

골격근 Contractile Protein 에 대한 Ca^{++} 의 영향

서울대학교 의과대학 약리학교실

박 찬 응 · 정 명 희 · 오 진 섭

=Abstract=

The Role of Ca^{++} on the Superprecipitation of the Contractile Protein

C. W. Park, M. H. Chung, J. S. Oh

Department of Pharmacology, College of Medicine, Seoul National University

Superprecipitation of actomyosin has been considered to be an in vitro model of the muscle contraction.

The superprecipitation and ATPase activity (which supplies the energy for contraction) are influenced by several factors which are the large amount of changes in ionic strength, Mg and ATP concentrations. But those behaviors are found to be promptly influenced by the change in a small range of calcium concentration which can be controlled by the cellular function of muscle physiologically only in the presence of the modulatory proteins, tropomyosin and troponin.

In order to elucidate the precise roles of calcium in the muscle contraction and relaxation, the effects of calcium on the actin-myosin interaction was observed in the presence of tropomyosin and troponin using the superprecipitation system.

The results are summarized as follows:

1. EGTA (glycol ether diaminetetraacetic acid) prolonged the initiation of the superprecipitation of natural actomyosin.
2. Superprecipitation curve was declined by adding EGTA at the time when the curve reached the half-maximum. The degree of declining was proportional to the amount of EGTA added. Especially, upon adding 0.25 mM EGTA the curve was lowered to the level before the protein superprecipitated. But addition of EGTA did not affect the curve after attaining the maximum.
3. Superprecipitation of Perry myosin B was not affected by EGTA added both before and during the course of the reaction.
4. Tropomyosin did not change the response of Perry myosin B to EGTA added at any time of the reaction.
5. Troponin also did not change the response of Perry myosin B to EGTA.
6. Both tropomyosin and troponin together rendered the Perry myosin B to obtain the same response as natural actomyosin to EGTA.
7. It was concluded that actin-myosin interaction was influenced by the minute change of calcium concentration only in the presence of both tropomyosin and troponin. We could reproduce the contraction and relaxation of the muscle in vitro under the presence of ATP by changing the calcium concentration.

서 론

Szent-György¹⁾는 actomyosin gel 이 Mg^{++} 존재하에서 ATP를 가수분해 하여 본래 투명한 gel suspension 이 점차 불투명 해지면서 혼탁도의 증가를 일으키는 현상을 superprecipitation 이라고 칭하고, 이를 시험관 내에서의 근 수축 model 이라고 주장하였다.

아직도 superprecipitation 의 기전을 설명하는 명확한 이론은 없으나, actomyosin 이 가지는 효소작용, 즉 ATPase 에 의하여 ATP 가 가수분해 될 때 나오는 energy 를 이용하여, actin 과 myosin 의 상호작용으로 cross-bridge 를 형성한 때문이라고 주장한 Huxley²⁾의 학설이 유력하게 지지를 받고 있으며, Levy 와 Ryan³⁾은 superprecipitation 정도와 ATPase activity 는 서로 correlation 을 가지며, 따라서 ATPase activity 가 높을 때 superprecipitation 도 활발히 일어난다고 보고하였다.

Superprecipitation 은 근육의 수축현상을 재현하는 시험관 내의 model 로 여러 학자들에 의하여 인정받고 있으나 근육이 가지는 여러 성질을 설명하지 못하므로 아직까지는 불완전한 model 로 생각되고 있다. 이에 가장 큰 이유로는 superprecipitation 은 비가역적 반응으로 믿어지고 있어서, 근육의 수축현상을 설명되고 있으나 이완현상은 이 model 로 나타내기 힘든 것으로 여겨졌던 바, 시험관 내에서 근육의 이완현상을 재현하려는 노력은 시도된 바 없다.

한편 Ebashi⁴⁾는 "natural actomyosin"(actin 과 myosin 이의 troponin 과 tropomyosin 이 포함된 복합 단백질)의 superprecipitation 이 미량의 Ca^{++} 농도 변화에 예민한 영향을 받음을 보고하였다.

즉, Ca^{++} 농도가 증가하면 superprecipitation 이 촉진되고 Ca^{++} 농도가 저하되면 반응이 억제내지 상당히 지연됨을 관찰하였다.

