

골격근 actomyosin superprecipitation에 대한 magnesium ion의 역할에 관한 실험적 연구

An experimental study on the role of Mg ion on the actomyosin
superprecipitation in the skeletal muscle

서울대학교 의과대학 의과학교실

〈지도: 박 길 찬 송 교수〉

오 수 명

서 론

근육의 수축과 이완은 actin과 myosin의 상호작용 즉 association과 dissociation으로 생각되고 있으며 이들의 시험관 내에서의 현상을 actomyosin의 superprecipitation(혹은 syneresis)과 clearing으로 각각 불리우고 있다.

즉 근수축(superprecipitation)은 actin과 myosin의 association으로 myosin이 가지고 있는 낮은 ATPase 활성도가 actin에 의하여 촉진됨으로서 ATP 분해가 maximum에 달하여 이때 나오는 energy에 의하여 양자 사이에 cross-bridge¹⁾가 형성되는 것으로 주장되고 있으며 근이완은 actin과 myosin의 dissociation으로 myosin의 ATPase 활성도가 actin에 의하여 활성화되지 못하여 cross-bridge가 형성되지 못한 때문이라고 생각되고 있다^{2), 3)}.

그러므로 actin과 myosin의 상호작용(association 및 dissociation)은 actomyosin의 ATPase 활성도를 조절 하므로써 가능하며 따라서 이에 영향을 미칠 수 있는 요인들 즉 ionic strength, Mg⁺⁺농도 및 ATP 농도가 actomyosin의 ATPase 활성도와 superprecipitation에 미치는 효과에 관한 연구가 많이 보고되었다.^{4), 5), 6), 7), 8)}

즉 actomyosin의 ATPase 활성도는 ionic strength가 낮을 때는 촉진되어 곧 superprecipitation이 일어나

지만 ionic strength가 높을 때는 이 효소의 활성도가 억제되고 따라서 actin-myosin의 dissociation을 초래하여 clearing phase가 연장되어 superprecipitation이 저연됨이 보고되었다.

또한 Mg⁺⁺ 역시 고농도에서는 actin과 myosin의 association을 억제하여 ATPase 활성도를 억제하여 clearing phase를 연장시키고 저농도에서는 actomyosin의 ATPase 활성도를 촉진시켜 곧 superprecipitation이 일어남이 보고 되었고 이같은 actin과 myosin의 상호작용은 ATP 농도 변화에 의해서도 일어남이 보고되었다.

한편 Ebashi^{9), 10)}는 natural actomyosin(actin과 myosin 이외 troponin과 tropomyosin이 포함된 복합단백질)의 superprecipitation이 미량의 Ca⁺⁺ 농도 변화에 예민한 영향을 받음을 보고하였다. 즉 Ca⁺⁺ 농도가 증가하면 superprecipitation은 촉진되고 Ca⁺⁺ 농도가 저하되면 반응이 억제 내지 상당히 저연됨을 관찰하였다.

또한 Katz¹¹⁾도 순수한 reconstituted actomyosin에 native tropomyosin(tropomyosin과 troponin의 복합단백질)을 첨가하여 actomyosin의 Mg⁺⁺ activated ATPase 활성도가 미량의 Ca⁺⁺ 변화에 예민한 영향을 받는다고 보고하였다.

그러나 actin과 myosin의 상호작용이 시험관 내에서 ionic strength 및 Mg⁺⁺과 ATP의 농도변화에 의해서 조절될 수 있으나 매우 다량의 변화에 의해서만 가능하므로 근육세포의 생리적 기능으로 보아 이같이 많은 양의 조절은 불가능하며 따라서 근육세포가 조절할 수 있

*서울대학교 의과대학 의과학교실

** " 약리학교실

는 미량의 변화에 의해서 ATPase 활성도를 조절시킬 수 있는 Ca^{++} 이 excitation-contraction coupling에 있어서 최종적인 trigger의 역할을 한다고 주장되고 있다^{9, 12)}.

그러나 actin과 myosin의 상호작용에 영향을 미칠 수 있는 상기 요인들의 개별적인 작용에 관해서는 많은 보고가 있지만 이들 요인들 사이에 있어서의 상호관계에 대한 연구는 별로 보고된 바 없는 것으로 생각된다.

따라서 본 실험에서는 이들 요인들 가운데에서 특히 Mg^{++} 의 superprecipitation에 있어서의 작용과 Ca^{++} 의 작용에 미치는 영향 및 이 양이온이 균 수축과 이완에 있어서의 영향과 양자사이의 상호관계를 관찰하여 다음과 같은 성적을 얻어 이에 보고하는 바이다.

실험 방법 및 재료

1) Natural actomyosin

수정된 Ebashi¹³⁾ 방법으로 토끼 등 근육에서 추출한 actomyosin을 사용하였다. 최종 KCl 농도는 0.6M로 하고 동량의 glycerol과 혼합하여 -20°C 에서 보관한 후 매 실험 때마다 50 mM KCl, 5 mM Na_2EDTA , Tris-Maleate buffer pH 6.8로 한 용액 9 volume에 저장 actomyosin 1 volume의 비율로 넣고 14,000×g로 20분간 원심 분리하여 실험에 사용하였다.

