

Myosin Head의 Spin Label이 온도 영향에 따른 구조 변화 연구

김덕술[†] · 박근호^{*}

동명정보대학교 컴퓨터공학과, *창원대학교 공과대학 화공시스템공학과
(2003년 6월 2일 접수 ; 2003년 8월 28일 채택)

Study of Structure Change by Temperature Effect in Spin Label of Myosin Head

Duck-Sool Kim[†] · Keun-Ho Park^{*}

*Department of Computer Engineering, Tongmyong University of Information Technology,
Pusan 608-711, Korea*

**Department of Chemical Engineering, Changwon National University,
Changwon 641-773, Korea*

[†]e-mail : dskim@tit.ac.kr

(Received June 2, 2003 ; Accepted August 28, 2003)

Abstract : IASL(iodo acetamide spin label) and MSL(maleimide spin label) disordered the orderly helix arrangement of myosin in the rest state of spin level. Especially the effect of IASL was great. The muscle was isometrically tetanized with three trains of 3ms pulses every 50ms between 5°C with 25°C. Equatorial reflection change inferred that myosin head was moved to the vicinity of actin filament by spin level. The intensity change of 143Å and 72Å could offer information of the mass projection of population of myosin head along the filament axis. The slope of intensity profile of the mass projection of 143Å and reflection of IASL is appeared and that of MSL is appeared sharply. The decrease of 215Å reflection intensity the periodical character of 143Å reflection by spin label. The raise of MSL actin reflection at 51Å and 59Å 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 can conclude that IASL and MSL are spin labeled on SH of myosin head and disordered the helix arrangement of actin.

Keywords : myosin head, spin label, reflection.

1. 서 론

근육수축의 분자구조에 관해서는 지금까지 몇

가지의 가설을 제공하여져 왔다. 그 가운데 가장 유력한 설로서는 myosin head진동설 혹은 회전설이다. 이 가설에 의하면, myosin filament

로부터 나온 head가 actin과 결합한 후 각도가 변화하여, 이 head의 각도변화가 myosin filament와 actin filament간의 미끄럼운동을 발생시킨다. 또 근육이 장력을 발생할 때도 myosin head에 큰 각도변화가 일어난다. 생체 근육 수축 시스템은 기능과 구조가 직접적인 영향을 미친다. 즉 생체근육 수축에 대한 에너지 변환과 그 구조의 역할이 근육수축에 영향을 미치고 있기 때문에, 의학 분야에서 많이 연구가 행하여져 왔다[1-3]. 근육 수축에 대한 X 선 연구는 근육이 ATP (adenosine triphosphate)를 분해하여 어떻게 힘을 발생시키는가를 구조변화를 통하여 밝히는데 있다. 이것은 장력발생을 담당하는 myosin head와 actin과의 결합이 중요한 요인으로 작용한다. 근육 수축은 actin과 myosin이라고 하는 단백질분자에서 일어나며, 근육수축의 기본과정은 myosin에 의하여 ATP 가수분해를 일으킴으로서 나타나는 에너지를 에너지원으로 양 단백질의 상호작용에 있다[4]. 근육의 actin과 myosin은 각각 filament상으로 규칙적으로 배열을 하고 있기 때문에 그 구조가 X-ray 혹은 전자현미경을 통하여 일반적으로 연구보고 되고 있다[5-9]. 그러나 미세한 구조변화는 아직도 연구진행중이며, 그 중에서도 electron spin resonance equipment(전자스핀공명장치)를 이용한 myosin head의 움직임에 대한 연구가 활발히 진행되어 왔다. 그 각의 운동량을 spin이라 한다. 이것은 myosin head의 구조해석에 널리 쓰이고 있으며, 특히 myosin head 중의 sub head (SH)에 spin label 시약을 이용하여 ATP 가수분해 중에 actin과의 결합에서 어떤 각도로 결합하는가를 전자 스핀 공명을 응용하여 널리 연구되고 있다[10-15].

