

장력발생이 근육 분자막에 미치는 영향에 관한 연구

김덕술·박근호

창원대학교 공업화학과

A Study on the Effects of Muscle Membrane in Tension Development

Kim, Duck-Sool · Park, Keun-Ho

*Department of Chemical Technology, Changwon National
Sarim-dong Changwon, Kyungnam, 641-773 Korea*

(Received Feb., 20, 1998)

ABSTRACT

On contraction of the muscles, marked changes in X-ray reflections are observed, suggesting that conformational changes of contractile molecules and the movement of myosin heads during muscle contraction. The time needed to the peak tension after the onset of stimulation and the amount of peak tension depend on the number of twitch cycle. It was found that the successive twitches decreased not only the time needed to the peak tension after the onset of stimulation but also the time needed to the maximum change of the X-ray intensity. However, the difference of the time between the peak tension and the maximum intensity change ($T_i - I_i$) is nearly the same at any twitch. Based on these results the causes of the decrease of T_i and I_i , and physiological implication of $T_i - I_i$ are discussed.

I. 서론

X-ray 구조분석은 지금까지 여러 분야에 응용되어 왔다. 특히 benzene, toluene 등 화학약품으로 많이 쓰이는 시약의 분자구조를 이용한 실험은 이제는 일반화 되어 있다. 그 가운데 생체막이 화학약품을 이용한 동물성 및 식물성 지방 등을 분리정제도 이용 가능한 시대로 접어들고 있다. 이러한 연구에서는 그 메커니즘을 연구하는 것이 중요한데, 본 연구에서는 생체 근육막에서 발생되어지는 문제를 연구하고자 한다. 먼저 개략적인 근육구조를 보자면, 근육수축에 따른 분자구조에 관해서는 지금까지 몇 가

지의 가설이 있어 왔다. 그 가운데 가장 유력한 설로서는 myosin head 진동설 혹은 회전설이다^{1~3)}. 이 가설에 의하면, myosin filament로부터 나온 head가 actin과 결합한 후 각도가 변화하며, 이 head의 각도변화가 myosin filament와 actin filament간의 미끄럼운동을 발생시킨다. 또 근육이 장력을 발생시킬 때도 myosin head에 큰 각도변화가 일어난다. 이 역학적 변화가 ATP 분해 cycle의 중요한 역할을 맡는 것으로 되어 있다. 이러한 가설을 기본으로 myosin head의 역학적 변화, 에너지변환의 작용 등을 증명하는 실험들이 많이 소개되었다^{4~6)}. 그리고 지금까지 연구결과는 근육이라는 조직세포로 구성된 것 중에서 actin과 myosin이 어떻게 분자변화를

동반한 분자 상호간의 힘을 발생시키는 가를 밝히는 것이었다. 지금까지의 X선 측정에 의하면, 근육단백질의 구조변화는 최대장력 발생에 의해서 매우 빨리 완료된다. 이것은 actin-myosin 분자가 이완상태에서 힘발생의 구조상태로 다시 전이하는 것으로 생각된다⁷⁻⁹⁾. 그러나, 이완상태에서 구조변화로의 전이에는 myosin head가 가는 filament로 이동 및 myosin head를 일정하게 정리하는 시간이 포함되어 있다.

본 연구에서는 생체 근육과 X선 회절 광학계를 사용하여 실험하였고, ringer 용액으로 분자막 안에서 일어나는 Crossbridge(myosin 돌기)의 화학적 상태를 어느 정도 일치시키고, 이 분자막에서 일어나는 변화를 image plate에 의해 나타난 2차원 X선 회절상으로 구조를 분석하였다. 그리고 자극장치로 분자막에 연속 전기자극을 가하여 장력발생의 시간적 변화에 미치는 영향을 규명하고자 하였다.

II. 이 론

근육골격근의 X선 회절상은 굵은 filament와 가

는 filament의 나선구조에 의해 2개의 층선 반사로 부터 형성된다. 이것은 나선구조가 Fourier 변화하여 불연속선 층선 분포가 이루어짐을 의미한다. 이 2개의 층선 반사는 양 filament의 구조주기가 다르기 때문에 일반적으로 분리형으로 관측된다¹⁰⁻¹²⁾. Veinshtein¹³⁾의 X선 회절이론에 의하면, Fig. 1(a)에서 나선구조를 잔기(분자)의 축방향의 간격을 p, 그 분자로 구성되는 나선 peach를 P라 두고 N회전하며, M잔기로 진행할 때 구조가 정확히 반복할 경우, 이 구조주기를 c라 하면 $c = Mp = Np$ 가 성립한다. 이때 층선에 나타나는 자오선 방향의 좌표를 Z라 둘 때 다음의 관계가 성립한다.

$$Z = (m/p) + (n/P)$$

여기서 m, n은 임의의 상수

이 식은 peach P를 갖는 연속나선의 Fourier변화에 의한 $1/P$ 의 간격으로 나타나는 층선 분포가 $1/P$ 의 간격의 점배열에 겹쳐지는 결과에 의하여 전체의 층선 분포의 기록으로 되어 있다. $C = Mp = Np$ 의 관계를 위 식에 대입하면, 관측된 2개의 나선구조는 다음 식의 층선차식($1 = cZ$)에 의해 기록된다.

