

海産腹足類의 Paramyosin의 分離 및 그 特性에 關한 研究

卞 在 亨

釜山水産大學 食品工學科

Isolation and Characterization of Paramyosins of Marine Gastropods

by

Jae-Hyeung Pyeun

Dept. of Food Science and Technology

Pusan Fisheries College

ABSTRACT

The muscle of abalone, *Notohalotis discus* (REEVE), and top-shell, *Turbo cornutus* Solander, were examined for protein composition.

Then paramyosins which are known as one of the important structural protein of the muscle fibrils were isolated from the both muscle and their physico-chemical properties such as solubility, salting-out behaviour, intrinsic viscosity, ATPase activity, etc. involving amino acid composition and N-terminal amino acid residues were investigated to elucidate phylogenetic characteristics more intensively from the viewpoint of comparative biochemistry.

The analysis of protein composition resulted in the following estimations: abalone muscle; water-soluble protein of 22 %, salt-soluble protein, 34%, alkali-soluble protein, 20%, and stroma protein, 24%, and top-shell muscle; water-soluble protein of 16%, salt-soluble protein, 30%, alkali-soluble protein, 29%, and stroma protein, 25%, respectively.

It is demonstrated in sedimentation analysis that paramyosin and myosin-actomyosin account for approximately 65% and 35% of the salt-soluble protein of abalone, and that the composition of both sediments in top-shell was approximately 70% and 30%, respectively.

The ultracentrifugally homogenous paramyosins isolated essentially according to Bailey's ethanol-dried method from both of the muscle showed a $S_{20,w}^0$ of 3.14s for abalone and a $S_{20,w}^0$ of 3.50s for top-shell.

The both paramyosins were commonly rich in arginine, aspartic acid, and glutamic acid, while scarcely contained proline and tryptophan, in rough accord with the other paramyosins thus far reported.

It is clear that these gastropod paramyosins showed of having the characteristic N-terminal amino acid residues such as N-aspartic acid, N-valine, N-serine, and N-threonine in common.

The abalone paramyosin completely salted in with KCl beyond 0.35 μ and the top-shell paramyosin beyond 0.30 μ . The abalone paramyosin was salted-out between 18% and 30% saturation of ammonium sulphate and the top-shell paramyosin between 22% and 29% saturation.

The intrinsic viscosities of abalone and top-shell paramyosins at 25°C were estimated respectively to be 3.1 dl/g and 2.6 dl/g showing somewhat higher than the values for some other paramyosins from lamellibranchs.

In regard with the ATPase activity, the paramyosin specimens did not exhibit any significant activity over through the pH conditions of 5 to 9.5, irrespective of the presence of Ca⁺⁺ or Mg⁺⁺. So was the case with the abalone paramyosin prepared by a slightly modified Bailey's wet-extraction method.

緒 論

海産動物은 動物性 蛋白質의 給源으로서 매우 重要하며 그 筋肉蛋白質의 性質을 充分히 把握하여 物理化學的인 特性을 適切하게 活用한다면 海産動物肉은 蛋白質食糧으로서 보나 効果의으로 利用할 수 있을 것이다. 특히 水産動物은 分類學上 陸上動物과는 比較가 안될 程度로 廣範圍하고 아주 많은 種類들이 包含되므로 그 筋肉蛋白質의 特性을 生化學的으로 比較 研究하는 것은 極히 意義있는 일이라고 생각된다.

水産動物의 筋肉蛋白質에 關한 研究에 있어 魚類의 筋肉蛋白質의 組成은 大体로 陸棲脊椎動物에 比하여 基質蛋白質의 量이 적은 反面, 筋原纖維蛋白質은 약간 많이 含有되고 있다고 發表하였고(Miyake and Hayaishi, 1956; Migita, 1959; Shimizu and Simidu, 1960), 頭足類인 피듬어꾸투기(*Onmastrephes sloani pacificus*)는 蛋白質의 組成이 魚類의 그것과 비슷하고(Matsumoto, 1958), 2枚貝類인 *Meretrix lusoria*는 部位에 따라서 다른 組成을 보이며, 內轉筋인 때는 魚類와 비슷하고, 足筋은 토끼 骨骼筋의 蛋白質의 組成과 비슷하다고 하였다(Baba, 1959).

Takahashi and Tanaka(1961)는 소라의 筋肉蛋白質의 組成을 部位別로 測定하여 myosin區와 非 myosin 區蛋白質이 魚類보다 훨씬 적고 基質蛋白質은 일등히 많은 含量을 보인다고 하였다.

海産無脊椎動物의 筋肉構成蛋白質에 關하여 Yagi等(1955)은 몇가지 貝類의 myosin B로서 ATP 感度와 ATPase 活性을 測定한 結果 ATP感度は 전복足部 < 가리비閉殼筋 < 토끼 橫紋筋 < 昆蟲의 胸筋 < 가리비의 活動筋 順으로 強하다고 하였다. Tonomura等(1955, 1956)과 Tonomura and Kitagawa(1960)는 큰 가리비(*Pecten yessoensis*) myosin B는 slow adductor에서 抽出한 것보다 fast adductor에서 抽出한 것이 ATPase 活性이 數倍 더 크며, ATP感度 또한 類似한 傾向이고 이 slow 및 fast adductor myosin B의 ATPase 活性의 差異는 分子中の 活性點의 數가 다른 것이 原因일

것이라고 하였다. Maruyama and Kominz(1960)는 큰 가리비 內轉筋 myosin A와 myosin B로서 流動復屈折方法으로 分子의 長이를 測定하고 myosin A는 1,700~1,900Å, myosin B는 1~2μ이라고 報告하였으며, Rüegg(1961 a)는 가리비의 一種인 *Pecten maximus*와 진주담치(*Mytilus edulis*)의 actomyosin과 myosin의 精製途中의 沈降定數와 ATPase 活性의 變動을 檢討하였다.

Bárány等(1965, 1966)은 가리비의 一種인 *Pecten aradians* 橫紋筋 myosin의 ATPase 活性은 토끼의 骨骼筋 myosin보다는 높으나 大体로 비슷하며, 그 아미노酸 組成은 토끼 myosin과 比較할 때 약간의 差異가 있고 調製中에는 cysteine과 β-mercaptoethanol을 쓰지 않으면 ATPase 活性이 상당히 떨어진다고 報告하였다.

海産 甲殼類 筋肉蛋白質에 關하여 Woods等(1963)은 lobster myosin의 性質은 魚類 myosin과 많이 닮았다고 하였고, de Villafranca等(1964, 1967, 1968, 1969)도 창게(*Limulus polyphemus*) myosin B와 myofibrils를 分離하고 ATPase 活性과 沈降速度等 生物物理化學的인 性質을 測定하여 다른 動物과는 別다른 差異가 認定되지 않는다고 報告하였다.

軟體動物의 特異한 收縮舉動(tonic contraction)에 關與하며 脊椎動物에서는 찾아볼 수 없는 myofibrillar protein인 paramyosin은 α-helix狀 蛋白質로서(Cohen and Szent-Györgyi, 1957), Hall等(1945)에 依하여 paramyosin fibril로서 처음으로 發見 命名되었으며, 그 後에 Bailey (1956, 1957)와 Bailey and Rüegg (1960)는 不溶性 tropomyosin으로 水溶性 tropomyosin과 區分하여 그 物理化學的인 性質을 檢討한 바가 있다.

Paramyosin의 分子構造와 形狀 및 筋肉의 收縮機構(catch mechanism)에 關한 研究로서는, 二枚貝의 一種인 *Venus mercenaria*의 paramyosin의 抽出方法을 檢討하고 鹽類溶液中의 粘度와 沈降性質을 報告한 Laki(1957)의 研究를 비롯하여 Locker and Schmitt

(1957)는 同 paramyosin을 trypsin으로 處理하면 myosin의 分解에서 생기는 分解物과 비슷한 分解物이 生成된다고 하였으며, 이 paramyosin은 弱하지만 myosin과 같은 ATPase 活性이 있다고 發表하였다.

Johnson and Kahn(1959)은 paramyosin系는 에너지의 消耗없이 張力を 維持할 수 있다고 하였으며, Kubo(1961)는 피듬어풀뚜기에서 protein A와 protein B를 分離하여 分子의 길이는 protein A가 1,560 Å, protein B가 720Å, 그리고 兩 蛋白質의 N-末端基는 存在하지 않는다고 하였다.

Milstein and Bailey(1961)는 *Pinna nobilis*의 tropomyosin A를 trypsin 分解하여 45~48%의 tryptic core를 얻었는데 이 tryptic core의 아미노酸 pattern은 元來의 tropomyosin A와 區別할 수 없는 것이었다고 하였으며, 그 分子量은 約 65,000이고 N-末端基는 glutamic acid라고 하였다. 또 Ikemoto and Kawaguti(1967)는 창게 tropomyosin A로서 實驗하였을 때 thick filament를 伸長시키는 效果를 觀察하였다고 報告하였으며, Kenndrick-Jones等(1969, 1970)은 paramyosin은 myosin의 螺旋狀 subunit인 light meromyosin과 tropomyosin 두 蛋白質과 類似하고 X-線 回折圖로 分析하여 α-helical coiled-coiled의 2個의 사슬을 가진 分子라고 하였다. Cohen等(1971)과 Szent-Györgyi等(1971)에 依하면 paramyosin 分子의 길이는 約 1275 Å이고 筋肉의 張力維持를 爲하여 特異한 調節役割을 할 것이라고 하였으며, Olander(1971)는 *Venus mercenaria*의 paramyosin은 2個의 共軌 subunit(分子量 約 100,000)를 가졌고, 그 分子量은 217,000이라고 報告하였다.

그러나 海産無脊椎動物 筋肉 構成蛋白質中의 paramyosin에 關한 위의 報告들은 大部分이 2枚貝나 一部 頭足類에 集中되고 있으며, 특히 이 paramyosin이 筋肉의 收縮運動에 直接的으로 介入하는지 如何에 關하여서는 報告內容이 一致하지 않는다(Locker and Schmitt, 1957; Rüegg, 1961a; Tsuchiya and Matsumoto, 1970).

그러므로 著者は 海産腹足類인 전복과 소라를 材料로 採擇하여 筋肉의 蛋白質組成을 밝힌 後, 그 主要 構成蛋白質로서 밝혀진 paramyosin을 單離하고, 種類에 따른 特異性을 生化學的으로 比較 檢討하기 爲하여 超遠心沈降學動을 分析한 後, 鹽溶 및 鹽析範圍, 固有 粘度, 그리고 ATPase 活性等 特性을 究明하고 그 組成아미노酸과 N-末端基를 分析하였다.

實驗 方法

1. 材料

東京中央都賣魚市場에서 살아 있는 전복 *Notohaliotis discus*(REEVE) (體重: 147~220g, 體長: 세로 7.6~9.5cm, 가로 10.6~14.7cm)과 소라 *Turbo comutus Solander* (體重: 143~162g)를 購入하고 即時 實驗室에 運搬하여 Fig.1 및 Fig.2에 表示한 筋肉部分을 貝殼으로 부터 分離 切取하여 各各 試料로 使用하였다. 本 實驗에서의 모든 實驗 操作은 別途로 指摘하지 않는 限 低溫室(2~4°C)에서 實施하였다.

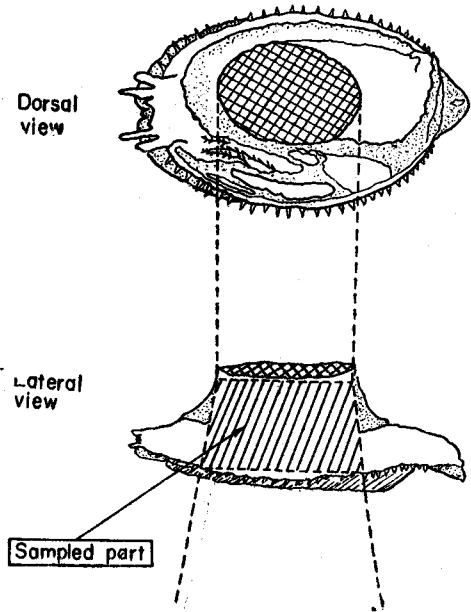


Fig. 1. Dorsal and lateral views of the sampled part of abalone with shell removed.

