

## 아날로그에 효과에 의한 토끼 근육 막 수축의 중간단계 연구

김덕술<sup>†</sup>

<sup>†</sup>동명대학교 의용공학과  
(2007년 1월 5일 접수 ; 2007년 2월 23일 채택)

### A Study on the Middle Step of Rabbit Skeletal Muscle Membrane Contraction by Analog Effects

Duck-Sool Kim<sup>†</sup>

<sup>†</sup>Department of Biomedical Engineering Tongmyong University, Busan 608-711, Korea  
(Received Jan. 5, 2007 ; Accepted Feb. 23, 2007)

**Abstract** : X-ray diffraction studies have been made to investigate the effects of binding of ADP, ADP+Vi, ADP+AIF<sub>4</sub>, ADP+BeF<sub>3</sub> on the structure of glycerinated rabbit skeletal muscle in the rigor state. Although these phosphate analogs are known to bind actively cycling myosin heads, it is not clear whether they can bind to the attached heads in the rigor muscle. We have found that these analogs can bind to the myosin heads attached to actin filaments in the rigor state. The present results indicate that (1) bound myosin heads altered their conformation in the proximal end toward the plane perpendicular to the fiber axis when MgADP bound to them, and (2) myosin heads were dissociated substantially (up to 50%) from actin filaments but still remained in the vicinity of actin filaments when MgADP and metallofluorides (AIF<sub>4</sub> and BeF<sub>3</sub>) or vanadate bound to them. We detected new conformations of myosin heads attached to actin filaments when they had MgADP or ADP.Pi analogs. We report here these findings on the effects of MgADP and MgADP+phosphate analogs to the rigor crossbridges.

**Keywords** : myosin head, BeF<sub>3</sub>, reflection

### 1. 서론

지금까지 여러 과학자들에 의해 근육세포에 밝혀진 내용을 보면, 액틴과 미오신으로 된 2종류의 수축성 필라멘트가 생체 에너지물질 ATP를 소비하면서 끌어당긴다는 사실과, Ca<sup>2+</sup>이온이 이것을 조절을 한다는 것을 밝혔다[1-3].

근육 수축 계는 기능과 구조가 직접적인 관계를 가진다. 즉 근육 수축에 대한 에너지변환과 그 구조의 역할이 근육수축에 영향을 미치고 있기 때문이다. 근육 X선 연구는 근육이 ATP를 분해하여 어떻게 힘을 발생시키는가를 구조변화를 통하여 밝히는데 있다. 이것은 장력발생을 담당하는 미오신 머리와 액틴과의 결합이 중요한 요인으로 작용한다. 근육 수축은 액틴과 미오신이라 하는 단백질분자에 의하여 일어나며, 근육 수축의 기본과정은 미오신에 의하여 ATP 가수분해

<sup>†</sup>주저자 ( e-mail : dskim@tu.ac.kr)

를 시킴으로서 나타나는 에너지를 에너지원으로 하는 양 단백질의 상호작용에 있다[4]. 근육의 액틴과 미오신은 각각 필라멘트상으로 규칙적으로 배열을 하고 있기 때문에 그 구조가 오래 전부터 연구되어 왔다[5-9]. 근육의 수축은 각각의 십자교(crossbridge)가 완전히 다르게 움직인다. 따라서 특정의 상태를 연구하려면, 시약에 의한 물리적인 변화를 주어 장시간의 변화과정을 연구하여야 한다. ATP 가수분해과정 혹은 굵은 필라멘트와 가는 필라멘트를 시약으로 분리 측정하는 등은 그 좋은 예이다. 앞으로 이러한 정적·동적인 근육메커니즘을 분석함으로써 인공근육에 대한 연구까지 확대된다고 본다 [10-12].

본 연구에서는 이 수축중의 액틴과 미오신의 상호작용은 십자교의 ATP 가수분해반응과 함께 일어난다고 추정된다. 일반적으로 등척성 수축하면 높은 장력을 발생할 때 ATP분해활성은 작아지고, 단축하여 일을 하고 있을 경우는 ATP 분해활성이 증가하는 것으로 알려져 있다. 이러한 관계에서 등척성 수축에는 ATP 분해반응과정의 특정단계를 그대로 두면, 십자교의 화학상태와 구조상태의 관계를 직접 해명할 수 있을 가능성도 있다. 실험은 ATP 반응 중간체의 아날로그를 작용시켜 X선 분석을 하였다.

