

G-Actomyosin の酵素化学的研究

Actin の G-F Transformation と Actomyosin-ATPase Activity との関連 (その 1)

麥倉元 湯田坂八重子
遠藤邦夫 馬原逸郎
札幌医科大学生理学教室 (主任 永井教授)

Studies on the Enzymatic Properties of G-Actomyosin Relation Between the G-F Transformation of Actin and the Actomyosin-ATPase Activity (I)

By

HAJIME MUGIKURA, YAEKO YUTASAKA, KUNIO ENDO
and ITSURŌ MAHARA

Department of Physiology, Sapporo University of Medicine
(Chief: Prof. T. NAGAI)

収縮と ATP 分解との関連性の研究は筋収縮機構解明への最も本質的な問題の一つである。

さきに著者の一人¹⁾は myosin 及び合成 actomyosin の酵素化学的研究を行い、0.2 M KCl 以下の低塩濃度では myosin-ATPase の活性度が極めて低いにかかわらず、これに F-actin を加えると強い活性に転ずることから、actin の結合が myosin-ATPase の性質に変化をきたしたものと考えた。

従来 myosin 及び F-actomyosin の ATPase に関する研究は少ない (I. Banga²⁾, N. K. Sarkar & A. G. Szent-Györgyi³⁾, W. Hasselbach⁴⁾) が、G-actomyosin の ATPase に関する報告はまだみられていない。

われわれは actin の演ずる役割に対する理解をさらに深めるため、F-actin よりさらに構造の簡単な G-actin を用い、その myosin-ATPase 及び superprecipitation に及ぼす影響を観察した。

実験方法

A. 実験材料

家兎筋肉から myosin は Szent-Györgyi⁵⁾ の方法により actin は Straub⁶⁾ の方法によつて抽出した。ATP は家兎及び犬の筋肉から Szent-Györgyi⁵⁾ の方法によつて得た。

Myosin 溶液: 8 mg/cc, 0.3 または 0.6 M KCl 溶液。

Actin 溶液: 4-8 mg/cc, F-actin は G-actin に KCl を加えて 0.1 M とし室温に 30 分以上放置し、また非重合性 G-actin (以下 G₀-actin と記す) は G-actin を 4~6 日水で透析、或いは 30°C 10-24 時間及び 80°C 1 時間加熱処理して得た。

G-AM 溶液: myosin 溶液に ATP を混じ、5 秒後に G-actin を加えて G-AM とした。

G₀-AM 溶液: G₀-actin を上記のように myosin-ATP 混合液に加えて G₀-AM としたもの。

F-AM 溶液: F-actin を上記のように myosin-ATP 混合液に加えて F-AM とした。

1) 湯田坂: 札幌医誌 5, 90 (1954).
2) Banga, I.: cit. Szent-Györgyi, A. Chemistry of Muscular Contraction 2 nd. ed. (1951).
3) Sarkar, N. K. & Szent-Györgyi, A. G.: Enzymologia 14, 4, 267 (1950).

4) Hasselbach, W.: Z. Naturforsch. 7, b, 183 (1953); cit. Berichte 157, 177 (1953).
5) Szent-Györgyi, A.: Chemistry of Muscular Contraction, 1st ed. (1947); 2nd ed. (1951).
6) Straub, F. B.: cit. 5).

ATP 溶液: 5×10^{-3} M/lit, Ba 塩を K-塩に置換して用いた。

MgCl₂ 溶液: 10^{-2} M/lit.

buffer 溶液: Michaelis 氏 veronal-acetate buffer 溶液, pH 6.5

B. 方法

1) 反応混液: myosin, actin, ATP 及び MgCl₂ の終濃度をそれぞれ 0.8 mg/cc, 0.2 mg/cc, 4.2×10^{-4} M/lit 及び 10^{-3} M/lit となるように加え, buffer 溶液は 0.5 cc を用い, 2 M 或いは 0.2 M KCl で反応混液の [KCl] を規正し, 総量 3.0 cc とした。