본 연구에서는 이러한 전자 스핀 공명장치를 이용한 myosin head의 움직임을 X선 회절장치를 이용하여 실험 하였고, 전자 스핀 공명에 사용된 시약을 사용하여 myosin head의 SH에 spin label화한 것에 X선을 투과시켜 관찰하였다. 그리고 생체근육내에서 일어나는 변화를 image plate에 나타난 2차원 X선 회절상을 통하여 변화를 추적하였고, actin과 myosin의 상호작용을 구조 분석하여 실험하였다. 그리고 spin label한 myosin head가 온도변화에 미치는 영향관계를 연구하였다.

2. 실험

2.1. X-ray 실험장치

Fig. 1에서 보는바와 같이 X-ray 회절 장치는 일본에 있는 고 에너지 물리연구소의 소각산란 회절계(BL15A, PF, tsukuba, Japan)를 사용하였다, 이 장치는 수축중인 생체근육의 회절 실험만을 위하여 설계되었다. 광원으로부터의 거리가 13m의 위치에 있는 정밀거울은 X-ray의 수직방향의 발산각을 받아서 전반사시킨다. 거울의 전장은 완만하게 굽어져 있고, 수직방향의 beam을 광원으로부터의 거리 22m 위치에 집중시킨다. 카메라는 최대 3m까지 연장되며, 위치는 변경시킬 수 있다. 시료로부터의 산란 X-ray는 진공관 안을 통과하여 검출기 면에 닿으면 검출기에 기록된다. 광원 가속기는 양전자 에너지 2.4GeV, 전류 250-350mA로 운전된다. 시분할 X-ray에 의한 기체원자로부터 전리한 전자를 양극선의 근방에서 gas로 증폭시켜서, X선 광자를 전자파로서 검출한다. One Dimensional Position Sensitive proportional Detector(일차원민감형검출기) : 1D-PSD (model No. 7860, Rigaku Denki Tokyo)는 기체 증폭이 양극선상의 특정한 위치를 결정하는 검출기이다. 회절상의 장력시간 변화도 같은 시간대에 동시에 측정된다. 또 전류치와 시료에 입사하는 X-ray 강도도 기록된다. 시료와 검출기 사이의 거리는 측정하고자 하는 반사내역은 분리하여 기록할 수 있도록 약 2.4 m으로 하였다. PSD에 의한 1차원 회절상의 신호를 computer에 접속한 CAMAC(model No. 3588,

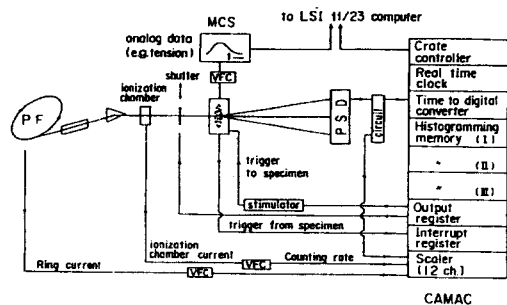


Fig. 1. The principle of data acquisition system of the small-angle X-ray diffractometer at the Photon Factory in Japan.

LecRoy Research System S.A., Switzerland) 기억장치에 시간의 함수로서 저장하였다. 생체 근육으로부터 X-ray 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.

2.2. 실험방법

Glycelin 처리한 토끼골격근(Glycelin 처리후 1-2주 이내)을 0.3mm정도 두께로 사용하였다. 근육의 크기는 길이가 4-5cm 로 두께는 약 1mm정도이다. 근육은 백금선을 나란히 자극전극으로 준비한 시료 cell의 한쪽 끝에 연결하였다. 시료의 다른 한쪽 끝에는 측정장치가 있는 금속에 수술용 실을 연결하였다. 근절의 길이는 He-Ne Laser의 광회절법으로 가는 filament와 굵은 filament가 충분히 결합된 길이(2.2-2.4 m)로 조정하였다. cell 중에 양쪽끝을 고정시켜 이완용액을 흘려 보낸 후, 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)-iodo acetamide와 N-(1-oxy-2,2,6,6-tetramethyl-4-piperidiny)-maleimide이며, 전자는 IASL, 후자는 MSL로 칭하고, Control 시약의 경우는 UL이라한다. spin label 은 적어도 SH-1에 label되어져 있다. 먼저 control 시약을 cell 안에 20분간 순환시켜 X-ray를 투과하여 반응한 X-ray 회절상을 얻은 후 전자스핀공명(ESR)측정에 이용된 시료와 같이 제조된 IASL spin label 시약을 실험용 cell 안으로 약 30분간 순환시킨다. MSL spin label 시약도 같은 방법으로 순환시킨다. 다음은 반응된 근육을 X-ray를 투과하여 실험하였다. 즉, myosin head의 SH 에 반응시켜 토끼 근육에 X-ray를 투과하여 spin label에 의한 영향을 비교하였다. X-ray 회절은 일본 PF의 방사선 X-ray와 카메라 및 image plate를 사용하여 행하였다. X-ray와 시료와의 거리는 190cm, 노출 시간은 3분이었다. 온도는 25°C와 0°C에서 실험하였다.

