

근원섬유단백질에 관한 연구

제3보 Troponin-Tropomyosin Complex의 변화

양 응 · 이 용 규*

연세대학교 공과대학 식품공학과

전남대학교 농과대학 낙농학과*

(1977년 9월 20일 수리)

Studies on the Myofibrillar Proteins

Part III. Post-mortem Changes in Troponin-Tropomyosin Complexes.

by

Ryung Yang and Yong-Kyu Lee*

Department of Food Engineering, Yon Sei University

*Department of Dairy Science, Chonnam National University

Abstract

The procedures for the Preparation of regulatory proteins of myofibrill were developed and post-mortem changes in the regulatory proteins of myofibrill were investigated.

Both the physiological property and molecular shape of α -actinin from pre-rigor muscle did not differ from those of α -actinin from post-rigor muscle. On the other hand, although tropomyosin of myofibril changed negligibly during the post-mortem storage of muscle, troponin of myofibril changed remarkably.

많은 研究者들은 Myosin과 Actin의 相互作用이 筋肉의 貯藏中에 變化되고있다고 報告하고 있다¹⁻⁴⁾. 그러나 Actin-Myosin interaction에 있어서의 貯藏中의 變化를 일으키는 蛋白質成分이 筋原纖維 蛋白質中의 어느 成分인지에 대하여서는 아직 밝혀져 있지 않다.

熟成된 筋肉으로부터 抽出精製된 Myosin 本來의 ATPase 活性과 Actin과의 結合能은 屠殺直後의 筋肉으로부터 抽出精製된 Myosin의 그것과 本質의으로 變化되어 있지 않으며 Myosin ATPase에 대한 Actin의 Allosteric effect도 變化되어 있지않으므로^{3,5,6)} Actin-myosin interaction의 貯藏中의 變化는 筋原纖維蛋白質中의 調節蛋白質, 즉 α -actinin과 native tropomyosin 또는 그 두 성분중의 한 성분의 貯藏中의 變化에 의한 것이라고 豫想되었다. 왜냐하면 이들 調節蛋白質들은 筋原纖維를 構成하는 構造蛋白質로서의 기능과 Actin-myosin interaction을 조절하는 기능을 同時에 갖고 있기 때문이다.

最近 Arakawa等은 α -actinin과 tropomyosin-troponin complex의 物理化學的性質이 筋肉의 貯藏中에 얼마간 變化되어 있기는 하나, α -actinin과 tropomyosin-troponin complex의 貯藏中의 變化가 actin-myosin interaction의 貯藏中의 變化에 대한 直接的이며 根本的인 原因이 될수없다고 報告하였다^{12,13)}. 한편 Yang等은 筋原纖維의 thin filament가 筋肉의 貯藏中에 變化되고있으며 thin filament의 貯藏中의 變化는 주로 thin filament를 構成하는 主要成分이 되고있는 tropomyosin-troponin complex의 變化에 의한 것으로 推定하고 있다¹⁴⁾.

著者들은 筋原纖維調節蛋白質의 貯藏中의 變化와 myosin-actin interaction의 貯藏中의 變化와의 關係에 대하여 研究하고자 하였다.

本報에서는 筋原纖維調節蛋白質의 物理化學的인 特性에 대한 筋肉의 貯藏中의 影響에 대하여 研究하였으며, 研究結果는 筋肉의 貯藏中에 筋原纖維의 troponin 含量이 減少되고 있음을 나타내고 있다.

2. 結論實驗材料 및 方法

모든 試料의 調製는 4°C의 低溫室에서 行하였으며 溶液의 調製에는 脫 ion 蒸溜水를 使用하였다.

筋 肉

屠殺直後의 家兔를 剝皮하고 Longissimus dorsi筋을 摘出하였으며 脂肪과 結締組織을 가능한 한 除去한 뒤 에 挽肉하였다. 挽肉은 熟成을 위하여 4°C에 貯藏하였다. 腐敗微生物에 의한 變化를 抑制하기 위하여 挽肉塊의 表面 및 容器에는 10mM의 Sodium azide 용액을 噴霧시켰다. 熟成시킨뒤의 挽肉으로부터 試料를 調製할 때는 表面層을 剝除한 뒤에 試料를 取하였다.

Myofibril의 調製

Myofibril의 調製는 梁 등의 方法¹⁴⁾에 의하였다.

調節蛋白質의 調製

筋原纖維調節蛋白質들은 Scheme I 과 Scheme II (結果 및 考察 참조)에 따라 抽出되었다.

Scheme I 과 Scheme II에서 얻어진 上澄液은(NH₄)₂SO₄로 0~10%, 10~40% 및 40~75% 飽和區分으로 分割하여 5,000×g에서 30分間 遠心分離시켰다. 各分割에서 얻어진 沈澱物은 2mM NaHCO₃ 용액에 대하여 透析하였으며 5,000×g에서 30分間 遠心分離하여 上澄液을 取하였다.

얻어진 上澄液을 다시 (NH₄)₂SO₄로 再分割하여 10~25%(NH₄)₂SO₄ 飽和區分을 얻고 2mM NaHCO₃ 용액에 대하여 透析한 다음 5,000×g에서 遠心分離하여 上澄液을 α-actinin용액으로 하였다.

Troponin과 tropomyosin을 함유한 40~75%(NH₄)₂SO₄ 飽和區分은 소량의 0.15M KCl용액에 용해시키고 0.01M KCl-5mM NaHCO₃ 용액에 대하여 透析하였다.

透析內液을 5,000×g에서 30分間 遠心分離한 뒤, 얻어진 上澄液을 (NH₄)₂SO₄로 再分割하고 40~75%飽和區分을 0.10M KCl-5mM NaHCO₃ 용액에 대하여 透析하고 透析內液을 5,000×g에서 30分間 遠心分離하여 얻어지는 上澄液을 troponin-tropomyosin complex 용액으로 하였다.

Troponin-tropomyosin complex의 等電分離

Troponin-tropomyosin complex의 等電分離(isoelectric separation)는 Ebashi와 Kodama의 方法에¹⁵⁾ 따라 행하였다.

Troponin-tropomyosin complex의 Gel filtration

Gel filtration은 Watanabe와 Staprans의 方法¹⁶⁾에 근거하여 행하였다. 2.5cm×83cm의 Sephadex G-200 column을 0.10M KCl-20mM Tris-HCl (pH 7.5)용액으로 용출시켰으며 流速은 8~12ml/hr였다. 4.5cm시현관

에 分取하여 278nm에서의 吸光度를 측정하였다.

