

경직상태의 근육막에 MgADP를 첨가시킨 결과에 대한 연구

김덕술[†]

[†]동명대학교 의용공학과
(2007년 8월 23일 접수 ; 2007년 11월 28일 채택)

A Study on The Effect of Added MgADP to The Rigor Muscle Membrane

Duck-Sool Kim[†]

[†]Department of Biomedical Engineering Tongmyong University, Busan 608-711, Korea
(Received August 23, 2007; Accepted November 28, 2007)

Abstract : To study the relationship between elementary biochemical states and structural states of the actomyosin crossbridges in muscle, the effects of binding of MgADP to myosin heads in the rigor muscle were examined by X-ray diffraction using synchrotron radiation. X-ray diffraction studies have been made to investigate the effects of binding of ADP on the structure of glycerinated rabbit skeletal muscle in the rigor state. The intensity increase was accompanied by a slight but distinct decrease in the 5.9 am layer-line intensity close to the meridian. These results strongly suggest that myosin heads altered their attached conformation in the proximal end toward the plane perpendicular to the fiber axis when MgADP was bound to them. We found that the intensity of the 14.5 nm-based meridional reflections increase by 20-50% when MgADP was added to the rigor muscle in the presence of hexokinase and myokinase inhibitor.

Keywords : MgADP, myosin head, reflection

1. 서 론

근육세포는 굵은 필라멘트로부터 나온 머리가 액틴과 결합한 후 각도가 변화하며, 이 머리의 각도변화가 굵은 필라멘트와 가는 필라멘트 간의 미끄럼운동을 발생시킨다. 또 근육이 장력을 발생시킬 때도 미오신 머리에 큰 각도변화가 일어난다. 이 역학적 변화가 ATP 분해 cycle의 중요한 역할을 맡는 것으로 되어있다.

이러한 가설을 기본으로 미오신 머리의 역학적 변화, 에너지변환의 작용 등을 증명하는 실험들이 많이 소개되었다[1-3]. 그리고 지금까지 연구결과는 근육이라는 조직세포로 구성된 것 중에서 액틴과 미오신이 어떻게 분자변화를 동반한 분자 상호간의 힘을 발생시키는가를 밝히는 것이었다. 지금까지의 X선 측정에 의하면, 근육 단백질의 구조변화는 최대장력 발생에 의해서 매우 빨리 완료된다. 이것은 액틴-미오신분자가 이완상태에서 힘발생의 구조상태로 다시 전이하는 것으로 생각된다[4-5]. 그러나, 이완상태에서 구조변화로의 전이에는 미오신 머리가 가는

[†]주저자 (e-mail : dskim@tu.ac.kr)

필라멘트로 이동 및 미오신 머리를 일정하게 정리하는 시간이 포함되어 있다. 근육의 액틴과 미오신은 각각 필라멘트상으로 규칙적으로 배열을 하고 있기 때문에 그 구조가 오래 전부터 연구되어 왔다[6-8]. 근육의 수축은 각각의 십자교(crossbridge)가 액틴과 미오신에 의해 완전히 다르게 움직인다. 따라서 특정의 상태를 연구하려면, 시약에 의한 물리적인 변화를 주어 장시간의 변화과정을 연구하여야 한다[9-12].

본 연구에서는 정적인 방법으로 근육 세포막에 작용하는 메카니즘을 알아보고자 하였다. 근육이 경직된 상태 즉 십자교(액틴과 미오신의 결합)가 아주 강하게 결합된 상태에서 MgADP를 첨가하여 어떤 상태로 변화하는지 X선 회절법으로 분석하였다. 그래서 수축중인 근육세포막의 화학적인 구조 상태를 연구하였다.

