

## Ca<sup>2+</sup>-ATPase 3차원 결정의 Lamellar면 구조분석

정 강 원

경상대학교 자연과학대학 생화학과

### Structural Analysis of Lamellar Plane in Three-Dimensional Crystal of Ca<sup>2+</sup>-ATPase

Gang-Won Cheong

Department of Biochemistry Gyeongsang National University  
900 Gazwa-Dong, Chinju, 660-701, Korea

(Received February 20, 1997)

#### ABSTRACT

Cylinder-like crystals of Ca<sup>2+</sup>-ATPase provide views parallel to the lamellar plane, from which parameters of lamellar stacking can be directly measured. These parameters were measured using different preparation methods. Assuming that molecular packing is the same, data from lamellar plane could supplement those obtained by tilting large, thin plate-like crystals. However, base on data obtained by electron microscopy and x-ray powder patterns, the plate-like crystal may have another scheme for stacking the lamellar. The projection map (h,0,l) from cylinder-like crystals using cryoelectron microscopy suggest the lamellar spacing can be variable.

**Key words** : Ca<sup>2+</sup>-ATPase, Cryoelectron microscopy, X-ray, Negative Stain, Image Analysis

#### 서 론

Ca<sup>2+</sup>-ATPase는 Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase와 H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase와 함께 P-type 이온 펌프에 포함된다 (Green, 1992; Stokes & Nakamoto, 1994). Ca<sup>2+</sup>-ATPase에 대해서 반응속도, ligand binding과 amino acid sequence 등 광범위하게 연구가 되어져 있다 (Bigelow & Inesi, 1992; Andersen & Vilsen, 1994). Ca<sup>2+</sup>-ATPase은 sarcoplasmic reticulum

(SR)로부터 형태가 다른 결정을 형성할 수 있다. 먼저 튜브형태의 결정은 native SR membrane에서 lanthanides (Dux *et al.*, 1985)나 vanadate (Dux & Martonosi, 1983)을 포함하는 용액에서 형성되어 진다. 이 결정을 negative로 착색후 얻은 약 25~30Å 분해능의 구조에서는 cytoplasmic head의 형태를 보고하였다 (Castellani *et al.*, 1985; Taylor *et al.*, 1986). Frozen hydrated 된 시료로 얻은 14Å 분해능 구조에서는 분자의 transmembrane과 luminal 부분을 보고 (Toyoshima *et al.*, 1993) 하였다.

다른 형태의 결정 (Dux *et al.*, 1987; Pikula *et al.*, 1988)은 고농도의  $\text{Ca}^{2+}$  과 detergent속에서 C2의 space group (Taylor *et al.*, 1988; Stokes & Green, 1990b)를 가지는 3차원 결정으로 성장한다. 이 결정은 lamella들의 stacking으로 구성되어 있으며, 각 lamella는 lipid와 detergent (~1 : 1의 질량비)의 bilayer에  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 분자들이 양쪽 면에서 돌출되어 있다 (Stokes & Green, 1990b). Detergent-to-lipid 비율에 따라 이 결정은 다른 형태를 보여준다. 높은 detergent-to-lipid 비율에서는 많은 lamella를 포함하는 적고 실린더 모양의 결정(실린더 형태, **ac** 평면 관찰)을 생성하는 반면, 낮은 비율에서는 적은 lamella층(3~10)을 가진 넓은(1~5  $\mu\text{m}$ ) 평면모양의 결정(평면형태, **ab** 평면 관찰)을 형성한다. 이 결정(평면형태 결정)으로 고분해능의 image (6 $\text{\AA}$ , Stokes & Green, 1990a)와 4 $\text{\AA}$ 의 electron diffraction (Shi *et al.*, 1995)이 보고된 바 있다.

평면형태의 결정은  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase의 고분해능의 3차원 구조를 연구하기에 충분한 크기를 가진다. 얇은 3차원 결정의 3차원 구조는 2차원 결정과 유사한 방법 (Amos *et al.*, 1982)으로 재구성할 수 있다. 그러나, 평면형태 결정의 tilting자료를 3차원 data set에서 3차원 구조를 재구성할 경우, Fourier space에서 2차원 결정에서 얻어지는 2차원 lattice-line 보다 3차원 lattice의 reflection들이 존재하게 된다. 주어진 tilt각도와 축에서 특정 reflection들의 (h, k, l) index들을 알기 위해서, unit cell의 정확한 기하학 즉, unit cell의 크기와 unit cell간의 각도를 알아야 한다. 실린더 형태 결정의 image에서 직접적으로 **a**, **c**와  $\beta$ 를 구할 수 있다. 만약 평면 형태와 실린더 형태 결정의 packing모델이 동일하다면, 전자현미경의 물리적 제한으로 60° 이상 단순 tilting을 시킬 수 없으므로, 평면형태 결정에서 lamellar축(**c**)방향으로 얻을 수 없는 data를 실린더 형태의 결정으로 구할 수 있다. 이와 같은 data는 전형적으로 tilting으로 재구성하는 구조의 문제점 소위 missing corn 문제 해결로 (Unger & Schertler, 1995) lamellar 평면으로 고분해능의 3차원 구조를 얻을 수 있을 것이다.

