

연체류의 근원섬유단백질에 관한 연구

신완철 · 송재철 · 김영호*

울산대학교 식품영양학과, *한국식품개발연구원

Studies on the Myofibrillar Proteins of Mollusca

Wan-Chul Shin, Jae-Chul Song and Young-Ho Kim*

Department of Food and Nutrition, Ulsan Univ.

*Korea Food Research Institute

Abstract

In order to compare and examine the general characteristics of myofibrillar proteins which is an important protein source as a food resource and relates directly with muscle contraction, we have extracted the myofibrillar proteins from squid and clam.

The ionic strength of myofibrillar proteins connected with Ca-ATPase activity, Mg-ATPase activity and EDTA-ATPase activity showed distinct differences between squid and clam. In the activity-pH curve, actomyosin of the clam had a weak biphasic response. In the low concentration of dioxane, myofibrillar proteins of the squid showed a sudden decrease in activity but myofibrillar proteins of the clam showed an increase in activity. Ethanol and methanol in low concentration caused myosin and HMM from the squid and clam to increase their activities. If we cause modification by NEM, under 10^{-6} M concentration, the activity was increased but above 10^{-5} M concentration, there was a sudden decrease in activity.

Key words : myofibrillar protein, mollusca, ATPase activity, actomyosin HMM, NEM

서 론

근원섬유단백질은 생체의 근수축기작과 단백질 식품의 구성에 중요한 역할을 담당하고 있는 염용성 단백질이다. 이러한 근원섬유단백질은 구조단백질인 동시에 ATP와의 작용을 통하여 화학적 에너지를 기계적 에너지로 전환시키는 기능단백질로서¹⁾ 포유류에 대한 연구들이 주로 보고되고 있다. 이와 같은 근원섬유단백질의 에너지 전환은 근원섬유를 구성하고 있는 조절단백질에 의하여 조절된다고 알려져 있으며^{2,3)}, 근원섬유단백질의 구성단백질로서 10여종이 분리·정제되어 생화학적, 단백질화학적 연구가 꾸준히 진행되고 있다.

한편, 연체류의 근원섬유단백질은 육상동물의 근원섬유단백질과는 달리 상대적으로 적은 에너지를 방출하면서도 오랫동안 근육을 수축시킬 수 있는 catch prop-

erty를 지니고 있는데 이는 육상동물의 근원섬유단백질에 존재하지 않는 thick filament의 90~95%를 차지하는 paramyosin이 myosin filament의 backbone에서 core를 형성하여 thin actin-containing filament와의 sliding이 일어날 때 작용하기 때문이라고 알려지고 있지만⁴⁻⁶⁾ 아직 완전하게 이해되고 있지 않다. 또한 연체류의 actin-myosin-ATP의 상호관계는 myosin-linked regulation 또는 dual regulation으로서 포유류와는 다른 근 수축기작을 보유하고 있는 것으로 알려져 있으나^{7,8)}, 앞으로 규명이 되어야 할 부분으로 남겨져 있다.

이러한 근원섬유단백질은 식품의 재료로서 육제품의 물성과 탄력성에 직접적인 영향을 미치는 것으로 알려지고 있으며, 이러한 연구들은 주로 소, 돼지와 같은 육상동물을 이용하여 진행하고 있다. 그러나 비교적 지방

함량이 낮고 단백질함량이 높아 그 소비량이 점차 증대되고 있는 수산물에 대한 연구는 부족한 실정이다. 그러므로 본 연구는 식품으로 이용되고 있는 연체류중 오징어와 대합을 선택하여 근원섬유단백질에 대한 생물활성을 비교, 조사하므로써 그 특성을 규명하는데 도움이 되 고자 하였다.

재료 및 방법

1. 재 료

오징어(Squid : *T. pacificus*)는 내장과 표피를 제거한 후 외투막을 chopping하여 사용하였으며, 대합(Clam : *M. lusoria*)은 껍질을 제거한 후 내전근을 모아 chopping하여 사용하였다.

2. Myofibrillar protein의 제조 방법

Actomyosin의 조제는 Matsumoto의 방법⁹⁾에 따라 조제하였으며, myosin의 조제는 Konno의 방법¹⁰⁾을 변형하여 조제하였다.

Heavymyomeromyosin(HMM)의 조제는 Lowey 등의 방법¹¹⁾을 변형하여 조제하였다. Konno의 방법을 변형하여 조제한 myosin 용액에 0.5M KCl-0.05M Tris-maleate buffer를 동량 첨가한 후 trypsin(wt%, 250:1) 1ml를 넣어 10℃에서 25분 동안 가수분해하였다. 가수분해는 2배의 trypsin inhibitor를 첨가하여서 종료시켰다. 가수분해시킨 용액을 4℃에서 24시간 동안 투석시킨 후 30,000×g에서 30분 동안 원심분리하였으며, 여기서 생성된 상등액을 gel chromatography함으로서 정제된 HMM을 얻었다. Gel chromatography는 Sephadex G-200(Column : 2.0×45.0cm)을 사용하였으며, 4℃에서 0.05M KCl-0.005M Tris-HCl buffer(pH 7.5)로써 시간당 20ml의 용출속도로 용출시켰다.

3. 단백질농도의 측정

단백질 농도는 Biuret방법에 의하여 측정되었으며, 검량선은 bovine serum albumin을 micro-Kjeldahl 법으로 분석하여 작성되었다.

