



新リン酸定量法(Ohnishi法)によるミオシンATPase 活性の測定

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 北海道教育大学 公開日: 2012-11-07 キーワード: 作成者: 浅川, 哲弥, 上田, 敦子 メールアドレス: 所属:
URL	https://doi.org/10.32150/00002783

新リン酸定量法 (Ohnishi 法) によるミオシン ATPase 活性の測定

浅川 哲弥・上田 敦子
北海道教育大学旭川分校化学教室

Application to Myosin ATPase Activity Measurement of New Inorganic Phosphate Assay Method by Ohnishi et al

Tetsuya ASAKAWA and Atsuko UEDA
Chemistry Laboratory, Asahikawa College, Hokkaido University of Education,
Asahikawa 070

Abstract

The new method for inorganic phosphate determination reported by Ohnishi et al is advantageous for measuring myosin ATPase activity.

The most important advantage of this method is that the protein is soluble in their solution so that the deproteinization step is unnecessary.

However, in order to measure myosin ATPase activity by this method, there remain several conditions which should be carefully checked. In this paper, we established these conditions by comparing the Ohnishi method with the Fiske-SubbaRow method.

The following results were obtained.

- 1) The time dependent color change of C solution using the Ohnishi method did not affect the slope of Pi standard curve.
- 2) A Precise waiting time was not necessary.
- 3) The color development of molybdate blue by this method showed a stable plateau from 8 to 16 minutes. From these results, we settled on 15 minutes for the color development.
- 4) The sensitivity of the Ohnishi method was 1.6 times higher than that of the Fiske-SubbaRow method.
- 5) The rate of the nonenzymatic decomposition of ATP by the reagents of the Ohnishi method was slower than that of the Fiske-SubbaRow method.
- 6) Although the intensity of molybdate blue by the Ohnishi method was affected by various reagents, the linearity of the Pi standard curve was maintained. Consequently, we had to determine the Pi standard curve for each condition.

7) The rates of myosin ATPase reaction which were determined by the Ohnishi method were similar to those by the Fiske-SubbaRow method.

From these results, it may be concluded that the inorganic phosphate determination method reported by Ohnishi et al is applicable to measure the myosin ATPase activity.

ミオシン ATPase 活性の測定方法には、ATPase 反応において放出される H^+ やリン酸などを定量する方法があるが、現在、これらの中で、最も多く用いられている方法は、放出されるリン酸の定量による方法である。

リン酸の定量には、主に 3 種の方法が用いられている。

- 1) リンモリブデン酸錯体の還元により生じるリンモリブデンブルーの比色定量。
- 2) リンバナドモリブデン酸錯体の黄色の比色定量。
- 3) $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP を基質として、生成するリン酸 (^{32}Pi) の定量。

これらの方法の主なものを、表 1 に示した。

^{32}P の定量は、高感度を持ち、酵素が微量でも測定ができるなどの利点の為、最近、その利用が増えており、定量法にも改良が加えられている。しかし、一般に最も多く用いられているリン酸定量法は、Fiske-SubbaRow 法²⁾に代表される、リンモリブデンブルーの比色量である。この Fiske-SubbaRow 法は、極めて有用な方法であるが欠点も少なくない。そこで、表 1 に示された様に、多くの研究者が、(1) 発色を支配する要因としての酸度、温度、発色時間、(2) 発色の安定性と感度の増大、(3) 発色阻害物質の種類とその対策、(4) 共存する不安定リン酸化合物 (ATP、クレアチンリン酸など) の分解、などの問題点について検討を加え、様々な改良法が発表されている。(表 1)

これらの従来のリン酸定量による ATPase 活性測定法は、総じて酵素反応を酸で終止し、除タンパク質操作を行ない、リンモリブデン酸錯体を形成後、還元剤を加え発色させるという一連の操作からなる。Martin-Doty 法¹⁾ などでは、さらに有機溶媒によるリンモリブデン酸錯体の抽出操作が加わる。従って、操作が複雑であり熟練が必要である。この複雑な操作を単純化する試みは、Dulley²⁾、Lin & Morales²⁶⁾ らによって行なわれた。彼らの方法は酵素反応を SDS の添加によって終止し、同時にタンパク質を可溶化し、除タンパク質操作を省くというものであった。しかし、SDS は、0.1~0.2 M 以上の濃度の一価陽イオン (K^+ 、 Na^+ など) が存在する場合、それらと錯体を形成し、沈殿を生じる。その場合、除タンパク質操作に代って除沈殿操作を必要とする²⁶⁾。従って、低イオン強度で行なわれるアクトミオシン ATPase 反応の測定には利用できるが、高イオン強度でのミオシン ATPase 反応ではその利点を生かす事ができない。

Ohnishi らは、1975 年、除タンパク質操作を必要とせず、有機溶媒による抽出操作を行わずとも、高感度の測定が行なえる新リン酸定量法を発表し²³⁾ 最近、更にその方法を詳しく検討している²⁷⁾。その中で、彼らは、検量線の直線性、測定用の試薬の最適濃度の決定、EDTA の発色阻害に対する対策、クレアチンリン酸の分解をおさえる条件の決定、阻害剤 (シュウ酸ナトリウム、クエン酸ナトリウム、酒石酸ナトリウム) の阻害の様子などについて調べ、試薬濃度の異なる標準法と高感度法を挙げている。