ATPase activity의 측정

反應液의 조성은 Myofibril 0.25mg/ml, 1mM MgCl₂ 혹은 1mM EDTA, 1mM ATP 및 15mM Tris-HCl(pH 8.0)이었고 25°C에서 5分間 반응시켰다. 最終濃度 4%의 TCA로 反應을 정지시켰으며 活性은 1분간에 1mg의 단백질에 의하여 유리되는 無機磷의 μ mole로 表示하였다.

超遠心分析

超遠心分析은 Schlieren 光學系와 連續溫度制御裝置가 부착된 Hitachi UCL 分析用超遠心機로 행하여졌다.

蛋白質濃度測定

단백질농도는 biuret 方法에 의하여 측정되었으며 egg albumin으로 作成된 檢量線은 micro-hjeldahl 法으로 檢定되었다.

Scheme I 및 II에서 얻어진 上澄液의 단백질농도는 Lowry 등의 方法¹⁷⁾에 의하여 측정되었다.

× × ×

이 논문에서 사용된 略語는 다음과 같다.

AM, actomyosin; MF, myofibrils; O-myofibril; 屠殺直後의 筋肉으로 부터 調製된 myofibril; 1-myofibril, 屠殺後 24時間經過後의 筋肉으로 부터 調製된 myofibrils; 8-myofibril, 8日 貯藏된 筋肉으로 부터 調製된 myofibril; Pi, 無機磷; ATPase, adenosine triphosphatase; EDTA, ethylene diamine tetraacetic acid; EGTA, 1,2-bis-(2-dicarborymethylaminoethoxy)-ethane; Tris, tris-(hydroxymethyl)-aminomethane.

3. 實驗結果

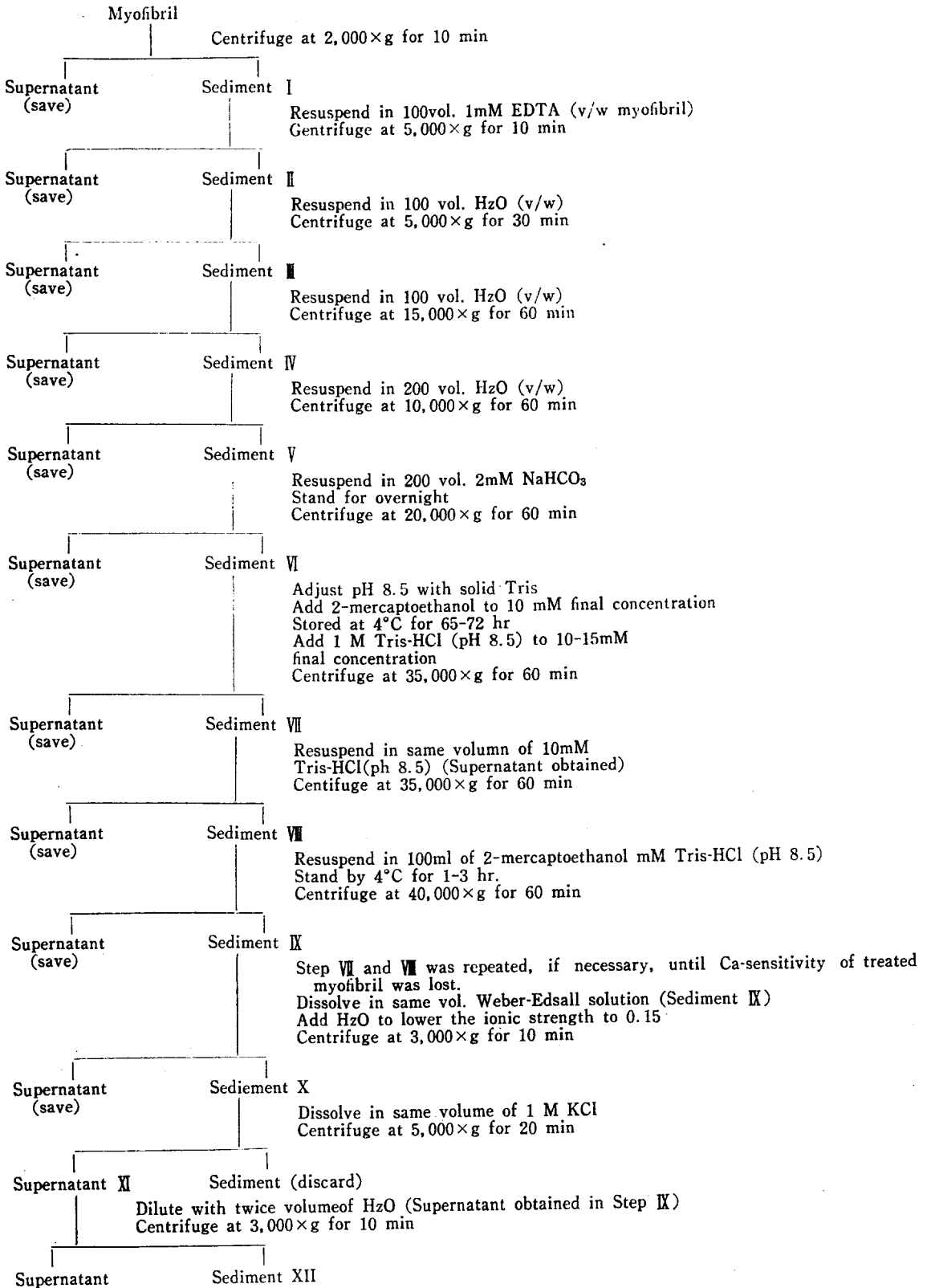
(1) 調節蛋白質抽出을 위한 Scheme의 作成

최근 Arakawa 등은 α-actinin과 troponin-tropomyosin complex는 myofibril을 低 ion強度의 용액으로 抽出하면 얻어질 수 있다고 보고하고 있다.^(18,19)

Scheme I에 나타낸 조절단백질조제용 flowsheet는 본질적으로는 Arakawa 등의 方法에 근거하여 作成되었으나, 出發物質로서 사용된 myofibril은 梁 등의 方法⁽¹⁴⁾에 의한 점이 다르며, 이러한 점에서 Arakawa 등의 方法과 비교하면 상당부분이 修正되고 있다.

Scheme I은 myofibril을 脫ion증류수와 희박한 Na HCO₃용액으로 번갈아 현탁시키므로서 myofibril을 膨潤시키고 이 조각을 myofibril에 Ca-sensitivity가 나타나지 않을 때까지 반복하고 있으며 최종적으로 Ca-感受성이 없는 actomyosin을 調製하는 것으로 구성되어 있다.