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 13 m의 위치에 있는 정밀거울은 X선의 수직방향의 발산각을 받아서 전반사 시킨다. 거울의 전장은 완만하게 굽어져 있고, 수직 방향의 beam을 광원으로부터 22 m 위치에 집중시킨다. 카메라는 최대 3 m까지 연장되며, 위치는 변경시킬 수 있다. 시료로부터의 산란 X선은 진공관 안을 통과하여 검출기면에 닿아서 검출기에 기록된다. 광원 가속기는 양전자 에너지 2.4 GeV, 전류 250-350 mA로 운전된다. 시분할 X선에 의한 기체원자로부터 전리한 전자를 양극선의 근방에서 기체로 증폭시켜서, X선 광자를 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 검출기간의 거리는 측정하고자 하는 반사를 다른 반사와 분리하여 기록할 수 있도록 약 2.4 m으로 하였다. 방사선 X선은 강력

하기 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.

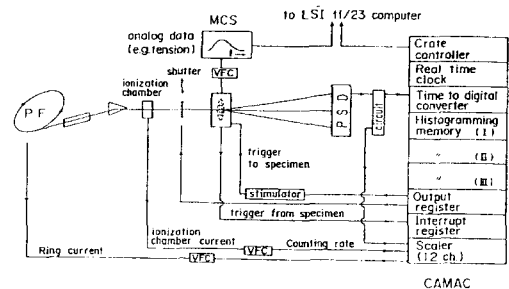


Fig. 1. Schematic of data acquisition system of the small-angle X-ray diffractometer at the Photon Factory in Japan.

2.2. 재료 및 방법

식용개구리(*Rana catesbeiana*)의 봉공근(sartorius) 또는 반건양근(semetendinosus)의 살아있는 근육을 시료로 이용하였다. 근육의 크기는 길이가 4-5 cm로 두께는 약 1 mm정도였다. 근육은 백금선을 나란히 자극전극으로 준비한 시료 cell의 한쪽 끝에 연결하였다. 시료의 다른 한쪽 끝에는 transducer의 shutter의 금속에 수술용 실을 연결하였다. 봉공근의 경우 혈관과 신경이 보이는 내측을 전극에 접촉시켰다. 글리세린 처리한 토끼골격근(글리세린 처리후 1-2주이내)을 0.3 mm정도 두께로 사용하였다. 근육은 백금선을 나란히 자극전극으로 준비한 시료 셀의 한쪽 끝에 연결하였다. 시료의 다른 한쪽 끝에는 transducer의 차단막의 금속에 수

술용 실을 연결하였다. 근절의 길이는 He-Ne Laser의 광 회절법으로 가는 필라멘트와 굵은 필라멘트의 full overlap의 길이(2.2-2.4 μ m)로 조정하였다. 셀 중에 양쪽끝을 고정시켜 이완용액을 흘려 보낸 후, MgADP시약으로 교환하였고, 가는 필라멘트와 굵은 필라멘트가 충분히 반응할 수 있도록 하였다. 사용한 ATP 아날로그시약은 MgADP였다.

먼저 control 시약을 셀 안에 20분간 순환시켜 X선을 투과하여 반응한 X선회절상을 얻은 후 ESR 측정에 이용된 시료와 같이 제조된 ATP 아날로그시약은 MgADP를 실험용 셀 안으로 약 30분간 순환시켰다. 그리고 나서 반응된 근육을 X선을 투과하여 실험하였다. X선회절은 일본의 Photon Factory(PF)의 방사선 X선과 카메라 및 화상처리를 사용하여 행하였다. X선과 시료와의 거리는 190 cm, 노출시간은 3분이었다. 온도는 25 $^{\circ}$ C에서 실험하였다.

Control 시약 조성 : 80 mM K-propionate, 40 mM imidazole, HCl buffer, 6 mM Mg-acetate, 5 mM EGTA, 5 mM Na₂ATP, (pH7.0).

아날로그 시약 조성 : 50 mM KCl안에 35 mM NaF, 1 mM MgADP, 10 mM imidazole, (pH 7.0).

