서 울 의 대 잡 지 제14권 제2호
The Seoul Journal of Medicine
Vol. 14, No. 2, June, 1973

骨骼筋 收縮機轉에 있어서의 Ca^{++}의 役割에 關한 實驗的 硏究

The Role of Ca^{++} on Contractile Mechanism of Skeletal Muscle

서울大學校 醫科大學 泌尿器科學敎室

〈指導 朱 楨 源 敎 授〉
〈指導 朴 贊 雄* 助敎授〉

金 漢 璡

緖 論

筋肉의 收縮은 excitation-contraction coupling이라고 불리우는 一連의 過程을 거쳐 일어나고 있음은 잘 알려진 사실이다. 即 筋肉細胞에 到達한 刺戟은 細胞膜을 通하여 이온의 移動을 일으키고 이는 筋細胞에 活動電壓을 形成하고 이것에 依하여 細胞膜을 通한 또는 sarcoplasmic reticulum으로 부터의 ca^{++}의 動員이 일어난다. 이같이 遊離된 Ca^{++}은 筋細胞의 收縮性 蛋白인 actomyosin의 ATPase에 依하여 ATP가 分解되고 이에 發生되는 에너지를 利用하여 actomyosin의 收縮 即 筋肉의 收縮이 일어나게 되는 것이다.

Szent-György[1]는 actomyosin gel이 Mg^{++}存在下에서 ATP를 加水分解하여 本來 透明하던 gel suspension이 漸次 混濁하여지는 現象을 觀察하고 이를 superprecipitation이라고 稱하고 이를 試驗管內 筋收縮의 model이라고 主張하였다. 아직까지 이와같은 superprecipitation의 明確한 說明은 하지 못하고 있으나 actomyosin ATPase가 ATP를 加水分解하면서 發生되는 에너지에 依하여 actin과 myosin의 cross-bridge가 形成된다는 所謂 Huxley[2]의 sliding model이 가장 有力한 學說로 認定되고 있다.

Levy와 Ryan[3]은 superprecipitation이라는 現象은 actomyosin의 ATPase活性度와 密接한 關係가 있음을 觀察하여 Huxley의 說을 뒷바침하여 주고 있다.

이와같은 筋收縮 model로서의 superprecpitation에는 몇가지 收縮性 蛋白이 關與하고 있으며 이들 複合蛋白인 所謂 Ebashi[4]가 主張하는 "natural" actomyosin의 superprecipitation은 微量의 Ca^{++}농도의 變化에 依하여 銳敏한 影響을 받는다. 即 Ca^{++}濃度가 低下하면 反應이 遲延됨을 볼 수 있다.

Katz[5]는 純粹하게 分離한 各收縮性蛋白을 再構成하고 이것의 Mg^{++} activated ATPase活性度는 Ca^{++}濃度變化에 依하여 銳敏하게 影響을 받는것을 報告함으로서 superprecipitation과 ATPase活性間의 相關關係를 提示하고 있다. 이같은 事實들은 Ca^{++}이 筋肉의 excitation-contraction coupling過程에서의 最終的인 點火役割을 하고 있다는 實驗的 根據가 되는 것이다.[6]

그러나 superprecipitation이 筋收縮現象의 試驗管內 model로서 널리 認定되고 또 利用되고 있기는 하나 生體에서의 筋肉이 갖이는 여러가지 性質을 完全히 說明하지는 못하고 있다. 即 superprecipitation이라는 現象은 非可逆的인 反應으로 認定되어 筋肉의 收縮過程 硏究에는 合當하나 弛緩過程을 說明하지 못하고 있다. 即 일단 形成된 superprecipitation은 Ca^{++}濃度의 調節로서 變化가 일어나지 않는 것으로 생각되어 왔다. 이는 以前까지의 大部分의 實驗이 反應前에 Ca^{++}濃度를 낮추거나 또는 superprecipitation反應이 絕頂에 達하였을때에 Ca^{++}濃度를 低下시키므로서 反應을 되돌리려는데서 나타난 現象으로 생각된다. 이에 着眼한 朴[11]등은 superprecipitation反應의 進行途中에 Ca^{++}濃度의 變化를 이르킴으로서 superprecipitation反應의 變化를 나타낼 수 있었다. 이것은 superprecipitation이 可逆