## 2. 실험

### 2.1. 실험장치

본 실험의 장치와 원리는 Fig. 1에 나타내었다. X선 회절 광학계는 일본에 있는 고에너지 물리연구소의 소각산란 회절계(BL15A, PF, tsukuba, Japan)를 사용하였다. 이 광학계는 수축중인 근육의 회절 실험만을 위하여 설계되었다. 광원으로부터 13m의 위치에 있는 정밀거울은 X선의 수직방향의 발산각을 받아서 전반사시킨다. 거울의 전장은 완만하게 굽어져 있고, 수직 방향의 beam을 광원으로부터 22m 위치에 집중시킨다. 카메라는 최대 3m까지 연장되며, 위치는 변경시킬 수 있다. 시료로부터 산란 X선은 진공관 안을 통과하여 검출기 면에 닿아서 검출기에 기록된다. 광원 가속기는 양전자 에너지 2.4GeV, 전류 250-350mA로 운전된다. 시분할 X선에 의한 기체원자로부터 전리한 전자를 양극선의 근방에서 기체로 증폭시켜서, X선 광

자를 전기파로서 검출한다. 1차원 위치 센서 : 1D-PSD(type 7860, Rigaku Denki, Tokyo)는 기체 증폭이 양극선 선상의 특정 위치를 결정하는 검출기이다. 회절상의 장력시간변화도 같은 시간대에 동시에 측정된다. 또 전류치와 시료에 입사하는 X선 강도도 기록된다. 시료와 검출기 간의 거리는 측정하고자 하는 반사를 다른 반사와 분리하여 기록할 수 있도록 약 2.4m으로 하였다. 방사선 X선은 강력하기 때문에, 이 방사선에 의한 손상을 최소화하기 위하여 자료수집 이외에는 시료에 X선이 닿지 않도록 시료 앞에 고속 차단막을 두었다. PSD에 의한 1차원 X선 회절상의 신호를 컴퓨터에 접속한 CAMAC(type 3588, LecRoy Research System S.A., Switzerland) 메모리에 시간의 함수로서 저장하였다.

근육으로부터 X선 회절상을 2차원적으로 기록하기 위하여, 'image plate'(BAS 2000, Fuji Film, Tokyo)라고 하는 적분형 X선 검출기를 이용하였다. 화상처리는 가시광에 의해 형광을 발하는 현상을 이용한 것으로 후지필름이 의학 화상진단용으로 개발한 장치를 사용하였다. 즉, 방사선 에너지 물질을 축적을 하고 난 후, 광의 기동에 의해 다시 형광 하는 현상이다.

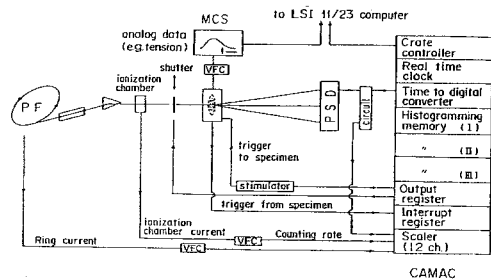


Fig. 1. Schematic of data acquisition system of the small-angle X-ray diffractometer at the Photon Factory in Japan.

### 2.2. 재료 및 방법

글리세린 처리한 토끼골격근(글리세린 처리후 1-2주이내)을 0.3mm정도 두께로 사용하였다. 근육의 크기는 길이가 4-5cm로 두께는 약 1mm정도이다. 근육은 백금선을 나란히 자극전극으로 준비한 시료 셀의 한쪽 끝에 연결하였

다. 시료의 다른 한쪽 끝에는 transducer의 차단 막의 금속에 수술용 실을 연결하였다. 근절의 길이는 He-Ne Laser의 광 회절법으로 가는 필라멘트와 굵은 필라멘트의 full overlap의 길이 (2.2-2.4 $\mu\text{m}$ )로 조정하였다. 셀 중에 양쪽끝을 고정시켜 이완용액을 흘려 보낸 후, ATP 반응 중간체의 아날로그시약으로 교환하였고, 가는 필라멘트와 굵은 필라멘트가 충분히 반응할 수 있도록 하였다. 사용한 ATP 반응 중간체의 아날로그시약은 NaF, Bes4,  $\text{AlCl}_3$  이다.

