

## Red muscle myosin과 White muscle myosin의 생물활성의 비교

신완철 · 오두환 · 진홍승 · 김기태 · 양 용 ·

연세대학교 공과대학 식품공학과

# Comparison of Myosin ATPase Activities from Red Muscle and White Muscle

Wan-Chul Shin, Doo-Whan Oh, Hong-Seung Jhin, Kee-Tae Kim and Ryung Yang

Department of Food Engineering, College of Engineering, Yonsei University

### Abstract

Myosin were prepared from red muscle and white muscle, and their ATPase activities were compared. Ca-ATPase activity of bovine myosin from red muscle was higher than that of myosin from white muscle, while Ca-ATPase activity of chicken myosin from red muscle differed hardly from that of myosin from white muscle. Also EDTA-ATPase activity of bovine red muscle myosin was higher than that of white muscle myosin, although EDTA-ATPase activity of chicken myosin from red muscle differed hardly from that of white muscle myosin. When myosins were treated with trypsin, bovine myosin from white muscle was hydrolysed more easily than red muscle myosin was. Chicken myosin from red muscle, however, was hydrolysed by trypsin more easily than white muscle myosin was.

### 서 론

前報에서<sup>(1)</sup> 著者들은 red muscle 과 white muscle에서 조제된 myofibril의 SDS-acrylamide gel 전기영동상은 근원섬유구성단백질조성에 차이를 보였으며, 정제된 actomyosin에 있어서도 actomyosin의 생물활성은 물론 염용액에 대한 용해도에서 차이가 있다는 사실을 밝혔다. 또한 소의 근육의 red muscle과 white muscle 사이의 차이가 닭의 근육에 있어서의 red muscle과 white muscle 사이의 차이와 동일한 경향을 보이지는 않았으므로, 소의 근육과 닭의 근육의 근원섬유단백질에는 각각 동물의 종특성(species-characteristics)이 존재할 가능성이 있다고 추정하였다.

그런데, 前報에서 비교된 actomyosin의 생물활성은 본질적으로는 myosin의 생물활성에서 유래된 것이며<sup>(2,4)</sup>, actin은 myosin ATPase에 대한 allosteric effector로 취급될 수 있으므로<sup>(6-7)</sup>, 前報에서 얻어진 결과를 확인하는데에는 myosin에 대한 보다 정밀한 분석이 필요하다고 생각되었다.

Myosin은 근원섬유의 thick filament를 구성하는 주

성분으로 근세포의 대표적인 구조단백질인 동시에 ATP의 화학에너지를 기계적 에너지로 변환시키므로써 근수축과 이완을 가능하게 하는 기능단백질이 밝혀져 있다<sup>(8-14)</sup>. 더우기 육제품의 탄력성과 열응고성에는 myosin이 주요인자로 작용하고 있으며<sup>(15-21)</sup>, 근원섬유단백질중에서도 가장 유효력이 큰 것으로 알려지고 있다<sup>(22)</sup>. 그러므로 red muscle과 white muscle로부터 정제된 myosin의 생물활성을 비교하는 것은 분자생물학적 측면은 물론 식품공학적 측면에서 유의미한 작업이라고 생각되었다.

본 연구에서는 소의 근육과 닭의 근육으로부터 각각 myosin을 추출, 정제하고 그 생물활성의 특징을 fiber type에 따라 비교하기로 하였다.

### 실험재료 및 방법

#### 실험재료

한국 재래종 소(Bovin)의 longissimus dorsi muscle을 white muscle로, sartorius muscle을 red muscle로 취하여 지방과 결체조직을 제거한 후 사용하였다.

닭(chicken)은 가슴근육을 white muscle로, 다리 근육 중 white fiber함량이 높은 gastronemius, semimembranous 등을 제거한 나머지 부분을 red muscle로 취하여 지방과 결체조직을 제거한 후 사용하였다.

§ : 본 연구는 근섬유의 특성에 관한 비교생화학적인 연구의 제 2 보로 1985년도 한국식품과학회 추계학술발표회(장소: 서울대학교 농과대학)에서 발표되었음.

근원섬유단백질의 조제

Myosin의 조제는 Perry<sup>(23)</sup>와 Mommaerts의 방법<sup>(24)</sup>에 의하여 조제하였다.

