

## 온도 영향에 따른 Myosin Head의 SH 구조 변화 연구

김덕술<sup>†</sup> · 송주영

창원대학교 공업화학과

### A Study on the SH Structure Change of Myosin Head by Temperature Effect

Duck- Sool Kim<sup>†</sup> and Ju-Yeong Song

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

#### Abstract

The effect of temperature on the structure change of the SH of myosin head have been investigated with improved resolution by x-ray diffraction using synchrotron radiation. The movement of myosin head and conformational change of contractile molecules were occurred in the muscle contraction. IASL (iodo acetamide) and MSL (maleimide) disordered the orderly helix arrangement of myosin in the rest state of spin level. The temperature effect on the structure change was great at the UL in the equatorial reflection. But those of IASL and MSL were minor. Equatorial reflection (10,11) change inferred that myosin head was moved to the vicinity of actin filament by temperature change (from 25 °C to 0 °C) at UL, but spin level was not changed. The intensity change of 143 Å and 72 Å could offer information of the mass projection of population of myosin heads along the filament axis. The slope of intensity profile of the mass projection of 143Å and reflection of MSL is appeared sharply and those of UL and IASL were not changed. The decrease of MSL actin reflection at 51 Å and 59 Å in the actin reflection change refers that the shifted myosin head binds a certain actin or changes an actin structure. From these results, we could conclude that IASL and MSL were spin labeled on SH of myosin head and disordered the helix arrangement of actin.

**Key words** – Myosin head, SH, Spin label, Reflection

#### 서 론

생체근육 수축 system은 기능과 구조가 직접적인 관계를 가진다. 즉 근육 수축에 대한 에너지변환과 그 구조의 역할이 근육수축에 영향을 미치고 있기 때문에 의확분야

에서 많은 연구가 행하여져 왔다[7]. 근육 X선 연구는 근육이 ATP를 분해하여 어떻게 힘을 발생시키는가를 구조 변화를 통하여 밝히는데 있다. 이것은 장력발생을 담당하는 myosin head와 actin과의 결합이 중요한 요인으로 작용한다. 근육 수축은 actin과 myosin이라 하는 단백질분자

<sup>†</sup> Corresponding author

에 의하여 일어나며, 근수축의 기본과정은 myosin에 의하여 ATP가수분해를 시킴으로서 나타나는 에너지를 에너지 원으로 하는 양 단백질의 상호작용에 있다[1]. 근육의 actin과 myosin은 각각 filament상으로 규칙적으로 배열을 하고 있기 때문에 그 구조가 X-ray 혹은 전자현미경을 통하여 어렵지 않게 연구되고 되었다[2]. 그러나 미세한 구조 변화는 아직도 연구진행 중이며, 그 중에서도 Electron Spin Resonance를 이용한 myosin head의 움직임에 대한 연구가 활발히 진행되어 왔다[3,4]. 이것은 원자나 분자중의 전자는 지구가 자전하는 것처럼 어떤 내부운동을 하고 있다. 그 각의 운동량을 spin이라 한다. 이것은 myosin head의 구조해석에 널리 쓰이고 있으며, 특히 myosin head중의 SH에 spin label 시약을 이용하여 ATP 가수분해 중에 actin과의 결합에서 어떤 각도로 결합하는가를 전자 spin 공명을 이용하여 널리 연구되고 있다[5,6].

본 연구에서는 이러한 전자 spin 공명장치를 이용한 myosin head의 움직임에 대하여 X선 회절장치를 이용한 실험을 하였고, 전자 spin 공명에 사용된 시약을 사용하여 myosin head의 SH에 spin label한 것에 X선을 투과시켜 연구하였다. 그리고 근육 내에서 일어나는 변화를 image plate에 의해 나타난 2차원 X선 회절상을 통하여 변화를 추적하였고, actin과 myosin의 상호작용을 구조 분석하여 연구하였다. 그리고 spin label한 myosin head가 온도에 민감하게 반응하는지를 연구하였다.