## 재료 및 방법

### 1. $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase의 정제와 결정화

Eletr와 Inesi (1972)의 방법에 따라 sarcoplasmic reticulum을 토끼의 다리근육에서 분리한 후,  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase를 affinity chromatography로 정제하였다.  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase의 결정화는 Stokes와 Green (1990b)의 방법에 따라 microanalysis cell에서 수행하였다. 간단히 요약하면 아래와 같다. 2 mg/ml  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, 1 mg/ml C12E8, 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM  $\text{CaCl}_2$ , 10 mM MOPS pH 7과 4 mM ADP가 포함된 용액에 1~3 mg/ml egg yolk phosphatidylcholine을 첨가하였다. 이 용액을 20% glycerol, 100 mM KCl, 10 mM  $\text{CaCl}_2$ , 3 mM  $\text{MgCl}_2$ , 20 mM MES pH 6.0, 1 mM  $\text{NaN}_3$ , 5 mM DTT가 포함된 crystallization buffer에 대해 4°C에서 dialysis를 했으며, 약 1~4 주후 결정의 생성을 관찰할 수 있었다. lipid의 양에 따라 평면판(plate) 또는 실린더판(cylinder) 결정을 얻었다.

### 2. 전자현미경

Frozen hydrated specimens (cryoelectron microscopy)는 실린더판  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 결정이 포함된 용액을 holey carbon film을 입힌 grid (Toyoshima, 1989)에 흡착시킨 후, grid의 뒤쪽 면에서 여과지로 상등액을 조심스럽게 제거한 후, 곧 grid를 ethane slush에서 냉동시켰다. 냉동된 grid를 액체질소속에서 벗어남이 없이 cryoholder (Gatan)로 옮긴 후 -175°C에서 Philips 전자현미경 400T로 관찰하였다. image들을 다른 두 defocus 값(800 nm와 1.6  $\mu\text{m}$ )으로 최소한의 electron doses 값(5~10 electrons/ $\text{\AA}$ , 각 image)으로 Kodak SO163필름에 기록하였다.

contrast를 높이기 위해서 실린더판  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 결정이 포함된 용액을 glucose (2%)와 섞은후(1 : 1), holey carbon film을 입힌 gride에 흡착시켰다. 여과지로 상등액을 조심스럽게 제거한 후, uranyl acetate 용액(1%)으로 두 번 씻은 후, 두 가지의 다른 방법으로 시료를 준비하였다. 첫 번째로, ethane slush에서 급속 냉동시킨 후, frozen hydrated speci-

mens와 같이 -175°C에서 전자현미경을 관찰하였다 (gluc, stain, freezing), 두 번째로, 공기 중에서 건조시킨 후, 실온에서 전자현미경을 관찰하였다 (gluc, stain, air dried). 또, 실린드폴 Ca<sup>2+</sup>-ATPase 결정을 1% uranyl acetate 용액 (0.01% glucose 포함)으로 착색시킨 후, 실온에서 전자현미경을 관찰하였다 (Uac, c. gluc, air dried).

### 3. image analysis

Optical diffraction을 근거로 전자현미경사진을 선택하여 20 μm 간격(실제 시료에 대해 4.3Å)으로 계수화(digitize)하였다. MRC Program (Henderson *et al.*, 1986)을 이용하여 image analysis를 하였다. Fourier data들의 common phase origin은 ORIG-TILT 프로그램을 이용하여 조정하였으며 이때 IQ값이 2 보다 낮은(S/N=8.2) reflection을 이용하였다. Figure of merit(FOM)은 각 vector들의 합에서 얻었고, 이것으로 phase error (cos<sup>-1</sup>(FOM))의 값을 얻었다. Symmetry-related phase residuals은  $\sum |F_i| |\psi_i - \psi_{sym}| / \sum |F_i|$ 로 계산하였다. 여기서, F<sub>i</sub>는 amplitude,  $\psi_i$ 는 phase origin을 조정한 후 각각의 image의 reflection들의 phase,  $\psi_{sym}$ 은 symmetry-constrained phase을 나타내었다.

