaN_3 , 10mM Tris-maleate buffer (pH 7.0) 溶液に 10 mg/ml の蛋白質濃度で浸漬して、 5°C でゆっくり攪拌し、一定時間経過後に Virtis ホモゲナイザーで 60 秒間 10,000 rpm でホモゲナイズして、遊離蛋白質量および小片化の程度を測定した。遊離蛋白質量はホモゲナイズした懸濁液を 12,000 rpm で 20 分間遠心分離して、上澄液の蛋白質量を biuret 法で測定した。この方法を基本として、蛋白質の遊離量に対する Ca^{2+} 濃度, pH, 温度あるいは KCl 濃度の影響を調べた。

4. Ca^{2+} -抽出物の部分精製

筋原線維を Ca^{2+} 処理することによって遊離する蛋白質群のうち有効なものを部分精製した。 Ca^{2+} -抽出物中の有効蛋白質が 40-80% 飽和の硫酸画分に存在する事は、20% およびの画分によって確認した。 Ca^{2+} -抽出物の蛋白質濃度を 1.5~2.0 mg/ml とし、固形硫酸を 40% 飽和となるように溶解し、アンモニア水で pH を 7.0 に調整後 30 分間氷冷した。この溶液を 12,000 rpm で 30 分間遠心分離し、上澄液に 80% 飽和となるように固形硫酸を溶解し、pH 7.0 に調整後 30 分間氷冷した。12,000 rpm で 30 分間遠心分離して

沈殿部を回集して少量の 0.1 M KCl , 10 mM CaCl_2 , 20 mM Tris-HCl ($\text{pH } 7.5$) 溶液に溶解し, 大量の同液に対して約 20 時間透析した。透析により完全に硫酸を除いたものを $15,000\text{ rpm}$ で 20 分間遠心分離した上澄液を部分精製 Ca^{2+} -抽出物とした。

5, 合成アクトミオシンの透明化 (clearing phase) 期間の測定

合成アクトミオシン懸濁液 (0.25 mg/ml アクチン, 0.75 mg/ml ミオシン, 0.1 M KCl , 5 mM MgCl_2 , 1 mM CaCl_2 , $20\text{ mM imidazol-HCl}$ $\text{pH } 7.0$) 3 ml を分光計セルに入れ, adder-mixer を用いて ATP を加え, その後の濁度変化を波長 660 nm ⁽⁷⁹⁾ で日立 101 型分光計と記録計 QPD 54 を用いて測定し, 透明化期間を求めた。本論文で用いた透明化期間とは ATP 添加時より濁度が上昇し始めるまでを指している。

6, Mg^{2+} -ATPase 活性の測定

合成アクトミオシン懸濁液の Mg^{2+} -ATPase 活性は ATP の添加により直ちに超沈殿が起る条件を選んで行なった。反応条件は 0.25 mg/ml アクチン, 0.75 mg/ml ミオシン, 75 mM KCl , 2 mM MgCl_2 , 1 mM CaCl_2 , $20\text{ mM imidazol-HCl}$ ($\text{pH } 7.0$), 0.3 mM

ATPであった。25°Cで攪拌し、一定時間経過後に等量(2 ml)の冷却した15% TCA(三塩化酢酸)を加えて反応を停止させ、遊離した無機リン酸量を測定した。無機リン酸の定量は Fiske-Subbarow 法⁽⁸⁰⁾によって行なった。

7. 筋原線維の CAF 処理がトリチン-ミオシン相互作用におよぼす影響

Perry と Grey の方法⁽⁵⁶⁾によって調製した筋原線維に粗 CAF 標品を加えて、ATP によるフラメントの解離量、筋原線維の小片化の程度および蛋白質の遊離量を調べた。反応は筋原線維 10 mg/ml, 0.1 M KCl, 1 mM CaCl_2 , 10 mM β -mercapto ethanol, 1 mM NaN_3 , 50 mM Tris-HCl (pH 7.0) で 25°C, 100 分間振とう恒温槽中で行ない、10 mM EDTA の添加により反応を停止させた。CAF 処理した筋原線維はホモゲナイズを行わずに各々の測定に供した。また、CAF 処理によって筋原線維から遊離した蛋白質の部分精製は次のように行なった；20 mg/ml の筋原線維に対して 0.5 mg/ml の粗 CAF を添加して 25°C で 3 時間半反応させ、筋原線維の小片化の割合が 0.85 以上となったものを 12,000 rpm で 20 分間遠心分離した。上澄

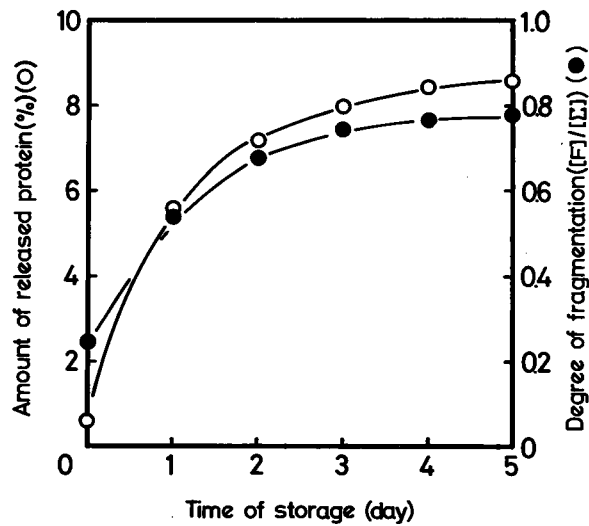
液の蛋白質濃度を約 2mg/ml とし、 $40\sim 80\%$ 飽和度の範囲で硫酸分画した。

第三節 結 果

第一項 Ca^{2+} 処理によつて筋原線維から遊離する蛋白質 (Ca^{2+} -抽出物)

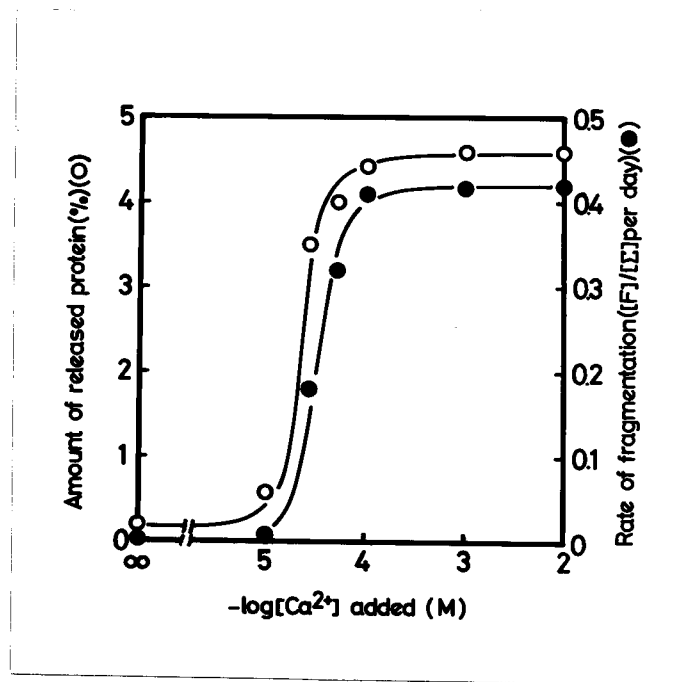
— その遊離量と筋原線維の小片化の関係 —
新鮮な筋原線維を Ca^{2+} で処理すると Z 線の崩壊に基づく小片化が惹起されるが、それとともに一群の蛋白質が筋原線維から遊離する⁽³⁰⁾。 Ca^{2+} -抽出物の遊離量と筋原線維の小片化の関係を調べた結果が第12図である。 Ca^{2+} -抽出物の遊離量および小片化の割合は共に Ca^{2+} 処理の3日目まで増加を続け、それ以降はほぼ一定値となった。 Ca^{2+} -抽出物の最大量は筋原線維の全蛋白質量の約8%であった。 Ca^{2+} -抽出物の遊離量と筋原線維の小片化の Ca^{2+} 濃度依存性を調べた結果が第13図に示してある。 Ca^{2+} -抽出物の遊離量と小片化の割合は共に Ca^{2+} 濃度が $1 \times 10^{-5} \text{M}$ から $1 \times 10^{-4} \text{M}$ にかけて増加し、 $1 \times 10^{-4} \text{M}$ 以上では一定値となった。

Ca^{2+} -抽出物の遊離量と筋原線維の小片化の pH 依存性は第14図に示すように、 Ca^{2+} -抽出物の遊離量が pH の上昇とともに増加するのに対して、筋原線維の小片化は pH 6.5 で最低値となり逆ベール型の Ca^{2+} 濃度依存性を示した。 Ca^{2+} -



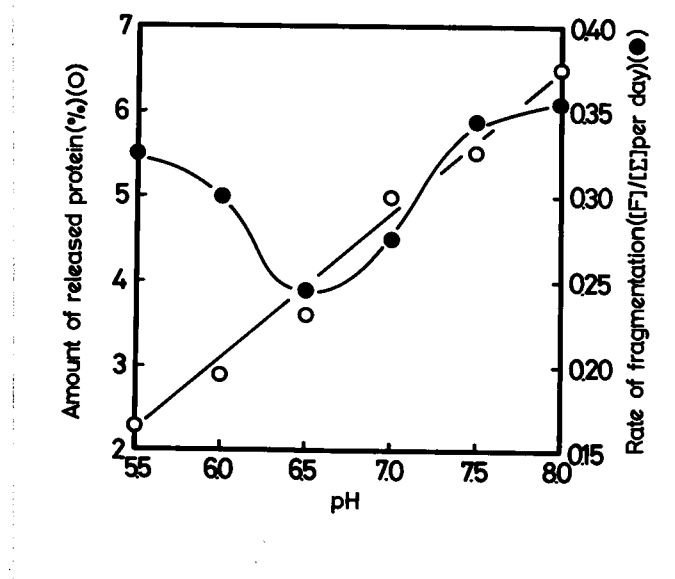
第12図 Ca^{2+} -抽出物の遊離量と筋原線維の小片化の関係

Perry と Grey の方法⁽⁵⁸⁾によつて調製した筋原線維 (10 mg/ml) を 0.1 M KCl, 10 mM CaCl_2 , 1 mM DTT, 1 mM NaN_3 , 10 mM Tris-maleate buffer, pH 7.0 に浸漬し, 5°C でゆっくりに攪拌した。一定時間経過後に Virtis ホモゲナイザーで60秒間, 10,000 rpm でホモゲナイズしたものの小片化の割合 (●) とこれを 12,000 rpm で20分間遠心分離後上澄液としてえられる Ca^{2+} -抽出物の遊離量 (○) を測定した。



第13図 Ca^{2+} -抽出物の遊離量と筋原線維の小片化におよぼす Ca^{2+} 濃度の影響

筋原線維を 10 mg/ml とし、 Ca^{2+} 濃度の異なる溶液 ($5 \text{ mM EGTA} \sim 1 \times 10^{-2} \text{ M CaCl}_2$, 0.1 M KCl , 1 mM DTT , 1 mM NaN_3 , $10 \text{ mM Tris-maleate buffer, pH 7.0}$) に浸漬し、よく攪拌しながら 5°C で24時間貯蔵した後、ホモゲナイズし、 Ca^{2+} -抽出物の遊離量 (○) と小片化の割合 (●) を調べた。



第14図 Ca^{2+} -抽出物の遊離量と筋原線維の小片化におよぼすpHの影響

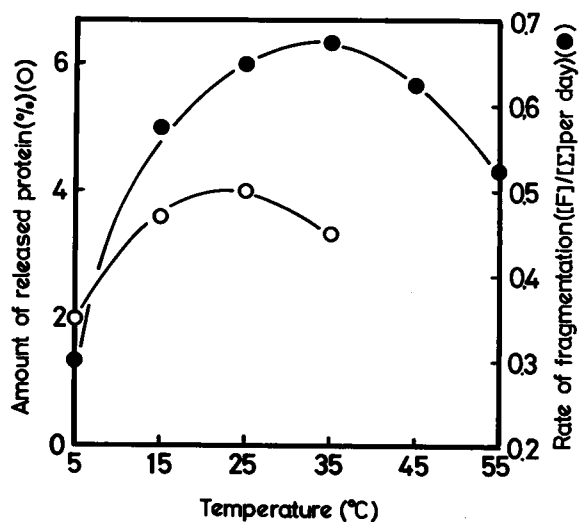
筋原線維を 10 mg/ml とし、pHの異なる溶液 ($20 \text{ mM Tris-maleate buffer}$, pH 5.5 ~ 8.0, 0.1 M KCl , 10 mM CaCl_2 , 1 mM DTT , 1 mM NaN_3) に浸漬して 5°C で24時間ゆっくり攪拌した後、ホモゲナイズし、 Ca^{2+} 抽出物の遊離量 (○) と小片化の割合 (●) を調べた。

抽出物の遊離量と筋原線維の小片化の温度依存性を調べた結果が第15図である。 Ca^{2+} 抽出物の遊離量は 25°C までは浸漬温度の上昇とともに増加するが、 35°C では若干減少した。 45°C 以上では測定値が異常に高かったので図示しなかったが、これは筋原線維性蛋白質の熱変性によるものと考えられる。筋原線維の小片化は 35°C までは温度の上昇に伴って増加し、それ以上の温度では減少して、ベル型の温度依存性を示した。 Ca^{2+} 抽出物の遊離量と筋原線維の小片化のKCl濃度依存性を調べた結果が第16図である。小片化の割合はKCl濃度が高くなるのとともに増加するが、 Ca^{2+} 抽出物の遊離量は 0.12M KCl濃度で最大値を示した。尚、 $0-0.2\text{M}$ KClの範囲において筋原線維の位相差顕微鏡下の形態は正常であったが、 0.2M を越えると太いフラメントが溶解するため明瞭な形態を示さなかった。

第二項 部分精製した Ca^{2+} 抽出物がテググン-ミオシン相互作用におよぼす影響

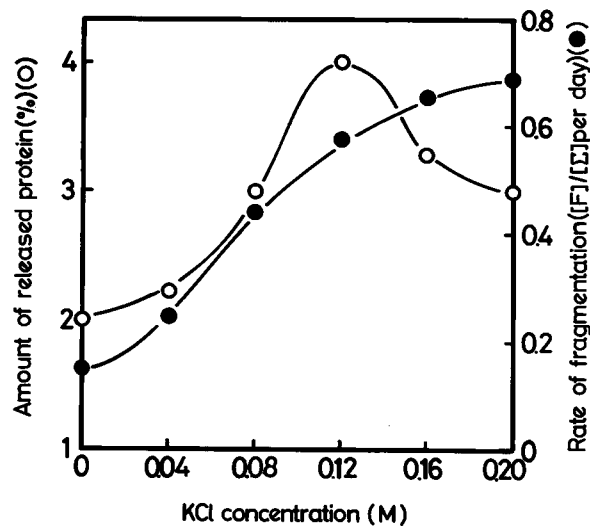
I, フラメントの解離性におよぼす影響

硫酸分画により部分精製した Ca^{2+} 抽出物を新鮮な筋原線維に加え、ATPの添加によって



第15図 Ca^{2+} -抽出物の遊離量と筋原線維の小片化におよぼす温度の影響

筋原線維を 10 mg/ml とし、 0.1 M KCl , 10 mM CaCl_2 , 1 mM DTT , 1 mM NaN_3 , $10\text{ mM Tris-maleate buffer, pH 7.0}$ の溶液に浸漬して 5°C から 55°C に調整した恒温槽内で6時間ゆっくり攪拌した後、ホモゲナイズし、 Ca^{2+} -抽出物の遊離量(○)と小片化の割合(●)を調べた。



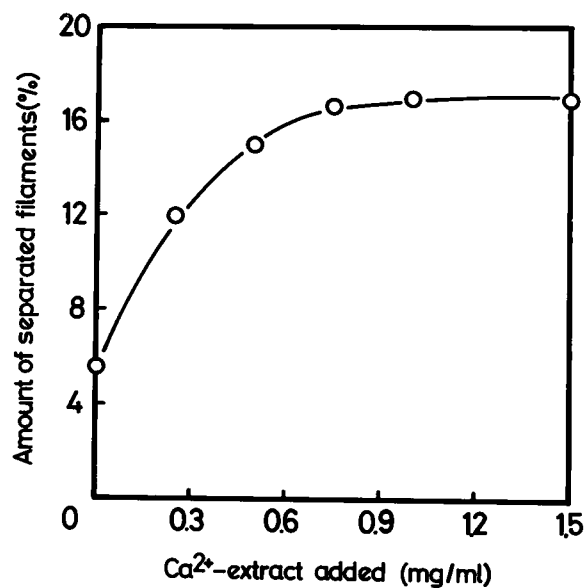
第16図 Ca^{2+} -抽出物の遊離量と筋原線維の小片化におよぼすKCl濃度の影響

筋原線維を 10 mg/ml とし、 17 KCl 濃度の異なる溶液 ($0 \sim 0.2\text{ M KCl}$, 10 mM CaCl_2 , 1 mM DTT , 1 mM NaN_3 , $10\text{ mM Tris-maleate buffer, pH 7.0}$) に浸漬して 5°C で24時間ゆっくりに攪拌した後、ホモゲナイズし、 Ca^{2+} -抽出物の遊離量 (○) と小片化の割合 (●) を調べた。

解離するフラメントの量を調べた結果が第17図である。解離するフラメントの増加量は筋原線維の全蛋白質量の11.4%と小さいが、明らかに Ca^{2+} 抽出物の添加量に応じて増加した。筋原線維1mgに対して約0.8mgの部分精製した Ca^{2+} 抽出物を添加した時にフラメントの解離量は最大値を示し、0.8mg以上添加してもフラメントの解離量は増加しなかった。

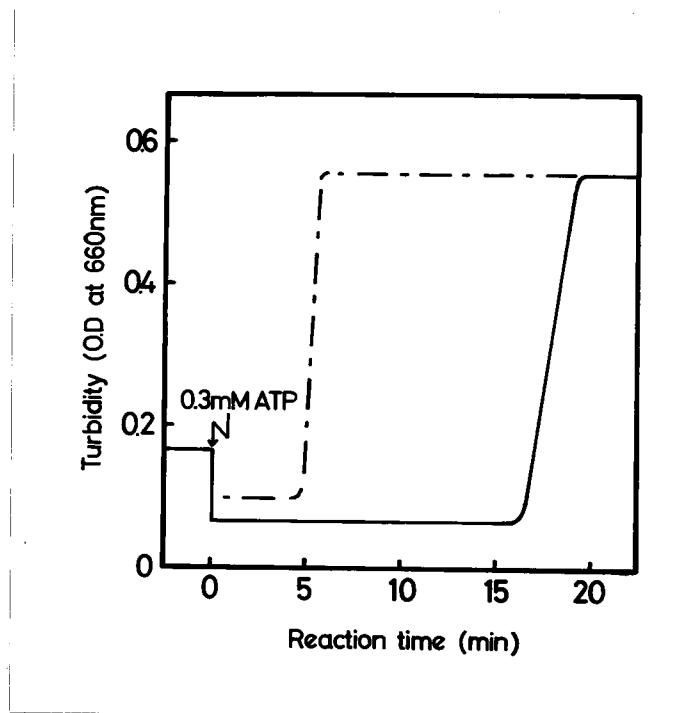
2. アクトミオシンの超沈殿におよぼす影響

第18図に示すように合成アクトミオシン懸濁液にATPを添加すると直ちに透明化を起し、濁度が低下した状態が数分間持続する。その後濁度が急速に上昇し、やがて一定値となり超沈殿を起す⁽⁷⁹⁾。合成アクトミオシンに部分精製した Ca^{2+} 抽出物を加えて超沈殿におよぼす影響を調べると、ATP添加直後の濁度の低下が無添加のものに較べて大きくなり、また、透明化の期間が顕著に延長され、濁度が上昇するまでに要する時間が無添加の場合の約4倍も長くなった。他方、濁度の最大値は無添加区と同一であった。透明化期間の延長効果と Ca^{2+} 抽出物の添加量の関係は第19



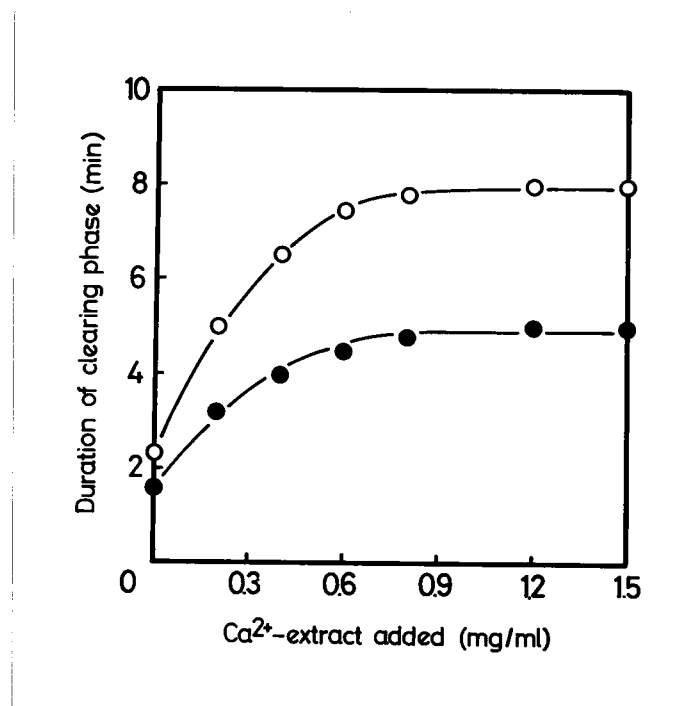
第17図 筋原線維からのフィラメントの解離性におよぼす部分精製した Ca^{2+} -抽出物の影響

まず, Ellinger の方法⁽⁵⁷⁾で調製した筋原線維懸濁液に部分精製した Ca^{2+} 抽出物を加え攪拌混和した。ついで, 等量の ATP 溶液を加えた。従って, 最終混和液の組成は 2mg/ml 筋原線維, 0~3.0mg/ml Ca^{2+} 抽出物, 0.15M KCl, 5mM MgCl_2 , 1mM CaCl_2 , 10mM Kphosphate pH 7.0, 5mM ATP となつてゐる。この混和液をフロンホモゲナイザーを用いて氷冷しながら 1,400rpm で100秒間に外筒を5回往復させてホモゲナイズ後直ちに 3,000rpm で10分間遠心分離し, 上澄液の蛋白量を測定した。 Ca^{2+} 抽出物の添加量は筋原線維 1mg/ml 当りの量を表示してある。縦軸は筋原線維の全蛋白量に対する割合である。