2) Superprecipitation의 측정

반응조건은 100 mM KCl, 20 mM Tris-Maleate buffer pH 6.8로 했으며 Ca^{++} 은 따로 첨가하지 아니하였으며 반응액 중에 contamination되어 있는 것으로 대신하였다.

actomyosin은 반응액 매 ml 당 0.5mg protein이 되도록 하였고 0.5 mM ATP를 첨가하여 반응을 시작하였으며 Mg^{++} 농도 조절은 저농도의 경우 Mg^{++} 을 따로 첨가하지 않고 EDTA(ethylene diamine tetraacetic acid)를 반응액에 넣어 조절하였으며 고농도의 경우에는 실험에서 지시하는 농도로 Mg^{++} 을 첨가하여 반응액의 총량을 3 ml로 하였다.

Superprecipitation 정도는 Hitachi Perkin-Elmer spectrophotometer를 사용하여 545 m μ 에서 optical density의 변화를 측정하고로서 정하였으며 spectrophotometer에 Sargent linear log gear recorder를 연결하여 계속적으로 optical density의 변화를 기록하였다. 상기 모든 조작은 실온에서 행하였고 protein 농도 측정은 Biuret method를 사용하였다.

3) Ca^{++} 농도 조절

전 실험 과정을 통하여 Ca^{++} 은 별도로 첨가하지 아니하였으며 반응액 중의 Ca^{++} 농도는 시약, 단백질 및 물 속

에 포함된 Ca^{++} 에 의하여 약 10 μM 정도라고 추정한 Katz¹⁴⁾의 보고에 준하였다.

최종 기대하는 유리 Ca^{++} 농도 0.1 μM ~10 μM 을 얻기 위하여 용액중의 ATP⁻⁴와 Ca^{++} 과 salt를 형성하고 남은 유리 Ca^{++} 에 EGTA(glycoletherdiaminetetraacetic acid)를 추가로 첨가하여 조절하였다.

첨가되는 EGTA 농도는 Katz¹⁴⁾의 방법에 의하여 박¹⁵⁾등이 유도한 다음 공식을 이용하였다.

$$\text{즉 } Z = \frac{10^{-6} + 9.96 \times [\text{Ca}^{++}] - 45.7 \times 10^4 \times [\text{Ca}^{++}]^2}{4.4 \times 10^5 \times [\text{Ca}^{++}]}$$

Z: the amount of EGTA to be added to achieve the desired free Ca^{++} concentration

[Ca^{++}]: the desired free Ca^{++} concentration

본 실험에서 25 μM 의 EGTA를 첨가하였을 경우 위 공식에 의하면 free Ca^{++} 농도가 약 $2 \times 10^{-6}\text{M}$ 이 될 것으로 추정하였다.

*¹⁵⁾ 위 공식을 유도하는데 다음과 같은 상수를 이용하였다.

pH 6.8에서

a) dissociation constant of 4th H⁺ of ATP=10^{-6.79}

b) (ATP^{-4})/(ATP^{-3})=0.63

c) binding constant for Mg^{++} and ATP^{-4} =8.8×10⁴

d) binding constant for Ca^{++} and ATP^{-4} =3.15×10⁴

e) binding constant for Ca^{++} and EGTA=4.4×10⁵

본 실험에 사용된 단백질은 3마리의 토끼에서 얻어진 것이고 매 단백질 preparation에서 8회 이상 실험하여 그 평균치를 표시한 것이다.

실험에 사용된 시약은 EGTA만 Eastman 제품이고 나머지는 모두 Merck 회사 제품을 사용하였다.

실험 성 적

1) Natural actomyosin superprecipitation에 있어서의 Mg^{++} 의 역할

반응액 속에 Mg^{++} 을 추가로 첨가하지 아니하고 ATP에 의하여 반응을 일으켰을 때 superprecipitation은 즉시 일어났다.(Fig 1)

그러나 반응액 속에 5 mM의 EDTA를 첨가하였을 경우 superprecipitation은 완전히 억제되었다(Fig 1) 이 같이 억제된 반응은 6 mM의 Mg^{++} 을 첨가하므로서 superprecipitation을 다시 일으킬 수 있었다(Fig 1)

