

SH에 Spin Label한 Rabbit Glycerin처리근육의 X선 회절에 관한 연구

김덕술 · 송주영†

창원대학교 공업화학과

A Study on the X-ray Diffraction of Rabbit Glycerin Muscle by Spin Labeled on SH

Duck Sook Kim and Ju Yeong Song†

Department of Chemical Technology, Changwon National University,
Sarim-dong, Changwon, Kyungnam 641-773 Korea

Abstract

IASL(iodo acetamide) and MSL(maleimide) disordered the orderly helix arrangement of myosin in the rest state of spin level. Especially the effect of IASL was great. Equatorial reflection(10,11) change inferred that myosin head was moved to the vicinity of actin filament by spin level. The intensity change of 143 Å and 72 Å could offer information of the mass projection of population of myosin heads along the filament axis. The slope of intensity profile of the mass projection of 143 Å and reflection of IASL is appeared and that of MSL is appeared sharply. The decrease of 215 Å reflection intensity the periodical characteristic of 143 Å reflection by spin label. The raise of MSL actin reflection at 51 Å and 59 Å in the actin reflection change refers that the shifted myosin head binds a certain actin or changes an actin structure by spin label effect. Because iodo acetamide has a tendency to decrease the actin reflection, actin dose not bind myosin head. From this result, we could conclude that LASL and MSL are spin labeled on SH of myosin head and disordered the helix arrangement of actin.

Key words : myosin head, SH, spin label, reflection

서 론

근육과 같은 생물 moter 장치의 작동원리를 해명하기 위하여서는 단백질 분자의 운동을 아는 것이 무엇보다도 중요하며 물리학적 방법을 사용하여 생물 moter를 연구하는 것은 이제는 일반적인 연구방법이다¹⁻³⁾. 근육 수축 system

은 기능과 구조가 직접적인 관계를 가진다. 즉 근육 수축에 대한 에너지변환과 그 구조의 역할이 근육수축에 영향을 미치고 있기 때문이다. 근육 X선 연구는 근육이 ATP를 분해하여 어떻게 힘을 발생시키는가를 구조변화를 통하여 밝히는데 있다. 이것은 장력발생을 담당하는 myosin head와 actin과의 결합이 중요한 요인으로 작용한다. 근육 수축은

† Corresponding author

actin과 myosin이라 하는 단백질분자에 의하여 일어나며, 근수축의 기본과정은 myosin에 의하여 ATP가수분해를 시킴으로서 나타나는 에너지를 에너지원으로 하는 양 단백질의 상호작용에 있다⁴⁾. 근육의 actin과 myosin은 각각 filament상으로 규칙적으로 배열을 하고 있기 때문에 그 구조가 오래 전부터 연구되어 왔다⁵⁾. 이 중에서 전자spin공명 즉 ESR(Electron Spin Resonance)를 이용한 myosin head의 움직임에 대한 연구가 활발히 진행되어 왔다. 이것은 원자나 분자중의 전자는 지구가 자전하는 것처럼 어떤 내부운동을 하고 있다. 그 각의 운동량을 spin이라 한다. 이것은 myosin head의 구조해석에 널리 쓰이고 있으며, 특히 myosin head중의 SH에 spin label 시약을 이용하여 ATP 가수분해 중에 actin과의 결합에서 어떤 각도로 결합하는가를 전자spin공명을 이용하여 널리 연구되고 있다.

본 연구에서는 이러한 전자spin공명장치를 이용한 myosin head의 움직임을 연구에 대하여 X선 회절장치를 이용한 실험을 하였고, 전자spin공명에 사용된 시약을 사용하여 myosin head의 SH에 spin label한 것에 X선을 투과시켜 연구하였다. 그리고 근육 내에서 일어나는 변화를 image plate에 의해 나타난 2차원 X선 회절상으로의 변화를 추적 하였고, actin과 myosin의 상호작용을 구조 분석하여 연구 하였다.