또한 Katz⁵⁾도 순수한 reconstituted actomyosin 에 native tropomyosin (tropomyosin 과 troponin 의 복합체)을 첨가하여 actomyosin 의 Mg -activated ATPase 활성도가 Ca^{++} 농도 변화에 예민한 영향을 받는다고 보고하였다.

이와 같은 Ca^{++} 의 ATPase 에 대한 작용은 glycerol-extracted muscle fiber 에서도 관찰되었으며⁶⁾, 이상의 보고들은 Ca^{++} 이 excitation-contraction coupling 에 있어서 생리적인 최종적 trigger 의 역할을 하고 있다는 실험적인 증거라고 생각할 수 있다⁷⁾.

Superprecipitation 과 ATPase 활성도에 미치는 Ca^{++}

의 영향에 관한 지금까지의 보고들은 모두 반응 초기부터 조절된 Ca^{++} 농도에 따르는 효과를 관찰하여 시험관내 근 수축 과정에 대한 Ca^{++} 의 작용을 설명하고 있다.

따라서 저자들은 excitation-contraction coupling 에 Ca^{++} 이 가지는 작용을 더욱 명확히 밝히기 위하여 superprecipitation system 에서, 반응전은 물론 반응 도중 Ca^{++} 농도를 변화시켜 superprecipitation 에 미치는 영향을 관찰하므로써 근 수축과 근 이완 현상을 나타내려고 시도하였다.

실험방법 및 재료

1. Natural actomyosin

수정된 Ebashi⁸⁾방법으로 토끼 등 근육에서 추출한 actomyosin 을 사용했다. 최종 KCl 농도는 0.6 M 로 하고, 동량의 glycerol 과 혼합하여 $-20^{\circ}C$ 에서 보관한후 실험 때마다 50 mM KCl, 5 mM Na_2 EDTA, (ethylenediaminetetraacetic acid), Tris-maleatebuffer pH 6.8 로 한 용액 9 volume 에 저장 actomyosin 1 volume 의 비율로 넣고, 14,000×g 로 20분 동안 원심분리하여 세척한 후 실험에 사용했다.

2. Perry myosin B

상기 과정으로 얻어진 natural actomyosin 을 Perry⁹⁾방법을 이용하여, 몰로 1,200×g 에서 30분간 원심분리하여 3번 세척하고, 5 mM Tris-HCl buffer pH 8.6 용액 3배 volume 에 섞어 $0^{\circ}C$ 에서 48시간 방치하였다. 이후 33,000×g 에서 15분간 원심분리하여 얻은 precipitate 를 3배의 volume 몰로 역시 33,000×g 에서 15분간 원심분리하여 2번 세척하고 pH. 7.0 로 하여 최종 KCl 농도를 0.6 M 로 교정하여 동량의 glycerol 과 혼합하여 $-20^{\circ}C$ 에서 보관하였다. 사용시 세척 방법은 natural actomyosin 의 경우와 같았다.

3. Troponin 및 tropomyosin

토끼 등 근육을 사용하여 모두 Ebashi¹⁰⁾방법에 의하여 추출하여 사용하였다.

4. Superprecipitation 의 측정

반응조건은 100 mM KCl, 5 mM $MgCl_2$, 20 mM Tris-maleate buffer pH 6.8 로 했으며, Ca^{++} 은 따로 첨가하지 아니하였으며 반응액 중에 contamination 되어 있는 것으로 대신하였다. Actomyosin 은 natural 과 Perry 모

두 반응액 매 ml 당 0.5 mg protein 이 되도록 하였고, tropomyosin 과 troponin 은 반응액 매 ml 당 25 μg 이 되도록 하였으며, 0.5 mM ATP 를 첨가하여 반응을 시작하였고, 반응액의 총량은 3 ml 로 하였다.

Superprecipitation 정도는 Hitachi Perkin-Elmer spectrophotometer 를 사용하여 545 mμ 에서 optical density (O.D)의 변화를 측정하므로써 정했으며, spectrophotometer 에 Sargent linear log gear recorder 를 연결하여 계속적으로 optical density 의 변화를 기록했다. 상기 모든 조작은 실온에서 행하였고 protein 농도 측정은 Biuret method 를 사용하였다.

