

## 잉어 Myosin B의 몇 가지 생물물리화학적 성질

卞 在 亨\*

## SOME PHYSICO-CHEMICAL CHARACTERISTICS OF CARP MYOSIN B

by

Jae Hyeung PYEUN

Natural actomyosin was extracted from the dorsal muscle of carp (*Cyprinus carpio*), and some physico-chemical properties were determined.

The sedimentation constant ( $S_{20,w}$ ) of the purified skeletal muscle actomyosin was about 24.76s and the ATP sensitivity 147-176.

The specific viscosity was rapidly ascended with the increase of protein concentration as other vertebrate actomyosins.

ATPase activating site under the effect of pH variation was showed on the both sides of acid and base resembling with the tendency of rabbit skeletal muscle actomyosin, and found at 6.0 on the acidic side and at 9.5 on the basic side.

## 서 언

어류의 근육 구성 단백질 중 actomyosin에 관해서는 대구, *Gadus callaris*에서 추출 검토한 Connell (1954; 1957; 1958)의 보고를 비롯하여 잉어에 관한 Migita (1959) 및 Takashi (1970)의 보고 등이 있다. 그러나, 추출 방법과 물리화학적인 성질에 관해서는 아직도 검토할 여지가 많다.

저자는 근육 단백질의 비교생화학적인 연구를 위한 기초 실험으로서 잉어의 actomyosin을 추출하여 그 물리화학적인 성질과 관련하여 생물학적인 활성을 측정하여 수산 척추동물의 근육 구성 단백질인 actomyosin에 관한 몇 가지 성질을 구명코자 본 실험을 실시하였다.

## 실험 방법

**Actomyosin의 추출**: 살아 있는 양식 잉어(*Cyprinus carpio*)를 저온실( $2\pm 2^\circ\text{C}$ )로 옮겨서 머리를 잘라 죽인 뒤 배육(背肉)을 절취하여 Fig. 1의 방법에 따라 actomyosin을 추출하였다.

**염석 곡선**: 근육의 염용성 구분을 추출하여 Snellman(1954)의 방법에 따라 염석 곡선을 측정하였다.

**초원심분석**: Hitachi 제 분석용 초원심 분리기 UCA-1형으로 bar angle  $65^\circ$  측정 온도  $10^\circ\text{C}$ , 최고 회전 속도 55,430 rpm에서 관찰 측정하였다.

**점도의 측정**: Ostwald형 점도계(용매 유속: 55.4초)로 단백질의 농도 0.25~3mg/ml의 범위에서 측정하였다.

**ATP-sensitivity**: 0.6 M KCl 용액중에 용존되어 있는 단백질의 농도 0.3~0.5mg/ml에 대하여 ATP-2Na 및  $\text{MgCl}_2$ 를 각각 1mM씩을 첨가하여  $25^\circ\text{C}$ 에서 첨가 전후의 점도를 측정하고 Weber & Portzehl(1952)의 식에 의하여 감도를 산출하였다.