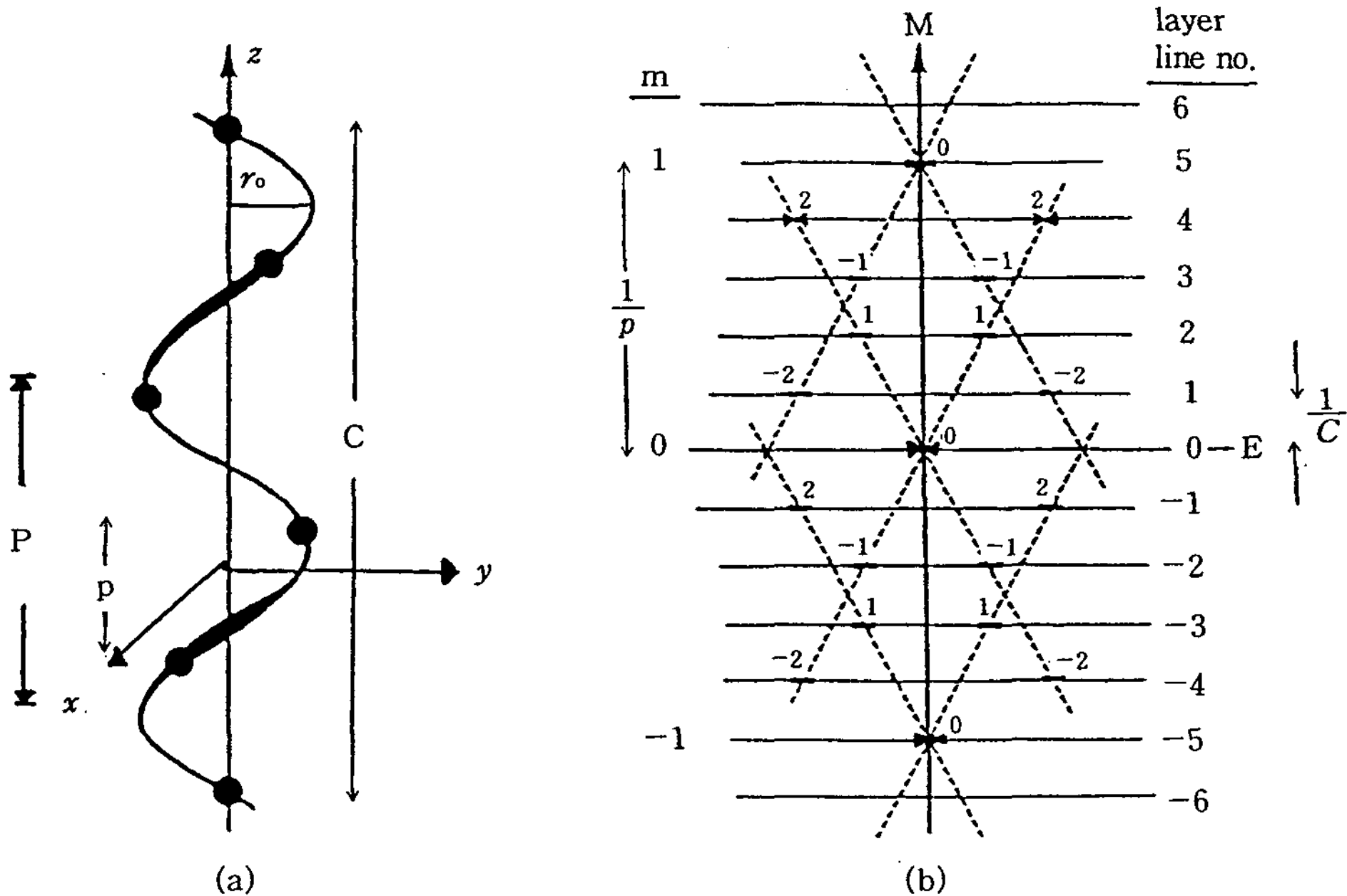


Fig. 1. (a) Helix structure : P denotes the peach. (b) The n-l plot of the Fourier transform of (a). Schematic representation of layer-line reflections : M denotes the Meridian and E the Equator.

$$l = nN + mM$$

이것은 나선구조로부터 나타난 층선의 규칙을 의미한다. 자오반사(Meridian reflection)를 중심으로 각각의 층선 반사는 n 과 l 에 의해 지정된 나선에 따라 전자밀도를 선유 축에 수직인 면에 투영한 것의 Fourier변환을 나타낸다. 특별히 $l=0$ 의 적도상에 나타난 반사는 선유 축에 따라 전자밀도 분포를 투영한 것의 Fourier변환으로, filament격자의 횡단면에서 질량분포에 관한 정보를 제공한다. 따라서 적도반사(Equator reflection)는 filament 육각배열에 의한 결정반사 (100)면과 (110)면으로부터의 반사이며, 이것은 굵은 filament와 가는 filament와의 crossbridge관계를 나타낸다. 이러한 자오반사와 적도반사는 굵은 filament와 가는 filament의 동적, 정적정보를 제공해 주며 이를 Fig. 1(b)에 나타내었다.

III. 실험방법

1. 시료 및 시약

식용개구리(*Rana catesbeiana*)의 봉공근(sartorius) 또는 반건양근(semetendinosus)의 살아있는 근육을 시료로 이용하였다. 근육의 크기는 길이가 4~5cm로 두께는 약 1mm 정도이다. 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. 근절의 길이는 He-Ne Laser의 광회절법으로 가는 filament와 굵은 filament의 full overlap의 길이(2.2~2.4 μ m)로 조정하였다. 냉각한 개구리 ringer용액을 시료 cell 중에 순환시켜 온도 13 $^{\circ}$ C로 제어하였다.

개구리 ringer용액의 조성은 115mM NaCl, 2.5mM KCl, 1.8mM CaCl₂, NaHCO₃, pH 7.2이다.

2. 실험장치

X선 회절 광학계는 일본에 있는 고에너지 물리연구소의 소각산란 회절계(BL15A, PF, Japan)를 사

용하였다. 이 광학계는 수축 중인 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. Camera는 최대 3m까지 연장되며, 위치는 변경시킬 수 있다. 시료로부터의 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 근방에 gas를 증폭시켜서, X선 광자를 전기파로서 검출한다. 1D-PSD(Rigaku Denki, Tokyo)는 gas증폭이 양극선 선상의 특정 위치를 결정하는 검출기이다. 회절상의 장력시간 변화도 같은 시간대에 동시에 측정된다. 또 전류치와 시료에 입사하는 X선 강도도 기록된다. 시료와 검출기간의 거리는 측정하고자 하는 반사를 다른 반사와 분리하여 기록할 수 있도록 약 2.4m로 하였다. 방사선 X선은 강력하기 때문에 이 방사선에 의한 손상을 최소화하기 위하여 data수집 이외에는 시료에 X선이 닿지 않도록 시료 앞에 고속 shutter를 두었다. PSD에 의한 1차원 X선 회절상의 신호를 computer에 접속한 CAMAC(type 3588, LecRoy Research System S. A., Switzerland) memory에 시간의 함수로서 저장하였다.

자극장치(type UT, Shiko Co., Tokyo)는 연속적으로 자극을 줄 수 있도록 설계되었고, 자극에 pulse를 25~30Hz로 연속적으로 주어서 근육을 강하게 수축시켰다. 식용개구리 봉공근은 등척성 자극으로 200~400gw의 장력을 적용하였고, 등척성 수축할 때에는 이것 이상의 장력이 발생하기 때문에 장력 transducer에서는 500gw 이상 측정 가능한 것으로 이용하였다. 장치도 원리는 Fig. 2에 나타내었다.