筋收縮調節蛋白質들을 얻기 위하여서는 Scheme I에



Dissolve in same vol. of 1 M KCl
Centrifuge at 5,000×g for 20 min
Residue Actomyosin

Scheme I. Flow sheet showing preparation of residue actomyosin and supernatant containing regulatory proteins.

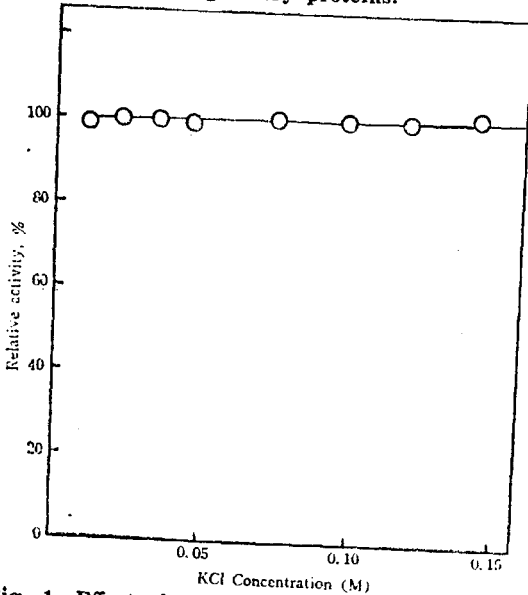
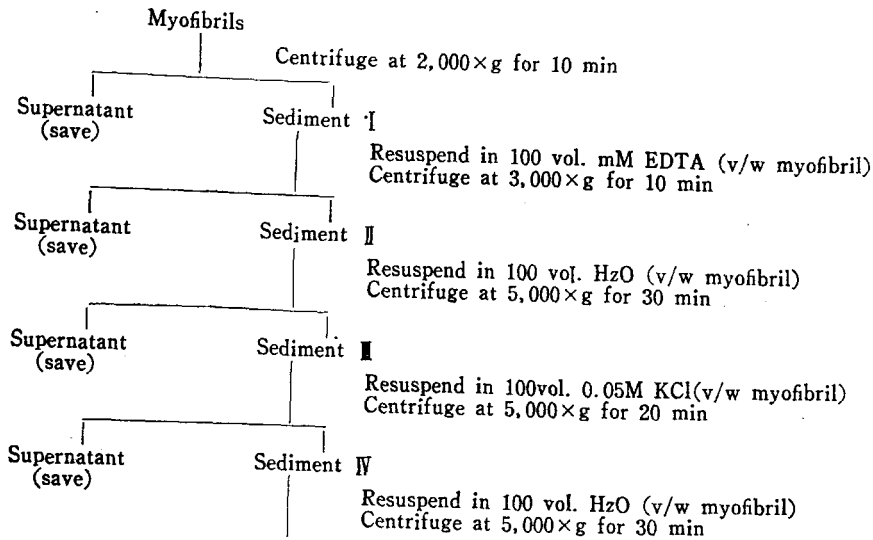


Fig. 1. Effect of EGTA on Mg-activated ATPase of desesized actomyosin

AT Pase assay: 0.125mg/ml actomyos, 1mM Mg Cl₂, 1mM ATP, 25mM Tris-HCl (pH 8.0) and Kcl at the concentration cited of absissa. 25°C for 5min.

Relative value:

$$\frac{\text{Activity in the presence of EGTA}}{\text{Activity in the absence of EGTA}} \times 100$$



서 얻어지는 上澄液을 수집하고 實驗方法에 기술된 바와 같이 (NH₄)₂ SO₄에 의한 鹽析法으로 分割하였다.

myofibril을 Scheme I에 따라 처리한 결과, 얻어진 actomyosin에는 Ca-感受性이 전혀 발견되지 않았다 (Fig. 1). 따라서 Scheme I에 의한 처리방법은 myofibril로부터 Ca-感受性因子를 완전히 抽出시킬수 있음을 확인하였다.

本 研究에서는 또 하나의 調節蛋白質抽出을 위한 flowsheet를 作成하였다.

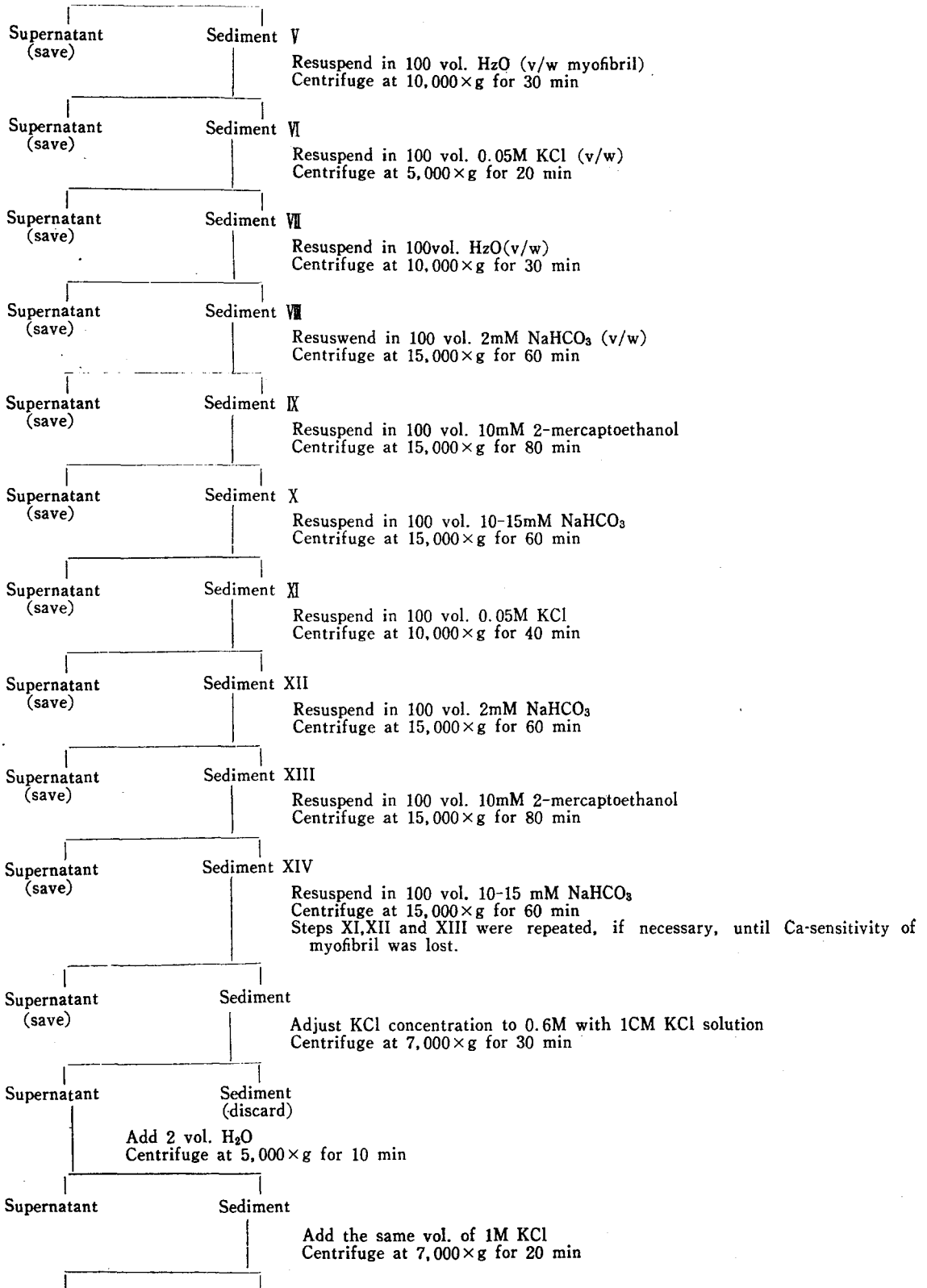
Scheme II에 나타낸 조절단백질조제용 flowsheet는 Perry 등의 方法⁽¹⁰⁾에 근거하여 作成되었다. 일찌기 Perry 등은 myofibril을 묶은 alkali 용액으로 처리하면 troponin-tropomyosin complex를 제거시킬 수 있다고 발표한 바 있다⁽¹⁰⁾.