しかし、ミオシン ATPase 反応に用いられる試薬類については全く検討されていないため、この報告では、彼らの高感度法を基に、この方法をミオシン ATPase 反応の活性測定に応用する為に Fiske-SubbaRow 法を対照に用いて、必要とされる検討を行なった。

表1 主なリン酸定量法

略号: PCA : 過塩素酸
 TCA : トリクロル酢酸
 PMB : リンモリブデンブルー法
 PVM : リンバナドモリブデン酸錯体法
 ANSA : 1-アミノ-2-ナフトール-4-スルホン酸

文献 (年)	反応終止	分離操作	定量法 (還元剤)
Bell-Doisy (1920) ¹⁾			PMB (ヒドロキノン)
Fiske-SubbaRow (1925) ²⁾	H ₂ SO ₄		PMB (ANSA)
Kuttner-Cohen (1927) ³⁾	H ₂ SO ₄		PMB (SnCl ₂)
Youngburg-Youngburg (1930) ⁴⁾	H ₂ SO ₄		PMB (SnCl ₂)
King (1932) ⁵⁾	HClO ₄		PMB (ANSA)
Berenblum-Chain (1938) ⁶⁾		イソブタノール抽出	PMB (SnCl ₂)
Allen (1940) ⁷⁾	HClO ₄		PMB (アミドール)
Gomori (1942) ⁸⁾	H ₂ SO ₄		PMB (エロン)
Koenig (1942) ⁹⁾	PCA		PVM
Lowry-Lopez (1942) ¹⁰⁾	酢酸 pH4.0		PMB (アスコルビン酸)
Martin-Doty (1949) ¹¹⁾		ベンゼン, イソブタノール抽出	PMB (SnCl ₂)
Takahashi (1955) ¹²⁾	TCA	イソブタノール抽出	PMB (アスコルビン酸)
Benjaminsen (1956) ¹³⁾	PCA		PVM
Wallach-Kamat (1966) ¹⁴⁾	TCA		PMB (ANSA)
Chignell (1966) ¹⁵⁾		イソブタノール抽出	³² P
Lecocq-Inesi (1966) ¹⁶⁾	PCA		PVM
Post-Sen (1967) ¹⁷⁾	PCA	酢酸ブチル抽出	PMB (ANSA)
Baginski (1967) ¹⁸⁾	TCA		PMB (アスコルビン酸)
Ueda-Wada (1970) ¹⁹⁾	TCA	クロロホルム抽出	PVM
Roufgails (1971) ²⁰⁾	PCA シリコタンゲステン酸		PMB (ANSA)
Dulley (1975) ²¹⁾	SDS		PMB (ANSA)
Bais (1975) ²²⁾	PCA	活性炭吸着	³² P
Ohnishi (1975) ²³⁾	H ₂ SO ₄		PMB (塩酸ヒドロキシルアミン)
Cassel (1975) ²⁴⁾	SDS	活性炭吸着	³² P
Le Deaut (1976) ²⁵⁾	TCA		PMB (ヒドロキノン)
Lin-Morales (1977) ²⁶⁾	SDS		PVM
Ohnishi (1978) ²⁷⁾	H ₂ SO ₄		PMB (塩酸ヒドロキシルアミン)
Seals (1978) ²⁸⁾	SDS	キシレン・イソブタノール抽出	³² P

試薬及び実験方法

[1] Fiske-SubbaRow 法

原理: TCA によりタンパク質を変性させて反応を終止させ, 除タンパク質操作を行なった後, 酸性条件下で, リンモリブデン酸錯体を作り, ANSA によってそれを還元し, 発色するリンモリブデンブルーを比色定量する。

- 試薬: 1) TCA 溶液: 10% TCA
 2) モリブデン酸アンモニウム溶液
 : 0.75% モリブデン酸アンモニウム

1.5 N 硫酸

3) ANSA 溶液

: ANSA 0.2 g, 亜硫酸ナトリウム 1.2 g, 亜硫酸ナトリウム 1.2 g を乳鉢で混合後, 0.25 g ずつ分包し, その 1 包を 10 ml の水に溶解して ANSA 溶液とする. この溶液は, 冷暗所に保存すると約 2 週間還元力を保持する.

操作: 試験管に TCA 溶液を 1 ml ずつ取っておく. 反応混液にミオシンを加え, 反応を開始した後, 一定時間間隔で反応液を 2 ml ずつ取り, TCA の入った試験管に加え反応を終止させる. 生じた変性タンパク質の沈殿を, 東洋濾紙 No. 5 A, $\phi=5.5$ cm で除き, 濾液より 2 ml を取ってモリブデン酸アンモニウム液 1 ml と混合する. これに ANSA 溶液 0.1 ml を添加し, 10 分後, 660 nm の波長で吸光度を測定する. 操作は室温で行なう.

[2] Ohnishi 法

原理: 硫酸酸性下 (pH 約 2) で酵素を変性させて ATPase 反応を止め, 同時に PVP の触媒作用によってリンモリブデン酸錯体を生成させる. 次に水酸化ナトリウム溶液 (発色剤) を加える事によって, アルカリ性で還元剤として作用する塩酸ヒドロキシルアミンを活性化し, リンモリブデンブルーを発色させると同時に, 変性タンパク質を可溶化させる. なおアルカリ性では, リンモリブデン酸錯体は形成されないので, 発色剤添加後に ATP が分解しても, そのリン酸は測定にかからない.