Heavy meromyosin(HMM)의 조제는 조제된 myosin을 trypsin으로 한정가수분해한 후 Lowey와 Cohen의 방법<sup>(25)</sup>을 약간 수정하여 조제하였다.

Myosin 용액(7~8mg/ml)에 동량의 0.5M KCl-0.05M Tris-HCl 완충액(pH 7.5)과 trypsin(wt%, 250:1) 1ml를 혼합한 후 25°C에서 10분동안 반응시켰다. trypsin처리되는 2배양의 trypsin inhibitor를 첨가함으로써 정지되었으며, 처리된 현탁액은 4°C에서 0.05M KCl-0.005M Tris-HCl 완충액(pH 7.5)에서 24시간동안 투석되었다. 투석액은 30,000×g에서 30분동안 원심분리되었으며, 원심분리상등액(HMM 용액)을 더욱 정제하기 위하여 Gel chromatography를 행하였다.

Gel chromatography는 Sephadex G-200(column size: 2×46cm)을 사용하였으며 4°C에서 0.05M KCl-0.005M Tris-HCl 완충액(pH 7.5)으로 시간당 20ml의 용출속도로 용출하였고, 4ml씩 분획하였다.

ATPase 활성 측정

0.25mg/ml myofibrillar proteins, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM CaCl<sub>2</sub> 혹은 1mM EDTA, 1mM ATP, 25mM Tris-HCl 완충액(pH 8.0)의 혼합액을 30°C에서 5분간 반응시켰다. 반응은 최종농도 4%인 TCA를 첨가시켜 정지시켰으며, 유리된 인산을 Fiske-Suffarow 방법<sup>(26)</sup>으로 정량하였다.

ATPase 활성은 1mg의 단백질에 의해서 유리되어 나오는 무기인산의 μmoles로 표시하였다.

Trypsin에 의한 myosin의 가수분해속도 측정

Myosin과 trypsin의 중량비를 200:1로 하여 0.5M KCl-0.005M Tris-HCl 완충액(pH 7.5)과 혼합하여 25°C에서 서서히 저어주면서 반응시켰다. 반응시간별로 위의 반응액을 일정량씩 취해 20% TCA를 첨가하여 trypsin 작용을 정지시켰으며 가수분해 정도를 비교하기 위해 1000×g에서 10분간 원심분리하여 얻어진 상등액을 280nm에서 흡광도 측정을 하였다.

결과 및 고찰

Myosin의 ATPase 활성에 대한 각종 effector의 영향의 비교

Myosin의 ATPase 활성에 대한 여러 effector의 영향에 대해서는 많은 연구가 행하여졌으나<sup>(4,27-29)</sup>, fiber type에 따른 연구로는 일반적으로 white muscle의 myosin

ATPase 활성은 더 높다고 알려진 사실 외에는 동물과 fiber type에 대한 각 effector들의 영향은 체계적으로 조사 연구되어 있지는 않다.

그러므로, 소와 닭의 red muscle과 white muscle에서 myosin을 추출, 정제하고 ATPase 활성을 측정하여, 그 성질을 비교 검토하였다.

Fig.1에 나타낸 바와 같이, 소의 myosin의 Ca-ATPase 활성은 red muscle 쪽이 white muscle 쪽보다 거의 두배 정도 높게 나타나고 있다. 이 결과는 red muscle의 myosin ATPase 활성이 white muscle의 그것보다 1/2~1/3이 낮다고 한 Barany의 결과<sup>(30)</sup>와는 모순되고 있다.

Fig.1의 결과는 Fig.2의 결과로부터도 확인되었다. 즉, 소의 myosin의 EDTA-ATPase 활성은 red muscle에서 높게 나타나고 있으며, 닭의 myosin의 EDTA-ATPase 활성은 red muscle과 white muscle 사이에 거의 차이가 없다.

Fig.1과 2의 결과들은 myosin ATPase 활성이 Barany의 결과와 같이 white muscle의 myosin ATPase 활성이 일률적으로 red muscle의 myosin ATPase 활성보다 2~3배 높게 나타나는 것은 아니며, 오히려 동물의 종류를 따른 종특성을 나타낼 수 있음을 암시하고 있다.

