

## 蛔虫体壁斜紋筋ミオシンの酵素学的 および物理化学的特性

中 村 健

(昭和58年8月29日 受領)

**Key words:** *Ascaris*, nematode, myosin, actomyosin, ATPase, muscle contraction.

### 緒 言

筋収縮機構に関する研究は、脊椎動物骨格筋で最も良く進歩し、今日、その対象は平滑筋や無脊椎動物の筋肉に至っている。これらの研究は、収縮の本体となる構造蛋白質、すなわちミオシンおよびアクチンの単離と、それぞれの物理化学的性状の認識に始まり、ATPase活性、超沈澱現象等、幅広い観察を基盤として、収縮機構の解明を行なっている(山口, 1971; Weber and Murray, 1973; 大日方, 1983)。

蛔虫をはじめ、線虫類は、その体壁に斜紋筋構造をもっている(Rosenbluth, 1965a; Epstein *et al.*, 1974)。斜紋筋は、thick-filamentsとthin-filamentsが斜めに規則正しく配列し、繊維構造の配列状態(Rosenbluth, 1965a; Nonomura, 1968)やミオシンとアクチンとの構成比(Tregear, 1973; 中村ら, 1976)等から、横紋筋と平滑筋との中間型とも考えられ、従つて、筋収縮機構の研究上非常に重要な位置をしめている。

一方、寄生生活を営む蛔虫のエネルギー生成系は、宿主のような高等哺乳動物のそれとは著しく異つた機構をもつ事が知られており、それらと環境適応との関連についての生化学的研究が詳細になされている(大家, 林, 1976; 大家, 1980)。それに対し、代表的なエネルギー消費系、すなわち筋収縮に関しては、蛔虫体壁斜紋筋(蛔虫筋)について、形態的に、筋繊維の構造、小胞体やミトコンドリア、神経筋接合部の状態等が電子顕微鏡的に観察されている(Rosenbluth, 1965a, b)。また消費系の機能面に関しては、Langer *et al.*, (1972)が、蛔虫筋ホモジネートにウサギ骨格筋アクトミオシン系と類似した基質親和性をもつATPase (EC 3.6.1.3)の存在を報告し、さらに、Štefl and Kubistová (1972)は、蛔

虫体壁筋のアクトミオシン含量が筋層総蛋白質量の多くとも10%である事を示した。そして、Yamaguchi *et al.* (1973a)は蛔虫筋よりミオシン-A(蛔虫筋ミオシン)を調製し、そのATPase活性および合成アクトミオシン系におけるATP感受性についての性質を示した。その後、Nakamura *et al.* (1975)は、さらに蛔虫筋ミオシンを精製し、そのサブユニット構造の特異性、および試験管内収縮モデルである合成アクトミオシン系超沈澱において、蛔虫斜紋筋独特と考えられる現象を見出した。

また、斜紋筋の収縮制御機構については、近年、イカ外套膜筋のCa<sup>2+</sup>制御の研究が行なわれている(Tsuchiya *et al.* 1978a; Konno, 1978)。さらに、蛔虫斜紋筋においても、そのミオシン軽鎖がprotein kinaseによつてリン酸化され、この現象の収縮制御への関連が示唆されている(Srihari *et al.*, 1981)。

この様に、宿主である高等哺乳動物とは、著しく異つたエネルギー生成系と独特な筋微細構造や収縮現象をもつ蛔虫において、収縮性蛋白質、とくにその主要成分であるミオシンは、高等動物のそれと比較して、どのような分子特性をもっているのか。蛔虫筋ミオシンに関する分子レベルでの基礎的研究は未だ行なわれていない。本研究は、蛔虫筋ミオシン分子の酵素化学的および物理化学的性質を詳細に検討したものである。

### 実験材料および方法

1) ミオシンの調製: 蛔虫筋ミオシンは、ブタ蛔虫(*Ascaris suum*) 生鮮雌成虫体壁筋層より既報(Yamaguchi *et al.*, 1973a; Nakamura *et al.*, 1975)の方法で調製した。3-12時間の抽出操作を行つたが、抽出時間による収量の変化は無く、100g(湿重量)の筋層から約70mgの蛋白質が得られた。得られた標品は、超遠心分

析的には単一のピークを示すが、SDS-電気泳動的には若干の不純蛋白質を含んでいる (Nakamura *et al.*, 1975).

比較のために使用したウサギ骨格筋ミオシン (骨格筋ミオシン) は Kielley and Bradley (1965) の方法に従って調製した。

2) アクチンの調製: 合成アクトミオシンを得るためのウサギ骨格筋アクチンは、ミオシン抽出後のアセトン処理筋より Mommaerts (1952), または Spudich and Watt (1971) の方法で調製した。得られた G-アクチンは 0.05M KCl 中で F-アクチンに変換した。

3) 蛋白濃度の測定: Weichselbaum (1946) の biuret 法の変法 (Yamaguchi and Sekine, 1966), または紫外部吸収から Small *et al.* (1961) のウサギ骨格筋ミオシンの分子吸収係数 ( $E_{279}^{1\%} = 5.60$ ) を用いて算出した。

4) ATPase 活性の測定: ATPase 活性は、ATP-buffer 液にミオシンまたはアクトミオシンを加える事により反応を開始し、一定時間後、硫酸酸性下で反応停止、遊離した Pi を Fiske and SubbaRow (1925) の方法で定量した。

5) 超沈澱の測定: 日立自記分光光度計 EPS-3T を用い、Ebashi (1961) の方法に従い、660nm の吸収変化によって測定した。反応は ATP の添加によって開始し、電動攪拌装置によってセル内反応液を常時一定攪拌し、均一な濁度として定量化した (Yamaguchi *et al.*, 1973b)。

6) N-ethylmaleimide (NEM) 修飾によるミオシン ATPase 活性中心構造の検討: NEM によるミオシンの SH 残基の化学修飾は、Sekine and Yamaguchi (1963) の変法で行った。すなわち、2.5mg/ml のミオシンを 0.5M KCl, 50mM Tris-histidine buffer (pH 7.0), または、これに 1mM MgCl<sub>2</sub> および 1mM ATP を加えた溶液中 (pH 7.8) において、0.1mM (0.2 $\mu$ mole) NEM と反応させた。反応液に十分量の SH 基をもつ 0.8mM dithiothreitol (DTT)-0.5M KCl 液の 4 容量を適時加える事によって反応を停止させた。

7) 沈降分析: 沈降定数 (S) および拡散定数 (D) は、日立 UCA Model 1-A を用い、60,000rpm, 20°C で分析、Kielley and Harrington (1960) および Woods *et al.*, (1963) の方法に従って算出した。

8) 粘度測定: 比粘度 ( $\eta_{sp}$ ) は、Ostwald 型粘度計 (容量, 2.0ml; 流速, 約60秒 H<sub>2</sub>O) を使用し、10.0°C 恒温水槽内で測定した。

## 結 果

### 1. 蛔虫筋ミオシンの酵素化学的特性

1) Ca<sup>2+</sup> 存在下の ATPase (Ca<sup>2+</sup>-ATPase) 活性: Fig. 1 に蛔虫筋ミオシン Ca<sup>2+</sup>-ATPase 活性の KCl 濃度依存性を示してある。活性曲線は、低 KCl 濃度で高く、高 KCl 濃度で低かつた。