- 試薬: 1) A液 : 4.4%モリブデン酸アンモニウム,
13.3 mM Na_2EDTA
NaOH で pH を 6.5 に調製.
2) B液 : 300 mM 塩酸ヒドロキシルアミン
240 mM 硫酸
8%PVP (ポリビニルピロリドン)
3) 発色剤: 1.73 M水酸化ナトリウム

操作: 同体積の A 及び B 液を混合し C 液を調製する. 反応混液にミオシンを加え ATPase 反応を開始した後, 一定時間間隔で反応液 1 ml を取り, C 液 1 ml の入った試験管に加えて反応を終止させる. 発色剤 0.5 ml を加えて 15 分後に 720 nm の波長で吸光度を測定する. 操作は室温で行なう. なお, 試薬の濃度に関して, 原法を少し修正した.

ミオシンは, ホタテ貝閉殻筋より, 浅川, 矢沢, 東の方法²⁹⁾により調製した. 濃度はビウレット法³⁰⁾で求めた.

試薬類としては, 塩酸, 尿素, エチルアルコール, n-ブチルアルコールが和光特級, PVP が半井一級, 硫酸アンモニウム, SDS が半井特製試薬, それ以外は, 半井特級を用いた.

実験結果及び考察

Ohnishi 法試薬 (C 液) 調製後の時間の経過と測定値.

Ohnishi 法における C 液 (A 液と B 液を等量ずつ混合して調製) は調製直後は, 黄色透明な液であるが, 室温で放置しておくと, 時間経過とともに, 緑色となり, 1 日をすぎると暗緑色となった.

このC液の呈色の時間変化はきわだっているが、原法ではあまりふれていない。そこで、このC液の呈色の時間変化が、Ohnishi法の発色に影響するか否かを調べる為、リン酸の検量線をC液調整後、経時的に求め、 10^{-4} Mリン酸あたりの吸光度の変化量 (ΔA) を求めた、図1に示した様に、C液調整直後では、 $\Delta A = 0.257$ であったが、調整後1,2時間のうちに、 ΔA がわずかに減少し、その後2日ほどは一定であった。従って、C液の時間経過による呈色は、検量線の傾きにほとんど影響しない事がわかった。しかし図1に示される様に、定濃度のリン酸の実測値は、C液調整後の時間経過とともに、上昇した為、C液の時間経過による呈色は、実測値の上昇と相関すると考えられる。

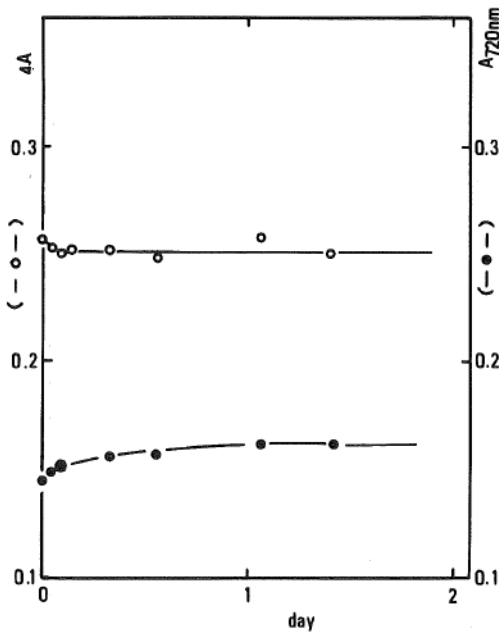


図1 C液調整後の ΔA 及び A_{720nm} の時間変化
 ○： ΔA (10^{-4} Mリン酸あたりの検量線の傾き)
 ●： A_{720nm} (4×10^{-5} Mリン酸の実測値)
 待ち時間2分，発色時間15分

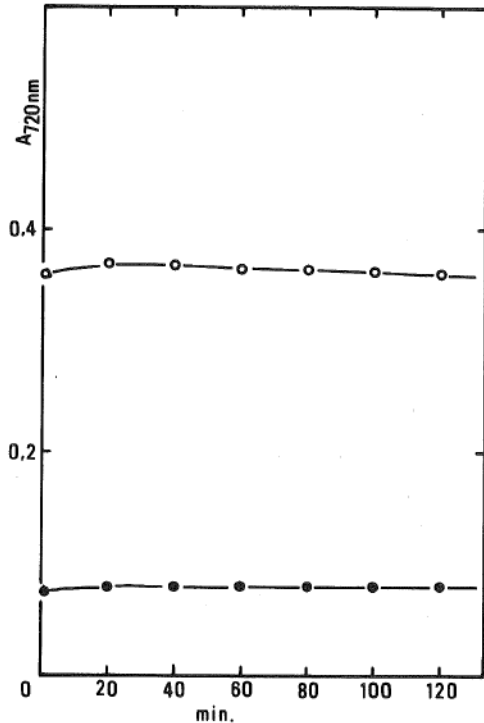


図2 発色と待ち時間の関係
 ○： 10^{-4} Mリン酸の実測値
 ●： 10^{-5} Mリン酸の実測値
 発色時間15分

Ohnishi法における待ち時間と発色

反応液とC液の混合によってリンモリブデン酸錯体の形成がおこるが、その為の待ち時間が必要である。原法では、Kit法で2分間、LAP法で30秒間である²³⁾。しかし、ある程度多数のATPase反応を同時に測定する場合、待ち時間がこの様に短いと非常に不便である。そこで待ち時間を変えて、 10^{-5} Mと 10^{-4} Mリン酸の吸光度を測定した。図2に示された様に、吸光度は、待ち時間が120分以内であれば、一定であった。即ち、リンモリブデン酸錯体の生成は、直ちにおこり、その錯体は少なくとも120分間は安定に存在した。そこで、厳密な待ち時間の設定は行なわなかった。

