

Actomyosin Ca^{++} Activated Adenosinetriphosphatase*

활성도에 대한 pH 및 온도의 영향

연세대학교 의과대학 생리학교실

김희중 · 황애란 · 박양생 · 강두희

=Abstract=

pH-Temperature Dependence of the Ca-ATPase Activity in Actomyosin Systems of Rabbit and Frog Skeletal muscle.

Hee Joong Kim, Ae Ran Hwang, Yang Saeng Park and Doo Hee Kang

Department of Physiology Yonsei University College of Medicine

The activity of the Ca^{++} activated adenosinetriphosphatase (Ca-ATPase) of actomyosin systems of rabbit and frog skeletal muscle has been studied at varying pH and temperature.

The pH optima of the Ca-ATPase activity of the rabbit actomyosin was rather broad. Over the temperature range of 16-36°C activity of the enzyme was not appreciably changed between pH 6.4-8.5; below and above which it rapidly reduced. The pH at the inflection point of the enzyme activity increased as temperature decreased, showing the ΔpH inflection/ ΔT of approximately -0.018 unit/°C. Consequently, $(OH^-)/(H^+)$ ratio at the inflection point was constant regardless of assay temperature.

In the frog actomyosin systems the Ca-ATPase activity was not apparently altered between pH 6.4-7.0 when the incubation temperature was 15~30°C. Outside of this range of pH, however, the enzyme activity was dramatically decreased. The pH of the inflection point changed inversely with temperature. ΔpH inflection/ ΔT at the acidic side was approximately -0.018 unit/°C, whereas that at the alkaline side it was about -0.037 unit/°C.

The Arrhenius plot on the Ca-ATPase activity at constant $(OH^-)/(H^+)$ ratio of 1.0 was not linear, but showed break at arround 20°C for both rabbit and frog actomyosin preparations.

From these results it was speculated that pH dependence of Ca-ATPase activity of rabbit actomyosin systems might reflect titrations of histidine-imidazole and -SH groups, and that of the frog actomyosin represents titrations of histidine-imidazole and lysyllysine α -NH₂ groups.

I. 서 론

대부분의 동물에서 혈액의 pH는 체온의 변화에 맞추어 조절되고 있는데 그 결과 세포내액의 pH는 어느 온도에서나 중성으로 유지되고 단백질의 하전(charge)

상태는 항상 일정하게 유지된다(Rahn 등 1975). 세포가 수행하는 여러가지 작용은 단백질분자의 활동에 의하여 이루어지므로 단백질의 하전 상태는 결국 세포의 기능을 조절하게 된다. 예를들면 효소활동을 좌우하는 효소분자의 구조(conformation), 그리고 기질(substrate), activator 및 inhibitor와 효소분자간의 결합은 모두 단백질의 하전상태에 따라 달라진다. 마찬가지로 세포막을 통한 물질이동 역시 단백질분자의 하전에 따라 변화한다.

*본 연구는 1977년도 유한연구비의 지원으로 이루어 졌음.

이러한 사실은 Na-K-ATPase (Park 및 Hong 1976), acetyl Co-A carboxylase, fatty acid synthetase, NADH 및 succinate cytochrome reductase (Hazel 등, 미발표 논문) 등의 효소활동과 신피질조직의 능동적 p-aminohippurate 이동 (Park 및 Solomon, 1977)을 위한 optimal pH가 모두 온도가 낮아짐에 따라 증가하지만 optimal (OH⁻)/(H⁺)비는 온도에 무관하게 항상 일정한 사실로 뒷받침되고 있다.

따라서 동물체가 체액의 산-염기상태를 조절하는 것은 결국 단백질의 net charge를 일정하게 유지하여 세포기능을 위한 최적상태를 유지하기 위한 것이라고 할 수 있다.

본 연구에서는 토끼와 개구리의 골격근에서 분리한 actomyosin 분획의 Ca⁺⁺ activated adenosinetriphosphatase (Ca-ATPase) 활성도가 pH에 따라 변화하는 양상을 여러 온도에서 조사하여 효소분자의 하전상태와 효소활성도 간의 상관성을 규명하였다.