동물의 종류에 따른 myosin ATPase의 종특성은 my-

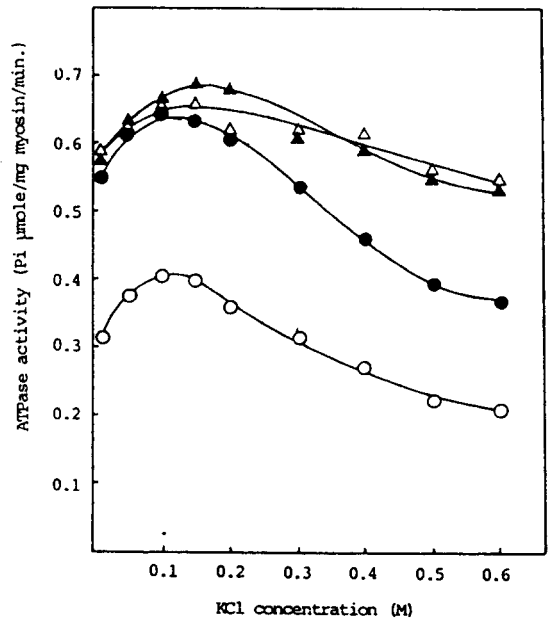
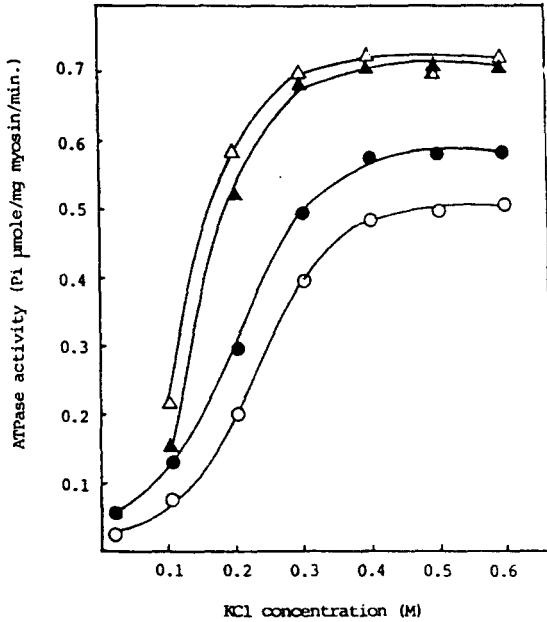


Fig. 1. Effect of KCl concentration on the Ca-activated ATPase activity of myosin from bovine and chicken muscle

Enz. assay: 25mM Tris-HCl buffer (pH8.0), imivi ATP, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.25mg/ml myosin

(●,▲): red fiber, (○,△): white fiber  
(●,○): bovine, (▲,△): chicken



**Fig. 2. Effect of KCl concentration on the EDTA-enhanced ATPase activity of myosin from bovine and chicken muscle**

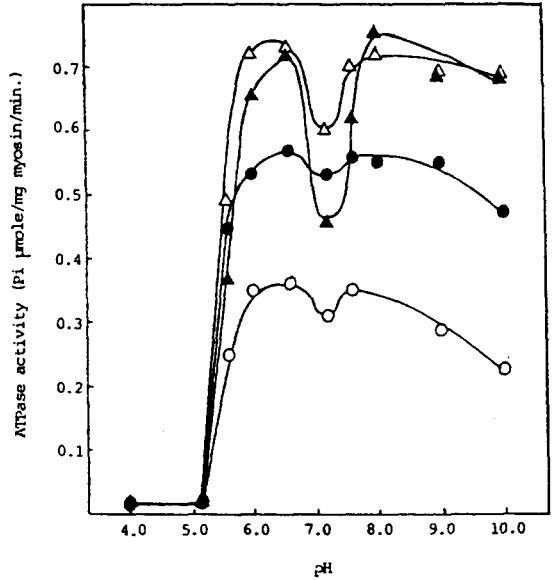
Enz. assay: 25mM Tris-HCl buffer (pH8.0), 1mM ATP  
1mM EDTA, 0.25mg/ml myosin  
(●,▲): red fiber, (○,△): white fiber  
(●,○): bovine, (▲,△): chicken

osin ATPase 활성에 대한 pH의 영향에서도 관찰되었다 (Fig. 3).

Goodno 등<sup>(31)</sup>은 pH 변화는 myosin분자의 LMM, s-1, s-2 영역의 상대적인 안정성을 조절할 수 있다고 하였다. 그러므로 pH의 변화에 대한 myosin의 ATPase 활성조사를 하므로써 myosin의 구조변화 및 동물의 종류에 따른 myosin의 물리적성질을 추적하는데 상당히 도움이 될 것으로 예상되었다.