発色の時間変化

Ohnishi 法及び Fiske-SubbaRow 法における、発色剤又は還元剤添加後のリンモリデンブルーの発色の時間変化を調べた。図 3 に示された様に、Ohnishi 法の場合、 10^{-4} M リン酸の発色は、発色剤添加後 6 分までは急速に増大し、8-16 分の安定なプラトーの後、わずかずつ吸光度が減少していった。さらに半日を経ると吸光度は最高時の半分近くまで減少した。より低濃度 (10^{-5} M) のリン酸では、早くプラトーに達し、安定な呈色を示す時間が長かった。以上の結果から、発色剤添加後 15 分を測定時刻と定めた。Fiske-SubbaRow 法では、還元剤添加後、20 分までは吸光度が増大し、その後 100 分までは一定であった。

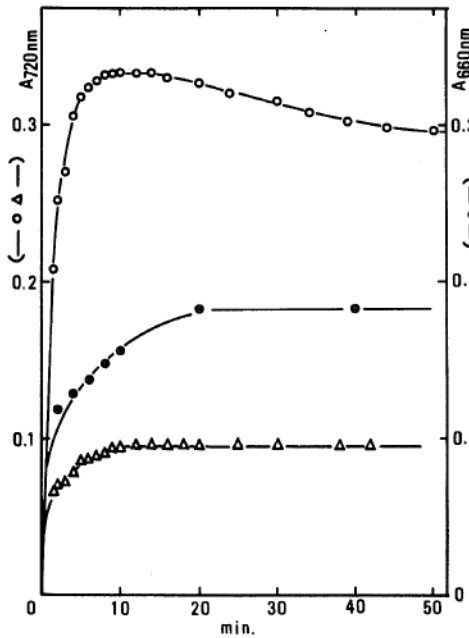


図 3 発色の時間変化
 ○ : 10^{-4} M リン酸の実測値 (Ohnishi 法)
 △ : 10^{-5} M リン酸の実測値 (Ohnishi 法)
 ● : 10^{-4} M リン酸の実測値 (Fiske-SubbaRow 法)

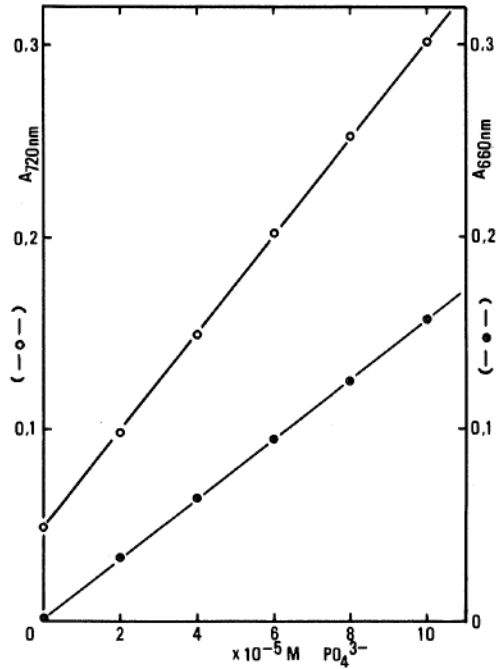


図 4 リン酸の検量線
 ○ : Ohnishi 法
 ● : Fiske-SubbaRow 法

リン酸の検量線

図 4 に、Ohnishi 法と Fiske-SubbaRow 法のリン酸 ($0-10^{-4}$ M) の検量線を示した。両方とも、直線性を示した。 10^{-4} M リン酸あたりの吸光度 (ΔA) は Ohnishi 法で、 $\Delta A_{720} = 0.252$ であり、Fiske-SubbaRow 法では $\Delta A_{660} = 0.155$ であった。Ohnishi 法の方が 1.6 倍ほど感度が良かった。

ATP の非酵素的分解

実際の ATPase 活性の測定では、反応液中に未分解の基質、ATP を含んでいる。この ATP は酸、モリブデン酸塩及び高温によって加水分解される為、リン酸定量用の試薬類により非酵素的に分

解される。この為、ミオシン Mg-ATPase などの低活性の酵素反応を長時間 (30~60 分) 行なって反応速度を求めようとする時、反応初期の測定点は、酵素反応により生じたリン酸以外に、試薬類によって非酵素的に分解されたリン酸を含むため誤差を生む要因となる。そこで、リン酸定量用の試薬による ATP の非酵素的分解の速度を調べておく事は重要である。Fiske-SubbaRow 法では、反応終止段階の TCA 存在下と、発色前の TCA とモリブデン酸アンモニウム存在下の 2 状態で、Ohnishi 法では、発色剤添加前の状態で、 1 mM ATP の非酵素的分解速度の温度依存性を調べた。図 5 に示される様に、Ohnishi 法は、室温において、Fiske-SubbaRow 法の TCA+モリブデン酸アンモニウム存在下より、ATP の分解速度がおそかったが、TCA 存在下よりは速かった。又、ATP の非酵素的分解速度は温度に依存し、 0°C では、 10^{-7} MPi/min 以下であったが、 30°C では、10 倍近くに増加した。この事から特に長時間反応を継続する場合には、反応終止の状態で水冷しておくの事が適当である。