II. 실험재료 및 방법

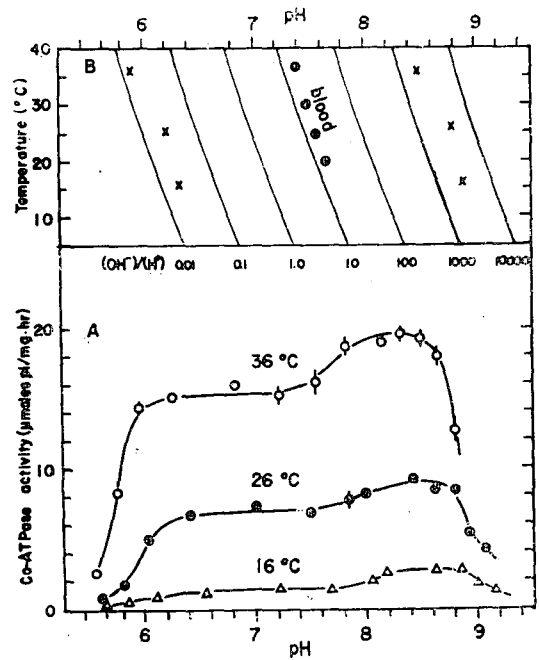
실험재료로는 토끼의 배근(back muscle)과 개구리 비장근(gastrocnemius muscle)에서 분리한 actomyosin 분획을 사용하였다. Actomyosin의 분리는 Levy 및 Fleisher 법(1965)에 의거 시행하였다. 즉 근육 매 gm 당 3ml의 냉각된(4°C) Weber-Edsall 용액(0.6 M KCl, 0.01 M Na₂CO₃, 0.04 M NaHCO₃, pH 7.5, 25°C)을 가한 후 waring blender로 homogenize하여 24시간 냉소(4°C)에 방치한 다음 0.6 M KCl를 가하여 3배로 희석한 후 gauze로 여과하여 여과물을 2,500×g로 20분간 원심분리하였다. 다음 상층액을 취하여 증류수로 0.1 M KCl이 될 때 까지 희석하므로써 actomyosin을 침전시켜 2,500×g로 20분간 원심분리하여 actomyosin 분획을 얻는다. 이것을 정제하기 위하여 다시 2.4 M KCl를 0.6 M KCl이 될 때 까지 가하여 actomyosin을 다시 용해시킨 후 20,000×g로 40분간 원심분리한 후 상층액에 증류수를 가하여 다시 KCl 농도가 0.1M이 되게 하여 actomyosin을 침전시켰다. 이상의 과정을 반복함으로써 비교적 순수한 actomyosin 분획을 얻었고 biuret 비색법(Weichselbaum 1946)으로 단백질 농도를 측정하였다.

Ca-ATPase 측정은 Hartshron (1972)의 방법과 유사한 방법으로 시행하였다. 즉 incubation 용액(30 mM KCl, 5 mM-MgCl₂, contaminated[Ca⁺⁺], acetate buffer pH 5.6~6.0, imidazole buffer pH 6.0~7.5, Tris buffer pH 7.5~9.0)에 actomyosin을 0.3~0.4 mg prote-

in/ml 농도로 가하여 2분간 preincubation 한 후 ATP를 0.5 mM 되게 가하여 2분간 incubation 하였다. 미리 냉각된 20% TCA를 가하여 반응을 정지시킨 후 3,000×g로 10분간 원심침전시켜 상층액에 유리된 무기인산(Pi)를 Fiske 및 Subbarow (1925)의 방법으로 측정하였다. Ca-ATPase 활성도는 incubation 용액내에 2 mM EGTA를 가한 경우의 활성도(즉 Mg-ATPase)를 전체 활성도에서 감하여 산출하였다.

III. 실험성적

먼저 Ca-ATPase 작용의 initial velocity를 얻는데 필요한 incubation 시간을 알기 위하여 ATP 가수분해에 의한 무기인산 (Pi)의 생성을 incubation 시간별로 조사한 바 25°C에서는 2분까지는 Pi 생성이 incubation



제 1도. A, Incubation 용액의 온도가 36, 26, 16°C 일 때 토끼 actomyosin의 Ca-ATPase 활성도에 대한 pH의 영향(실험예수 6, I: ±S.E., S.E.가 ±0.4 이하일 때는 symbol 내에 포함되어 있음).

