

Twitch Stimulation에 의한 Myosin Heads 움직임의 시간분석 연구

김덕술[†] · 정정수 · 박근호^{*}

동명정보대학교 컴퓨터공학과, *창원대학교 화공시스템공학과
(2004년 3월 17일 접수 ; 2004년 5월 21일 채택)

A Study on The Time For Movement of Myosin Heads by the Twitch Stimulation

Duck-Sool Kim[†] · Jung-Su Jung · Keun-Ho Park^{*}

*Department of Computer Engineering Tongmyong University of Information Technology,
Busan 608-711, Korea*

**Department of Chemical Engineering, Changwon National University,
Changwon 641-773, Korea*

[†]*e-mail : dskim@tit.ac.kr*

(Received March 17, 2004 ; Accepted May 21, 2004)

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. Time slice requires tension peak after the onset of stimulation and the height of tension peak depends on the number of twitch cycle. The muscles were stimulated by five successive stimuli at an interval of 80 ms started while the tension was still being exerted by the muscles. The intensity of I_{11} , I_{10} , 143Å and 215Å reflection measured with 5ms time resolution and is recorded in isometric tension. The peak height of I_{11} and 143Å intensity is changed after the onset of a stimulation I_i , and the length of twitch is shortened by successive twitches in the case of stimulation T_i . On the other hand, the peak height of I_{11} and 215Å intensity starts to decrease at the 1st twitch and remains constant at low peak height without appreciable recovery during the contraction term. In the case of successive twitch stimulation, the myosin heads of muscle are once moved from their resting position and never returned to their initial position.

Keywords : X-ray diffraction, tension, time resolution, actin, myosin head.

1. 서 론

myosin 필라멘트로부터 나온 head가 actin

과 결합한 후 각도가 변화하며, 이 head의 각도 변화가 myosin filament와 actin 필라멘트간의 미끄럼운동을 발생시킨다[1-3]. 또 근육이 장력

을 발생시킬 때도 myosin head에 큰 각도변화가 일어난다. 이 역학적 변화가 ATP 분해 cycle의 중요한 역할을 맡는 것으로 되어있다. 이러한 가설을 기본으로 myosin head의 역학적 변화, 에너지변환의 작용 등을 증명하는 실험들이 많이 소개되었다[4-6]. 그리고 지금까지 연구 결과는 근육이라는 조직세포로 구성된 것 중에서 actin과 myosin이 어떻게 분자변화를 동반한 분자 상호간의 힘을 발생시키는가를 밝히는 것이었다.

일반적으로 근육의 수축을 담당하는 중요한 단백질은 actin과 myosin이다. 근육수축의 기본 과정은 myosin에 의한 ATP의 가수분해로 얻은 에너지를 사용한 양 단백질의 상호작용에 있다. 근육 중에는 actin과 myosin이 필라멘트상에서 분자집합으로 되어있고, 액상에서 규칙적으로 배열하고 있기 때문에 X선 회절로 그 구조가 규명 되어왔다[7-9]. 근육의 수축은 actin-myosin의 화학적, 구조적, 역학적 전이와 함께 일어난다. 이것의 전이반응과 동반하는 구조변화의 소과정을 추적하는 방법의 한가지로서 전기자극 후에 동기를 일치시켜 일어나는 일련의 화학적, 구조적, 역학적 상태 변화의 시간경과를 비교하는 시분할방법(time slice)이 있다. 이 반응은 근세포내의 급격한 Ca^{2+} 상승과 troponin의 Ca^{2+} 결합에 의한 가는 필라멘트의 활성화에 의해 시작된다[10-12].