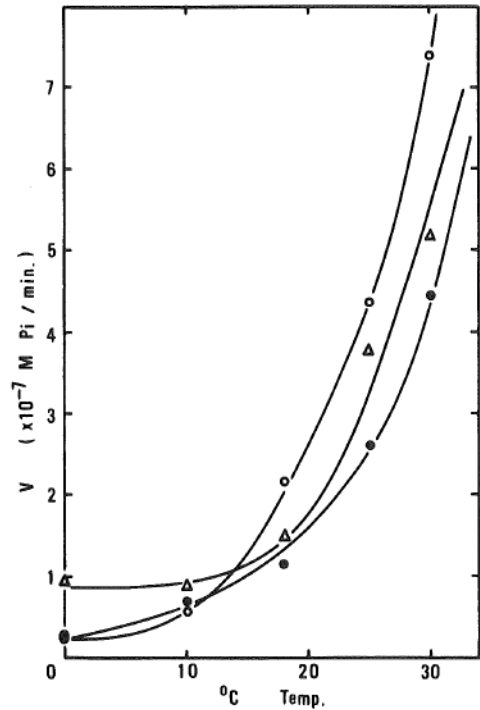


図 5 ATP の非酵素的分解速度の温度依存性
 △ : Ohnishi 法
 ○ : Fiske-SubbaRow 法 (発色前の段階)
 ● : Fiske-SubbaRow 法 (反応終止段階)
 1 mM ATP

種々の試薬の発色に及ぼす影響

ミオシン ATPase 反応の反応混液は、数種の試薬を含んでおり、目的により他の試薬がさらに加わる事が考えられている。そこで、以下に記した化合物について、それらの化合物の存在下で、Ohnishi 法と Fiske-SubbaRow 法の発色がどの様に影響されるかを調べた。一定濃度のリン酸の発色の共存する試薬の濃度依存性は、図 6 a. b. c. d. e に示した。調べた試薬と濃度範囲は表 2 に示した。

Fiske-SubbaRow 法では、ほとんどの試薬は、発色に影響を与えなかった。(図 6), 例外的な試薬は、EDTA (図 6,c) 及び尿素 (図 6,d) であった。EDTA は、その濃度が 10 mM 以上で、尿素は、 4 M 以上の濃度で発色を阻害した。

一方、Ohnishi 法では、逆に、ほとんど全ての試薬が発色に影響を与えた。KCl (図 1,a), エチルアルコール (図 6,e), 尿素 (図 6,d) は、その濃度増加に比例して、発色を増大させた。MgCl₂, CaCl₂ (図 6,a), n-ブチルアルコール (図 6,e) は、その濃度増加にともない、双曲線的に発色が増大した。Tris-maleate pH 7.0 (図 6,b) は、その濃度増加に比例して、わずかに吸光度が減少し、Tris-HCl pH 8.0 (図 6,b) は、 30 mM 以上の濃度で吸光度が減少した。EDTA, EGTA (図 6,c) グリセリン (図 6,d) は、その濃度増加に伴い、発色をおさえた。サッカロース (図 6,b) では、 20 mM までは吸光度が減少するが、それ以上、 80 mM まで、吸光度は一定であった。SDS (図 6,c) では、発色は、 $0.2 \sim 0.3\%$ に極大を持つ凸型の濃度依存性を示し、硫酸アンモニウム (図 6,e) では、 4% に極小を持つ濃度依存性を示した。

表2 試薬の種類と濃度範囲

略号：EGTA : Ethyleneglycolbis(β -aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid.
 EDTA : Ethylenediaminetetraacetic acid.
 SDS : ラウリル硫酸ナトリウム
 n-BtOH : n-ブチルアルコール
 EtOH : エチルアルコール
 Am. Sulfate : 硫酸アンモニウム

試薬	濃度範囲
KCl	0 - 1 M
MgCl ₂	0 - 10mM
CaCl ₂	0 - 10mM
Tris-maleate pH 7.0	0 - 50mM
Tris-HCl pH 8.0	0 - 50mM
EDTA	0 - 20mM
EGTA	0 - 20mM
Urea	0 - 7 M
SDS	0 - 0.5%
n-BtOH	0 - 6 %
EtOH	0 - 25%
Sucrose	0 - 100mM
Am. sulfate	0 - 5 %
Glycerin	0 - 10%