2) Mg^{++} 이 첨가되지 않은 조건에서 EDTA가 actomyosin superprecipitation에 미치는 영향

반응액에 Mg^{++} 을 첨가하지 않고 ATP에 의하여 반응을 일으켰을 경우 superprecipitation은 그림 1에서와 같

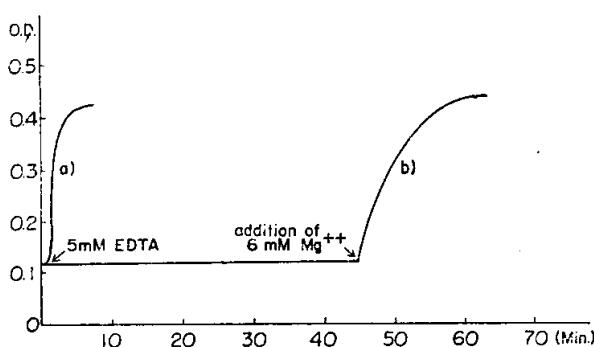


Fig. 1. Role of Mg^{++} in the superprecipitation of natural actomyosin. Medium contained 20 mM Tris-Maleate buffer pH 6.8, 100 mM KCl and 0.5 mM ATP. a) Superprecipitation of actomyosin was completely inhibited by 5 mM EDTA(ethylenediaminetetraacetic acid) but addition of 6 mM Mg^{++} initiated the superprecipitation.

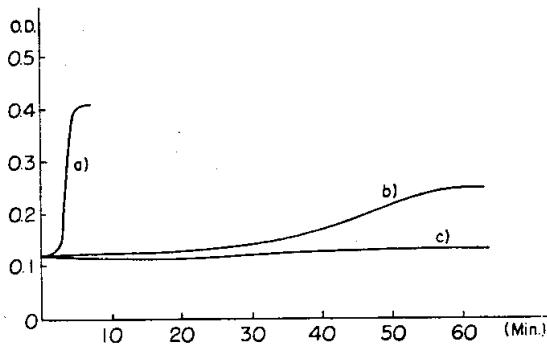


Fig. 2. Effect of EDTA on the superprecipitation of actomyosin in condition without addition of Mg^{++} . Medium contained 20 mM Tris-Maleate buffer pH 6.8, 100 mM KCl and 0.5 mM ATP. No Mg^{++} was added. a) no EDTA, b) 1 mM EDTA, c) 3 mM EDTA.

이 즉시 일어났으나 EDTA 를 첨가하므로서 superprecipitation 은 억제를 보여 maximum 에 도달된 혼탁도가 EDTA 를 첨가하지 아니하였을 때보다 낮았으며 EDTA 에 의한 이 같은 억제현상은 EDTA 농도가 높을 수록 현저하였다. (Fig 2).

3) Mg^{++} 이 actomyosin의 superprecipitation 과 clearing에 미치는 영향

Mg^{++} 을 반응액에 첨가하지 아니하였을 경우나 혹은 여기에 EDTA 를 첨가하였을 경우에는 superprecipitation 이 일어나는 정도 즉 maximum 에 도달된 혼탁도와 maximum 혼탁도에 도달되는 시간에 있어서만 차이를

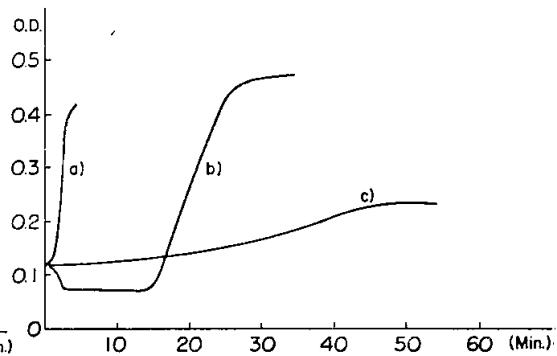


Fig. 3. Effect of Mg^{++} concentration on the superprecipitation and clearing of actomyosin. Medium contained 20 mM Tris-Maleate buffer, 100 mM KCl and 0.5 mM ATP. a) no Mg^{++} added, b) 5 mM Mg^{++} added and c) 1 mM EDTA without addition of Mg^{++}

보여 주었으나 5 mM Mg^{++} 을 첨가하여 반응 시켰을 경우에는 superprecipitation 이 일어나기 전에서 ATP 첨가 전 혼탁도 보다 오히려 하강된 혼탁도를 보여주는 소위 clearing 현상을 나타내었다(Fig 3).

즉 낮은 농도의 Mg^{++} 존재하에서는 superprecipitation 은 clearing 을 수반하지 않고 반응이 일어났으며 그 반응 정도는 Mg^{++} 농도에 비례하였으나 Mg^{++} 농도가 과량인 경우에는 최종 maximum 혼탁도는 Mg^{++} 을 첨가하지 않은 경우와 같거나 혹은 더 높은 값을 보여 주고 있지만 superprecipitation 이 일어나기 전 clearing 을 동반하여 반응의 지연을 보인 후 superprecipitation 은 maximum 에 도달하였다(Fig 3).