산성 아미노산이 풍부한 myosin<sup>(32)</sup>의 ATPase 활성은 중성 pH 및 약알칼리pH에서 활성화된다는 사실은 일찍부터 알려지고 있다.

myosin ATPase 활성은 myosin의 활성자리에 있는 histidine 잔기의 imidazole 그룹과 cystein 잔기의 sulfhydryl 그룹 및 tyrosine의 phenolic OH 그룹에서 각각 양자가 해리되는 pH 6.0 부근과 pH8~10 부근에서 극대활성을 나타내며, pH 7.5부근에서 극소활성을 갖는 특징적인 biphasic response를 나타낸다고 하였다<sup>(33,34)</sup>. 이와 같이 pH에 따른 ATPase 활성의 변화는 정상상태에서의 myosin-ATP 복합체가 활성형과 불활성형의 2가지가 존재하기 때문인 것으로 알려져 있으며, 이때 actin이나 화학수식제가 존재하면 불활성형이 활성형으로 이동되어 biphasic response가 소실된다고 하였다<sup>(33)</sup>.



**Fig. 3. Effect of pH on the Ca-ATPase activity of myosin from bovine and chicken muscle**

Enz. assay: 0.1 M KCl, 1 mM ATP, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.25mg/ml myosin

Buffer System:

pH 3.0-5.0: 25mM Citrate buffer

pH 5.0-7.0: 25mM Tris-maleate buffer

pH 7.0-9.0: 25mM Tris-HCl buffer

pH 9.0-10.0: 25mM Carbonate-bicarbonate buffer

(●,▲): red fiber,

(○,△): white fiber

(●,○): bovine,

(▲,△): chicken

Fig. 3에 나타낸 바와 같이 닭의 myosin ATPase 활성의 경우 red muscle과 white muscle 사이에 거의 차이를 나타내지 않으나 양쪽이 특징적인 biphasic response를 보이고 있다. 그러나 소의 myosin ATPase 활성의 경우에는 red muscle과 white muscle 사이에 큰 차이를 나타내고 있으나 myosin이 갖는 특징으로 알려진 biphasic response가 오히려 전보<sup>(1)</sup>에 나타낸 actomyosin의 경우보다 상당히 미약하게 나타나고 있다.

이상과 같은 결과들은 소의 myosin 및 닭의 myosin의 종특성과 관련이 있을 것으로 추정되나 이에 대하여서는 보다 광범위하고 체계적인 분석이 필요할 것으로 생각되었다.

**Trypsin에 의한 myosin의 가수분해 속도의 비교**

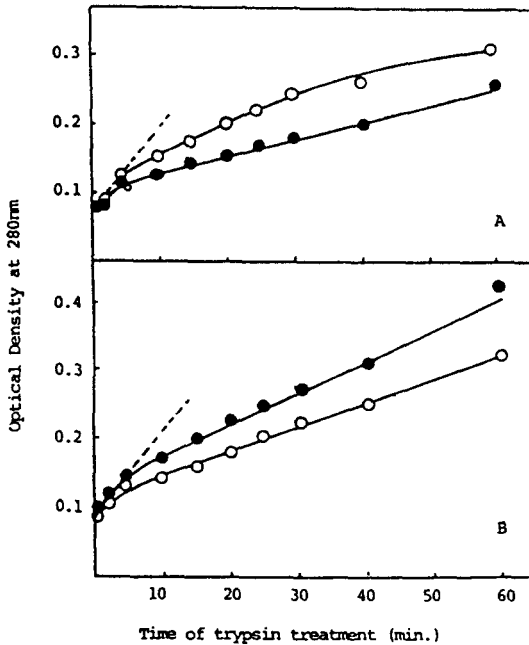
Myosin을 trypsin으로 한정가수분해 시키면 첫 단계에서는 분자량이 150,000인 light meromyosin(LMM)과 분자량이 350,000인 HMM으로 분리되며, 다음 단계에서는 이들이 다시 가수분해되어 segment 1과 2를 생성하는 것으로 알려지고 있다<sup>(35,36)</sup>.