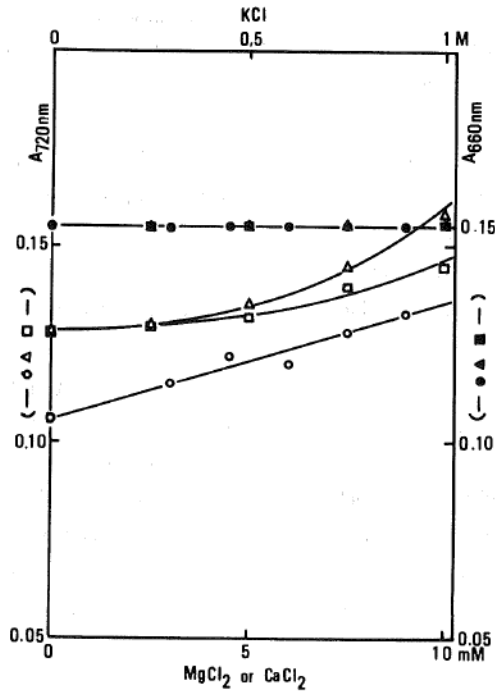
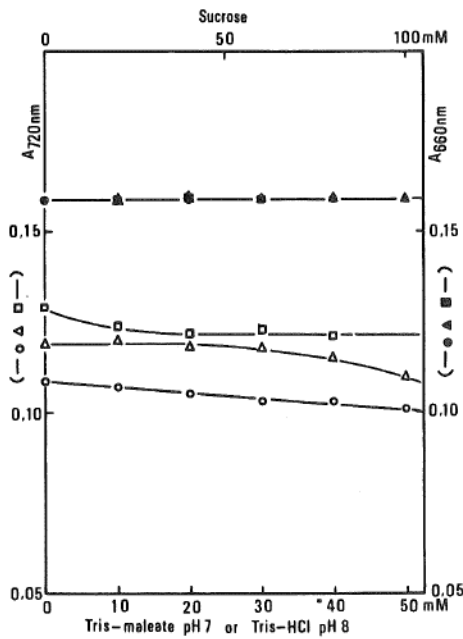
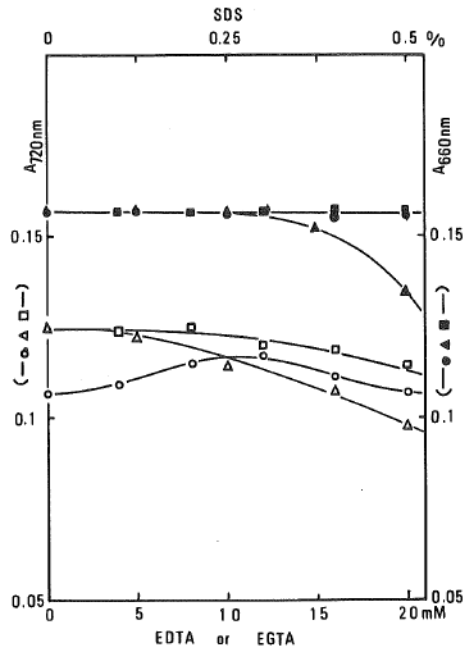


図6 各試薬の発色に及ぼす影響
 ○, △, □ : Ohnishi 法
 ●, ▲, ■ : Fiske-SubbaRow 法
 ※対照は蒸留水を用いた。
 (a) ○, ● : KCl
 △, ▲ : MgCl₂
 □, ■ : CaCl₂

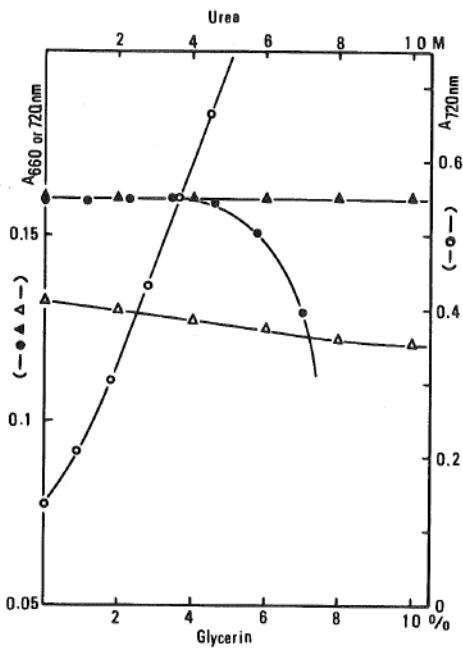
新リン酸定量法によるミオシン ATPase 活性の測定



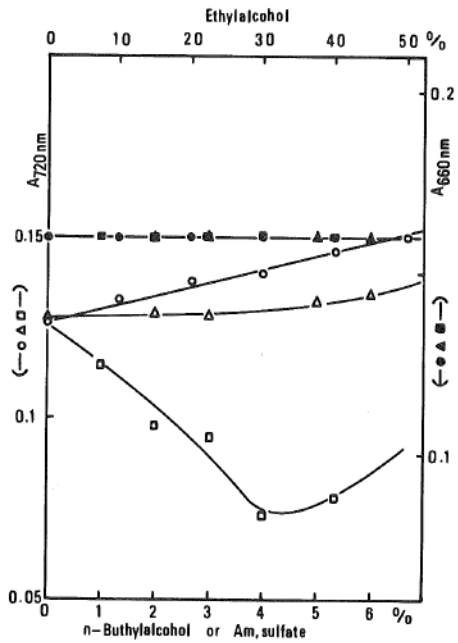
(b) ○, ● : Tris-maleate pH 7.0
 △, ▲ : Tris-HCl pH 8.0
 □, ■ : Sucrose



(c) ○, ● : SDS
 △, ▲ : EDTA
 □, ■ : EGTA



(d) ○, ● : Urea
 △, ▲ : Glycerin



(e) ○, ● : エチルアルコール
 △, ▲ : n-ブチルアルコール
 □, ■ : 硫酸アンモニウム

表3 Ohnishi法の発色に及ぼす各試薬の影響

 ΔA_{720} : 10^{-4} Mリン酸あたりの検量線の傾き

※相関係数 (r) は、回帰計算で得られた直線と測定値の相関を示し、 $r = 1$ の場合、測定値は全て直線上にある。

試薬 (濃度)	相関係数 (r)	ΔA_{720}
Blank	0.9956	0.245
KCl (1M)	0.9998	0.250
MgCl ₂ (10mM)	0.9999	0.261
CaCl ₂ (10mM)	1.0000	0.233
Tris-maleate pH 7.0 (50mM)	0.9999	0.210
Tris-HCl pH 8.0 (50mM)	0.9987	0.225
EDTA (20mM)	1.0000	0.209
EGTA (20mM)	0.9996	0.225
Urea (3M)	0.9989	0.178
SDS (5%)	0.9960	0.239
n-BtOH (6%)	0.9996	0.256
EtOH (25%)	0.9998	0.254
Sucrose (100mM)	0.9960	0.215
Am. Sulfate (5%)	0.9999	0.151
Glycerin (10%)	0.9998	0.232