먼저 control 시약을 셀 안에 20분간 순환시켜 X선을 투과하여 반응한 X선회절상을 얻은 후 ESR 측정에 이용된 시료와 같이 제조된 ATP 반응 중간체의 아날로그 시약을 실험용 셀 안으로 약30분간 순환시킨다. 그리고 나서 반응된 근육을 X선을 투과하여 실험하였다. 즉, 미오신 머리의 SH에 반응시켜 토끼근육에 X선을 투과하여 spin label에 의한 영향을 비교하였다. X선 회절은 일본의 Photon Factory(PF)의 방사선 X선과 카메라 및 화상처리를 사용하여 행하였다. X선과 시료와의 거리는 190cm, 노출시간은 3분이었다. 온도는 25 $^{\circ}\text{C}$ 에서 실험하였다.

control 시약 조성 : 80mM K-propionate, 40mM imidazole, HCl buffer, 6mM Mg-acetate, 5mM EGTA, 5mM  $\text{Na}_2\text{ATP}$ , (pH7.0).

아날로그 시약 조성 : 50mM KCl안에 35 mM NaF, 1 mM Bes04 or  $\text{AlCl}_3$ , 10mM imidazole, (pH 7.0).

### 3. 결과 및 고찰

#### 3.1. X선회절상

화상처리의 디지털 자료를 X-Y방향으로 저장하였고, 전체강도로 다른 자료를 전부 규격화시켜 각각의 3개의 자료가 가산되었다. 본 연구에서는 X선 회절상과 적도반사, 미오신 반사, 액틴반사의 강도를 비교하였다.

근육골격근의 X선 회절상은 굵은 필라멘트와 가는 필라멘트의 나선구조에 의해 2개의 층선 반사로부터 형성된다.

이것은 나선구조가 프리에 변화하여 불연속 선 층선 분포가 이루어짐을 의미한다. 적도반사는 근육의 구조를 장축에 따라서 적도면에 투영한 구조를 반영하고, 자오 반사는 근 선유 축에

수직으로 투영한 근육의 구조를 반영한다. 이 2개의 층선 반사는 양 필라멘트의 구조주기가 다르기 때문에 일반적으로 분리형으로 관측된다. 근육의 장축과 수직인 면, 즉 적도면 위에 나타나는 굵은 필라멘트와 가는 필라멘트의 6방 배열에 의한 (100)면과 (110)면으로 부터의 반사와, 적도축에 수직인 중앙 축, 즉 자오선 위에 나타난 굵은 필라멘트의 십자교의 주기 구조로부터의 143 $\text{\AA}$ 과 215 $\text{\AA}$  자오 반사가 나타나는데, 이 2개의 반사는 미오신 필라멘트의 기본 주기 (430 $\text{\AA}$ )의 3차와 2차 반사에 해당한다.

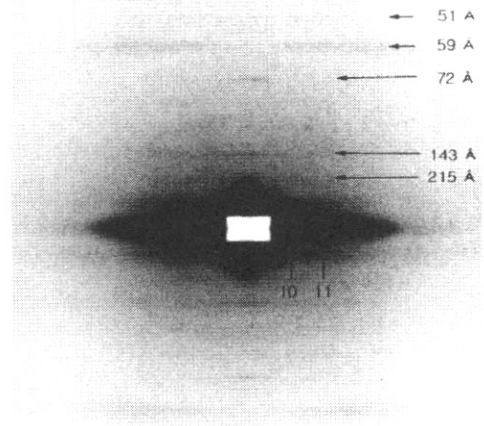


Fig. 2. X-ray diffraction pattern of glycerinated rabbit muscle fibers in rest state.