재료 및 방법

실험장치

X선 회절 광학계는 일본에 있는 고에너지 물리연구소의 소각산란 회절계(BL15A, PF, tsukuba, Japan)를 사용하였다. 이 광학계는 수축중인 근육의 회절 실험만을 위하여 설계되었다. 광원으로부터 13m의 위치에 있는 정밀거울은 X선의 수직방향의 발산각을 받아서 전반사 시킨다. 거울의 전장은 완만하게 굽어져 있고, 수직 방향의 beam을 광원으로부터 22m 위치에 집중시킨다. camera는 최대 3m까지 연장되며, 위치는 변경시킬 수 있다. 시료로부터의 산란 X선은 진공관 안을 통과하여 검출기 면에 닿아서 검출기에 기록된다. 광원 가속기는 양전자 에너지 2.4GeV, 전류 250-350mA로 운전된다. 시분할 X선에 의한 기체원자로부터 전리한 전자를 양극선의 근방에서 gas로 증폭시켜서, X선 광자를 전기파로서 검출한다. One Dimensional Posi-

tion Sensitive propotional Detector : 1D-PSD(type 78 60, Rigaku Denki, Tokyo)는 gas증폭이 양극선 선상의 특정 위치를 결정하는 검출기이다. 회절상의 장력시간변화도 같은 시간대에 동시에 측정된다. 또 전류치와 시료에 입사하는 X선 강도도 기록된다. 시료와 검출기간의 거리는 측정하고자 하는 반사를 다른 반사와 분리하여 기록할 수 있도록 약 2.4m으로 하였다. 방사선 X선은 강력하기 때문에, 이 방사선에 의한 손상을 최소화하기 위하여 data수집 이외에는 시료에 X선이 닿지 않도록 시료 앞에 고속 shutter를 두었다. PSD에 의한 1차원 X선 회절상의 신호를 computer에 접속한 CAMAC(type 3588, LecRoy Research System S.A., Switzerland) memory에 시간의 함수로서 저장하였다.

Imaging 기록장치

근육으로부터 X선 회절상을 2차원적으로 기록하기 위하여, 'image plate'(BAS 2000, Fuji Film, Tokyo)라고 하는 적분형 X선 검출기를 이용하였다. Image plate는 가시광에 의해 형광을 발하는 현상을 이용한 것으로 후지필름이 의학 화상진단용으로 개발한 장치를 사용하였다. 즉, 방사선 에너지물질을 축적을 하고 난 후, 광의 기동에 의해 다시 형광 하는 현상이다.

X선시료

Glycelin 처리한 토기골격근(Glycelin 처리후 1-2주이내)을 0.3mm정도 두께로 사용하였다. 근육의 크기는 길이가 4-5cm로 두께는 약 1mm정도이다. 근육은 백금선을 나란히 자극전극으로 준비한 시료 cell의 한쪽 끝에 연결하였다. 시료의 다른 한쪽 끝에는 transducer의 shutter의 금속에 수술용 실을 연결하였다. 근질의 길이는 He-Ne Laser의 광회절법으로 가는 filament와 굵은 filament의 full overlap의 길이(2.2-2.4um)로 조정하였다. cell 중에 양쪽 끝을 고정시켜 이완용액을 흘려 보낸후, spin label 시약으로 교환하였고, 가는 filament와 굵은 filament가 충분히 반응 할 수 있도록 하였다. 사용한 spin label 시약은 N-(1-oxy-2,2,6,6-tetramethyl-4-piperidiny)-iodoacetamide와 N-(1-oxy-2,2,6,6-tetramethyl-piperidiny)-maleimide이며, 전자는 IASL, 후자는 MSL로 칭한다. Spin Label은 적어도 SH1에 label되어져 있다.

실험방법

먼저 control 시약을 cell안에 20분간 순환시켜 X선을 투과하여 반응한 X선회절상을 얻은후ESR측정에 이용된 시료와 같이 제조된 IASL spin label시약을 실험용 cell안으로 약30분간 순환시킨다. MSL spin label시약도 같은 방법으로 순환시킨다. 그리고 나서 반응된 근육을 X선을 투과하여 실험하였다. 즉, myosin head의 SH에 반응시켜 토끼근육에 X선을 투과하여 spin label에 의한 영향을 비교하였다. X선 회절은 일본의 PF의 방사선X선과 카메라 및 image plate를 사용하여 행하였다. X선과 시료와의 거리는 190cm, 노출 시간은 3분이었다. 온도는 25°C에서 실험하였다.

control 시약 조성(UL) : 80mM K-propionate, 40mM imidazole, HCl buffer, 6mM Mg-acetate, 5mM EGTA, 5 mM Na2ATP, (pH7.0).

spin label 시약 조성(IASL, MSL) : 50mM KCl안에 300um-MSL, IASL, 1mM MgCl2, 10mM imidazole, (pH 7.0).