## 재료 및 방법

### X-ray실험장치

X선 회절 광학계는 일본에 있는 고 에너지 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. Camera는 최대 3 m까지 연장되며, 위치는 변경시킬 수 있다. 시료로부터 산란 X선은 진공관 안을 통과하여 검출기 면에 닿아서 검출기에 기록된다. 광원 가속기는 양전자 에너지 2.4 GeV, 전류 250-350 mA로 운전된다. 시분할 X선에 의한 기

체원자로부터 전리한 전자를 양극선의 근방에서 gas로 증폭시켜서, X선 광자를 전기파로서 검출한다. One Dimensional Position Sensitive proportional Detector:1D-PSD (type 7860, Rigaku Denki, Tokyo)는 gas증폭이 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 2.4 m으로 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.

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 화상진단용으로 개발한 장치를 사용하였다. 즉, 방사선 에너지물질을 축적을 하고 난 후, 광의 기동에 의해 다시 형광 하는 현상이다.

### 실험방법 및 조건

Glycerin 처리한 토끼골격근 (Glycelin 처리 후 1-2주 이내)을 0.3 mm정도 두께로 사용하였다. 근육의 크기는 길이가 4.5 cm로 두께는 약 1 mm정도이다. 근육은 백금선을 나란히 자극극으로 준비한 시료 cell의 한쪽 끝에 연결하였다. 시료의 다른 한쪽 끝에는 transducer의 shutter에 부착된 금속부분에 수술용 실을 연결하였다. 근질의 길이는 He-Ne Laser의 광회절법으로 가는 filament와 굵은 filament의 full overlap의 길이 (2.2-2.4  $\mu$ m)로 조정하였다. Cell 중에 양쪽 끝을 고정시켜 이완용액을 흘려 보낸 후, spin label 시약으로 교환하였고, 가는 filament와 굵은 filament가 충분히 반응 할 수 있도록 하였다. 사용한 spin label 시약은 N-(1-oxo-2,2,6,6-tetramethyl-4-piperidiny)-iodo acetamide와 N-(1-oxo-2,2,6,6-tetramethyl-piperidiny)-maleimide이며, 전자는 IASL, 후자는 MSL로 칭한다. Spin Label은 적어도 SH1에 label 되어져 있다.

먼저 control 시약을 cell안에 20분간 순환시켜 X선을 투과하여 반응한 X선회절상을 얻은 후 ESR 측정에 이용된 시료와 같이 제조된 IASL spin label시약을 실험용 cell안으로 약 30분간 순환시킨다. MSL spin label 시약도 같은 방법으로 순환시킨다. 그리고 나서 반응된 근육을 X선을 투과하여 실험하였다. 즉, myosin head의 SH에 반응시켜 토끼근육에 X선을 투과하여 spin label에 의한 영향을 비교하였다. X선 회절은 일본의 PF의 방사선 X선과 카메라 및 image plate를 사용하여 행하였다. X선과 시료와의 거리는 190 cm, 노출시간은 3 분이였다. 온도는 25℃와 0℃에서 실험하였다.

Control 시약 조성 (UL) : 80 mM K-propionate, 40 mM imidazole, HCl buffer, 6 mM Mg-acetate, 5 mM EGTA, 5 mM Na<sub>2</sub>ATP, (pH 7.0).

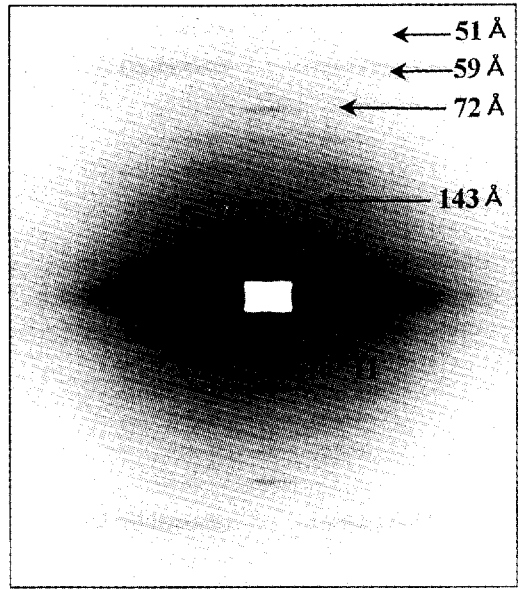
Spin label 시약 조성 (IASL, MSL) : 50 mM KCl안에 300 μm-MSL, IASL, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM imidazole, (pH 7.0).