次に、Ca<sup>2+</sup>-ATPase の pH 依存性を調べた (Fig. 2)。中性 pH 領域 (7.0-7.5) に最も低い活性が認められた。

2) Mg<sup>2+</sup> 存在下の ATPase (Mg<sup>2+</sup>-ATPase) 活性: 蛔虫筋ミオシンの Mg<sup>2+</sup>-ATPase 活性は、骨格筋ミオシンのそれに比べ約 1/5 であつた (Table 1)。蛔虫筋ミ

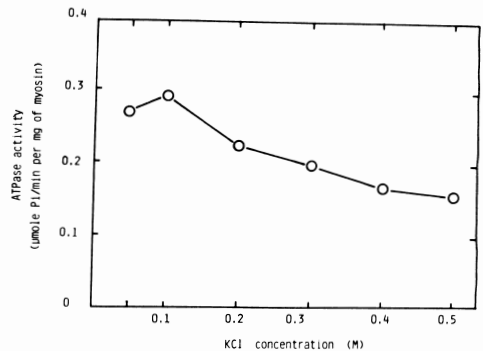


Fig. 1 Dependence of KCl concentrations on Ca<sup>2+</sup>-ATPase activity of *Ascaris* myosin. ATPase activity was measured in KCl at various concentrations containing 5mM CaCl<sub>2</sub>, 1mM ATP and 20mM histidine buffer (pH 7.6) at 37°C for 10min.

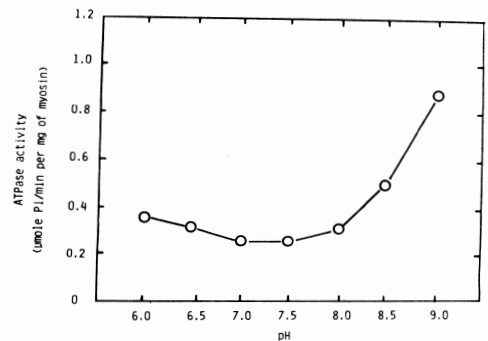


Fig. 2 Dependence of pH on Ca<sup>2+</sup>-ATPase activity of *Ascaris* myosin. ATPase activity was measured in 5mM CaCl<sub>2</sub> containing 1mM ATP, 0.5M KCl and 20mM Tris-maleate buffer at 37°C for 10min.

Table 1  $Mg^{2+}$  ATPase activity and Michaelis constants(Km) of *Ascaris* or rabbit skeletal myosin

Source	Specific activity ( $\mu$ mole Pi/min. per mg of myosin)		Km (M)
	Myosin ATPase	Actin activated myosin ATPase	Myosin ATPase
<i>Ascaris</i> myosin	0.002	0.013	$2.1 \times 10^{-5}$
Rabbit skeletal myosin	0.011	0.170	$2.6 \times 10^{-5}$

ATPase activity was measured in 0.028 M KCl containing 1 mM  $MgCl_2$ , 0.5 mM  $CaCl_2$ , 1 mM ATP, 0.2 mg/ml of myosin and 20 mM Tris-maleate buffer (pH 6.5) with or without 0.8 mg/ml of rabbit skeletal F-actin at 37°C for 10 min.

オシンの  $Mg^{2+}$ -ATPase 活性はウサギ骨格筋アクチンによって約6倍活性化された (Actin activated myosin ATPase, 合成アクトミオシン ATPase)。しかし、骨格筋合成アクトミオシンの活性化率 (約15倍) より低かった。そこで、 $Mg^{2+}$  存在下における、蛔虫筋ミオシンと骨格筋ミオシンそれぞれの基質親和性を検討した。0.125-2.0mM ATP 存在下で活性を測定し、Lineweaver and Bark (1934) のプロットから Km 値を算出し Table 1 に示した。Km 値は、蛔虫筋ミオシンで  $2.1 \times 10^{-5}M$ 、骨格筋ミオシンでは  $2.6 \times 10^{-5}M$  とほぼ等しかった。

3) 活性中心近傍の SH 残基: NEM による化学修飾を用い、蛔虫筋ミオシンの ATPase 活性中心近傍の SH 残基の状態を検討した。Fig. 3 は蛔虫筋および骨格筋ミオシンを 0.5M KCl (pH 7.0) 溶液中で NEM 修飾し、その  $Ca^{2+}$ -ATPase および EDTA 存在下の ATPase (EDTA-ATPase) 活性を測定したものである。蛔虫筋ミオシンの場合、 $Ca^{2+}$ -ATPase 活性化の比率は骨格筋ミオシンの約  $1/2$  であった。しかし、この条件下で活性化が認められた事から、蛔虫筋ミオシンに、骨格筋ミオシンのいわゆる  $SH_1$  (fast reacting sulfhydryl group, Sekine *et al.*, 1962; Sekine and Kielley, 1964) に相当する SH 残基が存在する事が示唆された。

次に、ATP- $Mg^{2+}$  存在下 (pH 7.8), すなわち、骨格筋ミオシン  $SH_2$  (Sekine and Yamaguchi, 1963, Yamaguchi and Sekine, 1966) の修飾条件下で、蛔虫筋ミオシンに NEM を反応させた (Fig. 4)。この条件下では、蛔虫筋ミオシンは、骨格筋ミオシンと同様、 $SH_1$  修飾による  $Ca^{2+}$ -ATPase の活性化 (Fig. 4 では10分以内の反応に認められる) は抑制された。しかし、骨格筋ミオシンが NEM との20分反応によつて、修飾前の活性以下に抑制されるのに対し、蛔虫筋ミオシンは、80分の反応でも、修飾前よりも若干高レベルの活性

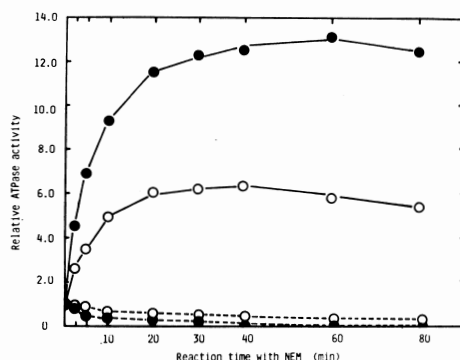


Fig. 3 Change in ATPase activity of *Ascaris* or rabbit skeletal myosin caused by modification with NEM.

Chemical modification was carried out in 0.1 mM NEM containing 0.5M KCl, 2.5mg/ml of myosin and 50mM Tris-histidine buffer (pH 7.0) at 0°C. ATPase activity was measured at 37°C in 0.5M KCl containing 1 mM ATP, 20 mM histidine buffer (pH 7.6) and either 5mM  $CaCl_2$  or 1 mM EDTA for 10min. O, *Ascaris* myosin; ●, rabbit skeletal myosin; Solid line,  $Ca^{2+}$ -ATPase; Dotted line, EDTA-ATPase.