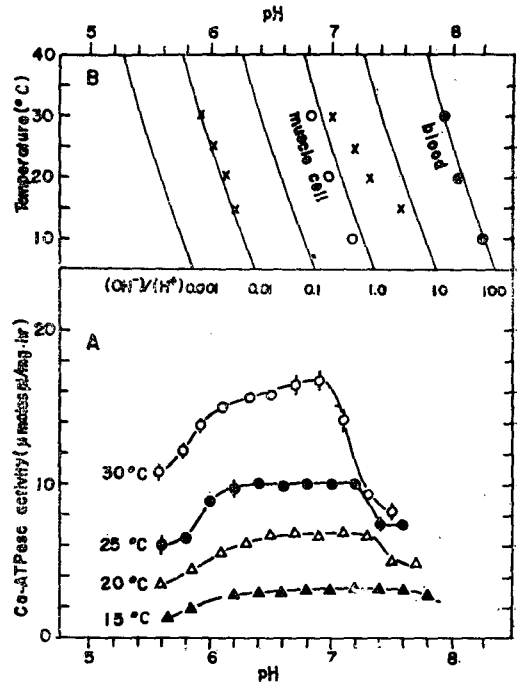
B, 토끼 actomyosin Ca-ATPase의 inflection point pH의 온도에 따른 변화 ×; inflection point 대각선들은 중성 pH (pN)의 온도에 따른 변화와 평행하는 선들로 특정 (OH⁻)/(H⁺)비에 대한 선들이다. 표유류 혈액에 대한 점들(•)은 Rosenthal (1948)로 부터 얻었음.

시간에 정비례하게 증가하였다. 따라서 이후의 실험에서 ATPase 활성도는 incubation 시간 2분동안에 생성되는 Pi 양을 기초로 하여 $\mu\text{moles Pi/mg. hr}$ 로 산출하였다.

제 1 도의 A 는 토끼 골격근의 actomyosin 분획에서 측정된 Ca-ATPase 활성도에 미치는 pH 의 영향을 여러 온도(즉, 16, 26 및 36°C)에서 비교한 것이다. 어느 온도에서나 생리적 pH 영역(즉, 세포내 pH 7.0 전후)에서는 효소 활성도가 pH 변화에 별로 영향을 받지 않았다. 그러나 pH 6.0 이하의 산성영역과 pH 8.8 이상의 염기성영역에서는 효소활성도가 급격히 감소되었는데, 효소활성이 급변하는 점(inflection point)의 pH 는 산성영역에서나 염기성영역에서나 모두 온도가 낮아짐에 따라 증가되었다.

제 1 도의 B 는 이 inflection point 의 pH 를 온도에 대한 함수로 나타낸 것인데 온도에 따른 변화율($\Delta\text{pH inflection}/\Delta T$)은 산성영역이나 염기성영역에서 모두 약 -0.018 정도로서 혈액의 pH 가 온도에 따라 변화하는 양상(Rosenthal, 1948)과 유사하였다. 그 결과 inflection point 의 $(\text{OH}^-)/(\text{H}^+)$ 비는 산성영역에서는 대략 2×10^{-2} , 그리고 염기성영역에서는 3×10^3 전후로 온도에 무관하게 일정하였다. 그런데 산성과 염기성영역에서의 효소활성도의 감소가 효소분자의 비가역적 변화에 의하여 초래된 결과일 수도 있으므로 actomyosin 분획을 25°C 에서 pH 5.6, 6.0, 6.4, 7.5, 8.5, 8.9 및 9.1 인 용액에 30분간 전처리(pretreatment)한 후 pH 7.5 용액에서 활성도를 측정된 결과 전처리한 pH 에 무관하게 동일한 값을 나타내었다. 따라서 제 1 도에 나타낸 성적은 inflection point 를 전후해서 효소-기질반응(enzyme-substrate reaction)이 급변한 결과임을 나타낸다.