3. 결과 및 고찰

3.1. X선회절상

근육골격의 X-ray 회절상은 굵은 filament와 가는 filament의 나선구조에 의해 2개의 층선반사로부터 형성된다. 이것은 수학적으로 계산하면 나선구조가 Fourier함수에 의해 변화된 불연속선 층선 분포가 이루어짐을 의미한다. 적도반사는 근육의 구조를 장축에 따라서 적도면에 투영한 구조를 반영하고, 자오반사는 근유축에 수직으로 투영한 근육의 구조를 반영한다. 이 2개의 층선 반사는 양 filament의 구조주기가 다르기 때문에 일반적으로 분리형으로 관측된다.

화상처리의 디지털 자료를 X-Y방향으로 저장하였고, 전체강도로 다른 자료를 전부 규격화시켜 각각의 3개의 자료가 더 하였다. 본 연구에서는 X선 회절상과 적도반사, 미오신 반사, 액틴반사의 강도를 비교하였다. 근육골격근의 X선 회절상은 굵은 필라멘트와 가는 필라멘트

의 나선구조에 의해 2개의 층선 반사로부터 형성된다.

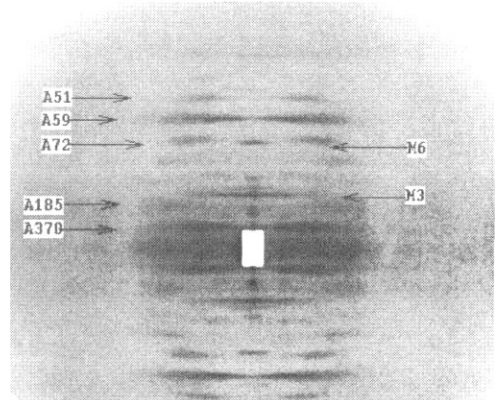


Fig. 2. X-ray diffraction pattern of glycerinated rabbit muscle fibers in rigor state.

Fig. 2에서 이것은 수축상태(rigor state)를 근섬유를 보였다. 미오신 머리가 액틴으로 모두 이동하였기 때문에 액틴이 강하게 나타난다. A가 붙은 것은 액틴반사이고, M이 붙은 것은 미오신반사이며 F-액틴에 의한 주요 반사는 370 Å을 주기로 하는 층선과 72 Å, 59 Å, 51 Å의 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.

이것은 나선구조가 푸리에 변화하여 불연속선 층선 분포가 이루어짐을 의미한다. 적도반사는 근육의 구조를 장축에 따라서 적도면에 투영한 구조를 반영하고, 자오 반사는 근선유 축에 수직으로 투영한 근육의 구조를 반영한다. 이 2개의 층선 반사는 양 필라멘트의 구조주기가 다르기 때문에 일반적으로 분리형으로 관측된다. 근육의 장축과 수직한 면, 즉 적도면 위에 나타나는 굵은 필라멘트와 가는 필라멘트의 6방 배열에 의한 (100)면과 (110)면으로 부터의 반사와, 적도축에 수직한 중앙 축, 즉 자오선 위에 나타난 굵은 필라멘트의 십자교의 주기 구조로부터의 143 Å과 215 Å 자오 반사가 나타나는데, 이 2개의 반사는 미오신 필라멘트의

기본 주기(430 Å)의 3차와 2차 반사에 해당한다.

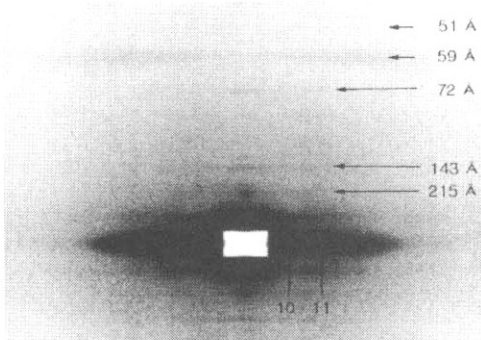


Fig. 3. X-ray diffraction pattern of glycerinated rabbit muscle fibers in rest state.