5. Ca⁺⁺농도 조절

전 실험 과정을 통하여 Ca⁺⁺을 따로 첨가하지 아니하였으며, 반응액 중의 Ca⁺⁺농도는 시약, 단백질 및 물 속에 포함된 Ca⁺⁺에 의하여 약 10 μM 정도라고 추산한 Katz¹¹⁾의 보고에 준하였다.

최종 기대하는 유리 Ca⁺⁺농도 0.1 μM~1 μM 을 얻기 위하여, 용액 중의 ATP⁻⁴와 Ca⁺⁺과 Salt 를 형성하고 남은 유리 Ca⁺⁺에 EGTA (glycoetherdiaminetetraacetic acid)를 추가로 첨가하여 조절하였다.

첨가되는 EGTA 의 농도는 Katz¹²⁾의 방법에 의하여 유도한 다음 공식을 이용하였다. 즉,

$$Z = \frac{10^{-5} + 9.96[Ca^{++}] - 45.7 \times 10^4 \times [Ca^{++}]^{2*12}}{4.4 \times 10^5 \times [Ca^{++}]}$$

Z: the amount of EGTA to be added to achieve the desired free Ca⁺⁺ concentration

[Ca⁺⁺]: the desired free Ca⁺⁺ concentration

* 12) 위 공식을 유도하는데 다음과 같은 상수를 이용하였다.

at pH 6.8

- a) dissociation constant of 4th H⁺ of ATP=10^{-6.97}
- b) [APT⁻⁴]/[ATP⁻³]=0.63
- c) binding constant for Mg⁺⁺ and ATP⁻⁴=8.8×10⁴
- d) binding constant for Ca⁺⁺ and ATP⁻⁴=3.15×10⁴
- e) binding constant for Ca⁺⁺ and EGTA=4.4×10⁵

본 실험에 사용된 시약은 EGTA 만 Eastman 회사 제품이고, 나머지 시약은 Merck 회사 제품을 사용하였다.

실험 결과

1) EGTA 의 natural actomyosin superprecipitation 에 미치는 영향

Natural actomyosin 의 superprecipitation 은 EGTA 에

매우 예민한 반응을 보여 주었다. 즉, 25 μM EGTA 를 superprecipitation 시작 전에 미리 첨가하였을 경우 (Fig. 1) superprecipitation 의 상당한 지연을 보여 half-maximum turbidity 에 도달되는 시간이 EGTA 를 첨가하지 아니한 system 에서는 15분인데 비하여 무려 75분이나 되었다.

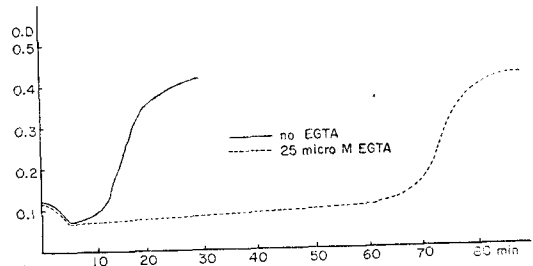


Fig. 1. Effect of a chelating agent, EGTA on the superprecipitation of 'natural actomyosin'. Reaction mixtures contained in final concentrations: KCl 100 mM, MgCl₂ 5 mM, Tris-Maleate buffer (pH 6.8) 20 mM, protein 0.5 mg/ml and ATP 0.5 mM.

medium 내의 유리 Ca⁺⁺농도에 natural actomyosin 이 매우 예민한 반응을 나타내고 있음을 알 수 있었다.

한편 superprecipitation 이 일어나고 있는 도중에 EGTA 를 첨가하였을 때 superprecipitation curve 는 하강하여 O.D. 가 감소하는 현상을 나타내었다(Fig. 2). 이 같은 O.D. 의 감소현상은 EGTA 의 양에 비례함을 보여 주었다. 즉 0.041 mM 의 EGTA 를 첨가하여 반응액 중의 유리 Ca⁺⁺농도를 1 μM 로 하였을 때 약간 감소한 후 다시 증가하여 25분 후에 maximum turbidity

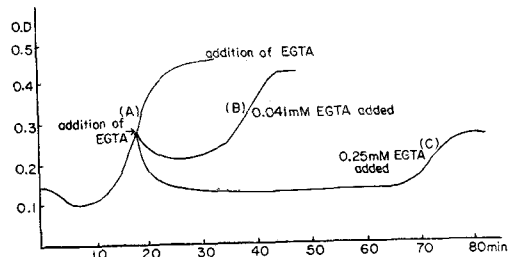


Fig. 2. Effect of EGTA added during and after the superprecipitation on the changes in turbidity of the 'natural actomyosin'. Reaction mixtures contained the same concentrations as in the Fig. 1. A) control, B) estimated free Ca⁺⁺ concentration, 1 micro M, C) 0.1 micro M.