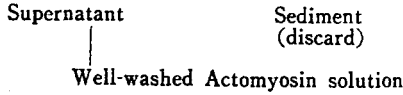
Scheme II에서 얻어진 actomyosin은 Ca-感受性因子가 含有하고 있지 않고 있는 것을 확인하였다(Fig. 2).

이상의 결과는 本 研究에서 제시된 調節蛋白質抽出을 위한 方法이 myofibril로부터 troponin-tropomyosin complex를 완전히 抽出시킬수 있는 것을 명백히 하고 있으며, 따라서 troponin-tropomyosin complex의 완전 추출이라는 所期의 目的을 달성할 수 있다고 결론지었다.

α-actinin의 筋肉貯藏中の 변화

actin-myosin interaction에 있어서의 筋肉貯藏中の





Scheme II. Flow sheet showing preparation of well-washed actomyosin and supernatant containing regulatory proteins.

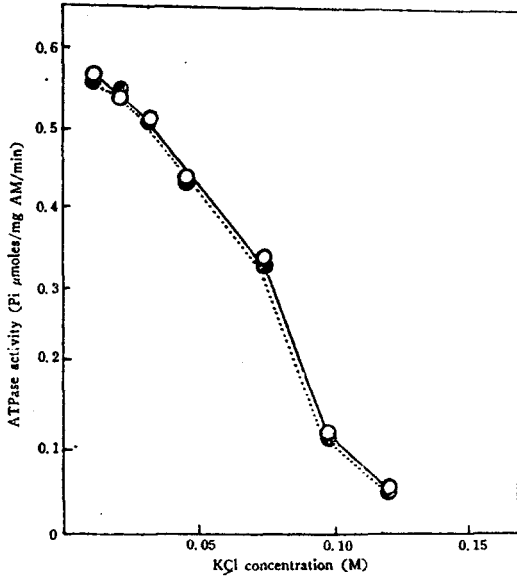


Fig. 2. Effect of EGTA on the KCl concentration dependence of Mg-ATPase activity of desensitized actomyosin.

Activities in the presence (filled circles) or absence (open circles) of 1mM EGTA were measured at same conditions as in Fig. 1.

변화에^(1,3,4) 대한 주요한 원인물질로서는 α-actinin도 그 하나가 될 수 있으므로, 본 연구에서는 먼저 α-actinin의 筋肉貯藏中の 변화를 추적하였다.

筋肉貯藏中에 α-actinin의 生物活性가 여하히 변화하고 있는가를 알아보기 위하여 0-myofibril과 8-myofibril로부터 각각 α-actinin이 분리정제되고 Ca-感受性이 없는 actomyosin의 ATPase 활성에 대한 α-actinin의 ATPase 활성증가효과가 측정되었다.

Fig. 3에 나타낸 바와 같이, 8-myofibril에서 분리정제된 α-actinin의 ATPase 활성 증가효과는 0-myofibril에서 분리정제된 α-actinin의 그것과 아무런 차이를 발견할 수 없었다.

Fig. 4.는 0-myofibril과 8-myofibril로부터 분리정제된 각각의 α-actinin의 sedimentation pattern을 나타낸 것이다. 上位成分의 S_{20,w}는 6.05였고 下位成分의 S_{20,w}는 6.03이었다.

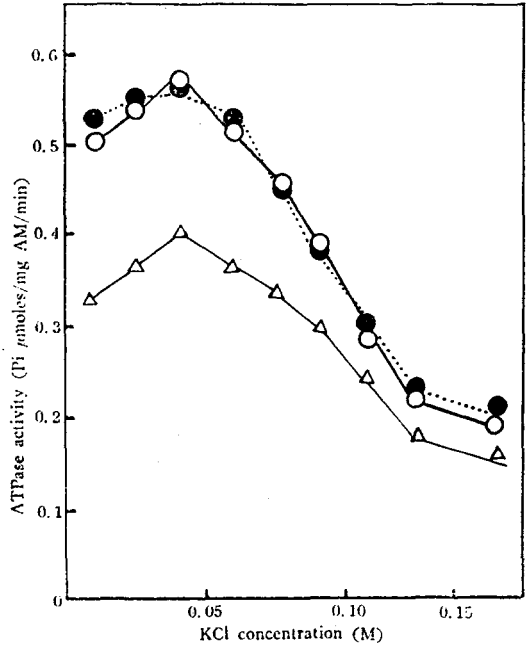


Fig. 3. Effect of α-actinin on Mg-ATPase activity of well-washed actomyosin

Triangles, activity in the absence of α-actinin. circles, activity in the presence of α-actinin

filled circles: α-actinin from 8-MF. open circles: α-actinin from 0-MF.