결과 및 고찰

Image plate의 digital data를 X-Y방향으로 저장하였고, 전체강도로 다른 data를 전부 규격화시켜 각각의 3개의 data가 가산되었다. 본 연구에서는 X선 회절상과 적도반사, myosin 반사, actin반사의 강도를 비교하였다.

X선회절상

근육골격근의 X선 회절상은 짧은 filament와 가는 filament의 나선구조에 의해 2개의 층선 반사로부터 형성된다. 이것은 나선구조가 Fourier변화하여 불연속선 층선 분포가 이루어짐을 의미한다⁶⁾. 적도반사는 근육의 구조를 장축에 따라서 적도면에 투영한 구조를 반영하고, 자오반사는 근 선유축에 수직으로 투영한 근육의 구조를 반영한다. 이 2개의 층선 반사는 양 filament의 구조주기가 다르기 때문에 일반적으로 분리형으로 관측된다. 근육의 장축과 수직한 면, 즉 적도면 위에 나타나는 짧은 filament와 가는 filament의 6방배열에 의한 (100)면과 (110)면으로 부터의 반사와, 적도축에 수직한 중앙축, 즉 자오선 위에 나타난 짧은 filament의 crossbridge의 주기 구조로부터의 143 Å 과 215 Å 자오반사가 나타나는데, 이 2개의 반사는 myosin fila-

ment의 기본주기(430 Å)의 3차와 2차반사에 해당한다.

Fig. 1에서 적도반사(10, 10)는 근육의 구조를 장축에 따라서 적도면에 투영한 구조를 반영한다. 2개의 층선반사는 양 filament의 구조주기가 다름에 따라 일반적으로 분리된 형태로 나타난다. 143 Å 자오반사는 짧은filament에서 튀어나온 2개의 head로부터 되는 myosin-crossbridge의 규칙배열로부터 오는 반사이다. 215 Å 반사는 이완상태로 myosin-crossbridge의 주기적 유동을 받은 나선배열에 의한 반사로(15), 근육이 수축하면 매우 약하게 된다.

이들 반사를 선택한 이유는 이것의 강도변화가 crossbridge의 움직임과 구조변화를 직접적으로 반영하기 때문이다. 양 자오반사의 강도변화는 myosin-crossbridge의 filament 축에 따라 투영구조의 변화에 대한 정보를 제공한다. 이것의 강도변화가 crossbridge의 움직임과 구조변화를 직접적으로 반영하기 때문이다. 59 Å, 51 Å 반사는 전부 actin monomer의 반사이다. 이완상태에서는 actin과 myosin이 떨어져 있기 때문에 각각 다른 위치에서 관찰된다. 215 Å, 143 Å, 72 Å 반사는 myosin으로부터 오는 반사이다.

Fig. 2에서는 iodo acetamide(IASL)시약을 반응시킨 후

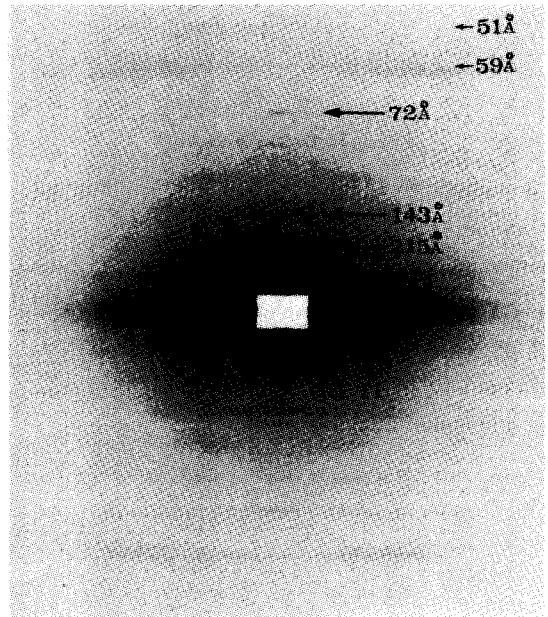


Fig 1. X-ray diffraction pattern of glycerinated rabbit muscle fibers in rest state(UL).