を保つていた。また EDTA-ATPase 活性の失活曲線においても、骨格筋ミオシンが20分修飾によつてほぼ完全に失活するのに対し、蛔虫筋ミオシンは80分修飾でも20%の活性を保つていた。

4) 超沈澱: 蛔虫筋および骨格筋ミオシンと、ウサギ骨格筋 F-アクチンとの合成アクトミオシン (蛔虫筋 AM および骨格筋 AM) の超沈澱における性質を検討した。Fig. 5 [A] は骨格筋, Fig. 5 [B] は蛔虫筋 AM 懸濁液の低濃度 ( $5 \mu M$  および  $10 \mu M$ ) ATP 添加時における濁度変化 (A660nm) を経時的に測定したものである。骨格筋の場合、0.1-0.7mM 程度の ATP 存在下で典型

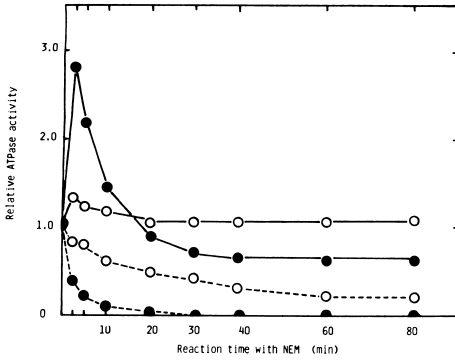


Fig. 4 Change in ATPase activity of *Ascaris* or rabbit skeletal myosin caused by modification with NEM in presence of ATP-Mg<sup>2+</sup>. Chemical modification was carried out in 0.1 mM NEM containing 0.5M KCl, 1 mM ATP, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 2.5mg/ml of myosin and 50mM Tris-histidine buffer (pH 7.8). ATPase activity was measured under the same condition as described in Fig. 3. O, *Ascaris* myosin; ●, rabbit skeletal myosin; Solid line, Ca<sup>2+</sup>-ATPase; Dotted line, EDTA-ATPase.

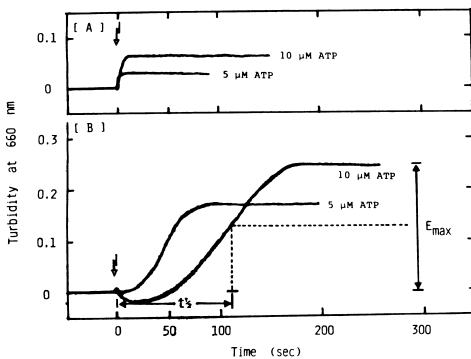


Fig. 5 Superprecipitation of actomyosin from *Ascaris* or rabbit skeletal myosin. Actomyosin(0.15mg/ml) was reconstituted from myosins and rabbit skeletal F-actin [actin: myosin=1:2 (W/W)] in 0.028M KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5mM CaCl<sub>2</sub> and 20mM Tris-maleate buffer (pH 6.2) Turbidity measurement was started by adding 5 μM or 10 μM ATP (arrow) at 25°C. [A], actomyosin with rabbit skeletal myosin and [B], actomyosin with *Ascaris* myosin. See the text for t<sub>1/2</sub> and E<sub>max</sub>.

的な超沈澱を生ずるが(山口, 1971; 野々村, 1983), 蛔虫筋 AM は, 極めて低濃度の ATP 条件下で, 骨格筋 AM に比べ, 速度は遅いが, 著しい濁度上昇を示した

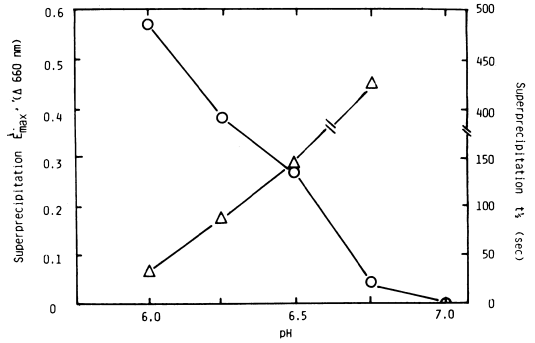


Fig. 6 Effect of pH on superprecipitation t<sub>1/2</sub> or E<sub>max</sub> of *Ascaris* actomyosin.

The ratio of F-actin to myosin was 1:2 (0.3 mg/ml of actomyosin) Superprecipitation was measured in 0.028M KCl containing 1mM Mg-Cl<sub>2</sub>, 0.5mM CaCl<sub>2</sub>, 10 μM ATP and 20mM Tris-maleate buffer at 25°C. O—O, E<sub>max</sub>; Δ—Δ, t<sub>1/2</sub>.

(Fig. 5 [A&B]). また蛔虫筋 AM について, 5 μMATP 添加時の方が, 10 μM ATP 添加時に比べ, 到達最大濁度 (E<sub>max</sub>) は若干低いが (E<sub>max</sub>=5 μM ATP, 0.18; 10 μM ATP, 0.25), 濁度上昇速度 (E<sub>max</sub> の 1/2 に到達するまでの時間, t<sub>1/2</sub>) はより高かった (t<sub>1/2</sub>=5 μM ATP, 約40sec; 10 μM ATP, 約110sec) (Fig. 5 [B]).

Fig. 6 に種々の pH (6.0-7.0), 10 μM ATP 添加時に測定した超沈澱の E<sub>max</sub> および t<sub>1/2</sub> を示してある. ウサギ骨格筋 AM は, 同条件下, pH 6.2-7.2で著明な超沈澱が見られた (Nakamura *et al.*, 1975) にもかかわらず, 蛔虫筋 AM は pH 6.0-6.5の範囲でのみ著明な超沈澱が認められた. pH 6.75においても濁度上昇が見られるが極めて低く, また pH 7.0では全く超沈澱は認められなかった. pH 6.0以下の濁度変化はミオシンの変性を伴うため測定は行なわなかった. 検討した pH の範囲では, pH 6.0において最も速く (t<sub>1/2</sub>=30sec), かつ高い (E<sub>max</sub>=0.58) 濁度上昇が観察された.

一般にミオシンのフィラメント形成や超沈澱現象には Mg<sup>2+</sup> イオンが重要な因子の一つとして関与する (Maruyama and Gergely, 1962a, b). そこで Mg<sup>2+</sup> 濃度変化の超沈澱におよぼす効果を調べた (Fig. 7). 両 AM 共, より高濃度 Mg<sup>2+</sup> (10<sup>-4</sup>-10<sup>-2</sup>) で高い超沈澱 (E<sub>max</sub>) が見られた. とくに蛔虫筋 AM では 10<sup>-3</sup>-10<sup>-2</sup>M Mg<sup>2+</sup> において著しい濁度上昇が認められた. 10<sup>-4</sup>M Mg<sup>2+</sup> 反応液中では両 AM の透明化, すなわち AM はフィラメントを形成しえず, 従つて ATP 添加によつても超

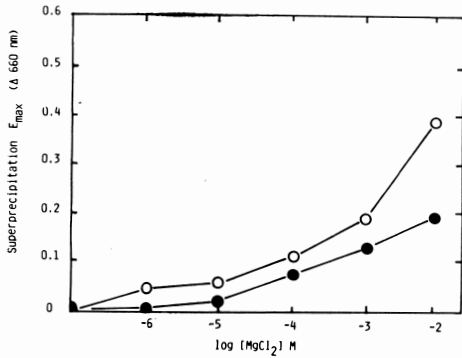


Fig. 7 Effect of  $Mg^{2+}$  concentration on superprecipitation  $E_{max}$  of *Ascaris* and rabbit skeletal actomyosin.