4) Mg^{++} 농도가 actomyosin clearing 현상에 미치는 영향

Mg^{++} 을 반응액에 첨가하지 않은 경우 ATP에 의한 superprecipitation 은 clearing 을 수반하지 않고 곧 반응이 일어났으나 점차 Mg^{++} 농도를 증가시키므로서 반응은 지연되었다. 1 mM의 Mg^{++} 존재하에서는 clearing 을 보여줌으로서 더욱 반응이 지연되었으며 이는 Mg^{++} 농도가 증가할수록 더욱 현저하였다. 따라서 maximum 혼탁도에 도달되는 시간도 Mg^{++} 농도가 증가될수록 더욱 연장되었다.

5) Mg^{++} 농도가 actomyosin의 Ca^{++} -sensitivity에 미치는 영향

Mg^{++} 을 반응액에 첨가하지 않고 ATP로 superprecipitation 을 일으켰을 경우 역시 반응은 즉시 일어났으며 여기에 EGTA 25 μM 을 첨가하여 반응액의 Ca^{++} 농도를 약 10 μM 에서 $2 \times 10^{-6} M$ 로 낮추었을 경우 super-

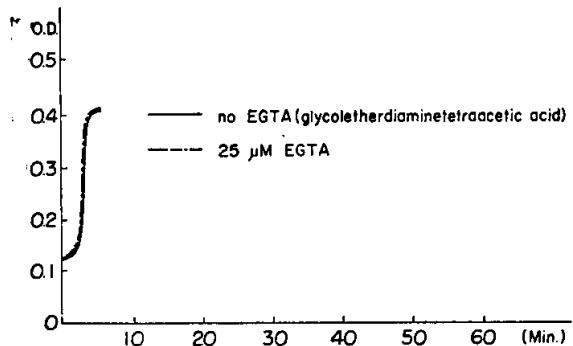


Fig. 4. Effect of Mg^{++} on the Ca^{++} sensitivity of natural actomyosin. Medium contained 20 mM Tris-Maleate buffer, 100mM KCl and 0.5 mM ATP. no Mg^{++} was added.

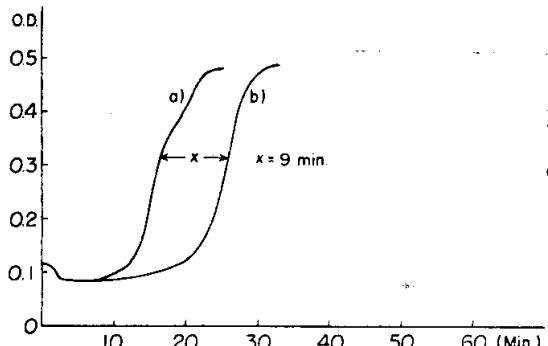


Fig. 6. Effect of Mg^{++} on the Ca^{++} sensitivity of actomyosin. Medium conditions: same as in case of Fig. 4 except the presence of 1mM Mg^{++} . a) no EGTA b) 25 μM EGTA.

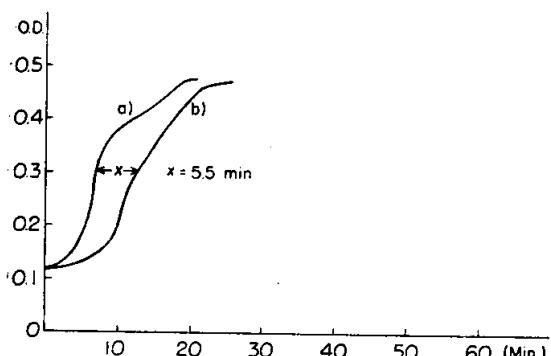


Fig. 5. Effect of Mg^{++} on the Ca^{++} sensitivity of actomyosin. Medium conditions: same as in case of Fig. 4 except for the presence of 100 μM Mg^{++} a) no EGTA b) 25 μM EGTA.

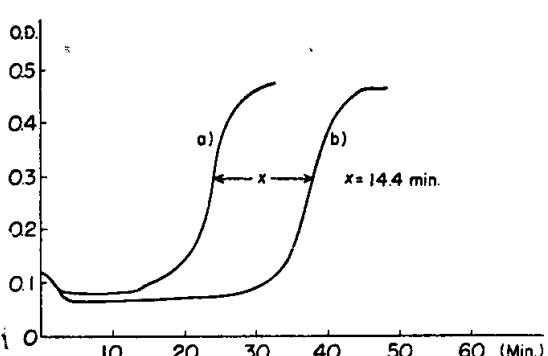


Fig. 7. Effect of Mg^{++} on the Ca^{++} sensitivity of actomyosin. Medium conditions: same as in case of Fig. 4 except for the presence of 5 mM Mg^{++} , a) no EGTA b) 25 μM EGTA.