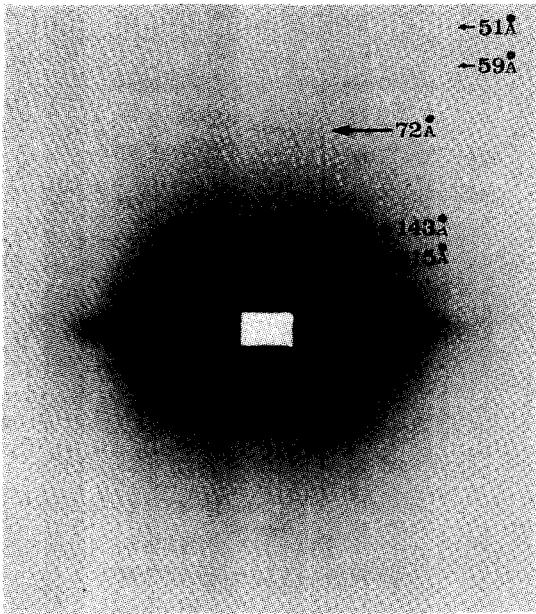


Fig. 2. X-ray diffraction pattern of iodo acetamide(IASL).

X선을 통과시켜 결과를 나타내었다. 역시 Fig. 1과 비교해서 전체적으로 반사들이 많이 약하게 나타나 있다. 이것은 시약에 의한 반응으로 보여지며 myosin head의 SH가 어떤 변화를 나타내고 있다. 특히 59Å 반사가 많이 약하게 나타나고 있다.

Fig. 3은 maleimide(MSL)시약을 반응시킨 후 X선을 통과시켜 결과를 나타내었다. iodo acetamide(IASL) 시약과 반응한 Fig. 2와 비교해서 층선 반사가 강하게 나타나고 있다. 그러나 이완상태보다는 많이 희미하게 보인다. 위의 X선 pattern이 다르게 나타내는 것은 spin label의 진행과정으로 보여지며, 결과적으로 maleimide(MSL)시약반응에서 iodo acetamide(IASL)시약반응으로 진행될 수 있다는 것을 시사한다.

이것은 maleimide시약을 장시간 두면 Fig. 2처럼 결국 층선 반사가 약해 질 수 있다는 것을 시사하고 있다. 이러한 각 층선 반사가 약해지는 요인으로는 여러 가지가 있다. 먼저 rest 상태에서 오랜 시간 동안 반응시키면, 자연적인 근육의 경직현상이 있을 수 있다. 하지만 같은 반복실험을 통하여 반사가 약해지는 근육은 실험 data에서 제외시켰다. 또 다른 요인으로는 근육fiber 간의 당기는 현상으로 있지만 극히 미미한 영향을 미치기 때문에 무시해도 된다. 하지만

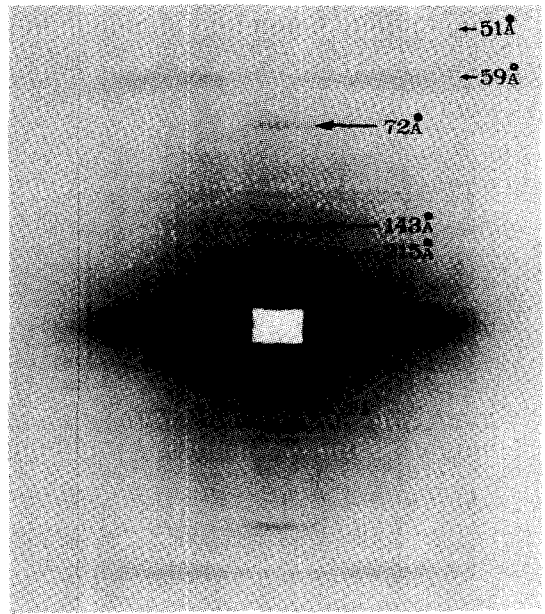


Fig. 3. X-ray diffraction pattern of maleimide(MSL).

실험결과 data를 면밀히 검토하여 이러한 현상이 보이는 data도 제외시켰다.