Fig. 2에서 적도반사(10, 10)는 근육의 구조를 장축에 따라서 적도면에 투영한 구조를 반영한다. 2개의 층선 반사는 양 필라멘트의 구조주기가 다르기 따라 일반적으로 분리된 형태로 나타난다. Yagi[13,14]에 의하면 이러한 적도 반사의 강도변화는 근육의 구조 변화를 나타낸다. 143 $\text{\AA}$  자오 반사는 굵은 필라멘트에서 튀어나온 2개의 머리로부터 되는 미오신-십자교의 규칙배열로부터 오는 반사이다. 215 $\text{\AA}$  반사는 이완상태로 미오신-십자교의 주기적 유동을 받은 나선 배열에 의한 반사로, 근육이 수축하면 매우 약하게 된다.

이들 반사를 선택한 이유는 이것의 강도변화가 십자교의 움직임과 구조변화를 직접적으로

반영하기 때문이다. 양 자오 반사의 강도변화는 미오신-십자교의 필라멘트 축에 따라 투영구조의 변화에 대한 정보를 제공한다. 이것의 강도변화가 십자교의 움직임과 구조변화를 직접적으로 반영하기 때문이다. 59Å, 51Å 반사는 전부 액틴 모노머의 반사이다. 이완상태에서는 액틴과 미오신이 떨어져 있기 때문에 각각 다른 위치에서 관찰된다. 215Å, 143Å, 72Å 반사는 미오신으로부터 오는 반사이다.

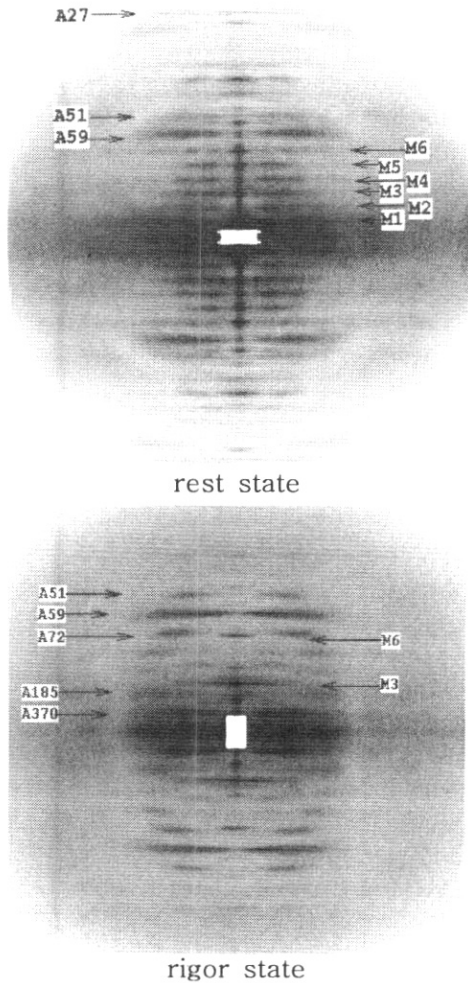


Fig. 3. X-ray diffraction pattern of glycerinated rabbit muscle fibers in rest state and rigor state.

Fig 3에서 A가 붙은 것은 액틴반사이고, M이 붙은 것은 미오신반사이며 F-액틴에 의한 주요 반사는 370Å을 주기로 하는 층선과 72Å, 59Å, 51Å의 비교적 강한 층선 및 27Å 자오 반사로 되어 있다. 27Å 자오 반사는 최근 접 액틴 모노머의 축 방향 간격에 상당하는 반사이며 59Å, 51Å 반사는 전부 액틴 모노머의 반사이다. 이완상태(rest state)에서는 액틴과 미오신이 떨어져 있기 때문에 각각 다른 위치에서 관찰되었고, 수축상태(rigor state)에서는 미오신 머리가 액틴으로 모두 이동하였기 때문에 액틴이 강하게 나타난다.