### 결과 및 고찰

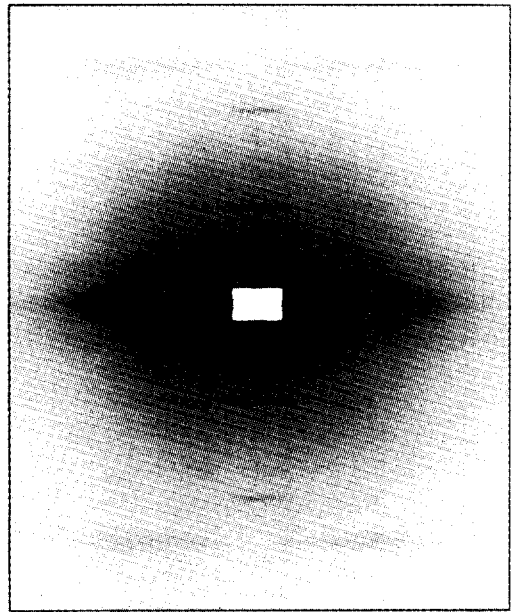
#### 온도변화에 의한 X선회절상

근육골격근의 X선 회절상은 굵은 filament와 가는 filament의 나선구조에 의해 2개의 층선 반사로부터 형성된다. 이것은 나선구조가 Fourier변화하여 불연속선 층선 분포가 이루어짐을 의미한다[10]. 적도반사는 근육의 구조를 장축에 따라서 적도면에 투영한 구조를 반영하고, 자오 반사는 근 선유축에 수직으로 투영한 근육의 구조를 반영한다. 이 2개의 층선 반사는 양 filament의 구조주기가 다르기 때문에 일반적으로 분리형으로 관측된다. 근육의 장축과 수직인 면, 즉 적도면 위에 나타나는 굵은 filament와 가는 filament의 6방 배열에 의한 (100)면과 (110)면으로부터의 반사와, 적도축에 수직인 중앙축, 즉 자오선 위에 나타난 굵은 filament의 crossbridge의 주기 구조로부터의 143 Å와 215 Å 자오반사가 나타나는데, 이 2개의 반사는 myosin filament의 기본주기 (430 Å)의 3차와 2차 반사에 해당한다.

Fig. 1.의 (a)에서 적도반사 (10, 11)는 근육의 구조를 장축에 따라서 적도면에 투영한 구조를 반영한다. 2개의 층선반사는 양 filament의 구조주기가 다름에 따라 일반적으



(a)



(b)

Fig. 1. X-ray diffraction pattern of glycerinated rabbit muscle fibers in rest state (UL) at 25 °C (a) and 0 °C (b).

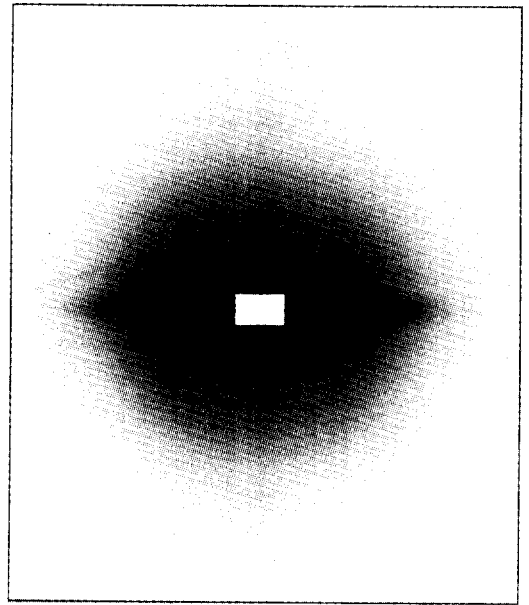
로 분리된 형태로 나타난다. 143 Å 자오반사는 굵은 filament에서 튀어나온 2개의 head로부터 되는 myosin-crossbridge의 규칙배열로부터 오는 반사이다. 215 Å 반사는 이완상태로 myosin-crossbridge의 주기적 유동을 받은 나선배열에 의한 반사로, 근육이 수축하면 매우 약하게 된다.