적도반사

적도반사는 filament육각배열에 의한 결정반사 (100)면과 (110)면으로 부터의 반사이며, 이것은 굵은 filament와 가는 filament와의 crossbridge관계를 나타낸다⁹⁾. 적도면을 중심으로한 근육의 층선구조를 보면, 굵은 filament로부터 나온 myosin돌기의 배열은 굵은 filament안의 myosin분자에 의해 지배를 받는다⁹⁾.

육방격자에 의한 10, 11반사에 의한 data를 나타내었다. Fig. 4에 나타난 것처럼 10반사는 조금만 변화한 반면, 11반사가 현저하게 높게 올라 간 것을 알 수 있다. 이것은 myosin head가 actin filament부근으로 이동해 있다는 것을 알 수가 있다. 이러한 변화는 spin label에 의한 영향으로 해석될 수 있고, 규칙적인 myosin head의 구조가 흐트러져 있음을 나타낸다. 적도반사 10/11강도비는 spin label하면 control에 비하여 반정도밖에 되지 않는다. 이 강도비의 변화는 11반사의 50%가까이 증가 되었다.

myosin 자오반사

근육의 장축과 수직인 면, 즉 적도면 위에 나타나는 굵

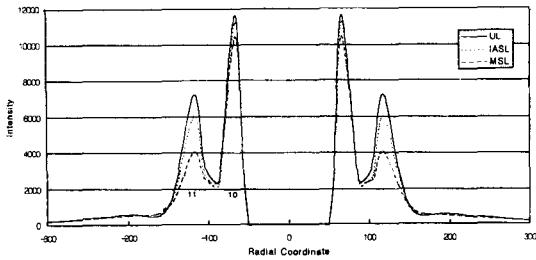


Fig. 4. The intensity profiles of 10, 11 equatorial reflections(UL, IASL, MSL)

은 filament와 가는 filament의 6방배열에 의한 (100)면과 (110)면으로 부터의 반사와, 적도축에 수직한 중앙축, 즉 자오선 위에 나타난 굵은 filament의 crossbridge의 주기 구조로부터의 143 Å 과 215 Å 자오반사이다. 이것의 반사는 crossbridge의 움직임과 구조변화를 직접적으로 반영한다.

Fig. 5에서 myosin 선이로부터 나선 주기의 2차(215 Å 반사), 3차(143 Å 반사), 6차(72 Å 반사)를 측정하였다. myosin자오반사에 관하여 IASL, MSL도 215 Å 반사가 약하게 되었다. myosin기본주기의 3차, 6차의 반사는 IASL에서 반정도 내려간다. 한편, MSL에는 이것의 반사강도를 현저하게 올라가서 특히, 143 Å 반사의 강도를 80% 정도 올라갔다. 이 변화는 filament축에 따라서 있는 myosin-crossbridge의 분포가 변하고, filament축에 수직으로 투영한 질량분포가 143 Å 주기로 증가하게 되는 것을 시사한다. 이러한 143 Å의 변화는 myosin의 대표적 주기변화로서 crossbridge의 변화를 의미한다. 이것은 myosin head의 SH가 어떤 변화가 있었다는 것을 나타내며, myosin head가 actin으로부터 떨어져 있다는 것을 알 수가 있었다.

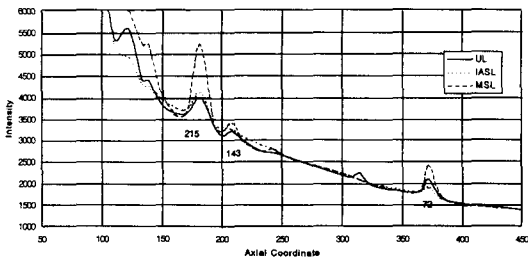


Fig. 5. The intensity profiles of 215 Å, 143 Å, 72 Å meridional reflections(UL, IASL, MSL)

actin 층선반사

27 Å 자오반사는 최근접 actin monomer의 축방향 간격에 상당하는 반사이며, 59 Å, 51 Å 반사는 전부 actin monomer의 반사이다. Fig. 6에서 actin반사로부터 유래하는 59 Å, 51 Å 반사를 측정하였다. actin반사에 관해서도 같이 IASL은 반정도이하로 강도가 내려가지만, MSL은 특히 59 Å 반사를 60% 정도 올랐다. 이러한 결과는 IASL의 반응은 actin이 myosin head와 떨어져 있다는 것을 나타내고 있다. 즉, actin-myosin의 crossbridge의 관계가 spin label 시약에 영향을 받는다는 것을 알 수가 있었다. 그러나 MSL의 반응은 actin-myosin의 crossbridge의 관계가 구조적으로 변화 하였다는 것을 나타낸다. 즉, myosin head가 actin과 결합이 되었다 할지라도 결합각도가 변했다고 볼 수 있다. 이러한 변화는 spin label 시약의 효과에 대한 중간과정으로도 볼 수가 있다.