3. Imaging 기록장치

근육으로부터 X선 회절상을 2차원적으로 기록하기 위하여, 'image plate'(BAS 2000, Fuji Film, Tokyo)라고 하는 적분형 X선 검출기를 이용하였다. Image plate는 가시광에 의해 형광을 발하는 현상을 이용한 것으로 후지필름이 의학 화상진단용으

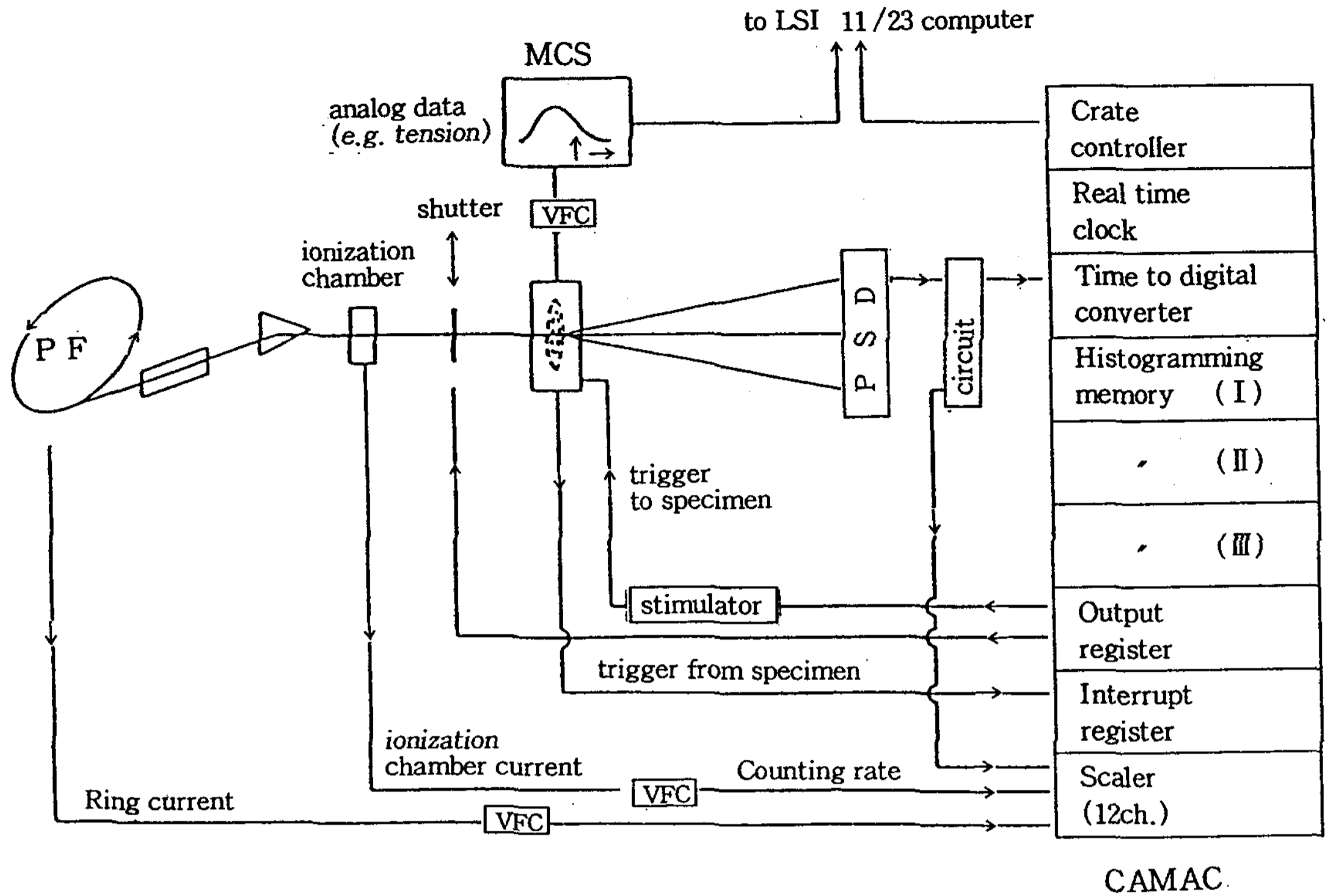


Fig. 2. The principle of data acquisition system of the small-angle X-ray diffractometer at the Photon Factory in Japan.

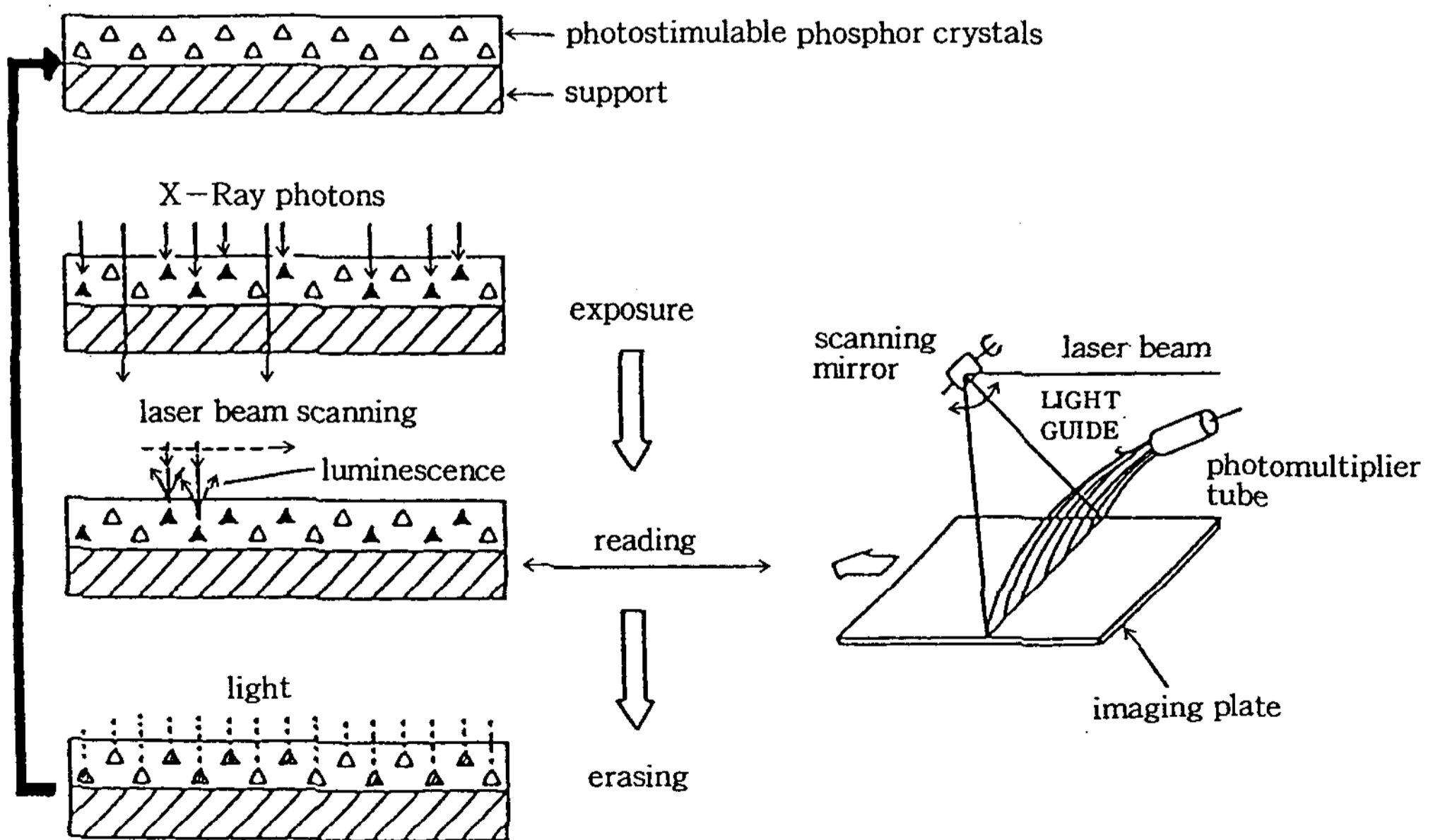


Fig. 3. The principle of imaging plates.