한편 개구리 골격근의 actomyosin 분획에서 측정된 Ca-ATPase 활성도는 제 2 도 A 에 표시된 바와 같이 incubation temperature 가 15~30°C 일 때 pH 6.0~7.0 사이에는 효소활성도가 크게 변화되지 않았으나 강한 산성과 알칼리성영역에서는 급격히 감소하였는데 inflection point 의 pH 는 온도가 낮아짐에 따라 증가하였다. $\Delta\text{pH inflection}/\Delta T$ 는(제 2 도 B) 산성영역에서는 -0.018 정도로서 온도에 따른 근육세포의 pH 변화율(Reeves, 1972) 및 혈액의 pH 변화율(Howell et al. 1970)과 동일하였으나 염기성영역에서는 약 -0.037로서 체액의 경우보다 월등히 컸다. 따라서 inflection point 의 $(\text{OH}^-)/(\text{H}^+)$ 비는 산성영역에서는 어느 온도에서나 1.0 전후였으나 염기성영역에서는 온도가 낮아짐에 따라 증가하여 30, 25, 20 및 15°C 에서 자기 1.1, 2.3



제 2 도. A, Incubation 용액의 온도가 30, 25, 20, 15°C 일 때 개구리 actomyosin Ca-ATPase 활성도에 대한 pH 의 영향(실험예수 6~8, I ± S. E., S.E.가 ±0.4 이하일 때는 symbol 내에 포함되어 있음).

B, 개구리 actomyosin Ca-ATPase inflection pH 의 온도에 대한 변화 ×; inflection point, 대작선은 중성 pH (pN)의 온도에 대한 변화와 평행하는 선들로 특정 $(\text{OH}^-)/(\text{H}^+)$ 내에 대한 선들이다. 변온동물의 혈액(●) 및 근육 세포내액(○)에 대한 점들은 각각 Howell 등(1970) 및 Reeves(1972)로 부터 얻었음.

및 8이었다.

제 3 도는 $(\text{OH}^-)/(\text{H}^+)$ 비가 1.0일 때, 즉 세포내액의 pH 에서의 Ca-ATPase 활성도를 온도에 대한 함수로 나타낸 것인데, activation energy 를 산출하기 위하여 Arrhenius 식 (Dixon 및 Webb, 1964)을 적용하였다. 즉 Pi 생성의 initial rate 가 constant K 에 직접적으로 비례한다고 가정하면

$$d \ln K / dT = E_a / RT^2$$

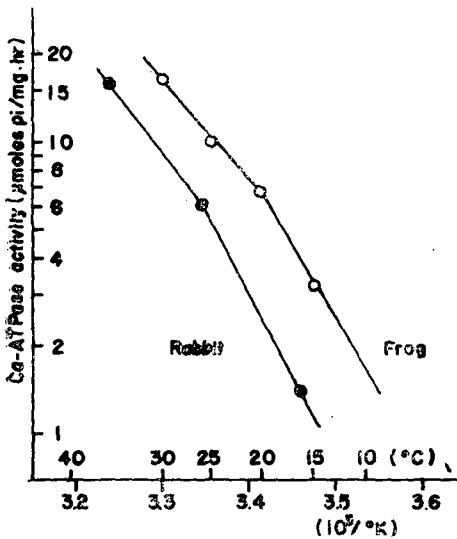
적분하면

$$\ln K = -E_a / RT + C$$

혹은

$$\log K = -E_a / 2.303 RT + C$$

(단 E_a : activation energy, Cal/mole, R: 기체상수 1.987 Cal/deg. mol, T: 절대온도, C: 상수)



제 3 도. 토끼 및 개구리 actomyosin Ca-ATPase 활성도에 대한 Arrhenius plot. 각 수치는 제 1도 및 제 2도에서 (OH⁻)/(H⁺) = 1.0 일 때로부터 얻었음.

제 1 표. 토끼 및 개구리 actomyosin Ca-ATPase의 activation energy

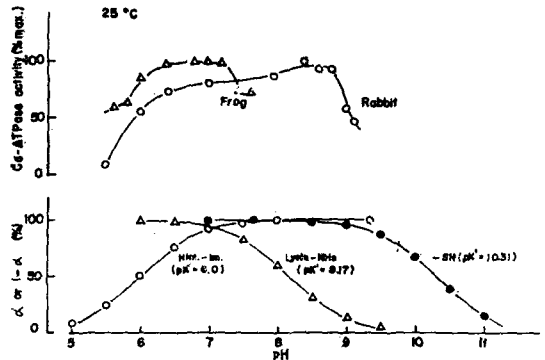
토끼		개구리	
온도 (°C)	Ea. (Kcal/mole)	온도 (°C)	Ea. (Kcal/mole)
16~26	27.81	15~20	25.44
26~36	14.86	20~30	15.79

그림에서 보는 바와 같이 토끼에서나 개구리에서나 Arrhenius plot는 하나의 기울기를 가진 직선으로 나타나지 않고 15~25°C 사이에서 직선의 기울기가 변했다. 그 결과 activation energy는 양 동물에서 흔히 25°C 이상에서는 약 15 Kcal/mole 그리고 20°C 이하에서는 26 Kcal/mole 정도를 나타내었다(제 1 표).