에 도달하였으나 0.25 mM의 EGTA를 첨가하여 유리 Ca^{++} 농도를 $0.1 \mu M$ 로 하였을 때는 O.D.는 superprecipitation이 일어나기 전 상태에 까지 하강하였으며, 1시간 후에 maximum turbidity에 도달하였다. 또한 이때의 maximum turbidity는 EGTA를 첨가하지 않은 대조 superprecipitation이 나타낸 maximum turbidity에 도달하지 못함을 볼 수 있었다.

그러나 superprecipitation이 maximum에 도달한 후에 EGTA를 첨가하였을 때는 O.D.에 전혀 영향을 주지 아니하였다(Fig. 2).

2) EGTA의 Perry myosin B superprecipitation에 미치는 영향

Natural actomyosin에서 Ca^{++} sensitivity를 나타내게 하는 troponin과 tropomyosin을 처리하여 얻어진 Perry myosin B는 그 superprecipitation에 있어서 EGTA에 영향을 받지 아니하였다. Fig. 3-A에서 볼 수 있는 바와 같이 $25 \mu M$ 과 $50 \mu M$ 의 EGTA를 첨가하였을 경우 half-maximum에 도달되는 시간에 별차이를 보여주지 않으며, 또한 대조 superprecipitation의 그것과도 별 차이를 나타내지 않았다.

또한 EGTA를 superprecipitation 반응 도중 첨가하였을 때도 natural actomyosin의 경우와는 대조적으로 O.D.에는 전혀 변화를 주지 아니하였다(Fig. 3-B).

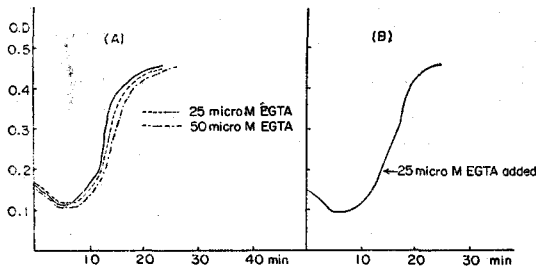


Fig. 3. Effect of EGTA on the superprecipitation of 'Perry myosin B'. Reaction mixtures contained the same concentrations as in the Fig. 1. A) EGTA added from the beginning of the reaction, B) EGTA added during the reaction.

3) Tropomyosin 0 Perry myosin B superprecipitation 및 Ca^{++} sensitivity에 미치는 영향

Perry myosin B의 superprecipitation은 $25 \mu g/ml$ 의 tropomyosin 첨가로 항진됨을 볼 수 있었다(Fig 4A).

Half-maximum turbidity에 도달되는 시간이 대조 superprecipitation이 17분 정도인데 반하여 tropomyosin

이 첨가된 경우 8분 정도로 단축되었다.

한편 tropomyosin의 존재가 Perry myosin B의 superprecipitation에 EGTA의 영향이 나타나도록 하지는 못하였다(Fig. 4-B). 처음부터 EGTA를 첨가한 경우 대조 superprecipitation의 half-maximum turbidity에 도달되는 시간과 별 차이를 보여주지 아니하였을 뿐만 아니라 반응 도중 EGTA를 첨가하였을 경우도 O.D.에 영향을 주지 아니하였다.

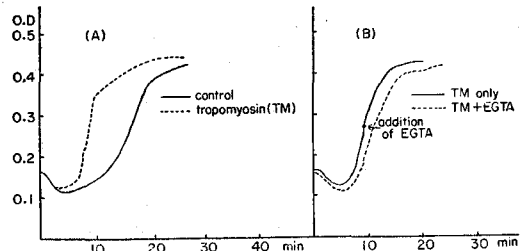


Fig. 4. A) Influence of tropomyosin on the superprecipitation of 'Perry myosin B'. B) Effect of tropomyosin on the response of 'Perry myosin B' to EGTA.