로 개발한 장치를 사용하였다. 즉, 방사선 에너지물질을 축적하고 난 후, 광의 기동에 의해 다시 형광하는 현상이다. 기록장치의 원리는 Fig. 3에 도시하였다.

IV. 결과 및 고찰

1. X선 회절에 의한 회절상

연속자극에 의한 개구리 골격근 이완상태와 수축상태의 회절상은 다음과 같다. X선 회절상은 앞서 말한 것과 같이 굵은 filament와 가는 filament의 나선구조에 의한 2개의 층선반사로 구성된다. 2개의 층선반사는 양 filament의 구조주기가 다름에 따라 일반적으로 분리된 형태로 나타난다. Fig. 4와 Fig. 5에서 A가 붙은 것을 actin반사이고, M이 붙은 것은 myosin반사이며 Factin에 의한 주요 반사는 370Å을 주기로 하는 층선과 72Å, 59Å, 51Å의 비교적 강한 층선 및 27Å자오반사로 되어 있다. 27Å자오반사는 최근접 actin monomer의 축방향 간격에

상당하는 반사이며 59Å, 51Å반사는 전부 actin monomer의 반사이다. Fig. 4에서 이완상태에서는 actin과 myosin이 떨어져 있기 때문에 각각 다른 위치에서 관찰되었고, Fig. 5에서 수축상태에서는 myosin head가 actin으로 모두 이동하였기 때문에 actin반사가 강하게 나타난다.

Fig. 6은 노출시간이 짧은 개구리 골격근의 X선 회절상을 표시하였다. 근육의 장축과 수직인 면, 즉 적도면 위에 나타나는 굵은 filament와 가는 filament 6방배열에 의한 (100)면과 (110)면으로 부터의 반사와, 적도축에 수직인 중앙축, 즉 자오선 위에 나타난 굵은 filament crossbridge의 주기 구조로부터의 143Å과 215Å자오반사이다. 이것의 반사는 crossbridge의 움직임과 구조변화를 직접적으로 반영한다. 적도반사는 근육의 구조를 장축에 따라서 적도면에 투영한 구조를 반영하고, 자오반사는 근선유 축에 수직으로 투영한 근육의 구조를 반영한다. 즉, 양 filament에서 나오는 I₁₀, I₁₁, I₂, I₂₀, I₂₁,

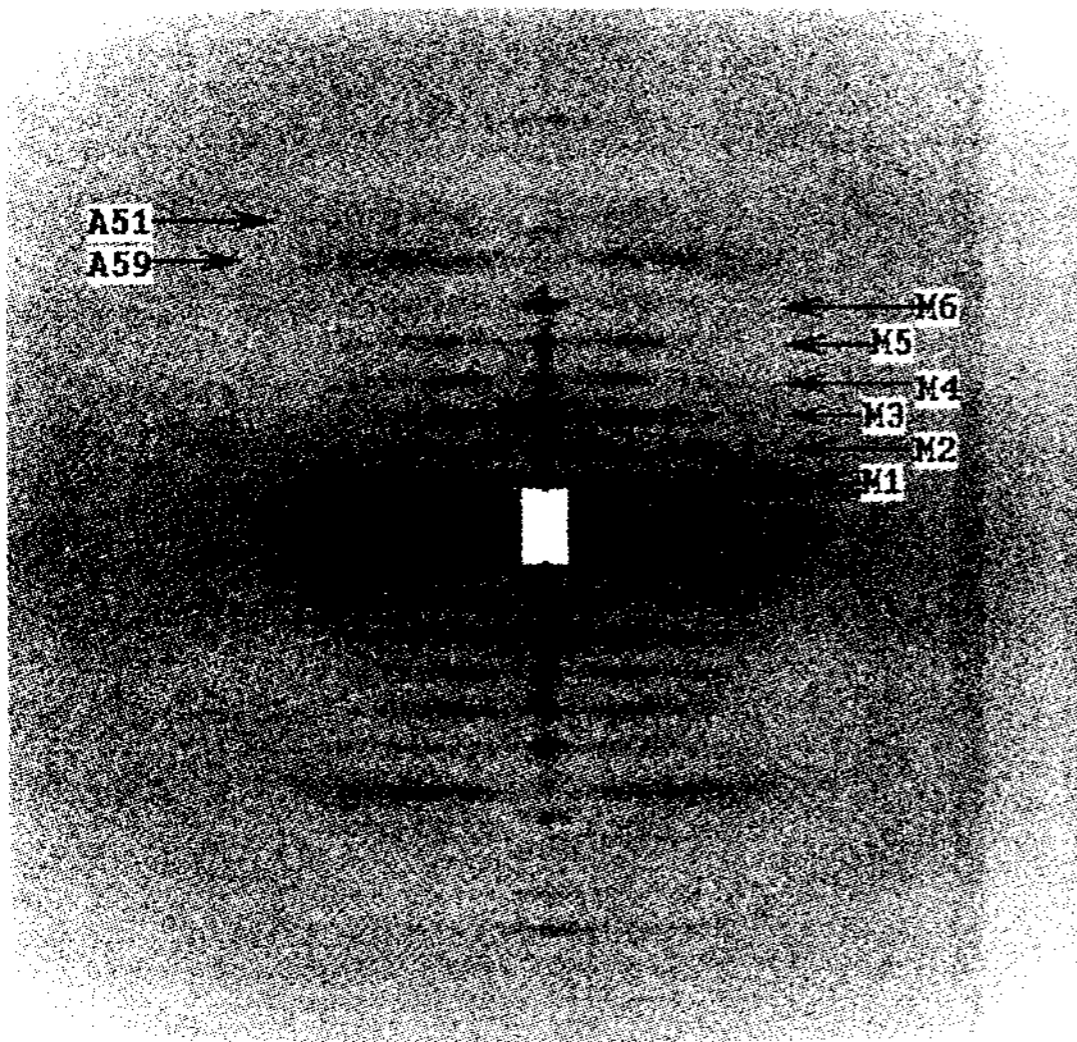


Fig. 4. X-ray diffraction patterns of frog skeletal muscles recorded with storage phosphor plates(imaging plates). This is resting patterns from sartorius muscle at full overlap length of the thin and thick filaments. the A long arrow indicate the actin reflections and the M long arrow indicate the myosin reflections.