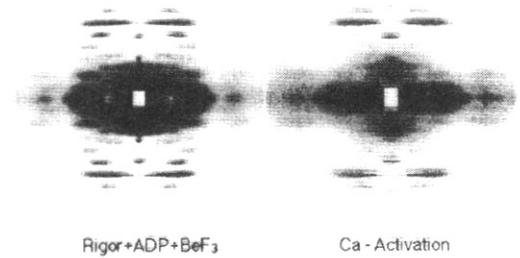


Fig. 4. X-ray diffraction pattern of glycerinated rabbit muscle fibers in rigor+ BeF<sub>3</sub> and Ca-Activation

Fig 4는 ATP 반응 중간체의 아날로그시약을 반응시킨 후 X선을 통과 시켜 결과를 나타내었다. 수축중의 액틴과 미오신의 상호작용은 십자교의 ATP가수분해반응과 함께 일어난다고 추정된다. 이전의 Tanaka[15]의 연구에서 근육구조 변화를 시험하였다. 일반적으로 등척성 수축하면 높은 장력을 발생할 때 ATP분해활성은 작아지고, 단축하여 일을 하고 있을 경우는 ATP분해활성이 증가하는 것으로 알려져 있다[16][17]. 이것은 ATP 반응 중간체의 아날로그 시약을 장시간 두면 층선 반사가 약해질 수 있다는 것을 시사하고 있다.

Fig 5.에서는 정확하게 구별되지 않지만 아날로그 시약의 BeF<sub>3</sub>의 부분이 약해져 있는 것을 볼 수가 있고, 이러한 현상은 액틴-미오신의 십자교의 관계가 ATP 반응 중간체의 아날로그시약에 영향을 받는다는 것을 알 수가 있다. 이러한 현상은 미오신 머리가 액틴과 결합이 되었다 할지라도 결합각도가 변했다고 볼 수가 있다. 그

리고 실험이 장시간 노출될 경우 각 층선 반사가 약해지는 요인으로는 여러 가지가 있다. 먼저 이완상태에서 오랜 시간 동안 반응시키면, 자연적인 근육의 경직현상이 있을 수 있다. 하지만 같은 반복실험을 통하여 반사가 약해지는 근육은 실험 자료에서 제외시켰다. 또 다른 요인으로는 근육 막 간의 당기는 현상으로 있지만 극히 미미한 영향을 미치기 때문에 무시해도 된다. 하지만 실험결과 자료를 면밀히 검토하여 이러한 현상이 보이는 자료도 제외시켰다.

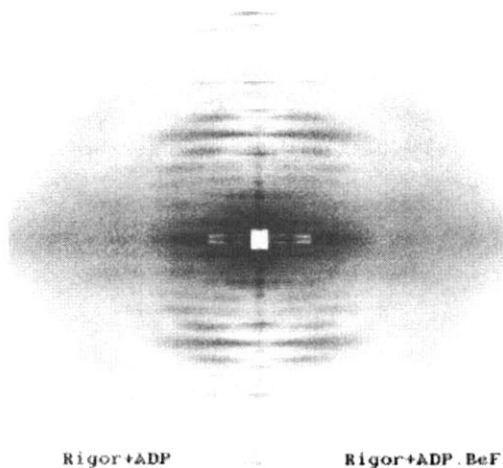


Fig. 5. X-ray diffraction pattern of glycerinated rabbit muscle fibers in rigor + ADP and rigor + ADP.BeF<sub>3</sub>

### 3.2. 액틴 층선 반사

Fig. 3에서 보는 바와 같이 27Å 자오 반사는 최근접 액틴 모노머의 축방향 간격에 상당하는 반사이며, 59Å, 51Å 반사는 전부 액틴 모노머의 반사이다. 액틴반사로부터 유래하는 59Å 반사를 측정하였다.

Fig 6.에서는 ATP 반응 중간체의 아날로그 시약의 59Å의 층선을 비교한 결과 rigor의 59Å 층선이 다른 것에 비하여 앞으로 기울어지는 현상을 볼 수 있다. 이것은 액틴에 결합된 미오신의 머리가 떨어져 있음을 시사하고 있다.