Tropomyosin 25 micro g, EGTA 25 micro M and other medium conditions was same as in the Fig. 1.

4) Troponin 0 Perry myosin superprecipitation 및 Ca^{++} sensitivity에 미치는 영향

Troponin은 Perry myosin B의 superprecipitation에 별 영향을 미치지 아니하였으며(Fig. 5-A), 또한 Perry myosin B에 Ca^{++} sensitivity도 주지 못하였다(Fig. 5-B). Perry myosin B의 EGTA에 대한 sensitivity는

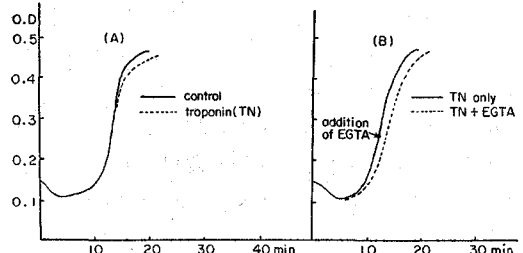


Fig. 5. A) Effect of troponin on the superprecipitation of 'Perry myosin B'.

B) Effect of troponin on the response of 'Perry myosin B' to EGTA.

Troponin 25 micro g. Reaction conditions; same as in the Fig. 1.

tropomyosin 이나 troponin 이나 단독으로 존재할 때는 생기지 아니함을 볼 수 있었다.

5) Troponin 및 tropomyosin 이 존재할 때 Perry myosin B superprecipitation 과 Ca⁺⁺ sensitivity 에 미치는 영향

Perry myosin B 에 troponin 과 tropomyosin 을 동시 첨가한 결과 EGTA 의 영향은 natural actomyosin 때와 같은 결과를 얻을 수 있었다(Fig. 6).

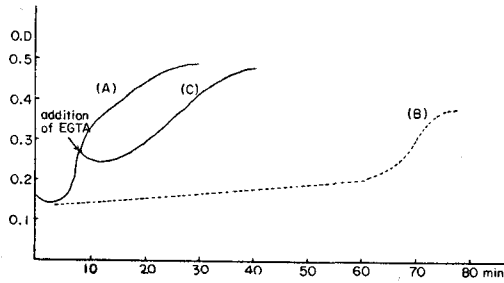


Fig. 6. Effect of troponin+tropomyosin on the response of 'Perry myosin B' to EGTA. Medium contained the same concentrations as in the Fig. 1. except for troponin 25 micro g and tropomyosin 25 micro g. A) control, B) adding EGTA from the beginning, C) adding the chelating agent during the course of the reaction. EGTA: 25 micro M.

처음부터 EGTA 를 첨가하였을 경우 natural actomyosin 의 superprecipitation 과 같이 70분 정도 경과 후에 half-maximum 에 도달하였으며, 반응도중 EGTA 을 첨가한 결과 역시 superprecipitation curve 는 하강하여 O. D. 의 감소를 보여 준 후 점차 O. D. 가 증가하여 다시 maximum 에 도달되었다.

고 찰

Ebashi⁴⁾는 natural actomyosin 을 trypsin 으로 처리하였을 때 EGTA 의 첨가로 superprecipitation 에 영향을 미치지 못함을 관찰하였고, 이 trypsin-treated actomyosin 에 tropomyosin-like protein 을 첨가하여 다시 Ca⁺⁺ sensitivity 가 회복됨을 보고하였다. 또한 Perry⁹⁾는 trypsin 으로 처리하는 대신 pH 8.6 0°C 에서 48시간 방치함으로써 natural actomyosin 을 trypsin 으로 처리한 결과와 같음을 보고하였다.

이어 Ebashi¹⁰⁾는 actin 과 myosin 의 interaction 에 Ca⁺⁺-sensitivity 를 주는 tropomyosin-like protein 에서 troponin 을 분리하였고, 이 단백질이 Ca⁺⁺와 binding

하는 protein 임을 증명하고, troponin 이 단독 존재할 때는 Ca⁺⁺-sensitivity 를 나타내지 못하지만 tropomyosin 과 함께 존재할 때 Ca⁺⁺-sensitivity 를 회복시킴을 관찰하고, troponin 이 Ca⁺⁺-receptive protein 이며 contraction 에 trigger 역할을 한다고 보고하였다.