Superprecipitation was measured with  $10\mu M$  (*Ascaris* AM) or  $20\mu M$  (skeletal AM) ATP in  $0.028 M$  KCl containing  $0.5 mM$   $CaCl_2$ ,  $0.15 mg/mg$  of AM (actin: myosin=1:2) and  $20 mM$  Tris-maleate buffer (pH 6.2) at  $25^\circ C$ . O—O, *Ascaris* AM and ●—●, rabbit skeletal AM.

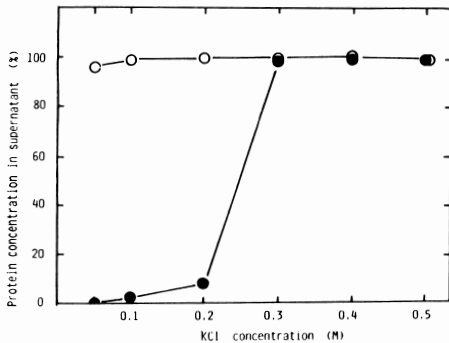


Fig. 8 Solubility of *Ascaris* or rabbit skeletal myosin.

Myosin ( $5 mg/ml$ ) dialyzed against  $5 mM$  K-phosphate buffer (pH 7.0) containing KCl at various concentrations was centrifuged at  $25,000 \times g$  for 30 min. Protein concentration of supernatant was determined by the biuret reaction. Solubility was expressed as percent when the protein concentration of supernatant of  $0.5 M$  KCl solution was 100%. O—O, *Ascaris* myosin; ●—●, rabbit skeletal myosin.

沈澱は観察されなかつた。

## 2. 蛔虫筋ミオシンの物理化学的性質

1) 溶解性: 蛔虫筋 AM は中性 pH 領域では超沈澱を生じなかつた。この現象は蛔虫筋ミオシンが低イオン強度においても、中性 pH ではフィラメントを形成し

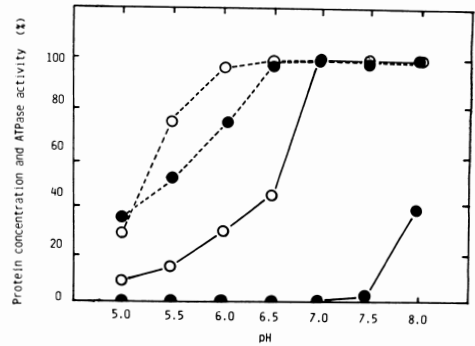


Fig. 9 Dependence on pH of solubility or ATPase activity of *Ascaris* or rabbit skeletal myosin.

Myosin was dialyzed against  $0.05 M$  KCl containing  $5 mM$  K-phosphate buffer (varied pH). Solubility was determined by the same method as described in Fig. 8. Myosin dialyzed against  $0.05 M$  KCl (varied pH) was re-dialyzed against  $0.5 M$  KCl for assay of ATPase activity.  $Ca^{2+}$ -ATPase activity was measured in  $5 mM$   $CaCl_2$  containing  $1 mM$  ATP,  $0.5 M$  KCl and  $20 mM$  histidine buffer (pH 7.6). Relative ATPase activity was expressed as percentage of ATP-splitting by native myosin. O, *Ascaris* myosin; ●, rabbit skeletal myosin; Solid line, solubility; Dotted line,  $Ca^{2+}$ -ATPase activity.

えない事を示唆する。Fig. 8は pH 7.0, 各 KCl 濃度でミオシンを透析後、その  $25,000 \times g$  遠心上清の蛋白量を測定した結果である。骨格筋ミオシンは  $0.3-0.5 M$  KCl においては可溶性を示すが、 $0.2-0.3 M$  KCl で巨大な凝集体(フィラメント)を形成し沈澱するのに対し、蛔虫筋ミオシンは  $0.05-0.5 M$  KCl で可溶性を示した。

次に、低イオン強度下 ( $0.05 M$  KCl), 種々の pH (5.0-8.0) 領域で透析し、Fig. 8と同様に遠心後測定した溶解度と、透析後、全蛋白質を  $0.5 M$  KCl (pH 8) で再透析、可溶化したミオシンの  $Ca^{2+}$ -ATPase 活性の測定結果を Fig. 9に示してある。蛔虫筋ミオシンは pH 6.5-7.0の間でフィラメントを全く形成しなかつた。著明な超沈澱が観察された pH 6.0-6.5でも若干上清に蛋白質が存在するのは不純蛋白成分に由来するものであろう。また、蛔虫筋ミオシン  $Ca^{2+}$ -ATPase 活性について見ると、pH 6.0以下の酸性 pH 領域では、不可逆的な失活を示した。EDTA-ATPase 活性についても同様の傾向が見られた。一方、蛔虫筋ミオシンの失活傾向に比べ、骨格筋ミオシンのそれはやや強く生じ、蛔虫筋ミオシンに若干の耐酸性が認められるようである (Fig. 9)。

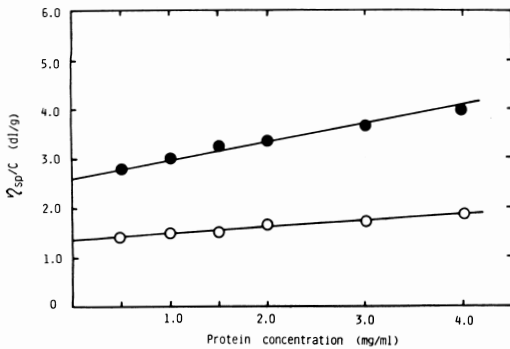


Fig. 10 Concentration dependence on specific viscosity of *Ascaris* or rabbit skeletal myosin. Solvent condition: 0.5M KCl containing 20mM Tris-maleate buffer (pH 7.0). ○—○, *Ascaris* myosin; ●—●, rabbit skeletal myosin.

2) 粘度: 蛔虫筋ミオシンのフィラメント形成の特性をより詳細に知るため, ミオシンモノマーの固有粘度 ( $[\eta]$ ) を求めた。Fig. 10は蛔虫筋および骨格筋ミオシンの, 各蛋白濃度における, 0.5M KCl 存在下 (pH 7.0), モノマー状態での比粘度 ( $\gamma_{sp}/C$ ) をプロットしたものである。両ミオシン共に, 若干の蛋白濃度依存性を示した。外挿法によつて, 蛔虫筋ミオシンに  $[\eta]=1.40(\text{dl/g})$  の値が得られた (Table 2)。この値は骨格筋ミオシンのそれ ( $[\eta]=2.60\text{dl/g}$ ) に比べ著しく小さい。

3) 沈降分析: 低イオン強度下 (pH 7.0) において, 蛔虫筋ミオシンは25,000×gの遠心では沈澱しえなかつた (Figs. 8, 9)。この条件下で, 蛔虫筋ミオシン分子は, モノマーなのか, それともダイマー, テトラマー等のオリゴマー (small aggregate, Hatano and Takahashi, 1971) を形成しているのであろうか。0.5M または0.05 M KCl, pH 7.0の条件下で, 蛔虫筋ミオシンの超遠心