Fig. 3에서 적도반사(10, 11)근육의 구조를 장축에 따라서 적도면에 투영한 구조를 반영한다. 2개의 층선 반사는 양 필라멘트의 구조주기가 다름에 따라 일반적으로 분리된 형태로 나타난다. Yagi[13,14]에 의하면 이러한 적도 반사의 강도변화는 근육의 구조 변화를 나타낸다. 143 Å 자오 반사는 굵은 필라멘트에서 튀어나

온 2개의 머리로부터 오는 미오신-십자교의 규칙배열로부터 오는 반사이다. 215 Å 반사는 이완상태로 미오신-십자교의 주기적 유동을 받은 나선배열에 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. 59 Å, 51 Å 반사는 전부 액틴 모노머의 반사이다. 이완상태에서는 액틴과 미오신이 떨어져 있기 때문에 각각 다른 위치에서 관찰된다. 215 Å, 143 Å, 72 Å 반사는 미오신으로부터 오는 반사이다.

Fig 4는 근육세포에 MgADP 시약을 반응시킨 후 X선을 통과 시킨 결과를 나타내었다. 수축중의 액틴과 미오신의 상호작용은 십자교의 ATP가수분해반응과 함께 일어난다고 추정된다. 이전의 Tanaka[15]의 연구에서 근육구조변화를 시험하였다. 일반적으로 등척성 수축하면 높은 장력을 발생할 때 ATP분해활성은 작아지고, 단축하여 일을 하고 있을 경우는 ATP 분해활성이 증가하는 것으로 알려져 있다. 이것은 MgADP 시약을 장시간 두면 층선 반사가 약해 질 수 있다는 것을 시사하고 있다. 이러한 현상은 미오신 머리가 액틴과 결합이 되었다

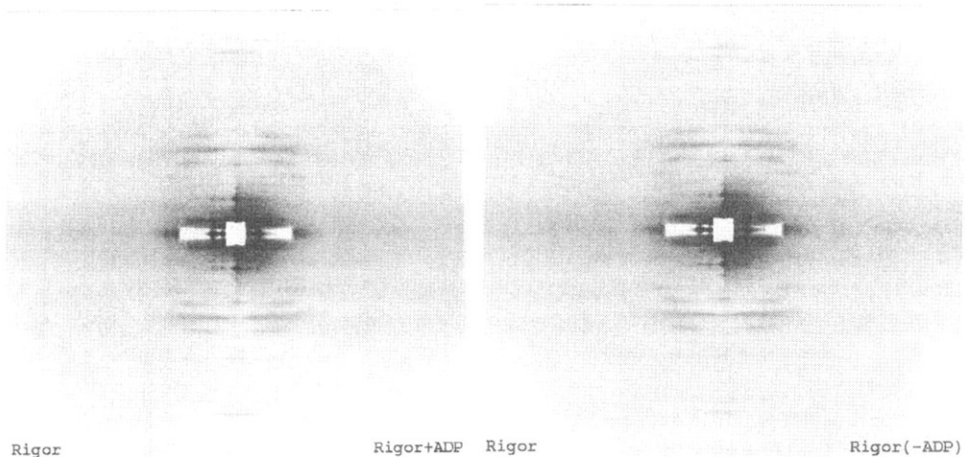


Fig. 4. X-ray diffraction pattern of glycerinated rabbit muscle fibers in rigor(+ADP, -ADP).

할지라도 결합각도가 변했다고 볼 수 있다. 그리고 실험이 장시간 노출될 경우 각 층선 반사가 약해지는 요인으로서는 여러 가지가 있다. 먼저 이완상태에서 오랜 시간 동안 반응시키면, 자연적인 근육의 경직현상이 있을 수 있다. 하지만 같은 반복실험을 통하여 반사가 약해지는 근육은 실험 자료에서 제외 시켰다.