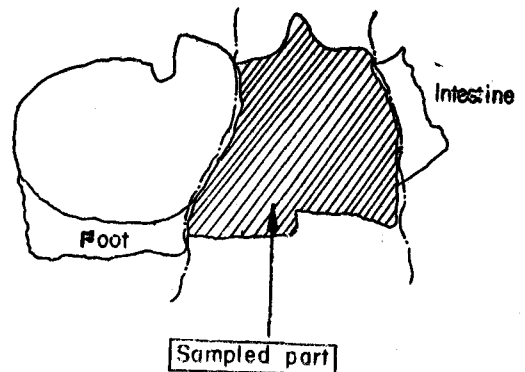


Fig. 2. A lateral view of the sampled part of top-shell muscle with shell removed.

2. 蛋白質 組成의 分析

(1) 筋肉의 蛋白質組成: 各 試料 筋肉에 對한 蛋白質組成은 貝類筋肉에 適用한 Baba(1959)의 方法과 魚

類筋肉에 適用한 Shimizu and Simidu(1960)의 方法을 改良한 Fig. 3에 나타난 方法에 依하여 分析하였다. 곧 細切한 肉에 海砂를 混合하여 mortar에서 充分

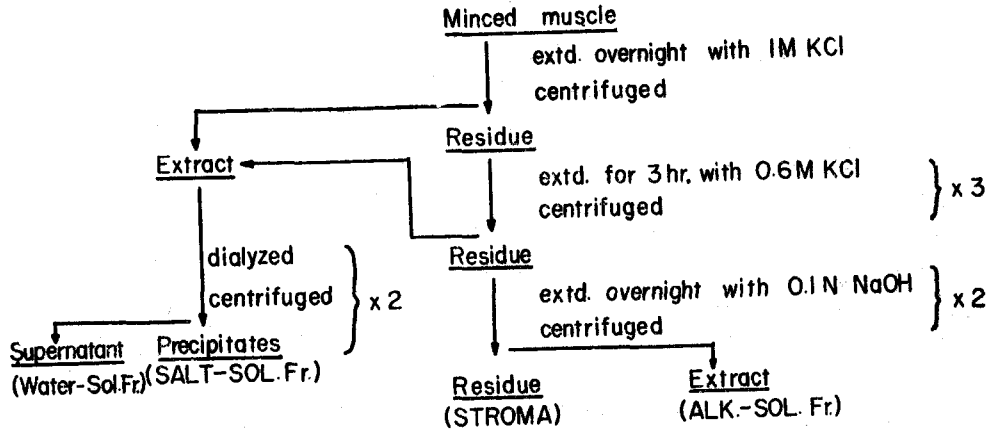


Fig. 3. Analytical procedure for estimating protein composition of gastropod muscles.

히 磨碎한 後, 1.0M KCl · 0.05M tris-HCl, pH 7.0 緩衝液으로 14時間 동안 低溫 抽出한 뒤, 그 殘渣는 다시 0.6M KCl · 0.025M tris-HCl, pH 7.0 緩衝液으로 3回 反復하여 抽出한 後 이 두 抽出液을 合하여 透析에 依하여 稀釋 沈澱시킨 다음 遠心分離하므로써 水溶性區分과 鹽溶性區分으로 分割하였다. 그리고 위의 鹽緩衝液 抽出에서 남은 殘渣는 0.1N NaOH로서 2回 抽出하여 알칼리可溶性區分과 stroma 區分으로 分離하였다. 이들 各 抽出區分中의 蛋白質 含量은 Umemoto (1966)의 改良 Biuret法과 micro-Kjeldahl 法으로, stroma區中의 蛋白質 含量은 micro-Kjeldahl法으로 測定하였다.

(2) 塩溶區蛋白質의 組成: 各 鹽溶性區分과 전복 筋肉의 水溶性區分의 一部를 取하여 超遠心分析法으로 構成蛋白質의 組成을 測定하였으며 超遠心分析은 Schlieren光學系를 가지는 分析用 超遠心機(日立 UCA-1A型)로서 10°C로 調整하여 分析하였다. 그리고 沈降圖上에서 判別할 수 있는 各成分의 量的 比의 測定은 Svedberg等(1940) 및 Schachman(1959)의 方法에 依하였다. 즉 超遠心分析에서 얻은 Schlieren pattern을 Nikon製 萬能投影器(Model 6C)로 擴大하여 그래프紙上에 投影된 peak 面積을 切取하고 秤量하여 成分의 組成比率를 測定하여 計算하였다.

(3) 塩溶區蛋白質의 塩析: Snellman and Tenow (1954)의 方法에 따라 0.5M KCl · 0.025M tris-HCl, pH 7.0 緩衝液에 透析한 鹽溶性區分의 蛋白質溶液을 同一 鹽 緩衝液에서 再結晶하여 精製한 黃酸암모늄을 飽和시

켜 만든 飽和 黃酸암모늄溶液과 위의 鹽緩衝液을 計算量 加減 添加하므로써 一定한 蛋白質濃度下에 黃酸암모늄 飽和度(V/V)가 2% 間隙으로 64%까지 되도록 比率別로 混合한 後, 2~4°C에서 24時間 동안 매매로 攪拌하면서 靜置 鹽析시킨 다음, 濾過(Toyo 濾紙 No. 2)하여 277mμ에서 濾液의 吸光度를 測定하여 鹽析曲線을 作成하였다.

3. Paramyosin의 分離

(1) Ethanol-dried method에 依한 分離: Bailey (1956, 1957)의 ethanol-dried method를 조금 改良하여 Fig. 4와 같은 方法으로 전복 및 소라 筋肉中의 paramyosin을 分離 精製하였다. Fig. 1과 Fig. 2에서 나타난 筋肉部分을 切取하여 mortar에서 充分히 磨碎한 後, 0.04M KCl · 0.025M tris-HCl, pH 7.0 緩衝液으로 5回 洗滌한 後, 筋肉殘渣를 미리 冷却한 알코올과 에테르로서 各各 2回 反復하여 씻고 에테르를 冷風으로 除去하여 乾燥粉末을 만들었다. 이 乾燥粉末을 미리 冷却한 1M KCl · 0.05M tris-HCl, pH 7.0 緩衝液으로서 24時間 抽出한 後, 殘渣는 0.6M KCl · 0.025M tris-HCl, pH 7.0 緩衝液으로서 다시 抽出하여, 두 抽出液을 合하여 稀釋沈澱法으로 0.1M~0.4M 間의 KCl · 0.025M tris-HCl, pH 7.0 沈澱劃分을 分離하였다. 이 劃分은 1.0M KCl · 0.05M tris-HCl, pH 7.0 緩衝液에 溶解시켜서 0.5M KCl · 0.025M tris-HCl, pH 7.0 緩衝液으로 透析한 後, 전복 paramyosin을 抽出하기 爲하여서는 18~30% 黃酸암모늄 飽和, 소라 paramyosin을 抽出하기 爲하여서는 20~32% 黃酸암

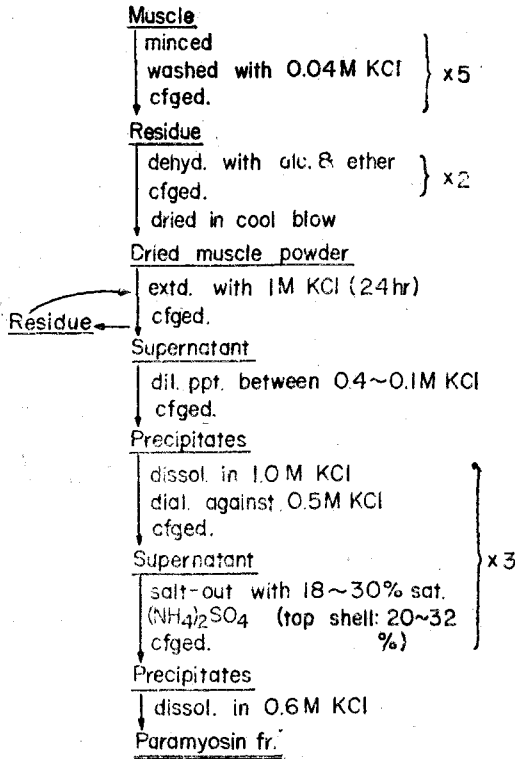


Fig. 4. Procedure for purification of gastropod paramyosins prepared by ethanol-dried method.

~30% 黄酸암모늄 飽和 範圍로 5回 反復 鹽析 分割하였다. 分割한 沈澱을 0.6M KCl · 0.025M tris-HCl, pH 7.0 緩衝液에 徐徐히 攪拌하면서 溶解시키고 다시 미리 冷却한 同一 鹽緩衝液에 24時間 隨時로 外液을 攪면서 透析하여 natural paramyosin을 分離하였다.

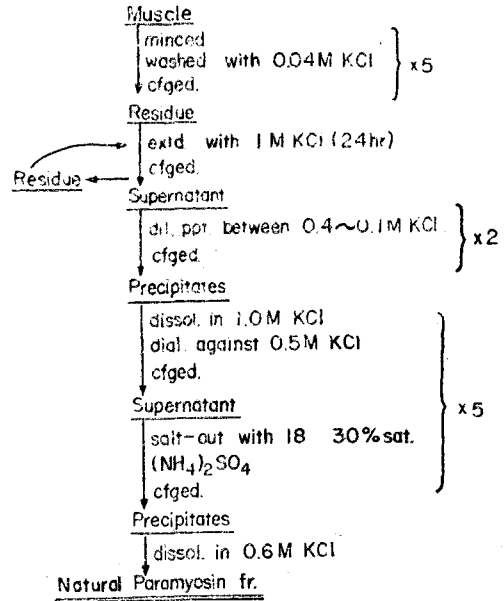


Fig. 5. Procedure for purification of natural paramyosin of abalone muscle.

모늄 飽和로 各各 3回씩 鹽析하고 沈澱을 遠心分離하였다. 이 沈澱은 0.6M KCl · 0.025M tris-HCl, pH 7.0 緩衝液에 徐徐히 攪拌하면서 溶解시키고 미리 冷却한 同一 鹽緩衝液에 24時間 外液을 攪면서 充分히 透析하여 各各 精製 paramyosin을 分離하였다.

(2) **Natural paramyosin의 分離**: Fig. 1에서 나타난 전복 筋肉部를 Fig. 5에서와 같은 方法으로 處理하여 natural paramyosin(有機 溶媒를 쓰지 않고 精製한 paramyosin)을 分離 精製하였다. 곧 切取한 筋肉을 充分히 細切 磨碎하고 0.04M KCl · 0.025M tris-HCl, pH 7.0 緩衝液으로 5回 洗滌한 後, 殘渣에는 1.0M KCl · 0.05M tris-HCl, pH 7.0 緩衝液을 加하여 24時間 抽出한 다음, 다시 0.6M KCl · 0.025M tris-HCl, pH 7.0 緩衝液으로 6時間 동안 再抽出하여 透析에 의한 稀釋沈澱法으로 0.1M~0.4M間的 KCl · 0.025M tris-HCl, pH 7.0 緩衝液에서의 沈澱 劃分을 2회에 걸쳐 反復 遠心分離하여 얻은 沈澱을 1.0M KCl · 0.05M tris-HCl, pH 7.0 緩衝液에 溶解시켜 다시 0.5M KCl · 0.025M tris-HCl, pH 7.0 緩衝液에 透析한 뒤, 18

4. Paramyosin의 純度檢定

(1) **Absorption spectra法에 依한 檢定**: paramyosin 의 0.6M KCl · 0.025M tris-HCl, pH 7.0 緩衝液中的 溶液에 對하여 recording spectrophotometer(Cary 14) 로서 分光分析을 하였으며, Warburg and Christian (1941)에 依한 吸光比를 計算하여 核酸의 汚染 如否를 檢討하였다.

(2) **超遠心分析法에 依한 檢定**: 0.6M KCl · 0.025M tris-HCl, pH 7.0 緩衝液에 溶解시킨 paramyosin 標品을 wedge window cell을 갖춘 分析用 超遠心機(日立 UCA-1A型)로서 回轉速度 55,430 rpm, 溫度 調整 10±0.2°C에서 數個 段階의 濃度別 試料에 對하여 超遠心分析을 實施하였다.

Sedimentation pattern은 時間 間隙別로 撮影하고 單一 peak의 沈降 模樣을 觀察하여 不純物의 混在 如否를 檢討하였다.

(3) **蛋白質 濃度の 測定**: paramyosin 標品の 蛋白質 濃度は Umemoto(1966)에 依한 改良 Biuret法으로 測定하였다.