IV. 고 찰

용액중에서 해리되는 분자의 하전상태는 pH에 따라 달라지는데 이는 pH에 따라 그 분자에 수소이온(H⁺)이 결합되었던가 아니면 그 분자로부터 분리되어 나오기 때문이다.

효소작용에 대한 pH의 영향 역시, 효소분자, 기질(substrate) 또는 효소-기질 복합체와; 하전상태(charge



제 4 도. 위: 각 pH에서의 토끼 및 개구리의 Ca-ATPase의 상대적 활성도(% maximum). 각 수치는 제 1도 및 제 2도로 부터 계산하여 얻었음.

아래: protein의 몇가지 ionizable group의 ionization 분율

○—○; histidine-imidazole group

△—△; lysyllysine α-NH₂ group

●—●; -SH group

α; histidine imidazole 기의 ionized fraction

1-α; -SH 기 및 lysyllysine α-NH₂ 기의 nonionized fraction

state)를 변화시키기 때문에 나타난다(Dixon 및 Webb, 1964). 효소분자에 대한 pH의 영향은 active site가 H⁺에 의해 직접 titration 되던가 그와 다른 group들이 titration 되어 효소분자의 구조(conformation)가 달라진 결과 나타난다. 따라서 pH가 변화할 때 효소의 하전상태가 크게 변하지 않더라도 기질의 하전상태가 변화하면 효소-기질반응상태는 달라지게 된다. 일반적으로 효소활동은 최적 pH에서 최고치를 나타내고 그 이하 또는 이상의 pH 영역에서는 감소되는데 이는 최적 pH에서 그 효소반응의 구성분자들(효소와 기질)이 가장 효율적인 하전상태를 보유하기 때문이다.

그런데 ionizable group의 pK'치는 온도에 따라 변화될 수 있으므로 이들 group의 하전상태에 대한 pH의 영향은 온도에 따라 달라질 수 있다. 즉 Henderson-Hasselbalch 식에 의거



$$pH - pK' = \log \frac{(A^-)}{(HA)}$$

혹은

$$10^{(pH-pK')} = (A^-)/(HA) \text{이다.}$$

해리된 상태(즉 deprotonated state)의 분율은

$$\alpha = (A^-)/(HA) + (A^-) = [1 + 10^{(pK' - pH)}]^{-1} \text{가 된다.}$$

따라서 온도에 따라 pK'이 변화하면 pH가 일정 하더라도 ionizable group의 하전상태는 달라지게 된다.

그러나 만일 온도가 변화할 때 pK' 이 변화되는 것과 같은 정도로 용액의 pH 를 변화시키면(즉 $pH-pK'$ 을 일정하게 유지하면) ionizable group의 하전상태는 일정하게 유지될 수 있다.

본 연구에서 토끼 골격근에서 분리한 actomyosin 분획의 Ca-ATPase 활성도는 생리적 pH 영역(pH 6~8)에서는 큰 변동을 보이지 않았으며 명확한 최적 pH를 나타내지 않았는데(제 1도 참조) 그 기전은 명확치 않다. 전술한 바와 같이 효소활동에 대한 pH의 영향은 효소분자내의 여러 ionizable group과 기질의 하전상태에 영향을 미치므로서 나타나는데 pH가 6~8사이에서 변할때는 개개의 ionizable group의 하전상태의 변화가 Ca-ATPase 활동에 미치는 영향이 서로 상쇄되어 전체적으로는 Ca-ATPase 활성도가 동일하게 나타나는 것으로 생각된다. 이처럼 Ca-ATPase가 생리학적 pH 영역에서는 pH 영향을 비교적 덜 받는다는 사실은 그 기전 여하에 불문하고 생리학적으로 중요한 의의를 갖는다고 생각된다. 즉 근육이 심한 운동을 할 때 lactic acid 등의 유기산이 축적되어 근육세포에 과산증이 생기더라도 Ca-ATPase가 크게 영향을 받지 않는다면 근육수축능은 크게 변하지 않을 것이다. 따라서 이와 같은 현상은 근육세포가 갖는 적응현상의 하나라고 사료된다.