4. ATPase 활성 측정

0.25mg/ml myofibrillar proteins, 10mM CaCl₂, 1mM MgCl₂ 혹은 1mM EDTA, 1mM ATP(Adenosine 5'-Triphosphate Disodium Grade I, Sigma Chemical Co.), 25mM Tris-HCl buffer(pH 8.0) 그리고 일정 염농도의 혼합액을 30℃에서 5분간 반응시켰

다. 반응은 최종농도 4%인 TCA를 첨가하여 ice bath 상에서 정지시켰다. ATPase의 활성은 1mg의 단백질에 의하여 1분 동안에 유리되는 무기인산(Pi)의 μ mole로 표시하였다.

5. NEM 처리시의 조건

2mg/ml의 단백질용액 0.5ml와 각 농도의 NEM용액 0.5ml를 혼합한 후 실온에서 20분간 방치시킨 다음 ATPase의 활성을 측정하였다.

결과 및 고찰

1. 근원섬유단백질의 활성에 대한 염농도의 영향

육상동물의 근수축·이완 및 사후강직의 분자론적 기전은 actin-myosin 상호작용에 관여하는 조절단백질과 그에 대한 ATP의 영향이라고 알려져 있으며^{12,13)}, 이러한 기작은 근원섬유내의 Ca 이온에 의해 활성화된다고 알려지고 있다^{13,14)}.

따라서 연체동물로부터 natural actomyosin, myosin 및 HMM을 추출하여 이온강도에 따른 Ca, Mg 그리고 EDTA-ATPase 활성을 측정하여 이미 알려져 있는 육상동물과의 차이를 비교하였으며 또한 연체동물간의 차이를 비교 검토하였다.

토끼 그리고 소와 같은 육상동물의 actomyosin ATPase 활성은 Mg에 의해서는 이온강도 0.03~0.05, Ca에 의해서는 0.1~0.15에서 최대활성을 나타내며 그 이상의 이온강도에서는 감소하는 경향을 나타내는 것으로 알려지고 있으며¹⁵⁾, 한편 EDTA의 경우에는 0.17M 이상의 염농도에서 actomyosin의 탈인산속도를 가속화하는 것으로 Bowen 등¹⁶⁾은 보고하고 있다.

Fig. 1에 나타난 오징어와 대합의 Ca-ATPase활성의 경우 최대 활성을 나타내는 이온강도와 활성의 크기에 차이를 나타내고 있으나 앞에서 언급한 육상동물의 Ca-ATPase 활성과 비슷한 경향을 보여주었다.

또한 Ca이온과 antagonistic effect를 나타내며¹⁷⁾, actomyosin type의 ATPase 활성을 증가시키는 Mg 이온에 의하면 오징어는 이온강도 0.3, 대합은 0.05에서 최대활성을 나타내고 그 이상의 이온강도에서 감소하는 경향을 나타내고 있다. Fig. 1에서 볼 수 있듯이 대합의 경우는 이온강도에 따른 ATPase 활성이 육상동물과 비슷한 경향을 나타내었으나, 오징어의 경우는 고이온강도에서도 뚜렷한 활성을 나타내 오징어 actomyosin의 활성이 0.15 이상의 이온강도에서 Mg 이온에 의하여 활성화된다는 Horie 등¹⁸⁾의 보고와 일치하는 현상으로 나타났다. 하지만 저이온강도에서 활성화되고 고

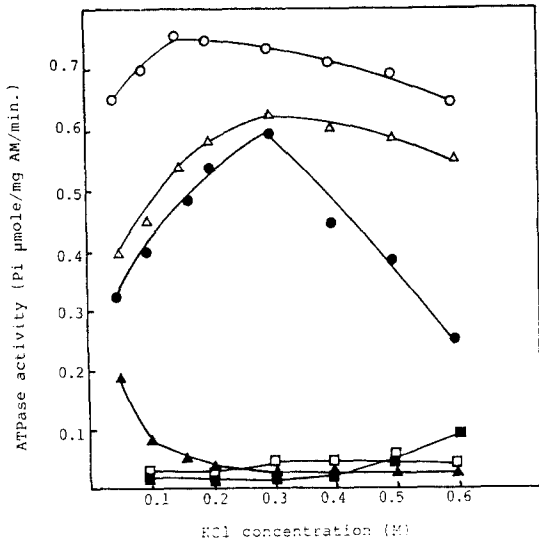


Fig. 1. Effect of KCl concentration on the Ca (○, ●), Mg(△, ▲) or EDTA(□, ■)-ATPase activity of actomyosin from Squid mantle(○, △, □) and Clam adductor(●, ▲, ■) muscle.
 Enz. assay : 25mM Tris-HCl buffer(pH 8.0), 1mM ATP, 10mM CaCl₂, 1mM EDTA, 1mM MgCl₂, 0.25mg/ml AM.

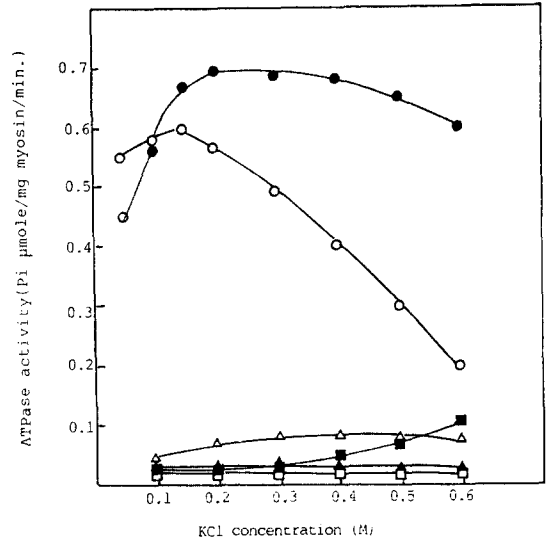


Fig. 2. Effect of KCl concentration on the Ca (○, ●), Mg(△, ▲) or EDTA(□, ■)-ATPase activity of myosin from Squid mantle(○, △, □) and Clam adductor(●, ▲, ■) muscle.
 Enz. assay : 25mM Tris-HCl buffer(pH 8.0), 1mM ATP, 10mM CaCl₂, 1mM EDTA, 1mM MgCl₂, 0.25mg/ml myosin.