分析を行った。Fig. 11にその沈降像を示した。両 KCl 濃度条件共, 単一のピークが得られた。種々の蛋白濃度における沈降像を解析し, 沈降定数 ( $S_{0, 20, w}$ ) および拡散定数 ( $D_{0, 20, w}$ ) を求め Table 2 に示してある。0.5M KCl 中における S 値と D 値は, それぞれ6.2と1.10, 0.05M KCl 中においては, それぞれ7.5と1.40の値が得られた。それぞれの D 値と S 値とから Woods *et al.* (1963) のウサギ骨格筋ミオシンについての計算式を用いて分子量を算出すると, 0.5M, 0.05M KCl 両条件下共  $54 \times 10^4$  ダルトンの値が得られた (Table 2)。

### 考 察

蛔虫の筋蛋白質については, ミオシン (Yamaguchi *et al.*, 1973a; Nakamura *et al.*, 1975), アクチン (Dedman and Harris, 1975; Nakamura *et al.*, 1979), パラミオシン (Winkelman, 1976) 等が単離され, 他の生物からの筋蛋白質との生化学的検討がなされている。このうちミオシンは, 酵素 (ATPase, EC 3.6.1.3), アクチンとの相互作用 (収縮性蛋白質) および thick-フィラメントの構成能 (構造蛋白質) の複数の機能を担う主要筋構成蛋白質である。そこでこの蛔虫筋ミオシンの分子レベルにおける詳細な検討を行った。

蛔虫筋ミオシンの酵素としての性質は骨格筋ミオシンのそれと類似していた。蛔虫筋ミオシン  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性曲線 (Fig. 2) は, 高塩濃度で低く, 低塩濃度で高い値, いわゆる骨格筋タイプ (Yamaguchi *et al.*, 1970; 山口, 1971) であつた。蛔虫筋ミオシンの  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase 活性の基質親和性も, 骨格筋ミオシンの  $K_m$  値とほぼ同じ値を示し, この事は Langer *et al.* (1972) の知見と一致した。また蛔虫筋ミオシン ATPase 活性中心近傍には, ウサギ骨格筋タイプの, NEM に高い反応性を

Table 2 Molecular characteristics of *Ascaris* myosin at high or low ionic strength

	in 0.5 M KCl	in 0.05 M KCl
Sedimentation coefficient ( $S_{0, 20, w}$ )	$6.2 \times 10^{-13}$	$7.5 \times 10^{-13}$
Diffusion constant ( $D_{0, 20, w}$ )	$1.10 \times 10^{-7}$	$1.40 \times 10^{-7}$
Intrinsic viscosity $[\eta]$	1.4 dl/g	
Molecular weight	540,000	540,000

Sedimentation analysis of myosin was carried out at 60,000 rpm in 0.5 or 0.05 M KCl containing 20 mM Tris-maleate buffer (pH 7.0) and various concentrations of protein at 25°C. Intrinsic viscosity was obtained from Fig. 10. Apparent molecular weight was calculated from sedimentation coefficient and diffusion constant by the method for rabbit skeletal myosin (Woods *et al.*, 1963).

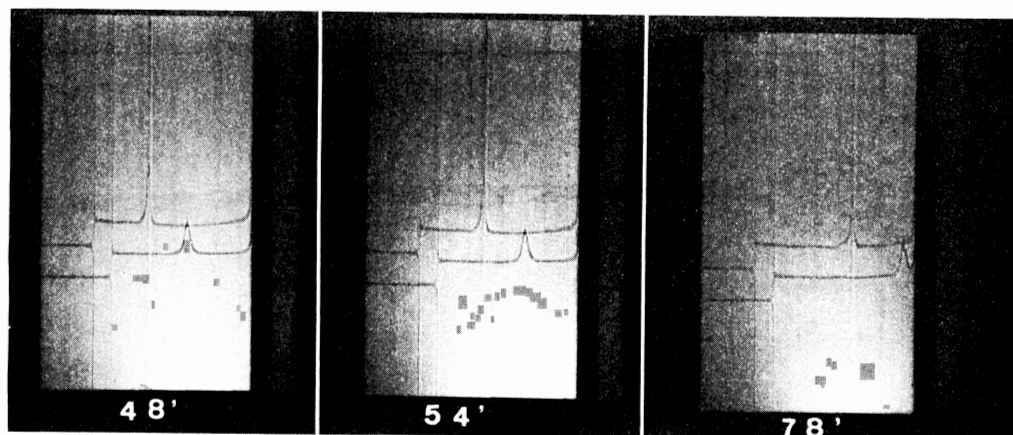


Fig. 11 Sedimentation pattern of *Ascaris* myosin at high or low ionic strength.

Ultracentrifugation was carried out at 60,000rpm at 25°C. protein concentration, 2.5mg/ml. Solvent condition: 20mM Tris-maleate buffer (pH 7.0) containing 0.5 or 0.05M KCl. Time in minutes after reaching maximum velocity was indicated on each photograph. Upper peak, in 0.5M KCl; lower peak, in 0.05M KCl.

示す、少なくとも2種類のSH残基が証明された(Figs. 3, 4). ウサギ骨格筋の場合、ATPase活性中心近傍には、活性発現に必須な、少なくとも2種類の特異的SH残基が存在する。第1はNEM等のSH試薬に最も高い反応性を示し、化学修飾によつて、ミオシンCa<sup>2+</sup>-ATPaseを著しく活性化(EDTAによる活性化を抑制)するSH残基(SH<sub>1</sub>またはS<sub>1</sub>, Sekine *et al.*, 1962; Sekine and Kielley, 1964)であり、第2はミオシン内部に埋没し、ATP-Mg<sup>2+</sup>の存在によつて構造が崩される事によつて反応性を示し、修飾によつてCa<sup>2+</sup>-ATPaseの活性化を抑制するSH残基である(SH<sub>2</sub>またはS<sub>2</sub>, Sekine and Yamaguchi, 1963; Yamaguchi and Sekine, 1966). 一方、脊椎動物平滑筋(Yamaguchi *et al.*, 1970)、軟体動物斜紋筋(Tsuchiya *et al.*, 1978b)や非筋細胞(Hatano and Ohnuma, 1970)からのミオシンには、骨格筋ミオシンSH<sub>1</sub>に相当するSH残基が認められない。今回の実験から、蛔虫筋ミオシンのATPase活性中心近傍には、明らかに骨格筋ミオシンSH<sub>1</sub>およびSH<sub>2</sub>に類似したSH残基の存在が示唆された。しかし、蛔虫筋ミオシンのCa<sup>2+</sup>-ATPase活性化率(約6倍)は骨格筋ミオシンのそれ(約13倍)の約1/2であった(Fig. 3). Yamaguchi *et al.* (1973b)は、アクトミオシン超沈澱に関する実験において、ミオシンSH<sub>1</sub>が収縮速度と関係するであろう事を推定している。蛔虫筋AMの超沈澱速度が骨格筋AMに比べ緩慢であるという性質(Fig. 5)はSH<sub>1</sub>の性質の差に起因するのかもしれない。また、蛔虫筋ミオシンと骨格筋ミオ

シンのATP-Mg<sup>2+</sup>存在下の化学修飾において、Ca<sup>2+</sup>-ATPase活性化抑制の度合い、およびEDTA-ATPase失活曲線に両者若干の違いが認められた(Fig. 4). 蛔虫筋ミオシンのSH<sub>2</sub>は、反応性または高次構造における埋没状態が、骨格筋ミオシンのそれとは若干異つていようである。