第18図 部分精製した Ca^{2+} -抽出物が合成アクトミオシンの超沈殿におよぼす影響

合成アクトミオシン懸濁液 (0.25mg アクトン, 0.75mg ミオシン/ml, 0.1M KCl, 5mM MgCl_2 , 1mM CaCl_2 , 20mM imidazol-HCl pH 7.0) を 25°C で恒温保持して ATP を添加し, 濁度変化を 660nm で測定した (破線)。実線は 0.7mg/ml の Ca^{2+} -抽出物添加区を表わす。

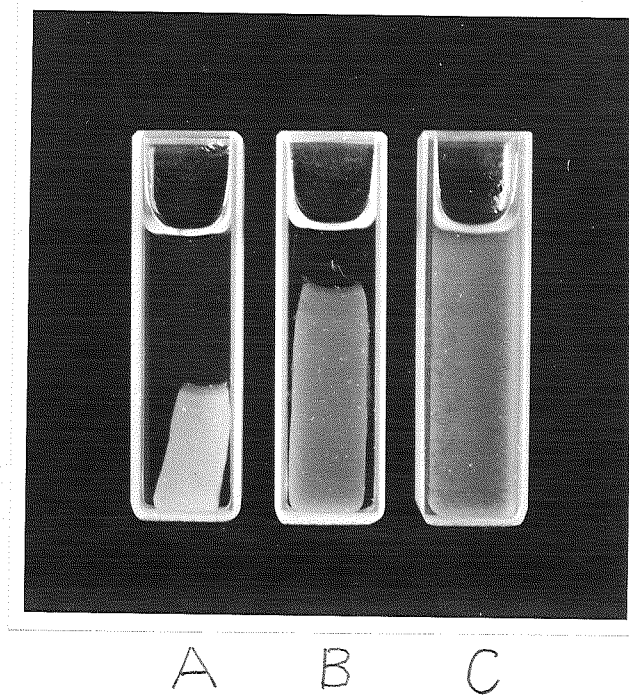


第19図 部分精製した Ca^{2+} -抽出物の透明化 期間延長作用

部分精製した Ca^{2+} -抽出物を添加した合成アクトミオシン (○) あるいは超沈殿した合成アクトミオシン (●) 懸濁液 (0.25mg アクトン, 0.75mg ミオシン, 0~1.5mg Ca^{2+} -抽出物/ml, 0.1M KCl, 5mM MgCl_2 , 1mM CaCl_2 , 20mM imidazole-HCl pH7.0) に, さらに 0.3mM ATP を添加して, 透明化期間を測定した。超沈殿した合成アクトミオシンとは, 合成アクトミオシン懸濁液に 1mM ATP を加えて透明化期に 5,000 rpm で10分間遠心分離して上澄液を採り, これを 25°C に放置して超沈殿させた後に再度遠心分離し, 沈殿部を再懸濁したものである。

図に示す通りである。1mg/mlのアクトミオシンに対して部分精製した Ca^{2+} -抽出物約0.8mg/mlの添加によって透明化期間の延長効果は飽和点に達することがわかる。超沈殿を起こした合成アクトミオシンを用いた場合もほとんど同じ結果がえられたが、透明化期間の延長効果がやや小さかった。超沈殿を起こした合成アクトミオシンではアクチンとミオシンの結合が強くなっている⁽⁸¹⁾にもかかわらず、部分精製した Ca^{2+} -抽出物は透明化期間の延長効果を顕著に示す事が明らかである。

さらに、部分精製した Ca^{2+} -抽出物を加えた場合、形成される沈殿物の形態も無添加のものとは大きく異なっていた。第20図に示したように濁度変化が最大値に達した後約30分程静置した際に形成される超沈殿物はアクチンとミオシンだけからなる合成アクトミオシンでは栓状となるのに対し、 Ca^{2+} -抽出物の添加量の増加につれてしだいに粗大な集合体となり、1mg/mlの合成アクトミオシンに対して0.8mg/ml以上の部分精製した Ca^{2+} -抽出物を加えると擦りがラス状となり、このものは長時間(12時間)静置しても沈殿を形成することはない。



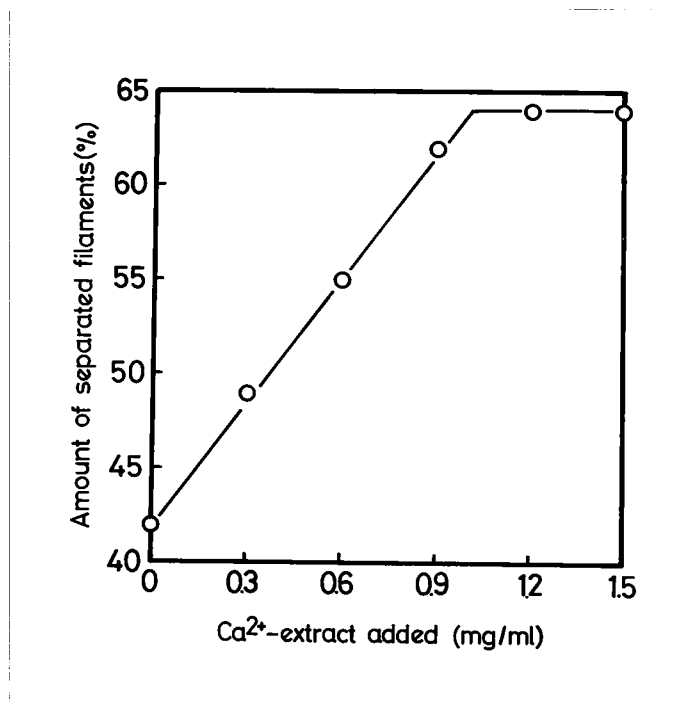
第20回 部分精製した Ca^{2+} -抽出物が合成アクトミオシンの超沈殿形成におよぼす影響
 合成アクトミオン懸濁液 (0.25mg アクテン, 0.75mg ミオシン/ml, 0.1M KCl, 5mM MgCl_2 , 1mM CaCl_2 , 20mM imidazol-HCl pH 7.0) 3ml を分光計セルに入れ, 0.3mM ATP を adder-mixer で添加後 25°C で1時間, 次いで室温で10時間放置してから写真撮影した。A, 対照区。B, 0.4mg/ml の Ca^{2+} -抽出物添加区。C, 0.8mg の Ca^{2+} -抽出物/ml 添加区。

かった。この添加量は透明化期間を延長させる作用が飽和点に達する添加量とよく一致しており、 Ca^{2+} -抽出物がアクトシン相互作用を抑制する効果は肉眼的にも識別できることが判った。

合成アクトミオシンの透明化期間に部分精製した Ca^{2+} -抽出物を添加して、フラメントの解離量を調べた結果が第21図である。部分精製した Ca^{2+} -抽出物の添加量の増加にともないフラメントの解離量は増加し、合成アクトシン 1mg に対して約 1mg の添加で最大値となり、この時、フラメントの解離量は無添加のものに比して22%も増加した。

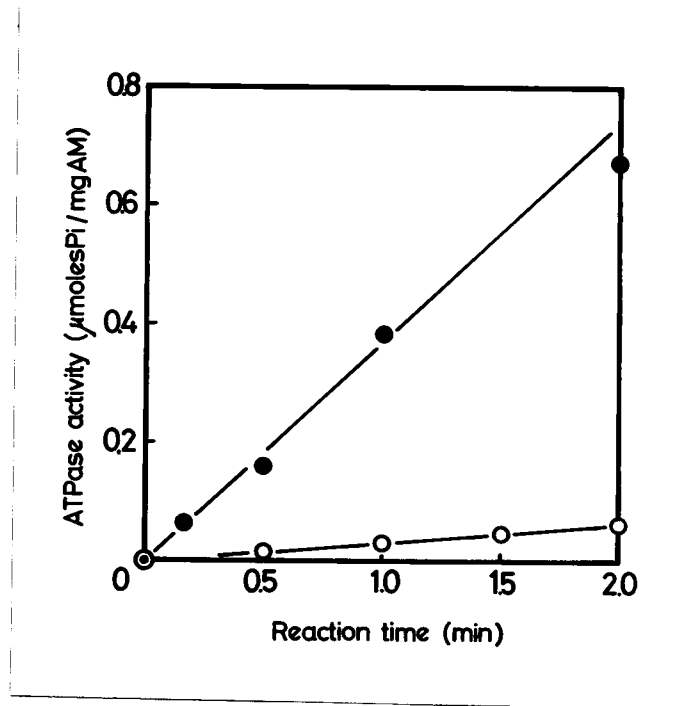
3, 合成アクトミオシンの Mg^{2+} -ATPase活性におよぼす影響

第22図は合成アクトミオシンにATPを添加後直ちに超沈殿が起る条件下で Mg^{2+} -ATPase活性を測定した結果である。合成アクトミオシンは高い Mg^{2+} -ATPase活性($U=0.35$)を示すのに対し、部分精製した Ca^{2+} -抽出物を加えた場合には Mg^{2+} -ATPase活性は低く($U=0.03$)、 Ca^{2+} -抽出物がアクトミオシンの Mg^{2+} -ATPase活性を著しく抑制する作用のある事が判る。部分精



第21図 合成アクトミオシンにおけるフラメントの解離性におよぼす部分精製した Ca^{2+} -抽出物の影響

合成アクトミオシン (0.25mg アクトン, 0.75mg ミオシン/ml, 0.1M KCl, 5mM MgCl_2 , 1mM CaCl_2 , 20mM imidazole-HCl pH 7.0) に 2.5mM ATP を添加して透明化を惹起した後, 部分精製した Ca^{2+} -抽出物を加え, フラメントの解離量を測定した。尚, 5,000 rpm, 10分間の遠心分離によってえられた上澄液の Folin 法による発色値から添加した Ca^{2+} -抽出物の発色値を差し引いて, フラメントの解離量を算出した。従って, 縦軸は合成アクトミオシンの全蛋白質質量に対する割合を表わす。



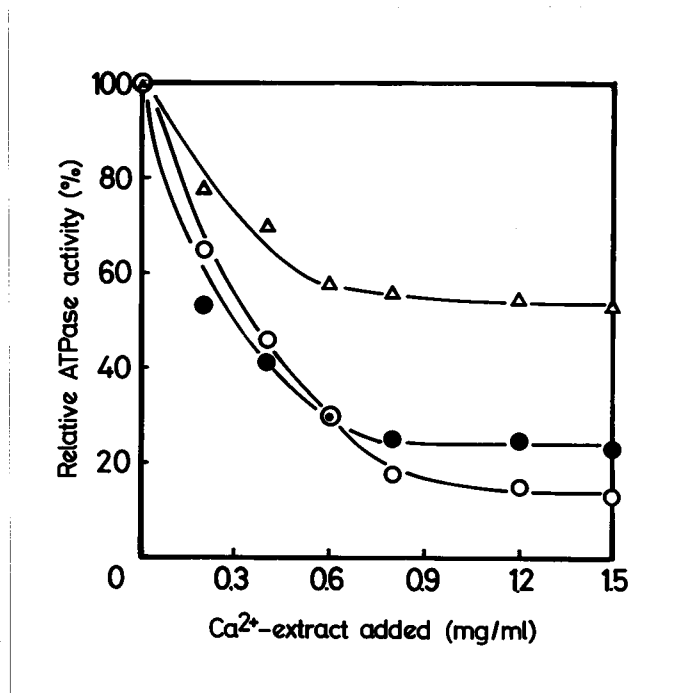
第22図 部分精製した Ca^{2+} -抽出物が合成した
クトロミオシンの Mg^{2+} -ATPase 活性におよぼす影
響

合成したクトロミオシン懸濁液 (0.25 mg クタン,
0.75 mg ミオシン/ml, 75 mM KCl, 2 mM MgCl_2 , 1 mM CaCl_2 ,
20 mM imidazol-HCl pH 7.0) を攪拌しながら 25°C に
保持し, 0.3 mM ATP を添加して反応を開始し
た。●, 対照区。○, 1 mg の部分精製した Ca^{2+} -抽
出物/ml 添加区。

製した Ca^{2+} -抽出物の添加量と合成アクトミオシンの Mg^{2+} -ATPase 活性の関係を調べた結果が第23図である。この図では、合成アクトミオシン、超沈殿した合成アクトミオシンおよび新鮮な筋原線維について、無添加の場合の活性値を100%とした相対値で活性を表示してある。合成アクトミオシンおよび超沈殿した合成アクトミオシンの場合には、合成アクトミオシン 1mg/ml に対して部分精製した Ca^{2+} -抽出物 0.8mg/ml までは添加量に応じて Mg^{2+} -ATPase 活性が抑制され、この量比の時約80%の活性の低下が見られた。一方、筋原線維の場合には、抑制が最大となる Ca^{2+} -抽出物の添加量は合成アクトミオシンの場合とほとんど同じであったが抑制の程度はかなり低く、約50%の活性を抑制するにとどまった。

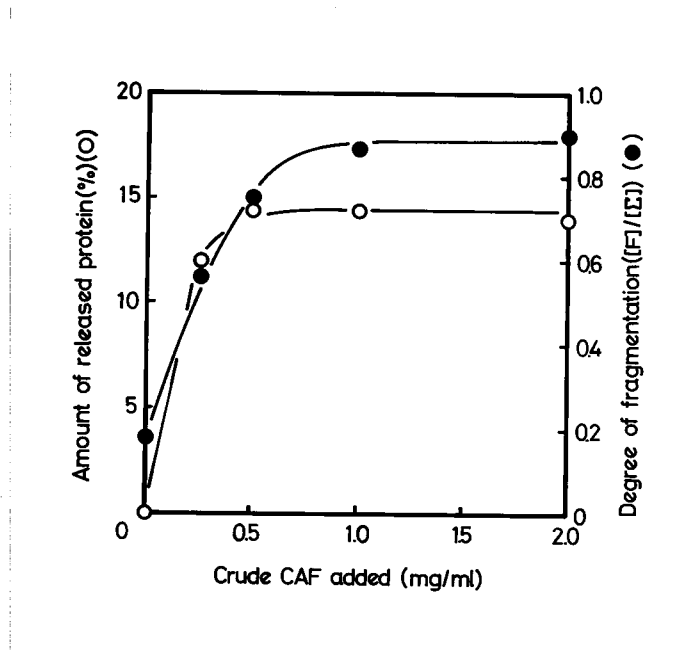
第三項 CAF 処理によって筋原線維から遊離する蛋白質がアクトン-ミオシン相互作用におよぼす影響

粗 CAF 標品を加え100分間、 25°C で処理した筋原線維について小片化および遊離蛋白質量を測定した結果が第24図である。筋原線維に少量の粗 CAF 標品を加えると、ほとんど全て



第23図 部分精製した Ca^{2+} -抽出物が Mg^{2+} -ATPase 活性におよぼす影響

反応はいづれも 25°C で混液を攪拌しながら行なった。添加した Ca^{2+} -抽出物（横軸）はアクトミオシンあるいは筋原線維 1mg 当りで表示した。 Ca^{2+} -抽出物無添加区の活性を100として、比活性（縦軸）で表示した。○； 1mg の合成アクトミオシン/ ml , 75mM KCl , 2mM MgCl_2 , 1mM CaCl_2 , 20mM imidazol-HCl pH7.0, 0.3mM ATP。●； 1mg の超沈殿した合成アクトミオシン/ ml , 60mM KCl , 2mM MgCl_2 , 1mM CaCl_2 , 20mM imidazol-HCl pH7.0, 0.4mM ATP。△； 0.5mg の Perry と Grey の方法⁽⁵⁶⁾ で調製した筋原線維/ ml , 60mM KCl , 2mM MgCl_2 , 1mM CaCl_2 , 20mM imidazol-HCl pH7.5, 1mM ATP。



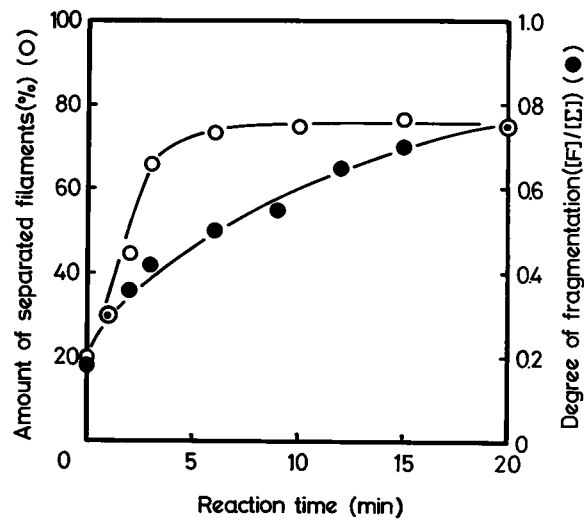
第24図 遊離蛋白質質量と小片化におよぼすCAFの影響

PerryとGreyの方法⁽⁵⁶⁾で調製した筋原線維(10mg/ml)に粗CAF標品を加え25℃で100分間振とう恒温槽で反応させた後に, 72,000rpmで20分間遠心分離して上澄液中の遊離蛋白質質量をbiuret法により測定した(○)。また, 遠心分離以前の試料について小片化の割合を測定した(●)。

の筋原線維（約90%）は小片化を起し、この時の遊離蛋白質量は筋原線維の全蛋白質の約15%に達した。

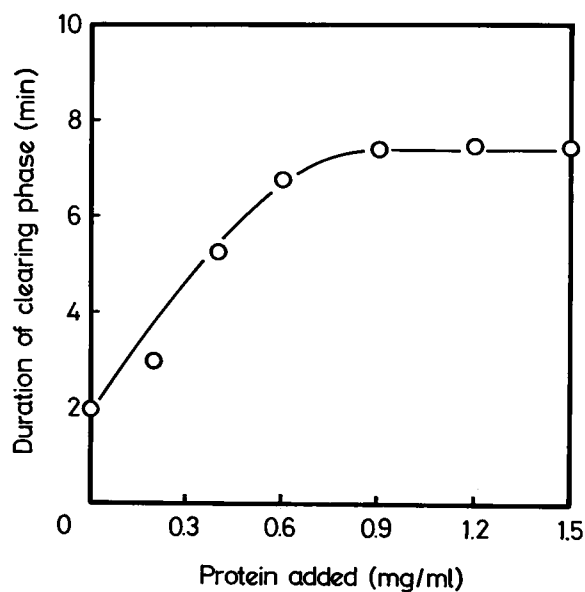
筋原線維と粗CAF標品の割合を10:1として処理した場合のフラメントの解離量と筋原線維の小片化の関係を追跡した結果が第25図である。筋原線維の小片化の程度は反応開始後20分までしだいに増加し、0.75となったが、フラメントの解離量は反応開始後6分で最大値に達し、筋原線維の全蛋白質量の75%に相当するフラメントがATPの添加によって解離するようになった。

CAF処理によって筋原線維から遊離した蛋白質について部分精製し、合成アクトミオシンの透明化期間の延長効果を調べた。第26図に示したように、合成アクトミオシン1mg/mlに対して約0.8mg/mlの添加までは添加量の増加に応じて透明化の期間も延長され、この濃度で最大値となり、その透明化期間の延長効果は対照の約4倍であった。この結果は、既に第19図で明らかにした Ca^{2+} 抽出物を示す延長効果と全く同様であった。



第25図 フラメントの解離量と小片化におよぼすCAFの影響

Perry & Grey の方法⁽⁵⁶⁾によつて調製した筋原線維に粗CAF標品を加え(10mgの筋原線維および1mgの粗CAF/ml, 0.1MKCl, 1mM CaCl₂, 10mM *p*-mercapto ethanol, 1mM NaN₃, 50mM Tris-HCl, pH 7.0) 25°Cでよく攪拌しながら一定時間毎に10mM EDTAで反応を停止し, 小片化の割合(●)を測定した。さらに, 3,000 rpmで10分間遠心分離し, 沈殿を0.1MKCl, 2mM EGTA, 10mM MgCl₂, 10mM Kphosphate (pH 7.0) 溶液で2回洗浄した後, ATPによつて解離するフラメント量(○)を測定した。



第26図 CAF処理によってえらわれる蛋白質が合成アクトミオシンの透明化期間の延長におよぼす影響

CAF処理により筋原線維から遊離した蛋白質を硫酸分画法で部分精製し、合成アクトミオシン懸濁液 (0.25 mg アクトン, 0.75 mg ミオシン / ml, 0.1 M KCl, 5 mM $MgCl_2$, 1 mM $CaCl_2$, 20 mM imidazol-HCl, pH 7.0) にて透明化期間を測定した。反応は 25 °C で, 0.3 mM ATP を添加して開始した。

第四節

考 察

Ca^{2+} 処理によって筋原線維から遊離する蛋白質質量と筋原線維の小片化の関係を調べた結果(第12図)は腹部と高橋⁽³⁰⁾によって報告された結果と同じであった。すなわち、筋原線維の小片化が Ca^{2+} による処理時間とともに増加すると、これに平行して遊離蛋白質質量も増加した。この両者の Ca^{2+} 濃度依存性を調べた結果(第13図)においても筋原線維の小片化、すなわちZ線の崩壊と遊離蛋白質質量は密接に関連しており、 Ca^{2+} によって惹起されるZ線の崩壊が遊離蛋白質質量の増加となって現出するものと考えられる。従って、遊離蛋白質中にはZ線の構成成分が多量に含まれていると考ええてよいであろう。

一方、遊離蛋白質と筋原線維の小片化のpH依存性(第14図)、温度依存性(第15図)およびKCl濃度依存性(第16図)においては、両者は同様の傾向を示さない。しかし、pHおよびKCl濃度の上昇ならびに増加によってZ線以外の筋原線維性蛋白質が可溶化されることが考えられること、および熱に対する安定性が遊離蛋白質では小さくなると考えることにより、

遊離蛋白質と筋原線維の小片化の間の不一致はよく説明できる。KCl濃度依存性において、0.12 M KClの時に遊離蛋白質量が最大値を示すが、このことは生理的塩環境において蛋白質の遊離が最も促進される事を示していると考えられ、興味深い。

遊離蛋白質量と筋原線維の小片化の関係を調べた結果(第12図より第15図まで)は第二章で述べたフラメントの解離量と小片化の関係(第6, 9, 10および11図)と全く同様の傾向を示した。例えば、第6図と第12図を比較すると、 Ca^{2+} による処理時間の経過にともなって筋原線維の小片化、すなわちZ線の崩壊が進行すると、遊離蛋白質量が増加し、同時にATPによって解離するフラメント量も増加する事が判る。これらの事実は、 Ca^{2+} 処理によって筋原線維から遊離した蛋白質にフラメントを解離させる作用があることを示している。そこで、 Ca^{2+} -抽出物から硫酸分画法により部分精製した蛋白質を筋原線維(第17図)あるいは合成テクトミオシン(第21図)に加えると、果して、フラメントの解離量は顕著に増加することが明らかになった。 Ca^{2+} -抽出物中