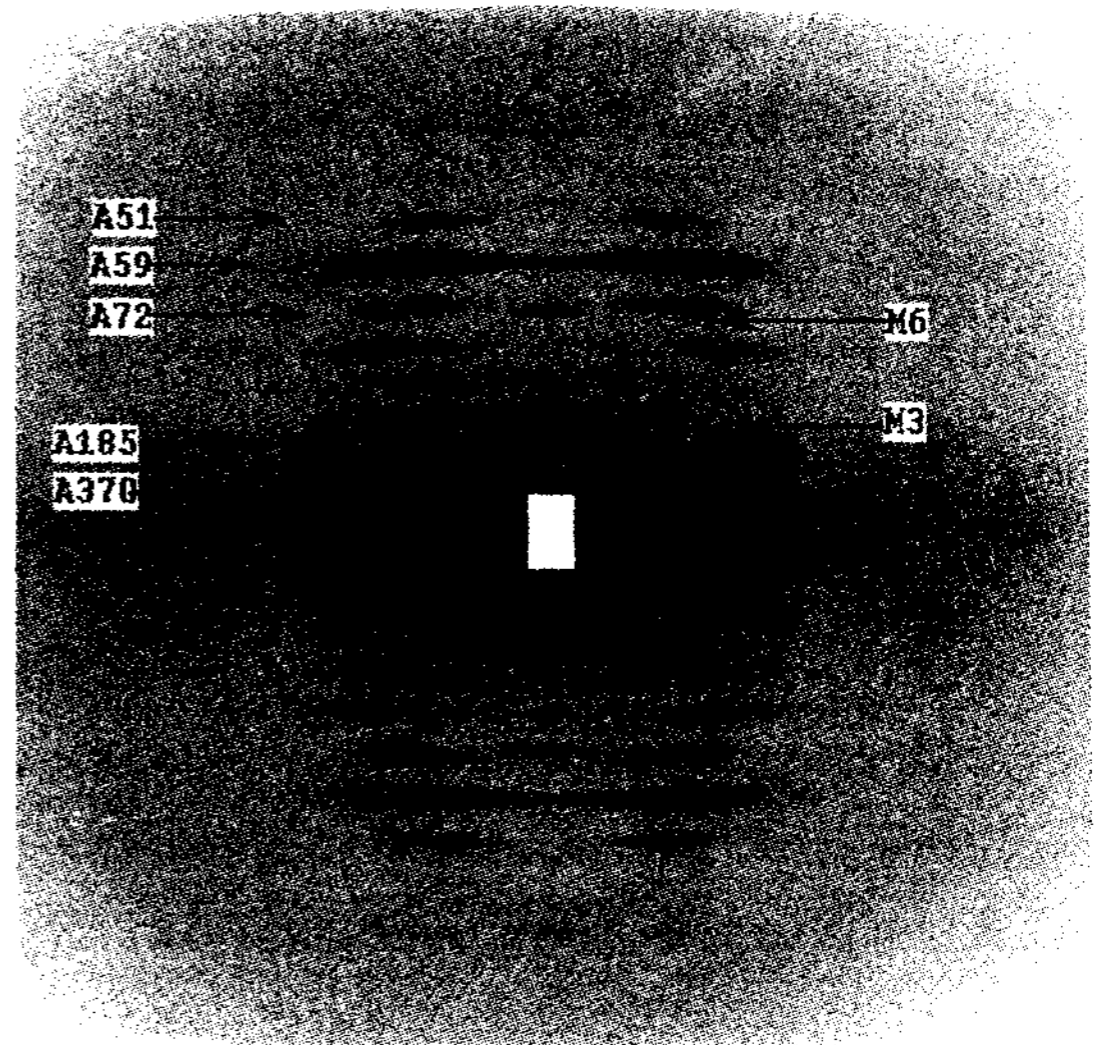


Fig. 5. X-ray diffraction patterns of frog skeletal muscles recorded with storage phosphor plates(imaging plates). This is contracting patterns from sartorius muscle at full overlap length of the thin and thick filaments. the A long arrow indicate the actin reflections and the M long arrow indicate the myosin reflections.

I_{30} 가 반사된다.

2. 자극의 시간(T_i) 의존성

Fig. 7에서 i 번째의 자극의 시작 후 i 번째의 장력이 peak에 도달하기까지 시간을 T_i 라 하면, T_i 는 자극의 순간 뿐만 아니라 연속 자극의 회수에 의존한다. 따라서 자극간격, 연속자극의 회수, T_i 의 관계를 비교하였고 이것에 대한 자극간격의 의존성을 나타내었다. T_i 는 온도에 의존하지만, 13°C라는 온도는 이전의 Tanaka¹⁴⁾의 연구에 기초를 두고, 각각의 자극에 의한 장력의 증가량과 X선 반사의 변화가 최대로 나타나는 조건으로 결정하였다. 또한 Fig. 6에서 T_2 의 최소치는 약 60ms로 T_3 의 최소치는 약 50ms로 하였다. 이처럼 T_i 의 최소치는 70~390ms의 자극간격의 범위에 두었고, 자극회수를 증가시킬수록 T_i 는 감소하였다. 그러나 3회 이상 자극의 회수를 증가시켜도 T_i 의 감소는 보이지 않았다. 즉, T_i 는 45ms 이하로는 내려가지 않았다. 자극간격이 150ms가 되면, 연속자극의 T_i 에 대한 효과는 거의 없었고, 단순히 자극이 반복적으로 나타났다. 한편, 자극간격이 70ms 이하가 되면 각각의 장력 peak를 정확히 결정할 수가 없었다. 이상의 것으로 T_i 의 감소는 자극간격이 70~90ms일 때 최적의 조건으로 나타났