5. Paramyosin의 化學的 分析

(1) 蛋白質의 아미노酸 組成: 精製 paramyosin 試料를 미리 冷却한 再蒸溜水中에서 隨時로 外液을 갈면서 72時間 以上 透析하여 脫鹽하고 沈澱한 試料는 遠心分離한 後, 精製 아세톤으로서 充分히 脫水시켰다. 그리고 이 脫水한 試料는 減壓데시케이터속에서 12時間 以上 乾燥시킨 後, 約 10 mg씩 精秤하여 6N HCl을 加하고 眞空密封한 다음 恒溫加水分解爐(110°C)에서 24時間 分解시켰다. 分解된 試料는 rotary vacuum evaporator로서 鹽酸을 除去한 後 定容하고 아미노酸 自動分析計(柴田, AA 600型)로서 組成 아미노酸을 分析하였다.

한편 tryptophan과 tyrosine은 Beaven等(1952)에 依한 紫外部吸光法에 依하여 測定하였다. 그리고 1/2 cystine은 Moore(1963)의 方法에 따라 performic acid로서 酸化시킨 試料를 cysteic acid로 分解시켜 前記아미노酸 自動分析計로서 分析하였다.

(2) N-末端基: paramyosin 試料 標品을 미리 冷却한 再蒸溜水로서 透析 沈澱시켜 遠心分離하고 dinitrophenyl法(DNP-method)에 依하여 Fig. 6에서 表示한 것과 같은 方法으로 N-末端基를 決定하였다(Bailey, 1962). 즉 試料와 同一量의 NaHCO₃를 加하고 1-fluoro-2, 4-dinitrobenzen(FDNB)의 5% 알코올 溶液을 添加한 後, 暗所에서 4時間동안 激烈하게 攪拌하면서 DNP-蛋白質化시켰다. 여기서 얻어진 DNP-蛋白質은 精製에틸과 再蒸溜水로서 잘 攪拌하면서 各各 5回씩 洗淨하여 過剩의 FDNB를 除去시키고, 다시 精製아세톤과 에틸로서 3回씩 洗淨하여 遠心分離하여 얻은 淨化 DNP-蛋白質은 冷氣流로서 어느程度 乾燥시킨 다음, 眞空데시케이터속에서 때때로 減壓하면서 充分히 乾燥시켜 이中 約50 mg씩을 試驗管에 精秤하여 넣고 6N HCl 3ml씩을 滴加하여 眞空封管한 뒤, 105°C의 恒溫加水分解爐에 넣어 3, 20, 40, 60時間씩 各各 時間 間隙別로 加水分解시켰다. 分解된 DNP-아미노酸은 褐色試驗管에 옮겨서 HCl의 濃도가 0.5N가 되도록 물로서 稀釋하고 에틸로서 DNP-아미노酸을 抽出하여 水溶性 DNP-아미노酸과 에틸 可溶性 아미노酸으로 分割시킨 後, 各 分割의 DNP-아미노酸을 二次元 上昇法으로 paper chromatography에 依하여 分離 抽出하고 定量하였다(Fraenkel-Conrat, 1955). 計算에 있어서는 DNP-蛋白質中의 蛋白質의 含量을 80%, 加水分解中의 DNP-아미노酸의 損失率은 DNP-serine과 DNP-threonine이 各各 10%, DNP-valine은 20%, DNP-aspartic acid는 40%, 그리고 chromatography 展開

中에 있어서의 損失率은 各各의 DNP-아미노酸에 對하여 7%로 看做하여 補正하였다(Iwai and Fujioka, 1963).

6. Paramyosin의 物理化學的 特性

(1) 固有粘度: 溶媒流速이 36秒인 Ostwald型 粘度計로서 25°C에서 濃度別로 各 paramyosin의 相對粘度(η_r)를 測定하여 그 固有粘度($[\eta]_c \rightarrow 0$)를 算出하였다.

(2) 塩析曲線: 0.5M KCl · 0.025M tris-HCl, pH 7.0 緩衝液에 充分히 透析한 paramyosin溶液을 前記 2의 (3)과 같은 方法으로 測定하였다.

(3) 塩溶曲線: 0.4M KCl · 0.025M tris-HCl pH 7.0 緩衝液에 透析시킨 paramyosin 試料를 最終 이온強度가 0.025~0.425 μ 로 되도록, 0.025 M tris-HCl, pH 7.0 緩衝液으로 稀釋하거나 透析하여 2~4°C에서 하루 밤 동안 靜置한 後, 遠心分離한 上澄液을 取하여 277 m μ 에서 吸光度를 測定하고 鹽溶曲線을 求하였다.

(4) 超遠心沈降定數: 超遠心沈降定數는 時間 間隙別로 撮影한 沈降圖型에서 回轉軸으로 부터 界面間의 移動距離의 對數值를 時間에 따라 plott하여 測定하는 移動界面法으로 求하였으며, Schachman(1957)의 式으로 計算하였다. 그리고 試料 蛋白質의 各 濃度別 S_{20, w} 값을 求하여 濃度零位外插值(S⁰_{20, w})를 表示하였다.

(5) 沈降平衡法에 依한 分子量 測定: Schlieren 光學系와 8 channel centerpiece를 갖춘 分析用 超遠心機로서 mid-point method에 依하여 測定하였으며 Yphantis(1960)가 提案한 式으로 計算하였다.

7. ATPase 活性: 전복의 paramyosin으로서는 5mM의 CaCl₂ 혹은 MgCl₂ 存在下에 pH 6.5~9.5, 25°C에서 5분間 反應시켜 測定하였다. 그리고 소라 paramyosin에 對한 反應系의 條件은 전복 paramyosin일 때와 같지만 다른點은 pH를 6.5와 9.0으로 固定시키고 反應時間을 0~60分間으로 한 것이다. 그리고 兩 反應系에 使用한 緩衝劑는 50 mM의 histidine이고 反應停止劑는 20% trichloroacetic acid 溶液을 最終濃度 4%가 되도록 迅速히 加하였다. 또 反應終了後의 溶液中의 遊離無機磷의 量은 Rockstein and Herron(1951)의 方法에 따라서 測定하였으며 미리 作成한 檢量曲線에서 그 濃度를 算定하였다.

그리고 위의 分析에서 쓴 모든 試藥은 ATP-2Na (C.F. Boehringer & Soehne製)를 비롯하여 特級品을 使用하였고, 黃酸암모늄은 再結晶시켜 精製한 것, 알코올, 에틸, 아세톤 등 有機溶媒는 再蒸溜한 것을 使用하였다. 또 蒸溜水는 再蒸溜하여 使用하였다.

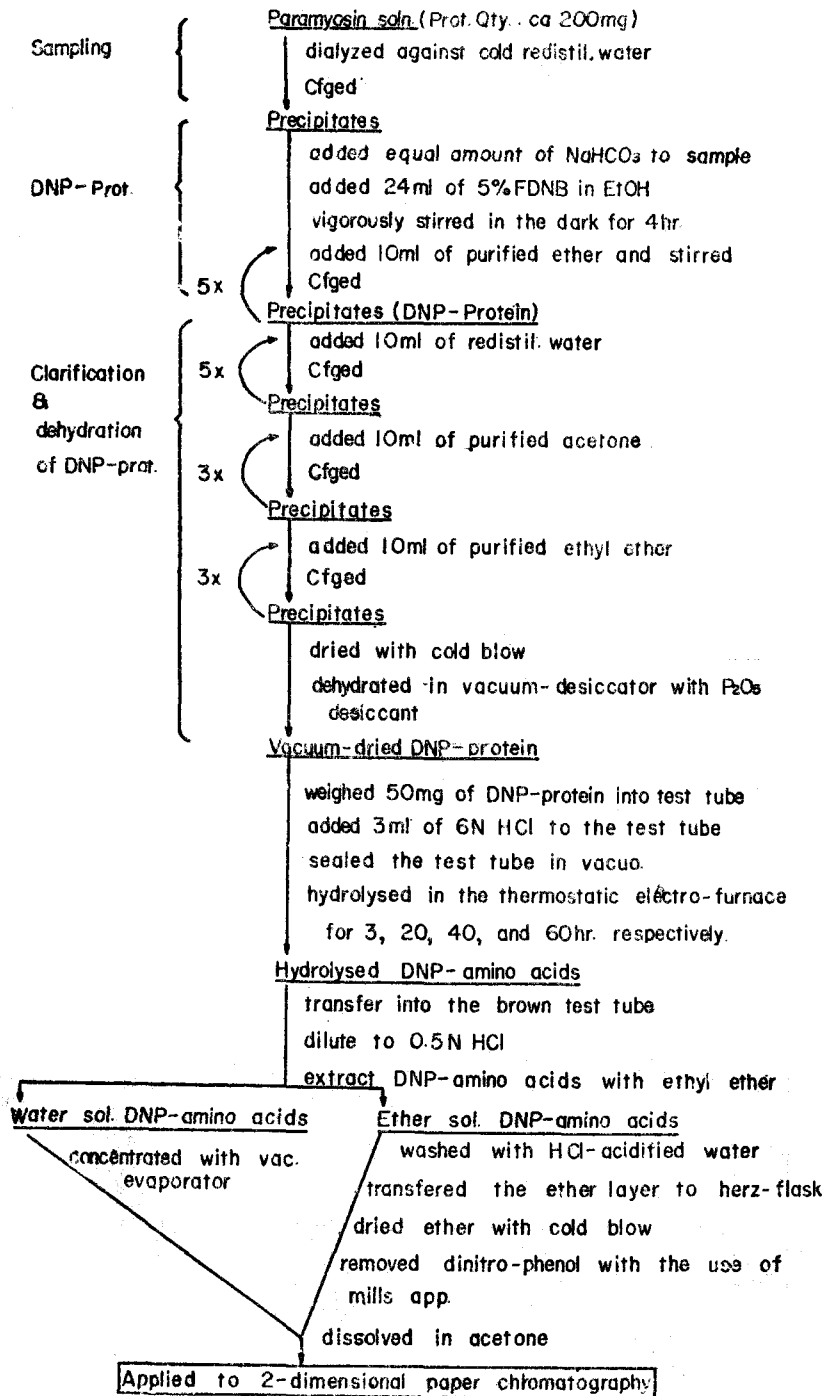


Fig. 6. Procedure for analysing the N-terminal amino acid residues of gastropod paramyosins.

結果 및 考察

筋肉의 蛋白質組成

전복과 소라의 筋肉의 蛋白質組成은 Table 1과 같다. 전복은 筋原質蛋白質이 約 22%, 筋原纖維蛋白質이 約 34%, 細胞殘渣蛋白質이 約 20%, 그리고 基質蛋白質이 約 24%이었다. 또 소라는 筋原質蛋白質이 約 16%, 筋原纖維蛋白質이 約 30%, 細胞內 殘渣蛋白質이 約 29%, 그리고 基質蛋白質이 約 25%이었다. 이 結果로 보면 전복과 소라의 細胞內 殘渣蛋白質이 各 20%와 29%로 많은 量을 보이고 있다. 이것은 전

복과 소라의 筋肉中에는 硬蛋白質로서 이루어지는 基質蛋白質을 많이 含有하기 때문에 이것이 試料 筋肉組織을 磨碎할 때 筋細胞의 破裂을 妨害하고 또 한편으로는 筋原纖維蛋白質의 一部와 試料 筋肉을 磨碎하는 途中 變性を 이르켜서 알칼리 抽出에 까지 移行하여 간 것이라고 생각된다. 그리고 이 細胞內 殘渣蛋白質의 量은 魚類中에서 細胞內 殘渣蛋白質을 많이 含有하고 있는 別상이 보라도 2倍 以上の 量을 含有하고 있으며 (Shimizu and Simidu, 1960), 大体로 筋肉中에 基質蛋白質을 많이 가지고 있을 때는 細胞內殘渣蛋白質도 많다는 結果임을 알 수 있었다.