이온강도에서 활성이 저해되는 대합의 경우와는 상반된 현상으로 나타났다.

또한 육상동물의 actomyosin은 고이온강도에서 myosin type으로 되어 EDTA에 의하여 활성화된다는 Bowen 등¹⁶⁾의 결과와는 달리 오징어는 이온강도에 관계없이 EDTA에 의한 활성화 현상이 나타나지 않았다.

이와 같은 결과로 보아 근섬유 구성단백질 내지는 actin-myosin 상호작용의 기작이 동물의 종류에 따라 다를 것으로 예상되었으며, 연체류들도 종류에 따라 ATPase 활성에 차이를 보일 것으로 생각되었다. 이러한 근원섬유단백질의 특성을 더욱 규명하기 위하여 오징어와 대합에서 추출한 myosin의 ATPase 활성을 Fig. 1에서와 같은 조건으로 측정하였다(Fig. 2).

Myosin의 경우 Ca-ATPase 활성은 이온강도에 따른 활성의 크기와 최대활성을 나타내는 이온강도에 있어서 조개와 오징어가 차이를 나타내었으나 육상동물의 일반적인 활성경향과 유사한 양상으로 나타났다. 이와 같은 현상은 이온강도에 관계없이 Mg에 의해서 활성이 저해되는 myosin Mg-ATPase 활성에서도 나타났다. 그러나 EDTA-ATPase의 경우 일반적으로 고농도에서 활성이 증가되는 육상동물과는 달리 실험 전체의 이온강도에서 저해되는 특이한 현상을 나타내고 있는데

이는 Tsuchiya¹⁹⁾의 보고와 일치하고 있다.

이러한 사실들을 좀 더 밀착하고 연체동물의 ATPase 활성이 육상동물과 같이 myosin의 머리부분이 관여하는가를 알기 위하여 조개의 myosin을 trypsin으로 한정가수분해하여 얻은 수용성인 HMM을 앞에서와 같은 조건으로 실험하였다(Fig. 3). Ca-ATPase 활성이 이온강도가 증가함에 따라 육상동물과 마찬가지로 분명하게 저해되는 현상을 나타내는 것으로 보아 myosin의 머리부분이 활성에 기여하는 것으로 판단된다. 하지만 Mg-ATPase 저이온강도에서 미약하나마 활성을 나타내는 현상을 보여주고 있어 이의 정확한 규명은 앞으로 더욱 연구가 필요한 것으로 판단된다.

이상과 같은 결과를 볼 때 같은 연체동물간의 근원섬유단백질의 생활활성에 있어서도 차이가 있을 것으로 판단된다.

2. 근원섬유단백질의 활성에 대한 pH의 영향

Myosin ATPase 활성은 histidine과 sulfhydryl group이 각각 이온화 상수를 갖는 pH 6.0 부근과 pH 10.0 부근에서 극대 활성을 나타내며 pH 7.5 부근에서 극소 활성을 갖는 biphasic response를 나타낸다고 한다²⁰⁾. 이와 같은 pH에 따른 ATPase 활성의 변화는 정

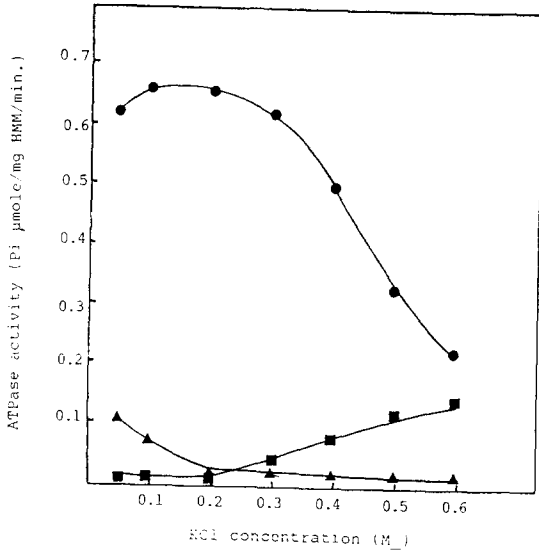


Fig. 3. Effect of KCl concentration on the Ca (●), Mg(▲) or EDTA(■)-ATPase activity of HMM from Clam adductor muscle.
 Enz. assay : 25mM Tris-HCl buffer(pH 8.0), 10mM CaCl₂, 1mM MgCl₂, 1mM EDTA, 0.25mg /ml HMM, 1mM ATP.

상상태에서 myosin-ATP complex가 활성형과 불활성형 두 가지가 존재하기 때문인 것으로 알려지고 있다. 만일 이 때 monoiodoacetamide나 actin이 존재하면 활성형 myosin-ATP complex가 형성되어 pH 7.5 부근에서의 저해현상이 없어지며 따라서 biphasic response가 소실된다고 한다²¹⁾.

pH에 따른 actomyosin, myosin, HMM ATPase 활성을 검토한 결과를 Fig. 4, 5 및 6에 나타내었다.

Fig. 4는 actomyosin ATPase 활성에 대한 pH의 영향을 나타낸 것으로 오징어는 Tonomura의 보고²¹⁾와 유사하였으나 대합은 pH 6.0까지 활성이 증가하다가 pH 6.6에서 약간의 감소를 보인 후 다시 활성화되어 pH 8.6에서 극대 활성을 나타내는 biphasic 현상을 보여주고 있다. Myosin ATPase 활성에 대한 pH의 영향(Fig. 5)에 있어서는 오징어는 pH 7.6에서 대합은 pH 7.2에서 극소 활성을 나타내는 특성적인 biphasic response를 보여주었다.