α-actinin의 S_{20,w}는 6.0~6.2로 보고되고 있으므로^(7, 10), 위의 두 α-actinin은 그 分子形에 아무런 변화를 나타내고 있지않고 있다고 해석되었다.

이상의 결과는 α-actinin이 筋肉貯藏中에 거의 변화하고 있지 않다는 Arakawa등의 결과와⁽¹²⁾ 잘 일치하고 있다. 또한 Arakawa 등은 α-actinin의 抽出性은 筋肉貯藏에 의하여 영향을 받지 않는다고 보고하고 있다⁽¹²⁾ 그러므로 著者들은 α-actinin은 筋肉의 貯藏에 의하여 아무런 변화도 일으키지 않는다고 결론지었다.

Troponin-tropomyosin complex의 筋肉貯藏中의 變化

위에서 筋肉의 貯藏中에 α-actinin의 生物活性과 分子形에는 아무런 변화가 없는 것으로 밝혀졌으므로 著者들은 troponin-tropomyosin complex의 貯藏中の 변화를 추적하기로 하였다.

먼저 in situ system에서의 troponin-tropomyosin

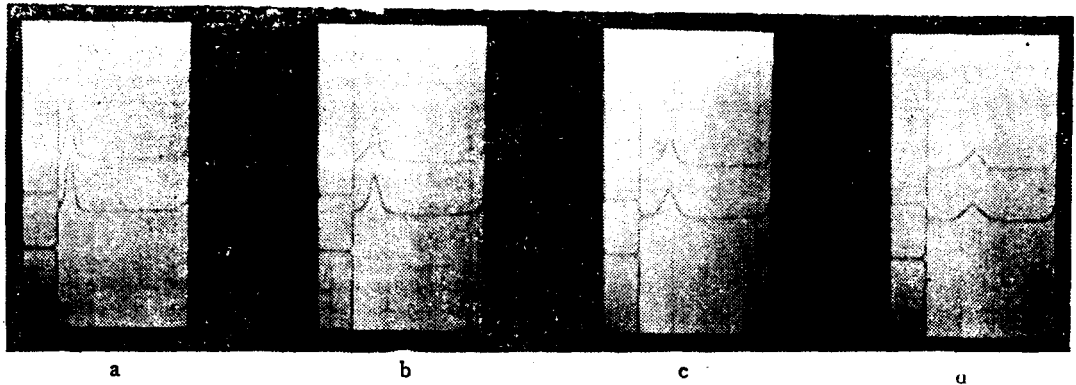


Fig. 4. Sedimentation Diagrams of α -actinin from Myofibril

Upper traces : α -actinin from O-MF (3.24 mg/ml) in 20mM Tris-HCl (pH 8.0)

Lower traces : α -actinin from 8-MF (3.10 mg/ml) in 20mM Tris-HCl (pH 8.0)

Rotor velocity : 60,000 rpm, Bar angle: 60°,

Temperature : 10.5°C,

Times after reaching 60,000 rpm

(a) 10 min

(b) 20 min

(c) 30 min

(d) 50 min

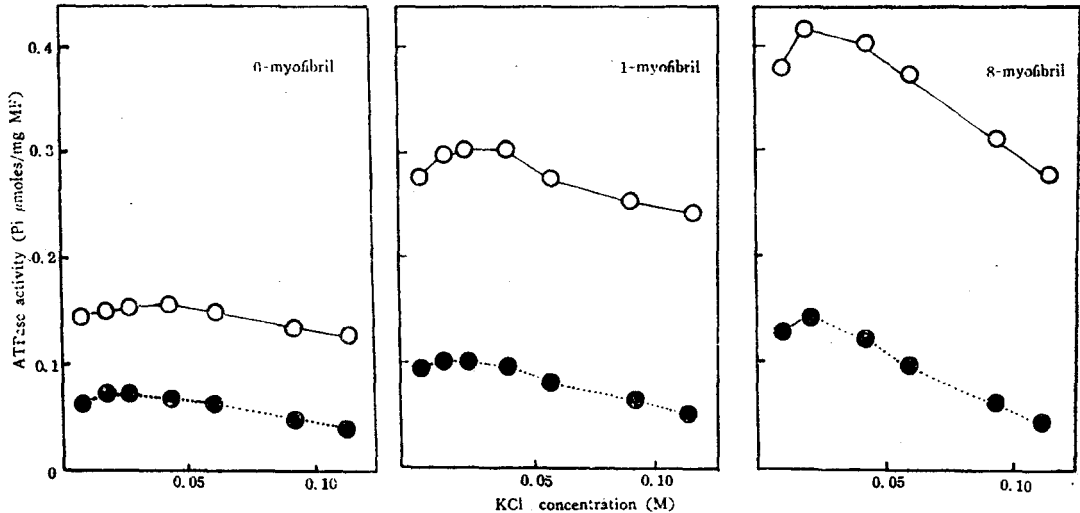


Fig. 5. Effect of EGTA on Mg-ATPase activity of Myofibril.

ATPase assay conditions, as in Fig.1 except 0.25 mg/ml myofibril instead of actomyosin.

complex의 生物活性을 알아보기 위하여 myofibril의 Mg-ATPase 활성에 대한 EGTA의 영향을 조사하였다.

Fig. 6에 나타낸 바와 같이 myofibril의 Mg-ATPase 활성은 EGTA에 의하여 현저하게 저해되고 있다. 특히 주목되어야 할 사실은 8-myofibril의 Mg-ATPase 활성에 대한 EGTA의 저해율이 0-myofibril의 경우보다 훨씬 크다는 사실이다(Fig. 5).

Fig. 5의 결과는 myofibril의 ATPase system이 筋肉貯藏中에 변화하고 있거나 혹은 EGTA의 존재하에서

myofibril의 ATPase를 저해하는 troponin-tropomyosin complex의 活性이 筋肉의 貯藏中에 증가되고 있거나 둘 중의 하나일 것으로 해석되었다. 그런데, 合成 actomyosin (reconstituted actomyosin)의 ATPase 활성에 대한 troponin-tropomyosin complex의 生物活性은 筋肉貯藏中에 변화하지 않는다고 알려져 있으므로⁽¹²⁾, 8-myofibril의 ATPase 활성에 대한 EGTA의 높은 저해율은 筋肉貯藏中에 일어나는 myofibril의 구조적 변화에 의한 것이라고 추정되었다. 梁 등은 이미 myofibril

은 筋肉貯藏中에 구조적 변화를 일으키고 있으며 이 변화는 myofibril의 thin filament의 변화에 의한 것이라는 것과 thin filament의 구조적 변화는 주로 thin filament를 구성하는 주요단백질성분의 하나인 troponin-tropomyosin complex의 변화에 의한 것이라고 추정한다(14).