\* 釜山水産大學; Dept. of Food Science and Technology, Pusan Fisheries College

下 在 亭

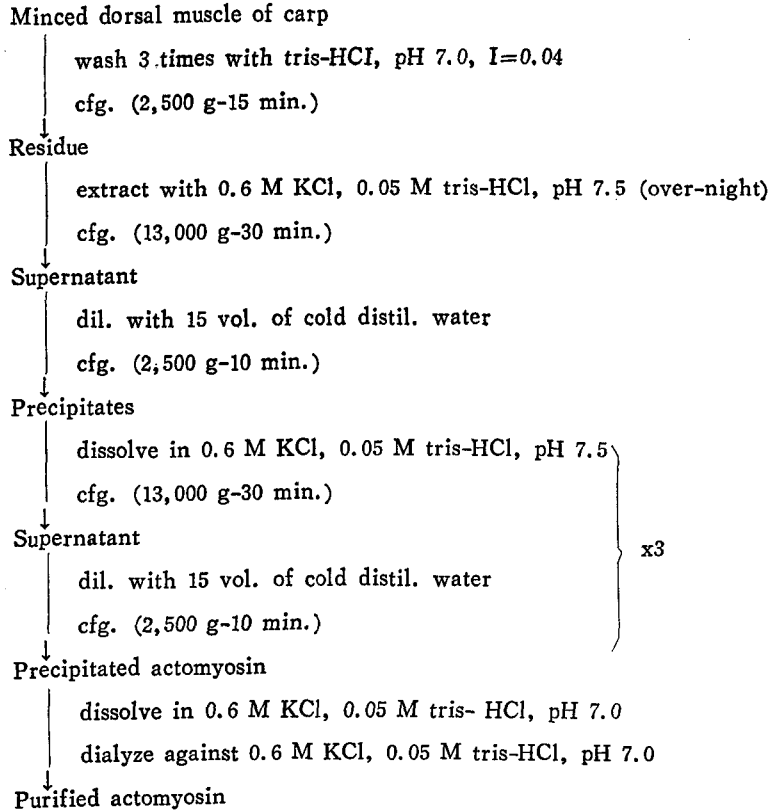


Fig.1. Procedure for preparation of carp actomyosin.

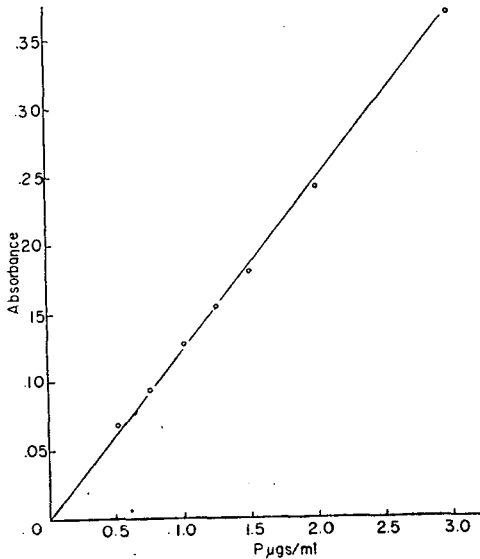


Fig. 2. Standard linear graph of phosphorus concentration in absorbance at 720 mμ.

ATPase activity: 0.3 M KCl, 0.05 M histidine buffer 및 5 mM Ca<sup>2+</sup> 또는 0.3 M KCl, 0.05 M histidine buffer 및 Mg<sup>2+</sup>의 각 medium에서 magnetic stirrer로써 교반하면서 25°C에서 반응시키고, 반응 5분후 최종 농도가 4%로 되도록 20%의 trichloro acetic acid를 신속히 가하여 단백질을 침전 실행시킨 뒤에 원심 분리한 상등액을 취하여 Rockstein(1951)의 방법에 따라 유리한 무기인의 양을 측정하여 미리 만든 standard linear graph(Fig.2)에서 그 농도를 구하였다.

단백질의 농도: 시료 중의 단백질의 농도는 개량 Biuret 법(Umemoto, 1966)에 따라 측정하였다.

결과 및 고찰

잉어의 배육을 절취하여 염용성 구분을 추출한 후, 염석 곡선을 측정한 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 염용성 구분 중의 각 구성 단백질에 대한 염석 범위는 actomyosin이 28~35%, myosin은 38~45%의 유압

잉어 Myosin B의 생물물리화학적 성질

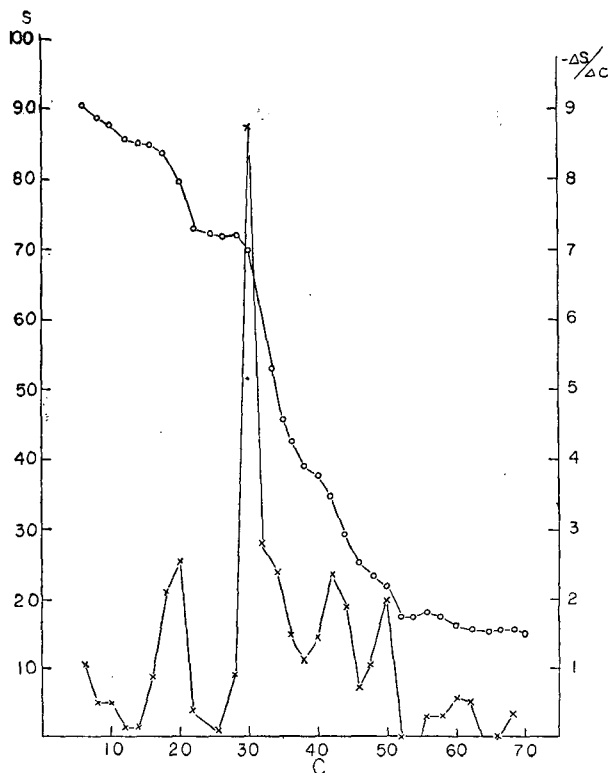


Fig. 3. Salting-out curve of the salt-soluble fraction of carp dorsal muscle. S= the extinction at 278 mμ. The initial extinction is put to 100. C=percent in vol. of saturated ammonium temp. 3°C for 16 hours. ds/dc=the derived salting-out curve.