이들 반사를 선택한 이유는 이것의 강도변화가 crossbridge의 움직임과 구조변화를 직접적으로 반영하기 때문이다. 양 자오반사의 강도변화는 myosin-crossbridge의 filament축에 따라 투영구조의 변화에 대한 정보를 제공한다. 이것의 강도변화가 crossbridge의 움직임과 구조변화를 직접적으로 반영하기 때문이다. 59 Å, 51 Å 반사는 전부 actin monomer의 반사이다. 이완상태에서는 actin과 myosin이 떨어져 있기 때문에 각각 다른 위치에서 관찰된다. 215 Å, 143 Å, 72 Å 반사는 myosin으로부터 오는 반사이다. 그림 (b)에서는 온도를 내려서 실험한 결과로 모든 반사가 약하게 나타나 있다. 이것은 양 filament가 온도에 민감한 반응을 보인다는 것을 시사한다.

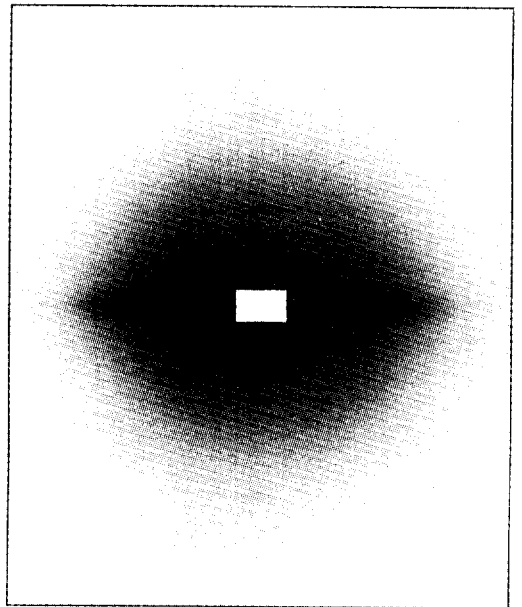
Fig. 2.에서 (a), (b)는 iodo acetamide (IASL)시약을 반응시킨 후 X선을 통과시켜 결과를 나타내었다. 역시 Fig. 1.과 비교해서 전체적으로 반사들이 많이 약하게 나타나 있다. 이것은 시약에 의한 반응으로 보이며 myosin head의 SH가 어떤 변화를 나타내고 있다. 특히 59Å 반사가 많이 약하게 나타나고 있다. 그리고 온도에 대한 특별한 변화가 보이지 않는다.

Fig. 3.의 (a), (b)는 maleimide (MSL)시약을 반응시킨 후 X선을 통과 시켜 결과를 나타내었다. Iodo acetamide 시약과 반응한 Fig. 2.와 비교해서 총선 반사가 강하게 나타나고 있다. 그러나 이완상태보다는 많이 희미하게 보인다. 위의 X선 pattern이 다르게 나타내는 것은 spin label의 진행과정으로 보여지며, 결과적으로 maleimide (MSL) 시약반응에서 iodo acetamide (IASL)시약반응으로 진행될 수 있다는 것을 시사한다. 그리고 온도변화에 대해서는 Fig. 2.와 마찬가지로 (a), (b)의 특별한 변화가 보이지 않는다.

이 실험에서는 같은 반복실험을 통하여 반사가 약해지는 근육은 실험 data에서 제외 시켰다. 또 다른 요인으로서는 근육 fiber 간의 당기는 현상으로 있지만 극히 미미한 영향을 미치지 때문에 무시해도 된다. 하지만 실험결과를 면밀히 검토하여 이러한 현상이 보이는 data도 제외시켰다.