蛔虫筋ミオシンのアクチンとの相互作用は、骨格筋ミオシンのそれとは異つた特異性を示した。蛔虫筋ミオシンとウサギ骨格筋F-アクチンとの合成アクトミオシン(AM)系はその超沈澱測定において、骨格筋AMの約1/10-1/20の低濃度ATP添加によつて著明な濁度上昇が惹き起こされた(Fig. 5). この現象は、エネルギー生産効率の低い蛔虫の代謝系(大家, 林, 1976)との相関が示唆される。しかし、この事はAM系試験管内収縮である超沈澱特性からでは想像の域を脱しえない。一方、骨格筋AMではpH 6.2-7.2(Nakamura *et al.*, 1975)の広いpH領域で著明な超沈澱が見られたのに対し、蛔虫筋AMの特徴的な低濃度ATP感受性超沈澱現象は、pH 6.0-6.5のより狭いpH領域でのみ観察された(Fig. 6). しかし、蛔虫筋細胞内の実測pH値が無く、この特性と、生体内におけるミオシンフィラメントの存在状態との関連は不明である。

蛔虫筋AMの超沈澱における試験管内特性はアクトミオシン系のどこに起因しているのか。今回の実験に使用したAMは蛔虫筋ミオシンとウサギ骨格筋F-アクチンとの、いわゆるhibrid AMである。しかし、蛔虫筋AMのこれらの特性は、蛔虫筋天然アクトミオシン

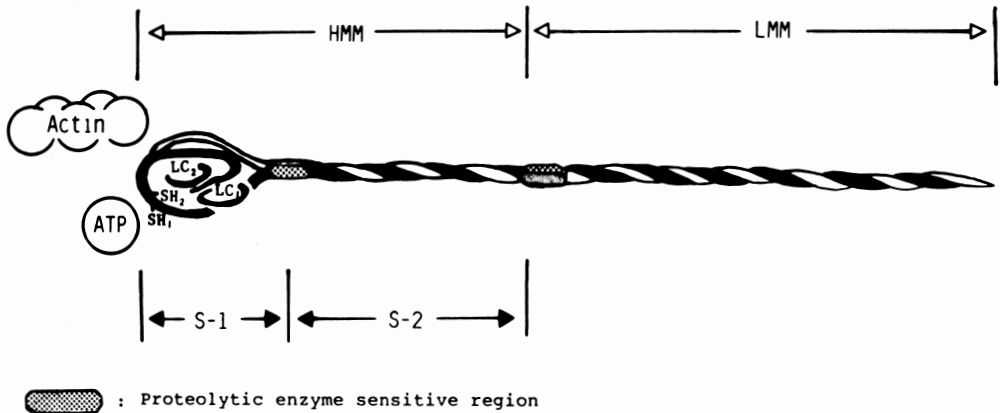


Fig. 12 Model for *Ascaris* myosin molecule.

Abbreviations: HMM, heavy meromyosin; LMM, light meromyosin; S-1, subfragment-1; S-2, subfragment-2; LC<sub>1</sub>, light chain 1; LC<sub>2</sub>, light chain 2. See the text for SH<sub>1</sub> and SH<sub>2</sub>.

(ミオシンB)においても、蛔虫筋より抽出精製したアクチン(Nakamura *et al.*, 1979)との合成AM系においても全く同様に認められた。また種々の異った生物や臓器より得られたアクチンは互いに、アミノ酸組成や一次構造的(Shapiro, 1971; Nakamura *et al.*, 1979; 丸山, 1983)に、またその抗原性(Nishioka *et al.*, 1982, 1983)においても非常によく類似している。従つて、本研究で述べた合成アクトミオシン系の収縮モデルでの特徴は、蛔虫筋ミオシン分子の側の特性に起因するものと考えられる。そこで蛔虫筋ミオシンの分子特性を物理化学的手段を用いて調べた。

蛔虫筋ミオシンは、構造蛋白質としてのフィラメント形成能が骨格筋ミオシンのそれとは異つていた。骨格筋ミオシンは中性pH領域、低塩濃度下で、巨大なフィラメントを形成するにもかかわらず、蛔虫筋ミオシンは同条件下で可溶性を示した(Fig. 8)。また、蛔虫筋ミオシンは、低塩濃度下において、pH 6.0-6.5の限定されたpH領域でフィラメントを形成し得る事(pH 6以下ではATPase失活)がわかつた(Fig. 9)。この事から、蛔虫筋AMの超沈澱現象の特異的なpH依存性が説明される。しかし、Hatano and Takahashi (1971)は粘菌(myxomycete plasmodium)のミオシンがその生理的塩濃度(0.03M KCl)下において可溶性を示すが、それはsmall aggregatesの状態にある事を報告している。そこで蛔虫筋ミオシンの高塩濃度および低塩濃度下、中性pH(7.0)における分子の状態を調べた。蛔虫筋ミオシンモノマー(0.5M KCl)の沈降定数は約6Sの値が得られ、ウサギ骨格筋(Woods *et al.*, 1963)、

ウマ食道平滑筋(Yamaguchi *et al.*, 1970)、ウサギ子宮平滑筋(Wachsberger and Kaldor, 1971)等からのミオシンモノマーの値と一致する。しかし、蛔虫筋ミオシンモノマーの粘度を測定すると、 $[\eta]=1.40\text{dl/g}$ の値が得られ(Fig. 10, Table 2)、骨格筋ミオシン $[\eta]=2.60\text{dl/g}$ に比べ極端に低く、Hatano and Ohnuma (1970)による粘菌ミオシン( $[\eta]=1.60\text{dl/g}$ )に近いものだつた。これらの事から、蛔虫筋ミオシン分子は、骨格筋ミオシンに類似した分子形をもつ、しかし、骨格筋ミオシン分子に比べ、軸比が小さいか、またはより柔軟な構造をもつと想像される。低塩濃度(0.05M KCl, pH 7.0)下における沈降分析では、骨格筋ミオシンが巨大凝集体を形成し、本条件では測定不能であるのに対し、蛔虫筋ミオシンには単一なピークが見られ(Fig. 11)、7.5Sの沈降定数が得られた(Table 2)。測定した $S_{0, 20, w}$ と $D_{0, 20, w}$ から蛔虫筋ミオシンの分子量を算出すると、0.5Mおよび0.05M KCl中、共に $54 \times 10^4$ ダルトンの値が得られた。すなわち、蛔虫筋ミオシンは低塩濃度中にあつても、中性pH領域ではモノマーの状態で存在する。従つて、蛔虫筋AM系に見られた試験管内収縮は、この様なミオシン自身の分子特性に起因しているものと推定される。

そこで、蛔虫筋ミオシンの分子構造がウサギ骨格筋ミオシンのそれと類似した形態(Woods *et al.*, 1963)をもつと仮定し、今迄に得られた蛔虫筋ミオシンの諸性質を考慮して、その分子構造を推定した(Fig. 12)。すなわち、蛔虫筋ミオシンは2本の主鎖(約 $20 \times 10^4$ ダルトン)と、それぞれに2種類の軽鎖LC<sub>1</sub>, LC<sub>2</sub>, それぞれ