著者들은 만약 myofibril이 Ca-感受성이 완전히 除去될 때까지 Scheme I과 Scheme II에 따라 처리된다면 추출된 troponin-tropomyosin complex의 양은 myofibril의 troponin-tropomyosin complex의 함량과 정비례할 것으로 예상하였고, 이러한 예상아래 Scheme I과 Scheme II에 의하여 처리된 myofibril로부터 얻어진 troponin-tropomyosin complex의 양을 경량하였다.

Table I과 Table II에 나타낸 바와 같이, 8-myofibril로부터 추출된 troponin-tropomyosin complex의 양은 0-myofibril과 1-myofibril로부터 추출된 troponin-tropomyosin complex의 양보다 20~30%가 낮았다.

최근 Arakawa 등은 低 ion 強度의 용액으로 추출되는 troponin-tropomyosin complex의 양은 筋肉의 貯藏 時間에 따라 아무런 차이를 나타내지 않았다고 보고하고 있다(12). 그러나 Arakawa 등은 myofibril중의 troponin-tropomyosin complex가 완전히 추출되었는지 어떤지를 점검하고 있지 않고 있으므로 그들의 결과는 참고의 가치가 없다고 생각되었다.

Table I과 Table II의 결과는 8-myofibril의 troponin-tropomyosin complex의 함량이 0-myofibril이나 1-myofibril의 troponin-tropomyosin complex의 함량보다 낮은 것을 나타내고 있으므로 著者들은 각각의 myofibril로부터 추출된 troponin-tropomyosin complex에 있어서의 troponin의 含有比를 측정하기로 하였다. tro-

Table I. Effect of Post-mortem Storage of Muscle at 4°C on the Amount of Troponin-tropomyosin Complex from Myofibrils.

| Sample | Protein mg/g MF | Percentage to troponin-tropomyosin complex of 0-myofibrils |
|-------------|-----------------|--|
| 0-myofibril | 72.4±1.4 | 100.00% |
| 1-myofibril | 72.2±0.9 | 99.72 |
| 8-myofibril | 57.2±0.4 | 79.01 |

Troponin-tropomyosin complex was extracted through the Procedures outlined in Scheme I, as described in Materials and Methods.

Table II. The Amount of Troponin-tropomyosin Complex extracted from Myofibrils.

| Sample | Protein mg/g MF | Percentage to troponin-tropomyosin complex of 0-myofibrils |
|-------------|-----------------|--|
| 0-myofibril | 72.4±2.1 | 100. % |
| 1-myofibril | 70.8±1.4 | 97.66 |
| 8-myofibril | 53.1±3.2 | 73.24 |

Troponin-tropomyosin complex was extracted through the Procedures outlined in Scheme II, as described in Materials and Methods.

ponin의 含有比를 측정하기 위하여서 본 연구에서는 Ebashi와 Kodama의 等電分離法(15)을 이용하였으며 이 방법에 의하면 Fig. 6에 나타낸 바와 같이 等電沈澱物은 순수한 tropomyosin이며 troponin은 上澄液중에 분리되는 것이 확인되었다.

等電分離法을 이용하여 troponin의 含有比를 측정한 결과, Table III에 나타낸 바와 같이 8-myofibril에서 얻어진 troponin-tropomyosin complex에 있어서는 0-



Fig. 6. Sedimentation diagram of precipitates by isoelectric separation

Protein (5.5 mg/ml) in 0.25M KCl-25mM Tris-HCl (pH 8.0)

Times after reaching 60,000 rpm,

(a) 30min

(b) 60 min

(c) 90 min

(d) 120min

Szo,w=2.6

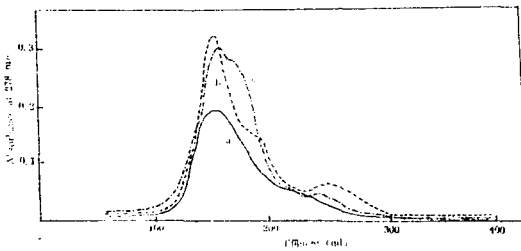


Fig. 7. Sephadex G-200 column chromatogram of Troponin-tropomyosin complex from myofibril

- a : T-T complex from 0-MF (25.3mg)
- b : T-T complex from 1-MF (38.4mg)
- c : T-T complex from 8-MF (38.5mg)

myofibril이나 1-myofibril에서 얻어진 그것들에 비하여 tropomyosin의 함량은 높고 troponin의 함량은 낮다는 것이 분명하여 졌다. troponin의 함유비가 근육의貯藏中에 낮아지고 있다는 위의 결과는 대단히 주목되어야 할 것으로 생각되었는데, 그 이유는 troponin은 Ca-感受性的의 담당성분인 동시에 thin filament에 400Å의 주기로 분포되어 있는 구조성분이기 때문이다⁽¹¹⁾.

0-myofibril, 1-myofibril 및 8-myofibril로부터 각각 추출계된 troponin-tropomyosin complex에 있어서 troponin의 함유비가 서로 다르다는 위의 결과는 Fig.7의 gel filtration pattern에 의해서도 지지되었다.

Fig. 7의 Sephadex G-200 chromatogram은 troponin-tropomyosin complex에 있어서 major 성분은 큰 차이가 없으나 minor 성분은 myofibril간에 차이가 있다는 것을 나타내어 주고 있다.

이상의 결과들을 총괄하여 著者들은 myofibril의 근육의貯藏中에 구조변화를 일으키며 이 변화는 myofibril의 thin filament의 구조변화에 의한 것이며 myofibril의 thin filament의 구조변화는 주로 troponin의 함량변화에 의한 것이라고 추정하였다.

4. 考 察

本 研究에서 얻어진 결과들은 myofibril이 근육의貯

Table III. Isoelectric separation (pH 4.6, 1M KCl) of Troponin-tropomyosin Complex from Myofibrils.

| Isoelectric separation (%) | | |
|----------------------------|-------------|---------------|
| Sample | Supernatant | Precipitation |
| 0-myofibril | 30.7±1.5 | 69.4±1.5 |
| 1-myofibril | 31.1±2.4 | 68.9±2.4 |
| 8-myofibril | 22.9±1.9 | 77.2±1.9 |

藏中에 구조변화를 일으키고 있으며 myofibril의 구조 변화는 thin filament의 구조변화에 의한 것이라는 梁 등의 추정^(6,14)을 지지하는 것이라고 해석되었다.