2) ATPase activity 測定法: actin 及び ATP を除いた上記反応混液を 20°C に温浴, 5 分後に ATP, さらに 5 秒後に G-或いは F-actin を加え, ATP を添加, 5 分 (time course を調べる場合はそれに相当した時間) 後に 5% トリクロール醋酸 2.0 cc で反応を止め, 濾液 1.0 cc についてその含有する遊離 P を Bodansky 法で呈色させ比色定量した (詳細は前報⁷⁾)。

3) 超沈殿の判定法: F-AM の場合には次のように表示した。

- : ATP の添加により透光度が増した以外何等の変化も示さないもの。

± : coarse flocculate を生じたもの (いわゆるわれわれのいう aggregate の状態⁸⁾)。

+ : loose plug を生じたもの。

++ : excellent plug を生ずる過程にあるもの。

: excellent plug を生じたもの。

G-AM の場合には white turbidity が現われるので次のように表示した。

⊖ : 上記(-)と同じ。

⊕ : ATP 添加により僅かに濁度の増したもの。

⊕ : fine turbidity の軽度なもの。

⊕ : fine turbidity の著明なもの。

⊕ : coarse turbidity を生じたもの。

実験成績

1) 0.04-0.6 M の広汎な [KCl] の変化の下に F-AM-, G-AM-, 及び myosin-ATPase の activity を比較し Fig. 1 に示すような成績を得た。

これによれば G-AM もまた湯田坂の F-AM の場合と同じく 0.2 M KCl 附近に一つの谷を有する ATPase activity を示し, 0.2 M KCl より低塩濃度における ATPase activity は F-AM > G-AM > myosin の順に, また高塩濃度側においては myosin > G-AM > F-AM の順になつ

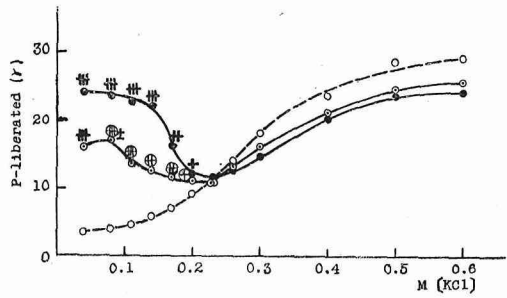


Fig. 1. ATPase Activity and Superprecipitation of F-Actomyosin, G-Actomyosin and Myosin under various KCl Concentrations.

●—● : F-Actomyosin
○—○ : G-Actomyosin
○—○ : Myosin
20°C. 5 min
Reaction mixture: 3.0 cc
Myosin: 0.8 mg/cc (final concentration)
Actin: 0.2 mg/cc (final concentration)
ATP: 4.2×10^{-4} M/cc (final concentration)
pH 6.5 (veronal-acetate buffer)

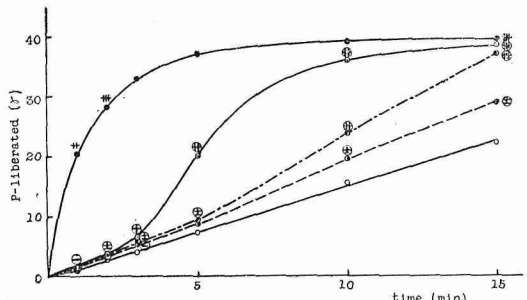


Fig. 2. Time Courses of F-Actomyosin-, G-Actomyosin-, G₀-Actomyosin- and Myosin-ATPase Activity.

●—● : F-Actomyosin (Myosin+F-Actin in 0.1 M KCl solution)
○—○ : G-Actomyosin (Myosin+G-Actin)
●—● : G₀-Actomyosin (Myosin + dialysed G-Actin for 4 days against distilled water)
●—● : G₀-Actomyosin (Myosin + dialysed G-Actin for 5.5 days against distilled water)
○—○ : Myosin
20°C.
Reaction mixture: 3.0 cc, 0.14 M KCl solution
Myosin: 0.8 mg/cc (final concentration)
G-Actin: 0.2 mg/cc (final concentration)
ATP: 4.2×10^{-4} M/cc (final concentration)
pH 6.5 (veronal-acetate buffer)

7) 麦倉: 札幌医誌 5, 175 (1954).

* 永井・宮崎: 高分子 3, 203 (1954).