지금까지의 X선 시분할 측정의 의하면, 근육 단백질의 구조변화는 최대장력 발생에 의해서 매우 빨리 완료된다. 이것은 actin-myosin분자가 이완상태에서 힘 발생의 구조상태로 다시 전이하는 것으로 생각된다. 그러나, 이완상태에서 구조변화로의 전이에는 myosin head가 가는 필라멘트로 이동 및 myosin head를 일정하게 정리하는 시간이 포함되어 있다. 이 연구에는 연속 단수축법(twitch)을 이용하여, 이것의 시간을 0으로 두고 actin-myosin의 장력발생에 동반하는 소과정을 X선 회절에 의해 추적하였다. crossbridge (myosin 돌기)의 화학적 상태와 역학적 상태를 어느 정도 일치시키는 실험방법은 여러 가지 있지만, 본 실험에서는 골격근에 연속 단수축을 주는 방법을 사용하였고, 적도반사와 myosin으로부터 나오는 자오반사의 강도변화의 시분할측정을 하였다. 그리고 myosin crossbridge의 구조변화와 장력발생의 시간적 변화의 관계를 연구하였다.

2. 실험

2.1. 재료 및 방법

식용개구리(*Rana catesbeiana*)의 봉공근(sartorius) 또는 반건양근(semetendinosus)의 살아있는 근육을 시료로 이용하였다. 근육의 크기는 길이가 4-5cm로 두께는 약 1mm정도이다. 근육은 백금선을 나란히 자극전극으로 준비한 시료 셀의 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 필라멘트와 굵은 필라멘트의 full overlap의 길이(2.2-2.4 μ m)로 조정하였다. 냉각한 개구리 ringer용액을 시료 셀중에 순환시켜 온도를 제어하였다. 개구리 ringer용액의 조성은 115mM NaCl, 2.5mM KCl, 1.8mM $CaCl_2$, NaHCO₃, pH 7.2이다.

2.2. 실험장치

X선 회절 광학계는 일본에 있는 고에너지 물리연구소의 소각산란 회절계(BL15A, PF, Japan)를 사용하였다. 이 광학계는 수축중인 근육의 회절 실험만을 위하여 설계되었다. 광원으로 부터 13m의 위치에 있는 정밀거울은 X선의 수직방향의 발산각을 받아서 전반사 시킨다. 거울의 전장은 완만하게 굽어져 있고, 수직 방향의 beam을 광원으로부터 22m 위치에 집중시킨다. camera는 최대 3m까지 연장되며, 위치는 변경시킬 수 있다. 시료로부터 산란 X선은 진공관 안을 통과하여 검출기 면에 닿아서 검출기에 기록된다. 광원 가속기는 양전자 에너지 2.4GeV, 전류 250-350mA로 운전된다.

일차원 민감형 검출기(1D-PSD)는 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 시분할 측정 중에는 장력의 시간변화도 같은 시간대에 동시에 측정된다. 또 전류치와 시료에 입사하는 X선 강도도 기록된다.

2차원 적분형 검출기(image plate)는 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. 본 실험의 장치 및 원리는 Fig 1에 도시하였다.

CAMAC

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

2.3. 연속 단수축 실험

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 데이터수집 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. memory는 256 channel, 128 prime으로 분할하였다. 측정 시간 분해능은 5ms로 행하였다. 데이터처리 및 해석은 graphic용 computer를 사용하였다.

극성이 교차하는 것처럼 백금선은 여러 개의 나란한 다전극계를 이용하였다. 지속 시간은 pulse을 주면 전압이 상승하고 이것에 의해 발생한 장력이 최대가 되는 전압의 1.3-1.5배로 설정하였다. 이렇게 하여 근육을 한번에 완전히 수축되도록 하였다. 자극장치(UT형, Shiko Co., Tokyo)는 연속적으로 자극을 줄 수 있도록 설계되었고, 단수축에 pulse를 25-30Hz로 연속적으로 주어서 근육을 강하게 수축시켰다. 식용개구리 붕공근은 등척성 단수축으로 200-400gw의

장력을 적용하였고, 등척성 수축할 때에는 이것 이상의 장력이 발생하기 때문에 장력 transducer에서는 500gw이상 측정 가능한 것으로 이용하였다.