### 4. x-ray diffraction

실린드폴 결정과 평면형태 결정생성후 전자현미경으로 관찰한 다음 3가지의 다른 방법으로 시료를 준비하여 low angle x-ray diffraction을 하였다. 첫 번째 방법은 capillary에서 자연적 침전법 즉 실린드형태 또는 평면형태 결정을 다른 어떤 조작도 하지 않은 채 1 mm glas capillary에 옮겨 자연적으로 침전물이 형성되게 하였다. 약 2~4주후 capillary 속에서 결정의 침전물이 생겼으며, 여분의 용액을 제거한 후, 이 capillary를 wax로 봉하여 x-ray diffraction에 이용하였다. 두 번째 방법은 capillary 원심분리를 이용한 방법으로 시료를 1 mm glass capillary에 옮긴 후 800xg로 40분간 원심분리후 침전물을 얻었다. 세 번째 방법은 시료를 11,000xg로 7시간 동안 원심분리후 침전물을 얻었다. 이상의 3가지방법 모두 4°C에서 수행하였다. Diffraction은 Rigaku RU-2000

(Rigaku/USA)로 CuK<sub>α</sub> x-ray를 12~60시간동안 CEA reflex film에 감광하여 얻었다. Helium-filled beam tunnel들을 background scatter를 감소시키는데 사용하였고 결정과 film간의 거리는 약 480 mm로 resolution의 범위는 210~50Å이다.

## 결과 및 고찰

### 1. 전자현미경

lamellar평면에 대한 unit cell parameter를 얻기 위해서 실린드형태의 Ca<sup>2+</sup>-ATPase 결정을 4가지의 다른 방법으로 시료준비를 한후 전자현미경으로 관찰한 사진을 그림 1에 나타내었다. 실린드형태의 Ca<sup>2+</sup>-ATPase결정은 unit cell의 c축이 specimen support에 평행되게 놓여져 있다. 그러므로 lamellar의 stacking을 직접적으로 볼 수 있다. 즉, unit cell의 a, c와 이 unit cell축 간의 각도(β)를 image로 부터 직접 구할 수 있다. 용액 속에서 단백질결정의 고찰 즉, 단백질결정속에 포함된 물분자의 유지로 자연의 상태에서 구조를 고찰(Dubochet *et al.*, 1987)하기 위해서, Ca<sup>2+</sup>-ATPase 결정을 빠른 냉동(재료 및 방법 참조)시킨 후 초저온(-175°C)에서 전자현미경으로 관찰하는 소위 cryoelectron microscopy와 low-dose 기술로서 관찰한 시료의 일반적인 전자현미경사진을 그림(1-a)에서 나타내었다. 전자현미경사진에서 lamellar stacking면 즉, a와 c를 뚜렷이 관찰할 수 있고, 전자현미경사진에서 보여주는 image의 optical diffraction에서 일반적으로 20Å resolution spot를 관찰할 수 있었다. Frozen hydrated된 시료의 contrast를 높이기 위해서, 시료를 glucose와 uranyl acetate로 착색한 후, 초저온(-175°C)에서 전자현미경한 사진을 그림(1-b)에 나타내었다. 그림(1-c)은 glucose와 uranyl acetate로 착색된 Ca<sup>2+</sup>-ATPase 결정을 실온에서 전자현미경한 사진이다. uranyl acetate로 Ca<sup>2+</sup>-ATPase 결정을 착색한 후, 실온에서 관찰한 전자현미경 사진을 그림(1-d)에서 나타내었다.

4가지의 다른 방법으로 전자현미경한 사진에서 Ca<sup>2+</sup>-ATPase 실린드형태 결정의 unit cell parameter 값들을 구하기 위해서 fourier transform 하였다. 표 1에서 4가지의 다른 방법으로 얻은 parame-

ter들의 값을 나타내었다.  $c$ 의 값이 frozen hydrated 된 시료와 air dried된 시료에서 큰 차이(약  $20\text{\AA}$ )를 보여준다. 특히 실온에서 전자현미경을 관찰한 경우 큰 표준편차를 보여준다. Baker 등(1985)은 gap junction에 대해 여러 종류의 negative stain으로 착색한 후, 실온에서 전자현미경적 고찰에서 lattice constant의 차이( $84.0\sim 77.4\text{\AA}$ )와 resolution의 차이를 보고한 바 있다. 또한 gap junction의 홀(pore)은 음이온적 stain으로 완전히 착색되지 않으나, 양이온적 stain으로는 완전히 착색되어지는 결과로부터 channel이 양이온으로 하전된(positively charged) 그룹으로 구성되어져 있음을 제안한 바 있다. 또, Woodcock와 Baumeister(1990)는 archaeobacteria인 *Clostridium acetium*의 S-layer 단백질결정을 다른 종류의 negative stain 즉, 양이온(uranyl acetate)과 음이온(sodium phosphotungstate, methylamine tungstate, ammonium molybdate)으로 구조의 변화를 관찰하였다. 단위격자간의 거리는  $121\sim 116\text{\AA}$ 으로 약 4%의 차이를 보고한 바 있다. 이와 같은 구조의 변화를 먼저 stain과 단백질과의 관계에 있다고 생각할 수 있다. 즉, stain물질이 시료를 완전하게 착색시키지 못하는 경우 소위 stain effect(Kiselev *et al.*, 1990)로 생각할 수 있다. Gaelser 등(1992)은 전자현미경사용을 위한 시료준비과정중 용액의 표면 즉, 용액과 공기가 맞나는 경계 점에 시료(단백질 결정 등)가 놓이게 될 경우 용액의 표면장력 등에 의해서 단백질결정의 구조가 변형될 수 있음을 제안한 바 있다.  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 실린드형태의 결정을 stain으로 착색한 후, 상온에서 관찰한 경우 큰 표준편차를 보여주는 것도 stain effect와 외부의 힘 즉, 표면장력 등으로 설명할 수 있다. 또 앞의 예(Gap junction, S-layer)보다 큰 변화를 보여주는 것은 결정의 형태로 보충 설명할 수 있다. Gap junction과 S-layer들은 매우안정한 2차원 결정이나, 실린드형태의  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase는 3차원결정으로 lamella면(ac 평면)이 grid에 수직으로 놓이게 되어 외부의 적은 변화(착색후 내부결정 물분자와 용액의 건조로 인한 수축; 아래부분 참조)에도 lamella면간의 거리(즉,  $c$  spacing)가 쉽게 변화됨을 생각할 수 있다. 또한, 큰 표준편차로부터  $c$ -spacing간의 결합이 매우 불안정함도 추정할