ている。なお低温濃度で ATPase activity が高くなるに伴つて F-AM では syneresis が強くなり、G-AM では white turbidity の度を増し 0.04 M KCl では syneresis をみるに至る。

2) 0.14 M KCl 溶液* で F-AM, G-AM, myosin 及び重合能力の低下した G₀-actin と myosin とよりなる G₀-AM の ATPase activity を比較し同時に superprecipitation を観察して Fig. 2 に示すような成績を得た。

これによれば F-AM の ATPase activity の time curve は hyperbola を示しその activity は最も高く、myosin のそれは極めて低く殆ど直線状をなしその ATPase activity が著明に抑制されている。G-AM では最初 myosin の curve に近く、時間の経過とともに white turbidity の出現に伴つて高い activity を示すようになる。また G₀-AM では curve は myosin と G-AM の中間にあ

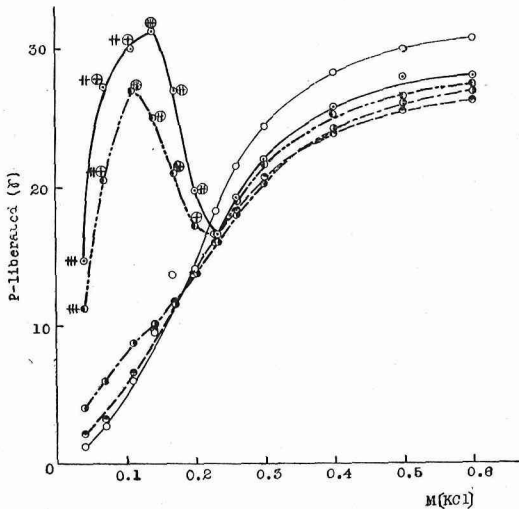


Fig. 3. ATPase Activity and Superprecipitation of G-Actomyosin, G₀-Actomyosin and Myosin.

- : G-Actomyosin (Myosin+G-Actin)
 - : G₀-Actomyosin (Myosin+G₀-Actin incubated 30°C for 10 hours)
 - : G₀-Actomyosin (Myosin+G₀-Actin incubated 30°C for 24 hours)
 - : G₀-Actomyosin (Myosin+G₀-Actin incubated 80°C for 1 hour)
 - : Myosin
23°C. 4 min
- Reaction mixture: 3.0 cc.
 Myosin: 0.8 mg/cc (final concentration)
 Actin: 0.27 mg/cc (final concentration)
 ATP: 4.2 10⁻⁷ M/cc (final concentration)
 pH 6.5 (Veronal-acetate buffer)

り、actin の重合能力に比例して G-AM の curve に接近し、同時に white turbidity 出現の時間は短縮しその強さも増し G-AM のそれに近くなる。

3) 0.04–0.6 M KCl の [KCl] 変化の下に加熱処理により重合能力の低下した G₀-actin と myosin とよりなる G₀-AM の ATPase activity 及び superprecipitation を比較し Fig. 3 に示すような成績を得た。

即ち加熱処理による重合能力の低下に比例して、低塩濃度側では G₀-AM-ATPase の活性度が下り、全く重合能力のない G₀-actin は殆ど myosin-ATPase を活性化することがない。superprecipitation の度合も ATPase activity と同様の関係にある。また高塩濃度側では重合能力の如何は myosin-ATPase activity に著明な影響を与えない。

総括並びに考按

以上われわれは G-actin の myosin-ATPase activity に及ぼす影響を観察した。G-actin は ATP の存在により AM の解離を来たすような高塩濃度においては myosin-ATPase activity を抑制し、ATP 共存下 myosin と superprecipitation を起すような低塩濃度においては、極めて低い activity しか有していない myosin ATPase を著明に活性化する。

高塩濃度側における G-AM-ATPase は myosin のそれと質的に同じものと考えられる。G-AM が myosin よりも下廻る ATPase activity を示すことは解離した G-actin が myosin-ATPase を抑制するためであり、最近われわれはこれを actin 中に含まれる Mg⁺⁺ の作用に求めようとしており、その詳細は近く稿を改めて論ずることとし、今回は低塩濃度側における G-actin の myosin-ATPase に及ぼす影響を中心として 2, 3 の考察を試みる。