Control 시약 조성(UL) : 80mM K-propionate imidazole, HCl buffer, 6mM Mg-acetae, 5mM EGTA, 5mM Na₂ ATP(pH

7.0)

Spin label 시약 조성(IASL, MSL) : 50ml KCl안에 300 m-MSL, IASL, 1mM MgCl₂ 10mM imidazole(pH 7.0)

3. 결과 및 고찰

Image plate의 디지털 데이터를 X-Y방향으로 저장하였고, 전체강도로 다른 데이터를 전부 규격화시켜 각각의 3개의 데이터가 가산되었다. 본 연구에서는 X-ray 회절상과 적도반사, myosin 반사, actin반사의 강도실험결과를 비교하였다.

3.1. 온도변화에 의한 X선 회절상

근육골격의 X-ray 회절상은 굵은 filament와 가는 filament의 나선구조에 의해 2개의 층선반사로부터 형성된다. 이것은 수학적으로 계산하면 나선구조가 Fourier함수에 의한 변화된 불연속선 층선 분포가 이루어짐을 의미한다[6]. 적도 반사는 근육의 구조를 장축에 따라서 적도면에 투영한 구조를 반영하고, 자오반사는 근 선유축에 수직으로 투영한 근육의 구조를 반영한다 [16]. 이 2개의 층선 반사는 양 filament의 구조 주기가 다르기 때문에 일반적으로 분리형으로 관측된다. 근육의 장축과 수직인 면, 즉 적도면 위에 나타나는 굵은 filament와 가는 filament의 6방배열에 의한 (100)면과 (110)면으로 부터의 반사와 적도축에 수직인 중앙축, 즉 자오선 위에 나타난 굵은 filament와 crossbridge의 주기 구조로부터 143Å과 215Å 자오반사가 나타나는데, 이 2개의 반사는 myosin filament의 기본주기(430Å)의 3차 2차반사에 해당한다.

Fig. 2에서 적도반사(10,11)는 근육의 구조를 장축에 따라서 적도면에 투영한 구조를 반영한다. 2개의 층선반사는 양쪽 filament의 구조주기가 다름에 따라 일반적으로 분리된 형태로 나타난다. 143Å 자오반사는 굵은 filament에서 튀어나온 2개의 head로부터 myosin-crossbridge의 규칙배열로부터 오는 반사로, 근육이 수축하면 매우 약하게 된다. 이들 반사를 선택한 이유는 이것의 강도변화가 crossbridge의 움직임과 filament축에 따라 투영구조의 변화에 대한 정보를 제공한다. 또한 이것과 구조변화를 직접적으로 반영하기 때문이다. 59Å, 51Å 반사는 전부

actin monomer의 반사이다. 이완상태에서는 actin과 myosin이 떨어져 있기 때문에 각각의 위치에서 관찰된다. 215Å, 143Å, 72Å 반사는 myosin으로부터 오는 반사이다.

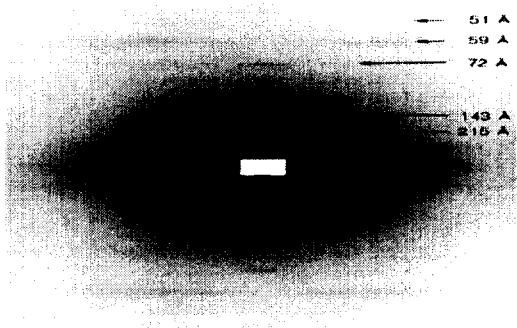


Fig. 2. X-ray diffraction pattern of glycerinated rabbit muscle fibers in rest state(UL) between 25°C to 0°C.