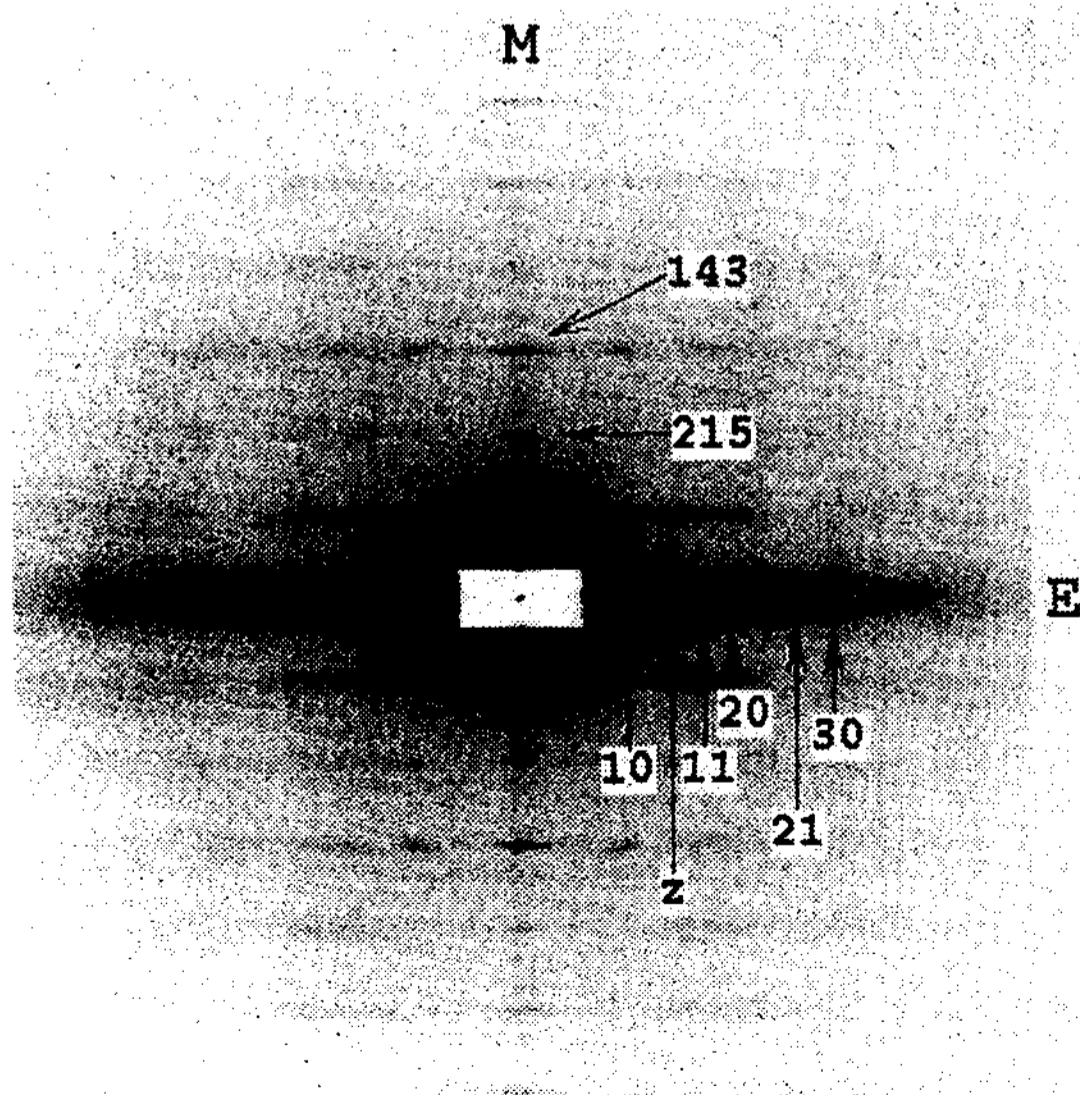


Fig. 6. X-ray diffraction pattern by twitch. The layer lines from the thick filaments are labelled 143 and 215 and those from the thick filaments are labelled 10, z, 11, 20, 21, 30.

다.

3. 연속자극에 의한 시간적 간격

Fig. 8에서 연속자극의 회수에 대하여 장력의 값과 자오반사 및 적도반사의 강도증분을 표시하였다.

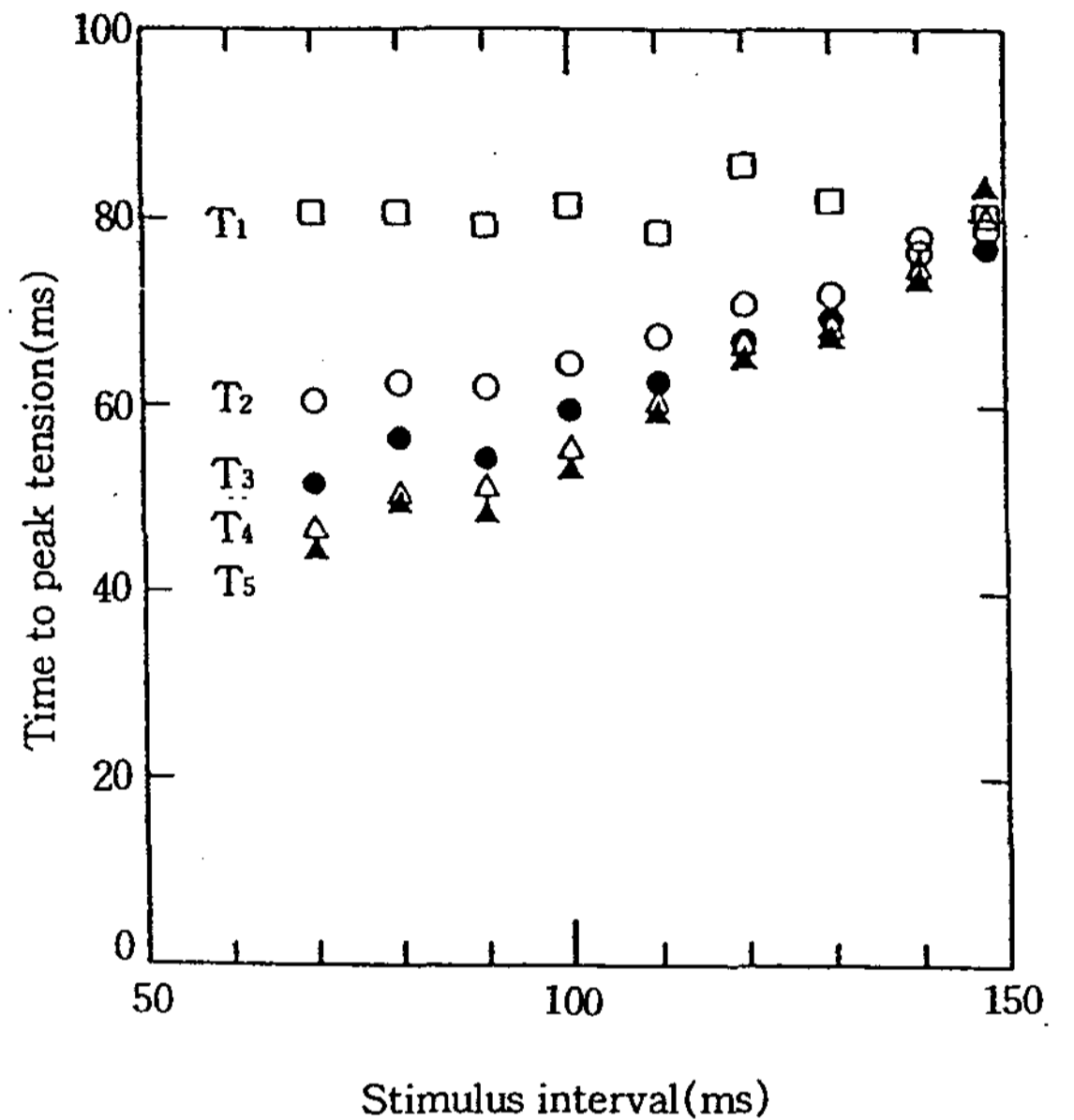


Fig. 7. Relation between the stimulus interval and the time to the peak tension. Muscle were stimulated by successive pulses at the various time(70~150ms) at 13°C. Each point is the average from 6 different muscle.