포화에서 염석하는 것을 알 수 있다. 이 결과는 Migita(1960)가 같은 잉어의 근육 염용성 추출분을 측정 한 결과(actomyosin 및 myosin의 염석 범위: 30~45%)와 비교하여 볼 때 actomyosin의 염석 범위가 조금 떨어질 뿐 큰 차이는 없었다. 그리고, 15~22%의 염석 구분은 actin일 것으로 짐작되며, 이 결과는 Snellman(1954)이 은혈 육상 척추동물인 토끼 팔각근의 actin의 염석 범위가 9~20%라고 한 점과 비교하면 조금 높은 범위에 있다.

한편, Fig. 1의 방법으로 분리한 actomyosin의 초원심 침강도형을 Fig. 4에서 나타냈으며, 여기서 산출한 침강 정수( $s_{20,w}$ )는 약 24.76s이며, 이 값은 냉혈 양서류인 개구리 (*Rana pipiens*)의 9.17 s (de Villafranca, 1962) 각류인 게 (*Limulus polyphemus*)의 40s (de Villafranca, 1968), 그리고 2대패류인 가리비 (*Pecten maximus*)의 6.1~7.5s (Rüegg, 1961)와 비교하여 볼 때, 각각 상이한 값을 나타내었는데, 이와 같은 침강 계수가 상이한 값을 보이는 원인은 actomyosin의 정제 방법의 차이,

동물종에 따른 분자 형태의 특이점 또는 초원심 분석의 측정 조건의 영향에 있는 것인지 더욱 검토해 봐야 할 것 같다.

잉어 actomyosin에 대하여 온도에 따른 상대 점도 및 환원 점도의 변화를 Fig. 5 및 Fig. 6에서 나타내었다. 여기서 상대점도 및 환원점도가 단백질 농도의 증가

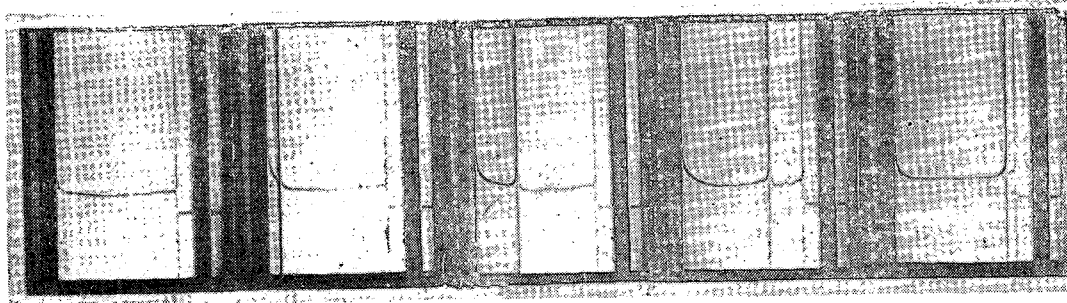


Fig. 4. Sedimentation patterns of carp actomyosin. Solvent: 0.6 M KCl, 0.05 M tris-HCl, pH 7.0. Photographs were taken at 55,430 rpm, and at 0, 10, 30, 50, and 72 min. (right to left).

와 더불어 급격히 상승하는 결과는 다른 동물종의 actomyosin이 보인 경향과 비슷하다. 이 점은 다른 방법으로 추출한 잉어 actomyosin을 측정 한 점성 곡선 (Takashi, 1970)과 비교하여 볼 때 본 실험 결과는 actomyosin의 점성에 대한 단백질 농도 의존성이 훨씬 높았다. 그리고, 온도에 따른 영향은 온도가 상승함에 따라 점성은 현저히 떨어지는 경향을 나타내었다. 이 점성과 단백질 농도와의 관계에 대해서, Takashi(1970)는 잉어에서 추출한

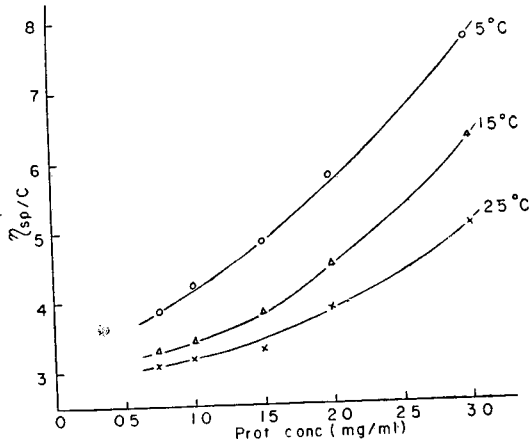


Fig. 5. Relative viscosity of carp actomyosin under the effect of temperature variation. The protein was dissolved in 0.6 MKCl, 0.05 M tris-HCl, pH 7.0.