に含まれている蛋白質がアクトン-ミオシン相互作用に影響をおよぼし、その結果、太いフィラメントと細いフィラメントが容易に解離するものと考えられる。

部分精製した Ca^{2+} -抽出物がアクトミオシンの超沈殿におよぼす影響を調べた結果(第18図)から明らかのように、 Ca^{2+} -抽出物はアクトミオシンの透明化期の濁度を低下させ、かつ透明化期間を延長する。アクトミオシンの濁度はアクトンフィラメントとミオシンフィラメントの結合に由来するものである⁽⁸¹⁾から、 Ca^{2+} -抽出物はアクトンとミオシン間の結合の解離を促進させる作用を有しており、さらに透明化期間を延長させるのは Ca^{2+} -抽出物がアクトン-ミオシン相互作用を抑制する事を反映したものである。このような Ca^{2+} -抽出物の効果は、肉眼的にもはっきりと確認される(第20図)し、 Mg^{2+} -ATPase 活性の測定結果(第22図)からしても明確である。アクトンによって活性化されるミオシンの Mg^{2+} -ATPase 活性はアクトンとミオシンの相互作用の強さを反映している⁽⁸¹⁾ので、 Ca^{2+} -抽出物を添加した場合には、合成アクトミオシンの Mg^{2+} -ATPase 活性が

対照区の名にも低下することから、 Ca^{2+} -抽出物はアクトニン-ミオシン相互作用を著しく抑制する作用のある事が判る。

部分精製した Ca^{2+} -抽出物の添加量と合成アクトミオシンの透明化期間の延長作用（第19図）、フラメントの解離量（第21図）および Mg^{2+} -ATPase 活性（第23図）との関係を調べた結果から明らかなように、最大の効果を表わすのに要する Ca^{2+} -抽出物の添加量はいずれの場合もよく一致しており、合成アクトニン 1mg に対し 0.8mg であった。一定量の Ca^{2+} -抽出物の添加によって、アクトニン-ミオシン相互作用が顕著に抑制されることから、第二章で述べた筋線維束（第5図）、筋原線維（第6図）あるいは超沈殿したミオシンB（第7図）を Ca^{2+} 処理した際に観察されたフラメントの解離量の増大をよく説明することが出来る。すなわち、筋線維束、筋原線維あるいは超沈殿したミオシンBを Ca^{2+} 処理すると、Z線の崩壊あるいはミオシンB標品中に残存するZ線の崩壊にともなって Ca^{2+} -抽出物が徐々に増加し、この Ca^{2+} -抽出物中に含まれる蛋白質がアクトニン-ミオシン間の結合を修飾することに

よりフラメントの解離量が増大すると考えられるのである。

Ca^{2+} -抽出物はZ線の崩壊にともなって筋原線維から遊離されるのであるから、アウチン-ミオシン相互作用を抑制する作用を持つ蛋白質はZ線に由来するであろう事が推定される。このことを確認するために、筋原線維をCAF処理し、この時遊離した蛋白質がアウチン-ミオシン相互作用におよぼす影響を調べた。CAFは筋原線維のZ線を選択的に分解する蛋白質分解酵素であると報告^(76, 82-85)されているので、筋原線維をCAFで処理した際に小片化の増大とともに遊離する蛋白質(第24図)はZ線から遊離したものを多く含んでいると考えられる。第25図に見られるようにCAFによるZ線の分解が進行するとフラメントの解離量も増加し、両者が密接に関連している事は明らかである。さらに、CAF処理によって得られた蛋白質を Ca^{2+} -抽出物の場合と同様に硫酸処理した蛋白質画分が示す場合アクトミオシンの透明化期間延長作用は、部分精製した Ca^{2+} -抽出物のそれと全く同一である(第19, 26図)。これらの事から、アウチン-ミオ

シン相互作用を抑制する蛋白質はZ線に由来
すると考えるのが妥当であろう。しかし、筋
原線維を Ca^{2+} 処理した場合とCAF処理した場
合では明らかな相異がある事は明記しておか
なければならぬ。すなわち、 Ca^{2+} 処理した場
合にはホモゲナイズすることによってはじめて
筋原線維は小片化するのに対し、CAF処理の
場合にはホモゲナイズという物理的衝撃を加
えなくても筋原線維は既に小片化している事
である。また、CAF処理の場合にはフラメン
トの解離量と小片化の関係(第25図)は、フ
ラメントの解離が小片化より遙かに先行して
起っており、 Ca^{2+} 処理の場合(第6図)と大き
く異なっている。 Ca^{2+} 処理とCAF処理の相違に
ついては、死後筋肉中でZ線の崩壊を惹起す
るのは Ca^{2+} であるのか、あるいはCAFであるの
かを明らかにする為の手段がかりを与えるもの
と考えられるので、今後さらに検討する必要
がある。

以上述べたように、筋原線維を Ca^{2+} 処理した
時に、Z線の崩壊とともに遊離される Ca^{2+}
抽出物は、アクトシン相互作用を顕
著に抑制する。この効果は、合或アクトミオ

シンの透明化期間の延長および Mg^{2+} -ATPase 活性の阻害効果において特に明瞭に認めることが出来るが、 Ca^{2+} -抽出物中に含まれている蛋白質がアウチンあるいはミオシンと結合してやれらの一方あるいは両者を修飾し、そのためにアウチン-ミオシン間の相互作用が阻害されるものと考えられる。阻害効果を持つ蛋白質が、生筋では筋原線維のZ線に局在しているとするれば、生筋においてアウチン-ミオシン相互作用に影響をおよぼすことは考えられず、死後筋肉においてZ線が崩壊してはじめてアウチン-ミオシン間結合を脆弱化させるとしてよく理解できよう。従って、第二章で述べた全筋におけるフラメントの解離量が増大するという現象は、 Ca^{2+} -抽出物中に含まれる蛋白質に起因するものと結論することが出来る。しかし、 Ca^{2+} -抽出中には多くの種類の蛋白質が含有されているので、アウチン-ミオシン相互作用の抑制がどのような機作によるものかを説明するためには、 Ca^{2+} -抽出物を精製し、効果を有する単一の蛋白質について検討を加える必要があると考えられる。 Ca^{2+} -抽出物の精製過程で、何を指標にするか

については、合成アクトミオシンの透明化期間の延長効果および Mg^{2+} -ATPase 活性の阻害効果を掲げることが出来る。しかし、後者は合成アクトミオシンの標品によって、また調製後の貯蔵時間によって活性が変化し、実験条件の設定に困難があるところから、透明化期間の延長効果を指標とするのが最も良い方法であると考えられる。

第四章 アクチン-ミオシン相互作用に 影響をおよぼす蛋白因子・偽トロポミオシ ンの諸性質

第一節 序

第二章および第三章においてえられた結果から、死後硬直時に短縮した筋節の長さが静止長へ復元するのは、硬直時に形成されたアクチン・ミオシン間の堅い結合が硬直解除期に脆弱化する事に起因していることが判った。また、このアクチン・ミオシン間結合の脆弱化は太いフィラメントおよび細いフィラメントのATPによる解離量の変化としてとらえることが出来るが、この変化はアクチンあるいはミオシン自体の変化に因るものではなく、筋原線維の小片化、すなわちZ線の崩壊と密接に関連している事が判明した。そしてZ線の崩壊にともなって筋原線維から遊離する Ca^{2+} 抽出物がアクチン-ミオシン相互作用を顕著に抑制する効果があり、この効果は、合成アクチン・ミオシンの透明化期間の延長および Mg^{2+} -ATP活性の阻害において特に明瞭に発揮された。さらに、筋肉模型である筋原線維や合成ア

アクチンに Ca^{2+} -抽出物を添加すれば、フラメントの解離性を大きく促進する事から、 Ca^{2+} -抽出物に含まれている蛋白質が生筋では筋原線維のZ線に局在しており、死後筋肉においてZ線が崩壊してはじめてアクチン-ミオシン間の結合を脆弱化するものと考えれば、全筋におけるフラメントの解離性の変化、すなわち死後硬直が解除する時期にATPによるフラメントの解離量が増大するという現象はよく理解でき、アクチン-ミオシン相互作用の死後変化という点からの死後硬直の解除機構がよく説明されよう。

しかし、 Ca^{2+} -抽出物中には多種類の蛋白質が含有されており、アクチン-ミオシン相互作用抑制の機作を解明するためには Ca^{2+} -抽出物を精製し、効果を有する単一の蛋白質について検討する必要がある。そこで、本章において透明化期間の延長効果を指標として、 Ca^{2+} -抽出物に含まれている有効蛋白質の精製と、その諸性質を調べる事を目的とした。精製によって得られた蛋白質は、その一般的特性が細いフラメント上に存在するトロポアクチンに類似していたので、本論文においては

Ca^{2+} -抽出物より精製したこの蛋白質を偽トロ
ポミオシン (Pseudo-tropomyosin) と呼ぶことに
した。

第二節 実験材料および方法

1, Ca^{2+} -抽出物の精製

Ca^{2+} -抽出物の精製は硫酸分画により部分精製した蛋白分画を出発物質とした。セフデックス G-200 (Pharmacia Fine Chemicals, particle size 40~120 μm) によるゲル濾過法および DEAE (diethylaminoethyl) セルロース (Whatman DE52) によるイオン交換カラムクロマトグラフ法を用いて精製を行った。ゲル濾過法および DEAE セルロースカラムクロマト法においては、溶出液の 280 nm における吸収を測定した。また、各フラクションについて、右或アクトミオシンの透明化期間の延長作用を指標としてアウチン-ミオシン相互作用を抑制する効果を調べた。

2, アウチンあるいはミオシンとの結合

精製した蛋白質 (偽トリポミオシン) とアウチンあるいはミオシンとの結合を超遠心分離法および SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法で調べた。アウチンあるいはミオシンは 0.2 M KCl, 5 mM MgCl_2 , 1 mM DTT, 10 mM K phosphate buffer (pH 7.0) 溶液として用いた。アウチンはこの条件下で 25°C で 30 分間重合させた後に 30,000 r

pmで120分間遠心分離し、ミオシンはこの条件下で40,000rpmで120分間超遠心分離し、各々の沈殿部分を同じ溶媒で再懸濁し、テフロンホモゲナイザーで均一化して使用した。偽トロポミオシンは上記溶媒に20時間透析後に40,000rpmで120分間超遠心分離し、上澄液を使用した。1mg F-アクトニンあるいは3mg ミオシン/4ml, 0.2MKCl, 5mMMgCl₂, 1mMDTT, 10mMKphosphate buffer (pH 7.0) 溶液に偽トロポミオシンを加えた混和液を作成し、5℃で2時間静置した後、40,000rpmで120分間超遠心分離し、上澄液の蛋白質量を280nmにおける吸収で測定し、沈殿部分の蛋白質量をbiuret法で定量した。また、沈殿部分についてはSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行なった。

3, CAF処理筋原線維の調製

偽トロポミオシンがフラメントの解離性におよぼす影響はCAFで短時間処理した筋原線維を用いて調べた。PerryとGreyの方法⁽⁵⁸⁾で調製した新鮮な筋原線維を10mg/mlとし、これに粗CAF標品を0.5mg/mlとなるように加え(筋原線維: CAF = 20:1), 0.1MKCl, 1mM CaCl₂, 10mM β -mercapto ethanol, 1mM NaN₃, 50mM Tris-HCl (pH

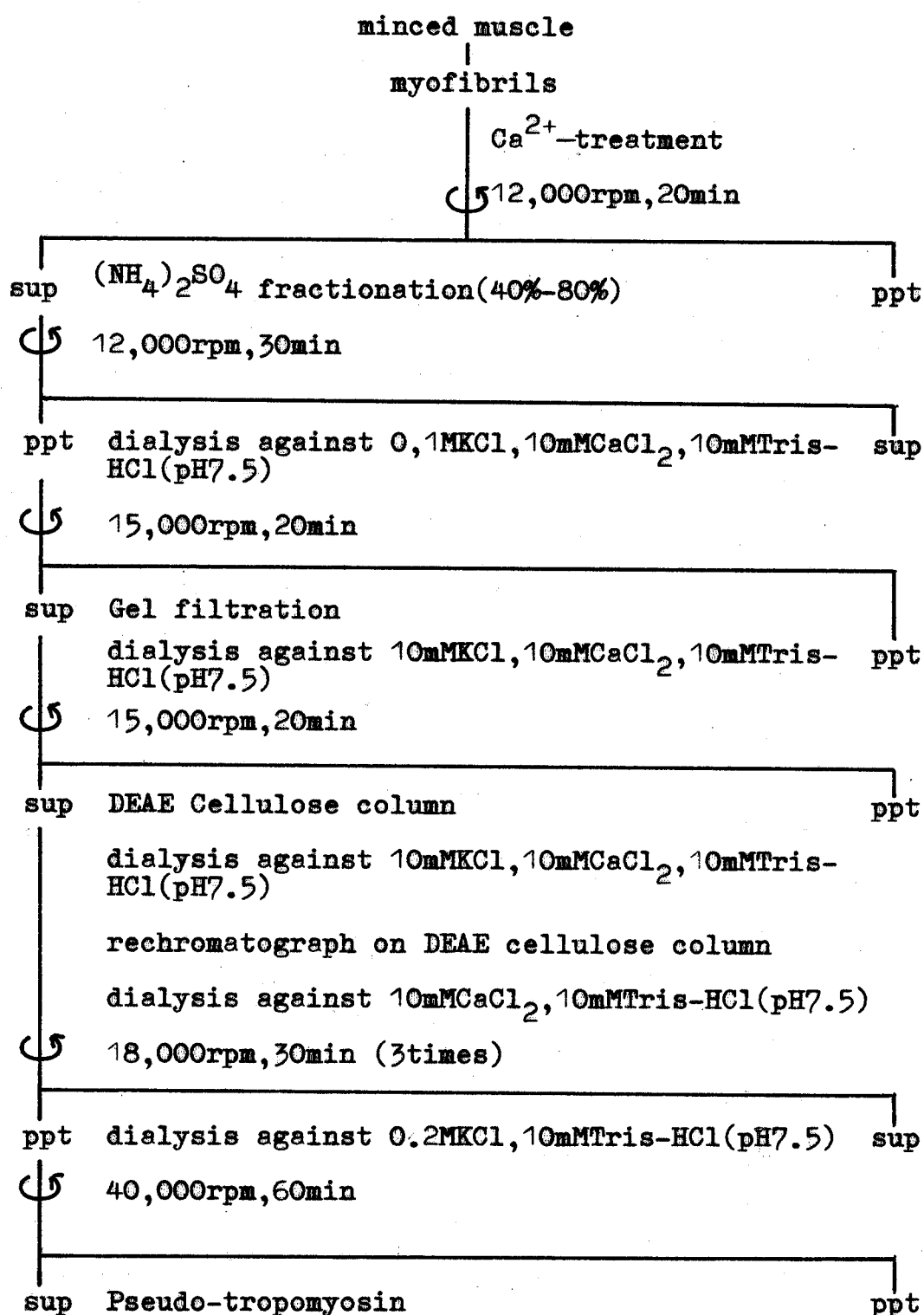
7.0) 溶液として 25°C , 200秒間反応させた後に
10mM EGTA を加え反応を停止した。この時の
筋原線維の小片化の増加は僅か12%であった。
これを 3,000 rpm で10分間遠心分離し、沈殿
を 0.1M KCl, 10mM MgCl_2 , 10mM Kphosphate buffer (pH
7.0) 溶液で2回洗浄してCAF処理筋原線維と
した。

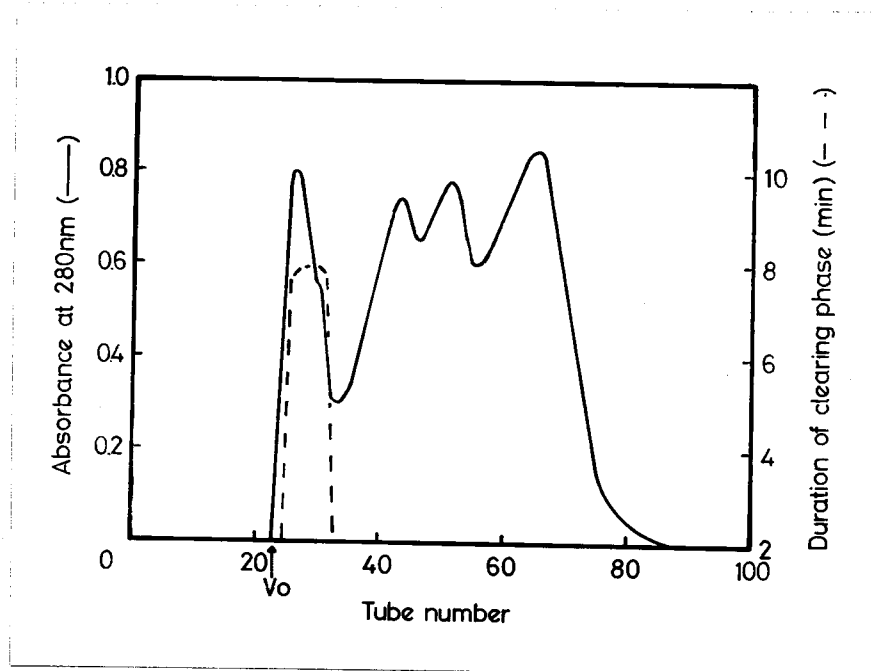
第三節

結 果

第一項 Ca^{2+} -抽出物の精製

Ca^{2+} -抽出物の精製方法を図式化して第27図に示した。家兔胸最長筋の挽き肉 1kg から Perry と Grey の方法⁽⁵⁶⁾によって筋原線維を調製すると約 70g の筋原線維性蛋白質質が得られる。この筋原線維を約 20 mg/ml とし、0.1 M KCl, 10 mM CaCl_2 , 1 mM DTT, 1 mM NaN_3 , 10 mM Tris-maleate buffer (pH 7.0) 溶液に懸濁し、5°C で 72 時間 Ca^{2+} 処理した後、遠心分離すると 1.5~2.0 mg/ml の Ca^{2+} -抽出物が得られる。 Ca^{2+} -抽出物を 40~80% 飽和の硫酸で分画することにより第三章において述べた部分精製した Ca^{2+} -抽出物が得られる。この標品をセフデックス G-200 によりゲル分過した結果が第28図に示してある。硫酸分画法で部分精製した Ca^{2+} -抽出物はゲル分過によって4つのピークに大別される。合成アクトミオシンに対する透明化期間の延長効果を指標として調べるとその活性は最初に溶出するピークに集中していた。この第1ピークの溶出開始点はカラムの排除体積 (void volume) とほとんど同じであった。また、活性のピークは溶出蛋白質のピークより tube 数で 1~2 本後方へ



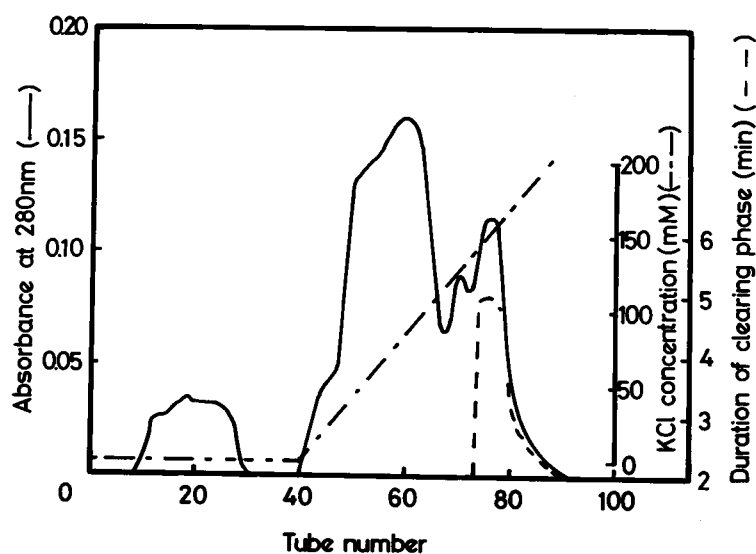


第28図 部分精製した Ca^{2+} -抽出物の Sephadex G-200 によるゲル濾過像

部分精製した Ca^{2+} -抽出物 (30mg/ml) 20 ml を 0.1 M KCl, 10 mM CaCl_2 , 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) に平衡化した $2.6 \times 95 \text{ cm}$ のカラムを用いて上昇流により 5°C でゲル濾過した。溶出は 18.4 ml/hr の流速で行ない、溶出液は30分毎に採取した。活性は合成アクトミオシンの透明化期間延長作用で測定した(点線)。カラムから溶出した各フラクションの 0.3 ml を合成アクトミオシンに加え 3 mg の AM と 0.3 ml の溶出液/3 ml, 0.1 M KCl, 5 mM MgCl_2 , 1 mM CaCl_2 , 20 mM imidazol-HCl (pH 7.5) の混液として 0.3 mM ATP を加え 25°C で測定した。尚、対照区の透明化期間は2分間であった。

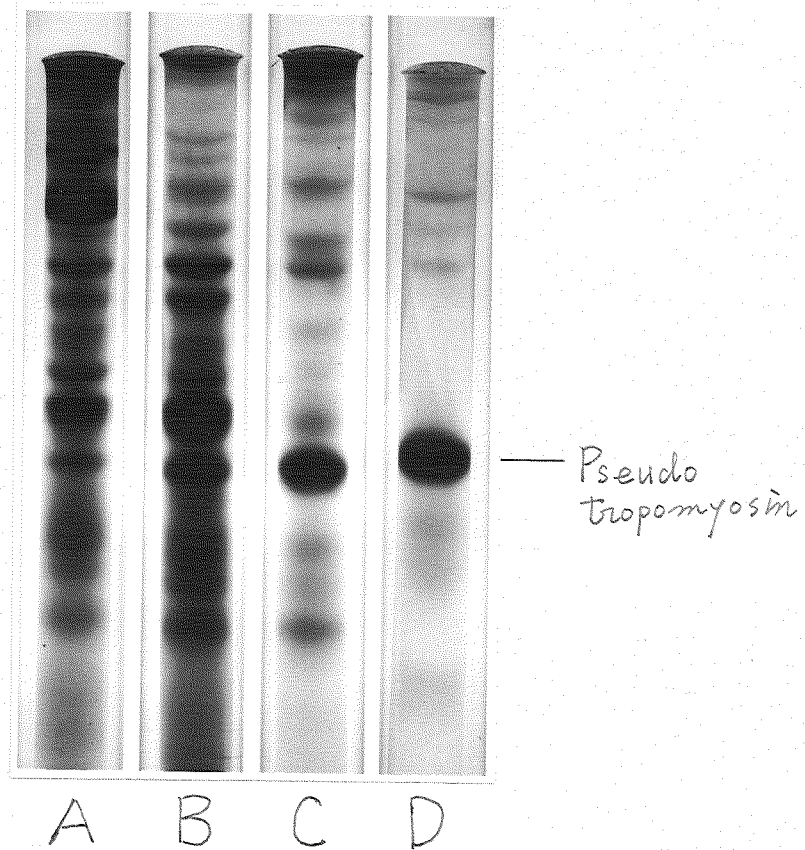
られた所にあった。分子の大きさを利用する
ゲル濾過法によつては、これ以上の分離は困
難であると考えられたので、次にDEAEセルロ
ースを用いたイオン交換クロマト法によりさ
らに精製を行なつた。ゲル濾過におけるフラ
クションNo. 25~33を採取し、これをDEAEセルロ
ースカラム分画した結果が第29図に示してあ
る。イウチン-ミオシン相互作用を阻害する
活性は、KCl濃度が0.15Mとなつた時に溶出し
はじめの部分にあった。蛋白質のピークは左
右対称ではなかったが、活性値と蛋白質濃度
で除した単位蛋白質当りの比活性はフラク
ションNo. 74から82までは同一であつたので、この
部分に精製された蛋白質が含まれていると考
えられた。ここにえられた蛋白質溶液を濃縮
するために、第29図におけると同一条件で再
クロマトし、1.5 mg/mlの蛋白質溶液を得るこ
とができた。