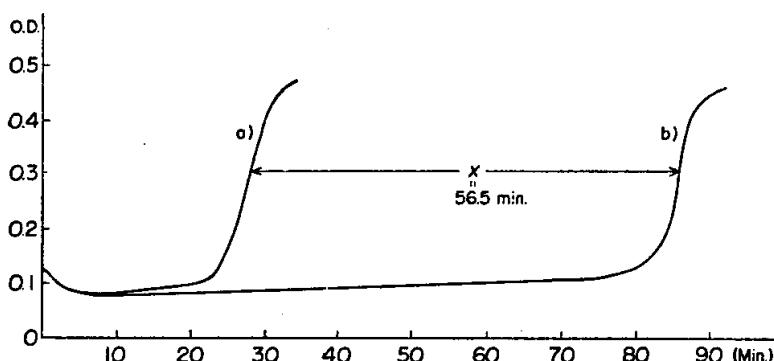


Fig. 8. Effect of Mg^{++} on the Ca^{++} sensitivity of actomyosin. Medium conditions: same as in case of Fig. 4 except for the presence of 10mM Mg^{++} . a) no EGTA b) 25 μM EGTA.

precipitation에 전혀 영향을 미치지 아니하였다(Fig 4) 그러나 반응액의 Mg^{++} 의 농도를 점차 증가시킬 수록

superprecipitation의 반응시작이 점차 지연되 있으며 여기에 EGTA를 첨가하였을 경우 Mg^{++} 농도가 증가 할수

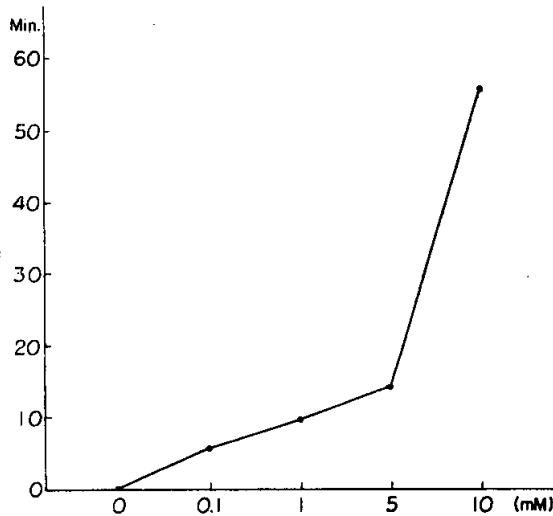


Fig. 9. Effect of Mg⁺⁺ concentration on the Ca⁺⁺ sensitivity of actomyosin. The Ca⁺⁺ sensitivity was determined by the method illustrated in Fig. 4 to 8. The ordinate indicates the differences between the times required for the increase in the turbidity of the reaction mixture to reach the half-maximum values after addition of ATP in the presence of high and low concentration of Ca⁺⁺ controlled by EGTA, viz., the length of shown in Fig. 4 to 8. The abscissa indicates the concentration of Mg⁺⁺.

즉 반응액의 Ca⁺⁺농도 감소에 예민한 반응을 보여주었다. (Fig 5, 6, 7, 8)

이 같은 Ca⁺⁺ 농도 감소에 대한 superprecipitation에 미치는 영향 즉 Ca⁺⁺-sensitivity 를 EGTA를 첨가하지 않은 경우와 첨가한 경우에 있어서 각 superprecipitation 이 half-maximum에 도달되는 시간의 차이를 표시하였을 경우 다음과 같다. (Fig 9)

Mg⁺⁺을 첨가하지 아니하였을 경우 0분이었고 100μM, 1 mM, 5 mM Mg⁺⁺ 존재하에서는 각각 5.5분 9.0분 14.4분으로 점차 증가하였으며 10 mM Mg⁺⁺에서는 56.5 분의 현저한 Ca⁺⁺-sensitivity 를 보여주었다. (Fig 9)

고 칠

본 실험에서 반응액 속에 Mg⁺⁺이나 Ca⁺⁺을 추가로 첨가하지 아니하고 ATP에 의하여 반응을 일으켰을 경우 superprecipitation은 즉시 일어났으나, 5mM의 EDTA를 첨가하였을 때는 완전히 억제되었으며 이 같이 억제된 반응은 Mg⁺⁺의 첨가로서 superprecipitation을 다시 일으킬 수 있었다. (Fig 1)

Maruyama 와 Watanabe¹⁶⁾ 역시 반응액에 Mg⁺⁺과 Ca⁺⁺을 첨가하지 아니하고 ATP에 의해서 superprecipitation이 일어남을 관찰하고 이때의 superprecipitation은 여러 chelating agent에 의하여 억제되나 그 억제 정도에 있어서 DCTA>EDTA>EGTA≈NTA의 순서임을 밝히고 또한 이 같은 억제는 소량의 Mg⁺⁺에 의하여 회복되나 Ca⁺⁺에 의해서는 회복되지 아니함을 보고 하였다.

따라서 Mg⁺⁺과 Ca⁺⁺의 첨가없이 ATP에 의하여 일어난 superprecipitation은 Ca⁺⁺에 의한 것이 아니고 actomyosin suspension에 이미 존재하고 있는 소량의 Mg⁺⁺에 의한 것으로 생각되었으며 이는 또한 superprecipitation 즉 근수축에 있어서 Mg⁺⁺이 일차적인 요소인 것으로 추측되었다. 이 같은 사실은 actomyosin의 superprecipitation과 근섬유의 수축에 있어서 필요한 양(陽)이온은 Ca⁺⁺이 아니라 Mg⁺⁺이라고 밝힌 Watanabe 와 Sleator¹⁷⁾의 보고와도 일치하였다.