**Table 1.** lattice space ( $c$ ) and angle ( $\beta^*$ ) between  $a^*$  and  $c^*$  of the cylinder-like crystals using different preparation methods.

preparation	$c(\text{\AA})$	$a/2(\text{\AA})$	$b^*(\text{deg.})$	$a/c$
frozen hydrated	$184.7\pm 1.5$	$84.4\pm 0.4$	$85.32\pm 0.7$	0.457
gluc, stain, freezing <sup>1)</sup>	$179.0\pm 2.0$	$82.1\pm 1.3$	$88.38\pm 1.0$	0.459
gluc, stain, air dried <sup>2)</sup>	$164.6\pm 7.9$	$79.9\pm 2.8$	$88.17\pm 1.1$	0.48
Uac. c. gluc, air dried <sup>3)</sup>	$176.3\pm 6.8$	$80.8\pm 2.6$	$87.78\pm 1.0$	0.458

<sup>1)</sup> see text, <sup>2)</sup> see text, <sup>3)</sup> see text

수 있다(averaged projection map부분 참조).

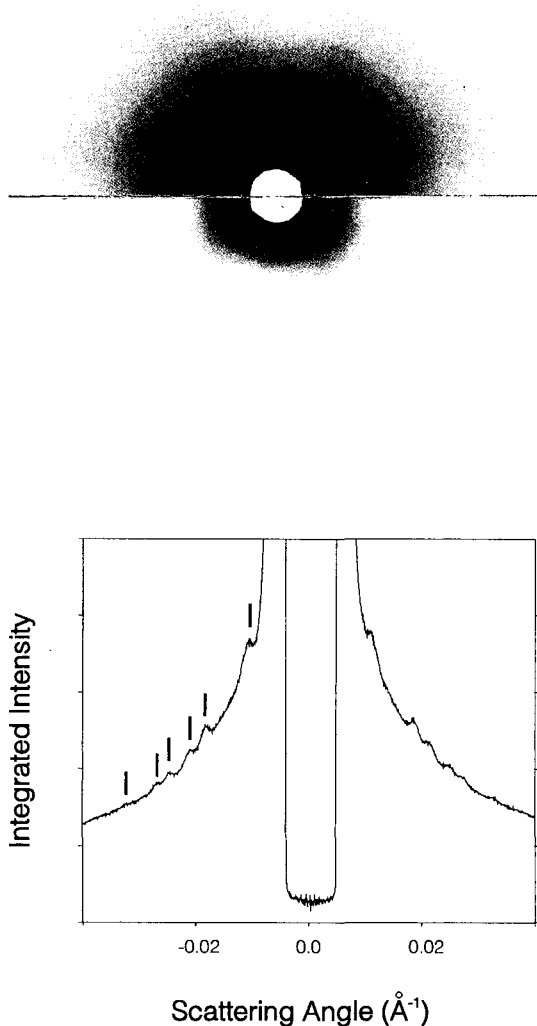
표 1에서 frozen hydrated된 시료와 air dried된 시료에서  $c$ 의 간격이 약  $20\text{\AA}$  정도 차이를 보여준다. 전자현미경 관찰을 위한 생물시료의 일반적인 준비방법은 stain으로 착색한 후, 실온에서 건조한다(Bremer *et al.*, 1992). 이 방법으로 준비된 시료의 전자현미경 관찰은 높은 contrast와 electron beam에 대해서 안정하므로 일반적으로 많이 이용되나, 단백질결정 등 생물물질에 포함된 물분자의 건조로 본래상태의 구조를 고찰할 수 없는 단점을 가지고 있다. Bubochet 등(1987)은 생물물질에 포함된 물분자를 간직한 채 구조의 고찰방법 즉 자연의 상태에서의 구조의 고찰방법으로 cryoelectron microscopy(Stewart & Vigers, 1986)의 중요성을 강조한 바 있다. 표 1에서 보는 바와 같이 frozen hydrated된 시료에서 얻은 unit cell parameter들 보다 air dried된 시료에서 얻은 값이 적음을 보여준다. 이 적은 값은 단백질결정에 포함된 물분자의 건조로 인해서 분자간의 수축으로 설명될 수 있다. 또 다른 원인을 결정의 형태 즉, 실린드꼴의 3차원결정모양으로 생각할 수 있다. frozen hydrated된 시료는 holy grid(재료 및 방법 참조)를 이용하여, hole에 위치한 결정은 본래의 상태로 존재하는 반면, 탄소막위에 위치한 결정에서 용액의 상등액 제거때(재료 및 방법 참조) 생기는 장력에 의한 lamellar면이 균열된 상태를 관찰할 수 있음을 Cheong 등(1996)이 보고한 바 있다. air dried된 시료는 hole grid의 hole속에 위치한 결정을 관찰할 수 없고, 탄소막위에 위치한 결정을 관찰할 수 있으므로 용액의 상등액 제거 때와 착색물질과 용액의 건조시 생기는