* 서울大學校 醫科大學 藥理學敎室

的 性質을 가지는 筋肉의 收縮 및 弛緩을 나타내는 試驗管內 model로서의 効用性을 뒷바침하여 주고 있다. 이에 著者는 이같은 superprecipitation의 反應樣狀과 ATPase 活性度間의 關係를 觀察함과 아울러 Ca^{++}과 收縮性蛋白間의 關係를 觀察하므로써 筋收縮機轉의 一端을 밝히고져 本實驗을 遂行하였다.

實驗方法 및 材料

1) Natural Actomyosin의 分離

家兎의 背筋으로부터 圖 1에 나타낸 바와 같이 Ebashi[8]의 方法으로 抽出하였다.

最終 KCl 濃度는 0.6M로 하고 同量의 glycerol과 混合하여 −20°C에서 保管한後 每實驗때 마다 50mM KCl 5mM Na_2EDTA를 含有하고 Tris-Salt로 pH 6.8로 만든 溶液을 貯藏 actomyosim에 對하여 9倍量과 섞어 14,000 ×g로 20分間 遠心分離하여 洗滌한 後 實驗에 使用하였다.

2) Perry Myosin B의 分離

上記 過程으로 얻어진 natural actomyosin을 Perry[9]의 原法을 利用하여 물로 1,200×g에서 30分間 遠沈시켜 3回 洗滌하고 5mM Tris-HCl buffer pH 8.6 溶液 3倍量을 加하여 0°C에서 48時間 放置한後 33,000×g로 15分間 遠心分離하여 얻어진 殘査를 3倍量의 물로 33,000 ×g로 15分間 遠沈하여 2回 洗滌하고 最終 KCl 濃度 0.6 M pH 7.0으로 마친 다음 同量의 glycerol과 混合하여 −20°C에 保管하였다.

每實驗때마다 亦是 natural actomyosin에서와 같은 方法으로 洗滌하여 使用하였다.

3) Troponin 및 Tropomyosin의 製造

亦是 토끼의 背筋을 使用하였으며 토끼를 固定시킨後 氣管을 切開하여 氣管캐눌을 挿入하고 respirator에 連結시킨後 d-tubocurarine을 注射한後 失血置死시켰다.

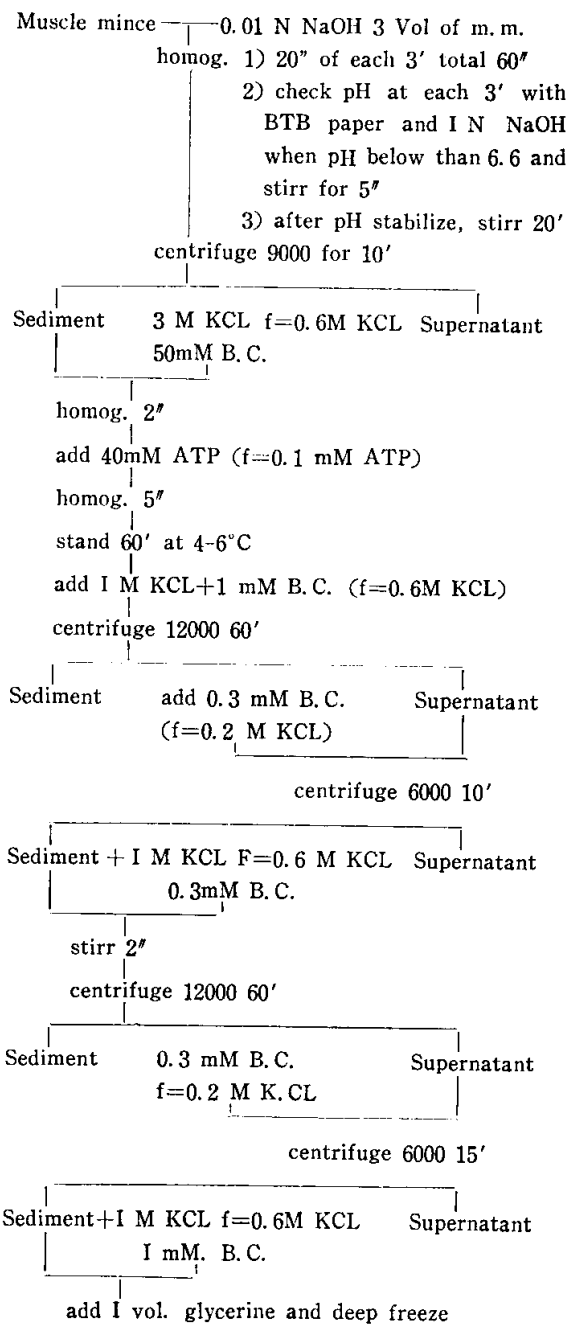
이같이 하여 얻어진 背筋은 Ebashi[10]의 方法에 따라 圖 2, 3에 보이는 바와 같은 過程으로 抽出하였다.