이상의 결과는 actomyosin superprecipitation은 Mg⁺⁺ activated ATPase의 활성도에 의존함을 말해주는 것으로 생각할 수 있겠다.

즉 Mg⁺⁺은 actomyosin ATPase를 활성화하는데 있어 기본적으로 필요한 cation이라고 할 수 있다. 그렇다면 Mg⁺⁺ 농도의 증가는 actomyosin ATPase 활성도와 비례할 것을 추측할 수 있겠다.

본 실험 Fig 2에서는 EDTA의 양을 3mM에서 1mM로 점차 줄임으로서 즉 Mg⁺⁺의 농도를 증가시킬 수록 superprecipitation은 촉진됨을 보여 주었고 전혀 첨가하지 아니하였을 경우 즉시 superprecipitation이 일어났다. 그러나 Mg⁺⁺을 5mM (physiological range in Mg⁺⁺ concentration) 첨가하여 반응시켰을 경우에는 superprecipitation에 앞서 clearing을 보여 주었다 (Fig 3).

actomyosin의 superprecipitation과 ATPase 활성도는 ionic strength 및 Mg⁺⁺과 ATP 농도가 높을수록 억제되고 농도가 낮을수록 촉진됨이 보고되었지만^{4, 5, 6, 7, 8)} 이 같은 현상이 가지는 근(筋) 생리의 기능적인 면에서 어떤 작용과 의미를 가지는지는 아직 밝혀지지 아니하였다.

본 실험의 Mg⁺⁺의 경우 superprecipitation의 primary essential factor로서 어느 한계까지 농도가증가하면 superprecipitation을 촉진하고 이 농도에서 더 증가하면 오히려 actin과 myosin의 dissociation을 초래하여 superprecipitation의 억제 즉 이완현상을 나타내는 dual effect를 가지고 있음을 알 수 있으나 후자의 작용 즉 근(筋) 수축에 있어서 essential factor로서 physiolog-

ical range의 농도에서 수축역제작용의 생리적 기능이 밝혀지지 않고 있다.

이같은 Mg^{++} 의 biphasic effect의 기전에 있어서도 아직 확실히 밝혀지지는 아니하였지만 Maruyama와 Watanabe¹⁶⁾는 actomyosin에 2개의 Mg^{++} -binding site가 있어서 superprecipitation을 야기시키는 site(I)와 superprecipitation을 억제시키는 site(II)가 있어서 site(I)에 binding되면 수축을 촉진하고 Mg^{++} 의 과량일 때는 site(II)에 binding되어 clearing이 일어난다고 주장하였다.

Ebashi^{9, 10)}는 natural actomyosin(actin과 myosin·이외 tropomyosin과 troponin이 포함된 복합 단백질)의 superprecipitation은 미량의 Ca^{++} 농도 변화에 의해 예민한 영향을 보임을 보고 하였고 Katz^{2, 5)}는 tropomyosin과 Ca^{++} 의 complex는 tropomyosin의 actomyosin ATPase 활성도가 억제작용을 약화시킴으로서 ATPase 활성도가 촉진되어 근수축이 일어난다고 보고하였다.

본 실험에서도 Mg^{++} 농도가 5mg 또는 10mg이 존재할 때는 EGTA 첨가에 의한 미량의 Ca^{++} 농도 변화($10^{-6} M$ 에서 $2 \times 10^{-6} M$)에 의하여 superprecipitation은 억제되어 예민한 Ca^{++} -sensitivity를 보여 주고 있다(Fig 7, 8) 그러나 같은 양의 Ca^{++} 농도 변화에 의한 Ca^{++} -sensitivity는 Mg^{++} 농도가 적어질수록 감소하여(Fig. 5, 6) Mg^{++} 을 반응액에 첨가하지 아니하였을 때는 전혀 Ca^{++} -sensitivity를 보여주지 아니하였다.(Fig. 4, 9) 이에 주목할 만한 사실은 Mg^{++} 에 의한 clearing 현상이 Mg^{++} 이 존재할 때만 Ca^{++} -sensitivity가 나타난다는 사실이며 Mg^{++} 농도의 증가에 의하여 clearing phase가 길어질수록 Ca^{++} -sensitivity는 증가함을 보여 주었다.

즉 Mg^{++} 은 actomyosin superprecipitation에 기본적인 역할을 할 뿐만 아니라 동시에 억제작용을 하는 이중적 효과를 가지고 있으며 한편 Mg^{++} 에 의하여 actomyosin의 Ca^{++} -sensitivity가 나타남은 Mg^{++} 에 의하여 억제된 actomyosin superprecipitation이 미량의 Ca^{++} 에 의하여 회복됨을 의미하는 것으로 해석할 수 있다.