1.8×10<sup>4</sup>, 1.6×10<sup>4</sup> ダルトン) から構成される (Nakamura *et al.*, 1975; Srihari *et al.*, 1981). 頭部 (S-1) に存在する ATPase 活性中心, またはその近傍の構造には骨格筋タイプの SH 残基 (SH<sub>1</sub> および SH<sub>2</sub>) をもつであろう. フィラメント形成の役割を担う棒状部分 (LMM および S-2) は骨格筋ミオシンのそれに比べより柔軟な構造をもち, 低イオン強度下, 限定された pH 領域においてのみフィラメントを形成しうる. そして, この様な分子特性をもった蛔虫筋ミオシン-フィラメントとアクチン-フィラメントとのアクトミオシン系は, Mg<sup>2+</sup> 存在下, 極く低濃度の ATP 添加によつて, 独特の試験管内収縮 (超沈澱) を惹き起すのであろう. 以上の仮説は, アクトミオシン系のみにおける, 最も単純な筋収縮モデルを述べたものである. ミオシンのもつ分子特性の, 蛔虫生体内収縮機構に果たす生理的役割の解明には, 神経系や収縮制御系との関連をも含め, より詳細な研究が必要であろう.

### 要 約

蛔虫体壁斜紋筋 (蛔虫筋) ミオシンについて, その生化学的性質をウサギ骨格筋 (骨格筋) ミオシンと比較した.

I. 蛔虫筋ミオシンの酵素化学的性質を調べ以下の結果を得た.

1) ATPase 活性および基質との親和性 (K<sub>m</sub>) は骨格筋ミオシンタイプであつた.

2) その ATPase 活性中心近傍には, 骨格筋ミオシンと同様, 活性発現に必須な, 反応性の高い, 少なくとも 2 種類の特異的 SH 残基が存在した.

3) F-アクチンとの合成アクトミオシン (AM) 系において, 蛔虫筋独特の性質が観察された. すなわち, 骨格筋 AM では, pH 6.2-7.2 にわたつて超沈澱が見られるのに対し, 蛔虫筋 AM は, より狭く限定された pH 領域 (6-6.5) において, 骨格筋 AM の 1/20-1/10 の低 ATP 濃度で著明な濁度上昇 (超沈澱) を示した.

II. 蛔虫筋ミオシンの物理化学的性質を調べ, 以下の結果を得た.

1) 高 KCl 濃度中, モノマー状態において, 骨格筋ミオシンと類似した分子形をもつが, より柔軟な構造であると考えられた.

2) 低 KCl 濃度中, 中性 pH では可溶性, かつモノマー状態で存在し, フィラメントを形成し得ず, 従つて収縮, すなわち超沈澱を生じえない.

III. 以上の結果から, 蛔虫筋の収縮特性は, 最も単純

な収縮モデルであるアクトミオシン系で見限り, ミオシンの側の分子特性に起因していると考えられた.

稿を終るにあたり, 懇切な御指導, 御校閲を賜りました北里大学柳沢十四男教授, 順天堂大学山口正弘助教授・関根隆光教授に深謝致します.

### 文 献

- 1) Dedman, J. R. and Harris, B. G. (1975): *Ascaris suum* actin: properties and similarities to rabbit actin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 65, 170-175.
- 2) Ebashi, S. (1961): Calcium binding activity of vesicular-relaxing factor. *J. Biochem.*, 50, 236-244.
- 3) Epstein, H. F., Waterston, R. H. and Brenner, S. (1974): A mutant affecting the heavy chain of myosin in *Caenorhabditis elegans*. *J. Mol. Biol.*, 90, 291-300.
- 4) Fiske, C. H. and SubbaRow, Y. (1925): The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.*, 66, 375-400.
- 5) Hatano, S. and Ohnuma, J. (1970): Purification and characterization of myosin A from myxomycete plasmodium. *Biochim. Biophys. Acta*, 205, 110-120.
- 6) Hatano, S. and Takahashi, K. (1971): Structure of myosin A from the myxomycete plasmodium and its aggregation at low salt concentrations. *Mechanochem. Cell Motility*, 1, 7-14.
- 7) Kielley, W. W. and Harrington, W. F. (1960): A model for the myosin molecule. *Biochim. Biophys. Acta*, 41, 401-421.
- 8) Kielley, W. W. and Bradley, L. B. (1965): The relationship between sulfhydryl groups and the activation of myosin adenosinetriphosphatase. *J. Biol. Chem.*, 218, 653-659.
- 9) Konno, K. (1978): The calcium regulation systems in squid (*Ommastrephes sloani pacificus*) muscle: Preparation of calcium sensitive myosin and tropomyosin. *J. Biochem.*, 84, 1431-1440.
- 10) Langer, B. W., Jr., Smith, W. J. and Theodorides, V. J. (1972): Nematode metabolism: The adenosine triphosphatase of *Ascaris suum* muscle. *Biochem. J.*, 128, 991-992.
- 11) Lineweaver, H. and Burk, D. (1934): Determination of enzyme dissociation constants. *J. Amer. Chem. Soc.*, 56, 658-666.
- 12) Maruyama, K. and Gergely, J. (1962a): Interaction of actomyosin with adenosine triphosphate at low ionic strength. I. Dissocia-