精製の各段階でえられた標品についてSDS-
ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行なつた
結果が第30図に示してある。 Ca^{2+} -抽出物には
 α -イウチンが多く含まれており、その他M-
蛋白質、C-蛋白質、75,000ダルトン、55,000ダルトン



第29図 ゲル濾過した Ca^{2+} -抽出物の DEAE セルロースカラムクロマト像

ゲル濾過法によつてえられた第1ピークを 10 mM KCl, 10 mM CaCl_2 , 10 mM Tris-HCl pH 7.5 に平衡化した 2.2×35 cm の DEAE セルロースカラムに吸着させた後に KCl の直線的濃度勾配による蛋白質の溶出を 5°C で行なった。KCl の濃度は Mohr 法 (クロム酸イオンを指示薬とする銀滴定) によつて測定した。流速は 16.5 ml/hr で、溶出液は 20 分毎に採取した。活性の測定は第28図と同じ条件で行なうため、反応混液の KCl 濃度は 0.1 M となるように調整した。

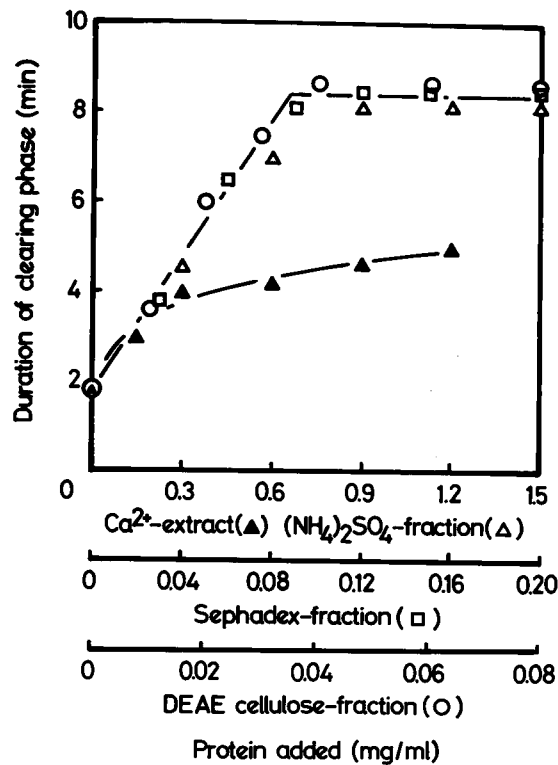


第30図 精製の各段階でえられた標品の
SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動像

試料は1% SDS と1% β -mercapto ethanol で98℃で2分間処理し、7.5% ポリアクリルアミドゲルを用い、0.1M Na phosphate, pH7.2, 0.1% SDS の buffer で泳動した。A; Ca^{2+} 抽出物, 50 μg 。B; 硫酸分画法により部分精製した Ca^{2+} 抽出物, 50 μg 。C: ゲル濾過法でえられた第1ピーク, 20 μg 。D: DEAE セルロースカラムクロマト法により精製した標品, 12 μg 。

トン、42,000ダルトンおよび35,000ダルトンの成分が存在している。硫酸アミン法で部分精製することによってメーアウチニンよりも大きい分子量のバンドはほとんどなくなり、42,000ダルトンおよび35,000ダルトンの蛋白質が主成分となる。ゲル濾過法によって分画した標品では分子量35,000ダルトンの蛋白質が主成分となる。DEAEセルロースカラムクロマト法によって分画した標品はほとんど単一のバンドとして泳動し、その分子量は35,000ダルトンであった。この標品では時として単一バンドではなく他の蛋白質のバンドが現れる事もあった(第30図)が、量的に僅少であった。混在蛋白質を完全に除去するためには、10mM CaCl_2 , 10mM Tris-HCl (pH 7.5) という条件下で重合体を形成させ18,000rpmで30分間遠心分離して沈殿させる操作を3回繰り返す事によってSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法では完全に単一のバンドが、すなわち純粋な偽トロポミオシンがえられるようになった(第39図参照)。

第31図は精製の各段階でえられた標品が合成アクトミオシンの透明化期間の延長におよ



第31図 精製の各段階でえられた標品が合成アクトミオシンの透明化期間の延長作用におよぼす影響

精製の各段階でえられた標品と合成アクトミオシンに添加し、透明化期間延長作用が飽和に達する量を求めた。尚、 Ca^{2+} -抽出物は合成アクトミオシンに予めATPを加え透明化起こした直後に添加した。測定条件は1mgの合成アクトミオシン/ml, 0.1M KCl, 5mM MgCl_2 , 1mM CaCl_2 , 20mM imidazol-HCl (pH 7.0) の混和液に0.3mM ATPを加え25℃で行なった。

ばす影響を測定した結果である。 Ca^{2+} -抽出物は透明化期間を延長する活性が弱いために、合成アクトミオシン/ATPを加えて透明化を起こさせた後に Ca^{2+} -抽出物を添加することによって測定した。 Ca^{2+} -抽出物を除く他の標品は透明化期間を4倍以上延長させる効果を持っていた。合成アクトミオシン (1mg/ml) の透明化期間を延長する活性が飽和点に達した時の蛋白質の添加量は Ca^{2+} -抽出物では 1mg/ml , 硫酸有画法でえられた標品では 0.7mg/ml , ゲル濾過法でえられた標品では 0.1mg/ml であり、DEAEセルロースカラムクロマト法で有画した標品では 0.035mg/ml であった。

第1表は Ca^{2+} -抽出物の精製の各段階における蛋白質の回収量および合成アクトミオシンの透明化期間を延長する活性の推移を表わしたものである。硫酸有画法およびゲル濾過法による有画では活性を有している画分の蛋白質量の減少にほぼ反比例して活性は増加しているが、DEAEセルロースカラムクロマト法における蛋白質の回収量は、活性値の増加量から期待される量の半分以下であったが、これは他蛋白質の混入を避けるため、活性を有

第1表 Ca^{2+} -抽出物の精製段階における蛋白質の回収量および活性^(a)の推移

家兔脛最長筋 / kg より調製した 70g の筋原線維を試した。

	Total protein (mg)	(b) Specific activity	Total activity	Recovery of activity	Purification index
Ca^{2+} -extract	4,700	2.1	9,870	100	1
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1,200	6.5	7,800	79	3.1
Sephadex	170	47	7,100	72	22.4
DEAE cellulose	20	140	2,800	28	66.7
Pseudo-tropomyosin	15	153	2,300	23	72.8

(a) 活性は合成アクトミオシンの透明化期間を延長させる作用で測定した。

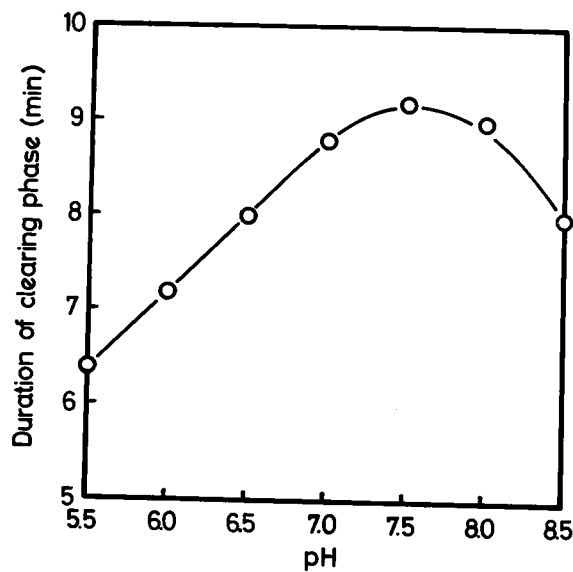
(b) ここでいう活性とは 1mg の合成アクトミオシンに 1mg の標品を加えた場合に透明化期間をどれだけ延長させるかについて第31および33図のグラフの勾配より算出した。

しているピークの前部および後部を採取しなかったことによると考えられた。

第二項 精製した蛋白質・偽トリオポミンの安定性

精製した蛋白質・偽トリオポミンについて、合成トリオポミンの透明化期間を延長する活性におよぼす Ca^{2+} 濃度、KCl 濃度および pH の影響を調べた。0 ~ 1×10^{-2} M の範囲で種々の濃度の Ca^{2+} を含む塩溶液 (0.1 M KCl, 1 mM DTT, 1 mM NaN_3 , 20 mM Tris-HCl pH 7.5) に対して 5°C で 72 時間透析した場合、活性には全く変化が認められず、偽トリオポミンの安定性は Ca^{2+} 濃度には無関係であることが判った。また、0 ~ 0.3 M の範囲で種々の濃度の KCl を含む溶液 (10 mM CaCl_2 , 1 mM DTT, 1 mM NaN_3 , 20 mM Tris-HCl buffer pH 7.5) に対して 5°C で 72 時間透析した場合、活性には全く変化が認められず、偽トリオポミンの安定性は KCl 濃度には無関係であることが判った。

溶液の pH を 5.5 から 8.5 の範囲で変えて 5°C で 72 時間貯蔵した場合には第 32 図に示す結果がえられた。貯蔵後に測定した偽トリオポミンの活性は pH 7.5 に貯蔵した場合に最も高く、



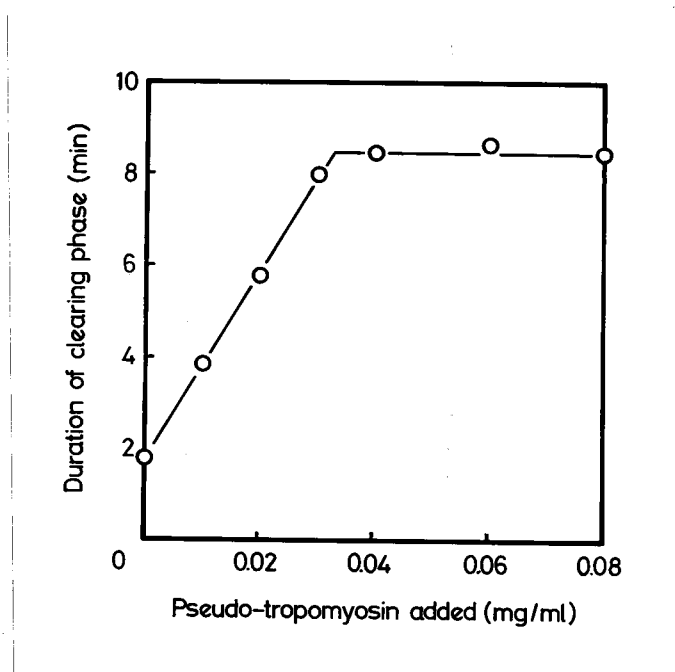
第32図 偽トロポミオシンの安定性におよぼす pH の影響

pH 5.5 ~ 8.5 の 50 mM Tris-maleate buffer, 0.1 M KCl, 10 mM CaCl_2 , 1 mM DTT, 1 mM NaN_3 溶液中に偽トロポミオシンを 0.4 mg/ml とし溶解し, 5°C で 72 時間貯蔵した。これらの試料を合成アクトミオシンに加え, 0.25 mg アクテン, 0.75 mg ミオシンおよび 0.04 mg 偽トロポミオシン/ml, 0.1 M KCl, 5 mM MgCl_2 , 1 mM CaCl_2 , 50 mM imidazol-HCl (pH 7.0) の反応混合液として透明化期間を測定した。尚, 懸液添加の透明化期間は 2 分であった。

pH 7.0 以下および pH 8.0 以上では活性は低くかった。pH 6.0 以下では溶液は自濁し、等電点沈殿を起こしたものと思われた。しかし、pH 5.5 に貯蔵したもののでも活性の喪失は余り顕著ではなく、透明化期間を3倍延長させる作用をなお保持していた。これらの事から、偽トロポミオシンは pH 7.5 附近でもっとも安定であることが判った。

第三項 アクチンあるいはミオシンとの結合

第31図に示したように右或アクトミオシンの透明化期間を延長する活性と蛋白質の添加量との関係を測定することによって活性の飽和点を知ることが出来る。SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法で単一成分であることを確認した偽トロポミオシン標品を用いて、1mg/ml の右或アクトミオシン (0.25mg アクチンおよび 0.75mg ミオシン/ml) に対する活性の飽和点を求めると、0.0336mg/ml という値がえられた (第33図)。活性の飽和点において偽トロポミオシンと右或アクトミオシンの結合も飽和すると考え、かつそれがアクチンと結合していると考えると 1mg のアクチンに対して、

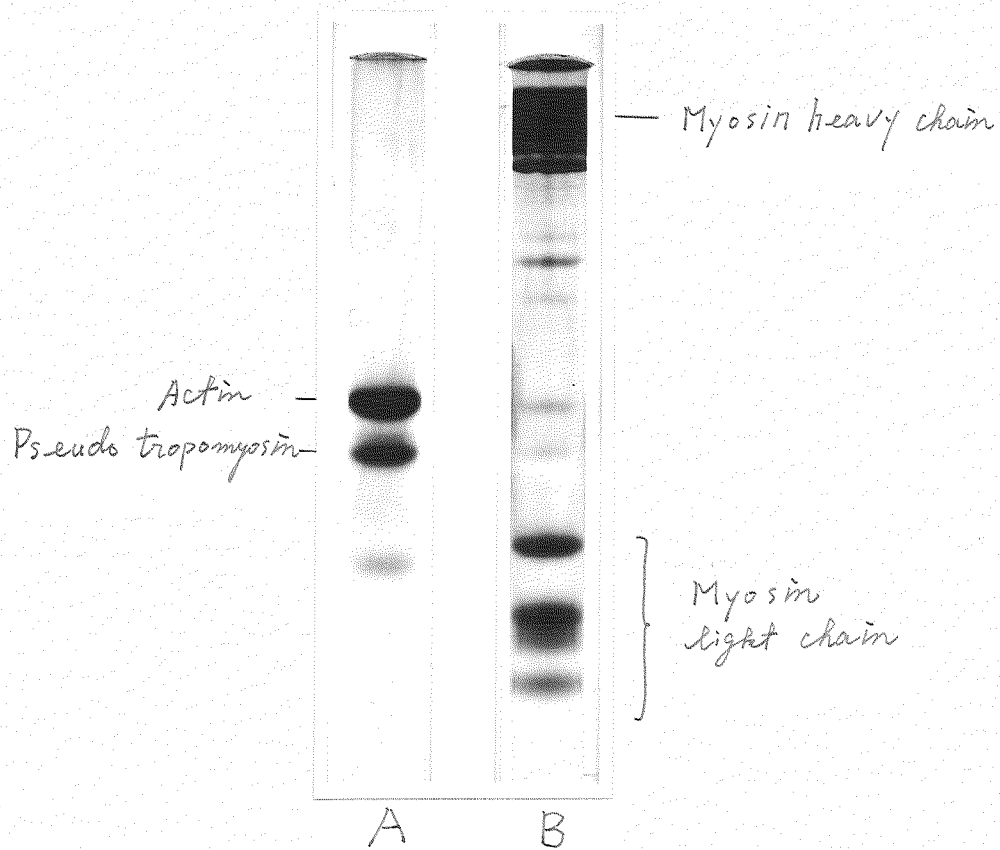


第33図 偽トロポミオシンが合成アクトミオシンの透明化期間の延長におよぼす影響

精製した偽トロポミオシンを加えた合成アクトミオシン混液 (0.25 mg アクテン, 0.75 mg ミオシン/ml, 0.1 M KCl, 5 mM $MgCl_2$, 1 mM $CaCl_2$, 20 mM imidazole-HCl pH 7.0) に 0.3 mM ATP を添加し, 透明化期間を測定した。

2. 1344 mg の偽トロポミオシンが結合することになる。

アウチンおよびミオシンがいづれも重合体（フラメント）を形成している 0.2 M KCl という条件下で、アウチンあるいはミオシンと偽トロポミオシンを混和し、混合液を 40,000 rpm で 120 分間超遠心分離して得られた沈殿部分を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により分析した結果が第 34 図である。ミオシンと偽トロポミオシンを混和した場合には沈殿としてえられる部分にはミオシンしか存在しないことが明らかであるが、アウチンと混和した場合には、アウチンのバンドの下方に偽トロポミオシンのバンドが観察された。従って、偽トロポミオシンはミオシンには結合せず、アウチンと結合することが明らかとなった。超遠心分離によってえられた上澄液についても SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行なったが、ミオシンと混和した場合には偽トロポミオシンのバンドと濃度の低いミオシンのバンドが観察されたのに対し、アウチンと混和した場合には蛋白質の存在はほとんど認められなかった。



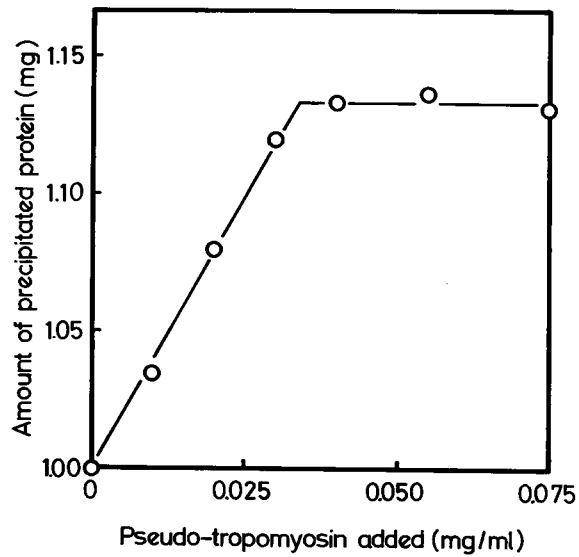
第34図 偽トロポミオシンとアクチンあるいはミオシンとの結合

0.2 M KCl, 5 mM $MgCl_2$, 1 mM DTT, 10 mM K phosphate (pH 7.0) という条件下で 0.25 mg/ml の F-アクチンあるいは 0.75 mg/ml のミオシンに 0.0375 mg/ml の偽トロポミオシンを混和したものを超遠心分離した。えられた沈殿物を 10% SDS, 1% β -mercapto ethanol で処理し, 7.5% ポリアクリルアミドゲルを用いて泳動した。A, アクチン + 偽トロポミオシン。B, ミオシン + 偽トロポミオシン。

第35図は 0.25 mg/ml の F-アウケン に偽トロポミオシンを添加し、その混合液を超速心分離することによってえられた沈殿部分の蛋白含量の変化を示している。偽トロポミオシンの添加量に応じて沈殿量も増加し、添加量が 0.033 mg/ml 以上では一定値となった。第35図より算出される 1 mg の アウケン に対する偽トロポミオシンの結合の飽和量は 0.133 mg であった。尚、本実験における条件下では F-アウケン は非常に安定な状態にあり、超速心分離によってほぼ100%の F-アウケン が沈殿として回収された。

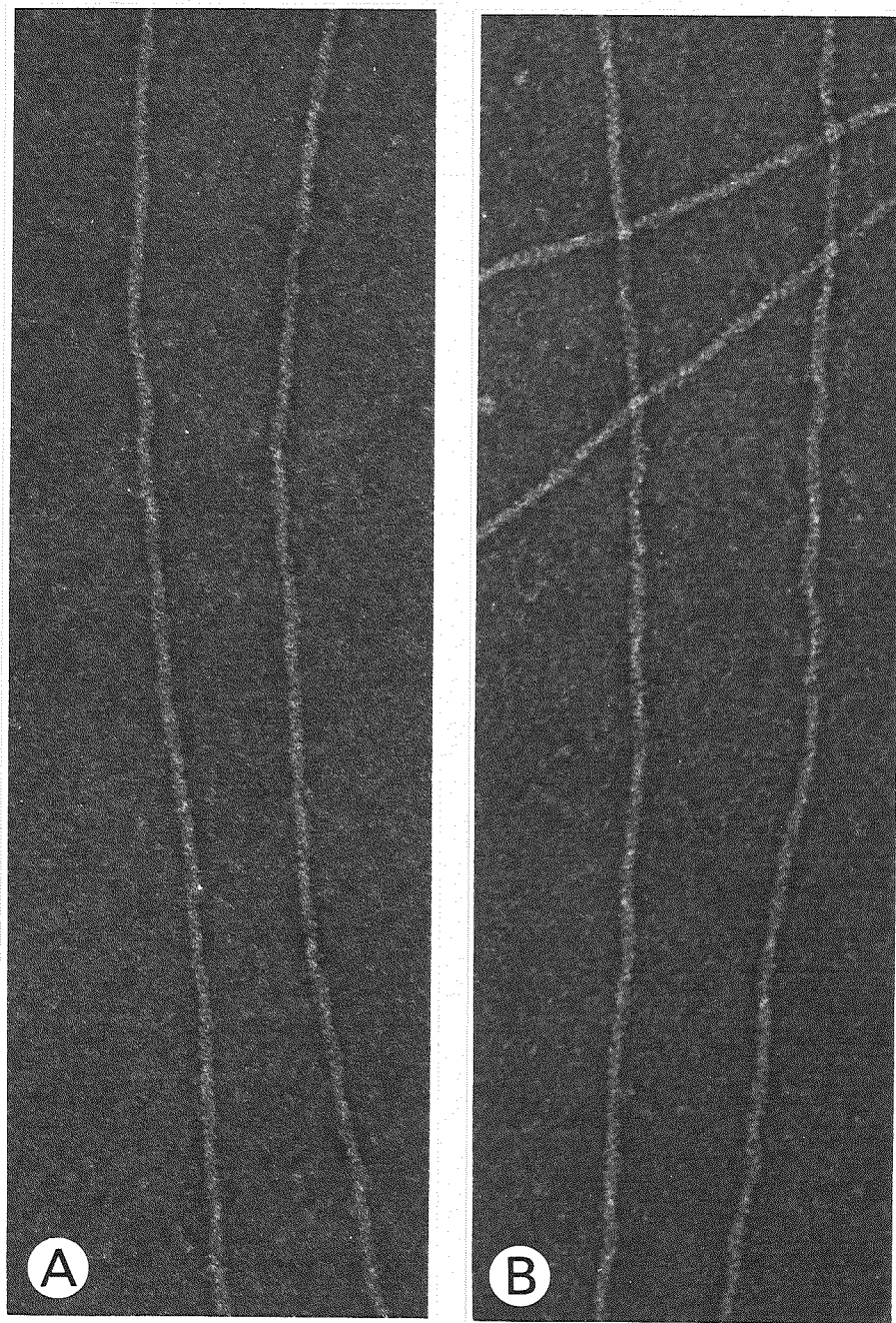
偽トロポミオシンが結合した F-アウケン の形態を電子顕微鏡で観察すると、対照の F-アウケン との間の差異は全く認められなかった(第36図)。