α -actinin은 myofibril의 Z-line을 구성하는 주요성분이며^(7,10) Z-line은 근육의貯藏中에 점차적으로 분해되고 있으므로^(25,26) α -actinin이 근육의貯藏中에 크게 변화를 일으키고 있을 것으로 예상되었으나, Ca-感受性이 없는 actomyosin의 ATPase 활성에 대한 α -actinin의 증가효과는 근육의貯藏中에 거의 변화되어 있지 않으며(Fig. 3), α -actinin의 分子形에도 아무런 변화를 관찰할 수 없었으므로(Fig. 4), α -actinin은 근육貯藏에 의한 actin-myosin interaction의 변화에는 직접적인 기여를 하고 있지 않다고 결론지었다. 이와 같은 결론은 이미 Arakawa 등도 내린 바 있다⁽¹²⁾. 따라서 著者들은 근육貯藏에 의한 actin-myosin interaction의 변화는 thin filament의 troponin-tropomyosin complex의 변화에 의한 것이라고 예상하였던 것이다.

Table I과 II에 나타낸 결과들은 myofibril의 troponin-tropomyosin complex의 함량이 근육의貯藏中에 점차 減少되고 있음을 나타내어 주고 있으며, 더우기 Table III은 troponin-tropomyosin complex에 있어서 troponin의 함유비가 근육의貯藏中에 낮아지고 있는 것을 나타내고 있다.

Troponin은 thin filament에 400Å의 주기로 규칙정연하게 配列되고 있는 성분이므로^(11,27), 근육의貯藏中에 troponin-tropomyosin complex의 troponin 함유비가 낮아지고 있다는 著者들의 결과는 thin filament의 구조변화는 troponin-tropomyosin complex의 변화에 의한 것을 증명하는 것이라고 평가되었다.

일찍이 Ebashi 등은 troponin은 actin 分子와 직접 結合되어 있지는 않으나 myosin의 actin과의 binding site 근처에 존재하므로서 troponin의 구조변화는 actin-myosin interaction의 변화를 유도할 수 있다고 예상하였으며⁽¹¹⁾, 뿐만 아니라 Drabikowsky 등은 troponin의 존재下에서는 tropomyosin을 actin으로부터 쉽게 분리할 수 없었다는 실험결과로부터 troponin은 actin과 tropomyosin의 헤리를 억제하는 cement의 기능을 갖고 있다고 발표하고 있다⁽²⁸⁾. 이러한 보고들은 troponin이 actin-myosin interaction을 조절하는 중요성분임을 강조하는 것이며 troponin의 변화가 근육貯藏中에 나타나는 actin-myosin interaction의 변화에 대한 직접적인 원인이 될수 있음을 암시하여 주는 것들이다. 더군다나 최근 Drabikowsky는 SDS-gel電氣泳動을 이용한 연구결과로부터 troponin이 근육貯藏中에 변화되고 있으며 troponin-tropomyosin complex의 함량이 감소되고

있는 것 같다고 보고하고 있으며⁽³⁷⁾ 著者들의 결과는 Drabikowsky의 예상을 명확하게 증명하는 것이라고 말할 수 있다.

本 研究에서 중요한 結果를 얻는데 이용된 Scheme I 과 Scheme II 는 myofibril의 조절단백질이 低ion 強度의 용액이나 묽은 alkali용액으로 용해시킬 수 있다는 사실^(18,20)에 근거하여 작성된 것이다. 그러나 myofibril로부터 추출된 troponin-tropomyosin complex의 양에 관한 한 몇가지의 의문점을 논의하지 않을 수 없다.

첫째의 의문점은 추출된 troponin-tropomyosin complex의 양을 myofibril의 troponin-tropomyosin complex 함량으로 평가하여도 좋은가 라는 점에 있다.

著者들은 만약 myofibril로부터 Ca-感受성이 나타나지 않을 때까지 troponin-tropomyosin complex가 추출된다면, 추출된 troponin-tropomyosin complex의 양은 myofibril의 troponin-tropomyosin complex 함량과 正比例한다고 생각하였다. 실제로 著者들의 결과(72mg/gMF, Table I 과 II)는 生體內的 근섬유중의 troponin-tropomyosin complex의 함량은 약 8%라는 Maruyama 등의 결과⁽³⁰⁾와는 잘 일치되고 있다. 물론 이 비교는 myofibril調製中에 流失되는 양을 配慮하면서의 비교이다.

두번째의 의문점은 40~75% (NH₄)₂SO₄ 飽和區分에는 troponin-tropomyosin complex만이 鹽析되며 그 외의 근원섬유단백질은 混入되지 않는가 라는 점에 있다.

40~75%(NH₄)₂SO₄ 飽和區分에 오직 troponin-tropomyosin complex만이 鹽析되는가를 확인하기 위하여 著者들은 분리정제된 40~75%(NH₄)₂SO₄ 飽和區分の Mg-ATPase 활성 및 Ca-ATPase 활성을 측정하였다. 그 결과, 40~75% 포화구분에는 ATPase 활성이 없었으며, 따라서 myosin의 混入은 없다고 판정하였다. 동시에 著者들은 40~75% 포화구분의 myosin ATPase 활성에 대한 allosteric effect를 측정하였으며 그 결과, 40~75% 포화구분은 myosin ATPase 활성에 대한 allosteric effect를 갖고 있지 않았다. 따라서 著者들은 40~75% 飽和區分에는 actin의 混入도 없다고 판정하고 40~75% 飽和區分에는 오직 troponin-tropomyosin complex만이 鹽析된다고 결론지었다.

세번째의 의문점은 40~75%(NH₄)₂SO₄ 飽和區分에 sarcoplasmic protein의 混入은 없는가 라는 점에 있다.

Aberle 등은 筋肉을 5°C이하의 온도에 저장하여 둔 결과 sarcoplasmic protein의 電氣泳動像은 筋肉의 貯藏에 의하여 변화가 없었다고 보고하고 있다⁽³¹⁾. 그러므로 sarcoplasmic protein의 混入이 있더라도 0-MF, 1-

MF 및 8-MF에 均等하게 混入될 것이므로 3者の troponin-tropomyosin complex의 함량비교에는 문제상이 없다고 판정하였다.

네번째의 의문점은 筋肉의 貯藏中에 troponin 또는 tropomyosin이 變性を 일으키고 그 결과, troponin-tropomyosin complex의 추출성이 달라지며, 따라서 含量의 차이를 나타내지 않는가 라는 점에 있다.