- tion of actomyosin during the clear phase. J. Biol. Chem., 237, 1095-1099.
- 13) Maruyama, K. and Gergely, J. (1962b) : Interaction of actomyosin with adenosine triphosphatase at low ion strength. II. Factors influencing clearing and superprecipitation : Adenosine triphosphatase and birefringence of flow studies. J. Biol. Chem., 237, 1100-1106.
  - 14) 丸山工作 (1983) : 収縮性蛋白質の進化. 蛋白質・核酸・酵素, 28, 351-359.
  - 15) Mommaerts, W. F. H. M. (1952) : The molecular transformation of actin I Globular actin. J. Biol. Chem., 198, 445-457.
  - 16) Nakamura, T., Yanagisawa, T. and Yamaguchi, M. (1975) : Studies on the subunits of myosin from muscle layer of *Ascaris lumbricoides suum*. Biochim. Biophys. Acta, 412, 229-240.
  - 17) 中村 健・山口正弘・海山初代・柳沢十四男 (1976) : 蛔虫の筋構造蛋白質. 寄生虫誌, 25(1. 補), 15.
  - 18) Nakamura, T., Yamaguchi, M. and Yanagisawa, T. (1979) : Comparative studies on actins from various sources: Fragments of actins from *Ascaris* muscle cleaved at cysteinyl residues in comparison with other actins. J. Biochem., 85, 627-631.
  - 19) Nishioka, M., Kobayashi, K., Uchida, M. and Nakamura, T. (1982) : A binding activity of actins with human clq. Biochem. Biophys. Res. Commun., 108, 1307-1312.
  - 20) Nishioka, M., Watanabe, S., Kobayashi, K. and Nakamura, T. (1983) : Rabbit autoantibodies to actin induced by immunization with heterologous actins; a possible mechanism of smooth muscle antibody production. Clin. exp. Immunol., 53, 159-164.
  - 21) Nonomura, Y. (1968) : Myofilaments in smooth muscle of guinea pig's taenia coli. J. Cell Biol., 39, 741-745.
  - 22) 野々村禎昭 (1983) : 平滑筋の収縮制御. 蛋白質・核酸・酵素, 28, 340-350.
  - 23) 大家 裕・林 久子 (1976) : 寄生適応よりみた回虫のエネルギー代謝. 生体の科学, 27, 202-414.
  - 24) 大家 裕 (1980) : 寄生動物の低酸素圧環境への適応. 日医雑誌, 84, 180-191.
  - 25) 大日方昂 (1983) : 筋肉の分化. 科学, 53, 689-695.
  - 26) Rosenbluth, J. (1965a) : Ultrastructural organization of obliquely striated muscle fibers in *Ascaris lumbricoides*. J. Cell Biol., 25, 495-515.
  - 27) Rosenbluth, J. (1965b) : Ultrastructure of somatic muscle cell in *Ascaris lumbricoides* II. Intermuscular junctions, neuromuscular junctions, and glycogen stores. J. Cell Biol., 26, 579-591.
  - 28) Sekine, T., Barnett, L. M. and Kielley, W. W. (1962) : The active site of myosin adenosine triphosphatase I. Localization of one of the sulfhydryl groups. J. Biol. Chem., 237, 2769-2772.
  - 29) Sekine, T. and Yamaguchi, M. (1963) : Effect of ATP on binding of N-ethylmaleimide to SH groups in active site of myosin ATPase. J. Biochem., 54, 196-198.
  - 30) Sekine, T. and Kielley, W. W. (1964) : The enzymic properties of N-ethylmaleimide modified myosin. Biochim. Biophys. Acta, 81, 336-345.
  - 31) Shapiro, H. M. (1971) : A multivariate statistical method for comparing protein amino acid composition: Studies of muscle actins and proteins derived from membranes and microtubular organelles. Biochim. Biophys. Acta, 236, 725-738.
  - 32) Small, P. A., Harrington, W. F. and Kielley, W. W. (1961) : The electrophoretic homogeneity of myosin subunits. Biochim. Biophys. Acta, 49, 462-470.
  - 33) Spudich, R. J. and Watt, S. (1971) : The regulation of rabbit skeletal muscle contraction I. Biochemical studies of the interaction of tropomyosin-troponin complex with actin and the proteolytic fragments of myosin. J. Biol. Chem., 246, 4866-4871.
  - 34) Srihari, T., Wiehrer, W., Pette, D. and Harris, B. G. (1981) : Electrophoretic analyses of myofibrillar proteins from the body wall muscle of *Ascaris suum*. Mol. Biochem. Parasitol., 3, 71-82.
  - 35) Štefl, B. and Kubištová, J. (1972) : Low actomyosin content in the body-wall muscle of *Ascaris lumbricoides*. Physiol. Bohemoslov., 21, 261-263.
  - 36) Tregear, R. T. and Squire, J. M. (1973) : Myosin content and filament structure in smooth and striated muscle. J. Mol. Biol., 77, 297-290.
  - 37) Tsuchiya, T., Kaneko, T. and Matsumoto, J. J. (1978a) : Calcium sensitivity of mantle muscle of squid. J. Biochem., 83, 1191-1193.
  - 38) Tsuchiya, T., Yamada, N. and Matsumoto, J. J. (1978b) : Physico-chemical properties of squid myosin. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish., 44, 181-184.

- 39) Wachsberger, P. and Kaldor, G. (1971) : Studies on uterine myosin and actomyosin. Arch. Biochem. Biophys., 143, 127-137.
- 40) Weber, A. and Murray, J. M. (1973) : Molecular control mechanisms in muscle contraction. Physiol. Rev., 53, 612-673.
- 41) Weichselbaum, T. E. (1946) : An accurate and rapid method for the determination of proteins in small amounts of blood serum and plasma. Am. J. Clin. Pathol. Tech. Sect., 10, 40-49.
- 42) Winkelman, L. (1976) : Comparative studies of paramyosin. Comp. Biochem. Biophys., 55B, 391-397.
- 43) Woods, E. F., Himmelfarb, S. and Harrington W. F. (1963) : Studies on the structure of myosin in solution. J. Biol. Chem., 238, 2374-2385.
- 44) Yamaguchi, M. and Sekine, T. (1966) : Sulfhydryl groups involved in the active site of myosin adenosine triphosphatase. J. Biochem., 59, 24-33.
- 45) Yamaguchi, M., Miyazaya, T. and Sekine, T. (1970) : Preparation and properties of smooth muscle myosin from horse esophagus. Biochim. Biophys. Acta, 216, 411-421.
- 46) 山口正弘 (1971) : ミオシンの比較生化学 ; 平滑筋ミオシンと骨格筋ミオシン. 生化学, 43, 185-196.
- 47) Yamaguchi, M., Nakamura, T., Oya, H. and Sekine, T. (1973a) : Preparation of myosin A from body wall musculature of *Ascaris lumbricoides*. Biochim. Biophys. Acta, 317, 312-315.
- 48) Yamaguchi, M., Nakamura, T. and Sekine, T. (1973b) : Studies on the fast reacting sulfhydryl group of skeletal myosin A : Conversion to smooth muscle myosin type with N-ethylmaleimide treatment. Biochim. Biophys. Acta, 328, 154-165.

Abstract

ENZYMIC AND PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES OF MYOSIN  
FROM BODY WALL, OBLIQUELY STRIATED MUSCLE  
OF *ASCARIS SUUM*

TAKESHI NAKAMURA

(Department of Parasitology, School of Medicine, Kitasato  
University, Sagami-hara, Kanagawa 228, Japan)

The enzymic properties of *Ascaris* myosin (myosin A from body wall, obliquely striated muscle of *Ascaris suum*) were investigated. *Ascaris* myosin was found to have the characteristics like enzymic properties of skeletal myosin (myosin A from rabbit skeletal muscle) in relation to the ATP-splitting activity, affinity with substrate (Km) and reaction of sulfhydryl residues involved in the active site with *N*-ethylmaleimide. However, superprecipitation of *Ascaris* actomyosin reconstituted with rabbit skeletal F-actin was observed only in the range of pH from 6.0 to 6.5 (skeletal actomyosin, pH from 6.2 to 7.2) when ATP was added at such low concentrations as about 1/20 to 1/10 of that added in case of skeletal actomyosin. This is one of the characteristics of *Ascaris* myosin.

The physicochemical properties of *Ascaris* myosin were determined by the viscometry and analytical ultracentrifugation. The molecular characteristics of *Ascaris* myosin in 0.5 M KCl at pH 7.0 were compared with those of skeletal myosin. The sedimentation coefficient ( $S_{0, 20, w}$ ) was 6.2S which was of the same order as that of skeletal myosin. However, the intrinsic viscosity ( $[\eta] = 1.4 \text{ dl/g}$ ) was only half of that of skeletal myosin ( $[\eta] = 2.6 \text{ dl/g}$ ). *Ascaris* myosin was completely soluble in low salt concentration at neutral pH. In 0.05M KCl at pH 7.0, *Ascaris* myosin could not form the aggregates or filaments and was suggested to be in the state of monomer with the sedimentation coefficients of 7.5S and the diffusion constants ( $D_{0, 20, w}$ ) of  $1.40 \times 10^{-7}$ .

These results obtained may suggest that the contractile characteristics of *Ascaris* muscle are due to the distinctive feature of myosin side of actomyosin system which is the most simple model of the muscular contraction.