장력에 의한 변화로 설명될 수 있다.

## 2. x-ray diffraction

전자현미경으로 관찰된 unit cell의 spacing을 확인하기 위해서 x-ray powder pattern을 관찰하였다. 그림 2는 실린드형태의  $Ca^{2+}$ -ATPase결정을 자연적으로 얻은 결정의 침전물(재료 및 방법 참조)에 대한 x-ray pattern과 intensity의 radial integration을 함께 나타내었다. 표 2에서는 그림 2에 나타난 ring의 spacing과 그 ring이 lamellar축(0,0,l) 또는 lamellar면(h,k,0)에 관계된 reflection을 표시하였다. low-order의 reflection은 강한 intensity의 ring을 보여주며(예; (2,0,0)에 대해 83Å, (1,1,0)에 대해 53Å, (4,0,0)과 (3,1,0)에 대해 40Å), 또 in-plan cell dimension(ab면)에 대해서는 실린드형태와 평면형태에서 같은 값을 전제로 했다. 특히, lamellar spacing(c spacing)값이 실린드형태 결정에 대해 cryoelectron microscopy로 얻은 값( $c=185\text{\AA}$ )과 일치함을 보여준다. 그림 2의 첫 번째 ring(표 2의 87.7 Å)은 예상했던 83Å의 ring보다 안쪽으로 이동되어 넓은 띠로 보여준다. 이것은 전자현미경에서 얻은 lamellar spacing 185Å을 근거로 두 ring 즉, (0,0,2)에 대한 92.5Å과 (2,0,0)에 대한 83Å spacing ring이 합쳐서 나타난 것으로 생각된다. 또 이것은 (0,0,5)와 (0,0,6)의 reflection ring의 관찰로 설명되어 질 수 있다. 약 70Å과 47Å의 두 ring은 다른 reflection들 보다 넓고 약하게 나타나며, 또한 평면결정에서는 equatorial 축을 따라서 아주 약하게 나타난다. 그러므로 이 ring들은 lamellar stacking의 연합으로 나타난 것으로는 생각할 수 없고, 또한 in-plane의 reflection에 연관되어질 수 없으므로 이 두 ring은 결정과 함께 형성된 lipid/detergent로 이루어진 물질에서 비롯된 것이라 생각할 수 있다.

표 3에서 3가지의 다른 방법으로 준비한 시료에 대한 x-ray diffraction의 값을 요약하여 나타내었다. 원심 분리하여 얻은 침전물의 lamellar spacing값이 자연적으로 형성된 침전물에서 보다 적은 값을 보여준다. 즉, 외부 힘의 크기에 따라 lamellar spacing간의 거리가 가까워짐을 알 수 있다. 이것은 평면결정에서도 lamellar간의 결합이 유동적임을 알 수 있다. 실



**Fig. 2.** X-ray diffraction from pellet of cylinder-like crystal. The crystals were not centrifuged, but allowed to settle naturally in capillaries and no orientation is therefore observed. The lower panel is the radial integration of the corresponding x-ray diffraction patterns. Spacings of individual rings were measured after radial integration and background subtraction. The vertical bars in the lower panels indicate the rings detected for these particular patterns; bars are at 87.7, 53.7, 47, 39.9, 37 and 30.7Å. Assignments for these rings are given in Table 2.

**Table 2.** spacing and assignments for low-angle x-ray diffraction.

spacing (Å)	assignments <sup>1)</sup>	
	(0, 0, 1)	(h, k, 0)
87.7 <sup>2)</sup>	(0, 0, 2)	(2, 0, 0)
67.1*	-	-
53.7	-	(1, 0, 0)
47.0*	(0, 0, 4)	-
39.9	-	(4, 0, 0); (3, 1, 0)
37.0	(0, 0, 5)	-
30.7	(0, 0, 6)	-
26.7	(0, 0, 7)	(2, 2, 0)
23.5	(0, 0, 8)	(4, 2, 0)

<sup>1)</sup> Assignments for crystals grow in 20% glycerol are consistent with a lamellar spacing of 185.3Å and in-plane spacing of a=166.4Å and b=55.7Å.