3.2. 적도반사 비교

적도반사는 필라멘트 육각배열에 의한 결정 반사(100)면과 (110)면으로부터의 반사이며, 이것은 굵은 필라멘트와 가는 필라멘트와의 십자교 관계를 나타낸다. 적도면을 중심으로한 근육의 층선구조를 보면 굵은 필라멘트로부터 나온 미오신돌기의 배열은 굵은 필라멘트 안의 myosin분자에 의해 지배를 받는다.

Fig. 5.에서는 육방격자에 의한 10, 11반사에 의한 data를 나타내었다. 그 결과 10반사는 조금만 변화한 반면, 11반사가 현저하게 높게 올라 간 것을 알 수 있다. 이것은 미오신 머리가 액틴 필라멘트부근으로 이동해 있다는 것을 알 수가 있다.

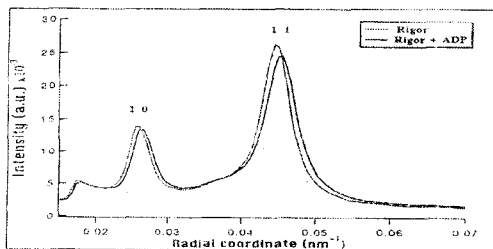


Fig. 5. Equatorial intensity profile from the rigor muscle in the presence of MgADP.

3.3. 미오신 층선반사

근육의 장축과 수직한 면, 즉 적도면 위에 나타나는 굵은 필라멘트와 가는 필라멘트의 6방배열에 의한 (100)면과 (110)면으로부터의 반사와 적도축에 수직한 중앙축, 즉 자오선 위에 나타난 굵은 필라멘트의 십자교의 주기 구조로부터의 143 Å과 215 Å자오반사이다. 이것의 반사는 십자교의 움직임과 구조변화를 직접적으로 반영한다[16][17].

Fig. 6과 Fig. 7에서 자오선반사 주기의 3차(143 Å반사), 6차(72 Å반사)로 측정하였다. 다

음은 굵은 필라멘트에서 발생하는 143 Å 자오반사는 굵은 필라멘트에서 튀어나온 2개의 미오신 머리로부터 오는 미오신-십자교의 규칙배열로부터 오는 반사이다. 이 수축중의 변화는 필라멘트 축에 따라서 있는 미오신-십자교의 분포가 변하고, 필라멘트 축에 수직으로 투영한 질량분포가 145 Å주기로 증가하게 되는 것을 시사한다.

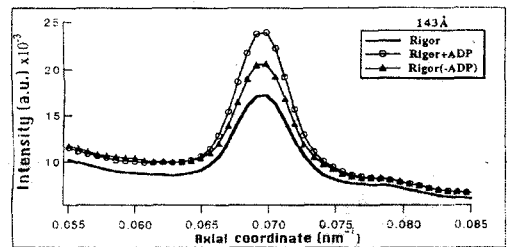


Fig. 6. Change in the intensity profiles of Myosin-based (143 Å) from the rigor muscle in the presence of (+MgADP and -MgADP).

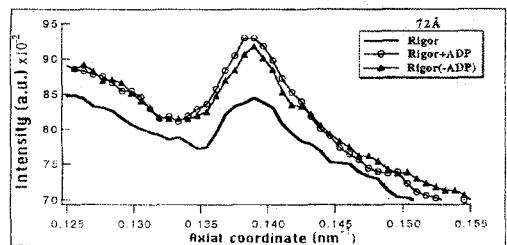


Fig. 7. Change in the intensity profiles of Myosin-based (72 Å) from the rigor muscle in the presence of (+MgADP and -MgADP).