この様に、Ohnishi法では、その発色が、種々の試薬によって影響をうける為、次にそれぞれの試薬の存在下にリン酸の検量線を求め、その直線性と、 10^{-4} Mリン酸あたりの傾き (ΔA) を調べた。(表3)

表3に示される様に、直線回帰計算によると各々の試薬の存在下で得られた測定値の相関係数は、1に非常に近い値であった。従って、これらの試薬の存在によって、検量線の直線性が失なわれる事はないと認められる。しかし、表3に示される様に、各試薬の存在下で求められた ΔA は対照と比較してそれぞれ変化していた。特に、尿素や硫酸アンモニウムは、検量線の傾きを大きく減少させていた。

以上の結果から、Ohnishi法では、その発色が様々な試薬によって影響をうけるという事がわかった。そこでこれらの試薬による影響を十分に考慮して検量線を作る事が必要となった。Fiske-SubbaRow法では、一つの検量線を多くの条件下で使えるが、Ohnishi法では、それができない。そこで、Ohnishi法では、ATPを含まない反応液と同組成の溶液を用いてリン酸の検量線を作る事にした。この場合、たとえば、ミオシン ATPase 活性の EDTA 濃度依存性を測定する為には、異なった EDTA 濃度の為の検量線がそれぞれ必要になるわけであるが、Ohnishi法の操作は簡単であるので、容易にできうる。

ミオシン ATPase 活性の測定

図7に、ホタテ貝閉殻筋ミオシンのカルシウムイオン感受性を測定する為に行ったミオシン ATPase 反応のリン酸放出の時間変化を示した。反応の測定は、ミオシンを加えて反応を開始し、同一の反応液から一定時間間隔で、Fiske-SubbaRow 法用、2mlと Ohnishi 法用、1mlの分画を交互に取り出して行なった。従って、全く同一の反応を、両法で測定した事になる。図7の直線から

得られたミオシン ATPase 活性の速度は、表 4 に示された様に一致した。

Ohnishi 法は、その特徴として、タンパク質を可溶化するので、除タンパク質操作を必要とせず、一段階の操作でリン酸定量ができるという利点を持っている。さらに、その感度、再現性も良く、ATP の非酵素的分解速度も、Fiske-SubbaRow 法と較べて速くはない、しかし検量線の傾きが、様々な試薬によって影響をうける。従って、ATPase 反応の条件が異なる場合、そのつど異なった組成で、リン酸の検量線を作る必要がある。この点に関しては、一つの検量線が、多くの条件下で使用できる Fiske-SubbaRow 法の方が便利である。しかし、同一組成で反応を行なう場合は、Ohnishi 法の方が遙かに迅速な測定が行なえる。結論として、Ohnishi 法は、充分、ミオシン ATPase 反応の測定に利用できる事が認められた。

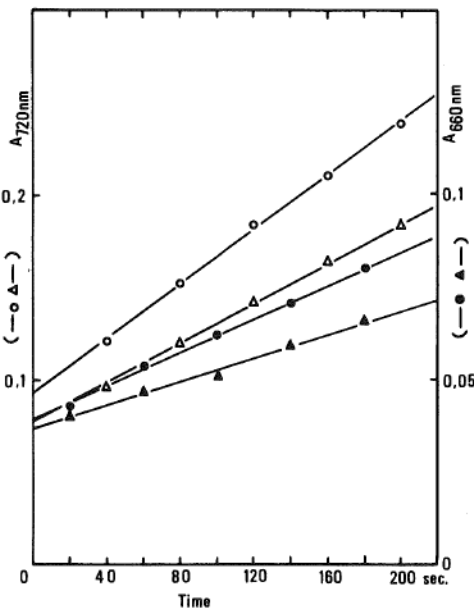


図 7 ミオシン ATPase 反応の時間経過

- : +Ca²⁺, Ohnishi 法,
 - : +Ca²⁺, Fiske-SubbaRow 法
 - △ : -Ca²⁺, Ohnishi 法,
 - ▲ : -Ca²⁺, Fiske-SubbaRow 法
- 反応条件: 0.1 mg/ml ホタテ閉殻筋ミ
 オシン, 0.5 M KCl, 20 mM
 Tris-maleate pH 7.0, 1 mM
 MgCl₂, 0.1 mM EGTA, 1 mM
 ATP, ±0.2 mM CaCl₂, 25°C

表 4 ミオシン ATPase 活性と Ca²⁺ 感受性

$$\text{Ca}^{2+}\text{感受性}(\%) = \frac{\text{ATPase活性}(+\text{Ca}^{2+}) - \text{ATPase活性}(-\text{Ca}^{2+})}{\text{ATPase活性}(+\text{Ca}^{2+})} \times 100$$