<sup>2)</sup> This strong reflection was broader than other assigned reflections and is therefore consistent with an unresolved doublet of (0, 0, 2) at 92.5Å and (2, 0, 0) at 83Å.

\* The intensities of these reflections were variable, generally weaker and broader than other reflections, we therefore believe that they come from a noncrystalline component in the solution.

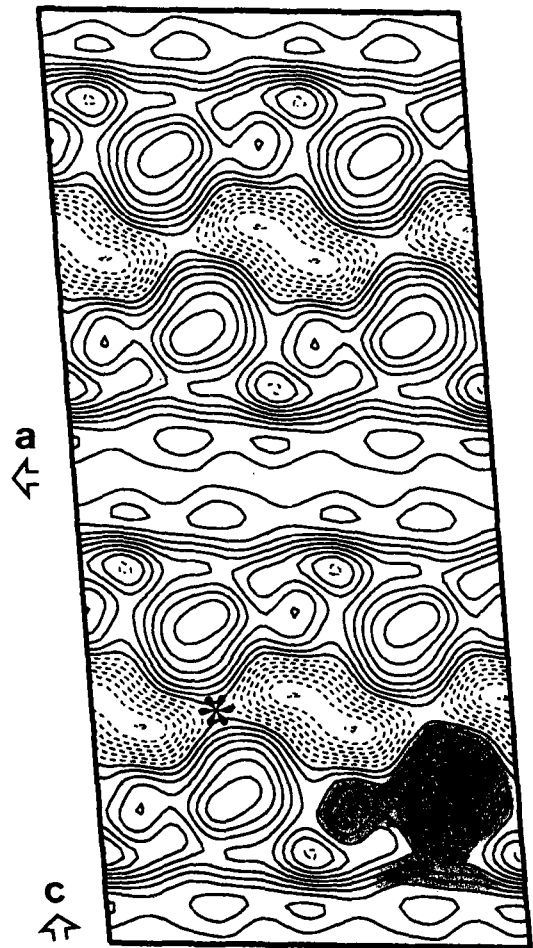
**Table 3.** c-spacing for low angle x-ray diffraction from different preparation methods.

preparation	C-spacing(Å)	
	cylinder	plate
11,000 × g, 7 hrs	-	142 ± 3
capillary, 800 × g, 2 times, 40 mins	-	154.5
capillary, no centrifugation	185.3 ± 1.6	155.7 ± 0.6

린드형태 결정의 lamellar spacing은 185Å으로 cryo-electron microscopy로 얻은 값과 일치함을 보여준다. 또, 실린드형태와 평면형태의 결정간에서 얻은 c spacing의 값은 큰 차이(약 30Å)를 보여준다. 이것은 Stokes와 Green (1990b)이 제시한 Ca<sup>2+</sup>-ATPase 3차원 결정의 model에서 실린드꼴과 평면 꼴은 동일한 unit cell (a, b와 c)을 가지며, 90°로 회전된 결정이라는 가설에 일치하지 않음을 보여준다. low angle x-ray diffraction과 cryoelectron microscopy의 결과로부터 실린드형태와 평면형태의 3차원 결정은 in-plane 즉, a와 b는 같은 값을 가지나, lamellar spacing은 다른 값을 가지는 것을 알 수 있다.

### 3. Averaged projection map

실린드형태 결정을 cryoelectron microscopy방법으로 얻은 9 image들을 하나의 data set로 합병(재료 및 방법 참조)하였다. 이 합병 data set (merged data set)로 부터 얻은 phase들의 값과 R-factor값들을 resolution의 영역별로 표 4에서 나타내었다. p2 symmetry-related phase residual(재료 및 방법 참조)은 12.3°로 p2 symmetry를 가지는 구조로 예상



**Fig. 3.** Projection map from frozen-hydrated cylinder-like crystals of Ca<sup>2+</sup>-ATPase. The area corresponding to a single cytoplasmic head has been shaded in the lower right corner. The star shows possible intermolecular contacts that stabilize the lamellar stacking.

**Table 4.** Phase statistics in different resolution range for merged data set of nine images.

resolution (Å) range	phase residuals <sup>a</sup> (degree)	phase error <sup>b</sup> (degree)	figure-of-merit (f.o.m)	R-factor <sup>c</sup>
100.0~20.0	39.1	8.1	0.982	0.412
20.2~14.1	66.2	16.7	0.942	0.285
14.1~11.5	73.5	25.5	0.886	0.190
overall	43.3	11.0	0.970	0.408

<sup>a</sup>phase residuals was evaluated a measure of the departure from centrosymmetry in the p1 average transform and phase show below the rondam phase (random=90°).