Table 1. Protein composition of gastropod muscle

Sample	Body weight g	Fractions of protein			
		water-sol. %	salt-sol. (structural protein) %	alkali-sol. %	stroma %
Abalone	147~220	22	34	20	24
Top-shell	143~162	16	30	29	25

(Abalone salt-sol. details: paramyosin: 22, actomyosin: 10, myosin: 2)
 (Top-shell salt-sol. details: paramyosin: 22, actomyosin and myosin: 8)

基質蛋白質의 量은 전복, 소라, 모두 다른 動物種에 對한 研究 結果보다 훨씬 量이 많았다. 곧 Baba(1959)가 報告한 白蛤 足筋의 基質蛋白質의 約 2倍以上의 量이었다. 그리고 이 結果는 一般的으로 魚類의 基質蛋白質의 量(約 3%)에 比하여 8倍 以上에 達하는 量이었다(Shimizu and Simidu, 1960). 이 結果로 미루어 보아 腹足類의 筋肉中에는 硬蛋白質로서 이루어지는 筋翰가 다른 動物肉보다는 훨씬 많이 分布되고 있고, 따라서 전복과 소라같은 腹足類의 筋肉은 다른 二枚貝類나 魚類의 筋肉보다는 肉質이 훨씬 단단하다고 생각된다. 一般的으로 筋肉中の 基質蛋白質의 含量은 肉質의 堅固성과 密接한 關連이 있다고 보아진다. 그리고

알칼리可溶性區分을 鹽溶性區分의 一部로 보면 알칼리可溶性區分과 鹽溶性區分을 合한것은 전복이 54%, 소라가 約 59%이었다. 이 結果는 Migita(1959)가 다른 種類의 전복(*Notohalotis gigante*) 筋肉으로 測定하였을 때, 鹽溶性區분이 48%라고 報告하였고 또 Takahashi and Tanaka(1961)는 소라의 內臟筋의 鹽溶性區分の 量이 59~77%라고 報告한 結果와 비슷하였다.

한편, 전복과 소라의 筋肉에서 抽出한 各 鹽溶性區分과 전복의 水溶性區分의 一部를 取하여 構成蛋白質의 組成을 밝히기 爲하여 超遠心分析을 實施한 結果 그 沈降圖型은 Fig. 7 및 Fig. 8과 같다.

Fig. 7에서 나타낸 바와 같이 전복은 水溶性區分

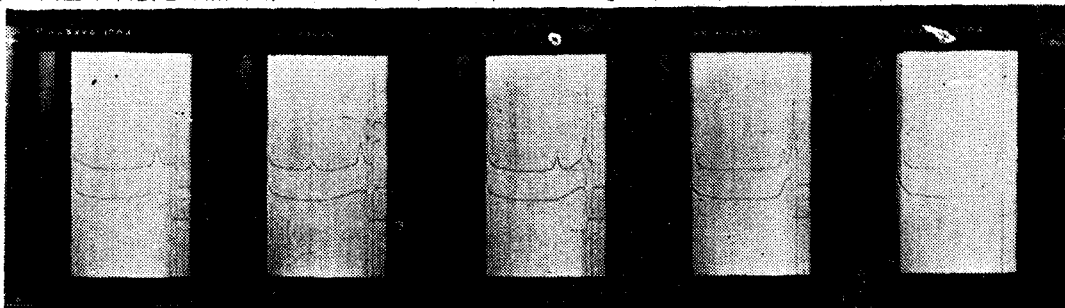


Fig. 7. Sedimentation patterns of the water- and salt-soluble fractions of abalone muscle. Photographs were taken at 33,000 rpm on the way to the top speed and at 10, 30, and 51 min after reaching the top speed of 55,430 rpm (right to left). Solvent: 0.6 M KCl·0.025 M tris-HCl buffer, pH 7.0. In each photographs, the patterns of salt-soluble(above) and water-soluble(below) fractions are seen.

때, 最高回轉速度 55,430rpm에 到達하는 途中 33,000 rpm에서 迅速히 沈降하는 큰 peak와 緩慢히 沈降하는 微少 peak가 나타났으나 最高回轉速度인 55,430rpm에서는 沈降하던 peak는 消失하여 버려 沈降이 끝난 것을 알 수 있었다. 緩慢히 沈降하던 peak만은 그대로 남아 있었는데 이 緩慢히 沈降하던 남은 peak는 그 沈降速度로 미루어 보아 tropomyosin B이라고 推測된다.

한편, 鹽溶性區分일 때는 (Fig.7 上部沈降圖型), 33,000rpm에서 극히 작은 迅速히 沈降하는 peak와 또 하나의 主 peak가 있었다. 55,430rpm에서는 迅速히 沈降하던 微少peak는 消滅하여 沈降分散한 것으로 보였으며, 主 peak는 最高回轉速度인 55,430rpm에서 10分 經過하였을 때 다시 2個의 peak로 나누어졌다.

그리고 55,430 rpm, 30分에서는 새로운 微細한 peak로 짐작되는 것이 兩 peak사이에 出現하였다. 여기서 나타난 이들 세 peak에 대하여 測定 計算한 $S_{20,w}$ 値는 沈降速度의 遞速順으로 各各 約 3s, 4s 및 14s이었다. 沈降速度에서 判別된 이들 各 peak의 成分中,

14s와 4s成分은 同一 試料에 대하여 2mM의 ATP와 5mM의 $MgCl_2$ 를 添加하여 別途로 超遠心分析을 實施한 結果 14s 成分이 消滅한 代身 4s成分이 增加한 事實과 그 沈降定數로 미루어 14s成分은 actomyosin, 그리고 4s成分은 myosin임을 알았다. 한편, 가장 늦게 沈降하는 3s成分은 後述하는 單離 paramyosin이 超遠心分析에서 보인 沈降學動과 잘 一致하므로 paramyosin임을 確認할 수 있었다.

그리고 이 沈降圖型으로 測定하였을 때 전복의 鹽溶性蛋白質을 構成하는 蛋白質組成 比率는 約 paramyosin이 65%, actomyosin이 30%, myosin이 5%이었다 (Table 1). 또 소라의 鹽溶性蛋白質區分에 대하여 超遠心分析을 實施한 結果 (Fig. 8), 沈降圖型의 時間에 따른 變化는 전복의 鹽溶性區分으로서 實施한 超遠心分析上的 沈降圖型과 大差 없었으나 actomyosin으로 짐작되는 成分의 沈降速度가 전복일 때 보다는 若干 빠르며 量的으로는 myosin보다 조금 적은 結果이었다 (Fig. 8). 그리고 myosin으로 認定된 成分도 전복일 때 보다는 조금 적은 量임을 알 수 있었다.



Fig. 8. Sedimentation patterns of the salt-soluble fraction of top-shell muscle. Photographs were taken at 0, 10, 30, 50, and 70 min after reaching the top speed of 55,430 rpm (right to left). Solvent: 0.6 M KCl-0.025 M tris-HCl buffer, pH 7.0.

그리고 鹽溶區蛋白質의 量的인 組成 比率는 約 paramyosin이 70%, 그리고 actomyosin과 myosin이 30%이었다.

전복과 소라가 鹽溶性區分으로서 抽出한 構成蛋白質中에 paramyosin이 65~70%까지 含有되고 있다는 事實은 海産 2枚貝類에 屬하는 *Pecten maximus*나 진주담치의 平滑 內轉筋이 그 構造蛋白質로서 約 1/3量의 actomyosin과 2/3量의 paramyosin으로 이루어져 있다는 報告(Rüegg, 1961a)와 진주담치의 筋肉이 그 閉殼筋속에 상당히 많은 量의 paramyosin을 含有하는 特徵이 있다는 報告(Twarog, 1967), 그리고 Szent-Györgyi等(1971)이 報告한 *Mercenaria mercenaria*의

內轉筋 筋纖維蛋白質의 赤色部는 paramyosin을 31/86 白色部는 48/86라는 報告, 그리고 *Crassostrea virginica*는 透明部分이 19/81, 不透明部分은 38/76이 paramyosin이었다는 等の 報告와 關連시켜 볼 때 海産腹足類에 많이 內包되어 있는 paramyosin은 生理的으로 중요한 구실을 한 것이라고 생각된다.

전복의 筋肉에서 抽出한 鹽溶性區分の 鹽析曲線에서 보면 (Fig. 9), 전복의 paramyosin은 18~30%의 黃酸 암모늄 飽和範圍에서 거의 定量的으로 鹽析 沈澱되는 것을 알 수 있고, 30~46%間에 鹽析되는 區分은 魚類인 잉어 骨骼筋으로부터 鹽溶性區蛋白質을 抽出하여 鹽析分析을 한 結果 (Migita, 1960; Pyeun, 1972)와 比

較하여 볼 때 actomyosin과 myosin일 것으로 짐작된다. 그리고 전복 paramyosin이 보인 이鹽析分析의結果는 다른軟体動物種의 paramyosin으로實驗한鹽析範圍가 대략 20~35%라는報告와比較할 때大差없는結果이었다(Milstein, 1967).

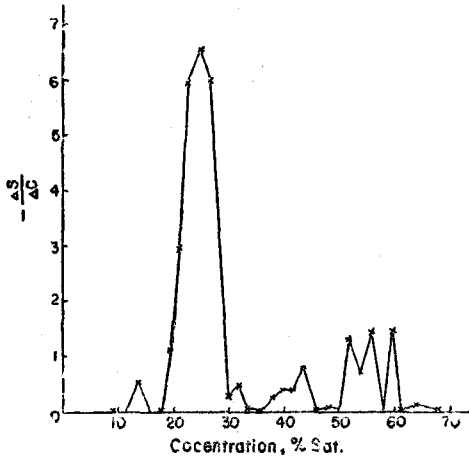


Fig. 9. Salting-out curve of the salt-soluble fraction of abalone muscle with ammonium sulfate. Temp.: 2~4°C.

Paramyosin의分離

(1) Ethanol-dried method에 의한分離: Bailey (1957)의 ethanol-dried method를 조금改良하여 paramyosin을分離하였을 때乾燥筋纖維粉末의收率은전복일 때는鮮肉에 대하여 15~16%이었으며, 소라일 때는約 27%에達하였고, 이乾燥筋纖維粉末에 대한 paramyosin의收率은 전복이 1~2%이었고, 소라는約 0.5~0.7%로서 전복일 때 보다는收率이 조금 떨어졌다. 이收率은 2枚貝인 *Aulacomya magellanica*의

境遇가約 20%와1~3% 이었다는報告(Milstein, 1967)와比較할 때 전복은 큰差異가 없었으나 소라일 때는 조금 떨어지는結果이었다.

Bailey의方法을 조금改良한 ethanol dried method에 의하여精製한同 paramyosin은紫外部分光分析에서(Fig. 10) 전복은 $\frac{E_{277}}{E_{260}} = 1.85$, 소라는 $\frac{E_{277}}{E_{260}} = 1.70$ 으로서 Warburg and Christian(1941)의報告에 비추어核酸 혹은 nucleotides의汚染은 전복일 때는 전혀 없으며 소라일 때는 거이無視할 수 있을程度인 것으로 생각되었다.

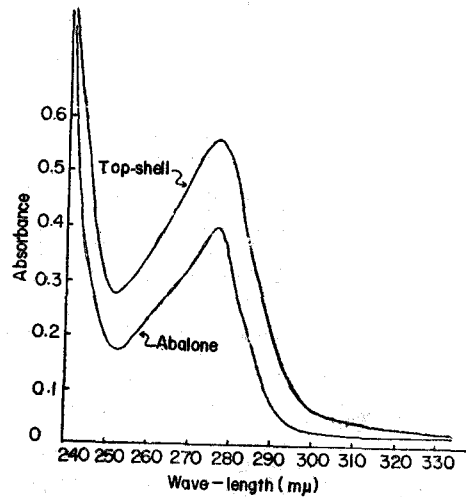


Fig. 10. UV-spectra of gastropod paramyosin in 0.6 M KCl·0.025 M tris-HCl buffer, pH 7.0.

한편, 超遠心分析의結果는 전복(Fig.11)과 소라(Fig.12)가各各約 3s의沈係降數로서單一의 peak를 보였고, 따라서紫外部分光分析의結果와後述하는

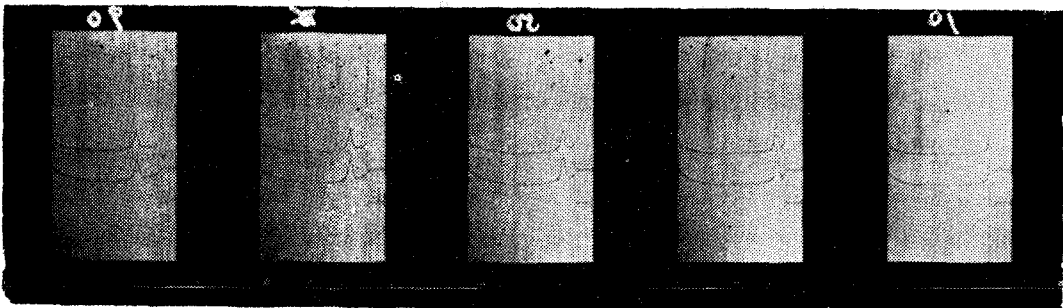


Fig. 11. Sedimentation patterns of abalone paramyosin prepared by modified Bailey's ethanol-dried method. Photographs were taken at 10, 30, 50, 70, and 90 min after reaching the top speed of 55,430 rpm (right to left). Solvent: The same as in Fig. 8. In each photograph, the upper and lower traces are taken for comparing the difference from protein concentration.