한편 Ca-ATPase 활성도가 급변하는 inflection point의 pH는 온도가 낮아짐에 따라 증가했는데 그 변화율($\Delta pH \text{ inflection} / \Delta T$)은 산성영역에서나 염기성영역에서나 동일하게 $-0.018 \text{ unit}/^{\circ}\text{C}$ 내외였다. van't Hoff 의식(Dixon 및 Webb, 1964)에 의하면 ionization enthalpy (ΔH)는 다음과 같이 규정된다. $\Delta H = -2.3 RT^2(\Delta pK' / \Delta T)$. 만일 $\Delta pK' / \Delta T$ 가 $-0.018 \text{ unit}/^{\circ}\text{C}$ 이면 ΔH 는 약 7 Kcal/mole 이 되는데 이 값은 histidine-imidazole기 ($pK'=6.0$, $\Delta H=6.9 \text{ Kcal/mole}$, Kirby 및 Neuberger, 1938)나 $-SH$ 기 ($pK'=10.31$, $\Delta H=6.9 \text{ Kcal/mole}$, Benesch 및 Benesch, 1955)에서 볼 수 있는 수치이다. 따라서 본 연구에서 관찰한 토끼 골격근 actomyosin Ca-ATPase 활성도의 inflection point는 산성영역에서는 아마도 효소분자내의 histidine-imidazole기의 titration을, 그리고 염기성영역에서는 $-SH$ 기의 titration에 의하여 주로 결정되는 것으로 추측된다. 이와 같은 추측을 뒷받침하는 사실은 histidine-imidazole기와 $-SH$ 기의 해리곡선이 토끼 골격근 actomyosin의 Ca-ATPase 활성도에 대한 pH의 영향과 유사한 점을 들 수 있다(제 4도). 이러한 사실들은 Ca-ATPase 활성도에 대한 pH의 영향이 주로 histidine-

imidazole기와 $-SH$ 기의 해리상태를 변화시키므로서 나타남을 암시 한다.

한편 개구리 골격근의 actomyosin Ca-ATPase의 경우에는 pH 6~7 사이에는 효소 활성도가 크게 변하지 않았으나 그 이하나 이상의 pH에서는 급격히 감소하였는데 이 inflection point의 pH는 온도에 따라 달라졌다(제 2도 A 참조). 이때 $\Delta pH \text{ inflection} / \Delta T$ 는 산성영역에서는 토끼에서와 같이 $-0.018 \text{ unit}/^{\circ}\text{C}$ 정도였으나 염기성영역에서는 $-0.037 \text{ unit}/^{\circ}\text{C}$ (제 2도 B 참조)로서 토끼의 경우와 상이하였다. $\Delta pK' / \Delta T$ 가 -0.037 인 group의 ΔH 는 약 15.0 Kcal/mole 에 해당하는데 이와 유사한 값을 나타내는 것으로는 lysyllysine $\alpha-NH_2$ 기 ($pK'=8.17$, $\Delta H=12.7 \text{ Kcal/mole}$)를 들 수 있다. 따라서 25°C 에서 측정된 개구리 골격근의 actomyosin Ca-ATPase 활성도에 대한 pH의 영향을 histidine-imidazole기와 lysyllysine $\alpha-NH_2$ 기의 해리곡선과 비교한 결과 양자가 유사한 형태를 보였다(제 4도 참조). 그러므로 개구리 골격근 actomyosin의 Ca-ATPase 활성도에 대한 pH의 영향은 주로 histidine-imidazole기와 lysyllysine $\alpha-NH_2$ 기의 하전 상태를 변화시키므로서 나타난다고 사료된다.

이상에서 우리는 pH에 따른 효소분자의 하전상태만을 고려했으며 기질분자의 하전에 대해서는 전혀 고려하지 않았는데 이는 본 실험에서 취급한 pH 영역(5~9)에서는 기질의 하전상태가 크게 변하지 않음 때문이다. 즉 Wolf (1971)에 의하면 Ca-ATPase의 기질은 $MgATP^{2-}$ 인데 $MgHATP^{1-}$ 의 pK' 은 5.0이므로 pH 6.0에서는 91%가 $MgATP^{2-}$ 형태이고 pH 8.0 이상에서는 거의 100%가 $MgATP^{2-}$ 형태이며 $MgHATP^{1-}$ 는 거의 없다.