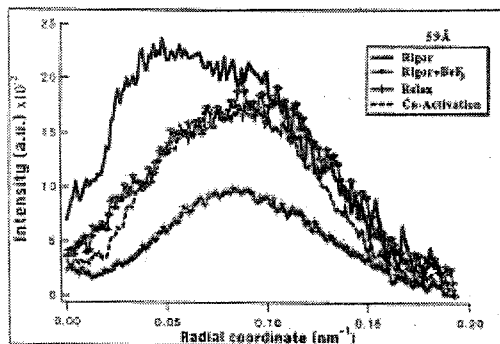


Fig. 6. Comparison of 59Å reflection of rigor, BeF<sub>3</sub>, relax and Ca-Activation

## 4. 결론

이상의 결과로부터 ATP반응중간체의 아날로그 시약의 효과로는 경직(rigor)상태에서는 미오신 머리의 규칙적인 나선 배열이 아날로그 시약의 영향에 의하여 흐트러진다. 특히 BeF<sub>3</sub>은 효과가 크다. 적도반사의 변화로부터 미오신 머리는 아날로그시약의 효과 의해 액틴 필라멘트 근방에 떨어져(50%정도) 있다는 것을 알 수 있었다. 59Å 층선 액틴반사변화에서 BeF<sub>3</sub>의 액틴 반사의 감소는 이동한 미오신 머리가 어떤 액틴과 해리되었거나, 아날로그시약의 영향으로 액틴의 구조가 변화되었음을 알 수 있었다.

## 참고문헌

1. K. Wakabayashi and Y. Amemiya, "Handbook on Synchrotron Radiation.", pp. 597, vol. 4, Progress in X-ray Synchrotron Diffraction Studies of Muscle Contraction, North Holland, Amsterdam (1991).
2. K. Wakabayashi, H. Tanaka, T. Kobayashi, T. Hamanaka, S. Nishizawa, H. Sugi, and T. Mitsui, Dynamic, *Adv. Biophys.*, 27, 3 (1991).

3. H. E. Huxley, *Science*, **164**, 1365 (1969).
4. H. E. Huxley, A. R. Farqi, and M. Brown, *J. Mol. Biol.*, **30**, 383 (1967).
5. H. E. Huxley, R. M. Simmons, A. R. Farqi, and M. Kress, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **266**, 347 (1988).
6. H. E. Huxley, A. R. Farqi, M. Kress, J. Bordas, and M. H. J. Koch, *J. Mol. Biol.*, **158**, 637 (1982).
7. Y. Amemiya, K. Wakabayashi, T. Hamanaka, T. Wakabayashi, T. Matsushta, and H. Hashizume, *Nucl. Instrum. Methods*, **208**, 471 (1983).
8. I. Matsubara and N. Yagi, *J. Mol. Biol.*, **208**, 359 (1989).
9. M. A. Bagni, G. Cecchi, F. Colomo, and C. Poggesi, *J. Muscle Res. Cell Motil.*, **11**, 371 (1990).
10. H. Iwamoto, T. Kobayashi, Y. Amemiya, and K. Wakabayashi, *Biophys. J.*, **68**, 227 (1995).
11. M. Kress, H. E. Huxley, A. R. Faruqi, and J. Hendrix, *J. Mol. Biol.*, **188**, 325 (1986).
12. K. Wang, R. McCarter, J. Wright, J. Beverly, and R. Ramirez-Mitchel, *Biophys. J.*, **64**, 1161 (1993).
13. N. Yagi, *J. Muscle Res. Cell Motil.*, **13**, 457 (1992).
14. N. Yagi and I. Matsubara, *J. Mol. Biol.*, **208**, 359 (1989).
15. K. Wakabayashi, H. Saito, T. Kobayashi, Y. Ueno, and H. Tanaka, *Photon Factory Act. Rep.*, **10**, 352 (1992).
16. K. Hirose, T. J. M. Murray, C. Franzini-Armstrong, and Y. E. Goldman, *J. Cell Biol.*, **127**, 763 (1994).
17. H. Yagi, S. Takemori, and M. Yamaguchi, *J. Mol. Biol.*, **231**, (1993).