이와 같이 같은 연체류에서 추출한 actomyosin 및 myosin 일지라도 pH에 대한 영향이 틀리고 활성의 크기가 다르다는 것은 근수축기작을 담당하고 있는 근섬유 단백질의 특성에 차이가 있는 것으로 예상되었으며, 대합 actomyosin에서 나타난 shoulder현상은 더욱 연구가 필요하다고 본다.

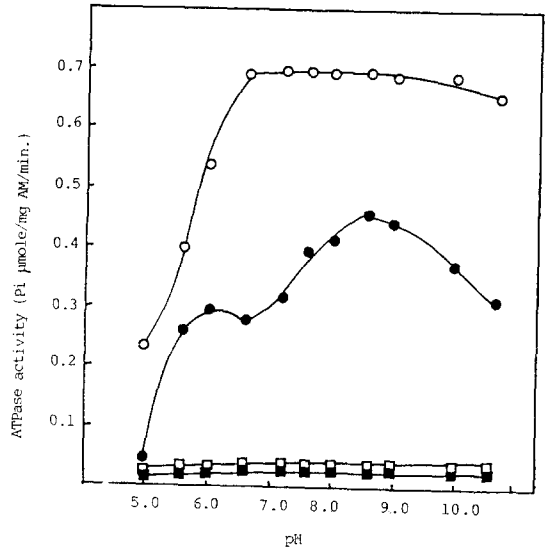


Fig. 4. Effect of pH on the Ca(○, ●) or EDTA(□, ■)-ATPase activity of actomyosin from Squid mantle(○, □) and Clam adductor(●, ■) muscle.
 Enz. assay : 0.125M KCl, 10mM CaCl₂, 1mM EDTA, 0.25mg /ml AM, 1mM ATP.
 Buffer system : pH 5.0~7.0 : 25mM Tris-maleate buffer
 pH 7.0~9.0 : 25mM Tris-HCl buffer
 pH 9.0~11.0 : Carbonate-bicarbonate buffer

한편, EDTA-ATPase 활성에 있어서 actomyosin은 오징어와 대합 모두 pH에 무관하게 활성이 저해되었으며, myosin의 경우에 있어서는 대합은 오징어와는 달리 알칼리 pH로 가면서 활성이 증가하는 현상을 보여주고 있다. 이러한 현상은 HMM의 ATPase 활성에서도 유사하게 나타났는데(Fig. 6) 이는 Fig. 1, 2, 3의 분석조건에서 활성이 나타나지 않았던 저이온강도에서 활성을 측정하였으므로 대합의 myosin은 오징어의 myosin과는 달리 알칼리 pH에서 구조적 변형을 일으켜 EDTA에 의한 저해작용이 소실되는 특이한 현상으로 예상되었으며, 이러한 현상은 actin에 의해 지배되는 것으로 보여진다.

HMM의 경우도 myosin과 마찬가지로 Ca에 의해 biphasic response를 보였으나 myosin에 비해 pH 안정성이 높았으며, 또한 극소 활성의 pH가 7.2에서 8.6으로 변화하였다. 이와 같은 현상은 HMM 조제시 myosin의 응집 성질을 나타내는 LMM 부분이 제거되므로써 기인되는 것으로 추정된다.

이상의 결과에서 볼 때 연체동물의 Ca-ATPase 활성에 대한 pH의존성이 포유동물과 비슷한 것으로 나타

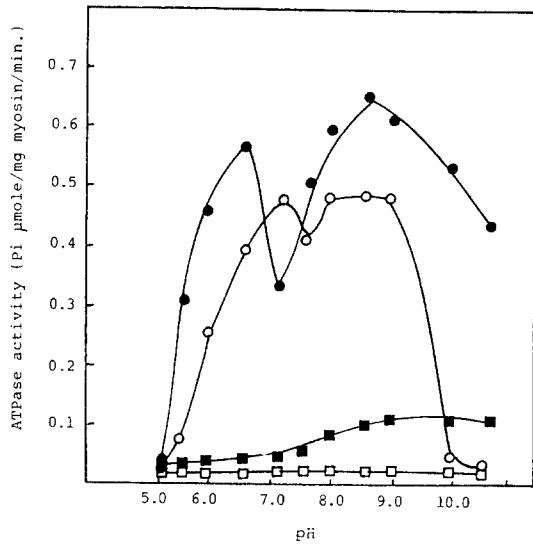


Fig. 5. Effect of pH on the Ca(○, ●) or EDTA(□, ■)-ATPase activity of myosin from Squid mantle(○, □) and Clam adductor(●, ■) muscle.
 Enz. assay : 0.125M KCl, 10mM CaCl₂, 1mM EDTA, 0.25mg/ml myosin, 1mM ATP.
 Buffer system : pH 5.0~7.0 : 25mM Tris-maleate buffer
 pH 7.0~9.0 : 25mM Tris-HCl buffer
 pH 9.0~11.0 : 25mM Carbonate-bicarbonate buffer

나 연체동물의 근원섬유단백질이 포유류와 유사한 것으로 예상되나, 대합의 경우 myosin 및 HMM의 EDTA-ATPase 활성이 저이온강도인데도 알칼리로 가면서 활성화되는 것으로 보아, 같은 연체동물일지라도 오징어와 대합의 근원섬유단백질 자체간의 구성 아미노산이나 근섬유간의 compactness에 차이가 있을 것으로 추정된다.