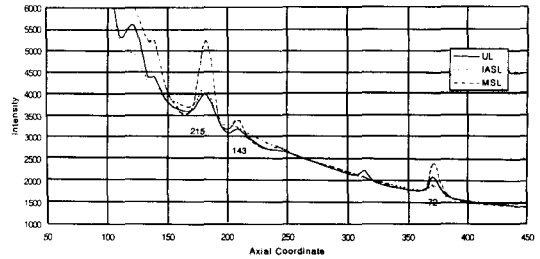


Fig. 6. The intensity profiles of 51 Å, 59 Å actin-based reflections(UL, IASL, MSL)

요 약

이상의 결과로부터 spin level의 영향은 IASL, MSL은 이완상태 myosin head의 규칙적인 나선 배열은 흐트러진다. 특히 IASL은 효과가 크다. 적도반사의 변화로부터 myosin head는 spin label하는 것에 의해 actin filament 근방에 이동해 있다는 것을 알 수 있었다. 215 Å 반사의 감소는 spin level에 의한 myosin의 143 Å 주기성을 더욱 강하게 해 준다. 143 Å, 72 Å의 거동은 filament축으로부터 투영한 구조를 반영하기 때문에 IASL에는 143 Å 주기의 밀도분포가 완만하게 되어 있다는 것을 나타내고, MSL에는 143 Å 분포가 올라와 있다는 것을 나타낸다. actin반사변화에서

MSL의 actin반사의 증가는 이동한 myosin head가 어떤 actin과 결합하였거나, spin label의 영향으로 actin의 구조가 변화되었다. 한편, IASL은 actin반사를 감소 시키기 때문에 myosin head의 결합을 하지 않았다. 결론적으로, 이것은 actin의 SH기에도 spin label되어 actin의 나선 구조가 크게 흐트러짐을 알 수 있었다.

참 고 문 헌

1. Barnett, V. A., P. G. Fajer, C. F. Polnaszek, and D. D. Thomas. : High-resolution detection of muscle crossbridge orientation by electron paramagnetic resonance. *Biophys. J.*, **49**, 144-146(1986).
2. Barnett, V. A. and D. D. Thomas. : Resolution of conformational states of spin-labeled myosin during steady-state ATP hydrolysis. *Biochemistry.*, **26**, 314-323(1987).
3. Barnett, V. A. and D. D. Thomas. : Microsecond rotational motion of spin-labeled myosin heads during isometric contraction. *Biophys. J.*, **56**, 517-523(1989).
4. Cooke, R., M. S. Crowder, and D. D. Thomas. : Orientation of spin-labels attached to cross-bridges in contracting muscle fibers. *Nature.*, **300**, 776-778 (1982).
5. Fajer, P. G. : Determination of spin-label orientation within the myosin head. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **91**, 937-941(1994).
6. Fajer, P. R. L. H. Bennett, C. F. Polnaszek, E. A. Fajer, and D. D. Thomas. : General method for multi-parameter fitting of high-resolution ESR spectra using a simplex algorithm. *J. Magn. Reson.*, **88**, 111-125(1990a).
7. Roopnarine, O., A. G. Szent-Gyorgyi, and D. D. Thomas. : Saturation transfer electron paramagnetic resonance of spin-labeled myosin regulatory light chains in contracting muscle fiber bundles. *Biophys. J.*, In press(1995).
8. Roopnarine, O., K. Hideg., and D. D. Thomas. : Saturation transfer ESR spectroscopy with an indane spin label : calibration with hemoglobin and application to myosin rotational dynamics. *Biophys. J.*, **64**, 1986-1907(1993).
9. Matta, J. J., and D. D. Thomas. : Biochemical and mechanical effects of spin-labeling myosin S1. *Biophys. J.*, **61**, A295(1992).