연속 단수축 실험에 관하여서는 장력발생과 X선 반사강도의 변화가 온도와 자극간격에 의존하기 때문에 온도와 자극간격은 연속 단수축에 의한 각각의 장력 피크가 상호간 분리하여 관측되도록 설정하였다. 여기에는 자극간격이 80ms, 온도 13℃, 연속자극의 회수는 5회로 한정하였다. 이처럼 수축은 1개의 근육으로 20초의 휴지시간을 주어서 10회 반복하였다. 10회 때의 장력의 값은 1회 때의 값의 약 90%가 되었고, 이 이하로 장력이 내려갈 경우 실험을 중단하였다.

2.4. 시분할(time slice) X선 회절법

장력 발생과정을 추적할 때, 그 과정을 비교하고 싶은 시간 분해능에 의존하고 몇 개의 시간적 구간(time slice)으로 나누어서, 각 시간상으로 1D-PSD에 검사한 데이터를 기록한다. 시간간격이 짧고, 1회 측정으로 기록하기에는 부족하기 때문에 측정을 반복한 데이터를 축적한다. Fig. 2에는 시분할 X선 회절법의 원리를 나타내었다. Fig. 2에서 나타낸 것은 장력의 시간 경과를 여러 가지 시간 prime으로 선택하여 이

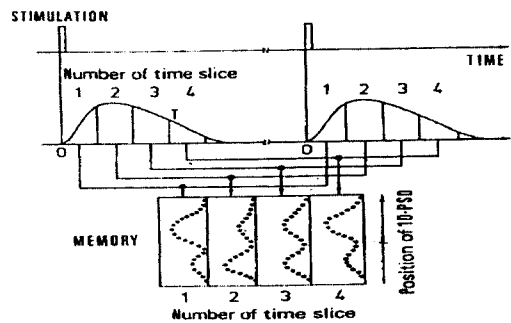


Fig. 2. Time-resolved X-ray equatorial diffraction diagrams. The signals of one dimensional pattern were stored as a function of time in a CAMAC memory linked to the computer. The memory was divided into 128 frames and 256 channels with a 5 ms time resolution.

것을 가산하였다. 작성한 데이터 file의 전시간 prime을 가산해서 구한 강도 프로파일에 대하여 극소치를 연결한 back-ground를 결정한 후에, 강도 프로파일을 각시간 prime의 공통 back-ground위의 피크의 적분강도를 계산하여 시간의 함수로 구하였다. 장력 데이터도 시간의 함수로서 동시에 기록하였기 때문에 양자의 데이터를 측정시간의 함수로서 최종적으로 나타내었다.

3. 결과 및 고찰

3.1. X선 회절에 의한 회절상

전기자극에 의한 개구리 팔격근 이완상태의 회절상은 다음과 같다. X선 회절상은 앞서 말한 것과 같이 굵은 필라멘트와 가는 필라멘트의 나선구조에 의한 2개의 층선반사로 구성된다. 2개의 층선반사는 양 필라멘트의 구조주기가 다름에 따라 일반적으로 분리된 형태로 나타난다. Fig. 3에서 A가 붙은 것을 actin반사이고, M이 붙은 것은 myosin반사이며 F-actin에 의한 주요 반사는 370Å을 주기로 하는 층선과 72, 59, 51Å의 비교적 강한 층선 및 27Å자오반사로 되어 있다. 27Å 자오반사는 최근접actin monomer의 축방향 간격에 상당하는 반사이며 59Å 및 51Å 반사는 전부 actin monomer의 반사이다. 이완상태에서는 actin과 myosin이 떨어져 있기 때문에 각각 다른 위치에서 관찰되었다.

Fig. 3. Small-angle X-ray diffraction pattern from frog sartorius muscle in living relaxed state.