4) Superprecipitation의 測定

反應液은 100mM KCl, 5mM $MgCl_2$, 20mM Tris-maleate buffer pH 6.8로 하였으며 Ca^{++}은 따로 첨가하지 않고 反應液中에 含有된것으로 代身하였다.[11] Actomyosin은 反應液 ml當 0.5mg의 蛋白量이 되도록 하였으며 "Perry myosin B"의 경우 troponin과 tropomyosin의 첨가는 反應液 每 ml當 25μg의 蛋白量이 되도록 하였다. 反應液의 總量을 3ml로 하였으며 反應의 始作은 0.5mM ATP를 加하므로써 開始하였다.

Superprecipitation의 程度는 Hitachi-Perkin-Elmer Spectro photometer Model 139에 Sargent Linear-log

Fig. 1. Preparation of Actomyosin



gear recorder와 Automatic cell positioner를 連結하여 波長 545mμ에서 optical density의 變化를 一定時間 間隔으로 繼續的으로 記錄하였다.

各 收縮性蛋白의 蛋白濃度의 測定은 Biuret 法을 使用하였다.

5) Actomyosin ATPase 活性度

Fig. 2. Preparation of Troponin

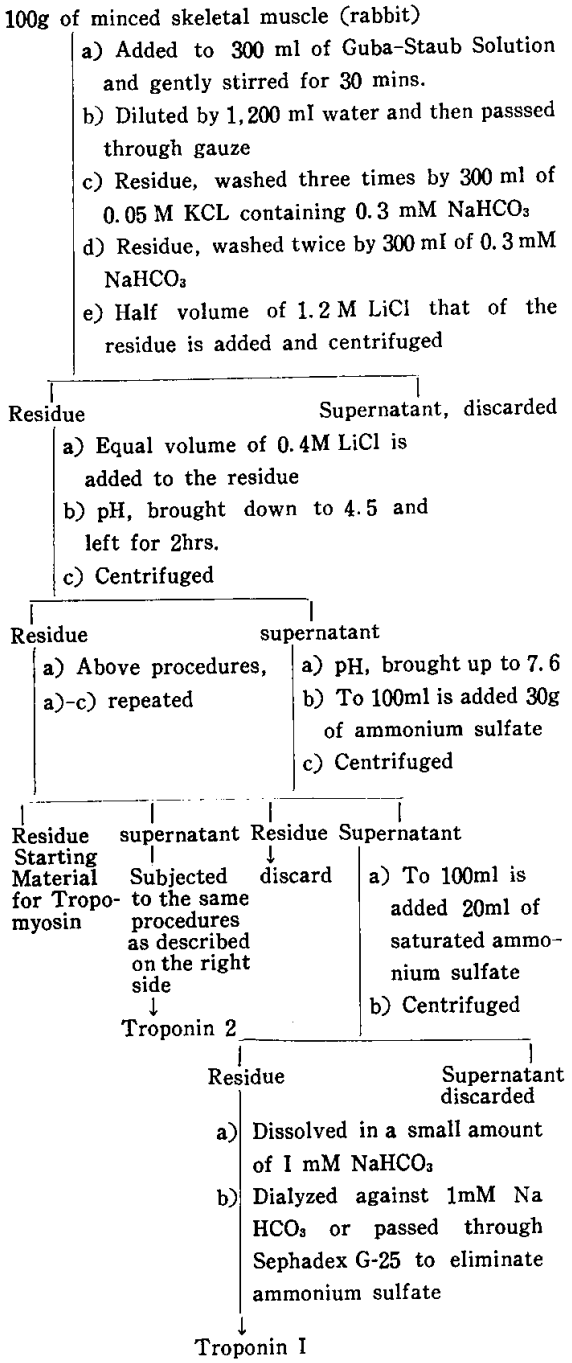
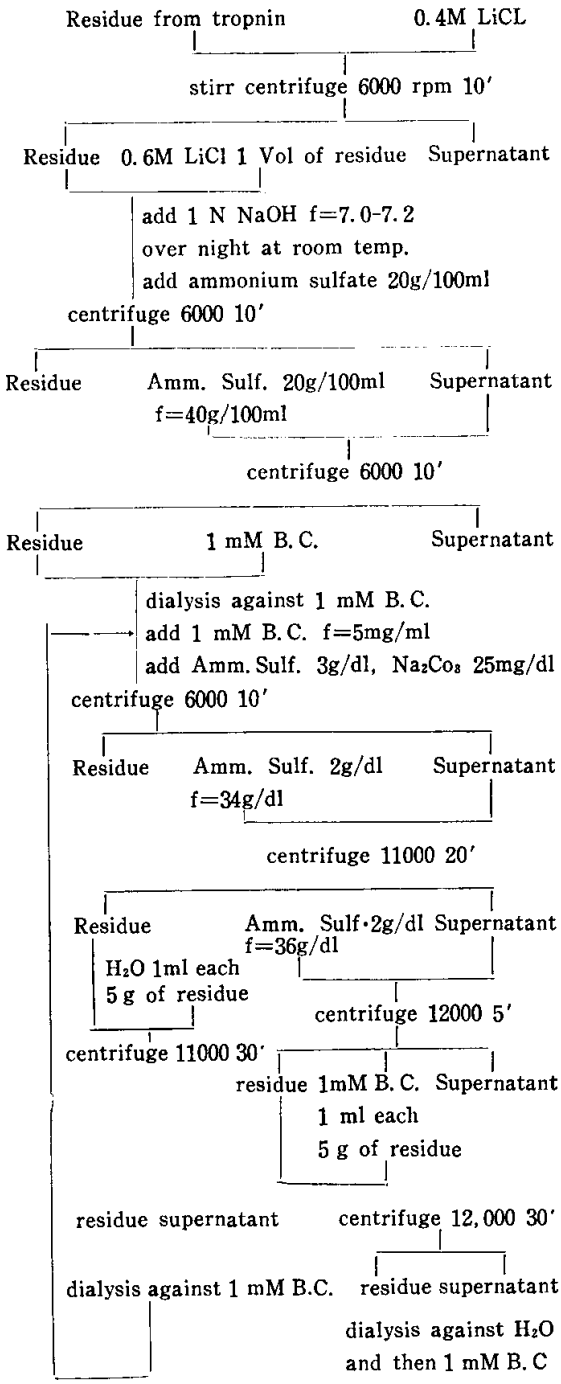


Fig. 3. Preparation of Tropomyosin



測定反應液의 組成 및 各收縮性 蛋白量은 superprecipitation 때와 같으며 反應은 20°C에서 ATP 0.5mM을 加하므로써 始作하였고 反應의 終了는 trichloroacetic acid를 加하므로써 끝나게 하였다. ATPase 活性은 反應液中에 遊離된 無機燐의 量을 測定하여 μmole Pi/mg protein으로 表示하였다.

遊離된 無機燐의 測定은 Fiske-Subbarow 法으로 比色定量 測定하였다.

本實驗에 使用된 모든 試藥은 Merk, Sigma 및 Eastman 製品을 使用하였으며 물은 硬質 유리容器로 再蒸餾한 蒸餾水를 使用하였다.