Fig. 3에서는 iodo acetamide(IASL) 시약을 반응시킨 후 X-ray를 통과시켜 결과를 나타내었다. 역시 Fig. 2과 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.

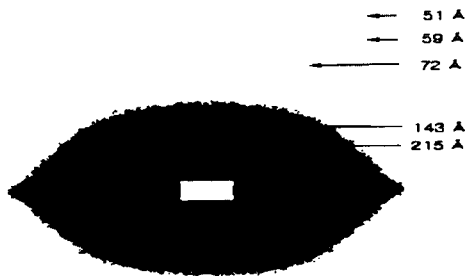


Fig. 3. X-ray diffraction pattern of iodo acetamide(IASL) between 25°C to 0°C.

Fig. 4은 maleimide(MSL)시약을 반응시킨 후 X-ray를 통과시켜 결과를 나타내었다. Iodo acetamide 시약과 반응한 Fig. 3와 비교해서 총

선 반사가 강하게 나타나고 있다. 그러나 이완 상태보다는 매우 희미하게 보인다. 위의 X-ray pattern이 다르게 나타내는 것은 spin label의 진행과정으로 보여지며, 결과적으로 maleimide(MSL) 시약반응에서 iodoacetamide (IASL) 시약반응으로 진행될 수 있다는 것을 시사한다. 이것은 maleimide시약을 장시간 두면 Fig. 2처럼 결국 총선 반사가 약해 질 수 있다는 것을 시사하고 있다. 이러한 각 총선 반사가 약해지는 요인으로 여러 가지가 있다. 먼저 이완상태에서 오랜시간 동안 반응시키면 자연적으로 근육의 경직현상이 있을 수 있다[17].

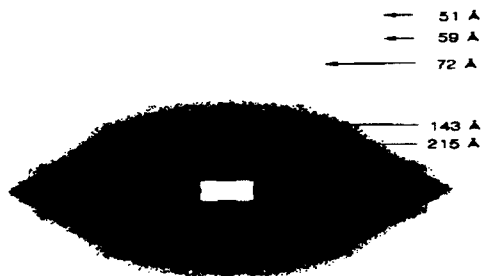


Fig. 4. X-ray diffraction pattern of maleimide(MSL) between 25°C to 0°C.

그러나 같은 반복 실험을 통하여 반사가 약해지는 근육은 실험 데이터에서 제외시켰다. 또 다른 요인으로는 근육 fiber간의 당기는 현상으로 있지만 극히 미미한 영향을 미치기 때문에 무시해도 된다. 하지만 실험결과 데이터를 면밀히 검토하여 이러한 현상이 보이는 데이터도 제외시켰다.

3.2. 적도반사 비교

적도반사는 filament 육각배열에 의한 결정반사(100)면과 (110)면으로부터의 반사이며, 이것은 굵은 filament와 가는 filament와의 crossbridge관계를 나타낸다. 적도면을 중심으로 한 근육의 총선구조를 보면 굵은 filament로부터 나온 myosin돌기의 배열은 굵은 filament안의 myosin분자에 의해 지배를 받는다.

육방격자에 의한 10, 11반사에 의한 data를 나타내었다. Fig. 5에 나타낸 것처럼 11/(10+11)

는 10반사와 11반사의 상대비교비이다. 그 결과 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 level 하면 control(UL)에 비하여 반 정도밖에 되지 않는다. 이강도비의 변화는 11반사의 50%가까이 증가되었다.

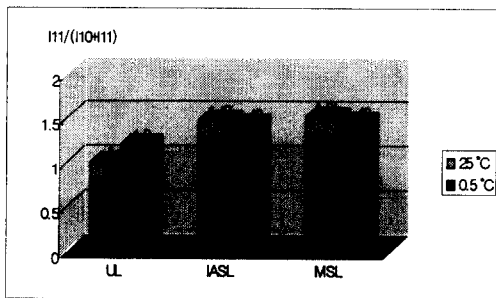


Fig. 5. The intensity profiles of 10,11 equatorial reflection(UL, IASL, MSL).