合成アクトミオシンあるいは超沈殿した合成アクトミオシンに偽トロポミオシンを添加してフラメントの解離量を調べた結果が第37図である。いずれの場合も偽トロポミオシンの添加量が合成アクトミオシン 1 mg に対して 0.035 mg までは添加量に応じて ATP によるフラメントの解離量が増加し、飽和点に達した。



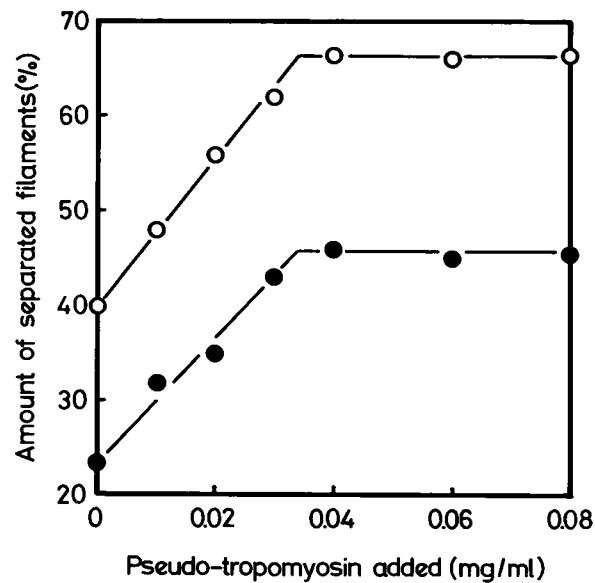
第35図 偽トロポミオシンのアクトンに対する結合量

0.2 M KCl, 5 mM $MgCl_2$, 1 mM DTT, 10 mM K phosphate (pH 7.0) という条件下で 0.25 mg/ml の F-アクトンに対して偽トロポミオシンを添加した。混合液の総量を 4 ml とし、40,000 rpm で 120 分間超遠心分離して沈殿部分の蛋白質量を測定した。



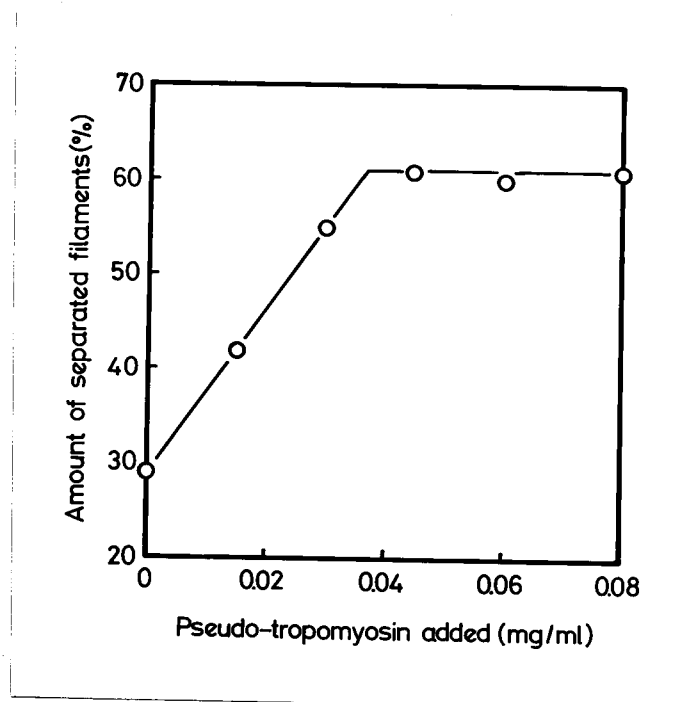
第36図 偽トリポミオシンが結合した7S
アタンの電子顕微鏡像 倍率 240,000X

アタンの重合は0.2M KCl, 5mM $MgCl_2$, 0.1mM $CaCl_2$, 1mM DTT, 10mM K phosphate (pH 7.0), 25°C で30分間行ない、7Sアタンを30,000rpmで120分間遠心分離し、沈殿をテフロンホモゲナイザーで再懸濁して供試した。支持膜としてグロー放電により親水化したカーボン膜を用い、0.3%酢酸ウランウムで染色した。A, 対照区 (0.1mgのアタン/ml)。B, 0.1mgのアタン + 0.014mgの偽トリポミオシン/ml



第37図 アクトミオシンからのフィラメントの解離量にあよぼす偽トロポミオシンの効果
 0.25 mg アクチン, 0.75 mg ミオシン/ml, 0.15 M KCl, 5 mM MgCl₂, 0.1 mM EGTA, 20 mM imidazole-HCl (pH 7.0) 懸濁液の合成アクトミオシン(○)および超沈殿した合成アクトミオシン(●)に偽トロポミオシンを加え, 5 mM ATP の添加によって解離するフィラメント量を測定した。測定方法は第21図と同じである。

解離量の増加量は無添加の場合に比して合成アクトミオシン，超沈殿した合成アクトミオシン共に約25%であったが，超沈殿した合成アクトミオシンからのフラメントの解離量は全体に合成アクトミオシンよりも約20%少なかった。CAPで短時間処理した筋原線維についてATPによるフラメントの解離性におよぼす偽トロポミオシンの効果を調べた結果が第38図に示してある。筋原線維/mgに対して0.037mgの偽トロポミオシンの添加によってフラメントの解離量は飽和点に達し，フラメントの解離量は無添加に比して32%も増大した。



第38図 筋原線維からのフィラメントの解離量におよぼす偽トロポミオシンの効果

CAで短時間処理した筋原線維に偽トロポミオシンを加え、さらにATPを添加してフィラメントの解離量を測定した。横軸は 1mg/ml の筋原線維に対して添加した偽トロポミオシンの量を示し、縦軸はフィラメントの解離量を全筋原線維蛋白質に対する割合で示した。実験条件は第17図と同じである。

第四節

考 察

合成了アクトミオシンの透明化期間の延長作用を指標として、硫酸分画法で部分精製した Ca^{2+} -抽出物をゲル濾過法およびDEAEセルロースカラムクロマト法によって精製することにより、活性を有する蛋白質をほぼ単一の成分からなる標品として純化することが出来た。さらに、この標品について、 10mM CaCl_2 存在下で重合体を形成させ、遠心分離によって沈殿部分を回収すれば、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動的に完全に単一の蛋白質標品を与えることが出来た。この蛋白質の分子量は35,000ダルトンを示し(第30図)、筋原線維内でアクチンに結合して細いフィラメントを構成しているトロポミオシンと同一の分子量⁽⁶⁸⁾であるので、本論文ではこの蛋白質を偽トロポミオシンと呼称することにした。

セフデックスG-200によるゲル濾過(第28図)において、偽トロポミオシンはカラムの排除体積とほぼ同じ位置に溶出し、 0.1MKCl , 10mM CaCl_2 , ($\text{pH } 7.5$) という条件下では大きな分子量を持つ重合体を形成していることが明らかである。また、DEAEセルロースカラムクロ

マト像(第29図)において、偽トロポミオシンは 10mM CaCl_2 存在下で KCl 濃度が 0.14M 以上で溶出することは、この塩濃度で会合体が解離するものと考えられる。

精製過程の各段階で得られる標品について SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により蛋白質の構成を分析すると(第30図)、 Ca^{2+} -抽出物には15種類の蛋白質が含まれており、特に、五線の構成蛋白質として知られている α -アクチニン⁽⁷⁴⁾に相当する $100,000$ ダルトンの成分の含量が高い。 α -アクチニン以上の分子量を持つ蛋白質は飽和度 $40 \sim 80\%$ の硫酸アム法によって除去することができた。一方、精製の各段階で得られた標品について、合成アクトミオシンの透明化期間の延長効果を調べた第31図に明らかなように、 Ca^{2+} -抽出物以外の標品においては、蛋白質の添加量と透明化期間の間には化学量論的対応があり、添加量の飽和点を明らかに知ることができるのに対し、 Ca^{2+} -抽出物の場合はグラフ上に明確な折れ曲りを示さない。この事は、 Ca^{2+} -抽出物中に α -アクチニンが存在するため、見かけ上偽トロポミオシンの作用が相殺されているこ

とによると考えられる。すなわち、 α -アーク
ニンは合成アクトミオシンの超収斂を促進す
る-アークニン-ミオシン相互作用を促進する
作用のあることが知られており⁽⁷³⁾、合成ア
クトミオシンに対し偽トロポミオシンと拮抗的
に作用すると考えられるからである。

Ca^{2+} -抽出物の精製過程における蛋白質の回
収量および活性の推移はまとめて第1表に示
したが、合成アクトミオシンの透明化期間を
延長する活性は純化した偽トロポミオシンに
おいては Ca^{2+} -抽出物の73倍になっている。 Ca^{2+} -
抽出物および純化した偽トロポミオシンにお
ける総活性の比 ($9,870 / 2,300 = 4.3$) と純化した
偽トロポミオシンの収量 (15 mg) から筋原線
維における偽トロポミオシンの含有量を求め
ると、 $(15 \text{ mg} \times 4.3) \div 70 \text{ g} \doteq 0.001$ となり約 0.1% で
ある。しかし、筋原線維の Ca^{2+} 処理によって、
全ての偽トロポミオシンが抽出されていると
は考え難いので、この値は一応の目安に過ぎ
ないであろう。

偽トロポミオシンが有している合成アクト
ミオシンの透明化期間を延長する作用がいかに
なる機作に基づくものであるのかを明らかに

するためには、合成アクトミオシンの構成々
分であるアウチンあるいはミオシンと偽トロ
ポミオシンとの結合を知ることが重要である
。SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動の結果
(第34図)が示すように、偽トロポミオシ
ンはアウチンと結合し、ミオシンとは結合し
ない。純化した偽トロポミオシンは化学量論
的に合成アクトミオシンの透明化期間を延長
するが、 1mg のアウチン当り 0.134mg の偽トロ
ポミオシンを添加した時に延長効果は飽和す
る(第33図)。偽トロポミオシンとアウチン
の結合を直接的に調べた結果(第35図)も、
両者の結合が化学量論的であり、 1mg のアウ
チンに対し、 0.133mg の偽トロポミオシンが結
合する事を明らかに示している。このように
、合成アクトミオシンの透明化期間延長作用
の飽和点におけるアウチンの単位重量当りの
偽トロポミオシン添加量とアウチンの単位重
量当りの偽トロポミオシンの結合量がよく一
致することは、偽トロポミオシンがアウチン
と結合することによって合成アクトミオシン
の透明化期間を延長する、すなわちアウチン
とミオシン間の相互作用を阻害することが明

うかである。アークチンの分子量を 42,000⁽⁸⁶⁾とし、偽トロポミオシンの分子量を 35,000⁽⁸⁷⁾として上記の結合量比から結合モル比を求めると、 $\frac{1}{42,000} : \frac{0.133}{35,000} = 6.2 : 1$ となり、アークチン 6.2 分子に対して偽トロポミオシン 1 分子が結合していることが判る。

偽トロポミオシンが結合したアークチンの形態と対照正のアークチンの形態の間には電子顕微鏡的に差異を認めることが出来ない(第36図)。従って、偽トロポミオシンとアークチンの結合は、 α -アークチニンとアークチンを混和した時に観察されるような凝集体形成⁽⁸⁷⁾ではないし、最近萩原と殿村⁽⁸⁸⁾が粘菌変形体から単離したアークチンを糸屑状に変化させる作用のあることを見出したアークチノタンゲリンとアークチンの結合とも異なっている。偽トロポミオシンが結合していても対照正のアークチンと同一の形態を示すということから、偽トロポミオシンはアークチンに密着していると考えられる。多分、トロポミオシンとアークチンの結合の場合⁽⁸⁹⁾と同様に、偽トロポミオシンはアークチンフィラメント上に側面結合しているのであらう。

合成アクトミオシンの透明化期間の延長効果を指標とした偽トロポミオシンの作用は、合成アクトミオシン（第37図）においても、筋原線維（第38図）においてもフラメントの解離を惹起することが明らかになった。特に、短時間のCAF処理によって若干のZ線の崩壊を惹起した筋原線維に対してはATPによるフラメントの解離量を著しく増加させる作用を発揮する。従って、偽トロポミオシンは筋肉の死後硬直の解除期にあつてはアクトン-ミオシン相互作用に変化をもたらし、代わりに重要な役割をになつてゐるものと思われる。

筋原線維に対する偽トロポミオシンの結合の飽和量は、筋原線維1mgに対して0.037mgであるので、筋原線維中のアクトン含量を20%⁽⁷¹⁾とすると、筋原線維中のアクトン1mgに対して0.185mgの偽トロポミオシンが結合することになる。この結合量は第35図におけるアクトンと偽トロポミオシンの結合量（1mg:0.133mg）よりやや多いが、筋原線維にあつては偽トロポミオシンがアクトン以外の蛋白質とも結合するためと考えられる。

第二章および第三章において、死後硬直の

解除期にフラメントの解離量が増大するのは、筋原線維のZ線の崩壊にともなって遊離するG⁺-抽出物中に含まれる蛋白質がアクチンとミオシン間の結合を脆弱化させることと述べた。これらの事実と本章でえられた結果との関連を考察すると次の通りである；死後筋肉中でG⁺濃度が $1 \times 10^{-5} M$ 以上に上昇するとZ線の構造が崩壊し始め、偽トロポミオシンが遊離する。遊離した偽トロポミオシンは太いフラメントのミオシンと堅く結合して硬直複合体を形成している細いフラメントのアクチン上に側面結合し、このことによりミオシンのアクチンに対する結合が不安定となり、両者はATPの添加で容易に解離するようになると解される。

偽トロポミオシンがSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動的にはトロポミオシンと等しい35,000ダルトンの分子量を示すこと、およびアクチンと結合した時の電子顕微鏡的形態がトロポミオシンがアクチンと結合した時のそれと同一であることから、本章でえられた結果からは偽トロポミオシンとトロポミオシンの異同を明らかにすることは出来ない。偽ト

ロホミオシンが死後筋肉で果たす役割をさらに
明らかにするためにも、また、生筋における
偽トロホミオシンの機能を知るためにも、偽
トロホミオシンとトロホミオシンの諸性質を
比較検討し、両者の相違を明確にすることが
必要であらう。

第五章 偽トロポミオシンとトロポミオシンの比較

第一節

序

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法で求めた偽トロポミオシンの分子量は35,000ダルトンである。一方、トロポミオシンも同様の電気泳動法で、35,000ダルトンの分子量であることが知られている⁽⁶⁸⁾。また、Katz⁽⁹⁰⁾によればトロポミオシンは合成アクトミオシンの透明化期間を延長する作用がある。このように、偽トロポミオシンはトロポミオシンと類似した性質を持っているが、死後筋肉における偽トロポミオシンの作用をいっそう明確にするとともに、生筋における偽トロポミオシンの機能を明らかにするために、本章においては、偽トロポミオシンの諸特性を、トロポミオシンのそれと比較検討した。

トロポミオシンは生筋内ではアクチンに側面結合して細いフィラメント上に在り⁽⁸⁹⁾、トロポミオシンとアクチンの結合モル比は1:7である^(40, 91)。トロポミオシンの分子量は約70,000^(92, 93)で35,000のサブユニット2個からなり⁽⁹⁴⁾、

長さ約 $420 \text{ \AA}$ 、太さ約 $20 \text{ \AA}$ の棒状分子⁽⁹⁵⁾で、 α -ヘリックス含量は 96 % である⁽⁹⁶⁾。イオン強度が低い条件では高い粘度を、イオン強度が高い条件では低い粘度を示し⁽⁶²⁾、 $10 \text{ mM} \sim 100 \text{ mM}$ の Ca^{2+} あるいは Mg^{2+} 存在下では準結晶を形成する⁽⁹⁷⁾。

生筋内では 1 分子のトロポミオシンは 1 分子のトロポニン⁽⁹⁸⁾ とまた 7 分子のアクチンと結合しており、この三者の会合体（細いフィラメント）は Ca^{2+} 濃度に依存して構造変化を起こし⁽⁸⁹⁾ て Ca^{2+} 感受性^(63, 72) を発現し、筋収縮の制御蛋白質として機能している。このようにトロポミオシンに因しては既に多くの事が知られており、本章においてはこれらトロポミオシンに因する既知の事柄を基に偽トロポミオシンとの比較検討を行なった。

第二節 実験材料および方法

1, アミノ酸分析

偽トリオポミオシンを 6N-塩酸中 110°C で 24 時間加水分解した後、日本電子製自動アミノ酸分析機 JLC 6AH によってアミノ酸分析を行った。

2, 紫外吸収および旋光分散の測定

紫外吸収スペクトルは偽トリオポミオシンおよびトリオポミオシンの濃度を 1mg/ml とし、 0.2M KCl , 10mM CaCl_2 , 10mM Tris-HCl buffer ($\text{pH } 7.5$) の条件下で日立自記分光光度計 323 を用いて測定した。また、溶媒として 6M-グアニジン塩酸, 20mM Kphosphate buffer ($\text{pH } 6.5$) 溶液を用いた測定も行なった。

旋光分散 (ORD) および円偏光二色性 (CD) の測定は偽トリオポミオシンおよびトリオポミオシンを 10mM CaCl_2 あるいは 5mM EGTA を含む 0.2M KCl , 10mM Tris-HCl ($\text{pH } 7.5$) 溶液に 0.35mg/ml となるように調整し、日本分光製自記旋光分散計 ORD/UV-5 型を用いて行なった。 α -ヘリックス含量の算出は旋光分散の場合は Greenfield の方法⁽⁹⁹⁾に従って、 233nm における谷の値より次式によって求めた。

$$\text{ヘリックス含量} = [m]_{233} - (2,200) / -15,000 - (-2,200)$$

ここで $[m]_{233}$ は波長 233nm における還元残基旋光度であり, この数値は溶媒の屈折率 ($n = 1.335$), アミノ酸残基平均分子量 ($M_0 = 115$) および比旋光度 $[[\alpha]_{233} = \text{測定値} / (\text{蛋白質濃度} \times \text{セルの光路長})]$ から次式によって求められる。 $[m]_{233} = M_0/100 \times \frac{3}{n^2+2} \times [\alpha]_{233}$ 。 $-15,000$ は多くのポリペプチドの α -ヘリックスの値であり, $-2,200$ はランダムコイルの値である。円偏光二色性の場合 *Greenfield* と *Fasman* の方法⁽¹⁰⁾ に従って 222nm における谷の値より次式によって求めた。

$$\text{ヘリックス含量} = [\theta]_{222} / -35,000$$

ここで $[\theta]_{222}$ は波長 222nm における分子構円率のことであり, 左右円偏光の位相の差 $[[\phi]_{222} = \text{測定値} / (\text{蛋白質濃度} \times \text{セルの光路長})]$ とアミノ酸残基平均分子量 ($M_0 = 115$) から $[\theta]_{222} = [\phi]_{222} \times M_0/100$ の式によって求められる。 $-35,000$ は α -ヘリックスの $[\theta]_{222}$ の値である。ランダムコイルの $[\theta]_{222}$ は非常に小さいので無視できる。

3. トリプトファン含量の算出

6M グアニジン塩酸を溶媒とした時の 288nm および 280nm における吸光度を用いて, 光学的にトリプトファン含量を求めた。Edelkoek の

方法⁽¹⁰⁾によれば、蛋白質1モル当りに含まれるトリプトファンのモル数 (N_{Trp}) はチロシンの含量 (M_{Tyr}) およびシスチンの含量 (P_{Cys}) が既知であれば次式 $N_{Trp} = [E_{288} - (385 \times M_{Tyr} + 72.5 \times P_{Cys})] / 4815$ あるいは $N_{Trp} = [E_{280} - (1280 \times M_{Tyr} + 120 \times P_{Cys})] / 5690$ によって求められる。 E_{288} と E_{280} は各々の波長における分子吸光係数であり、4815 と 5690 はトリプトファンのモデル化合物 (*N*-アセチルトリプトンアミド) の、385 と 1280 はチロシンのモデル化合物 (*Gly-Tyr-Gly*) の、また、72.5 と 120 はシスチンの 288 nm と 280 nm における分子吸光係数である。

4, 粘度の測定

粘度はオストワルド型粘度計 (容量 5 ml, 水の流速 160 秒) を用いて 25°C で測定した。

5, ゲル分過

偽トリホミオシンおよびトリホミオシンの溶液状態における分子量を検討するために *Se-phacryl S-300* (Pharmacia Fine Chemicals, Super fine 40-105 μm) によるゲル分過を行なった。0.2 M KCl, 0.5 mM EGTA, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) に平衡化した 2.6 x 95 cm のカラムを用いて、同溶液に

よって流速 17.6 ml/hr で上昇流によって溶出した。分子量は見かけの分配係数 K_{av} と検量曲線によって求められ、 K_{av} は次式によって算出される。

$$K_{av} = (V_e - V_0) / (V_t - V_0)$$

ここで V_t はカラム総体積 (500 ml)、 V_0 は排除体積 (200 ml)、 V_e は試料の溶出体積である。

6. Ca^{2+} 濃度の調整

Ca^{2+} 濃度の調整は Ca^{2+} -EGTA buffer で行なった。 20 mM imidazol-HCl ($\text{pH } 7.0$) における見かけの Ca^{2+} -EGTA の安定度定数を $5 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1(102)}$ とし、混入 Ca^{2+} を $20 \mu\text{M}$ として Ca^{2+} 濃度を算出した。

7. トロポミオシンの Ca^{2+} 処理

精製したトロポミオシンを 0.1 M KCl , 10 mM CaCl_2 , 1 mM DTT , 1 mM NaN_3 , $10 \text{ mM Tris-maleate buffer (pH } 7.0)$ 溶液に対して 5°C で 72 時間透析して Ca^{2+} 処理トロポミオシンをえた。

8. 抗血清の作製

鶏の浅脇筋より偽トロポミオシンを調製した。この標品は SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により完全に単一成分である事を確認後に抗原として用い、体重約 3 kg の健康