實驗結果

1) Actomyosin Superprecipitation에 미치는 EGTA의 影響

"Perry myosin B"에 troponin과 tropomyosin을 各各 25μg/ml씩 첨가하고 ATP를 加하여 圖 4의 (A)에서 보이는바와 같은 superprecipitation의 曲線을 얻었다. 約 10分의 clearing phase 後에 superprecipitation이 始作하여 約 30分에 最高에 達하였다. 이와같은 反應液에 처음부터 EGTA를 加하였을때 圖 4의 (C)와 같이 superprecipitation은 顯著하게 遲延되어 約 70分後부터 superprecipitation이 일어나서 80分에 最高에 達함을 볼 수 있다. 한편 上記 (A)에서와 같은 條件에서 反應이 始作된 後 superprecipitation의 程度가 最高 superprecipitation의 中間에 達하였을때 EGTA 25μM을 加하여 反應液中의 Ca^{++}濃度를 0.1μM로 줄여준 結果 圖 4의 (B)와 같이 superprecipitation이 中斷됨과 同時의 若干의 clearing phase를 나타내고 約 10分後 다시 superprecipitation이 일어남을 볼 수 있었다.

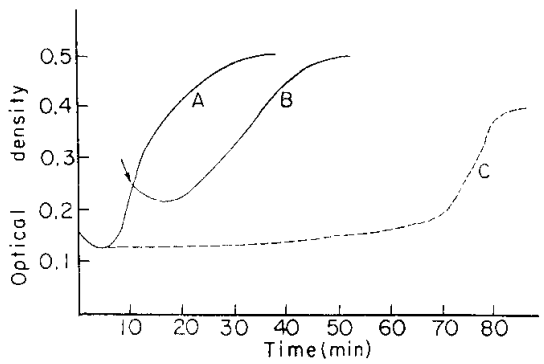


Fig. 4. The effect of the EGTA on superprecipitation of 'Perry myosin B' with troponin and tropmyosin. (A) control. (B) EGTA added at arrow. (C) EGTA added at start.
Medium: 100mM KCl, 5mM $MgCl_2$, 20mM Tir-maleate buffer(pH 6.8), protein 0.5mg/ml, troponin 25μg/ml, tropomyosin 25μg/ml and 0.5mM ATP.

以上 實驗에서의 遊離 Ca^{++}濃度는 Katz[12]의 假說에 따라 다음과 같은 公式으로 算出한 것이다.

$$Z=\frac{10^{-5}+9.96(Ca^{++})-45.7\times10^{4}\times(Ca^{++})^{2}}{4.4\times10^{5}\times(Ca^{++})}$$

Z: 要求되는 遊離 Ca^{++}濃度를 維持하기 爲하여 첨가할 EGTA의 量

(Ca^{++}): 要求되는 離遊 Ca^{++}濃度

(以上의 公式은 反應液 pH 6.8에서 이다)

2) Actomyosin ATPase에 對한 EGTA의 影響

"Perry myosin B"의 ATPase 活性은 圖 5에서 보는 바와 같이 反應液中에 EGTA가 存在하거나 않거나 影響을 받지 않았다. 即 EGTA가 없을때의 ATPase 活性이 0.0213 μmole Pi/mg protein/min인데 比하여 EGTA 存在下에서 0.0213 μmolePi/mg protein/min로써 兩者의