Arakawa 등은 troponin-tropomyosin complex를 0°C에서 40°C까지 그리고 pH를 5.7에서 7.0까지 변화시키면서 저장한 경우에도 이 complex의 生物活性에는 아무런 변화도 없었다고 보고하고 있다⁽¹³⁾. 따라서 筋肉貯藏中에 troponin과 tropomyosin은 變性を 일으키지 않으며 그 抽出性에도 變化가 없을 것으로 평가되었다.

本 研究의 結果들은 筋肉의 貯藏中에 일어나는 actin-myosin interaction의 변화가 myofibril의 thin filament의 구조변화에 의한 것이며 thin filament의 구조변화는 thin filament의 troponin-tropomyosin complex의 변화에 의한 것이라는 유력한 증거를 제시하고 있으나 troponin-tropomyosin complex가 筋肉貯藏中에 왜 변화하고 있는지에 대하여서는 연구하고 있지 않다. Arakawa 등은 actin과 troponin-tropomyosin complex와의 結合력이 筋肉의 貯藏中에 弱화되고 있다고 발표하고 있으나⁽¹²⁾, actin과 troponin-tropomyosin complex와의 綜合력이 왜 弱化되고 있는지도 아직 모른다.

최근 많은 研究者들은 troponin이 tropomyosin-binding protein과 Ca-receptive protein등 3개의 subunit로 되어 있다고 보고하고 있다.⁽³²⁻³⁸⁾ 따라서 筋肉의 貯藏中에 troponin의 subunit들이 어떻게 변화하고 있는가를 추적하는 것은 근육저장중에 troponin의 含有比가 낮아지는데 대한 유력한 해명을 얻는데 도움이 될 것으로 생각된다.

5. 要 約

근원섬유로부터 근수축조절단백질들을 추출정제하고 저장중의 변화를 연구하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. α -actinin은 그 分子形이나 生物活性에 아무런 변화도 일으키지 않았다.
2. 근육저장중에 근원섬유의 troponin-troponin complex의 함량은 감소되고 있으며 troponin-tropomyosin complex의 troponin含有比는 낮아지고 있다.

6. 참고문헌

- 1) M. Fujimaki, N. Atakawa, A. Okitani and L. Takagi: *J. Food Sci.*, 30,939(1965).

- 2) I.F. Penny: *J. Sci. Food and Agri.*, **19**, 518(1968).
- 3) D.E. Goll and R.M. Robson: *J. Food Sci.*, **32**, 323(1967).
- 4) M. Fujimaki, A. Okitani and N. Arakawa: *Agr. Bio. Chem.*, **29**, 581(1965).
- 5) A. Okitani, O. Takagi and M. Fujimaki: *Ibid*, **29**, 971(1967).
- 6) R. Yang, Okinaki and M. Fujimaki: *Ibid*, **34**, 1765(1970).
- 7) Y. Nonomura: *J. Biochem.*, **61**, 769(1967).
- 8) S. Ebashi and F. Ebashi: *Biochem.*, **55**, 604(1964).
- 9) M. Endo, Y. Nonomura, T. Maski, I. Ohtsuki and S. Ebashi: *J. Biochem.*, **60**, 605(1965).
- 10) D.E. Goll, W.F.H.M. Mommnerts, M.K. Reedy and K. Seraydarian: *Biochem. Biophys.* **175**, 174(1969).
- 11) S. Ebashi, A. Kodama and F. Ebashi: *Biochem.*, **64**, 465(1968).
- 12) N. Arakawa, D.E. Goll and J. Temple: *Food Sci.*, **35**, 703(1970).
- 13) N. Arakawa, D.E. Goll and J. Temple: *Ibid*, **35**, 712(1970).
- 14) R. Yang A. Okitani and M. Fujimaki: *Agr. Bio. Chem.*, **36**, 2087(1972).
- 15) S. Ebashi and A. Kodama: *J. Biochem.*, **58**, 107(1965).
- 16) S. Watanabe and I. Staprans: *Pro. Nat. Acad. U.S.A.*, **56**, 572(1966).
- 17) O.H. Lowly, N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall: *J. Bio. Chem.*, **193**, 265(1951).
- 18) N. Arakawa, R.M. Robson and D.E. Goll: *Bio-phys. Acta.* **200**, 269(1970).
- 19) R.M. Robson, D.E. Goll and N. Arakawa: *Bio-chem. Biophys. Acta.*, **200**, 269(1970).
- 20) S.V. Perry, V. Davies and D. Hayter: *Biochem. J.*, **100**, 289(1966).
- 21) A. Okitani and M. Fujimaki: *Agr. Bio. Chem.*, **34**, 1725(1970).
- 22) S. Lowey, H.S. Slayter, A.G. Woods and H. Baker: *J. Mol. Biol.*, **42**, 1(1969).
- 23) I.P. Trayer and S.V. Perry: *Biochemische Z.*, **345**, 87(1966).
- 24) M.F. Gellert, P.H. Vonhippel, H.K. Schachman and M.F. Morales: *J. Amer. Chem. Soc.*, **81**, 1393(1959).
- 25) C.F. Cook and R.G. Wright: *J. Food Sci.*, **31**, 861(1966).
- 26) K. Takahashi, T. Fukazawa and T. Yasui: *J. Food Sci.*, **32**, 409(1967).
- 27) I. Ohtsuki, T. Masaki, Y. Nanomura and S. Ebashi: *J. Biochem.*, **63**, 817(1967).
- 28) W. Drabikowski, D.R. Komin Z and K. Maruyama: *J. Biochem.*, **61**, 802(1968).
- 29) H. Tokuyama and Y. Tonomura: *J. Biochem.*, **62**, 456(1967).
- 30) K. Maruyama and S. Ebashi, In "Physiology and Biochemistry of Muscle as a Food" vol. 2 (E.J. Briskey, R.G. Cassens and B.B. Marsh, eds.) p.377. Univ. Wisconsin Press, Madison Wisconsin (1970).
- 31) E.D. Aberle and R.A. Merkei: *J. Food Sci.*, **31**, 151(1965).
- 32) D.J. Harshorne and H.Muller: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **31**, 647(1968).
- 33) M.C. Schaub and S.V. Perry: *Biochem. J.*, **115**, 993(1969).
- 34) D.J. Hartshorne: *J. Gen. physiol.*, **55**, 585(1970).
- 35) S. Ebashi, T. Wakabayashi and F. Ebashi: *Biochem.*, **69**, 441(1971).
- 36) M.C. Schaub, S.V. Perry and W. Hacker: *Biochem. J.*, **126**, 237(1972).
- 37) W. Drabikowsky, FEBS Letters, **27**, 239(1973).