근(筋) 수축의 시험관 내에서의 model을 superprecipitation이라고 생각함에는 여러 학자들간에 이견이 있는 것으로 보여지지만^{2, 18, 19, 20)} 이완현상의 model에는 아직도 의견을 달리하고 있어 Katz²⁾ 및 Gergely^{7, 8)} 등은 superprecipitation이 일어나기 전의 clearing phase를 이완현상이라고 생각하고 있고 박¹⁶⁾ 등은 superprecipitation이 진행 도중 Ca^{++} 감소에 의하여 superprecipitation curve의 하강을 실제 근(筋)이완에 가까운 model이라고 주장하고 있지만 본 실험의 경우 superprecipit-

ation이 일어나기 전의 clearing이 근(筋)이완현상이라고 한다면 근(筋)수축과 이완은 Mg^{++} 과 Ca^{++} 의 농도 변화에 의해서 조절될 수 있으며 Mg^{++} 의 경우 근(筋)세포의 생리적 기능상 처리하기에 거의 불가능한 과량의 농도변화에 의하여서만 가능하며 Ca^{++} 의 경우에는 근(筋)세포기능으로서 가능한 미량의 농도변화에 의하여 수축과 이완이 조절될 수 있음을 알수 있다.

과량 Mg^{++} 에 의한 근(筋)이완 작용 즉 clearing이 Watanabe¹⁶⁾가 주장한 site(II)에 의한 것인지 Katz^{2, 5)}가 주장한 tropomyosin을 통한 것인지는 알수 없지만, 어쨌든 Ca^{++} 에 의한 근(筋)수축작용과 이완작용 즉 본 실험에 있어서의 Ca^{++} sensitivity는 Mg^{++} 의 clearing effect가 존재할 때만 나타남을 알수 있다.

이상의 결과와 고찰로 미루어 Mg^{++} 은 superprecipitation 즉 근(筋)수축에 있어서 기본적인 역할을 담당할 뿐 아니라 적당한 농도에서 Ca^{++} -sensitivity를 나타내는 두 가지 작용을 통하여 근(筋)수축과 이완을 조절하는 역할을 담당하는 것으로 사료되었다.

결 론

1. Mg^{++} 이 actomyosin superprecipitation에 있어서의 작용과 Ca^{++} 의 작용에 미치는 영향을 관찰하였다.

2. Medium에 Mg^{++} 을 첨가하지 아니하여도 actomyosin의 superprecipitation은 ATP 첨가로 즉각 일어났으나 고농도의 EDTA에 의하여 완전히 억제된 superprecipitation이 Mg^{++} 첨가로 다시 반응이 일어났다.

3. 반응액에 Mg^{++} 을 첨가하지 않은 조건 하에 있어서의 superprecipitation은 EDTA의 농도가 증가할수록 반응은 억제되었다.

4. 낮은 농도의 Mg^{++} 저하존에서 superprecipitation은 억제되었으나 clearing을 수반하지 않고 반응이 일어났으며 Mg^{++} 농도가 높은 경우에는 superprecipitation이 일어나기 전에 clearing 현상이 선행되어 반응의 지연을 보인 후 superprecipitation은 maximum에 도달하였다.

5. Mg^{++} 에 의한 clearing phase는 Mg^{++} 농도에 비례하여 연장되었으며 따라서 superprecipitation의 지연도 Mg^{++} 농도에 비례하였다.

6. EGTA 첨가에 의한 Ca^{++} 농도의 감소에 대한 반응(Ca^{++} -sensitivity)은 Mg^{++} 의 농도가 증가 할수록 현저하였다.

이상의 실험 결과로 미루어 Mg^{++} 은 superprecipitation 즉 근(筋)수축에 있어서 기본적인 역할을 담당할 뿐 아니라 적당한 농도에서 Ca^{++} -sensitivity를 나타내는 두

가지 작용을 통하여 근 수축 및 이완을 조절하는 역할을 담당하는 것으로 사료되었다.

ABSTRACT

The experimental study on the role of Mg ion on the actomyosin superprecipitation in the skeletal muscle

Soo Myung Oh, M. D.

Department of surgery & pharmacology, Seoul National University, College of medicine, Seoul, Korea.

(Directors: prof. Kil Soo Park, M.D.
and assist. prof. Chan Woong Park, M.D.)

The dissociated actomyosin (clearing of actomyosin) probably constituted an in vitro model of resting muscle whereas the fully associated actomyosin(superprecipitated actomyssin) is analogous to the active muscle.

In contractile proteins composed of only actin and myosin, the state of association between the two proteins can be varied by several factors which are the changes in the concentrations of ATP, Mg, and salts. Among them, Mg⁺⁺ which, in low concentration behaves as an primary essential factor in the association of actomyosin, induces the dissociation of actomyosin in high concentration which is interestingly the concentration of physiological range.