3. 근원섬유단백질의 활성에 대한 기질농도의 영향

근원섬유단백질의 종류에 따른 기질친화성과 반응속도를 비교하기 위하여 Lineweaver-Burk plot을 한 결과 Fig. 7 및 8과 같았으며, Fig. 7과 8에서 얻은 K_m값과 V_{max}값은 Table 1과 같았다. 오징어와 대합의 actomyosin과 myosin의 K_m치는 오징어가 각각 1.47×10⁻³mol/l, 3.13×10⁻³mol/l로 대합의 2.27×10⁻³mol/l, 4.17×10⁻³mol/l 보다 기질친화도가 높았으며 V_{max}는 오히려 대합이 오징어에 비해 높은 값을 나타냈다. 또한 오징어와 대합에 있어서 myosin이 actomyosin보다 높은 K_m치와 V_{max}를 나타내었으며, 대합에서는 myosin보다 HMM이 더 높은 K_m치와 V_{max}를 보여

Table 1. Michaelis-Menten constants and maximum velocity of actomyosin, myosin and HMM from Squid mantle and Clam adductor muscle.

Myofibrillar protein	V _{max} (μmol/min)		K _m (mol)	
	Squid	Clam	Squid	Clam
actomyosin	1.45	1.65	1.47×10 ⁻³	2.27×10 ⁻³
myosin	2.47	3.42	3.13×10 ⁻³	4.17×10 ⁻³
HMM	-	4.44	-	5.33×10 ⁻³

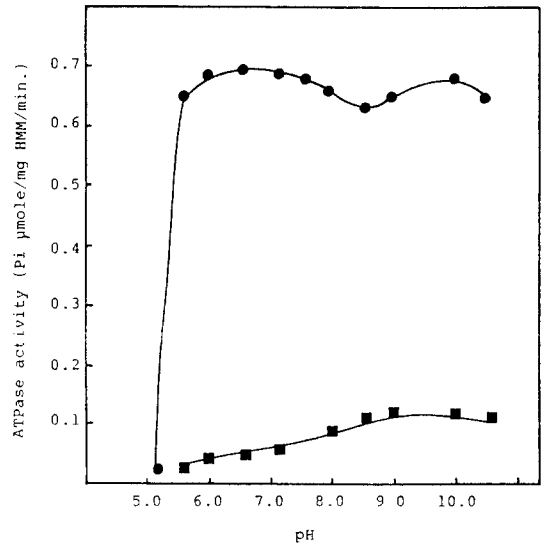


Fig. 6. Effect of pH on the Ca(●) or EDTA(■)-ATPase activity of HMM from Clam adductor muscle.
 Enz. assay : 0.125M KCl, 10mM CaCl₂, 1mM EDTA, 0.25mg/ml HMM, 1mM ATP.
 Buffer system : pH 5.0~7.0 : 25mM Tris-maleate buffer
 pH 7.0~9.0 : 25mM Tris-HCl buffer
 pH 9.0~11.0 : Carbonate-bicarbonate buffer

actin 또는 LMM이 효소의 활성부위에 영향을 주는 것으로 예상되며, 영향 정도도 동물간에 차이가 있는 것으로 추정되었다.

4. 근원섬유단백질의 활성에 대한 유기용매의 영향

Tomomura 등²¹⁾은 육상동물의 myosin 분자형태가 유기용매에 의하여 변화되며 그 결과 ATPase 활성이 영향을 받는다고 보고하였으며, Yang²²⁾은 에탄올에 의한 myosin ATPase 활성의 증감은 동물의 종류에 따라 큰 차이를 보인다고 하였다.

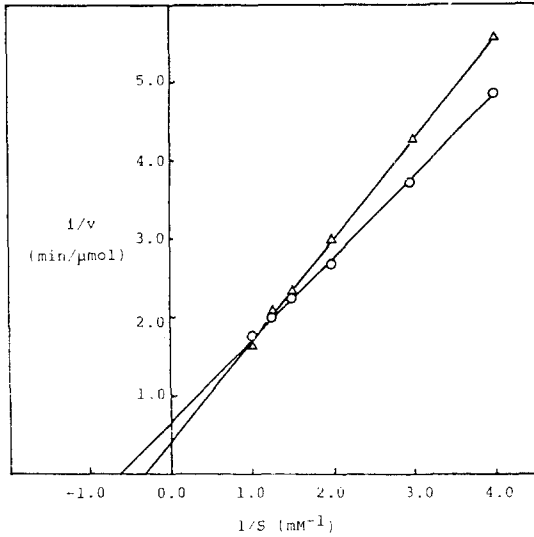


Fig. 7. Graphic representation of Lineweaver-Burk plot of actomyosin(○) and myosin(△)-ATPase activity from Squid mantle muscle.
 Enz. assay : 25mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) 0.125M KCl, 10mM CaCl₂, 0.25mg /ml protein

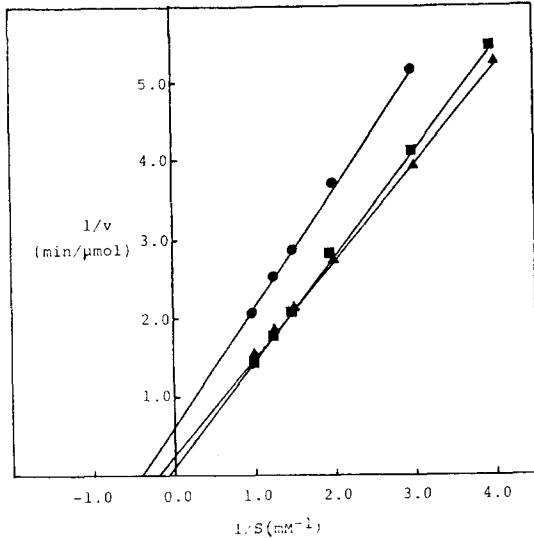


Fig. 8. Graphic representation of Lineweaver-Burk plot of actomyosin(●), myosin(▲) and HMM(■)-ATPase activity from Clam adductor muscle.
 Enz. assay : 25mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) 0.125M KCl, 10mM CaCl₂, 0.25mg /ml protein

연체류의 근원섬유단백질에 의한 유기용매의 영향을 알아보기 위해 오징어, 대합의 actomyosin, myosin, HMM의 ATPase 활성에 대한 에탄올, 메탄올, dioxan의 농도에 따른 영향을 검토하였다.