※ 10⁻⁴M リン酸あたりの検量線の傾き (ΔA)

$$\Delta A_{720\text{nm}}(\text{Ohnishi 法}) = 0.260$$

$$\Delta A_{660\text{nm}}(\text{Fiske-SubbaRow 法}) = 0.155$$

	ATPase 活性 (μmoles/mg/min)		Ca ²⁺ 感受性 (%)
	+Ca ²⁺	-Ca ²⁺	
Ohnishi 法	0.085	0.061	28.2
Fiske-SubbaRow 法	0.087	0.061	29.9

要 約

最近発表された Ohnishi らによるリン酸定量法の新法は、操作が簡単であり、高感度であるという利点を持つ。この新法をミオシン ATPase 活性の測定に利用する為に、Fiske-SubbaRow 法を対照として、検討を加え、次の結果を得た。

1) Ohnishi 法の C 液は、調製後、時間経過に伴って色が変化するが、この変色はリン酸の検量線の傾きに影響しなかった。

2) 反応液と C 液の混合後、発色剤を添加するまでの待ち時間は、2 時間以内であれば厳密に規定する必要はない。

3) 発色剤添加後の発色の時間変化は、 10^{-4} M リン酸で 8 ~ 15 分にプラトーを示し、その後徐々に減少する為、発色後の測定時刻を 15 分後と定めた。

4) リン酸の検量線から、Ohnishi 法は Fiske-SubbaRow 法より 1.6 倍高感度であった。

5) 定量用の試薬による ATP の非酵素的分解は Fiske-SubbaRow 法より Ohnishi 法の方がその速度が遅かった。

6) ATPase 反応液に含まれる可能性がある様々な試薬は、Ohnishi 法の発色に影響を与えたが、検量線の直線性は変化しないので、各々の条件下で検量線を作製するとよい事がわかった。

7) Ohnishi 法による実際のミオシン ATPase 反応の測定結果は、Fiske-SubbaRow 法での測定値と一致した。

以上の結果から、Ohnishi 法は十分に、ミオシン ATPase 活性を測定する為に利用できる事がわかった。

本研究の遂行にあたり御校閲を賜った本学旭川分校、東尚巳教授に深く感謝します。

文 献

- 1) R. D. Bell and E. A. Doisy, *J. Biol. Chem.*, **44**, 55 (1920).
- 2) C. H. Fiske and Y. SubbaRow, *J. Biol. Chem.*, **66**, 375 (1925).
- 3) T. Kuttner and H. R. Cohen, *J. Biol. Chem.*, **75**, 517 (1927).
- 4) G. E. Youngburg and M. V. Youngburg, *J. Lab. Clin. Med.*, **16**, 158 (1920).
- 5) E. J. King, *Biochem. J.*, **26**, 292 (1932).
- 6) I. Berenblum and E. Chain, *Biochem. J.*, **32**, 286 (1938).
- 7) R. J. L. Allen, *Biochem. J.*, **38**, 858 (1940).
- 8) G. Gomori, *J. Lab. Clin. Med.*, **27**, 955 (1942).
- 9) R. A. Koenig and C. R. Johnson, *Eng. Chem. Anal. Ed.*, **14**, 155 (1942).
- 10) O. H. Lowry and J. A. Lopez, *J. Biol. Chem.*, **162**, 421 (1946).
- 11) J. B. Martin and D. M. Doty, *Anal. Chem.*, **21**, 965 (1949).
- 12) Y. Takahashi, *Seikagaku*, **26**, 690 (1955).
- 13) J. Benjaminsen and J. Jensen, *Chem. Abstr.*, **50**, 3952a (1956).
- 14) D. F. Wallach and V. B. Kamat, "Method in Enzymology" E. F. Neufeld and V. Ginsburg eds. vol. 8, pp 164-172, Academic press, New York
- 15) C. F. Chingnell and E. Titus, *J. Biol. Chem.*, **241**, 5083 (1966).
- 16) J. Lecocq and G. Inesi, *Anal. Biochem.*, **15**, 160 (1966).
- 17) R. L. Post and A. K. Sen, "Method in Enzymology" R. W. Estabrook

- and M. E. Pullman eds. vol. 10, pp 762-768, Academic press, New York
- 18) E. S. Bafinski, P. P. Foa and B. Zak, *Clin. Chim. Acta*, **15**, 155 (1967).
 - 19) I. Ueda and T. Wada, *Anal. Biochem.*, **37**, 169 (1970).
 - 20) B. D. Roufgalis, *Anal. Biochem.*, **44**, 325 (1971).
 - 21) J. R. Dullely, *Anal. Biochem.*, **67**, 91 (1975).
 - 22) R. Bais, *Anal. Biochem.*, **68**, 271 (1975).
 - 23) T. Ohnishi, R. S. Gall and M. L. Mayer, *Anal. Biochem.*, **69**, 261 (1975)
 - 24) D. Cassell and Z. Selinger, *Biochim. Biophys. Acta*, **452**, 538 (1976).
 - 25) J. Y. Le Deaut and P. Mandel, *Biochimie*, **58**, 1397 (1976).
 - 26) T. I. Lin and M. F. Morales, *Anal. Biochem.*, **77**, 10 (1977).
 - 27) S. T. Ohnishi and R. S. Gall, *Anal. Biochem.*, **88**, 347 (1978).
 - 28) J. R. Seals, J. M. McDonald and D. Bruns, *Anal. Biochem.*, **90**, 785 (1978).
 - 29) T. Asakawa, *J. Hokkaido Univ. of Education*, Section II A, **30**; 249 (1980).
 - 30) J. W. Pelley, C. W. Garner and G. H. Little, *Anal. Biochem.*, **86**, 341 (1978).