3.2. 연속 단수축에 대한 장력변화

근육의 길이를 외부적으로 고정하여 단일 pulse자극을 하면 일과성의 twitch라 부르는 단수축 장력이 발생한다. 또는 상당히 짧은 간격으로 많은 pulse자극을 하면 근육은 완전 수축하여 최대의 장력이 발생한다. 완전수축이 안되도록 적당한 시간간격으로 단수축 자극을 반복하면, 다음의 자극으로 발생하는 장력은 앞의 장력에 가산된다. 이처럼 근육을 연속적으로 단수축 하는 것에 의해 일단 발생한 장력변화는 처음의 정지상태로 되돌아가지 않고 다음의 수축으로 이동하는 것이 가능하여 반응을 어느 정도 일치시키는 것이 가능하다. 이때 장력은 가산될 뿐만 아니라, 각각의 자극으로부터 최대장력에 이르는 시간을 짧게 한다. Fig. 4에서는 (001)과 (110)면으로 부터 가장 강한 2개의 적도반사의 단수축의 강도변화(I_{10} , I_{11})를 나타내었다. Yagi[13,14]에 의하면 이러한 적도 반사의 강도변화는 근육의 구조 변화를 나타낸다.

Fig. 4. Time-resolved X-ray equatorial diffraction diagrams from a single muscle fiber of frog during an isometric twitch contraction at 13°C. S : start of stimulation (t=0), T : twitch tension. Time resolution is 15 ms.

3.3. 자극의 시간(T_i) 의존성

Fig. 5에서 i 번째의 자극의 시작 후 i 번째의 장력이 피크에 도달하기까지 시간을 T_i 라 하면, T_i 는 자극의 순간뿐만 아니라 연속 단수축의 회수에 의존한다. 따라서 자극간격, 연속자극의 회수, T_i 의 관계를 비교하였고 이것에 대한 자극간격의 의존성을 나타내었다. 조건은 13°C, 80ms로 하였다. T_i 는 온도에 의존하지만, 13°C

라는 온도는 이전의 Tanaka[15]의 연구에서 전기자극에 의한 근육구조 변화를 시험 하였는데, 이 연구 결과를 바탕으로 각각의 자극에 의한 장력의 증가량과 X선 반사의 변화가 최대가 나타나는 조건으로 결정하였다. 또한 Fig. 6에서 T_2 의 최소치는 약 60ms로 T_3 의 최소치는 약 50ms로 하였다. 이처럼 T_1 의 최소치는 70-90ms의 자극간격의 범위에 두었고, 자극회수를 증가시킬수록 T_1 는 감소하였다. 그러나 3회이상 자극의 회수를 증가시켜도 T_1 의 감소는 보이지 않았다. 즉, T_1 는 45ms이하로는 내려가지 않았다. 자극간격이 150ms가 되면, 연속단수축의 T_1 에 대한 효과는 거의 없었고, 단순히 단수축이 반복적으로 나타났다. 한편, 자극간격이 70ms이하가 되면 각각의 장력피크를 정확히 결정할 수가 없었다. 이상의 것으로 T_1 의 감소는 자극간격이 70-90ms일 때 최적의 조건으로 나타났다. X선 강도변화와 겹쳐지기 때문에 연속자극의 간격은 80ms, 자극회수는 5회까지로 결정하고, 온도는 13°C로 X선 회절실험을 하였다.

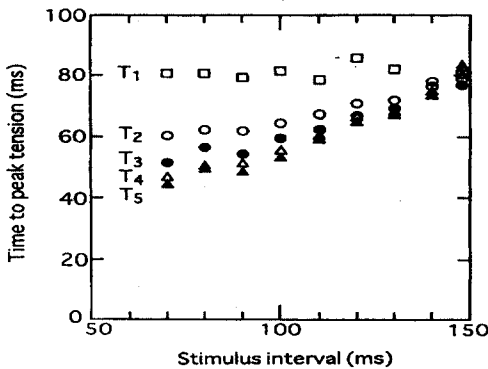


Fig. 5. Relation between the stimulus interval and the time to the peak tension. Muscle were stimulated by successive pulses at the various time(70-150 ms) at 13°C. Each point is the average from 6 different muscle.