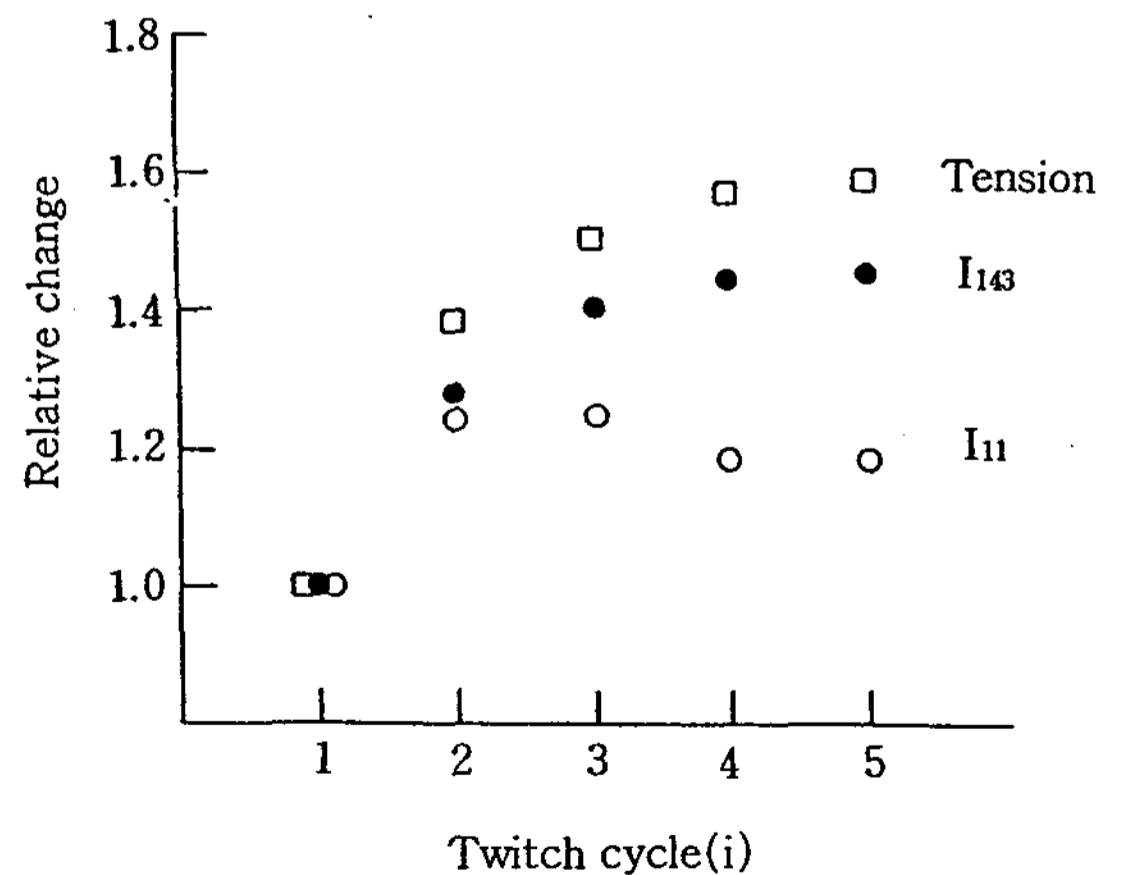


Fig. 8. Relation between the peak tension and the I₁₁, 143Å intensities.

1회 자극 때의 peak값을 기준으로 하여 표시하였다. 3회 때의 자극으로 장력 peak값은 오차 범위 내에서 4, 5회 때의 값과 거의 같았다. 이 때의 값은 수축 때의 90~95%에 도달하고 있다. 근육은 충분히 활성화되어 최대장력을 발생해 있다는 것을 나타낸다. 각각의 장력변화도 3회 이후의 자극에 포화상태이고, 최대변화에 도달해 있었다.

4. 장력발생의 효과

Fig. 9에는 T_i 와 I_i 는 자극의 회수를 증가시키면 같은 형태로 감소하고, 3회 이상의 수축에서 일정하게 되는 경향을 나타내었다. 그런데 양자의 시간차, $T_i - I_i$ 를 하면 이것은 어느 것의 자극에 대해서도 약 15~20ms로 일정하였다. 이 결과는 자극의 회수에는 의존하지 않는다는 것을 나타낸다. 1회 때의 자극으로 장력의 peak에 도달하는 시간, T_1 은 약 80ms, T_2 는 60ms, T_3 은 50ms로 점점 더 짧아지고, T_4, T_5 는 거의 T_3 과 같았다. Myosin-crossbridge의 이동이 일어나는 경우에 최초의 자극 밖에 일어나지 않는다고 사려된다¹⁵⁾. 여기에는 I_1 (혹은 T_1)은 다른 I_i (T_i)보다 길게 된다. 이 경우에는 I_1 과 I_2 간의 급격한 감소를 기대 할 수 있는데, 그림에서 보는 바와 같이 T_i 와 I_i 는 자극의 회수와 함께 완만하게 감소하

고 있다. 이것은 crossbridge가 굵은 filament가 가는 filament쪽으로 이동을 요하는 시간이 필요하다는 것을 나타낸다. 이 그림에서도 결국 3회 이상의 연속자극에서의 근육은 충분히 활성화되었고, 이 시점에서 최대장력을 발생한다.

본 실험에는 근육전부를 사용하기 때문에 특히 1회 자극 때 전부 근절이 모두 활성화되는 것은 기대할 수 없다. 어떤 근절은 다른 것보다 빠르게 활성화를 되고, 혹은 다른 근절을 당기는 것도 있다. 그 결과 근선유에 따라 있는 근절장의 분산을 일으키는 원인이 된다. 그리고 또다른 원인으로서는 내부수축 뿐만 아니라 외부적인 요소에 의해 근육의 일부가 장력발생을 늦게 발생시키는 것이라 추정하고 있다¹⁶⁾. 연속자극에 대해서는 거의 모든 근절이 이미 활성화되었다.