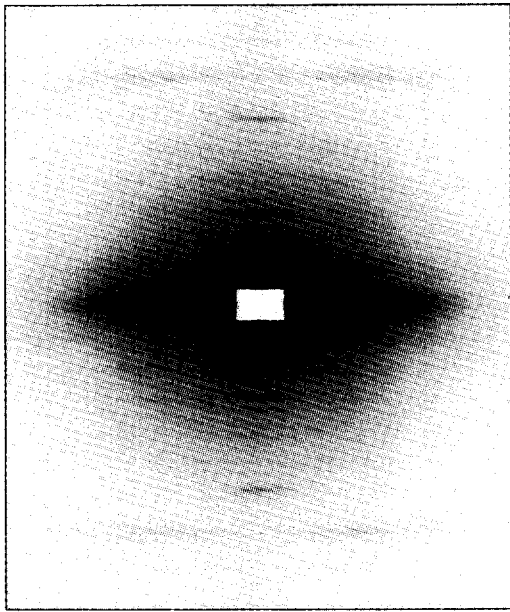


(a)

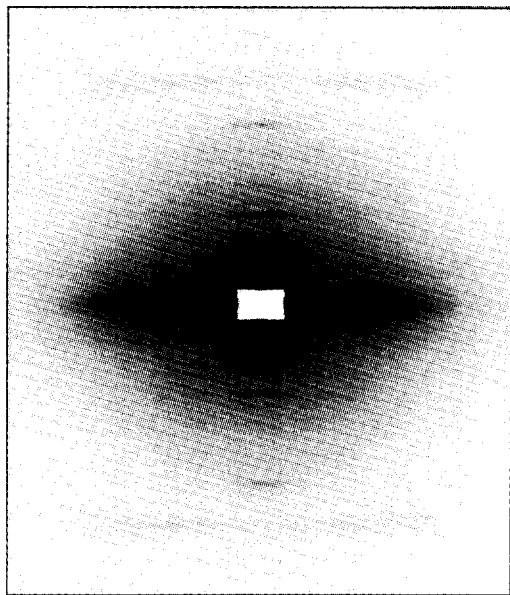


(b)

Fig. 2. X-ray diffraction pattern of iodo acetamide (IASL) at 25°C (a) and 0°C (b).



(a)



(b)

Fig. 3. X-ray diffraction pattern of maleimide (MSL) at 25°C (a) and 0°C (b).

적도반사 비교

적도반사는 filament육각배열에 의한 결정반사 (100)면과 (110)면으로 부터의 반사이며, 이것은 굵은 filament와 가는 filament와의 crossbridge관계를 나타낸다 [9]. 적도면을 중심으로한 근육의 층선구조를 보면, 굵은 filament로부터 나온 myosin돌기의 배열은 굵은 filament안의 myosin분자에 의해 지배를 받는다[8].

육방격자에 의한 10, 11반사에 의한 data를 나타내었다. Fig. 4의 25 °C에 나타낸 것처럼 UL의 경우와 비교해서 spin label한 시료가 40-50 %정도 증가 해 있다. 그리고 온도를 내려 비교하면, 10반사를 기준으로 두고 비교하면 11반사가 20 %정도 높게 올라 간 것을 알 수 있다. 이것은 myosin head가 actin filament부근으로 이동해 있다는 것을 알 수가 있다. 즉 UL의 경우에는 민감한 반응을 보인다는 것을 알 수 있었다. 그러나 IASL, MSL은 온도 변화에 거의 변화를 나타내지 않는다.

Myosin 자오반사 비교

근육의 장축과 수직인 면, 즉 적도면 위에 나타나는 굵은 filament와 가는 filament의 6방배열에 의한 (100)면과 (110)면으로부터의 반사와, 적도축에 수직인 중앙축, 즉 자오선 위에 나타난 굵은 filament의 crossbridge의 주기 구조로부터의 143 Å과 215 Å자오반사이다. 이것의 반사는 crossbridge의 움직임과 구조변화를 직접적으로 반영한다.