3.3. Myosin 자오선반사

근육의 장축과 수직인 면, 즉 적도면 위에 나타나는 굵은 filament와 가는 filament의 6방배열에 의한 (100)면과 (110)면으로부터의 반사와 적도축에 수직한 중앙축, 즉 자오선 위에 나타난 굵은 filament의 crossbridge의 주기 구조로부터의 143Å과 215Å 자오선반사이다. 이것의 반사는 crossbridge의 움직임과 구조변화를 직접적으로 반영한다[18].

Fig. 6에서 자오선반사 주기의 2차(215Å 반사), 3차(143Å 반사), 6차(72Å 반사)로 측정되었다. myosin자오선반사에 관하여 IASL, MSL도 215Å 반사가 약하게 나타났다. myosin기본주기의 3차, 6차의 반사는 IASL에서 반정도 내려간다. 한편, MSL에는 이것의 반사강도를 현저하게 증가를 나타내었고, 특히, 143Å 반사의 강도를 80%정도 증가를 나타내었다. 이 변화는 filament축에 따라서 있는 myosin-crossbridge의 분포가 변하였고, filament축에 수직으로 투영한 질량분포가 143Å 주기로 증가 되는 것을 시사한다. 이러한 143Å 주기 변화는 myosin의

대표적인 것으로 crossbridge의 변화를 의미한다. 이것은 myosin head의 SH가 변화를 나타낸 것으로 myosin head가 actin으로부터 멀리 떨어져 있다는 것을 알 수 있다.

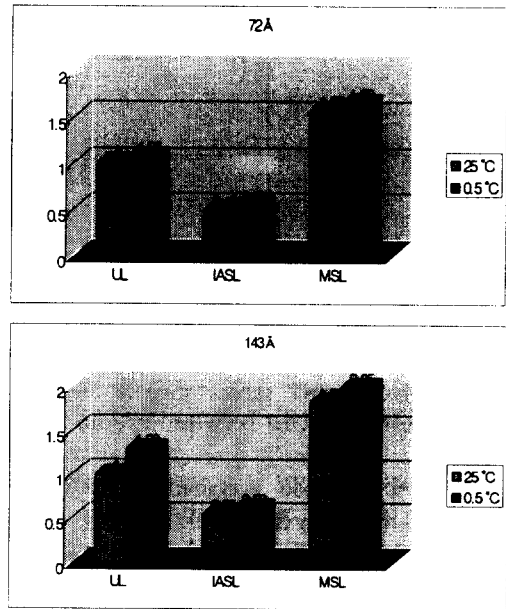


Fig. 6. The intensity profiles of 72Å, 143Å meridional reflection(UL, IASL, MSL).

3.4 .Actin 층선반사

27Å 자오선반사는 최근접 actin monomer의 축방향 상응하는 반사이며 59Å, 51Å 반사는 전부 actin monomer의 반사이다. Fig. 7에서 actin monomer반사로부터 59Å, 51Å 반사를 측정하였다. actin monomer반사에 관해서도 같이 IASL은 반정도이하로 강도가 떨어지지만 MSL은 특히 59Å 반사가 60%정도 상승하였다. 이러한 결과는 IASL의 반응은 actin이 myosin head와 떨어져 있다는 것을 나타내고 있다. 즉 actin과 myosin의 crossbridge의 관계가 spin label 시약에 영향을 받는다는 것을 알 수가 있었다. 그러나 MSL의 반응은 actin과 myosin의 crossbridge의 관계가 구조적으로 변화하였다는 것을 나타낸다. 즉, myosin head가 actin과 결합이 되었다는 할지라도 결합각도가 변했다고 볼 수 있다. 이러한 변화관계는 spin label 시약의 효과에 대한 중간과정으로 볼 수가 있다.

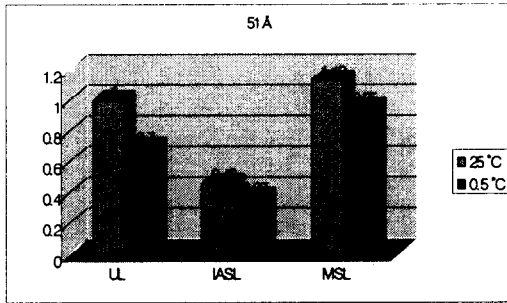


Fig. 7. The intensity profiles of 51 Å, 59 Å actin-based reflection (UL, IASL, MSL).