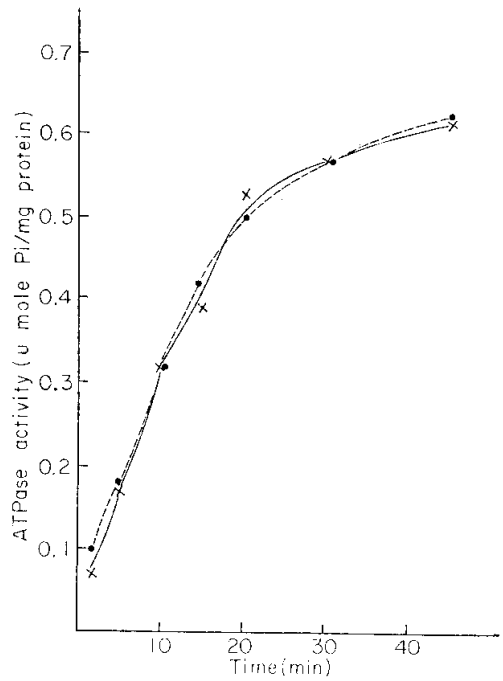


Fig. 5. The effect of EGTA on ATPase activity of 'Perry myosin B'.
Medium condition: 100mM KCl, 5mM $MgCl_2$, 20mM, Tris-maleate buffer (pH6.8), protein 0.5mg/ml and 0.5mM ATP
X: control. ●: 25μM EGTA added.

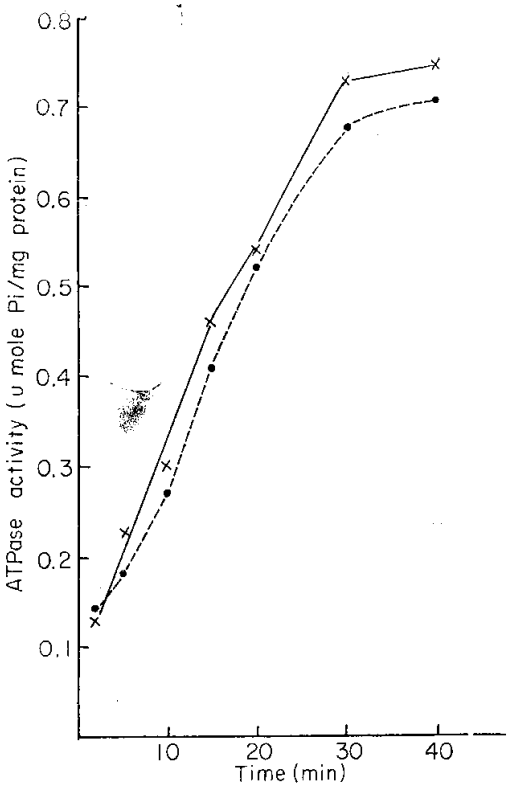


Fig. 6. The effect of EGTA on ATPase activity of 'Perry myosin B' with troponin.
Medium condition: same as Fig. 5 except 25μg of troponin.

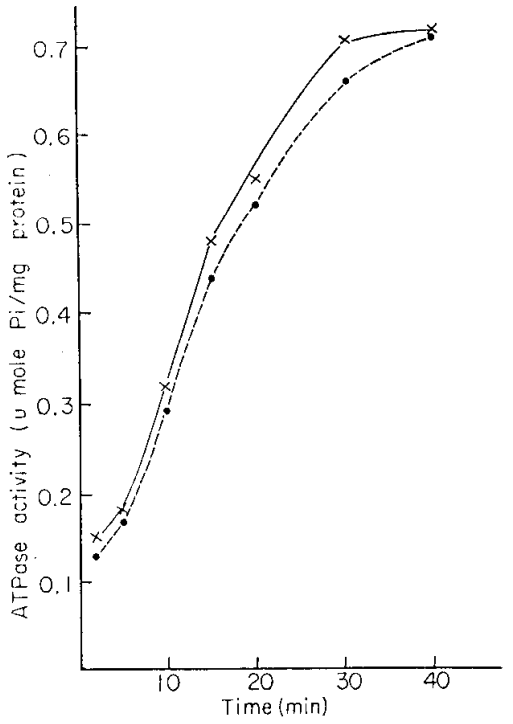


Fig. 7. The effect of EGTA on ATPase activity of 'Perry myosin B' with tropomyosin.
Medium condition: Same as Fig. 5 except 25μg of tropomyosin.

勾配에 差異를 나타내지 않았고 各時間에서의 ATPase 活性도 兩者間에 差異를 보이지 않는다.

위와같은 反應條件에서 troponin을 첨가하였을때 圖 6에서 보이는 바와 같이 亦是 EGTA에 對하여 影響을 받지 않았다. 또한 troponin 代身 tropomyosin만을 첨가하였을때도 圖 7에서 보이는 바와 같이 亦是 EGTA에 對하여 影響이 없는것으로 나타나고 있다.