72Å반사는 이완상태로 미오신-십자교의 주기적 유동을 받은 나선배열에 의한 반사로(15), 근육이 수축하면 매우 약하게 된다. 이것은 수축중 미오신-십자교가 각각의 미오신 필라멘트 주위에 나선배치가 무너지고, 가는 필라멘트의 근방에 이동하고 재배열하는 것으로 사료된다. 따라서, 양 자오반사의 강도변화는 미오신-십자교의 필라멘트 축에 따라 투영구조의 변화에 대한 정보를 제공한다.

3.4. 액틴 층선반사

Fig. 8과 Fig. 9 및 Fig. 10에서 보는 바와 같이 27 Å 자오 반사는 최근접 액틴 모노머의 축방향 간격에 해당하는 반사이며, 59 Å, 51 Å 반사는 전부 액틴 모노머의 반사이다. 액틴 반사로부터 유래하는 59Å 반사를 측정하였다.

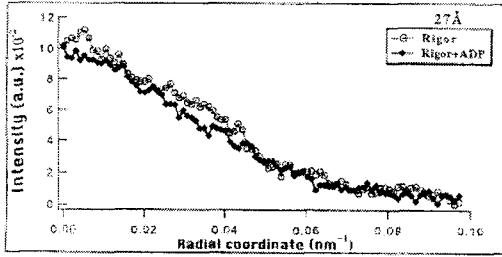


Fig. 8. Change in the intensity profiles of Myosin-based (27 Å) from the rigor muscle in the presence of MgADP.

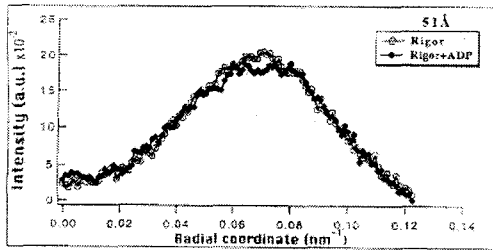


Fig. 9. Change in the intensity profiles of Myosin-based (51 Å) from the rigor muscle in the presence of MgADP.

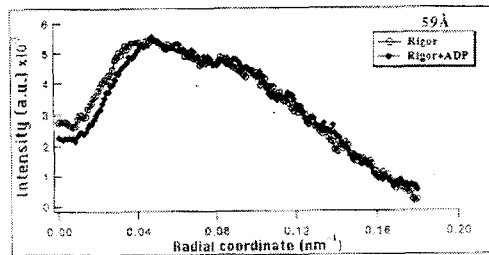


Fig. 10. Change in the intensity profiles of Myosin-based (59 Å) from the rigor muscle in the presence of MgADP.

Fig. 10에서 보는 바와 같이 MgADP 시약의 59 Å의 층선이 rigor의 59 Å 층선과 비교한

결과 다른 것에 비하여 앞으로 기울어지는 현상을 볼 수 있다. 이것은 액틴에 결합된 미오신의 머리가 떨어져 있음을 시사하고 있다.

4. 결론

이상의 결과로부터 육방격자에 의한 10, 11 반사와 굵은 filament의 crossbridge의 주기 구조로부터의 143 Å 과 215 Å 자오반사에서 충분히 MgADP시약의 효과가 나타나고 있으며, 경직(rigor)상태에서는 미오신 머리의 규칙적인 나선 배열이 아날로그 시약의 영향에 의하여 흐트러진다는 것을 알 수 있었다. 그리고 27 Å 자오반사는 액틴 모노머의 축 방향 간격에 해당하는 반사이며 59 Å, 51 Å 반사와 더불어 나타나는 강한 반사이므로 이것이 약해 졌다는 것은 액틴반사가 20-50%가 감소를 나타낸다. 이것은 이동한 미오신 머리가 어떤 액틴과 해리되었거나, MgADP시약의 영향으로 액틴의 구조가 변화되었음을 알 수 있었다.