3.4. 적도반사의 강도변화

앞에서 논하였던 것처럼 근육이 연속적으로 수축했을 때, 일단 발생한 변화는 처음으로 돌아가는 것이 아니고, 다음의 수축으로 이동하는 것이다. 따라서, 단순한 단수축과 연속 단수축에서는 crossbridge의 운동과 구조변화를 검출하

였다. 먼저 I_{10} 과 I_{11} 의 연속 단수축 중의 시간변화를 비교하였다. (100)면과 (110)면으로부터 나오는 가장 강력한 2개의 적도반사의 강도변화 (I_{10} , I_{11})를 Fig. 6에 나타내었다. 각각의 반사피크에 대하여 back-ground의 윗부분의 적분치를 강도로 측정하였다. 개구리 골격근의 경우, 정지(이완)상태에는 I_{10} 가 I_{11} 보다 약 2배 강하다. 근육이 등척성 수축을 하면, I_{10} 은 약 1/2정도 감소하고, I_{11} 은 약 2배정도 강하게 된다. 이처럼 적도반사의 강도변화는 필라멘트의 6방격자 내의 myosin-crossbridge의 분포변화에 의해 설명되어 왔다[16]. 즉, 굵은 필라멘트가 가는 필라멘트쪽으로 이동하는 것이다. 시각 0에서 처음 자극을 주어서, 그 후에 80ms의 간격으로 4회자극을 하였으며 자극시각을 종축에 나타내었다. 또 I_{10} 과 I_{11} 은 처음정지 상태의 값을 기준으로 하여 나타내었다.

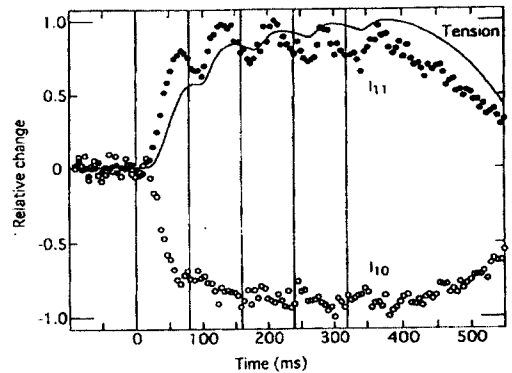


Fig. 6. Time courses of change in equatorial intensities and tension. On contraction I_{10} decreases and I_{11} increases in an opposite way. The figure is shown so that deviation of the intensities from their resting values becomes clear. Each data point represents a mean value of 6 different muscle.

Fig. 6에서 연속 단수축에 의한 I_{10} 의 반응은 확실하지는 않았지만, I_{11} 은 5회의 단수축에 대하여 5개의 피크가 명확히 관측되었다. I_{11} 은 각각의 자극으로 피크에 도달한 후 감소하였지만 처음으로는 돌아가지 않았다. I_{10} 은 최초의 자극으로 감소가 시작되었고, 그 후 낮은 값은 보존되었다. 이것은 최초의 자극으로 가는 필라멘트

쪽으로 일단 한번 이동한 crossbridge가 그 후의 연속수축 중 가는 필라멘트의 근방에 머물러 있는 상태에서 다음의 자극으로 한번에 갑자기 힘이 발생하는 것을 암시하고 있다. 이 그림에서 명확히 증명되어진 것은 각각의 자극개시로부터 I_{11} 의 여러 가지의 피크에 도달하는 시간 I_i 가 장력의 경우와 같이 연속자극에 의해 감소하고 있다는 것을 시사하는 것이다.