<sup>b</sup>phase error was the averaged error in the final estimate of the phase expressed as cos<sup>-1</sup>(f.o.m.).

<sup>c</sup>R factor= $\frac{\sum(I_i - I_{avg})}{I_{avg}}$

할 수 있다.

합병 data set로 부터 얻은 평균 projection map를 그림 3에서 나타내었고, 이 projection map은 약 14 Å의 resolution을 가진다(표 3에서 나타낸 phase residuals와 R-factor 등의 값으로 추정). 이 그림에서 a축을 따라 고밀도로 넓고 균일하게 분포된 띠(band)를 bilayer로 추정하였다. 그림에서 cytoplasmic head의 적은 중첩(또는 가까이 접촉)을 보여주며, 각 분자(검게 표시)들을 쉽게 구별 할 수 있다. bilayer의 두께를 45Å으로 가정한다면, 실린드형태 결정의 bilayer간의 거리는 약 140Å으로 이것은 cytoplasmic head의 크기가 70Å (lipid bilayer표면에서부터)으로 제안한 Toyoshima 등(1993)의 값과 잘 일치함을 보여준다. 또한 molecular의 좌측면에 작게 분포된 부분은 "nose"(또는 "beak")에, bilayer와 head를 연결 시켜주는 가늘게 분포된 영역은 "stalk"에 해당된다(Taylor *et al.*, 1986, Toyoshima *et al.*, 1993). 이 그림을 근거로 "nose"는 a축에 평행 되게 향하고 있음을 알 수 있다.

그림 3에서 두 lipid bilayer 사이의 cytoplasmic head와 head 사이에 낮은 전자밀도가 분포되어 있음을 보여준다. frozen hydrated된 시료와 air dried된 시료에서 lamellar spacing이 약 20Å 정도의 차이(표 1)를 보여주고, 평면형태 결정에 대한 x-ray diffraction에서도 시료준비 방법에 따라 14Å의 차이(표 3)를 보여준다. 이 차이들을 cytoplasmic head와 head 사이에 분포된 낮은 전자밀도로 설명할 수 있다. 시료가 건조됨에 따른 수축과 외부의 힘(원심

분리)의해 head간의 중첩(그림 3에서 별 표시)으로 c spacing 간격이 좁아지게 됨을 생각할 수 있다. 즉, cytoplasmic head 사이는 쉽게 수축 될 수 있음을 고찰할 수 있다.

## 결 론

Ca<sup>2+</sup>-ATPase의 두형태 즉 실린드형태와 평면형태 결정에 대해 전자현미경 자료와 x-ray자료로 각각의 결정에서 lamellar spacing간의 간격차이는 동일 모델(Stokes & Green, 1990b)이 아님을 보여준다. 전자현미경 시료준비 방법에 따른 lamellar spacing의 차이를 결정의 탈수화(dehydration) 등에 기인된 것으로 설명할 수 있다. 즉, 생물시료의 자연적 상태와 고분해능의 구조를 고찰하기 위해서는 cryoelectron microscope적 방법이 필요하다. 전자현미경과 x-ray 시료준비방법에 따른 c spacing 차이를 ac 평면의 projection map에서 보여주는 cytoplasmic head간의 낮은 전자밀도 분포로 고찰하였으며, 이 projection map은 Ca<sup>2+</sup>-ATPase의 3차원 구조를 이해하는데 매우 중요한 역할을 할 것이다.

## 감사의 글

본 연구에 대해 토론한 Dr. Stokes와 Dr. Young (Skirball Institute of Biomolecular Medicine, New York)에게 깊은 감사를 드린다.

## References

- Amos LA, Henderson R, Unwin PNT, 1982. Three-Dimensional Structure Determination by Electron Microscopy of Two-Dimensional Crystals. *Prog. Biophys. Molec. Biol.* 39, 183-231
- Andersen JP, Vilsen B, 1994. Structure-function relationships of cation translocation by Ca<sup>2+</sup>- and Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPases studied by site-directed mutagenesis. *FEBS Lett.* 359, 101-106.
- Baker TS, Sosinsky GE, Caspar DLD, 1985. Gap junction structures VII. Analysis of connexon images obtained with cationic and anionic nega-