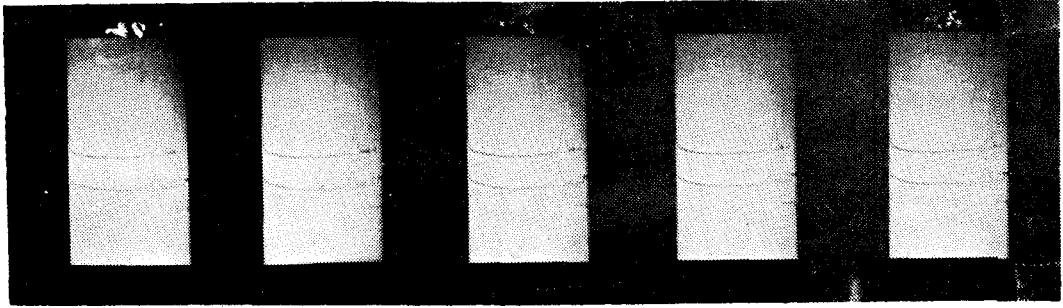


Fig. 12. Sedimentation patterns of top-shell paramyosin prepared by modified Bailey's ethanol-dried method. Photographs were taken at 24, 36, 48, 60, and 72 min after reaching the top speed of 55,430 rpm(right to left). Solvent: The same as in Fig. 8. In each photograph, the upper and lower traces are taken for comparing the difference from protein concentration.

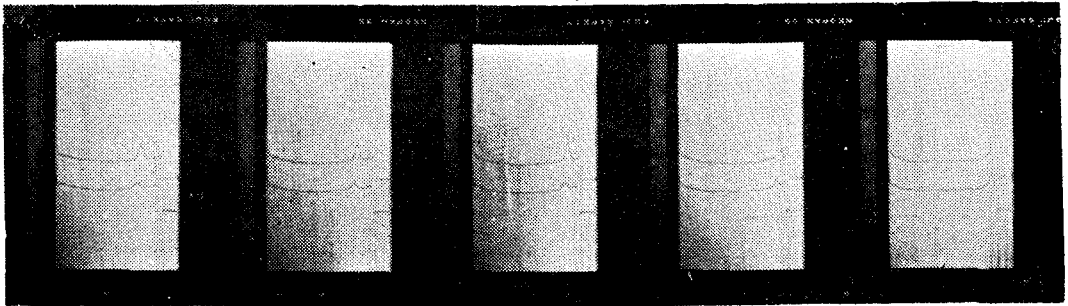


Fig. 13. Sedimentation patterns of natural paramyosin of abalone prepared by modified Bailey's wet-extraction method. Photographs were taken at 10, 30, 50, 70, and 90 min (right to left) after reaching the top speed of 55,430 rpm. Solvent: The same as in Fig. 8. In each photograph, the upper and lower traces are taken for comparing the difference from protein concentration.

物理化學的인 性質(Table 5) 및 構成아미노酸의 分析 結果(Table 2)로 보아 均質의 paramyosin임을 判別하였다.

(2) Natural paramyosin의 分離: 전복 筋肉으로부터는 別途로 有機溶媒를 쓰지 않는 Bailey(1956)의 wet-extraction method를 改良한 方法(Fig. 4)으로 natural paramyosin을 分離하였는데 이것은 超遠心 沈降分析에서(Fig. 13) 한개 主 peak를 보였지만 peak의 側近에 極微한 肩角이 判別되었으므로 그 構成아미노酸의 分析 結果가 ethanol-dried method에 의하여 精製한 paramyosin은 proline을 전혀 함유하고 있지 않은데 反하여 이 方法으로 얻은 paramyosin은 proline을 조금 內包하고 있었으므로 微量의 不純物이 混入되어 있는 것으로 看做하고, 物理化學的인 性質에 關한 實驗에는 本 方法으로 分離한 natural paramyosin은 除外하였다.

아미노酸 및 N-末端基의 分析

(1) 蛋白質의 아미노酸組成: 海産腹足類인 전복과 소라 paramyosin의 아미노酸成組의 分析 結果를 2枚貝類에 屬하는 *Aulacomya magellanica*와 *Pinna nobilis* paramyosin의 아미노酸 組成과 比較하여 Table 2에 나타내었다.

Table 2에서와 같이 전복이나 소라의 paramyosin은 함께 arginine, aspartic acid, glutamic acid, alanine 및 leucine이 많고, proline은 전혀 함유하지 않으며 tryptophan과 (1/2) cystine은 함유하지 않든가 혹은 극히 痕跡量을 내포하는 데 不過하였다. 이점은 2枚貝類나 그밖의 軟體類가 나타내는 아미노酸의 組成上의 特徵과 비슷한 傾向을 보이며, 特히 Kominz(1966)의 報告에 따르면 proline의 含量을 注意깊게 測定하면 汚染의 좋은 指針으로 삼을 수 있다고 提案한 報告와 關連하여 檢討할 때 本 實驗에서 ethanol-dried method

Table 2. Comparison of the amino acid composition of gastropod paramyosins with those of some other paramyosins

Amino acids	Moles of residues/10 ⁶ g of protein			
	Gastropods		Lamellibranchs	
	Abalone	Top-shell	<i>Aulacomya</i> ⁺¹	<i>Pinna</i> ⁺²
His	6	7	7.6	4.5
Lys	62	59	70	64.5
Arg	101	91	89	79
Asp	107	99	119	111
Thr	35	39	38	22
Ser	46	45	55	49
Glu	188	167	222	173
Pro	0	0	0	
Gly	25	25	14	12
Ala	88	97	80	102
Cys(1/2)	+	2	5	2.5
Val	30	36	22	35.5
Met	11	16	15	15.5
Ileu	37	33	25	28
Leu	100	97	94	103
Try	13	14	13	14
Phe	9	9	5	8.5
Trp	0	1	4	
(NH ₃)	(106)	(108)	(124)	(116)
Total	858	837	877	824

+1 Milstein (1967)

+2 Bailey (1957)

Table 3. A comparison of the charged groups on paramyosins of gastropods and some lamellibranchs (residue/10⁵g protein)

Samples	Acidic					Basic					
	Glu	Asp	Total	Amide NH ₃	Free acid	Lys	Arg	total	Chge	Glu/Asp	Lys/Arg
Gastropods											
Abalone	188	107	295	106	189	62	101	163	26	1.8	0.61
Top shell	167	99	266	108	158	59	91	150	8	1.7	0.65
Lamellibranchs											
<i>Venus</i> ⁺¹	169	114	283	110	173	62	81	143	30	1.5	0.77
<i>Aulacomya</i> ⁺¹	222	119	341	124	217	70	89	159	58	1.9	0.78

+1 Kominz (1966)

+2 Milstein (1967)

에 의하여分離한 전복과 소라의 paramyosin은 單一の均質物임을 알 수 있었다. 단지, 2枚貝類나 혹은 다른軟体類들은 lysine/arginine비가 0.8 혹은 1.0에 가까운 데 比하여 腹足類의 paramyosin은 約 0.61 혹은 0.65로서 약간 낮은 값을 보이는 것이 特徵이다.

한편, Table 3에서는 腹足類인 전복과 소라, 그리고 2枚貝類인 *Aulacomya magellanica* 및 *Venus*에 대한 아미노酸의 charged group를 나타내었는데 charged group의 數에서 볼 때 腹足類는 2枚貝類보다도 낮은 값을 보였으며, 이 點에 대하여 Kominz(1966)는

charged group가 적을수록 中性溶液에서의 溶解度가 低下한다고 하였으나, 腹足類의 paramyosin은 2枚貝類의 그것에 比하여 溶解度가 떨어지는 것인지 더욱 檢討해 볼 豫定이다. 그리고 酸性아미노酸中 Glu/Asp의 比는 전복과 소라가 各各 1.8과 1.7로서 glutamic acid가 훨씬 많이 內包되고 있으며 이 값은 *Venus*나 *Aulacomya*에 比하여 큰 差異가 없는 結果이다.

전복의 paramyosin의 아미노酸組成에 關하여서는 本 研究의 一部로서 發表한 뒤에 Woods and Margaret (1971)가 다른 種類의 전복(*Notohaliotis ruber*)의

paramyosin으로 아미노酸組成을 測定하여 發表한 것이 있었으나 비슷한 結果이었다(Pyeun, 1971).

(2) N-末端基: 腹足類의 paramyosin의 N-末端基를 測定하기 爲하여 DNP-法을 適用하고 二次元 上昇法으로 展開하였을 때의 chromatogram을 Fig. 14 및 Fig. 15에 나타냈으며, 加水分解 時間에 따른 N-末端基의 檢出量은 Table 4에 나타낸 바와 같다. 전복과 소라의 paramyosin은 共通의으로 40時間 加水分解하였을 때, DNP-aspartic acid, DNP-valine, DNP-serine 및 DNP-threonine이 가장 많이 檢出되었으므로 전복과 소라는 그 paramyosin이 前記 4種의 아미노酸末端殘基를 갖고 있는 것이 確實하다. 다른 軟体類 paramyosin의 N-末端基를 測定한 結果에 依하면 Bailey(1957)는 *Pinna nobilis*의 paramyosin을 DNP-法으로 測定하였을 때 N-末端基가 檢出되지 않는다고 報告하였으며, Kubo(1961)는 피둥어꼴뚜기 外套膜의 筋肉 protein A로서 測定하였을 때 DNP-leucine, 혹은 DNP-isoleucine, DNP-valine, 및 DNP-alanine이 蛋白質 每分子當 0.1 mole 以下로 檢出되었다고 報告하였고, 또 Milstein(1967)은 亦是 *Aulacomya magellanica*의 內轉筋 paramyosin의 N-末端基를 測定하였을 때 DNP-alanine, DNP-glutamic acid 및 DNP-glycine

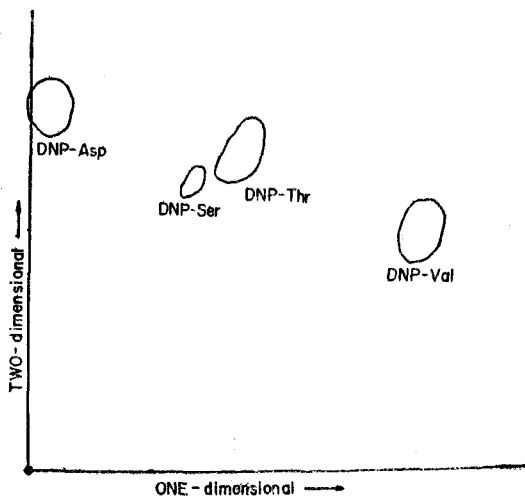


Fig. 14. Two-dimensional paper chromatogram of DNP-amino acids of abalone paramyosin. DNP-protein was hydrolysed for 40 hr.

Developer: one dimensional = toluene 40: pyridine 12: ethylene chlorhydrin 24: 0.8N NaOH 24
two dimensional = tert-amyl-alcohol layer saturated in sodium phthalate.

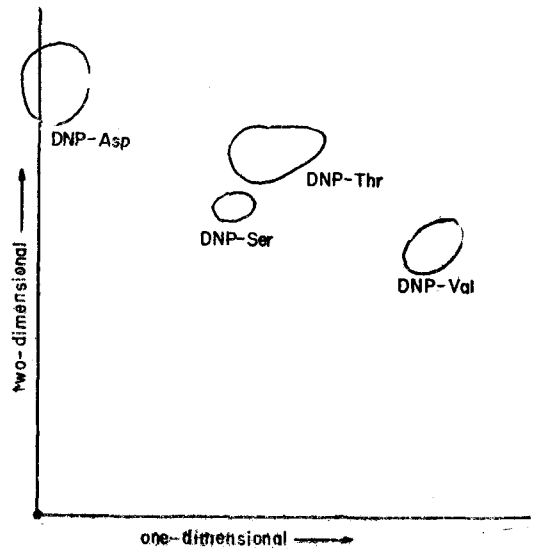


Fig. 15. Two dimensional paper chromatogram of DNP-amino acids of top-shell paramyosin. DNP-protein was hydrolyzed for 40hr.

Developer: The same as in Fig. 14.