な家兎を免疫した。第1回目には PBS (phosphate buffer saline ; 0.15 M NaCl, 5 mM Na phosphate pH 7.2) に溶解した 3 mg (2.3 mg/ml, 1.3 ml) の抗原を等量の Freund の完全アジュバント (羊井化学) とよく混合し W/O エマルジョンとして右脚筋肉内に注射した。第2回目は、第1回目より1週間後に同じエマルジョンを同量左脚筋肉内に注射した。第3回目は、第2回目より1週間後にアジュバントを用いずに 1.2 mg の抗原だけを右耳静脈に注射し、第4回目はさらに1週間後に第3回目同様に抗原だけを右耳に静脈注射した。採血は第1回免疫より25日目と最終免疫より10日目に耳静脈より一部 (5 cc) を、最終免疫より2週間後に心臓より全採血した。抗血清は採血後直ちに 37°C で2時間静置した後、一晩 4°C に静置し、3,000 rpm で5分間遠心分離して得られた上澄液をさらに 10,000 rpm で20分間遠心分離して得られた上澄液を抗血清とした。抗体価の検定は micro precipitation 法によって行なった。Multidish dispose tray (Linbo Chemical 社製) に抗原および抗血清を (各) 2μ l 希釈し、25 μ l づつ tray 中で混合し、37°C で1時間放置した後、暗視野顕微鏡によって沈殿物を

観察した。

9, 抗原抗体反応

免疫拡散テストは Ouchterlony 法^(103,104)によって行なった。0.05% SDS, 0.9% NaCl, 20mM Na phosphate buffer (pH 7.2) を含む 1.5% 寒天 (Difco, Special Agar Noble) ゲルを用い 37°C で 16 時間反応させた後に PBS で充分洗浄し, Coomassie brilliant blue で染色し, 7.5% 酢酸, 5% エタノール液によって脱色した。

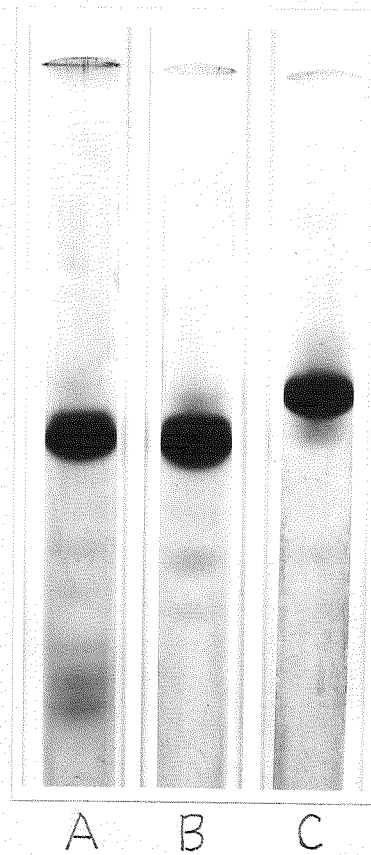
第三節

結 果

第一項 一般的性質における差異

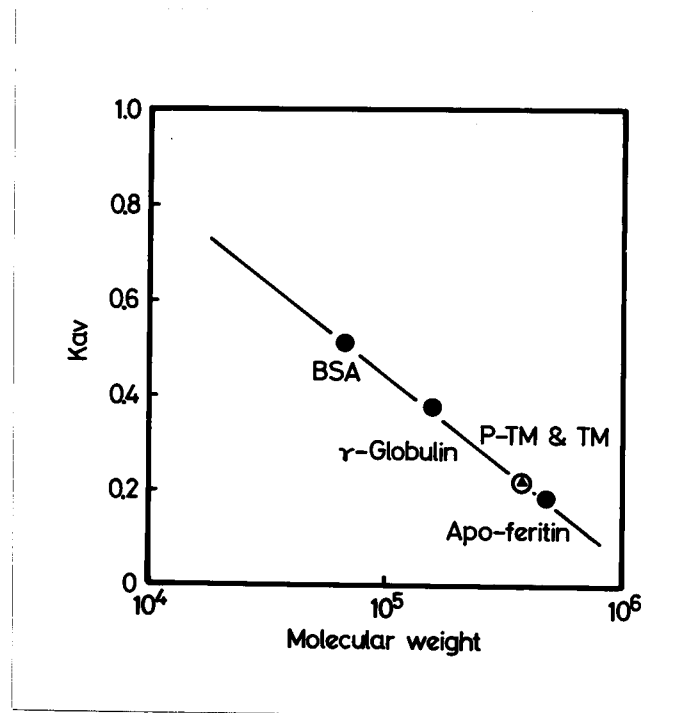
1. 分子量

第39図は偽トロポミオシン, トロポミオシンおよびアクチンについて同一条件下でSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行なった結果である。偽トロポミオシンとトロポミオシンは共に単一のバンドとして泳動し, 両者の間には何らの差異も見い出されず, いづれもアクチンよりもわずかに下方まで泳動した。SDS存在下でトロポミオシンはサブユニットに解離し, 分子量35,000ダルトンとなることが知られている⁽⁶⁾ので, 偽トロポミオシンの分子量はSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動的には35,000ダルトンであることが判った。SDS不在下の溶液状態における偽トロポミオシンとトロポミオシンの分子量を調べるために, Sephacryl S-300 カラムによるゲル濾過を行なった。標準蛋白質として分子量67,000の牛血清アルブミン, 160,000のγグロブリン, 480,000のアポフェリチンおよびブルーデキストラン2000を同一条件下で溶出して校量線と求めた。偽トロポミオシンあるいはトロポミオシ



第39図 偽トロポミオシンのSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動像

試料は 1% SDS, 1% β -mercaptoethanol, 10 mM Na phosphate (pH 7.0) に 79 $^{\circ}$ C, 2 分間処理し, その 10 μ g を 7.5% ゲルにて泳動した。A, 偽トロポミオシン。B, トロポミオシン。C, アクチン。



第40図 偽トロポミオシンおよびトロポミオシンのゲル透過法による分子量

Sephacryl S-300 superfine のカラム (2.6 × 95cm) を用いて 0.2M KCl, 0.5mM EGTA, 20mM Tris-HCl (pH 7.5) 溶液で流速 17.6 ml/hr で上昇流によって溶出した。

ンは各々のゲル淨過において単一ピークとして溶出し、溶出体積は同一であった(第40回)。球状蛋白質であると仮定して、溶出体積から分子量を計算すると、共に350,000ダルトンであった。

2, アミノ酸組成

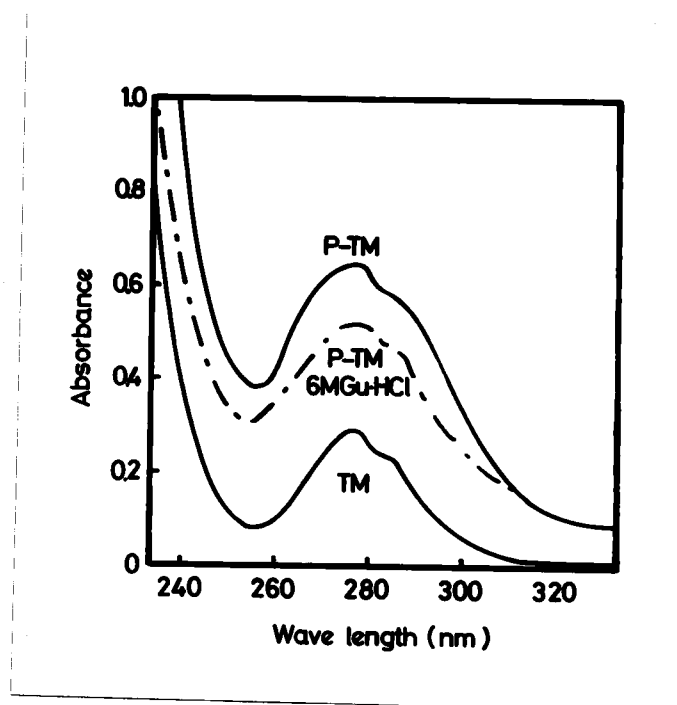
第2表に示したように酸加水分解した偽トロポミオシンのアミノ酸分析の結果はトロポミオシンのアミノ酸組成⁽⁹⁴⁾と差がなかった。酸加水分解物のアミノ酸分析によつてはトリプトファン含量を知ることとはできないので、第41回に示した6Mグアニジン塩酸に溶解した場合の288nmおよび280nmにおける吸光度からトリプトファン含量を計算すると、トロポミオシンでは35,000g当り0.5モル、偽トロポミオシンでは35,000g当りには2モルのトリプトファンが含まれていることが判った。

3, 分光学的性質

偽トロポミオシンおよびトロポミオシンの紫外吸収スペクトルを測定した結果が第41回である。トロポミオシンはアミノ酸組成から期待されるように、単位蛋白質当りの紫外吸収は極めて低い^(64,105)が、偽トロポミオシ

第2表 偽トロポミオシンのアミノ酸組成

Amino acid residues/68,000g of P-TM or TM		
Amino acid	rabbit skeletal Pseudo-tropomyosin	rabbit skeletal Tropomyosin ⁽⁹⁴⁾
Lys	81.9	78.5
His	4.5	4.4
Arg	29.9	30.7
Asx	56.2	63.8
Thr	17.3	16.7
Ser	25.2	28.0
Glx	155.0	149.5
Pro	0	0.5
Gly	9.9	8.9
Ala	75.6	76.4
Val	19.1	20.2
Met	11.5	11.7
Ile	22.7	23.9
Leu	66.3	68.0
Phe	3.0	2.9
Cys	1.9	2.7
Tyr	11.6	10.7



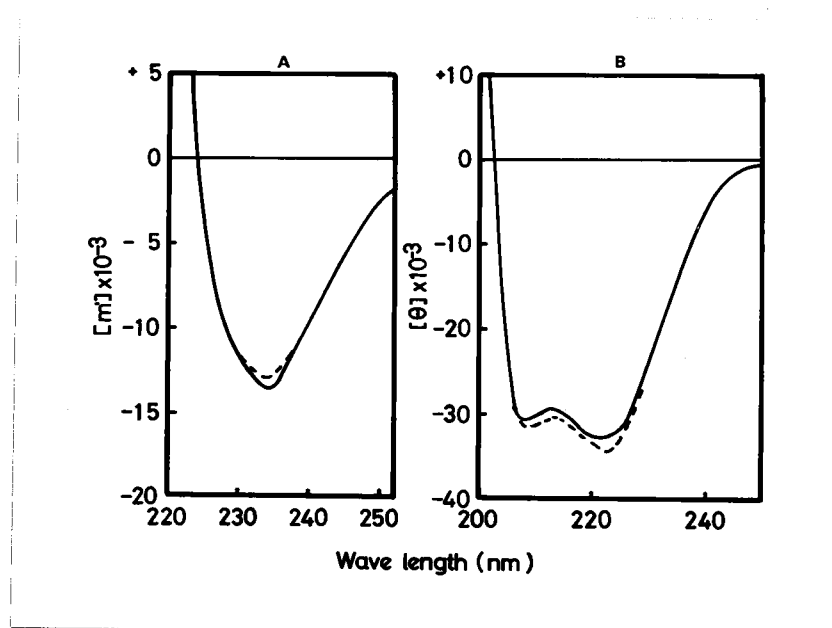
第41図 偽トロポミオシンとトロポミオシンの紫外吸収スペクトル

偽トロポミオシンあるいはトロポミオシンを 1mg/ml とし、 0.2M KCl , 10mM CaCl_2 あるいは 5mM EGTA , 10mM Tris-HCl ($\text{pH } 7.5$), または 6M グアニジン塩酸, 20mM K phosphate ($\text{pH } 6.5$) を用い 235nm から 335nm における紫外吸収スペクトルを測定した。

ンの吸収はそれより遙かに高い。277nmにおける $E'_{1\%}$ はトロポミオシンが2.9であるのに対し、偽トロポミオシンでは6.4であった。また、277nmと260nmにおける吸収の比はトロポミオシンでは2.4で偽トロポミオシンでは1.6であった。偽トロポミオシンもトロポミオシンも共に Ca^{2+} の有無によって紫外吸収スペクトルに差は認められなかった。また、 Ca^{2+} 処理したトロポミオシンは無処理のものと全く同じ吸収スペクトルを示した。6Mゲアニジン塩酸に溶解した場合には、トロポミオシンでは対照区との差はほとんど無かったが、偽トロポミオシンの場合には全波長域にわたって吸光度の減少がみられた。

旋光分散(ORD)および円偏光二色性(CD)の測定結果は第42図AおよびBで、いずれの場合も、偽トロポミオシンとトロポミオシンの間には差異が認められなかった。また、 Ca^{2+} の有無によっても差異は認められなかった。これらの結果から求めた α -ヘリックス含量は第3表の通りで、両蛋白質とも約90%の α -ヘリックスを含有していることが判った。

4. 粘度



第42図 偽トリプトファンおよびトリプトファンの旋光分散および円偏光二色性

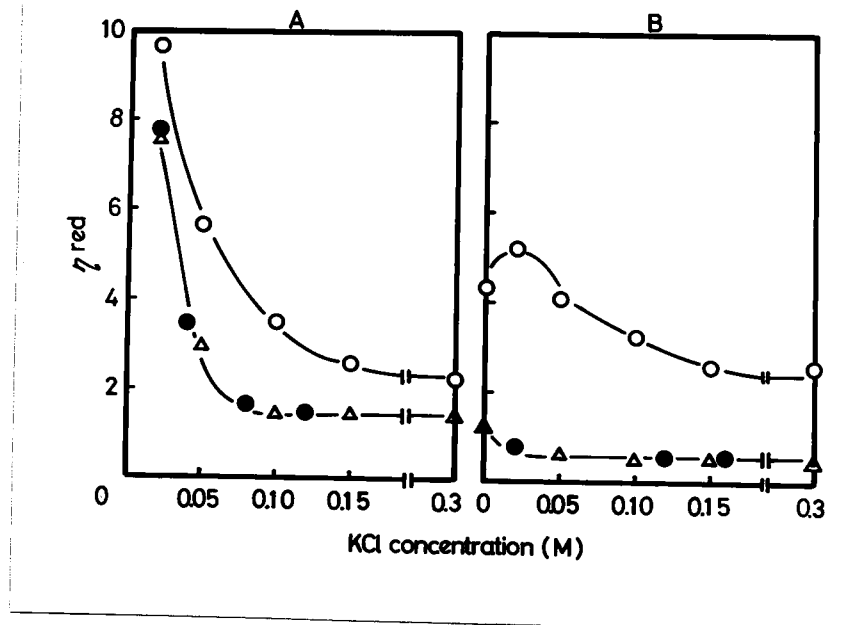
偽トリプトファンあるいはトリプトファンを 0.35 mg/ml とし、 0.2 M KCl , 10 mM CaCl_2 あるいは 5 mM EGTA , 10 mM Tris-HCl ($\text{pH } 7.5$) 溶液で光路長 2 mm のセルを用いて、旋光分散 (A) および円偏光二色性 (B) を測定した。

第3表 偽トロポミオシンおよびトロポミオシンの α -ヘリックス含量

	Pseudo-tropomyosin	Tropomyosin
ORD	84.4%	87.4%
CD	96.0%	93.9%
Average	90.2%	90.7%

旋光分散の場合には 233nm における谷の値から、円偏光二色性の場合には 222nm における谷の値から各々 Greenfield の方法^(99,100)により算出した。

DEAEセルロースカラムクロマト法でえられた標品，純化した偽トロポミオシンおよびトロポミオシンの三者について，粘度のKCl濃度依存性を調べた結果が第43図に示してある。第43図(A)は Ca^{2+} 不在の場合であり，(B)は 10mM Ca^{2+} が存在する場合である。(A)に示すようにいづれの蛋白質もKCl濃度が低いと粘度が高いがDEAEセルロースカラムクロマト標品は純化した偽トロポミオシンやトロポミオシンより高い粘度を示した。純化した偽トロポミオシンとトロポミオシンの間には差異がなかった。一方， 10mM Ca^{2+} が存在する場合(B)にはトロポミオシンとDEAEセルロースカラムクロマト標品の粘度のKCl濃度依存性は著しく異なるものであった。トロポミオシンは全てのKCl濃度でほぼ一定の低い粘度しか示さなかったが，DEAEセルロースカラムクロマト標品の場合には 0.02M KClで最大値となる特異的なKCl濃度依存性を示した。また，トロポミオシンは 10mM Ca^{2+} が存在する場合には Ca^{2+} 不在下におけるよりも低い粘度を示すのに対し，DEAEセルロースカラムクロマト標品は 10mM Ca^{2+} 存在下でより高い粘度を示



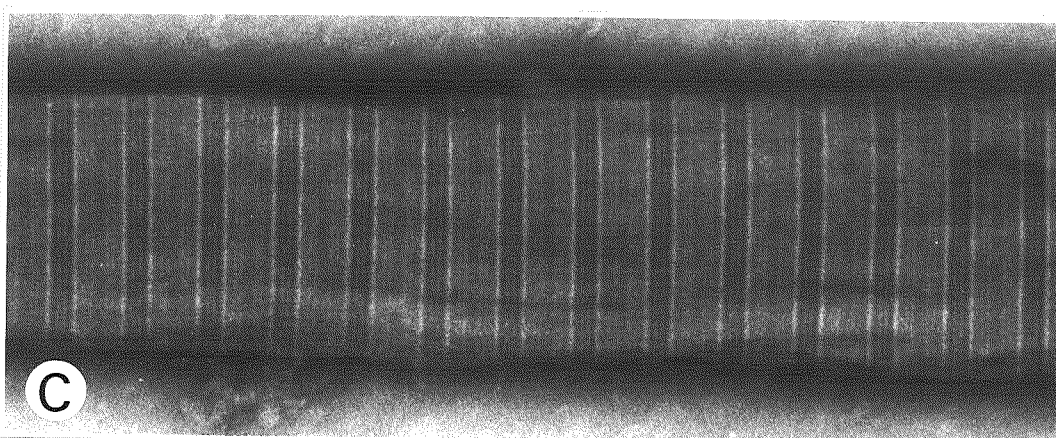
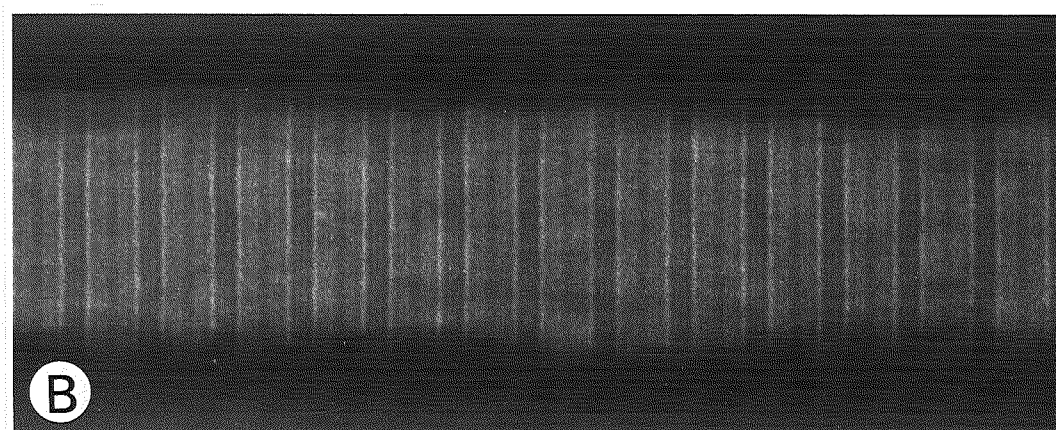
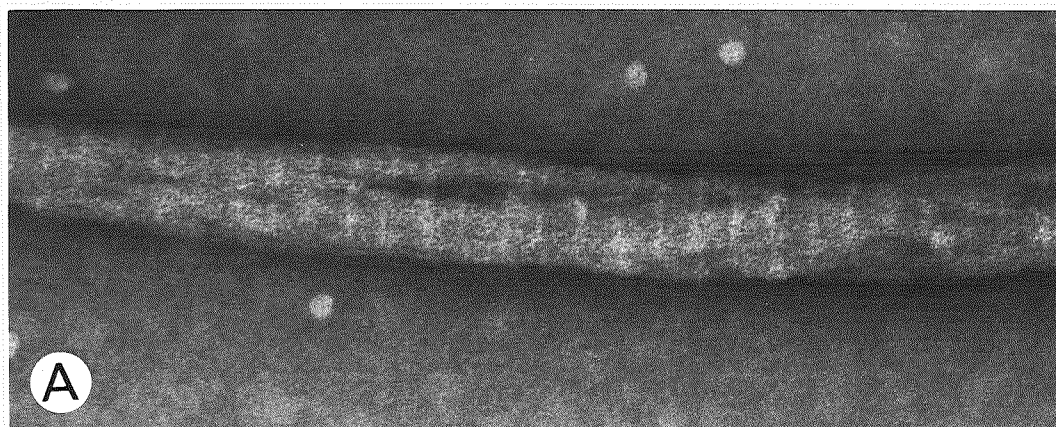
第43図 偽トロポミオシンおよびトロポミオシンの粘度のKCl濃度依存性

試料を 0.2 mg/ml としオストワルド粘度計を用い 25°C で測定した。A; 10 mM Tris-HCl ($\text{pH } 7.5$) 溶液。B; 10 mM CaCl_2 , 10 mM Tris-HCl ($\text{pH } 7.5$) 溶液。○, DEAEセルロースカラムクロマト法によりえられた標品。●, 純化した偽トロポミオシン。△, トロポミオシン。

いた。トロポミオシンはKClを含まない10 mM CaCl_2 溶液において準結晶を形成する⁽⁹⁷⁾ので溶液は白濁し、静置すれば沈殿を生じた。DEAEセルロースカラムクロマトによりえられた標品は同一条件下でも白濁せず、静置しても沈殿を生じることにはなかった。SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって単一成分であることを確認した純化した偽トロポミオシンでは全てのKCl濃度範囲においてトロポミオシンと全く同じ挙動を示した。

5. 重合体の形態

DEAEセルロースカラムクロマト標品、純化した偽トロポミオシンおよびトロポミオシンについて、10 mM CaCl_2 , 10 mM Tris-HCl (pH 7.5) という条件下で形成される重合体の形態を電子顕微鏡を用いて観察した結果が第44図である。DEAEセルロースカラムクロマト標品は細長い線維状重合体を形成する(A)のに対して、純化した偽トロポミオシンおよびトロポミオシンは規則的構造をもった準結晶を形成した。純化した偽トロポミオシン(B)およびトロポミオシンの準結晶像(C)は400 Åおそに明暗の縞模様が見られ、両者は全く同一の構