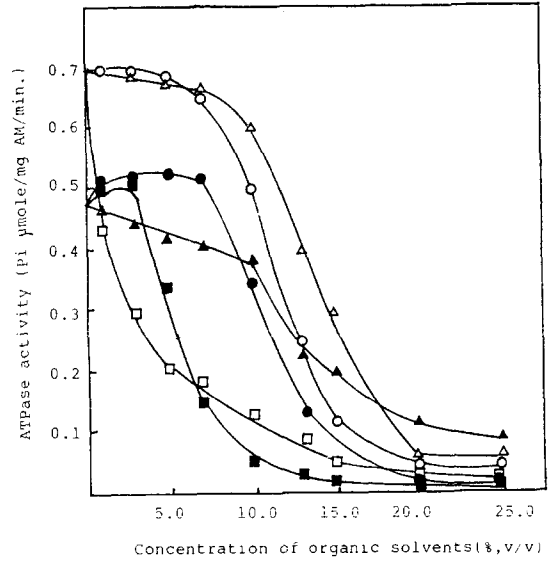


Fig. 9. Effect of ethanol(○, ●) methan(△, ▲) and dioxane(□, ■) on the Ca-ATPase activity of actomyosin from Squid mantle(○, △, □) and Clam adductor(●, ▲, ■) muscle.
 Enz. assay : 25mM Tris-HCl buffer (pH 8.0), 0.125M KCl, 10mM CaCl₂, 1mM ATP, 0.25mg /ml AM.

Fig. 9에서 볼 수 있는 바와 같이 오징어의 actomyosin ATPase 활성은 유기용매의 첨가에 의해 저해되어 dioxan의 경우 5% 농도에서도 70%의 활성이 상실되었으나, 대합은 오징어와는 달리 5% 에탄올, 3% dioxane에서 최대 활성을 나타내었다.

Fig. 10은 myosin에 대한 유기용매의 영향을 나타낸 것으로 오징어 myosin은 5%의 에탄올과 메탄올에서 최대 활성을 나타내었고 그 이상의 농도에서 저해현상을 보였으나 dioxan은 저농도에서도 저해를 일으켰다. 반면에 대합은 각 유기용매에 대하여 3%에서 최대 활성을 나타낸 후 농도가 감소함에 따라 활성이 감소하였다.

이와 같은 유기용매에 따른 myosin과 actomyosin의 활성을 비교하여 볼 때, 오징어 actomyosin과 myosin은 dioxan의 농도에 대해 상당히 민감한 저해반응을 나타냄을 알 수 있었으나, 대합의 경우는 저농도의 dioxan(3%)에서 활성화된 후 농도가 증가함에 따라 활성이 급격히 감소하는 특이한 양상을 보여 주었다. 또한 대합은 유기용매의 농도에 따른 활성추세가 actomyosin과 myosin이 비슷하였으나 오징어는 저농도의 유기용매에서 actomyosin과 myosin의 활성이 상반된 현상을 보이고 있었다. 이는 actin이 결합하고 있을 때 유

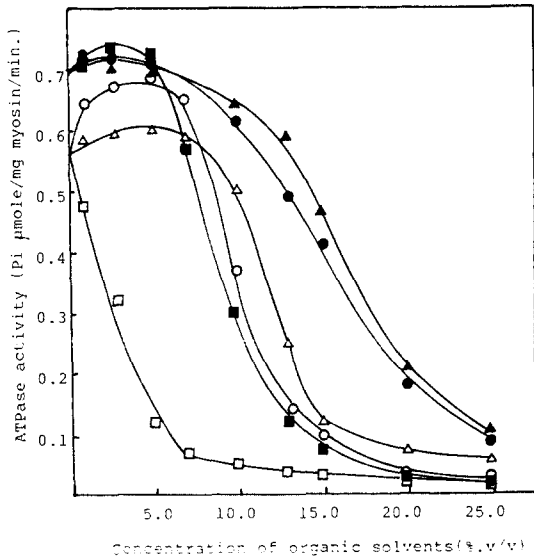


Fig. 10. Effect of ethanol(○, ●) methanol(△, ▲) and dioxane(□, ■) on the Ca-ATPase activity of myosin from Squid mantle(○, △, □) and Clam adductor(●, ▲, ■) muscle.
 Enz. assay : 25mM Tris-HCl buffer (pH 8.0), 0.125M KCl, 10mM CaCl₂, 1mM ATP, 0.25mg / ml myosin.