Fig. 5의 (a), (b)는 myosin 선으로부터 나선 주기의 3차 (143 Å반사), 6차 (72 Å반사)를 측정하였다. Myosin 자오반사에 관하여 UL을 기준으로 IASL, MSL의 143 Å

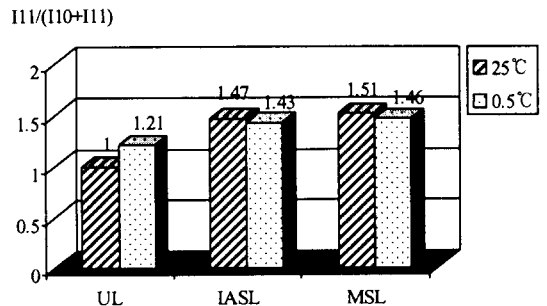


Fig. 4. The intensity profiles of 10, 11 equatorial reflections (UL, IASL, MSL)

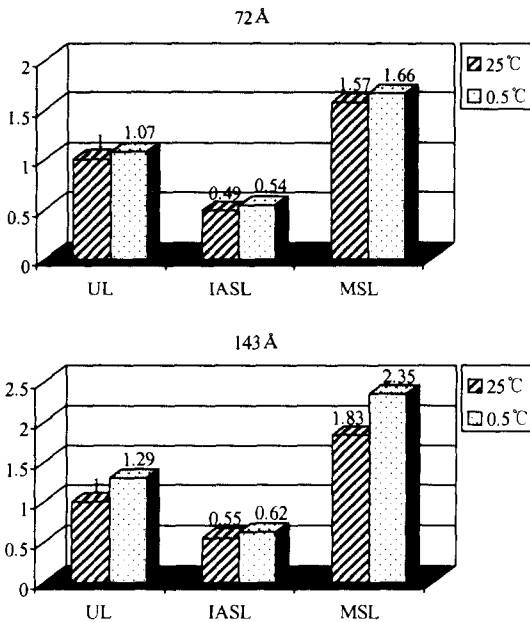


Fig. 5. The intensity profiles of 143 Å, 72 Å meridional reflections (UL, IASL, MSL).

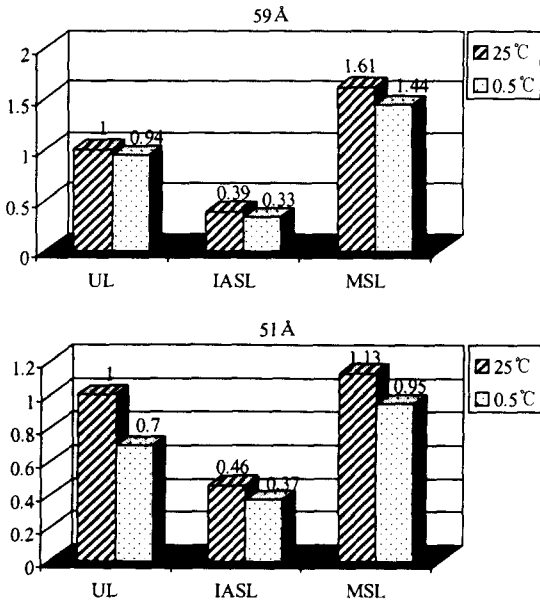


Fig. 6. The intensity profiles of 51 Å, 59 Å actin-based reflections (UL, IASL, MSL).

의 온도영향은 UL, MSL이 약 20 % 정도 올라가 있고, IASL은 역시 변화가 거의 없다. 6차 (72 Å 반사)는 3개 모두다 변화가 거의 없다.