Table 4. N-terminal amino acid residues of paramyosins from gastropods determined by the fluorodinitrobenzene method

Samples	Time of hydrolysis (hr.)	DNP-amino acids detected	No. of moles/MW of 10 ⁶
Abalone	3	Asp	0.043
		Ser	0.027
		Thr	0.004
	40	Asp	0.069
		Val	0.036
		Ser	0.032
Top-shell	3	Asp	0.079
		Ser	0.011
		Thr	0.023
	20	Asp	0.108
		Val	0.055
		Ser	0.022
Top-shell	40	Asp	0.107
		Asp	0.108
		Val	0.089
	60	Ser	0.082
		Thr	0.084
		Asp	0.102
60	Val	0.101	
	Ser	0.018	
	Thr	0.082	

혹은 DNP-serine이 檢出되었다고 報告하였다. 腹足類와 2枚貝類 및 頭足類의 筋肉 paramyosin에 關하여 N-末端基를 比較 檢討하여 보면, 共通으로 갖는 殘基는 不過 各己 1個程度에 지나지 않으며, 거기 相異한 殘基를 갖는 것으로 보아 N-末端基는 paramyosin의 動物種의 根源에 따라서 各各 서로 다른 subunit를 갖는 것인지 앞으로 檢討해야 할 問題라고 생각된다.

Paramyosin의 物理化學的인 性質

分離 精製한 paramyosin 標品에 대하여 測定한 還元粘度를 蛋白質의 濃度別로 測定하고 濃度 0으로 外插하였을 때의 固有粘度를 求하면 Fig. 16 및 Fig. 17에서 나타낸 바와 같다. 固有粘度는 전복의 paramyosin이 約 3.1, 그리고 소라의 paramyosin은 約 2.6으로서 이들 固有粘度는 2枚貝類의 paramyosin의 固有粘도와 比較하여 볼 때 어느 程度 높은 값을 나타내는 것을 알 수 있다(Table 5). 따라서 固有粘度는 paramyosin에 있어서 定數가 될 수 없는 것으로 생각되고 이와 關連하여 腹足類의 paramyosin은 大体로 다른 2枚貝類等의 paramyosin보다도 分子型이 細長하거나 多岐型일 것으로 推測된다.

그리고 이 腹足類의 paramyosin으로 測定한 鹽析曲線은 Fig. 18 및 Fig. 19에 나타내었다. 전복의 paramyosin은 黃酸암모늄 飽和 18~30%, 그리고 소라의 paramyosin은 22~29%의 範圍에서 敏感하게 鹽析되는 것을 알 수 있으며, 이들 鹽析範圍는 다른 2枚貝類의 鹽析範圍와 거이 비슷한 結果이다(Table 5). 그리고 이兩 paramyosin은 KCl에 依한 溶解度曲線에서 이온 強度 0.25 혹은 0.20에서 溶解하기 始作하여 0.35前後에서 거이 完全히 溶解하였으므로, 이 點은 Bailey and Rüegg(1960)가 *Pecten maximus*의 paramyosin으로

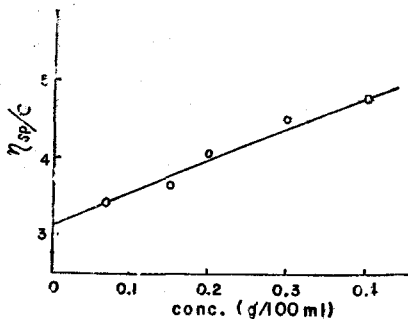


Fig. 16. Reduced viscosity of abalone paramyosin at various protein concentration (0.6 M KCl-0.025 M tris-HCl buffer, pH 7.0; 25°C).

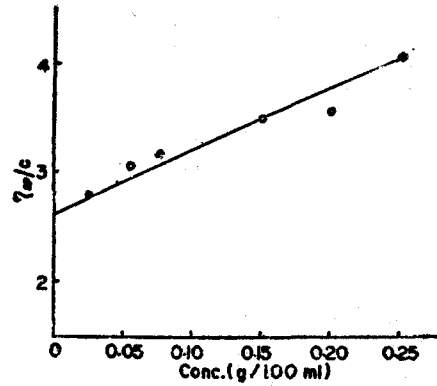


Fig. 17. Reduced viscosity of top shell paramyosin at various protein concentrations (0.6 M KCl-0.025 M tris-HCl buffer, pH 7.0; 25°C).

로 測定하였을 때 이온 強度 0.2~0.3에서 極히 銳敏한 曲線을 보이며 溶解하였다는 報告와 비슷한 傾向을 보였으나 조금 緩漫한 曲線을 보이는 것이 差異이었다 (Fig. 20).

한편, 兩 paramyosin은 蛋白質의 濃度別에 依한 沈降定數 關係曲線에서 전복 paramyosin의 沈降定數 (S_{20,w})는 約 3.14s이었고(Fig. 21), 소라의 paramyosin은 約 3.50s를 보여(Fig. 22), 소라의 沈降定數가 약간 높은 값을 보였다. 이들 腹足類의 paramyosin의 沈降定數는 *Pecten maximus*의 約 3s (Kay, 1958), 그리고 *Aulacomya magellanica*의 3.13s (Milstein, 1967)와 거의 비슷한 結果이다.

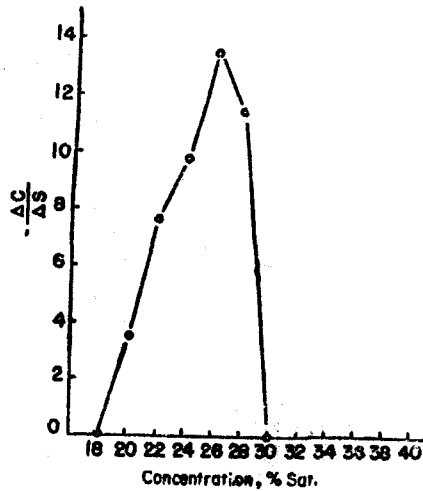


Fig. 18. Salting-out curve of abalone paramyosin with ammonium sulfate (Temp. 2~4°C).

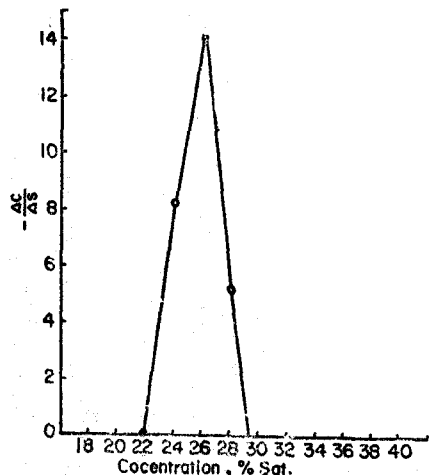


Fig. 19. Salting-out curve of top-shell paramyosin with ammonium sulfate (Temp.: 2~4°C).

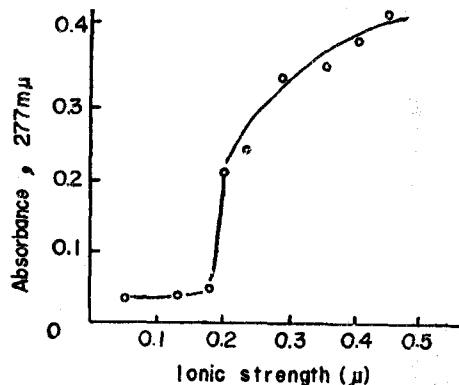
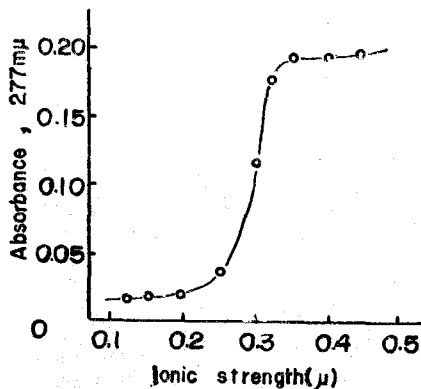


Fig. 20. Salting-in curves of abalone(left) and top-shell(right) paramyosins with KCl.

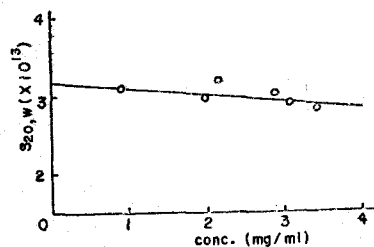


Fig. 21. Sedimentation coefficient of abalone paramyosin as a function of protein concentration.

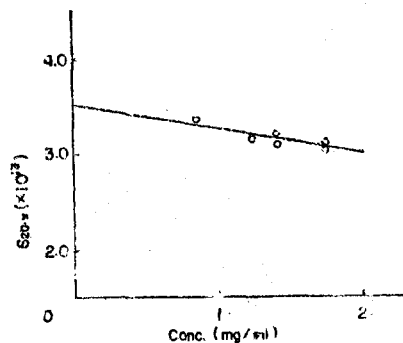


Fig. 22. Sedimentation coefficient of top-shell paramyosin as a function of protein concentration.

하는 전복과 소라의 paramyosin의 분자량은 이 실험 조건하에서는 $0.72 \sim 1.05 \times 10^6$ 간의 불확실한 수치로서算定되며 이와 關連하여 2枚貝類의 분자량을 測定 報告한 結果에 依하면 Kay(1958)는 *Pinna nobilis*의 para-

이들 paramyosin은 또 沈降平衡法으로 그 분자량의 測定을 試圖하였는 데 먼저 전복 paramyosin은 蛋白質濃度 1.5 mg/ml를 4段階로 稀釋하여 multichannel short column cell로서 14,400 rpm으로 回轉沈降시키고 濃度補正用 合成界面 capillary type cell은 12,290 rpm으로 操作하여 Schlieren pattern을 撮影(Fig. 23) 분자량을 計算한 結果 濃度 1.5 mg/ml으로 測定한 것만이 計算을 할 수 있었는 데 여기서 測定된 전복 paramyosin의 분자량은 大略 8.1034×10^4 이었고, 그리고 소라의 paramyosin은 蛋白質濃度 1.8 mg/ml를 4段階로 稀釋하여 multichannel short column cell은 7,060 rpm으로 回轉沈降시키고, 濃度補正用 合成界面 capillary type cell은 16,880 rpm으로 操作하여 Schlieren pattern을 撮影하고(Fig. 24) 분자량을 計算하였더니 濃度段階別로 분자량差가 一定치 않았으나 計算 結果는 분자량 $0.72 \sim 1.05 \times 10^6$ 간의 數值로서 나타났다. 위의 沈降平衡 分析의 結果로서 腹足類에 屬

myosin이 1.35×10^6 이라고 報告하였고, Milstein(1967)은 *Aulacomya*의 paramyosin으로 測定하였을 때

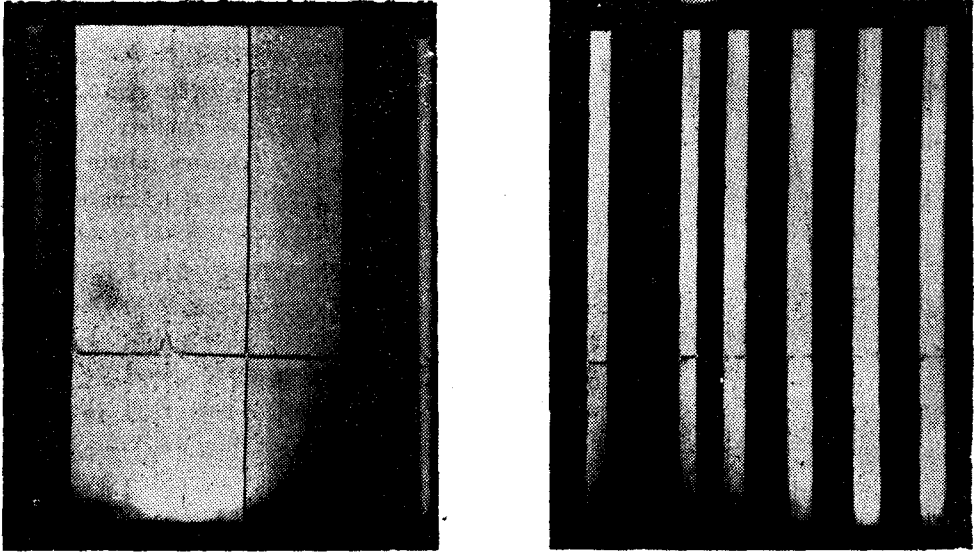


Fig. 23. Centrifugal equilibrium patterns of the purified abalone paramyosin. The pattern of synthetic boundary cell (left) was taken at 16 min after reaching to 12,290 rpm, and the pattern of multichannel equilibrium cell(right) was taken at 90 min after reaching to 14,400 rpm.