본 실험에서도 Perry myosin B 의 superprecipitation 은 10 μM 정도 이하의 유리 Ca⁺⁺농도 변화에 별 영향을 받지 아니하였다(Fig. 3-A, B.). 그러나 troponin 과 tropomyosin 이 함께 존재할 때는 Perry myosin B 는 natural actomyosin 과 같이 소량의 Ca⁺⁺농도 변화에 superprecipitation 은 예민한 영향을 보여주었다(Fig. 6). 그러나 troponin 과 tropomyosin 의 단독 존재에 의하여 이 같은 Ca⁺⁺-sensitivity 는 회복되지 못하였다(Fig. 4, 5). Actomyosin 의 superprecipitation 과 ATPase activity 는 ionic strength 와 Mg⁺⁺ 농도, 그리고 ATP 농도가 높을수록 억제되고, 농도가 낮을수록 촉진됨이 보고되었고¹³⁻¹⁵⁾ 특히 superprecipitation 에서 이들 농도가 높아짐에 따라 clearing phase 가 길어짐이 보고되었다^{16,17)}.

이는 actin 과 myosin 의 association 과 dissociation (muscular contraction and relaxation in vivo)이 ionic strength 와 Mg⁺⁺ 그리고 ATP 농도 등에 의하여 영향을 받을 수 있다는 증거이지만 Katz¹⁸⁾는 이 같은 영향이 매우 많은 농도의 변화에서만 나타나므로 생리적으로 근 수축과 이완이 이들에 의해서 조절될 것으로 생각하기는 힘들다고 주장하였다. 그러나 tropomyosin 과 troponin 의 존재하에서 actomyosin 의 superprecipitation 과 ATPase activity 는 근세포가 조절할 수 있는 Ca⁺⁺농도의 변화(10⁻⁵~10⁻⁷M)에 예민한 영향을 받으므로^{4,5,10)} Ca⁺⁺이 excitation-contraction coupling 에 있어서 final physiological mediator 이라고 주장되고 있다¹⁹⁾.

본 실험에서 natural actomyosin 의 superprecipitation 이 10 μM 에서 2 μM 정도로 Ca⁺⁺농도가 감소함으로써 상당한 억제를 보여줌(Fig. 1)은 이같은 사실과 일치한다고 생각할 수 있었다.

한편 actomyosin superprecipitation 이 Ca⁺⁺에 의하여 trigger 된다면 superprecipitation 진행중 Ca⁺⁺의 제거로서 반응을 중지시키거나 나아가 actin-myosin 의 dissociation 이 일어날 수 있는 가능성을 생각할 수 있을 것이다. 본 실험 결과에서 보이는 바와 같이 미량의 Ca⁺⁺농도 변화는 actin 과 myosin 의 association 에 영향을 줄 뿐만 아니라(즉 superprecipitation 의 지연 혹은 clearing phase 의 연장), 일단 superprecipitation 이 일어난 actomyosin 에서도 dissociation 을 일으킬 수 있음을 관찰할 수 있었다(Fig. 2). 즉, natural actomyosin 에서

superprecipitation 이 진행되고 있는 도중 EGTA 의 첨가로 10 μ M 정도의 유리 Ca^{++} 을 0.1 μ M 로 줄임으로서 curve 가 하강하여 superprecipitation 이 일어나기 전 level 까지 내려감을 볼 수 있었다.

이 같은 Ca^{++} 농도 감소에 의한 dissociation 현상은 Perry myosin B에서는 볼 수 없었으며, 여기에 troponin 과 tropomyosin 이 함께 첨가되었을 때 natural actomyosin 때와 같은 현상이 나타났으며 (Fig. 6), troponin 과 tropomyosin 이 단독으로 존재할 때는 dissociation 이 일어나지 아니하였다 (Fig. 4, 5).

이 같은 현상은 Ca^{++} 이 troponin 과 tropomyosin 존재하에서 actin 과 myosin 의 interaction 에 trigger 의 역할을 할 뿐만 아니라, 그 농도가 감소함으로써 ATP 가수분해에 의한 associated actin-myosin complex 의 dissociation 에도 trigger 의 역할을 하는 vivo 의 근 수축과 이완을 보여 주는 model 이라고 사료되었다.