即 兩者의 勾配에 있어서나 各 時間에서의 ATPase 活性에 있어 差異를 볼 수 없었다.

한편 "Perry myosim B"에 troponin과 tropomyosin을 同時에 첨가하고 이때 나타내는 ATPase 活性度는 圖 8에서와 같이 反應開始後 2分, 5分, 15分, 20分, 30分, 40分 各時間에서 0.16, 0.20, 0.28, 0.46, 0.59, 0.71, 0.70 μmole Pi/mg protein으로 나타났다. 같은 反應液에 EGTA가 처음부터 存在할 때는 各時間에서 0.11, 0.14, 0.18, 0.19, 0.35, 0.52, 0.51 μmole Pi/mg protein으로 나타나서 EGTA에 依하여 顯著하게 活性度가 低下되었음을 볼 수 있다.

그러나 反應速度는 EGTA가 없을때 0.031 μmole Pi/mg protein/min이고 EGTA 存在時 0.025 μmole/mg protein로써 若干의 減少를 나타내었다.

圖 9는 反應途中 EGTA를 添加하므로써 反應液中의 遊離 Ca^{++}濃度를 줄였을때의 ATPase 活性을 보여주는 것이다.

即 "Perry myosin B"에 troponin과 tropomyosin을 첨가한 反應液에서의 反應速度는 0.062 μmole Pi/mg portein/min이던것이 反應開始後 15分에 EGTA 25μM을 加하여 反應液中의 遊離 Ca^{++}濃度를 0.1μM로 하였을때 ATPase 活性은 0.031 μmole Pi/mg protein/min로써 EGTA 處理로써 그 反應速度가 50%나 減少한 것을 볼 수 있었다.

考　　按

Myosin은 筋纖維蛋白中에서 ATP의 terminal phosphate를 加水分解하는 活性 ATPase이다.[13] 이 酵素活性이 筋肉의 收縮過程에서 化學的 에너지를 機械的

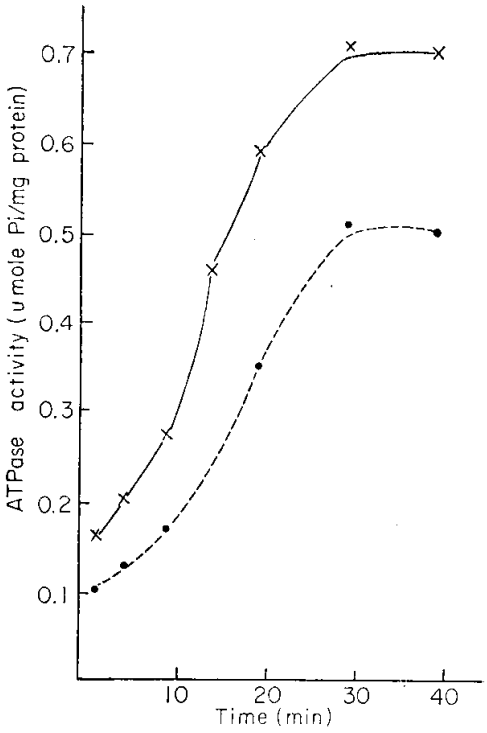


Fig. 8. The effect of EGTA on ATPase activity of 'Perry myosin B' with tropomyosin.
Medium condition: Same as Fig. 5 except 25μg of troponin and 25μg tropomyosin.