HMM은 그 자체가 수용성단백질로서의 특성을 지니

고 ATPase로서의 활성자리와 actin 과의 결합자리를 가지며, LMM 은 분자의 용해성에 관여한다고 하였다.<sup>(25)</sup>

그런데, myosin 의 trypsin 가수분해 속도는 동물에 따라 차이를 보이므로 fiber type 에 따른 myosin 의 가수분해속도를 비교하였다 (Fig. 4).

Myosin 은 fiber type 에 관계없이 가수분해반응 시작 후 5분 동안에 빠른 속도로 가수분해되나, 그 후에는, 가수분해 속도는 낮으나 비교적 일정한 속도를 유지하고 있다(Fig. 4). 그런데 소의 myosin 의 경우에는 white muscle 쪽이 비단백태 질소 화합물의 생성량이 많은데



**Fig. 4. Effect of trypsin treatment on myosin from Bovine (A) and Chicken (B) muscle**  
Myosin were treated with trypsin (200;1, wt %) in the presence of 0.5M KCl-0.05M Tris-HCl buffer (pH 7.5) at 25°C.  
●—● : red fiber, ○—○ : white fiber

비하여, 닭의 myosin 은 red muscle 쪽이 비단백태 질소 화합물의 생성량이 많은 것으로 나타나고 있다.

Syrový<sup>(27)</sup>와 Wu 등<sup>(28)</sup>은 white fiber myosin 이 red fiber myosin 보다 trypsin 에 의한 가수분해속도가 높다고 발표하고 있으나, 본 연구에서의 결과와 반드시 일치하지는 않으며, 동물의 종류에 따라 차이가 있다고 해석되었다.

**기질친화성 및 탈인산속도의 비교**

동물의 종류 및 fiber type 에 따른 myosin 과 HMM 의 기질친화성 및 탈인산속도를 비교하기 위하여 Km 값과 Vmax 값을 Table 1 에 나타내었다.

Table 1 의 Km 값과 Vmax 값은 기질인 ATP 농도를  $1 \times 10^{-4} M$ 에서  $1 \times 10^{-3} M$  까지 변화시키면서 반응속도가 증가하는 범위에서 Lineweaver-Burk 방법에 의해 plot 하여 구하였다.

Vmax 값은, white muscle 에 있어서는 소의 근육보다 닭의 근육 그리고 red muscle 에 있어서는 닭보다 소의 쪽이 높게 나타나고 있다.

한편, 기질친화도에 있어서는, white muscle 는 닭보다 소의 쪽이, red muscle 은 소보다 닭의 쪽이 높은 기질친화성을 나타내고 있어 동물의 종류와 fiber type 에 따른 차이를 확연하게 보여주고 있다.

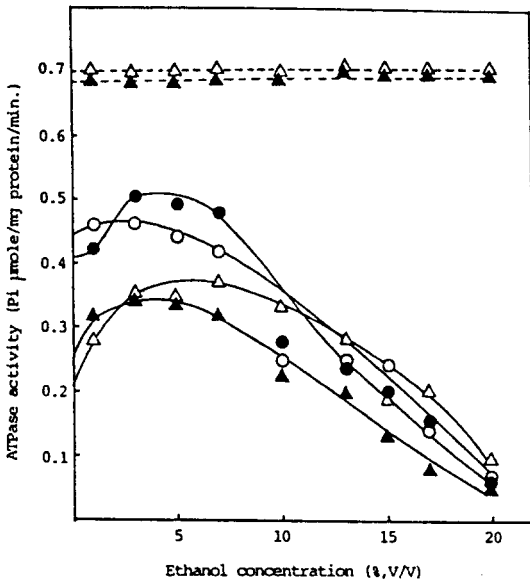
**유기용매처리에 따른 근원섬유단백질의 EDTA-ATPase 활성의 비교**

Tomomura 등<sup>(39)</sup>은 유기용매가 용액의 유전상수(dielectric constant)를 낮추어 myosin 의 분자형태를 변화시키며 따라서 ATPase 활성에 큰 영향을 미친다고 하였으며, Yang<sup>(40)</sup>은 ethanol 등의 유기용매는 이온강도 0.5 이상에서 myosin ATPase 활성에 큰 변화를 주었다고 하였다.