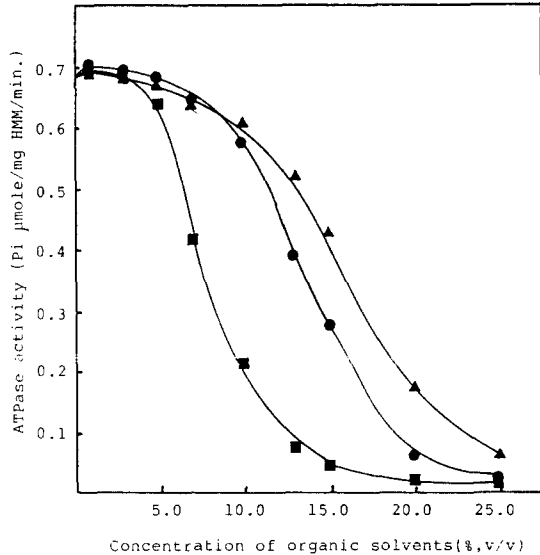


Fig. 11. Effect of ethanol(●) methanol(▲) and dioxane(■) on the Ca-ATPase activity of HMM from Clam adductor muscle.
 Enz. assay : 25mM Tris-HCl buffer(pH 8.0), 0.125M KCl, 10mM CaCl₂, 1mM ATP, 0.25mg / ml HMM.

기용매에 의한 유전항수의 변화를 오징어가 대합보다 더 예민하게 받기 때문인 것으로 예상된다.

Fig. 11은 대합 HMM의 활성에 대한 유기용매의 영향을 나타낸 것으로 Fig. 10의 결과와 비슷한 활성을 나타내고 있어 대합의 LMM은 유기용매의 영향을 받지 않는 것으로 예상되었다.

이와 같이 근원섬유단백질들이 유기용매의 종류에 따라 활성의 차이를 보이는 것은 각각의 유기용매가 용액에 끼치는 유전항수의 변화차와 근섬유간의 특성에 기인하는 것으로 추정된다.

5. 근원섬유단백질의 활성에 대한 NEM의 영향

Myosin에 NEM을 처리하여 myosin에 존재하는 SH₁기를 blocking하면 Ca-ATPase의 활성이 증가하나 두번째 필수 -SH기인 SH₂에 변형이 일어나면 활성이 손실된다고 한다. 이 때 myosin에 actin이 결합하게 되면 NEM에 의한 SH₁ group의 변형이 방지된다고 Barany 등²³⁾은 보고하고 있다.

Fig. 12는 오징어와 대합의 근원섬유단백질에 대한 NEM 농도의 영향을 조사한 것으로 오징어와 대합의 myosin은 10⁻⁶~10⁻⁷M 이하의 NEM 농도에서 modification되어 native myosin에 비해 활성의 증가가 일

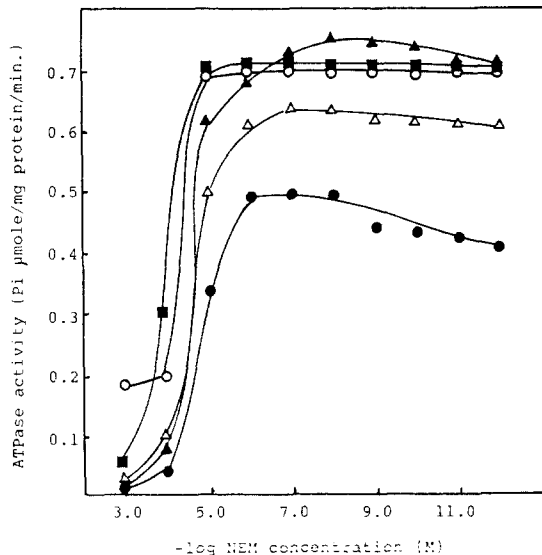


Fig. 12. Effect of NEM concentration on the Ca-ATPase activity of actomyosin(○, ●), myosin(△, ▲) and HMM(■) from Squid mantle(○, △) and Clam adductor(●, ▲, ■) muscle.
 Enz. assay : 25mM Tris-HCl buffer(pH 8.0), 0.125M KCl, 10mM CaCl₂, 1mM ATP, 0.25mg / ml protein.

어났으며 이와 같은 현상은 actomyosin에서도 유사하

게 나타났다. 그러나 오징어는 NEM-modified-myosin의 활성 증가가 NEM-modified-actomyosin의 활성 증가보다도 높게 나타나 Barany 등의 보고와 일치하였으나 대합은 오히려 반대되는 현상을 보였다. 또한 NEM 농도가 $10^{-6} \sim 10^{-5}M$ 이상이 되면 모든 근원섬유단백질은 활성이 급격히 떨어지고 있다. 이러한 현상은 NEM에 의하여 SH₁ group과 SH₂ group들의 분자 상호간의 결합에 기인된 것으로 추정할 수 있으며 대합과 오징어의 근원섬유단백질의 NEM-modified-enzyme의 활성에 차이가 나는 것은 동물의 근원섬유단백질간의 특성의 차이에 기인한 것으로 예상된다.

결론

식량자원으로서 중요한 단백질원이며 근수축에 직접 관여하는 근원섬유단백질을 오징어와 대합에서 각각 추출하여 연체류의 근원섬유단백질에 대한 일반적인 특성에 대하여 비교 검토하였다.

근원섬유단백질의 이온강도 의존성 및 Ca, Mg, EDTA의 효과는 오징어와 대합에서 그 차이가 뚜렷하였고, activity-pH curve에서 오징어 actomyosin의 Ca-ATPase 활성은 biphasic response가 소실된 반면 대합의 actomyosin은 미약한 biphasic response를 나타내 근원섬유단백질간에 차이를 나타냈다. 한편 오징어의 근원섬유단백질은 저농도의 dioxane에 의하여 급격한 활성의 감소를 나타냈으나 대합은 증가현상을 나타내었으며, 에탄올과 메탄올의 영향에 대해서는 오징어와 대합의 myosin 및 HMM 모두 저농도에서 활성을 증가시켜 유기용매에 따라 서로 다른 추세를 나타내었다. 또한 근원섬유단백질을 NEM으로 modification시켰을 때 오징어와 대합의 근원섬유단백질간의 ATPase 활성에 차이를 나타냈지만 $10^{-5}M$ 이하의 NEM 농도에서는 활성의 증가를 일으켰으며 10^{-5} 이상의 농도에서는 활성의 급격한 소실을 나타냈다. 따라서 동물의 근원섬유단백질의 생화학적 특성간에 차이가 있을 것으로 추정되며 이들의 특성의 차이에 따라 육가공품에 있어서도 큰 영향을 줄 것으로 추정되나 이에 대한 연구는 앞으로도 더욱 지속되어야 할 것이다.