第44図 偽トロポミオシン準結晶の電子顕微鏡像

DEAE セルロースカラムクロマト標品(A), 純化した偽トロポミオシン(B)およびトロポミオシン(C)を 10mM CaCl_2 , 10mM Tris-HCl (pH 7.5) に対して透析して形成させた重合体。試料は1% 酢酸ウランウムで染色した。倍率 $240,000\times$

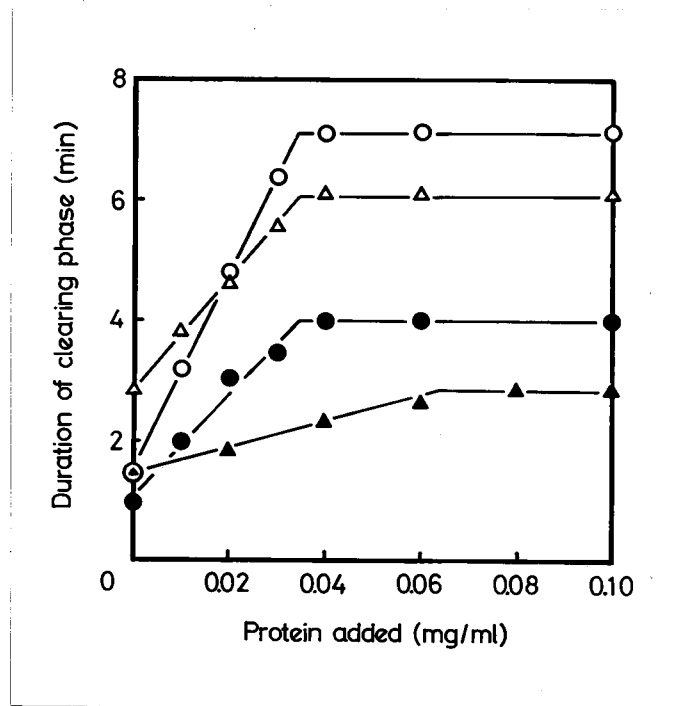
造であることが判る。DEAEセルロースカラムクロマト標品においても $400\text{\AA}$ 間隔で同一波長の繰り返しを観察されるが、準結晶の構造とは明らかに異なるものであった。

第二項 作用面における差異

1, 透明化期間の延長作用

第33図で明らかにしたように、偽トロポミオシンが合成アクトミオシンの透明化期間を延長する作用は極めて顕著である。トロポミオシンについてもこの作用を調べた結果が第45図に示してある。トロポミオシンの場合も合成アクトミオシンの透明化期間を延長するが、活性の飽和点をえるのに要するトロポミオシンの添加量は 1mg/ml の合成アクトミオシン当り 0.06mg/ml で、偽トロポミオシンの場合の約2倍であった。また、活性は偽トロポミオシンが対照区の透明化期間を4.7倍に延長するのに対してトロポミオシンでは僅か2倍にすぎなかった。また、トロポミオシンを Ca^{2+} 処理した場合にも無処理のトロポミオシンと全く同一の作用を示した。

偽トロポミオシンとトロポミオシンの異同をさらに明らかにするために、 1mg/ml の合成



第45図 合成アクトミオシンの透明化期間延長作用の比較

種々の合成アクトミオシンに偽トロポミオシンあるいはトロポミオシンを添加して両者の透明化期間延長作用を比較した。○, 合成アクトミオシン (0.25 mg アクテン, 0.75 mg ミオシン/ml) に偽トロポミオシンを添加した。▲, 合成アクトミオシンにトロポミオシンを添加した。△, 0.07 mg/ml のトロポミオシンを添加して形成させた合成アクトミオシンに偽トロポミオシンを添加した。●, 0.07 mg/ml のトロポミオシンおよび 0.08 mg/ml のトロポニン を添加して形成させた合成アクトミオシンに偽トロポミオシンを添加した。実験条件は第31図と同じである。

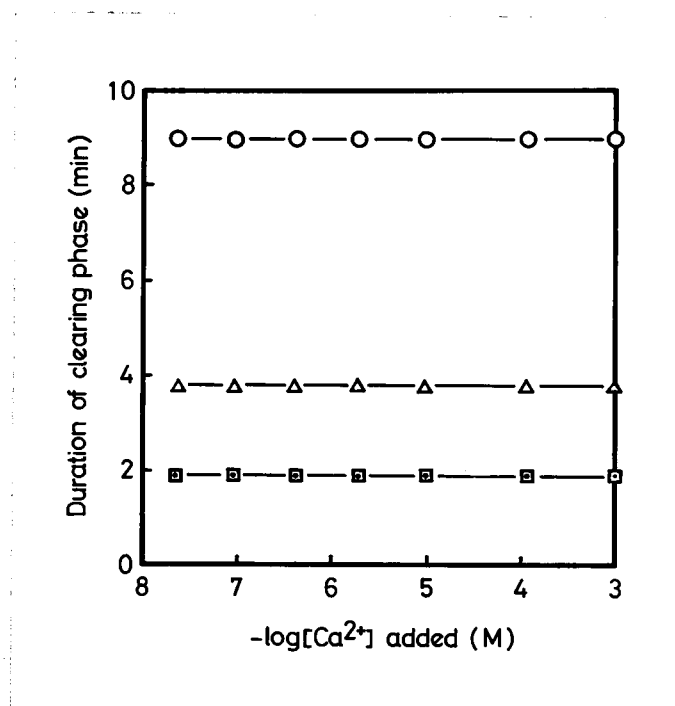
アクトミオシンに 0.07 mg/ml のトロポミオシンを添加して両者の結合を飽和した標品に偽トロポミオシンを添加することにより偽トロポミオシンの附加効果を調べた。この場合、トロポミオシンを含む合成アクトミオシンの透明化期間を偽トロポミオシンが附加的に延長することが明らかで、対照区の透明化期間を2.2倍に延長した。活性の飽和点を求めるのに要する偽トロポミオシンの添加量は 0.034 mg/ml であった。トロポミオシンとトロポニンを含む合成アクトミオシンは筋肉のモデル系と考えることができるが、両調節蛋白質を充分量添加して形成させた合成アクトミオシン（アクチン 0.25 mg , ミオシン 0.75 mg , トロポミオシン 0.07 mg , トロポニン 0.08 mg/ml ）に対しても、偽トロポミオシンは透明化期間を顕著に延長し、その程度は対照区の3.8倍であった。この場合も、活性の飽和点を求めるのに必要な偽トロポミオシンの添加量は 0.034 mg/ml であった。

2, 透明化期間延長作用の Ca^{2+} 濃度依存性

アクチンおよびミオシンからなる合成アクトミオシンに充分量の偽トロポミオシンあるいはトロポミオシンを添加した場合、その透

明化期間を延長する作用は Ca^{2+} 濃度が $2.4 \times 10^{-8} \text{ M}$ から $1 \times 10^{-3} \text{ M}$ の範囲で一定していて、 Ca^{2+} 濃度依存性を全く示さなかった（第46図）。また、トロポニンを単独で添加した場合にも透明化期間を延長する作用は Ca^{2+} 濃度依存性を示さなかった。

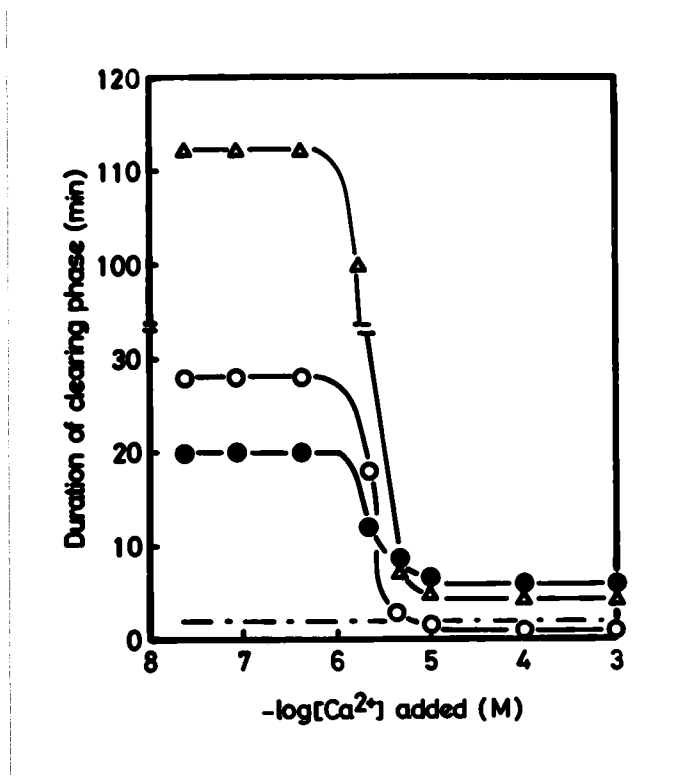
一方、 Ca^{2+} 感受性を持つ調節蛋白質・トロポニンがトロポミオシンあるいは偽トロポミオシンと共存する場合には、偽トロポミオシンの作用とトロポミオシンの作用の間には顕著な差異が認められた。すなわち、第47図に示すように、合成アクトミオシンにトロポニンとトロポミオシンを添加した場合には透明化期間に顕著な Ca^{2+} 濃度依存性が現われ、 $4 \times 10^{-6} \text{ M}$ 以下の Ca^{2+} 濃度においては透明化期間が延長され、 $1 \times 10^{-5} \text{ M}$ 以上の Ca^{2+} 濃度では逆に透明化期間が短縮された。 Ca^{2+} 濃度が $1 \times 10^{-7} \text{ M}$ における透明化期間は $1 \times 10^{-4} \text{ M}$ の場合の実に28倍に達した。この現象はトロポミオシンおよびトロポニンを含む合成アクトミオシンの Ca^{2+} 感受性としてよく知られているところである^(63, 72)。合成アクトミオシンにトロポニンと偽トロポミオシンを添加した場合には透明化期間の Ca^{2+} 濃度依



第46図 合成アクトミオシンの透明化期間を延長する作用と Ca^{2+} 濃度の関係

偽トロポミオシン, トロポミオシンおよびトロポニンについて, 合成アクトミオシンの透明化期間を延長する作用の Ca^{2+} 濃度依存性を調べた。反応条件: 0.1M KCl , 5mM MgCl_2 , $20\text{mM imidazole-HCl}$ ($\text{pH } 7.0$), 25°C で 0.3mM ATP を添加した。

●, 合成アクトミオシン (0.25mg アクチン, 0.75mg ミオシン/ ml)。△, 合成アクトミオシンに 0.07mg/ml のトロポミオシンを加えた。○, 合成アクトミオシンに 0.04mg/ml の偽トロポミオシンを加えた。□, 合成アクトミオシンに 0.08mg/ml のトロポニンを加えた。



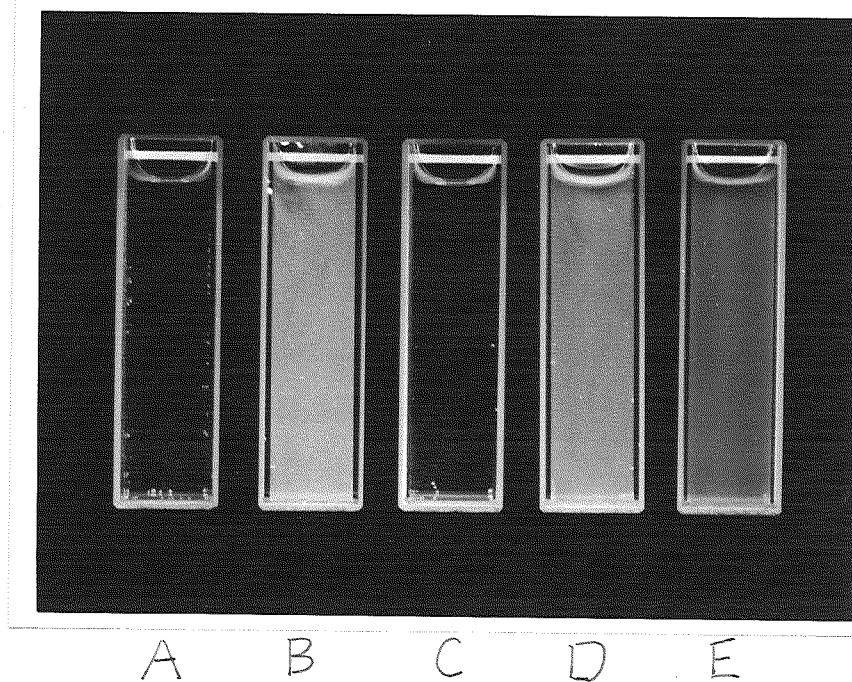
第47図 トロポニン存在下における合成アクトミオシンの透明化期間を延長する作用と Ca^{2+} 濃度の関係

トロポニンの存在下で，偽トロポミオシンおよびトロポミオシンについて透明化期間の延長作用の Ca^{2+} 濃度依存性を調べた。——，合成アクトミオシン（0.25 mg アクタン，0.75 mg ミオシン，0.08 mg トロポニン/ml）。○，合成アクトミオシン + 0.07 mg/ml のトロポミオシン。●，合成アクトミオシン + 0.04 mg/ml の偽トロポミオシン。△，（合成アクトミオシン + 0.07 mg/ml トロポミオシン） + 0.04 mg/ml の偽トロポミオシン。実験条件は第46図と同じである。

存性が余り顕著ではない。 Ca^{2+} 濃度が $1 \times 10^{-7} \text{ M}$ における透明化期間は $1 \times 10^{-4} \text{ M}$ の場合の僅か 3.3 倍にしか過ぎず、トロポニンの Ca^{2+} 感受性が充分に発現されないことが明らかになった。トロポミオシンおよびトロポニンを含む Ca^{2+} 感受性のある合成アクトミオシンにさらに偽トロポミオシンを添加した場合には、 Ca^{2+} 濃度が $2.4 \times 10^{-8} \text{ M}$ から $1 \times 10^{-3} \text{ M}$ の範囲で、合成アクトミオシンの透明化期間が約 5 倍に延長された。この場合、トロポニンの Ca^{2+} 感受性が発現されており、かつ、偽トロポミオシンによる透明化期間の延長作用も発現されていることが明らかである。

3. アクチン・ α -アクチニン複合体におよぼす影響

アクチンと α -アクチニンを混和すると複合体が形成され、混合液は白濁するが、トロポミオシンが共存すると溶液の白濁は生じない。すなわち、トロポミオシンはアクチンとの相互作用において α -アクチニンと拮抗することが知られている⁽¹⁰⁶⁾。このトロポミオシンの作用を偽トロポミオシンのそれと比較した結果が第48図である。(A) はアクチンだけが含



第48図 アクチン・ α -アクチニン複合体に
偽トロポミオシンのおよぼす影響

アクチンと α -アクチニンの複合体におよぼす偽トロ
ポミオシンおよびトロポミオシンの影響を Drabikowski
の方法⁽¹⁰⁶⁾によって調べた。セル内で, adder-mixer
を用いて各蛋白復を混和した。溶媒条件は 0.1M K
Cl, 20mM Tris-maleate (pH 6.8) で, 25°Cにおいて行ない, 3
時間後に撮影した。A, γ -アクチン 3.2mg/4ml。B, γ -ア
クチン 3.2mg + α -アクチニン 1.2mg/4ml。C, γ -アクチン 3.2mg + トロ
ポミオシン 0.8mg + α -アクチニン 1.2mg/4ml。D, γ -ア
クチン 3.2mg + 偽トロポミオシン 0.8mg + α -アクチニン 1.2
mg/4ml。E, γ -アクチン 3.2mg + トロポミオシン 0.8
mg + 偽トロポミオシン 0.8mg + α -アクチニン 1.2mg/4ml。

まれており溶液は透明である。(B) はアウチンと α -アウチニンを混和したもので、アウチン・ α -アウチニン複合体の形成によつて溶液は白濁した。(C) はアウチンとトロポミオシンの混和液に α -アウチニンを加えた場合で溶液の白濁は起らなかった。(D) はアウチンと偽トロポミオシンの混和液に α -アウチニンを加えた場合であり、混合液は白濁し、トロポミオシンを添加した場合は異なっていた。(E) はアウチン、トロポミオシンおよび偽トロポミオシンの混和液に α -アウチニンを加えたもので、(C) と (D) の中間的な白濁が形成された。これらの実験を行なった pH5.8 という条件はアウチンの等電点沈殿を起す可能性もあったので、上記の実験結果を確認するために pH7.5 における濁度および粘度を調べた結果が第4表である。660 nm における吸光度として測定した濁度も、複合体の形成を粘度で測定した場合にも変化量はいづれも小さかったが、第4図に示された結果によく合致していた。これらの事実から、偽トロポミオシンはトロポミオシンとは明らかに異なる作用を持っており、アウチン・ α -アウチニン複合体

第4表 アクチン・ α -アクチニン複合体に
およぼす偽トロポミオシンの影響

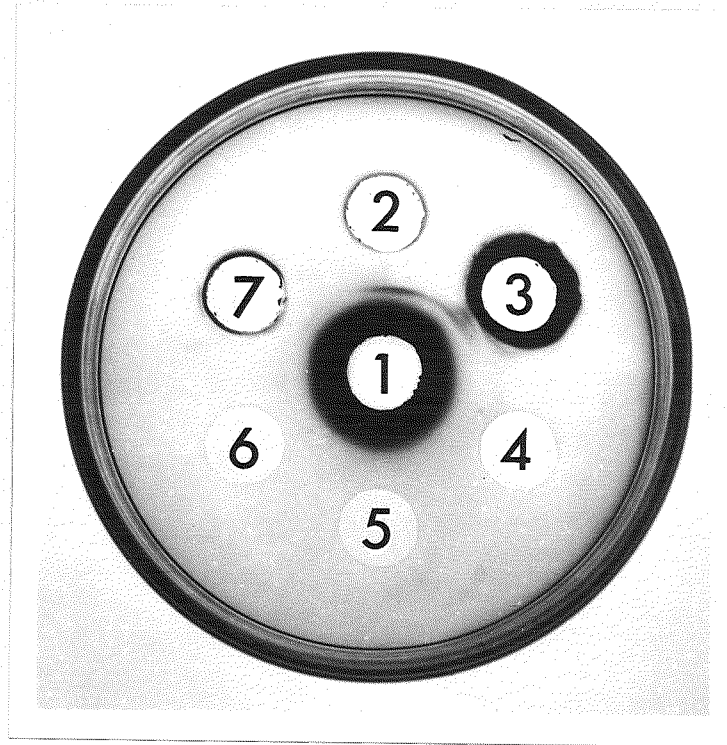
	F-actin	F-actin + α -actinin	F-actin + Tropomyosin + α -actinin	F-actin + Pseudo- tropomyosin + α -actinin
O.D.at 660nm	0.012	0.021	0.012	0.020
η sp	0.7	1.2	0.88	1.18

Goll の方法⁽¹⁰⁷⁾に従い, 0.1M KCl, 20mM Tris-HCl (pH 7.5) 溶液中で 25℃ で各蛋白質を混和し, 測定も 25℃ で行なった。各蛋白質は F-アクチン 1mg/ml, トロポミオシン 0.25mg/ml, 偽トロポミオシン 0.25mg/ml, および α -アクチニン 0.1mg/ml である。

の形成を阻害しない事が判った。

第三項 抗原抗体反応

鶏の偽トロポミオシンを抗原としてえられた抗血清に対する抗原抗体反応を *Ouchterlony* 法で行なった結果が第49図である。中心孔に抗血清を入れ、周囲の孔には各々鶏浅脇筋から調製した筋原線維、ミオシン、アクチン、トロポミオシン、トロポニンそれぞれに抗原である偽トロポミオシンを配した。抗原抗体反応による沈降線の形成は偽トロポミオシンおよび筋原線維との間に連続した強いものが見られた。抗偽トロポミオシン抗体はトロポミオシンとは反応しないことが明らかであるが、 37°C で長時間(30時間)反応させた場合にはトロポミオシンやミオシンとの間にも弱い沈降線の形成がみられた。



第49図 抗偽トロポミン抗血清のOuchterlony試験

筋原線維の蛋白質について、抗偽トロポミン抗血清との間の免疫拡散試験をOuchterlony法で行なった。抗血清以外は全て1% SDS, 1% β -mercaptoethanol, 0.9% NaCl, 20mM Na phosphate (pH 7.2) として98℃で3分間処理した試料を用い、各々の孔に注入した。37℃で16時間反応させて観察した。①, 抗血清30 μ l。②, 偽トロポミン30 μ g。③, 筋原線維300 μ g。④, アークン30 μ g。⑤, トロポニン30 μ g。⑥, トロポミン30 μ g。⑦, ミオシン30 μ g。尚、各蛋白質は全て鶏浅胸筋より調製したものである。

第四節 考 察

偽トロポミオシンとトロポミオシンは蛋白質の一般的特性についてほぼわめて類似している。先づ、両者の分子量はSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動においては共に35,000ダルトンであり(第39図), ゲル濾過法においては共に350,000ダルトンであった(第40図)。トロポミオシンの分子量は70,000^(92,93)であるが, SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動においては2種類のサブユニット34,000ダルトンと36,000ダルトンがほぼ単一の35,000ダルトンのバンドとして泳動することが知られてゐる⁽⁶⁸⁾。したがって、偽トロポミオシンにおいても同じ現象が起こっているのかも知れない。Sephacryl S-300 によるゲル濾過を行なった条件は粘度の測定結果(第43図)から重合体の形成は無いと考えられるのにもかかわらず、実際には350,000という値がえられた。これは球状蛋白質と仮定した場合の計算値であるので、トロポミオシン分子が長さ400Å, 直径20Åの棒状分子⁽⁹⁵⁾である事を考慮すれば、ゲル濾過法的には大きな値となったとも考えられる。偽トロポミオシンについても同様

の事が考えられよう。

アミノ酸組成はほぼ同一である(第2表)が、トリプトファン含量だけに差が見られ、偽トロポミオシンのトリプトファン含量はトロポミオシンのその4倍であり、このトリプトファン含量の違いが紫外吸収スペクトルの差となって表われている(第41図)ものと考えられる。偽トロポミオシンを調製する際の筋原線維の Ca^{2+} 処理において、トロポミオシンが変化したという可能性を考え、単離したトロポミオシンを Ca^{2+} 処理したが、紫外吸収スペクトルは未処理のトロポミオシンと全く同一であった。従って、偽トロポミオシンはその調製過程においてトロポミオシンが変化したものとは考えられない。旋光分散および円偏光二色性(第42図)においては兩者共に90%以上の α -ヘリックスを含有しており、差異が認められない(第3表)。また、 $10\text{ mM } \text{Ca}^{2+}$ の存在下で共に準結晶を形成するが、トロポミオシンの準結晶については電子顕微鏡を用いた多くの研究^(97, 108-111)がなされており、 $400\text{ \AA}$ 間隔で見られる縞模様はトロポミオシン分子の棒状形態を強く反映したものと考えられて