Fig. 5는 red muscle 과 white muscle 의 myosin과 HMM 의 ATPase 활성에 대한 ethanol 의 영향을 나타낸

**Table 1. Michaelis-Menten constants and maximum velocity of actomyosin, myosin and HMM from red and white muscle of bovine and chicken**

Myofibrillar protein	Vmax (M <sup>-1</sup> min.)		Km (M)	
	red	white	red	white
myosin	$3.72 \times 10^{-6}$	$1.12 \times 10^{-6}$	$4.86 \times 10^{-3}$	$1.01 \times 10^{-3}$
HMM	$8.94 \times 10^{-6}$	$3.28 \times 10^{-6}$	$12.43 \times 10^{-3}$	$4.35 \times 10^{-3}$
<b>Chicken</b>				
myosin	$3.07 \times 10^{-6}$	$2.30 \times 10^{-6}$	$3.81 \times 10^{-3}$	$2.78 \times 10^{-3}$
HMM	$4.22 \times 10^{-6}$	$20.51 \times 10^{-6}$	$4.88 \times 10^{-3}$	$28.71 \times 10^{-3}$



**Fig. 5. Effect of ethanol on the EDTA-ATPase activity of myosin and HMM from bovine and chicken muscle**

Enz. assay: 25mM Tris-HCl buffer (pH8.0), 0.5M KCl, 1 mM ATP, 1mM EDTA, 0.25mg/ml protein

(●,▲): red fiber, (O,△): white fiber  
 (●,○): bovine, (▲,△): chicken  
 — : myosin, ----: HMM

것으로, 소의 myosin 의 경우, red muscle myosin ATPase 활성은 ethanol 농도 7%까지 증가되며 3%에서 최대 증가효과를 나타내는데 비하여, white muscle myosin ATPase 활성은 거의 영향을 받고 있지 않다.

한편, 닭의 myosin 의 ATPase 활성은 white muscle 쪽이 고농도의 ethanol 즉, 보다 낮은 유전항수상태에서도 활성을 유지하고 있으며, HMM 의 ATPase 활성은 유전항수의 변화에 대하여 차이를 보이지 않고 있다.

이와같은 현상은 HMM 의 경우, myosin 분자의 side to side aggregation 에 관여하는 LMM 이 존재하지 않으므로 용액의 유전항수의 변화에 의해 HMM 의 분자 구조자체가 영향을 받지 않기 때문인 것으로 해석되었다.

이상의 결과들은 근원섬유단백질의 생화학적 특성에서 muscle fiber type 에 따라 차이가 있음을 확인시켜 주는 것으로 해석되었다.

**요 약**

소의 근육과 닭의 근육으로부터 각각 myosin 을 추출, 정제하고 그 생물활성의 특징을 fiber type 에 따라 비교하였다.

Myosin 의 Ca-ATPase 활성, EDTA-ATPase 활성

및 pH 에 따른 활성도의 변화는 소의 경우 fiber type 에 따라 뚜렷한 차이를 보였으나, 닭의 경우 그 차이가 관찰되지 않았다. 그러나 trypsin 에 의한 myosin 의 가수분해율에서 fiber type 에 따라 차이가 나타났다. 즉, 소의 myosin 에서는 white muscle 쪽이 가수분해율이 높았으나 닭의 myosin 에서는 red muscle 쪽이 가수분해율이 높았다. 또한 근원섬유단백질의 기질친화성 및 탈인산속도도 동물의 종류 및 fiber type 에 따른 차이를 확연하게 보이고 있었다. Ethanol 의 농도에 따른 myosin ATPase 활성의 증감효과는 동물의 종류 및 fiber type 에 따라 차이를 보이고 있으나 HMM ATPase 활성은 유전항수의 변화에 대하여 차이를 보이지 않았다.

**사 의**

본 연구는 근섬유의 특성에 관한 비교생화학적 연구의 제 2 보로 1983년도 하반기 한국과학재단연구비로 수행된 것이다. 저자들은 연구비를 지원하여 준 한국과학재단에 심심한 사의를 표하는 바이다.