従来 G-AM-ATPase について知られるところは殆どなかつた。これは低塩濃度においては G-actin は myosin によりその G-F transformation を著明に促進され速かに F-actin となり、従つて得られるものは F-AM で G-AM としては掴むことが出来ない。また高塩濃度では存在する ATP により actin と myosin とは解離し、従つて G-AM そのものの ATPase activity を知ることが出来ないなどのことが原因している。しかるに Spicer によれば

late 或いは plug を作らない。

8) Spicer, S. S.: Am. J. Physiol. 172, 671 (1953).

* 0.14 M KCl では ATP の共存により新鮮な G-AM 溶液は white turbidity のみを示し coarse floccu-

低塩濃度において ATP の共存の下に G-actin に myosin を、或いは myosin に G-actin と加えると G-actin は F-actin にまで重合しないうちに myosin と結合して G-AM の superprecipitation を生じ、G-actin の重合の度に応じて fine colloidal superprecipitate (fine white turbidity) から coarse precipitate (coarse turbidity) を生じ、G-actin の重合がさらに進めば F-AM と同じ coarse flocculate, 或いは Plug を作るようになるという。

われわれはこのような G-AM と F-AM との中間の段階において G-actin* の myosin-ATPase activity に及ぼす影響を観察したのである。

Fig. 1 にみられるように [KCl] の変化の下に G-AM-ATPase と F-AM のそれを比較するとき、質的には殆ど差が認められない。しかし G-AM に特有な white turbidity のみが見られるような [KCl] (0.14 M KCl 以上) で両者の ATPase activity の time curve を比較するときそこには著明な差が認められるようになる (Fig. 2)。

即ち F-AM-ATPase activity の time curve が hyperbola であるに反し G-AM のそれは sigmoid を描き、最初は myosin の curve に等しく極めて低い activity しか示さないが white turbidity の出現に伴つて curve の上昇をきたし、ATP 分解が進むに従つて curve は再び平坦になる。

F-AM と異なり G-AM-ATPase activity の time curve がこのように sigmoid を描くことは単に enzyme と substrate の濃度以外にさらにこの反応を規定する第 3 の要素が考えられねばならない。われわれは次のような理由からこれを actin の G-F transformation と解した。

1) AM-ATPase activity と actin G-F transformation との間には密接な parallelism が存在すること。即ち

i) G-AM-ATPase activity の time curve の上昇の rate と myosin 混在時の actin G-F transformation の rate とが一致する。Laki⁹⁾によれば KCl による G-actin の重合は myosin の存在によりその rate を促進し 0.1 M KCl 附近では 3 分前後で著明な viscosity の上昇をみ、5 分前後でその maximum に達する。遠藤¹⁰⁾はわれわれと同じ実験条件で actin の重合に及ぼす myosin の影響をみ、Laki と同様の結果を得ている。一方 0.14 M KCl における G-AM-ATPase activity の time curve は 2~3 分で上昇を示し、而もこの際同時に white turbidity の出現を伴う (Fig. 1)。

ii) 透析により重合能力を低下させた G₀-actin と myosin とよりなる G₀-AM では、その ATPase activity は低く、time curve は myosin のそれに近い。重合能力減少の度の少ないものほど G-AM の curve に近ずき、同時に white turbidity 出現の rate, 程度ともに G-AM のそれに近くなる (Fig. 2)。

iii) F-AM は常に G-AM より高い ATPase activity を有し、また actin 重合の度の進んだ G-AM (即ち plug 或いは flocculate を生ずるもの) ほど重合の度の少ない G-AM (fine or coarse turbidity のみを示すもの) より高い ATPase activity を有する (Fig. 1, 2)。

iv) 遠藤¹⁰⁾によれば KCl のみでは 0.1-0.15 M に optimum を有する actin の重合は、myosin の存在によりその optimum をさらに低塩濃度側へずらす。このことは、0.1 M KCl よりさらに低い塩濃度で G-AM が F-AM に近い superprecipitation を起し、同時に高い ATPase activity を示すのとよく一致する。