いる。従って、偽トロポミオシンもトロポミオシン同様に細長い棒状の分子であらう事が推察される。

一方、機能面において偽トロポミオシンはトロポミオシンと大きく異なる性質を示した。トロポミオシンは合成アクトミオシンの Mg^{2+} -ATPase 活性を抑制する作用の有る事が知られている^(90, 112-114)が、抑制の程度はいづれの報告の場合においても低いものである。事実、第45図に示したように、合成アクトミオシンの透明化期間の延長は約2倍に過ぎないのに対し、偽トロポミオシンの場合は合成アクトミオシンの透明化期間を約5倍にも延長し、アクトン-ミオシン相互作用を抑制する効果はトロポミオシンよりも遙に大きい。また、偽トロポミオシンは充分量のトロポミオシンが存在する合成アクトミオシンの場合にも透明化期間をさらに5倍に延長するという附加的抑制効果を発揮する。

第45図の結果から、 $1mg/ml$ の合成アクトミオシンに対して $0.06mg/ml$ のトロポミオシンを添加した時にトロポミオシンの作用は飽和点に達することが明らかになったが、 $1mg$ の合

或アクトミオシンには 0.25mg のアクチンが含まれているので、 1mg のアクチン当り 0.24mg のトロポミオシンが結合することになる。アクチンの分子量を $42,000^{(86)}$ とし、トロポミオシンのサブユニットの分子量を $35,000^{(68)}$ として上記の結合量比から結合モル比を求めると、 $\frac{1}{42,000} : \frac{0.24}{35,000} = 3.5 : 1$ となり、アクチン 3.5 分子に対してトロポミオシンのサブユニット 1 分子が結合していることが判る。この結合モル比は、第四章において求めたアクチンと偽トロポミオシンの結合モル比 ($6.2 : 1$) の約半であり、アクチンとの結合において、偽トロポミオシンがトロポミオシンと著しく異なることが明らかである。

Ca^{2+} 感受性を有するトロポニンの存在下において、偽トロポミオシンとトロポミオシンの差異はさらに明確なものとなった (第 47 回)。すなわち、 $1 \times 10^{-5} \text{M}$ 以上の Ca^{2+} が存在する場合、トロポミオシンは合或アクトミオシンの透明化期間を半に短縮するのに対し、偽トロポミオシンは透明化期間を逆に約 5 倍に延長する。 Ca^{2+} 濃度が $1 \times 10^{-6} \text{M}$ 以下の場合にはトロポミオシンが合或アクトミオシンの透明化期間

を約15倍に延長するのに対し、偽トロポミオシンは10倍にしか延長しない。しかも、延長効果はトロポミオシンでは、 Ca^{2+} 濃度が $1 \times 10^{-7} \text{ M}$ における透明化期間が Ca^{2+} 濃度 $1 \times 10^{-4} \text{ M}$ の場合の約30倍に達するのに対し、偽トロポミオシンではわずか3倍にすぎない。また、偽トロポミオシンによる透明化期間の延長効果は、トロポミオシンとトロポニンと共に含有する合致アクチンにおいて発揮され、 $2.4 \times 10^{-8} \text{ M}$ から $1 \times 10^{-3} \text{ M}$ の範囲で Ca^{2+} 濃度に関係なく透明化期間を4倍以上に延長させる作用を有している。この附加的效果もまた偽トロポミオシンとトロポミオシンの異同を示すものである。

アクチンと α -アクチニンの複合体に対してトロポミオシンは α -アクチニンと拮抗する作用を示し、複合体形成を阻害する^(106, 107) (第48図)。これに反して偽トロポミオシンはアクチンと α -アクチニンの複合体の形成を阻害する作用は全く示さず、偽トロポミオシンとトロポミオシンの差異を明らかに示しており、生筋における両蛋白質値が異なる機能を有していることを示唆している。

偽トロポミオシンとトロポミオシンとが異なる蛋白質である事は免疫学的手法によりよりいっそう明確となった。トロポミオシンのようにα-ヘリックス含量の高い蛋白質は免疫性がえわめて強く表われる⁽¹⁵⁾が、偽トロポミオシンを抗原としてえうれた抗血清はトロポミオシンとは反応しなかつた(第49図)。アミノ酸組成が類似しており、また、ヘリックス含量の高いという共通の蛋白質化学的性質を有する偽トロポミオシンとトロポミオシンでは抗偽トロポミオシン抗体がトロポミオシンと反応する可能性もえうれたが、30時間の反応によりやっと沈降線が認められる程度の弱い反応しか示さなかつた。この事は偽トロポミオシンがトロポミオシンとは明らかに異なつた蛋白質である事を証明している。

以上述べたように、蛋白質としての特性における偽トロポミオシンとトロポミオシンの差異は、トリプトファン含量に由来する紫外線吸収スペクトルにおいて現われるのみであるが、機能面における両者の差異は極めて顕著なものがある。機能面における差異および免疫反応における違いから、偽トロポミオシンは

トロポミオシンとは異なる未知の蛋白質であると結論することが出来る。筋原線維における偽トロポミオシンの局在については、今後蛍光抗体法を用いて検討する必要があるが、偽トロポミオシンが合成アクトミオシンの Ca^{2+} 感受性の発現においてトロポミオシンに代替できないという事は、細いフィラメントの、少なくともトロポニンが存在する領域には偽トロポミオシンが無いことを示唆している。細いフィラメントがZ線に接合する部分、すなわちZ線の中心から 76 nm の部位には、トロポニンは存在しないことが明らかにされており⁽¹¹⁶⁾、この部位に偽トロポミオシンがアクチンと結合して存在している可能性が考えられる。また、細いフィラメントの構成蛋白質であるアクチンとZ線の構成蛋白質である α -アクチニン間の相互作用を偽トロポミオシンが阻害しないという事からも、細いフィラメントとZ線の接合部に偽トロポミオシンが存在することによって、その接合を強化しているものと推測される。このように考えることにより、第三章において明らかにした、筋原線維の Ca^{2+} 処理に際してZ線の崩壊にともなって偽トロポ

ミオシンが遊離するという事実がよく理解されよう。

第六章 結 論

本論文は、骨格筋の死後における硬直の解除機構についてアクトシン相互作用という側面から解明する事を目的とし、未知の筋原線維性蛋白質である偽トロポミオシンの存在を見出す事により、死後硬直時に短縮した筋節が硬直解除期に静止長へ復元する現象の機作を明らかにすることが出来た。偽トロポミオシンは蛋白質としての一般的特性は筋原線維の細いフラメント上に存在するトロポミオシンにそわめて類似しているが、機能面においては両者の間には顕著な差異がある。また、生筋における偽トロポミオシンの局在はZ線ないしZ線の近傍であると考えられる。トロポミオシンとは似て非なる新蛋白質・偽トロポミオシンの存在を踏まえると、骨格筋の死後硬直の解除機構は、以下に述べるように結論される。

屠殺された家畜の死後、骨格筋の細胞内では、死後時間の経過に伴ってATPが減少し、pHが低下すると、筋小胞体およびミトコンドリアが Ca^{2+} 蓄積能を失い Ca^{2+} が筋形質内に漏

出する^(10,11)。細胞内 Ca^{2+} 濃度が $1 \times 10^{-6} \text{M}$ 以上になるとアクチン-ミオシン相互作用が起り、太いフィラメントと細いフィラメントが滑りを起こして各々の筋節は短縮し、死後硬直を起す⁽¹⁾。硬直が完了した時期には ATP が存在しないため、アクチンとミオシンは堅く結合して硬直複合体を形成する⁽⁴⁰⁾。筋細胞形質内の遊離 Ca^{2+} 濃度は最終的には $2 \times 10^{-4} \text{M}$ 程度に上昇し⁽³²⁾、高濃度となった Ca^{2+} は Z 線構成成分に作用し、Z 線の構造は崩壊し始める⁽³⁰⁾。Z 線の崩壊に伴って遊離した偽トロポミオシンは筋原線維の細いフィラメントを構成するアクチンに側面結合する。この結合によって、細いフィラメントにおける偽トロポミオシンの存在が立体障害となり、アクチン・ミオシン間の結合は不安定となる。硬直時に発生した張力は筋原線維に緊張を与えているので、アクチン・ミオシン間の結合が不安定になれば、太いフィラメントと細いフィラメントの相互位置にずれが生じ、筋節は静止長へ復元することになる。

このように、死後の骨格筋の硬直解除期において観察される筋節の静止長への復元という現象と、筋原線維の小片化という現象は其

に Ca^{2+} によるミ線の構造崩壊に起因しており、
 $1 \times 10^{-6} \text{M}$ 程度の Ca^{2+} によって惹起された死後硬直
は $2 \times 10^{-4} \text{M}$ 程度の Ca^{2+} によって解除されるという
をわめて明快な結論が得られた。また、弾性
蛋白フィブリンが死後の時間経過とともにな
って可溶化するために死後筋肉が可塑性にな
る現象も、 Ca^{2+} に依存している事が明らかにさ
れており⁽²¹⁾、食肉の熟成期間中に筋組織が脆
弱化する要因として掲げた3種類の現象は全
て Ca^{2+} によって発現されている事になる。

生理的な筋肉の収縮・弛緩が Ca^{2+} 濃度 $1 \times 10^{-6} \text{M}$
を境に調節されているのに対し、非生理的な
食肉の軟化はそれよりも200倍量の Ca^{2+} 、すな
わち $2 \times 10^{-4} \text{M}$ で惹起されるという事は誠に興味
深いものである。

謝 辞

本研究の企画，進行および論文作成において，終始御指導頂いた北海道大学農学部高橋興威助教授に深く感謝の意を表します。

本研究の遂行に当り，多大の便宜を計り下さり，長年月に渡って御助言，御鞭撻を，また，論文作成に当っては適切な配慮を頂きました北海道大学農学部宇井勉教授に深謝致します。

北海道大学農学部有馬俊久郎教授には論文を読閲いただき，貴重な御意見を賜わった。

抗体作成に際し北海道大学農学部仙北俊弘助手には技術的援助を頂き，本研究の進行には，北海道大学農学部森田潤一郎助手，同服部昭仁助手および北海道大学農学部畜産食品製造学講座の諸氏には種々の協力を頂いた，記して感謝の意を表したい。

引用文献

- 1) Bendall, J.R. (1973) "The Structure and Function of Muscle", Vol. 2, p 243, Academic Press, New York
- 2) Bendall, J.R. and Davey, C.L. (1957) Biochim. et Biophys. Acta 26, 93
- 3) Bate-Smith, E.C. (1939) J. Physiol. 96, 176
- 4) Bate-Smith, E.C. and Bendall, J.R. (1947) J. Physiol. 106, 177
- 5) Bate-Smith, E.C. (1948) Adv. Food Res. 1, 1
- 6) Bate-Smith, E.C. and Bendall, J.R. (1949) J. Physiol. 110, 41
- 7) Bendall, J.R. (1951) J. Physiol. 114, 71
- 8) Bate-Smith, E.C. and Bendall, J.R. (1956) Brit. Med. Bull. 12, 230
- 9) Bendall, J.R. (1960) "Structure and Function of Muscle", Vol. 3, p 227, Academic Press, New York
- 10) Nauss, K.M. and Davies, R.E. (1966) J. Biol. Chem. 241, 2918
- 11) Greaser, M.L., Cassens, R.G. and Hoekstra, W.G. (1967) J. Agr. Food Chem. 15, 1112
- 12) Ebashi, S. and Endo, M. (1968) Prog. Biophys. Mol. Biol. 18, 123
- 13) Marsh, B.B. (1954) J. Sci. Food Agr. 5, 70
- 14) Locker, R.H. (1959) J. Biophys. Biochem. Cytol. 6, 419
- 15) Mauriello, G.E. and Sandow, A. (1959) J. Gen. Physiol. 42, 865

- 16) Huxley, H.E. (1953) Biochim. Biophys. Acta 12, 387
- 17) Huxley, H.E. (1957) Biochem. Biophys. Cytol. 3, 631
- 18) Huxley, A.F. and Niedergengerke, R. (1954) Nature 173, 791
- 19) Huxley, H.E. and Hanson, J. (1954) Nature 173, 793
- 20) Takahashi, K., Fukazawa, T. and Yasui, T. (1967)
J. Food Sci. 32, 409
- 21) Takahashi, K. and Saito, H. (1979) J. Biochem. 85, 1539
- 22) Fukazawa, T. and Yasui, T. (1967) Biochim. Biophys. Acta
140, 534
- 23) Stromer, M.H., Goll, D.E. and Roth, L.E. (1967)
J. Cell Biol. 34, 431
- 24) Stromer, M.H. and Goll, D.E. (1967) J. Food Sci.
32, 329
- 25) Davey, C.L. and Gilbert, K.V. (1967) J. Food Technol.
2, 57
- 26) Davey, C.L. and Gilbert, K.V. (1969) J. Food Sci.
34, 69
- 27) Davey, C.L. and Dickson, M.R. (1970) J. Food Sci.
35, 56
- 28) Henderson, D.W., Goll, D.E. and Stromer, M.H. (1970)
Amer. J. Anat. 128, 117
- 29) Takahashi, K., Hattori, A. and Yasui, T. (1970)
J. Biochem. 67, 609
- 30) Hattori, A. and Takahashi, K. (1979) J. Biochem.
85, 47
- 31) Goll, D.E., Stromer, M.H., Robson, R.M., Temple, J.,
Eason, B.A. and Busch, W.A. (1971) J. Animal Sci.
33, 963

- 32) Nakamura, R. (1973) Anal. Biochem. 53, 531
- 33) Maruyama, K., Natori, R. and Nonomura, Y. (1976)
Nature 262, 58
- 34) Maruyama, K., Matsubara, S., Natori, R., Nonomura, Y.,
Kimura, S., Ohashi, K., Murakami, F., Handa, S. and
Eguchi, G. (1977) J. Biochem. 82, 317
- 35) Wang, K., McClure, J. and Annn Tu. (1979) Pro. Natl.
Acad. Sci. U.S.A. 76, 3698
- 36) Toyoda, N. and Maruyama, K. (1978) J. Biochem. 84, 239
- 37) dos Remedias, C.G. and Gilmour, D. (1978) J. Biochem.
84, 235
- 38) Goll, D.E., Stromer, M.H., Olson, D.G., Dayton, W.R.,
Suzuki, A. and Robson, R.M. (1974) "Proceedings of
the Meat Industry Research Conference" Chicagos p 75
- 39) Huxley, H.E. (1963) J. Mol. Biol. 7, 281
- 40) Huxley, H.E. and Brown, W. (1967) J. Mol. Biol.
30, 387
- 41) Lowey, S., Slayter, H.S., Weeds, A.G. and Baker, H. (1969)
J. Mol. Biol. 42, 1
- 42) Fujimaki, M., Arakawa, N., Okitani, A. and Takagi, O.
(1965) J. Food Sci. 30, 937
- 43) Wolfe, F.H. and Samejima, K. (1976) J. Food Sci. 41, 244
- 44) Szent-Györgyi, A. "Chemistry of muscle contraction"
(1951) 2nd ed., Academic press N.Y.
- 45) Endo, M., Nonomura, Y., Masaki, T., Ohtsuki, I. and
Ebashi, S. (1966) J. Biochem. 60, 605
- 46) Huxley, A.F. (1973) Proc. R. Soc., B 183, 83
- 47) Botzler, E. (1954) J. Gen. Physiol. 38, 149

- 48) Watanabe, S. (1955) Arch. Biochem. Biophys. 54, 559
- 49) Okitani, A., Takagi, O. and Fujimaki, M. (1967)
Agric. Biol. Chem. 31, 939
- 50) Goll, D.E. and Robson, R.M. (1967) J. Food Sci.
32, 323
- 51) Robson, R.M., Goll, D.E. and Main, M.J. (1967)
J. Food Sci. 32, 544
- 52) Davey, C.L. and Gilbert, K.V. (1968) J. Food Sci.
33, 2
- 53) Penny, I.F. (1968) J. Sci. Food Agric. 19, 518
- 54) Chaudhry, H.M., Parrish, F.C.Jr. and Goll, D.E. (1969)
J. Food Sci. 34, 183
- 55) Ikeuchi, Y., Ito, T. and Fukazawa, T. (1980)
J. Food Sci. 45, 13
- 56) Perry, S.V. and Grey, T.C. (1956) Biochem. J. 64, 184
- 57) Etlinger, J.P., Zak, R. and Fischman, D.A. (1976)
J. Cell Biol. 68, 128
- 58) Perry, S.V. (1955) Method in Enzymology 2, p 582
- 59) Straub, F.B. (1942) Studies Inst. Med. Chem. Univ.
Szeged. 2, 3
- 60) Rees, M.K. and Young, M. (1967) J. Biol. Chem. 242, 4449
- 61) Spudich, J.A. and Watt, S. (1971) J. Biol. Chem.
246, 4866
- 62) Bailey, K. (1948) Biochem. J. 43, 271
- 63) Ebashi, S., Kodama, A. and Ebashi, F. (1968)
J. Biochem. 64, 465
- 64) Hartshorne, D.J. and Mueller, H. (1969) Biochim.
Biophys. Acta 175, 301

- 65) Ebashi, S., Wakabayashi, T. and Ebashi, F. (1971)
J. Biochem. 69, 441
- 66) Masaki, T. and Takaiti, O. (1969) J. Biochem. 66, 637
- 67) Tawada, Y., Ohara, H., Ooi, T. and Tawada, K. (1975)
J. Biochem. 78, 65
- 68) Weber, K. and Osborn, M. (1969) J. Biol. Chem.
244, 4406
- 69) Gonall, A.G., Bardwill, C.S. and David, M.M. (1949)
J. Biol. Chem. 177, 751
- 70) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randoll,
R.J. (1951) J. Biol. Chem. 193, 265
- 71) Huxley, H.E. and Hansan, J. (1957) Biochim. Biophys.
Acta 23, 229
- 72) Ebashi, S. (1963) Nature 200, 1010
- 73) Ebashi, S. and Ebashi, F. (1965) J. Biochem. 58, 7
- 74) Masaki, T., Endo, M. and Ebashi, S. (1967)
J. Biochem. 62, 630
- 75) Dabrowska, R., Barylko, B., Novak, E. and Drabikowski, W.
(1973) FEBS Lett. 29, 239
- 76) Busch, W.A., Stromer, M.H., Goll, D.E. and Suzuki, A.
(1972) J. Cell Biol. 52, 367
- 77) Kundrat, E. and Pepe, F.A. (1971) J. Cell Biol.
48, 340
- 78) Offer, G., Moos, C. and Starr, R. (1973) J. Mol. Biol.
74, 653
- 79) Ebashi, S. (1961) J. Biochem. 50, 236
- 80) Fiske, C.H. and Subbarow, Y. (1925) J. Biol. Chem.
66, 375

- 81) Tonomura, Y. (1972) "Muscle protein, Muscle contraction and Cation transport" p 191 University of Tokyo Press
- 82) Penny, I.F., Voyle, C.A. and Dransfield, E. (1974)
J. Sci. Food Agr. 25, 703
- 83) Penny, I.F. (1974) J. Sci. Food Agr. 25, 1273
- 84) Suzuki, A., Nonami, Y. and Goll, D.E. (1975)
Agric. Biol. Chem. 39, 1461
- 85) Reddy, M.K., Etlinger, J.D., Rabinowitz, M., Fischman, D.A. and Zak, R. (1975) J. Biol. Chem. 250, 4278
- 86) Elzinga, M., Collins, J.H., Kuehl, W.M. and Adelstein, R.S. (1973) Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 70, 2687
- 87) Kawamura, M., Masaki, T., Nonomura, Y. and Maruyama, K. (1970) J. Biochem. 68, 57
- 88) 萩原 哲 , 殿村 雄治 (私信)
- 89) Wakabayashi, T., Huxley, H.E., Amos, L.A. and Klug, A. (1975) J. Mol. Biol. 93, 477
- 90) Katz, A.M. (1964) J. Biol. Chem. 239, 3304
- 91) Bremel, R.D. and Weber, A. (1972) Nature New Biol. 238, 97
- 92) Holtzer, A., Clark, R. and Lowey, S. (1965)
Biochemistry 4, 2401
- 93) Woods, E.F. (1965) Nature 207, 82
- 94) Cammins, P. and Perry, S.V. (1973) Biochem. J. 133, 765
- 95) Caspar, D.L.D., Cohen, C. and Longley, W. (1969)
J. Mol. Biol. 41, 87
- 96) Wu, C.C. and Young, J.T. (1976) Biochemistry 15, 3007
- 97) Cohen, C. and Longley, W. (1966) Science 152, 794

- 98) Ebashi, S., Endo, M. and Ohtsuki, I. (1969)
Quart. Rev. Biophys. 2, 4
- 99) Greenfield, N.J., Davidson, B. and Fasman, G.D. (1967)
Biochemistry 6, 1630
- 100) Greenfield, N.J. and Fasman, G.D. (1969) Biochemistry
8, 4108
- 101) Edelhoch, H. (1967) Biochemistry 7, 1948
- 102) Ogawa, Y. (1968) J. Biochem. 64, 255
- 103) Obinata, T., Hasegawa, T., Masaki, T. and Hayashi, T.
(1976) J. Biochem. 79, 521
- 104) Obinata, T., Masaki, T. and Takano, H. (1979)
J. Biochem. 86, 131
- 105) Woods, E.F. (1969) Biochemistry 8, 4336
- 106) Drabikowski, W., Nonomura, Y. and Maruyama, K. (1968)
J. Biochem. 63, 761
- 107) Goll, D.E., Suzuki, A., Temple, J. and Holmes, G.R.
(1972) J. Mol. Biol. 67, 469
- 108) Greaser, M.L., Yamaguchi, M., Brekke, C., Potter, J.
and Gergely, J. (1972) Cold Spring Harbor Symp. Quant.
Biol. 37, 235
- 109) Margossian, S.S. and Cohen, C. (1973) J. Mol. Biol.
81, 409
- 110) Yamaguchi, M., Greaser, M.L. and Cassens, R.G. (1974)
J. Ultrastruct. Res. 48, 33
- 111) Greaser, M.L., Yamaguchi, M. and Vanderkooi, G. (1977)
J. Mol. Biol. 116, 883
- 112) Schaub, M.C., Perry, S.V. and Hartshorne, D.J. (1967)
Biochem. J. 105, 1235

- 113) Shigekawa, M. and Tonomura, Y. (1973) J. Biochem. 73, 1135
- 114) Eaton, B.L., Kominz, D.R. and Eisenberg, E. (1975) Biochemistry 14, 2718
- 115) Granger, B.L. and Lazarides, E. (1978) Cell 15, 1253
- 116) Ohtsuki, I. (1974) J. Biochem. 75, 753