**문 헌**

1. Yang, R., Shin, W.C., Jhin, H.S., Oh, D.W. and Kim, K.T.: *Korean J. Food Sci. Technol.*, Vol. 18, in Press (1986)
2. Offer, G.W.: *Biochem. Biophys. Acta.*, 77, 682 (1963)
3. Bowen, W.J. and Kerwin, T.B.: *J. Biol. Chem.*, 211, 237 (1954)
4. Friess, E.T.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 51, 17 (1954)
5. Chaplain, R.A.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 22, 248 (1966)
6. Chaplain, R.A.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 25, 514 (1966)
7. Tokuyama, H. and Tonomura, Y.: *J. Biochem.*, 62, 456 (1967)
8. Briskey, E.J. and Fukazawa, T.: *Advances in Food Reserch*, Vol. 19, Academic Press, New York, 279 (1971)
9. Szent-Gyorgyi, A.: *The Chemistry of Muscular Contraction*, 2nd Rev. Ed., Academic Press, New York (1951)
10. Morimoto, K. and Harrington, W.F.: *J. Mol. Biol.*, 77, 165 (1973)
11. Morimoto, K. and Harrington, W.F.: *J. Mol. Biol.*, 88, 693 (1974)
12. Watterson, D.M., Sharief, F. and Vanaman, T.C.: *J. Biol. Chem.*, 255 962 (1980)

13. Tufty, R.M. and Kretsinger, R.H.: *Science*, **187**, 167 (1975)
14. Mikawa, T., Nonomura, Y., Hirata, M. and Ebashi, S.: *J. Biochem.*, **84**, 1633 (1978)
15. Ishioroshi, M., Samejima, K. and Yasui, T.: *J. Food Sci.*, **47**, 114 (1981)
16. Ishioroshi, M., Samejima, K. and Yasui, T.: *Agric. Biol. Chem.*, **47**, 2807 (1983)
17. Samejima, K., Ishioroshi, M. and Yasui, T.: *Agric. Biol. Chem.*, **47**, 2373 (1983)
18. Samejima, K., Ishioroshi, M. and Yasui, T.: *J. Food Sci.*, **46**, 1412 (1981)
19. Samejima, K., Ishioroshi, M. and Yasui, T.: *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 535 (1982)
20. Yasui, T., Ishioroshi, M. and Samejima, K.: *J. Food Biochem.*, **4**, 61 (1982)
21. Yasui, T., Ishioroshi, M. and Samejima, K.: *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 1049 (1982)
22. Hamm, R. and Hofmann, K.: *Nature.*, **207**, 1269 (1965)
23. Perry, S.V.: *Biochem. Biophys. Acta.*, **8**, 499 (1952)
24. Mommaerts, W.F.H.M. and Perrish.: *J. Biol. Chem.*, **188**, 545 (1951)
25. Lowey, S. and Cphen, C.: *J. Mol. Biol.*, **4**, 293 (1962)
26. Fiske, C.H. and Subbarow, Y.: *J. Biol. Chem.*, **66**, 375 (1925)
27. Ozawa, I. and Maruyama, K.: *Scientific Paper of the College of General Education, Univ. of Tokyo*, **18**, 261 (1968)
28. Offer, G.W.: *Biochem. Biophys. Acta.*, **89**, 566 (1964)
29. Mühlard, A., Fabian, F. and Biro, N.A.: *Biochem. Biophys. Acta.*, **89**, 186 (1964)
30. Barany, M., Barany, K., Reckard, T. and Volpe, A.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **109** 185 (1965)
31. Goodno. C.C., Harris, T.A. and Swenson, C.A.: *Biochemistry*, **15**, 5157 (1976)
32. Samejima, K., Takahashi, K. and Yasui, T.: *Agric. Biol. Chem.*, **40**, 2455 (1976)
33. Kitakawa, S., Yoshimura, J. and Tonomura, Y.: *J. Biol. Chem.*, **902**, 236 (1961)
34. Bendall, J.: *Muscles, Molecules and Movement*, American Elsevier Pub. Co. Inc. p. 34 (1969)
35. Lowey, S., Slater, A.G. and Baker, H.: *J. Mol. Biol.*, **42**, 1 (1969)
36. Gergely, J., Gouvea, M.A. and Karibian, D.: *J. Biol. Chem.*, **212**, 165 (1955)
37. Syrovi, I.: *Experimentia*, **24**, 1108 (1968)
38. Chuen-Shang Chung Mu.: *Biochem.*, **8**, 39 (1969)
39. Tonomura, Y. and Tokura, S.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **95**, 229 (1961)
40. Yang, C.S.: M.D. Thesis, Yonsei Univ. (1978).

(1986년 2월 14일 접수)