ATP 는 actin 과 myosin 의 interaction 에 dual effect 를 가지고 있음을 잘 알려진 사실이다¹⁹⁾. 즉, actomyosin sol 에 ATP 를 첨가하면 그 viscosity 가 감소하고, 점차 ATP 가 가수분해 되면서 그 농도가 감소되면 다시 viscosity 가 증가하고, 이 viscosity 증가는 Ca^{++} 을 첨가하므로써 촉진됨이 보고되었다²⁰⁾.

또한 actomyosin gel 에 ATP 를 첨가하면 그 혼탁도가 감소하는 소위 clearing 을 볼 수 있으며, 이때 myosin 이 가지는 ATPase 에 의해서 ATP 가 가수분해되면서 그 농도가 감소되면 superprecipitation 이 일어남이 보고되었다¹⁷⁾. 그리고 ATP 의 농도가 낮을 수록 superprecipitation 이 빨리 일어남이 보고되었다¹⁵⁾.

본 실험에서도 ATP 첨가에 의해 superprecipitation 이 일어나기 전에 clearing 이 일어남을 볼 수 있었으며, superprecipitation 이 일어난 후 반응 도중 Ca^{++} 농도의 감소는 ATPase activity 를 억제시켰으며²¹⁾, 그 결과 용액중에 남아있는 ATP 에 의해 actin 과 myosin 의 dissociation 이 일어나 O. D. 가 감소한 것으로 사료되었다.

Maximum turbidity 에 도달된 후 EGTA 를 첨가하여도 dissociation 이 일어나지 아니하였다는 사실과 (Fig. 2) Ca^{++} 농도 감소에 의해서 감소된 O. D.와 이후 다시 superprecipitation 이 maximum 에 도달되었을 때의 O. D. 가 같다는 사실 (Fig. 2)은 이를 더욱 뚜렷이 뒷받침하는 증거라고 생각되었다.

이상의 관찰과 실험적 근거로 미루어 보아 actin 과 myosin 의 association 및 dissociation 은 ATPase activity 와 ATP 농도사이의 balance 에 의해 결정되며, optimal balance 에 있을 때는 association 이 일어나고, ATPase

activity 보다 ATP 농도가 지나 칠 때는 actin-myosin 의 association 상태에 관계없이 dissociation 을 초래할 수 있으며, 이 같은 양자사이의 balance 는 troponin 과 tropomyosin 존재하에서 소량의 Ca^{++} 농도 변화에 의해 효율적으로 조절될 수 있다고 사료되었다.

결 론

- 1) ATP 존재하에서 Ca^{++} 농도를 조절함으로써 actin 과 myosin 의 association 과 dissociation 을 관찰하였다.
- 2) Natural actomyosin 의 superprecipitation 은 EGTA 존재하에서 상당한 시간 경과 후에 시작하였다.
- 3) Superprecipitation 이 half-maximum 에 도달하였을 때 EGTA 를 첨가하므로써 superprecipitation curve 는 하강하였으며, 이 같은 하강 정도는 EGTA 양에 비례하였다. 특히 0.25 mM 의 EGTA 를 첨가하였을 때는 superprecipitation 이 일어나기 전 level 까지 하강하였다.

한편 superprecipitation 이 maximum 에 도달된 후에 EGTA 를 첨가하였을 때는 superprecipitation curve 에 영향을 미치지 아니하였다.

- 4) Perry myosin B 의 superprecipitation 은 EGTA 에 영향을 받지 아니하였다. 즉 처음부터 EGTA 가 존재하였을 때 superprecipitation 의 시작에 영향을 주지 아니하였을 뿐만 아니라 superprecipitation 도중 EGTA 를 첨가하여도 그 curve 에 전혀 변화를 주지 아니하였다.

- 5) Tropomyosin 존재하에서 Perry myosin B 의 superprecipitation 은 처음부터 첨가한 경우나 superprecipitation 도중 첨가한 경우나 EGTA 에 영향을 받지 아니하였다.

- 6) Troponin 존재하에서도 Perry myosin B 의 superprecipitation 은 EGTA 에 영향을 받지 아니하였다.