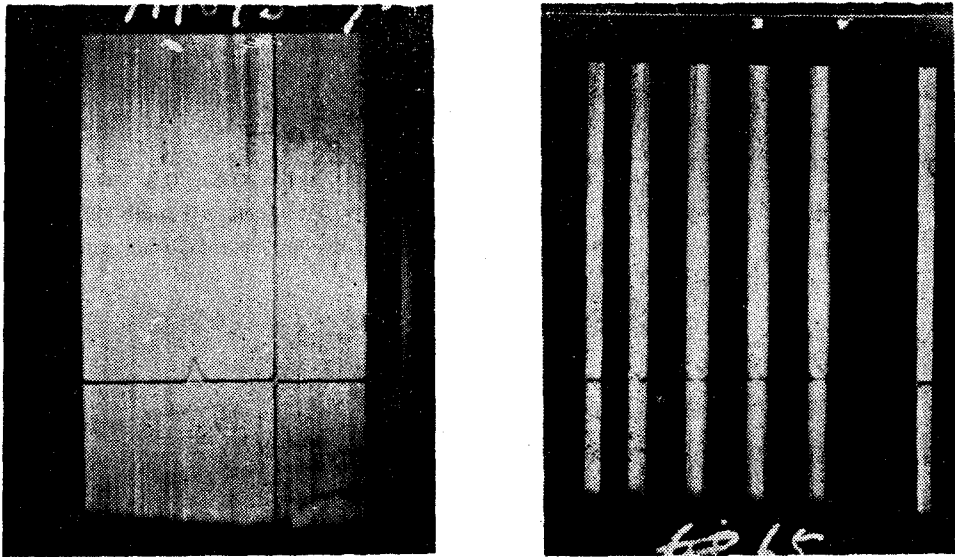


Fig. 24. Centrifugal equilibrium patterns of the purified top-shell paramyosin. The pattern of synthetic boundary cell (left) was taken at 16 min after reaching to 7,060 rpm, and the pattern of multichannel equilibrium cell (right) was taken at 65 min after reaching to 16,880 rpm.

2.58×10^5 , Woods(1969)는 *Crassostrea commercialis*로 서 測定하였을 때 2.08×10^6 , 그리고 Olander(1971)는 *Venus mercenaria*의 paramyosin으로 測定하였을 때,

2.17×10^6 이라고 報告하여 試料의 種類와 學者에 따라 서 相當한 差異가 있는 것 같다.

Table 5. Physico-chemical properties of paramyosins from gastropods in comparison with those from lamellibranchs

Samples	Salting-out range (%, sat. of (NH ₄) ₂ SO ₄)	Solubility in salt-soln. (with KCl)(μ)	Intrinsic viscosity (dl/g)	Sedimentation constant (S° _{20,w})	MW	Solubility in neutralized water	Charged groups in amino acids (No. of residue/10 ⁵ g protein)
Gastropods							
Abalone	18~30	0.25	3.1	3.14s	71,000~ 105,000	almost insoluble	26
Top-shell	22~29	0.20	2.6	3.50s			
Lamellibranchs							
<i>Pinna</i> adductor muscle ⁺¹							
<i>Venus</i>	23~29	0.20	2.4		135,000	almost insoluble	
"	"						
<i>Pecten</i>	28~40	0.20	1.9		220,000	almost insoluble	30
"	"						
<i>Aulacomya</i>	35~40	0.20	1.9		258,000	almost insoluble	58
"	"						
	21~34		0.8	3.13s			

+1 Bailey(1956)

+2 Kominz et al. (1957)

+3 Bailey and Rüegg(1960)

+4 Milstein(1967)

ATPase 活性

전복의 ethanol-dried method에 의하여分離한 paramyosin과 natural paramyosin, 그리고 소라의 ethanol-dried method로서 얻은 paramyosin으로는 ATPase 活性的 存否를 檢討하였으며 그 結果를 Fig.25 및 Fig.26에 나타냈다. 다른 軟体類로부터 分離한 paramyosin으로 測定 報告한 것을 보면 Locker and Schmitt(1957)는 *Venus mercenaria*의 內轉筋 paramyosin이 myosin과 비슷한 아주 弱한 ATPase 活性이 證明된다고 報告하였고 Rüegg(1958, 1959, 1961)는 *Pecten maximus*의 閉殼筋 paramyosin으로 檢討하고 精製 paramyosin은 어떤 境遇에도 actin, myosin 혹은

actomyosin이 갖는 것과 같은 ATPase 活性이나 그밖의 生物學的인 活性을 갖고 있지 않다고 報告하였다. 또 最近 Tsuchiya and Matsumoto(1970)는 키조개 (*Atrina*)의 平滑 內轉筋 paramyosin으로서 測定하였을 때, ATPase 活性이 認定된다고 報告하여 軟体動物 筋肉 paramyosin의 ATPase 活性的에 대하여는 各各 相反되는 結果가 報告되어 있다.

그러나 本實驗의 結果로부터 ethanol-dried method로 分離한 전복 paramyosin 標品은 Fig.25에 나타낸 바와 같이 pH 影響下(pH 5~9.5)에서 ATPase 活性이 認定되지 않았으며, 전복의 natural paramyosin 標品도 역시 ethanol-dried method로 分離한 paramyosin

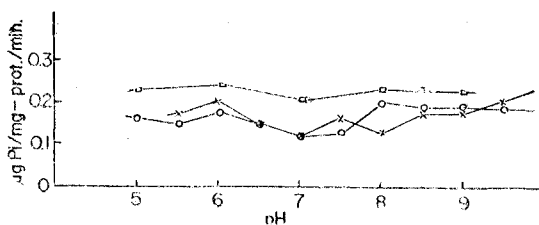


Fig. 25. ATPase activity of abalone paramyosin at various pH values. The paramyosin specimen used was prepared by the slightly modified ethanol-dried method of Bailey.
 —x—x—; In the presence of 5mM CaCl₂; no sample added.
 —o—o—; In the presence of 5mM CaCl₂.
 —□—□—; In the presence of 5mM CaCl₂.

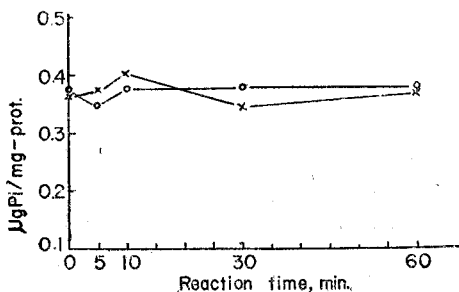


Fig. 26. ATPase activity of top shell paramyosin at various reaction time. The paramyosin specimen used was prepared by the slightly modified ethanol-dried method of Bailey.
 —o—o—; In the presence of 5mM CaCl₂ at pH 6.5.
 —x—x—; In the presence of 5mM CaCl₂ at pH 6.5.

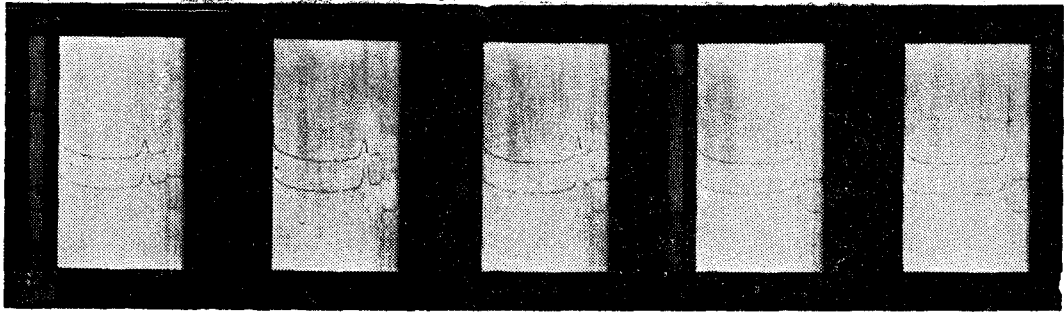


Fig. 27. Sedimentation patterns of abalone paramyosin preserved in low temp. for 66 days. Photographs were taken at 10, 30, 50, 70, and 90 min (right to left) after reaching the top speed of 55,430 rpm. Solvent: The same as in Fig. 8. In each photograph, the patterns of the frozen (at -20°C) and thawed at $2-4^{\circ}\text{C}$ instantly before the analysis (above), and low temp. preserved (at $2-4^{\circ}\text{C}$) paramyosin (below) are seen.

과 비슷한 결과로서 ATPase 활성이 없었다.

소라 근육부로 부터 ethanol-dried method로分離한 paramyosin 標品도 反應時間(0~60分)의 影響下에 測定한 것을 때, pH 6.5에서는 ATPase 활성이 없었으며(Fig. 26), 같은 條件下의 pH 9.0에서도 또한 ATPase 활성이 認定되지 않았다.

이 結果로 미루어 전복과 소라의 paramyosin은 筋肉의 收縮作用에 대하여 運動에너지로서 直接的으로 關與하지는 않는 것으로 보이며, Bailey and Rüegg (1960)가 提起한 假說과 Rüegg(1961 b, 1964)의 假說 및 Szent-Györgyz等(1971)이 提起한 假說과 關連하여 생각할 때, 軟体動物의 種類와 筋肉의 部位에 따라서 各各 含量이 다른 paramyosin은 energy mechanism과는 關係없이 靜電的 調節機能으로 이들의 特異한 收縮機構에 介入하는 것이라고 보여진다.

한편, 別途로 ethanol-dried method에 依하여 分離한 전복 paramyosin을 0.6M KCl · 0.025M tris-HCl, pH 7.0 緩衝液에 溶解시킨 狀態로서 $2-4^{\circ}\text{C}$ 와 -20°C 로 低溫 혹은 凍結하여 保存하면서 經時的으로 保存試料의 一部分을 取하여 凍結 保存한 것은 低溫中($2-4^{\circ}\text{C}$)에서 融解시켜 超遠心分析法으로 沈降圖型의 變化를 檢討하여 보았는데 $2-4^{\circ}\text{C}$ 에서 保存하였던 試料은 66日까지 別다른 變化를 發見할 수 없었으나, (Fig. 27 下部沈降圖), -20°C 에 保存한 試料은 66日째에 gel component와 같은 不溶性의 沈澱을 形成하였으며, 이때 溶存中의 paramyosin의 濃度는 原來의 約 2/3로 減少하였고, 그 沈降 pattern은 마치 Connel(1960, 1963)이 *Gadus callarias*의 myosin을 凍結融解하였을 때의 初期에 觀察한 aggregation pattern과도 類似한 모양을 보였다. 그러나 이 paramyosin은 溫度 25°C 에서는

不過 數 時間 以內에 凝固 沈澱하는 것을 肉眼的으로 볼 수 있었다. 따라서 이 paramyosin은 溫度에 따라서 安定性이 상당히 다르며 高溫에서 보다는 低溫에서 安定하고 低溫일 때는 0°C 近處에서 가장 安定한 것으로 보였다.

結 論

海産 腹足類인 전복과 소라의 筋肉蛋白質의 特性을 알기 위하여 그 構成蛋白質의 組成을 測定하였으며, 또한 paramyosin을 分離하여 그 沈降定數, 아미노酸 組成, N-末端基, 鹽析 및 鹽溶學動, 固有粘度, 및 ATPase 활성 등에 關하여 理化學的으로 檢討한 結果는 아래와 같다.

蛋白質의 組成은 水溶性區分, 鹽溶性區分, 알칼리可溶性區分 및 stroma區分으로 나누었을 때, 전복은 각 22, 34, 20, 24%이었고, 소라는 각 16, 30, 29, 25%이었다. 특히 鹽溶性區蛋白質의 組成은 전복이 paramyosin 65%, myosin과 actomyosin의 合計는 35%이며, 소라는 paramyosin 70%, myosin과 actomyosin이 30%이었다.

paramyosin의 沈降定數는 전복이 3.14s이며, 소라는 3.50s이었다.

paramyosin의 아미노酸 組成의 含量은 glutamic acid, aspartic acid, alginine等은 많이 含有되어 있었으나, proline과 tryptophan은 거의 含有되어 있지 않았다.

이들 paramyosin의 N-末端基로서는 DNP-aspartic acid, DNP-valine, DNP-serine 및 DNP-threonine等을 檢出할 수 있었다.