일반적으로 Ca-ATPase 활성도에 대한 온도의 영향을 조사할 때 용액의 pH를 어느 한 점으로 고정한 후(보통 pH 7~8) 온도만 변화시키는 경향이 있는데 본 연구결과에 의하면 토끼 actomyosin의 경우에는 pH 7~8사이에서는 어느 온도에서나 효소활성도가 pH 변화에 크게 영향을 받지 않으므로(제 1도 참조) pH를 고정해도 무방하겠으나 개구리 actomyosin에서와 같이 pH 7.0 이상에서는 pH 변화에 따른 효소활성도의 변화가 온도에 따라 상이할 때에는(제 2도 참조) 용액의 pH를 온도에 따라 달리 조절하여 각 온도에서 세포내액의 pH와 같게 해 주지 않으면 그 결과는 생리학적으로 별 의미가 없게 될 것이다. 따라서 본 연구에서는 Ca-ATPase 활성도에 대한 온도의 영향을 조사함에 있어서 각 온도에서 용액의 pH를 세포내액의

pH와 동일하게 조절한 후[즉 $(OH^-)/(H^+) \approx 1.0$] 효소활성도를 비교했는데 Arrhenius plot는 토끼에서나 개구리에서나 직선으로 나타나지 않고 20°C 전후에서 회절하였으며(제3도 참조), 그 결과 activation energy는 20°C 이상에서 보다 그 이하에서 증가되었다(제1표 참조). 이와 유사한 결과가 과거 타 연구자들에 의해서도 보고된 바 있는데 이러한 현상의 기전에 대해 Levy 등(1962)은 온도에 따른 actomyosin의 conformation의 변화 때문이라고 하였으며, Bárány (1967)는 저온에서 actin과 myosin의 dissociation이 증가되므로 activation energy가 커진다고 했다. 그러나 Barouch 및 Moos (1971)는 acto-heavy meromyosin을 이용한 실험을 통하여 actin과 myosin이 저온에서 dissociation된다는 증거가 없음을 제시한 후 Arrhenius plot이 직선이 되지 않는 것은 온도에 따른 myosin의 aggregation 현상에 의한 것일 거라고 추측하였다. 최근 Hartshorne (1972) 등은 이 문제를 계통적으로 추구하고 Arrhenius plot의 곡선은 Ca^{++} 및 troponin A가 없을 때에는 나타나지 않음을 발견하고 Ca^{++} -loaded troponin A에 의한 actin 작용의 변화가 온도에 따라 상이하기 때문에 나타나는 현상이라고 설명하였다. 이러한 가설의 진위여부는 본 연구결과로는 알 수 없으나 토끼에서나 개구리에서나 Arrhenius plot의 형태가 유사한 것으로 보아 nonlinear Arrhenius plot이 나타나는 기전은 두 동물에서 동일한 것으로 생각된다.

V. 결 론

토끼 및 개구리의 골격근에서 분리한 actomyosin의 Ca-ATPase 작용에 대한 pH의 영향을 여러 온도에서 조사하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 토끼의 경우 incubation 온도가 16~36°C 일 때, Ca-ATPase 활성도는 pH 6.4—8.5 사이에는 크게 변하지 않았으나 그 이하 또는 그 이상의 pH에서는 급격히 감소되었는데, 효소활성도가 급변하는점(inflection point)의 pH는 산성영역에서나 염기성영역에서나 온도가 낮아짐에 따라 증가하였으나 그때의 $(OH^-)/(H^+)$ 비는 일정하였다. 따라서 $\Delta pH_{inflection}/\Delta T$ 는 약 $-0.018 \text{ unit}/^\circ\text{C}$ 를 나타내었다.