#### Actin 층선반사비교

27 Å 자오반사는 최근접 actin monomer의 축방향 간격에 상당하는 반사이며, 59 Å, 51 Å 반사는 전부 actin monomer의 반사이다. Fig. 6의 (a), (b)는 actin반사로부터 유래하는 59 Å, 51 Å 반사를 측정하였다. Actin반사에 관해서도 같이 UL은 약 10-30 % 정도 변화를 보이고 있다. 그러나 IASL, MSL은 10 % 미만의 변화만 보인다. 이러한 결과는 UL의 반응은 온도변화에 actin이 myosin head 쪽으로 이동하였다는 것을 나타내고 있다. 그러나 IASL, MSL의 반응은 actin-myosin의 crossbridge의 관계가 구조적으로 큰 변화가 없다는 것을 나타낸다. 즉, myosin head가 actin과 결합이 되었다 할지라도 온도에는 그렇게 민감하게 반응하지 않는다는 것을 나타낸다.

#### 요 약

이상의 결과로부터 25 ℃에서의 적도 반사는 spin label을 한 시료가 약 40-50 % 정도 증가하였다. 그러나 온도효과에 미치는 각 spin label의 영향은 적도반사의 경우, UL의 경우는 많은 변화를 보였으나 IASL, MSL은 거의 변화가 없었다. 이것은 spin label 경우 온도변화가 영향을 주지 못함을 시사한다. Myosin의 143 Å 반사를 보면 IASL에는 온도 변화를 나타내지 않지만, MSL에는 UL과 같이 약 15 %의 변화를 보인다. Actin반사변화에서 모두 온도변화에 약간만 반응하고 있다. 결론적으로 UL은 온도에 민감한 반응을 보이지만, spin label의 경우, myosin head의 actin과의 약한 결합으로 온도변화에는 반응하지 않았다. 이것은 actin의 SH기에도 spin label되어 actin의 나선구조가 크게 흐트러짐을 알 수 있었다. 그리고 이것이 week binding 상태라는 것을 확인하였다.

#### 감사의 글

본 연구는 학술진흥재단의 Post-Doc 연구지원비에 의해 이루어 졌으며 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. Barnett, V. A., P. G. Fajer, C. F. Polnaszek, and D. D. Thomas. 1986. High - resolution detection of muscle crossbridge orientation by electron paramagnetic resonance. *Biophys. J.* **49**, 144-146.
2. Barnett, V. A. and D. D. Thomas. 1987. Resolution of conformational states of spin -labeled myosin during steady-state ATP hydrolysis. *Biochemistry* **26**, 314-323.
3. Barnett, V. A. and D. D. Thomas. 1989. Microsecond rotational motion of spin-labeled myosin heads during isometric contraction. *Biophys. J.* **56**, 517-523.
4. Cooke, R., M. S. Crowder, and D. D. Thomas. 1989. Orientation of spin-labels attached to cross-bridges in contracting muscle fibers. *Nature* **300**, 776-778.
5. Fajer, P. R. L. H. Bennett, C. F. Polnaszek, E. A. Fajer, and D. D. Thomas. 1990a. General method for multiparameter fitting of high-resolution ESR spectra using a simplex algorithm. *J. Magn. Reson.* **88**, 111-125.
6. Fajer, P. G. 1994. Determination of spin-label orientation within the myosin head. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 937-941.
7. Huxley, H. E., A. R. Farqi and M. Brown. 1969. The low-angle x-ray diagram of vertebrate striated muscle and it actin and myosin filaments . *J. Mol. Biol.* **30**, 384.
8. Matta, J. J., and D. D. Thomas. 1992. Biochemical and mechanical effects of spin-labeling myosin S1. *Biophys. J.* **61**, A295.
9. Roopnarine, O., K. Hideg., and D. D. Thomas. 1993. Saturation transfer ESR spectroscopy with an indane spin label: calibration with hemoglobin and application to myosin rotational dynamics. *Biophys. J.* **64**, 1986-1907.
10. Roopnarine, O., A. G. Szent-Goyrgyi, and D. D. Thomas. 1995. Saturation transfer electron paramagnetic resonance of spin-labeled myosin regulatory light chains in contracting muscle fiber bundles. *Biophys. J.* In press.