- 7) Tropomyosin 과 troponin 이 동시에 존재할 때 Perry myosin B 의 superprecipitation 은 natural actomyosin 때와 같이 EGTA 에 의하여 예민한 영향을 받았다. 즉 처음부터 EGTA 가 존재할 때 superprecipitation 은 상당한 시간 경과 후에 시작하였고, 반응 도중 첨가하므로써 superprecipitation curve 는 하강하였다.

- 8) Actin 과 myosin 의 interaction 은 tropomyosin 과 troponin 의 존재하에서 Ca^{++} 농도 변화에 예민한 영향을 받고 있음을 알 수 있었으며, 따라서 ATP 존재하에서 Ca^{++} 농도를 조절함으로써 시험관 내에서 근 수축과 이완을 재현할 수 있었다.

<본 실험수행에 있어서 시중 협력지도하여 주신 이

광수 교수님의 노고에 충심으로 감사드립니다.>

REFERENCE

- 1) Szent-Gyorgy, A.: *Chemistry of muscular contraction*. New York Academic, 1947.
- 2) Huxley, H. E.: *The mechanism of muscular contraction*. *Science*, 164: 1356-1366, 1969.
- 3) Levy, H. M. and Ryan, E. M.: *Evidence that the contraction of actomyosin requires the reaction of ATP and Mg^{++} at two different sites*. *Biochemische Zeitschrift*, 345: 132-147, 1966.
- 4) Ebahi, S.: *Third component participating in the superprecipitation of natural actomyosin*. *Nature*, 200:1010, 1963.
- 5) Katz, A. M.: *Purification and properties of a tropomyosin-containing protein fraction that sensitizes reconstituted actomyosin to calcium binding agent*. *J. Biol. Chem.*, 241:1522-159, 1966.
- 6) Ashely, C. C.: *Calcium and the activation of skeletal muscle*. *Endeavour*, 9:18-25, 1971.
- 7) Bianchi, C. P.: *Cell calcium*. Butterworths, London, p. 85-97, 1968.
- 8) Ebashi, S.: *Personal communication*.
- 9) Perry, S. V., Davies, V. and Hayter, D.: *Natural tropomyosin and the factor sensitizing actomyosin ATPase to EGTA*. *Biochem. J.*, 99: 1C-2C, 1966.
- 10) Ebashi, S., Kodama, A. and Ebashi, F.: *Tropomyosin*. *J. Biochem.*, 64:465-477, 1968.
- 11) Katz, A. M.: *Influence of Tropomyosin upon the reactions of actomyosin at low ionic strength*. *J. Biol. Chem.*, 239: 3304-3311, 1964.
- 12) Katz, A. M., Repke, D. I., Upshaw, J. E. and Polascik, M. A.: *Characterization of dog cardiac microsomes*. *Biochem. Biophys. Acta*, 205:473-490, 1970.
- 13) Maruyama, K. and Watanabe, S.: *The role of Mg^{++} and Ca^{++} on the superprecipitation of myosin B*. *J. Biol. Chem.*, 240:105-111, 1965.
- 14) Watanabe, S. and Yasui, S.: *Effect of Mg^{++} and Ca^{++} on the superprecipitation of myosin B*. *J. Biol. Chem.*, 240:105-111, 1965.
- 15) 홍사악, 박찬웅, 김명석, 정명희: *Mitochondria의 Calcium uptake에 미치는 ouabain의 영향*. 대한약리학잡지, 8:67-75, 1972.
- 16) Maruyama, K. and Gergely, J.: *Interaction of actomyosin with ATP at low ionic strength*. *J. Biol. Chem.*, 237:1095-1099, 1962.
- 17) Maruyama, K. and Gergely J.: *Interaction of actomyosin with ATP at low ionic strength*. *J. Biol. Chem.*, 237:1100-1106, 1962.
- 18) Katz, A. M.: *Contractile proteins of heart*. *Physiol. Review*, 50:63-153, 1970.
- 19) Ruch, T. C. and Patton, H. D.: *Physiology and Biophysics*. W. B. Saunders, London: p. 129, 1965.
- 20) Mommaerts, W. F. H. M.: *The reaction between actomyosin and ATP*. *J. Gen. Physiol.* 31:361-375.
- 21) *Unpublished data in this laboratory*.