참고문헌

1. H. E. Huxley, Mechanical Transients and the Origin of Muscular Force, *Science*, **164**, 1365 (1969).
2. H. E. Huxley, A. R. Farqi, and M. Brown, The Low-Angle X-ray Diagram of Vertebrate Striated Muscle and Its Behaviour during Contraction and Rigor, *J. Mol. Biol.*, **30**, 383 (1967).
3. H. E. Huxley, R. M. Simmons, A. R. Farqi, and M. Kress, X-ray Diffraction Studies on Muscle during Shortening and Their Implications Concerning Crossbridge Behaviour, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **266**, 347 (1988).
4. H. E. Huxley, A. R. Farqi, M. Kress, J. Bordas, and M. H. J. Koch, Time - Resolved X-ray Diffraction Studies of The Myosin Layer-Line Reflections during Muscle Contraction, *J. Mol. Biol.*, **158**, 637 (1982).
5. 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).
6. K. Wakabayashi, H. Tanaka, T. Kobayashi, T. Hamanaka, S. Nishizawa, H. Sugi, and T. Mitsui, Dynamic X-ray Diffraction of Skeletal Muscle Contraction Structural Change of Actin Filaments, *Adv. Biophys.*, **27**, 3 (1991).
 7. Y. Amemiya, K. Wakabayashi, T. Hamanaka, T. Wakabayashi, T. Matsushita, and H. Hashizume, Design of a Small-Angle X-ray Diffractometer using Synchrotron Radiation at The Photon Factory, *Nucl. Instrum. Methods*, **208**, 471 (1983).
 8. I. Matsubara and N. Yagi, Structural Change in The Thin Filament during Activation Studied by X-ray Diffraction by Highly Stretched Skeletal Muscle, *J. Mol. Biol.*, **208**, 359 (1989).
 9. M. A. Bagni, G. Cecchi, F. Colomo, and C. Poggese, Tension and Stiffness of Frog Muscle fibers at Full Filament Overlap, *J. Muscle Res. Cell Motil.*, **11**, 371 (1990).
 10. H. Iwamoto, T. Kobayashi, Y. Amemiya, and K. Wakabayashi, Effect of Stretch and Release on Equatorial X-ray Diffraction During a Twitch Contraction of Frog Skeletal Muscle, *Biophys. J.*, **68**, 227 (1995).
 11. M. Kress, H. E. Huxley, A. R. Faruqi, and J. Hendrix, Structural Changes during Activation of Frog Muscle Studies by Time-Resolved X-ray Diffraction, *J. Mol. Biol.*, **188**, 325 (1986).
 12. K. Wang, R. McCarter, J. Wright, J. Beverly, and R. Ramirez - Mitchel, Viscoelasticity of the Sarcomere Matrix of Skeletal Muscle Contraction The Actin-Myosin Composite Filament is a Dual-Stage Molecular Spring, *Biophys. J.*, **64**, 1161 (1993).
 13. K. Hirose, T. J. M. Murray, C. Franzini-Armstrong, and Y. E. Goldman, Structural Changes in Muscle crossbridge accompanying Force Generation, *J. Cell Biol.*, **127**, 763 (1994).
 14. H. Yagi, S. Takemori, and M. Yamaguchi, An X-ray Diffraction Study of Frog Skeletal Muscle during Shortening near The Maximum Velocity, *J. Mol. Biol.*, **231**, (1993).
 15. K. Wakabayashi, H. Saito, T. Kobayashi, Y. Ueno, and H. Tanaka, Detection of The Spacing Changes of Muscle Thin Filaments during Force Generation by X-ray diffraction, *Photon Factory Act. Rep.*, **10**, 352 (1992).
 16. N. Yagi, Effects of N-ethylmaleimide on The Structure of Skinned Frog Skeletal Muscle, *J. Muscle Res. Cell Motil.*, **13**, 457 (1992).
 17. N. Yagi and I. Matsubara, "Structural Changes in The Thin Filament during Activation Studied by X-ray Diffraction by Highly Stretched Skeletal Muscle, *J. Mol. Biol.*, **208**, 359 (1989).