2. 개구리 actomyosin에서는 온도가 15~30°C 일 때 pH 6.4—7.0 사이에서는 효소활성도가 별 변화를 보이지 않았으나 그 이하와 그 이상의 pH에서는 감소했으며 inflection point의 pH는 온도가 낮아짐에 따

라 증가했다. $\Delta pH_{inflection}/\Delta T$ 는 산성영역에서는 약 $-0.018 \text{ unit}/^\circ\text{C}$ 이었으나 염기성 영역에서는 약 $-0.037 \text{ unit}/^\circ\text{C}$ 이었다.

3. 토끼에서나 개구리에서나 actomyosin의 Ca-ATPase 활성도에 대한 Arrhenius plot는 직선이 아니고 20°C 근방에서 회절하였다.

이상과 같은 결과는 actomyosin Ca-ATPase에 대한 pH의 영향이 토끼에서는 효소분자내의 histidine-imidazole기와 -SH기의 해리도에 의하여, 그리고 개구리에서는 histidine-imidazole기와 lysyllysine α -NH₂기의 해리도에 의하여 각기 결정됨을 시사한다고 사료된다.

참고문헌

- 1) Barany, M.: *ATPase activity of myosin correlated with speed of muscle shortening. J. Gen. Physiol. 50:197, 1967.*
- 2) Barouch, W.W. and C. Moos: *Effect of temperature on actin activation of heavy meromyosin ATPase. Biochim. Biophys. Acta. 234:183, 1971.*
- 3) Benesch, R.E. and R. Benesch: *The acid strength of the -SH group in cysteine and related compounds. J. Am. Chem. Soc. 77: 5877, 1955.*
- 4) Dixon, M. and E.C. Webb: *Enzymes, 2nd ed., London: Longmans, Green, 1964.*
- 5) Fiske, C.H. and Y. Subbarow: *The colorimetric determination of phosphorous. J. Biol. Chem. 66:375, 1925.*
- 6) Hartshorne, D.J., E.M. Barans, L. Parker and F. Fuchs: *The effect of temperature on actomyosin. Biochem. Biophys. acta. 276: 190, 1972.*
- 7) Hazel, J.R., W.S. Garlick and P.A. Sellner: *The effects of assay temperature upon the pH optima of enzymes from poikilotherms: A test of the imidazole alphasat hypothesis (in press).*
- 8) Howell, B.J., F.W. Baumgardner, K. Bondi and H. Rahn: *Acid-base balance in cold-blooded vertebrates as a function of body temperature. Am. J. Physiol. 219:600, 1970.*
- 9) Kirby, A.H.M. and A. Neuberger: *Glyoxalines:*

- The determination of their pK' values and the use of their salts as buffers. Biochem. J. 32:1146, 1938.*
- 10) Levy, H.M., N. Sharon, E.M. Ryan and D.E. Koshland: *Effect of temperature on the rate of hydrolysis of ATP and ITP by myosin with and without modifiers. Evidence for a change in protein conformation. Biochim. Biophys. Acta. 56:118, 1962.*
- 11) Levy, H.M. and M. Fleisher: *Studies on the superprecipitation of actomyosin suspensions as measured by the change in turbidity. 1. Effects of ATP concentration and temperature. Biochem. Biophys. Acta. 100:471, 1965.*
- 12) Park, Y.S. and S.K. Hong: *Properties of toad skin Na-K-ATPase with special reference to effect of temperature. Am. J. Physiol. 232:1356, 1976.*
- 13) Park, Y.S. and S. Solomon: *pH-temperature dependence of organic acid transport in rat kidney slices. Am. J. Physiol. 235:F 382, 1977.*
- 14) Rahn, H., R.B. Reeves and B.J. Howell: *Hydrogen ion regulation, temperature and evolution. Am. rev. Resp. Disease. 112:165, 1975.*
- 15) Reeves, R.B.: *An imidazole alphastat hypothesis for vertebrate acid-base regulation: Tissue CO₂ content and body temperature in bullfrogs. Resp. Physiol. 14:219, 1972.*
- 16) Rosenthal, T.B.: *The effect of temperature on the pH of blood and plasma in vitro. J. Biol. Chem. 173:25, 1948.*
- 17) Weichselbaum, T.E.: *Accurate and rapid method for determination of protein in small amounts of blood serum and plasma. Am. J. Clin. Pathol. Suppl. 10:40, 1946.*
- 18) Wolf, H.W.: *Studies on a Ca⁺⁺ dependent ATPase of human erythrocyte membrans. Biochem. Biophys. Acta. 266:361, 1972.*