2) G-actin はその重合の度合に応じて myosin と結合する。

Fig. 2, 3 にみられるように、重合能力が著しく低下した G₀-actin は myosin-ATPase に殆ど影響を与えずに、また white turbidity の度も極めて僅かか或いはこれを示さない。G-actin の重合能力低下の度が少なくなるに伴つて myosin-ATPase をより強く活性化し、同時に white turbidity の度合をましその出現の時間を短縮し、条件によつては F-AM と同じ superprecipitation をも生ずる。これは G-actin がその重合の度合に応じて myosin との結合をますことを示唆するものであり、また actin と myosin との結合に際して、球状の actin よりもそれがいくつかが重合して珠数状となつたものの方がより結合し易いことは容易に理解出来るところである。最近 Feuer¹¹⁾が actin 中に含まれる ATP-C-phosphophorase の研究から、G-actin はその重合の度合に応じて myosin と結合することの見解を明かにしたことは、われわれの考え方の妥当性を支持するものである (この点はなお後で論ずる)。

以上 2 つの点から G-AM-ATPase activity の time curve が sigmoid を描くことを考察すれば、myosin-ATP に G-actin を混じた当初は、全く重合していない G-actin は myosin に殆ど影響を与えず、従つてその curve は myosin のそれに等しく、G-actin の重合に伴つて myosin との結合を増し AM-ATPase の性格を現わ

* われわれが G-Actin, G-AM と稱するものは、正確には F-actin, F-AM への過程にあるものをも含むのである。

9) Laki, K. & Clark, A. M.: Arch. Biochem. 30, 187

(1951).

10) 遠藤: 未発表。

11) Feuer, G. & Wollemann, M.: Acta Physiol. Hung. 5, 31 (1954).

し myosin とは異なる高い activity を示すようになり、従つて curve の上昇をきたし F-AM の curve に似てくる。また同時にそれ自身共存する ATP によつて superprecipitation を起して fine colloidal の superprecipitate を生じて white turbidity を示す。さらに ATP の分解がすすみ substrate 濃度が減少すると curve は再び平坦に近くなるものと解される。このように actin と myosin との結合の度合、即ち actin の G-F transformation が curve の sigmoid を描く直接の原因と解される。

このような見解はまた Spicer⁹⁾ の white turbidity に対する見解ともよく一致しており、これに基づいて Fig. 1 に示された各 [KCl] における G-AM 及び F-AM の ATPase activity の curve を見るとき、両者は一見類似しているように見えるがその内在する mechanism はやや異なり、G-AM のそれは Fig. 2 に示された ATPase time curve の一定時間で区切られた P 分解、換言すればそれぞれの [KCl] における G-F transformation の速度と本来の F-AM-ATPase の [KCl] 依存の二つを含む複雑なものであるが、その曲線の前半は主として前者即ち重合の rate を現わすものといえよう。

従来 actin の viscosity による実験では低 [KCl] 下に myosin の多量存在する reaction mixture (しかも ATP 存在下) の測定は沈澱が生ずるために不可能視されたが、上記の事実から G-AM-ATPase activity time curve の前半の立上りを知ることにより G-actin の重合をこのような条件下でも測定出来る可能性が生じたものといえる。

myosin-ATPase についてにこれまで専ら myosin の側からのみこれが眺められてきており actin については顧みられるところがなかつた。さきに湯田坂⁷⁾は actin 結合が myosin-ATPase の性質に変化をきずことを知り、さらにわれわれは結合する actin の重合の度合が myosin-ATPase 活性化に密接な関連を持つことを明かにした現在、actin の重要性が一段と強調されねばならず、しかも actin 重合と直接関連する ATP-C-phosphophorase の問題が myosin-ATPase と相結び注目されねばならぬときがきたといえよう。

ATP の存在により superprecipitation を起すような低塩濃度において、myosin に actin が結合することにより単独の myosin とは全く異なつた高い ATPase activity を示すようになり、しかも actin 重合の度合に応じてその activity は上昇し、収縮に最も好都合な F-AM が最も高