4. 결론

본 실험결과 spin level에 의한 온도영향에서 X-ray를 통하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

IASL, MSL은 이완상태에서 myosin head의 규칙적인 나선 배열은 흐트러진다. 특히 IASL은 그 효과가 매우 크다. 적도반사의 변화로부터 myosin head는 spin label하는 것에 의해 actin filament 지역에 이동해 있음을 알 수 있었다. 215 Å 반사의 감소는 spin level에 의한 myosin의 143 Å 주기성을 더욱 강하게 해 준다. 143 Å, 72 Å의 거동은 filament측으로부터 투명한 구조를 반영하기 때문에 IASL은 143 Å 주기의 밀도분포가 완만하게 되어 있다는 것을 나타내고 MSL에는 143 Å 분포가 올라와 있다는 것을 알 수 있었다. spin level에 의한 온도영향으로 가정 할 수 있는 것 온도의 영향으로 actin 반사변화에서 MSL의 actin반사의 증가는 이동한 myosin head가 어떤 actin과 결합하였거나, 혹은 spin level의 영향으로 actin의 구조가 변화되었다는 알 수 있었다. 한편, IASL은 actin 반사를 감소시키기 때문에 myosin head의 결합을 하지 않았다. 결론적으로 이것은 actin의 SH 기에도 spin label되어 actin의 나선구조가 크게 흐트러짐을 알 수 있었다.

참고문헌

1. H. E. Huxley, *Science*, **164**, 1356 (1969).
2. H. E. Huxley, A. R. Farqi and M. Brown,

J. Mol. Biol., **30**, 384 (1967).

3. H. E. Huxley, R. M. Simmons, A. R. Farqi, and M. Kress, *J. Bordas, Mol. Biol.*, **169**, 469 (1982).
4. H. E. Huxley, A. R. Farqi, M. Kress, J. Bordas, and M. H. J. Koch, *J. Mol. Biol.*, **158**, 637 (1985).
5. Y. Amemiya, K. Wakabayashi, T. Hamanaka, T. Wakabayashi, T. Matsushta and H. Hashizume, *Nucl. Instrum. Methods*, **208**, 471 (1983).
6. K. Wakabayashi and Y. Amemiya, *Handbook on Synchrotron Radiation*, Vol. 4, pp. 597-678, North Holland, Amsterdam, (1991).
7. K. Wakabayashi, H. Tanaka, T. Kobayashi, T. Hamanaka, S. Nishizawa, H. Sugi, and T. Mitsui, *Biophys. J.*, **49**, 581 (1986).
8. I. Matsubara and N. Yagi, *J. Physiol.*, **361**, 151 (1985).
9. J. J. Harford and J. M. Squire, *Biophys. J.*, **63**, 387 (1982).
10. H. Iwamoto, T. Kobayashi, Y. Amemiya, and K. Wakabayashi, *Biophys. J.*, **68**, 227(1995).
11. G. R. S. Naylor and R. J. Podolsky, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 5559 (1981).
12. S. Malinchik and L. C. Yu, *Biophys. J.*, **68**, 2023 (1995).
13. H. Tanaka, T. Kobayashi, Y. Amemiya, and K. Wakabayashi, *Biophys. Chem.*, **25**, 161 (1986).
14. K. Hirose, T. D. Lenart, J. M. Murray, C. Franzini-Armstrong, and Y. E. Goldman, *Biophys. J.*, **65**, 397 (1993).
15. S. Takemori, M. Yamaguchi, and H. Yagi, *J. Biochemistry.*, **117**, 603 (2002).
16. P. R. Fajer, L. H. Bennett, C. F. Polnaszek, E. A. Fajer, and D. D. Thomas, *J. Magn. Reson.*, **88**, 111 (1990a).
17. O. Roopnarine, K. Hideg, and D. D. Thomas, *Biophys. J.*, **64**, 1986 (1993).
18. J. J. Matta, and D. D. Thomas, *Biophys. J.*, **61**, 295 (1992).