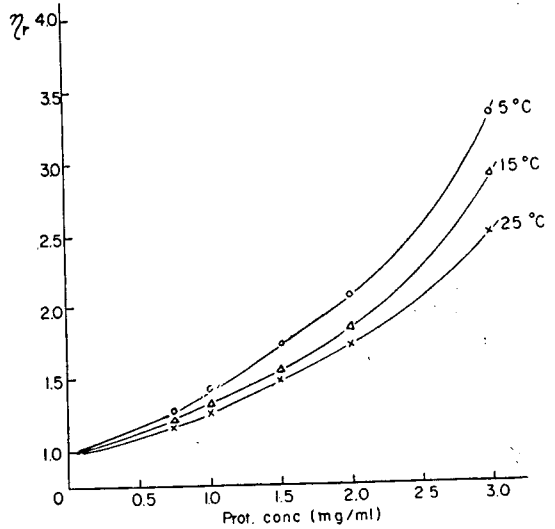


Fig. 6. Reduced viscosity of carp actomyosin under the effect of temperature variation. The protein was dissolved in 0.6 M KCl 0.05 M tris-HCl, pH 7.0.

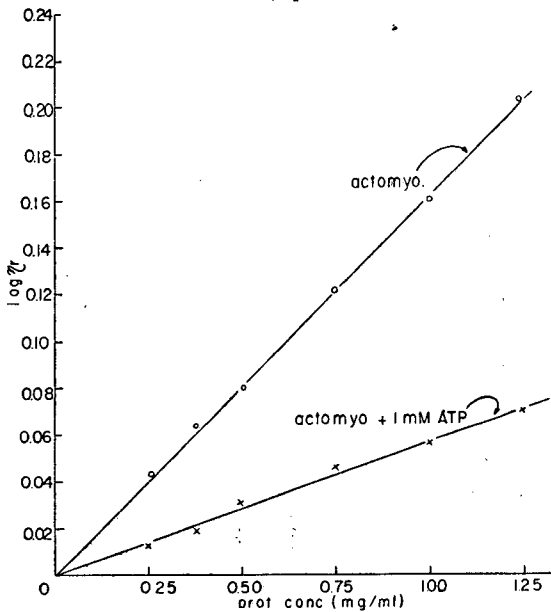


Fig. 7. Variation of viscosity under the effect of ATP by the concentration of carp actomyosin.

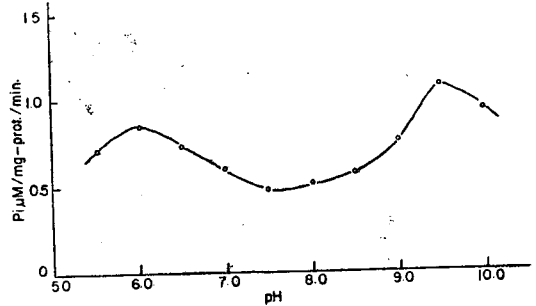


Fig. 8. ATPase activity of the actomyosin of the dorsal muscle of the carp as a function of pH. Reaction was run in 0.05 M histidine buffer, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.3 M KCl and 2mM ATP, and at 25°C of the reaction temperature.

actomyosin이 토끼 골격근에서 추출한 actomyosin의 점성보다도 조금 떨어지는 원인은 actomyosin의 정제 방법의 차이에서 오는 정제 도중의 변성이나 또는 어종에 따른 근육 단백질의 차이에 있다고 하였다. 그러나, 본 실험의 점성에 관한 결과는 Takashi (1970)의 것과 다른 점에 비추어 actomyosin의 정제 방법에서 오는 영향일 것으로 생각되었다.