V. 결 론

이상에서 근육 분자막에 연속자극을 주어서 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 본 실험 조건하에서 근육 수축 중에 X선 구조 분석에 의해 관찰되어진 두드러진 변화는 근육수축을 하는 가운데 myosin head의 움직임과 수축분자의 변화가 관찰되었다.
2. 내부 혹은 외부적인 요인에 의하여 filament격자 변화가 일어나고, 적도반사에도 영향을 주었고, filament격자 변화는 첫번째 수축 때 일어나서, 그 다음 이후의 수축에는 거의 변화가 일어나지 않고 있다는 것을 알 수 있었다.
3. 전기자극을 3회 이상에서는 일정하게 간격을 나타내고, 양자의 시간차, $T_i - I_i$ 를 하면 어느 것의 자극에 대해서도 약 15~20ms로 일정하였다. 이 결과는 자극의 회수에는 의존하지 않는다는 것을 알 수 있었다.

문 헌

1. Huxley, H. E., *Science*, 164, 1356(1969).
2. Huxley, H. E., Farqi A. R. and Brown, M., *J. Mol. Biol.*, 30, 384(1967).
3. Huxley, H. E., Simmons, R. M., Farqi A. R.

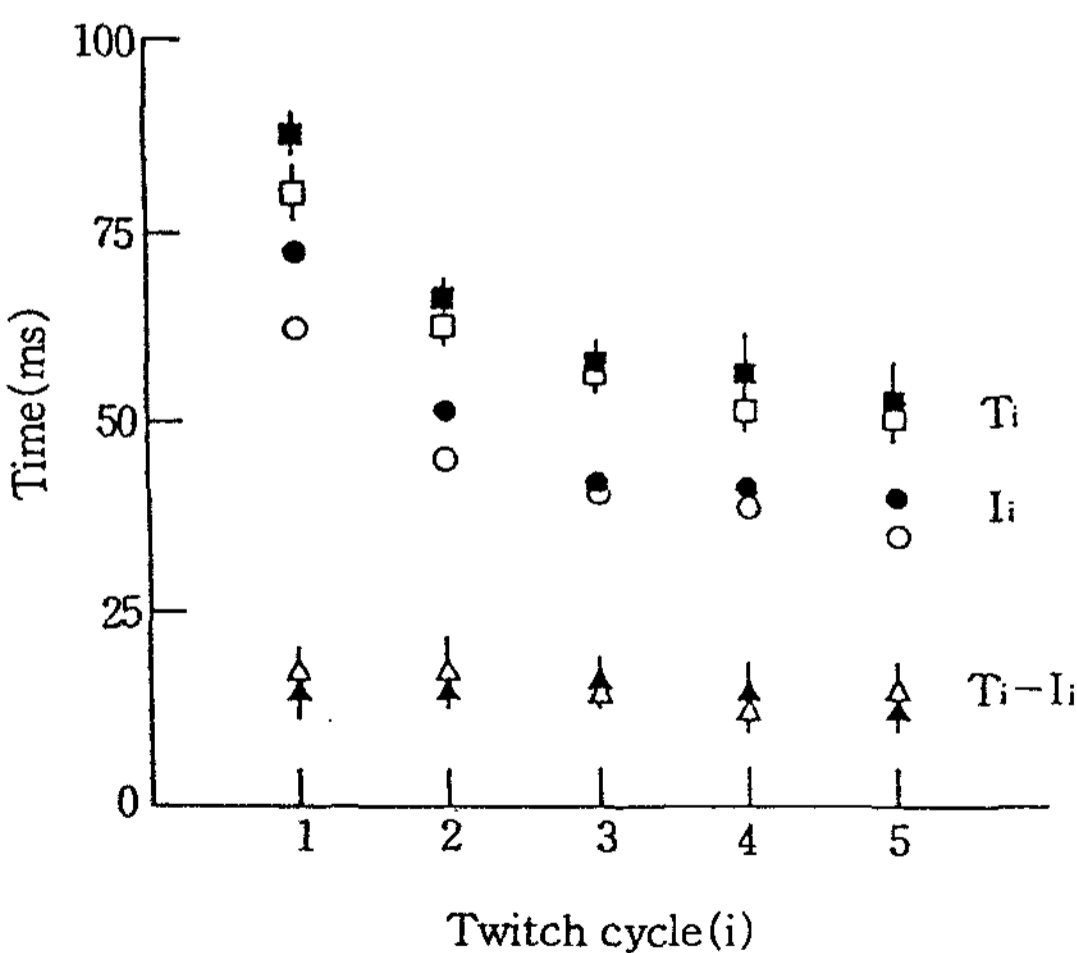


Fig. 9. Times needed to the 2 peak tension and to the maximum X-ray intensity change at each twitch. Difference of those time($T_i - I_i$) is also added.

- and Kress, M., *J. Bordas, Mol. Biol.*, 169, 469(1982).
4. Huxley, H. E., Farqi, A. R., Kress, M., Bordas J. and Koch, M. H., *J. Mol. Biol.*, 158, 637(1983).
5. Amemiya, Y., Wakabayashi, K., Hamanaka, T., Wakabayashi, T., Matsushta T. and Hashizume, H., *Nucl. Instrum. Methods*, 208, 471(1983).
6. Wakabayashi K. and Amemiya, Y., *Handbook on Synchrotron Radiation.*, Vol. 4, North Holland, Amsterdam, pp. 597~678(1991).
7. Wakabayashi, K., Tanaka, H., Kobayashi, T., Hamanaka, T., Nishizawa, S., Sugi, H., and Mitsui, T., *Biophys. J.*, 49, 581(1986).
8. Matsubara, I., and Yagi, N., *J. Physiol.*, 361, 151(1985).
9. Harford J. J. and Squire, J. M., *Biophys. J.*, 63, 387(1982).
10. Iwamoto, H., Kobayashi, T., Amemiya Y. and Wakabayashi, K., *Biophys. J.*, 68, 227 (1995).
11. Naylor G. R. S. and Podolsky, R. J., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78, 5559(1981).
12. Malinchik S. and Yu, L. C., *Biophys. J.*, 68, 2023(1995).
13. Veinshtein B. K., *Diffraction of X-ray by chain molecules*, Elsevier Publishing Company, London(1966).
14. Tanaka, H., Kobayashi, T., Amemiya Y., and Wakabayashi, K., *Biophys. Chem.*, 25, 161(1986).
15. Hirose, K., Lenart, T. D., Murray, J. M., Franzini-Armstrong C., and Goldman, Y. E., *Biophys. J.*, 65, 397(1993).
16. Takemori, S., Yamaguchi, M. and Yagi, H., *J. Biochemistry.*, 117, 603(1995).