3.5. Myosin 자오반사강도의 시간변화

다음은 굵은 필라멘트에서 발생하는 143Å와 215Å 자오반사의 강도변화를 비교하였다. 이 2개의 반사는 myosin 필라멘트의 기본주기(430Å)의 3차와 2차반사에 해당한다. Fig. 8에서 이 2개의 반사의 강도변화를 장력변화와 함께 나타내었다. 143Å 자오반사는 굵은 필라멘트에서 튀어나온 2개의 head로부터 되는 myosin-crossbridge의 규칙배열로부터 오는 반사이다. 수축중 1.3%정도 주기가 변하여 145Å가 되고, 그 적분강도(I_{143})는 증가한다. 이 수축중의 변화는 필라멘트축에 따라서 있는 myosin-crossbridge의 분포가 변하고, 필라멘트축에 수직으로 투영한 질량분포가 145Å 주기로 증가하게 되는 것을 시사한다. 215Å 반사는 이완상태로 myosin-crossbridge의 주기적 유동을 받은 나선배열에 의한 반사로[17], 근육이 수축하면 매우 약하게 된다. 이것은 수축중 myosin-crossbridge가 각각의 myosin 필라멘트 주위에 나선배치가 무너지고, 가는 필라멘트의 근방에 이동하고 재배열하는 것으로 사료된다. 따라서, 양 자오반사의 강도변화는 myosin-crossbridge의 필라멘트축에 따라 투영구조의 변화에 대한 정보를 제공한다. 적도의 I_{11} 반사의 변화와 같이 I_{143} 은 연속자극으로 증가하는 3회 이후의 증가는 포화하는 경향을 나타낸다. 자극과 자극의 사이에는 일단 감소하지만 이완상태 level까지 내려가지는 않았다. 자극 개시후 I_{143} 의 피크에 도달하는 시간(I_i)은 62.5ms(I_1), 45.0ms(I_2), 41.3ms(I_3), 38.8ms(I_4), 그리고 53.0ms(I_5)는 감소하였다. 따라서, 연속 단수축은 I_{143} 의 피크에 도달하는 시간의 감소를 일으켰다. 한편, I_{215} 는 적도 I_{10} 반사처럼 최초의 자극에는 감소하지만 그 후 자극사이의 강도회복을 나타내지 않고, 낮은 값을 그대로 보존하였다. I_i 의 감소가 관측되지 않은 150ms의 자극간격에는 I_{215} 는 자극과 자극사이에 현저한 회복이 관측되

었고, 가는 필라멘트근방에 있는 myosin-crossbridge가 자극과 자극사이의 이완위치에 돌아오는 것을 시사하고 있다.

Fig. 8. Time courses of changes in the 143Å and 215Å intensities and tension when the muscles were simulated by 5 successive pluses at an interval of 80 ms at 13°C. The first stimulation was given at $t=0$, and the times, when the muscle was stimulated, were shown by the vertical lines. Both intensity and tension are expressed relative to the peak value of each change. Each data point represents a mean value from 6 different muscle.

4. 결 론

근육 수축중에 X선 구조분석에 의해 관찰되어진 두드러진 변화는 근육수축을 하는 가운데 myosin head의 움직임과 수축분자의 구조적 변화가 관찰되었다. 자극간격 80ms, 온도 13°C의 실험 조건하에서 최초의 자극으로 한번 가는 필라멘트의 근방에 이동한 myosin-crossbridge는 그 후의 연속 단수축 중에는 이완위치에 돌아가지 않고, 가는 필라멘트 근방에 머물고 있다는 것을 강력히 시사하고 있다. 시분할은 자극후 장력피크를 필요로 하게 되고, 장력피크의 크기는 단수축 자극에 의존하였다. I_{10} , I_{11} , 134Å과 215Å의 강도는 5ms 분해능으로 측정하고, 모두 등척성 장력으로 기록되었다. 강도 I_{11} 과 143Å의 피크는 자극 I_i 의 시작 후에 변하고, T_i 경

우 단수축의 거리가 단축되었다. 한편, 장력 I_{10} 과 215A의 피크는 최초의 단수축이 감소하기 시작하였고, 수축하는 동안에는 장력이 회복되지 않고 낮은 값으로 유지되었다. 연속적인 단수축으로 자극할 경우, 일반적인 예상과는 달리 최초의 자극후 근육의 myosin head가 처음 이완상태로는 되돌아가지 않는다는 것을 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. 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).
6. 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).
7. 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).
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. Poggesi, 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 Studied 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. N. Yagi, Effects of N-ethylmaleimide on The Structure of Skinned Frog Skeletal Muscle, *J. Muscle Res. Cell Motil.*, **13**, 457 (1992).
14. 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).
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. 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).
17. 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).