## 잉어 Myosin B의 생물물리화학적 성질

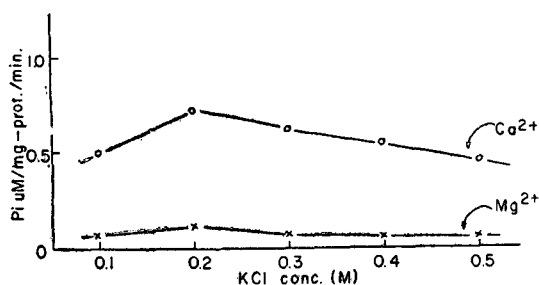


Fig. 9 ATPase activity as a function of  $Ca^{++}$  and  $Mg^{++}$  by the changes of the concentration of KCl. Reaction was run in 0.05M histidine buffer, pH 9.0, 5.0m  $MgCl_2$  or  $MgCl_2$  and 2.0mM ATP.

$Mg^{2+}$ 에 의해서는 KCl농도에 따른 활성의 변화를 찾아 볼 수 없었다.

그리고, 이 actomyosin은 ATP-2Na에 의하여 Fig.7에서와 같이 점성이 급격히 떨어졌으며 이 결과로 계산한 ATP-sensitivity는 147~176이며, Takashi (1970)가 보고한 결과보다 조금 높은 값을 보였다.

한편, actomyosin을 써서 측정된 pH영향에 따른 ATPase activity (Fig.8)는 온혈 척추동물인 토끼의 그것과 비슷한 성질을 나타내었다. 그리고, pH에 따른 활성측은 산, 알칼리 양성측이었으며 산성측의 활성 중심은 pH 6.0 전후, 알칼리측은 9.5 전후였다.

그리고, 이 actomyosin을  $Ca^{2+}$ 과  $Mg^{2+}$ 의 영향 아래서 KCl의 농도에 따른 ATPase activity의 변화를 측정된 결과 (Fig.9),  $Ca^{2+}$ 에 의해서는 활성이 촉진되며, KCl농도 0.2M일 때 가장 높은 활성을 보였다.

## 요 약

잉어의 배육 골격근에서 actomyosin을 추출하여 몇 가지 생물물리화학적 성질을 측정 검토한 결과는 다음과 같다.

즉, actomyosin의 침강 정수( $s_{20,w}$ )는 24.76s이고 그 점성은 단백질 농도의 증가와 더불어 급상승하여 다른 actomyosin의 그것과 비슷한 경향을 보였다. 그리고, ATP-sensitivity는 147~176이었고, pH영향하에서 ATPase activity는 산성측이 6.0부근, 알칼리성측이 9.5부근이었으므로 ATPase activating site가 산, 알칼리양측에 있음을 알았다.

## 참 고 문 헌

- Arai, K., R. Takashi and T. Saito (1970) : Studies on the muscular proteins of fish 5. On the superprecipitation of actomyosin from carp muscle. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 36(5), 169~172.
- Connell, J. J. (1954) : Studies on the proteins of fish skeletal muscle 3. Cod myosin and actin. Biochem. J. 58, 360-367.
- Connell, J. J. (1958) : Studies on the proteins of fish skeletal muscle 4. Ultracentrifugal analysis of codling extracts. *ibid.* 69, 5-12.
- Connell, J. J. (1958) : Studies on the proteins of fish skeletal muscle 5. Molecular weight and shape of cod fibrillar proteins. *ibid.* 70, 81-91.
- de Villafranca, G. W. and H. L. Hochgraf (1962) : Adenosine triphosphatase activity of frog myosin B. Comp. Biochem. Physiol. 6, 149-163.
- de Villafranca, G. W. (1968) : Some physico-chemical properties of myosin B from the horse shoe crab, *Limulus polyphemus*. *ibid.* 26, 443-454.
- Migita, M. and S. Otaka (1960) : Influence of death conditions upon muscle proteins 1. Composition of myosins from carps killed instantly and in anguish. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 26(2), 140-148.

- Rockstein, M. and P. W. Herron(1951): Colorimetric determination of inorganic phosphate in micro-organic quantities. *Anal. Chem.* 23(10), 1500-1501.
- Rüegg, J. C. (1961): The proteins associated with contraction in Lamellibranch catch muscle. *Proc. Roy. Soc. London B* 154, 209-223.
- Snellman, O. and M. Tenow(1954): A contractile element containing tropomyosin(actotropomyosin). *Biochem. Biophys. Acta* 13, 199-208.
- Takashi, R. K. Arai and T. Saito(1970): Studies on muscular proteins of fish 2. Preparation of actomyosin from carp muscle. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 36(2), 169-172.
- Umemoto, S. (1966): A modified method for estimation of fish muscle protein by Biuret method. *ibid.* 32(5), 427-435.
- Weber, H. and H. Portzehl(1952): Muscle contraction and fibrous muscle proteins. *Advances in Protein Chemistry* 7, 161-252.