전복의 paramyosin은 0.35 μ 이상, 소라의 paramyosin은 0.30 μ 이상의 이온強度인 KCl溶液에서 完全히

溶解하였으며, 鹽析範圍는 전복이 18~30%, 소라는 22~29%의 黃酸암모늄 飽和溶液의 範圍이었다.

paramyosin의 固有粘度는 전복이 3.1 dl/g이며, 소라는 2.6 dl/g이었다.

paramyosin의 ATPase活性은 Ca⁺⁺ 및 Mg⁺⁺의 存在下에서 전복은 pH 5.0~9.5, 소라는 pH 6.5와 9.0에서 ATPase活性이 認定되지 않았었다.

謝 意

本 實驗은 日本國 東京大學 農學部 水産化學研究室에서 하였으며, 實驗을 指導하여 주신 東京大學 教授 松浦 文雄博士, 同 助教授 橋本 周久 博士, 그리고 超遠心分析의 協助를하여 주신 東京大學 農學部 技官 櫻井 和子氏, 日本 東海區 水産研究所 生化學研究部 神名 孝一氏, 또 沈降平衡에 依한 分子量 測定을 爲하여 手苦하여 주신 日本 日立製作所 那珂工場 應用開發課 技士 岡島 慶明氏에게 深甚한 謝意를 表한다.

아울러 本 論文을 校閲하여 주신, 釜山水産大學 教授 李 應昊 博士, 同 李 康鎬博士, 同 李 秉喆 博士, 金 章亮 教授, 그리고 釜山大學校 文理科大學 教授 李 鉉琪 博士에게 衷心으로 感謝를 드린다.

文 獻

- Baba, H. (1959): Studies on the proteins of shell-fish III. On the high ionic strength extracts of clam, *Meretrix meretrix*. Eiyogaku Zashi. **15**(3) 121-124 (in Japanese).
- Bailey, K. (1956): The proteins of adductor muscles. Pubbl. Staz. Zool. Napoli. **29**, 96-108.
- Bailey, K. (1957): Invertebrate tropomyosin. Biochim. Biophys. Acta. **24**, 612-619.
- Bailey, K. and J. C. Ruegg (1960): Further chemical studies on the tropomyosins of lamellibranch muscle with special reference to *Pecten maximus*. Biochim. Biophys. Acta. **38**, 239-245.
- Bailey J. L. (1962): Techniques in protein chemistry. 161-167, Elsevier Publishing Co. Amsterdam, Netherlands.
- Bàrány M., A. T. Soldo, K. Pàrány and A. Volpe (1965): Scallop myosin, Federation proceedings. **24**, 400.
- Bàrány, M. and K. Bàrány (1966): Myosin from the striated adductor muscle of Scallop (*Pecten arradians*). Biochemische Zeitschrift. **345**, 37-56.
- Beaven, G. H. and E. R. Holiday (1952): Advances in protein chemistry. **7**, 319. Academic press, New York.
- Cohen, C. and A. G. Szent-Györgyi (1957): Optical rotation and helical polypeptic chain configuration in proteins. J. Am. Chem. Soc. **79**, 248.
- Cohen, C., A. G. Szent-Györgyi and J. Kendrick-Jones (1971): Paramyosin and the filaments of molluscan "Catch" muscles I. paramyosin: Structure and assembly. J. Mol. Biol. **56**, 223-237.
- Connel, J. J. (1960): Studies on the proteins of fish skeletal muscle 7. Denaturation and aggregation of cod myosin. Biochem. J. **75**, 530-538.
- Connel, J. J. (1963): Sedimentation and aggregation of cod myosin: A re-appraisal. Biochem. Biophys. Acta. **74**, 374-385.
- Fraenkel-Conrat, H., J. I. Harris, and A. L. Levy (1955): Methods of biochemical analysis (ed. D. Glick), **2**, 359, Academic press Inc., N. Y.
- Hall, C. E., M. A. Jackus and F. O. Schmitt (1945): The structure of certain muscle fibrils as revealed by the use of electron stains. J. Appl. Physiol. **16**, 459.
- Ikemoto, N. and S. Kawaguti (1967): Elongating effect of tropomyosin A on B the thick myofilaments in the long-sarcomere muscle of the horse-shoe crab. Proc. Jap. Acad. **43**(10), 974-979.
- Iwai, K. and H. Fujioka (1963): Methods of protein experiments. 5-26, Kyoritsu shuppan, Ltd. (in Japanese)
- Johnson, W. H. and J. S. Kahn (1959): Paramyosin and contraction of "catch muscles". Science. **130**(3368), 160-161.
- Kay, C. M. (1958): Some physico-chemical properties of *pinna nobilis* tropomyosin.

- Biochim. Biophys. Acta. **26**, 469.
- Kenndrick-Jones, J., C. Cohen, A. G. Szent-Gyorgyi, and W. Longley (1969): Paramyosin: Molecular length and assembly. *Science*. **163**(3872), 1196-1198.
- Kenndrick-Jones, J., W. Lehman, and A. G. Szent-Gyorgyi (1970): Regulation in molluscan muscles. *J. Mol. Biol.* **54**, 313-326.
- Kominz, D. R., F. Saad, and K. Laki (1957): Chemical characteristics of annelid, mollusc and arthropod tropomyosin, in: Conference on chemistry of muscular contraction. P. 66, Ikakushoin, Tokyo.
- Kominz, D. R. (1966): Phylogenetic studies of muscle proteins. Phylogeny of immunity. P. 55, Univ. of Florida press.
- Kubo, S. (1961): Squid tropomyosin. *Mem. Fac. Fish., Hokkaido Univ.* **9**(1), 57-83.
- Laki, K. (1957): A simple method for the isolation and crystallization of tropomyosin from the muscles of the clam, *Venus mercenaria*. *Arch. Biochem. Biophys.* **67**, 240-242.
- Locker, R. H. and F.O. Schmitt (1957): Some chemical and structural properties of paramyosin. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **3**(6), 889-895.
- Maruyama, K. and D. R. Kominz (1960): Scallop myosin. *Annotationes zoologicae Japanese.* **33**(1), 1-6.
- Matsumoto, J.J. (1958): On the protein composition of squid muscle. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.* **24**(2), 133-139.
- Migita, M. (1959): A comparative study on the extractibility of muscle proteins of some animals. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.* **24**(9), 751-759.
- Migita, M. and S. Otake (1960): Influence of death conditions upon Muscle proteins. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.* **26**(2), 140-148 (in Japanese).
- Milstein C. P. and K. Bailey (1961): Isolation and characterization of a tryptic core from the insoluble tropomyosin *pinna nobilis*. *Biochim. Biophys. Acta.* **49**, 412-413.
- Milstein, C. P. (1967): Isolation of *Aulacomya* paramyosin. *Biochem. J.* **103**, 634-640.
- Miyake, M. T. and K. R. Hayashi (1956): Studies on fish jellies-II. Content of the myosin fraction in fish muscle. *Bull. Japan. Soc. Fish.* **22**(1), 48-50 (in Japanese).
- Moore, S. (1963): On the determination of cysteine as cysteic acid. *J. Biol. Chem.* **238**(1), 235-237.
- Olander, J. (1971): Substructure of the paramyosin molecule. *Biochemistry.* **10**(4), 601-609.
- Pyeun, J. H. (1971): Protein composition and several physicochemical characteristics of paramyosin from abalone muscle. *Ann. Meet. Japan. Soc. Sci. Fish. at Tokyo.* p. 78.
- Pyeun, J. H. (1972): Some physicochemical characteristics of carp myosin B. *Bull. Korean Fish. Soc.* **5**(2), 57-62 (in Korean).
- Rockstein, M. and P. W. Herron (1951): Colorimetric determination of inorganic phosphate in micro-gram quantities. *Anal. Chem.* **23**(10), 1500-1501.
- Rüegg, J. C. (1958): The possible function of invertebrate tropomyosin. *Pro. Biochem. Soc.* **69**, 46.
- Rüegg, J.C. (1959): Tropomyosin and tonus in lamellibranch adductor muscles. *Biochem Biophys. Acta.* **35**, 278-270.
- Rüegg, J. C. (1961a): The proteins associated with contraction in lamellibranch "Catch" muscle. *Pro. Royal Soc. of London.* **B154**, 209-220.
- Rüegg, J. C. (1961b): On the tropomyosin-paramyosin system in relation to the viscous tone of lamellibranch "catch" muscle. *Pro. Royal Soc. of London.* **B154**, 224-249.
- Rüegg, J. C. (1964): Tropomyosin-paramyosin system and "prolonged contraction" in a molluscan smooth muscle. *Pro. Royal Soc. of London* **B-160**(981) 536-542.

- Schachman, H. K. (1957): Methods in enzymology. Vol. 4, 52-56. Academic press, New York.
- Schachman, H. K. (1959): "Ultracentrifugation in Biochemistry". 63-174. Academic press. New York.
- Shimizu, Y. and W. Simidu (1960): Studies on muscle of aquatic animals-XXVIII. protein composition of fish muscle. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish. **26**(8), 806-809.
- Snellman, O. and M. Tenow (1954): A contractile element containing tropomyosin (actotropomyosin). Biochim. Biophys. Acta. **13**, 199-208.
- Svedberg, T. and K. O. Pedersen (1940): "The ultracentrifuge". pp. 1-478, Clarendon press, Oxford, England.
- Szent-Györgyi, A. G., C. Cohen and J. Kendrick-Jones (1971): Paramyosin and the filaments of molluscan "catch" muscles II. Native Filaments: Isolation and characterization. J. Mol. Biol. **56**, 239-258.
- Takashi, T. and T. Tanaka (1961): On the meat of the top shell. Bull. Tokai Reg. Fish. Res. Lab. No. **30**, 85-02 (in Japanese).
- Tonomura, Y., K. Yagi and H. Matsumiya (1955): Contractile proteins from adductors of *pecten*. I. Some enzymic and physicochemical properties. Arch. Biochem. Biophys. **59**, 76-89.
- Tonomura, Y., K. Yagi and H. Matsumiya (1956): Contractile proteins from adductors of *pecten*. II. Interaction with adenosine triphosphate. Arch. Biochem. Biophys. **64**, 466-470.
- Tonomura, Y. and S. Kitagawa (1960): The initial phase of actomyosin-adenosine triphosphatase II. Factors influencing activity. Biochim. Biophys. Acta. **40**, 135-140.
- Tsuchiya, T. and J. Mastumoto (1970): Enzymatic activity of tropomyosin A from *Atrina* smooth adductor muscle. Seikagaku, **42**(8), 106 (in Japanese).
- Twarog, B. M. (1967): The regulation of catch in molluscan muscle. "proceedings of a symposium on the contractile process. J. Gen. Physiol. **50**(6), part 2, 157-169.
- Umemoto, S. (1966): A modified method for estimation of fish muscle protein by Biuret method. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish. **32**(5), 427-435 (in Japanese).
- de Villafranca, G. W. and D. C. Naumann (1964): Some properties of the myosin B ATPase from *Limulus*. Comp. Biochem. Physiol. **12**, 143-156.
- de Villafranca, G. W. (1967): The adenosine triphosphatase activity of myofibrils from the horse-shoe crab *Limulus polyphemus*. Comp. Biochem. Physiol. **21**, 259-271.
- de Villafranca, G. W. (1968): Some physicochemical properties of myosin B from the horse-shoe crab, *Limulus polyphemus*. Comp. Biochem. Physiol. **26**, 443-454.
- de Villafranca, G. W. and L. K. Campbell (1969): Magnesium activation of natural actomyosin ATPase from horse-shoe crab. Comp. Biochem. Physiol. **29**, 775-783.
- Warburg, O. and W. Christian (1941): Isolierung und kristallisation des Gärungsferments Enolase. Biochem. Zeit. **310**, 384-421.
- Woods, E. F., S. Himmelfarb and W. F. Harrington (1963): Studies on the structure of myosin in solution. J. Biol. Chem. **238**(3), 2374-2385.
- Woods, E. F. (1969): Subunit structure of oyster paramyosin. Biochem. J. **113**, 39-47.
- Woods, E. F., and J. P. Margaret (1971): Characterization of some invertebrate tropomyosins. Biochemistry. **10**(2), 270-276.
- Yagi, K., S. Sasaki and H. Matsumiya (1955) Enzymatic and physicochemical properties of myosin B of shell-fishes. Seikagaku. **26**(6), 630-632 (in Japanese).
- Yphantis, D. A. (1960): Rapid determination of molecular weights of peptides and proteins. Ann. New York Acad. Sci. **88**, 586-601.