い ATPase activity を有することは、ATP 分解に際してその energy を利用して収縮が完成され、その際 ATP の分解は myosin-ATPase によると解するわれわれの立場をさらに強く支持するものである。

全く重合しない状態で G-actin が myosin と結合するか否かについては未だ明かにされていない。Straub¹²⁾ 及び Szent-Györgyi¹³⁾ は初期に両者は結合して G-AM を作ると解した。しかし Stuaub の根拠は、“G-actin に myosin を加えても viscosity の上昇はないが、ATP の添加により G-AM は G-actin と myosin とに解離し、この間 G-actin は重合して F-actin となり ATP の消失とともにこの F-actin は myosin と結合して高い viscosity を示す F-AM となる、”という実験成績である。われわれ¹⁴⁾ の行つた同様の実験ではこのような事実は認め難く、G-actin は myosin の存在により極めて徐々に viscosity の上昇を示し、添加された ATP が分解して viscosity の再上昇をきたす場合でも ATP 添加前に比し著しい上昇を見ることはなかつた。また Szent-Györgyi のいう G-AM の形成は Spicer⁹⁾ の実験に基づいたものであるが、この実験では Spicer 自身も全く重合していない。G-actin が myosin と結合するとはいつておらず、G-actin が F-actin へと重合する過程において myosin と結合すると解している。即ち G-actin と myosin との結合を認めるものはその根拠が薄弱である。一方 ATP-C-phosphophorase の添加によつて actin 重合が促進される場合それと全く平行して AM 形成の増すことを明かにした Feuer 等¹¹⁾ の実験、及び myosin-ATP に G-及び F-actin の混在したものを加える場合先ず F-AM の superprecipitate 即ち plug を生じ、これより遅れて G-AM の superprecipitate である white turbidity が出現することを述べている Spicer⁹⁾ の実験は、われわれの成績とともに全く重合しない状態では G-actin は myosin と結合しないと解する方が好都合である。但しこの考えに対し矛盾するものとして myosin が G-actin の重合を著明に促進する事実がある。この事実は myosin と G-actin との interaction を示すものであり、この点からは G-actin は myosin と結合するものようにも考えられる。

要するに現在のところ全く重合しない状態の G-actin が myosin と結合して G-AM を形成するか否かについては直接証明はなく未だ結論を得ることは出来ない*。しかしながら ATP の存在下

12) Straub, F. B.: cit. Mommaerts; Muscular contraction (1950).

13) Szent-Györgyi, A.: Chem. Physiol. of Contract.

in Body & Heart Muscl. (1953).

14) 麦倉: 未発表.

に actin と myosin を混合した場合においては、最初は ATP の二重作用の一つたる dissociating action が働いて両者の結合を妨げ、この間 G-actin 自身は或程度の重合を行いこのような状態となつて初めて ATP の dissociating action に打勝ち、myosin と結合して AM を形成しここに ATP の contracting action が発現するものと考えるところも出来る。

最後に actin が myosin と結合することにより何故 myosin とは全く異なつた高い ATPase activity を示すようになるかその機構に関しては現在のところ全く不明であり、ATP-C-phosphophe-

rase の問題と関連し今後の研究にまたねばならない。

結 論

1) ATP の存在下 superprecipitation を起すような低塩濃度において、G-actin は F-actin と同様 myosin-ATPase を質的に変じ、これを著明に activate する。

2) actin による myosin-ATPase の活性化は actin 重合の度合に平行し、F-AM において最も強い。

(昭和 29. 10. 23 受付)

Summary

The effect of G-actin on the ATPase activity of myosin was studied, and the relation between the G-F transformation of actin and the ATPase activity of G-actomyosin was discussed.

Results were as follows:

- 1) G-actin enhanced the ATPase activity of myosin at lower KCl concentrations, at which time superprecipitation of G-actomyosin was observed.
- 2) An intimate parallelism between the degree of polymerization of G-actin and its activating effect on myosin-ATPase was noted.

(Received Oct. 23, 1954)

* 以上述べたところより actin はその重合の度に応じて myosin と結合すると考るべき理由が比較的多いと

考えられ、われわれは一応この考えに従つて、成績を説明した譯である。