- tive stains. *J. Mol. Biol.* 184, 81-98.
- Bigelow DJ, Inesi G, 1992. Contributions of chemical derivatization and spectroscopic studies to the characterization of the  $\text{Ca}^{2+}$  transport ATPase of sarcoplasmic reticulum. *Biochim. Biophys. Acta.* 1113, 323-338.
- Bremer A, Henn C, Engel A, Baumeister W, Aebi U, 1992. Has negative staining still a place in biomacromolecular electron microscopy? *Ultramicroscopy*, 46, 85-111.
- Castellani L, Hardwicke PM, Vibert P, 1985. Dimer ribbons in the three-dimensional structure of sarcoplasmic reticulum. *J. Mol. Biol.* 185, 579-594.
- Cheong G-W, Young HS, Ogawa H, Toyoshima C, Stokes DL, 1996. Lamellar stacking in three-dimensional crystals of  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase from sarcoplasmic reticulum. *Biophys. J.* 40, 1689-1699.
- Dux L, Martonosi A, 1983. Two-dimensional arrays of proteins in sarcoplasmic reticulum and purified  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase vesicles treated with vanadate. *J. Biol. Chem.* 258, 2599-2603.
- Dux L, Taylor KA, Ting-Beall HP, Martonosi A, 1985. Crystallization of the  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase of sarcoplasmic reticulum by calcium and lanthanide ions. *J. Biol. Chem.* 260, 11730-11743.
- Dux L, Pikula S, Mullner N, Martonosi A, 1987. Crystallization of  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase in detergent-solubilized sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 262, 6439-6442.
- Dubochet J, Adrian M, Chang J-J, Lepault J, McDowell W, 1987. Cryoelectron microscopy of vitrified specimens. In: R.A. Steinbrecht and K. Zierold (ed.), *Cryotechniques in Biological Electron Microscopy*, pp.114-131. Springer-Verlag, Heidelberg.
- Eletr S, Inesi G, 1972. Phospholipid orientation in sarcoplasmic reticulum membranes. spinlabel ESR and proton NMR studies. *Biochim. Biophys. Acta.* 282, 174-179.
- Green NM, 1992. Evolutionary relationships within the family of P-type cation pumps. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 671, 104-112.
- Glaeser R, 1992. Specimen flatness of thin crystalline arrays: influence of the substrate. *Ultramicroscopy*, 46, 33-43.
- Henderson R, Baldwin JM, Downing KH, Lepault J, Zemlin F, 1986. Structure of purple membrane from *Halobacterium halobium*: recording, measurement and evaluation of electron micrographs at 3.5Å resolution. *Ultramicroscopy*, 19, 147-178.
- Kiselev NA, Sherman MB, Tsuprum VL, 1990. Negative staining of proteins. *Electron. Microsc. Rev.* 3, 43-72.
- Pikula S, Mullner N, Dux L, Martonosi A, 1988. Stabilization and crystallization of  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase in detergent-solubilized sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 263, 5277-5286.
- Shi D, Hsiung H-H, Pace RC, Stokes DL, 1995. Preparation and analysis of large, flat crystals of  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase for electron crystallography. *Biophys. J.* 68, 1152-1162.
- Stokes DL, Green NM, 1990a. Structure of Ca ATPase: Electron Microscopy of Frozen-Hydrated Crystals at 6Å Resolution in Projection. *J. Mol. Biol.* 213, 529-538.
- Stokes DL, Green NM, 1990b. Three-dimensional crystals of  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase from sarcoplasmic reticulum: symmetry and molecular packing. *Biophys. J.* 57, 1-14.
- Stokes DL, Nakamoto RN, 1994. Structures of P-type and F-type ion pumps. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 4, 197-203.
- Stewart M, Vigers G, 1986. Electron microscopy of frozen-hydrated biological material. *Nature*, 319, 631-636.
- Taylor KA, Dux L, Martonosi A, 1986. Three-dimensional reconstruction of negatively stained crystals of the  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase from muscle sarcoplasmic reticulum. *J. Mol. Biol.* 187, 417-427.
- Taylor KA, Mullner N, Pikula S, Dux L, Peracchia C, Varga S, Mavtonosi A, 1988. Electron microscope observations on  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase microcrystals in detergent-solubilized sarcoplasmic



- reticulum. *J. Biol. Chem.* 263, 5287-5294.
- Toyoshima C. 1989. On the use of holey grids in electron crystallography. *Ultramicroscopy*, 30, 439-444.
- Toyoshima C, Sasabe H, Stokes DL, 1993. Three-dimensional cryoelectron microscopy of the calcium ion pump in the sarcoplasmic reticulum membrane. *Nature*, 362, 469-471.
- Unger VM, Schertler GFX, 1995. Low resolution structure of bovine rhodopsin determined by electron cryo-microscopy. *Biophys. J.* 68, 1776-1786.
- Woodcock CL, Baumeister W, 1990. Different representations of a protein structure obtained with different negative stains. *Euro. J. Cell Biol.* 51, 45-52.

## FIGURE LEGENDS

**Fig. 1.** Electron micrographs of cylinder-like crystals of Ca<sup>2+</sup>-ATPase from different preparation methods. Stacking of lamellae is directly visible in these crystals and occasionally the (h,0,l) projection is obtained, from which the angle can be measured. a) The crystals preserved in the frozen hydrated state. b) Before freezing, the crystals were contrasted with the mixture of glucose and uranyl acetate (1 : 1) and exposed at -175°C. c) The crystals were negatively stained with the mixture of glucose and uranyl acetate (1 : 1) and exposed at 20°C. d) The crystals were conventionally negatively stained with 1% uranyl acetate containing 0.01% glucose.