요약

근원섬유단백질의 이온강도에 따른 Ca-ATPase 활성, Mg-ATPase 활성 및 EDTA-ATPase 활성은 오징어와 대합에서 그 차이점이 뚜렷하였으며, activity-pH curve에서 오징어 actomyosin의 Ca-ATPase

활성은 biphasic response가 소실되었고 대합의 actomyosin은 미약한 biphasic response가 나타났다. 또한 저농도의 dioxane에 의하여 오징어의 근원섬유단백질은 급격한 활성의 감소를 보였으나 대합의 근원섬유단백질은 활성이 증가되었다. 그리고 에탄올과 메탄올은 오징어와 대합의 myosin 및 HMM에 대하여 저농도에서 활성을 증가시켰다. 한편 NEM으로 근원섬유단백질을 modification시키면 $10^{-6}M$ 이하의 NEM 농도에서는 활성이 증가되었으나 $10^{-5}M$ 이상의 농도가 되면 활성의 급격한 감소가 나타났다.

참고문헌

- Pollard, T. D. and Copper, C. A. : Actin and actin-binding proteins : A critical evaluation of mechanisms and functions, *Ann. Rev. Biochem.*, **55**, 987 (1986).
- Ebashi, S., Kodama, A. and Ebashi, F., Troponin, I. : Preparation and physiological function, *J. Biochem.*, **64**, 465 (1968).
- Schaub, M. C. and Perry, S. V. : The regulatory proteins of the myofibril : separation and biological activity of the components of inhibitory factor preparations, *Biochem. J.*, **127**, 295 (1972).
- Baguet, F. and Gillis, J. M. : *J. Physiol.*, **198**, 127 (1968).
- Squire, J. : The structural basis of muscular contraction, Plenum Press, New York and London, p418 (1981).
- Elloit, A. and Bennet, P. M. : Molecular organization of paramyosin in the care of molluscan thick filament, *J. Mol. Biol.*, **176**, 477 (1984).
- Kendrick-Jones, J., Szentkiralyi, E. M. and Szent-Gyorgyi, A. G. : Regulatory light chains in myosin, *J. Mol. Biol.*, **104**, 747 (1976).
- Bagshaw, C. R. and Kendrick-Jones, J. : Characterization of homologous divalent metal binding site of vertebrate and molluscan myosins using electron paramagnetic resonance spectroscopy, *J. Mol. Biol.*, **130**, 317 (1979).
- Matsumoto, J. J. : On AM of squid muscle from salt-extract : Preparation of AM, *Bull. Japan Soc. Sci. Fish.*, **24**, 125 (1958).
- Konno, K. : Two Ca regulation system in speed (*Onmastrephe sloani pacificus*) muscle, *J. Biochem.*, **84**, 1431 (1978).
- Lowey, S. and Cohen, C. : Studies on the structure of myosin, *J. Mol. Biol.*, **4**, 293 (1962).
- Yang, R., Okitani, A. and Fugimaki, M. : Postmortem changes in regulatory proteins of rabbit muscle, *Agri. Biol. Chem.*, **42**, 555 (1978).
- Gergely, J. : In "Physiology and Biochemistry of Muscle as a Food" (E. J. Briskey, R. G. Cassens and B. B. Marsh, eds.) 2nd. ed. p. 349, Univ. of Wisconsin Press, Madison, Wisconsin (1970).
- Hanna, B. and Edward, D. K. : Regulation of class

- I and class II myosins by heavy chain phosphorylation, *J. Biol. Chem.*, 271, 18983 (1996).
15. Maruyama, K. and Ishikawa, Y. : Effect of Mg and Ca on the ATPase activity of AM at low ionic strength, *Biochem. Biophys. Acta.*, 77, 681 (1963).
 16. Bowen, W. J. and Kerwin, T. D. : A study on the effect of EDTA on myosin ATPase, *J. Biol. Chem.*, 211, 237 (1954).
 17. Muller, H. : Characterization of the molecular region containing the active sites of myosin, *J. Biol. Chem.*, 240, 386 (1965).
 18. Horie, N., Tsuchiya, T. and Matsumoto, J. J. : Studies on ATPase activity of AM of squid mantle muscle, *Bull. Japan Soc. Sci. Fish.*, 41, 1039 (1975).
 19. Tsuchiya, T., Yamada, N., Mori, H. and Matsumoto, J. J. : Isolation, purification and structure of carp myosin HMM and LMM, *Bull. Japan Soc. Sci. Fish.*, 44, 203 (1978).
 20. Kitagawa, S., Yoshimura, J. and Tonomura, Y. : On the active site of myosin A-ATPase ; II. Properties on the trinitrophenyl enzyme and the enzyme free from divalent cations, *J. Biol. Chem.*, 236, 902 (1961).
 21. Tonomura, Y. and Tokura, S. : *Arch. Biochem. Biophys.*, 95, 229 (1961).
 22. Yang, C. H. : Studies on the biological activity of myosin, M. D. Thesis, Yonsei Univ., (1978).
 23. Barany, M., Bailin, G. and Barany, K. : Reaction of myosin with 1-fluoro-2,4-dinitrobenzen at low ionic strength, *J. Biol. Chem.*, 244, 648 (1969).

(1997년 4월 10일 접수)