This biphasic effect of high concentration is still more obscure in the physiological role of muscular contraction and relaxation.

In order to elucidate the role of Mg⁺⁺ in physiological function of muscle, present study observed the effect of Mg⁺⁺ on actomyosin superprecipitation under the influence of minute change in Ca⁺⁺ concentration which appears to be a final physiological triggering in the excitation-contraction coupling.

The results are summarized as follows:

1. ATP induced the superprecipitation of actomyosin suspension, even when neither Mg⁺⁺ nor Ca⁺⁺ was added. Addition of EDTA inhibited the superprecipitation completely, but this inhibition was reversed by the addition of Mg⁺⁺.

2. Inhibition of superprecipitation in condition w-ith no Mg⁺⁺ added, was proportional to the concentration of EDTA.

3. Both low and high concentrations of Mg⁺⁺ in-

hibited the superprecipitation but in differert manner; in the former, the superprecipitation was not preceded by clearing phase and in the latter, was preceded by it.

4. The duration of clearing phase was proportional to Mg⁺⁺ concentration.

5. The Ca⁺⁺ sensitivity of actomyosin to EGTA was showed only in the presence of Mg⁺⁺ and also proportional to Mg⁺⁺ concentration.

6. It is suggested that Mg⁺⁺ may have a biphasic effect in muscle function: it was required for the onset of superprecipitation as a primary essential factor but in excess, it gave the actomyosin Ca⁺⁺-sensitivity which may play a role in muscle relaxat-ion.

REFERENCES

1. Huxley, H. E.: *The mechanism of muscular contraction*. *Science*, 164:1356-1366, 1969.
2. Katz, A. M.: *Contractile proteins of heart*. *Physiol. Rev.*, 30:63-153, 1970.
3. Ashely, C. C.: *Calcium and the activation of skeletal muscle*. *Endeavour*, 9:18-25, 1971.
4. Tonomura, Y. and Yoshimura, J.: *Inhibition of myosin B adenosine triphosphatase by excess substrate*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 70:73-81, 1960.
5. Katz, A. M.: *Influence of tropomyosin upon the reaction of actomyosin at lower ionic strength*. *J. Biol. Chem.*, 239:3304-3311, 1964.
6. 홍사악, 박찬웅, 김명석, 정명희 : *Mitochondria 의 Ca⁺⁺ uptake 에 미치는 ouabain 의 영향*. 대한 약리학 잡지, 8:67-75, 1972.
7. Maruyama, K. and Gergely, J.: *Interaction of actomyosin with ATP at low ionic strength*. *J. Biol. Chem.*, 237:1095-1099, 1962.
8. Maruyama, K. and Gergely, J.: *Interaction of actomyosin with ATP at low ionic strength*. *J. Biol. Chem.*, 237:1100-1106, 1962.
9. Ebashi, S., Kodama, A. and Ebashi, F.: *Tropomyosin*. *J. Biochem.*, 64:465-477, 1968.
10. Ebashi, S.: *Third component participating in the superprecipitation of natural actomyosin*. *Nature*, 200:1010, 1953.
11. Katz, A. M.: *Purification and properties of a tropomyosin containing protein fraction that sensitizes reconstituted actomyosin to calcium binding agent*. *J. Biol. Chem.*, 241:1522-1592, 1969.

12. Sandow, A.: *Excitation-contraction coupling in skeletal muscle*. *Pharmacol. Rev.*, 17:265-320, 1965.
13. Ebashi, S.: *Personal communication*.
14. Katz, A. M., Repke, D. I., Upshaw, J. E. and Polascik, M. A.: *Characterization of dog cardiac microsome*. *Biochem. Biophys. Acta*, 205: 473-490, 1970.
15. 박찬웅, 정명희, 오진섭: 골격근 *contractile protein*에 대한 Ca^{++} 의 영향, 대한 약리학 잡지, 3:55-61, 1972.
16. Maruyama, K. and Watanabe, S.: *The role of magnesium in the superprecipitation of myosin*. *B. J. Biol. Chem.*, 237:3437-3442, 1962.
17. Watanabe, S., and Sleator, W.: *EDTA relaxation of Glycerol-Treated Muscle fiber and the effect of Mg^{++} , Ca^{++} and Mn^{++}* . *Arch. Biochem. Biophys.*, 68:81-101, 1957.
18. Levy, H. M. and Ryan, E. M.: *Evidence that the contraction of actomyosin requires the relation of ATP and Mg^{++} at 2 different sites*. *Biochemische Zeitschrift*, 345:132-147, 1966.
19. Szent-Gyorgyi, A.: *Chemistry of muscular contraction*. New York Academic, 1947.
20. Levy, H. W. and Fleisher, M.: *Studies on the superprecipitation of actomyosin suspension as measured by the change in turbidity*. *Biochem. Biophys. Acta*, 100:471-478, 1965.
-