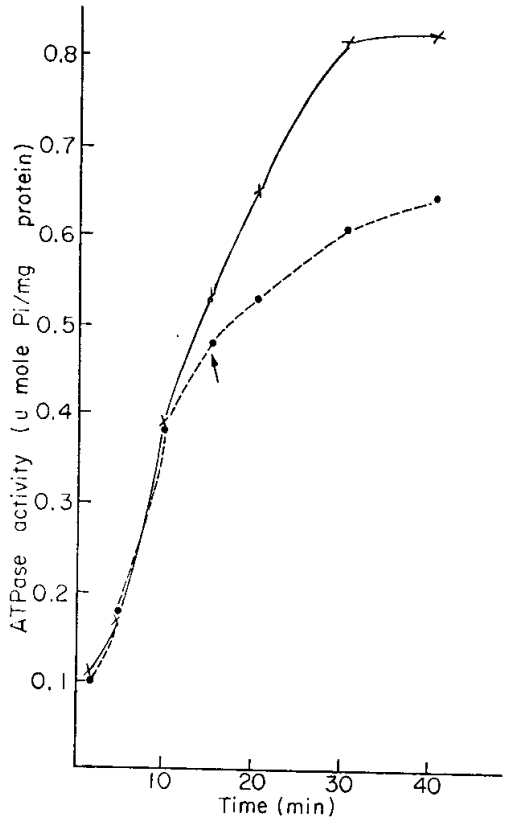


Fig. 9. The ATPase activity of perry myosin B' with tropomyosin, and troponin.
Medium condition: Same as Fig. 5 except 25 μg troponin, 25μg tropomyosin and EGTA added during the reaction. (arrow)

에너지로 轉換시키는 重要役割을 하는 것이며 ATP가 筋肉收縮에 있어서 即時 使用될 수 있는 化學的 에너지源인 것이다.[14] 이같은 myosin ATPase 活性은 鹽이 없는 狀態에서는 거의 나타나지 않으며[15] 여러가지 無機鹽들이 이 酵素活性에 對하여 活性效果를 나타낸다고 한다. 그 中 calcium 鹽은 骨骼筋 ATPase 活性을 强力하게 活性化한다.[15,16] 即 Ca^{++}은 myosin ATPase를 活性化하고 活性化된 ATPase에 依하여 ATP가 加水分解되면서 發生되는 에너지는 actin-myosin의 結合을 이루고 이것이 곧 生體內 筋肉收縮現象을 反映하는 것으로 생각되고 있다. 다시말하면 actomyosin ATPase 活性은 actin과 myosin의 結合을 促進시키는 條件下에서 增加될것이며 actin-myosin 結合을 억제시키는 條件下에서는 低下될 것이다. 이같은 事實은 actomyosin의 物理化學的 性質의 變化를 觀察한 여러 報告들에서 잘 나타나고 있다. Weber[17]는 骨骼筋 actomyosin sol에 ATP를 加하고 高濃度의 無機鹽(0.5-0.6 MKCl) 狀態로 만든 結果 粘度가 顯著히 低下하였으며 Flow birefringence가 低下함을 觀察하였으며 이것은 actomyosin이 actin과 myosin으로 分離된 現象으로 풀이되고 있다. 한편 Mommaerts[18]는 解離된 actomyosin을 ATP와 反應을 시킨결과 ATP 濃度가 徐徐히 減少하면서 原來의 粘度로 되돌아감을 보았으며 粘度의 增加速度는 Ca^{++}에 依하여 促進되고 Mg^{++}에 依하여 抑制됨을 報告한 바 있다.

또한 actomyosin은 低濃度의 ATP를 加하면 그 濁度가 顯著하게 增加하며 이같은 現象을 superprecipitation이라 하고 이것의 光散亂性을 利用하여 spectrophotometry로써 그 程度를 나타낼 수 있었으며[19] superprecipitation의 程度는 actomyosin ATPase 活性度와 密接한 關係가 있었다.[20]

한편 Ebashi[4]는 natural actomyosin을 trypsin으로 처리하였을 때 EGTA의 첨가로 superprecipitation에 影響을 미치지 못함을 觀察하였고 이 trypsin으로 處理된 actomyosin에 tropomyosin-like protein을 加하

였더니 Ca^{++}sensitivity가 다시 나타났음을 報告한바 있다. 또 Perry[9]는 trypsin 處理代身에 natural acomyosin을 pH 8.6으로 0°C에서 48時間 放置함으로써 Ebashi가 報告한 EGTA에 依한 影響을 除去할 수 있었다. 이어 Ebashi[16,21]는 actin과 myosin의 相互作用에 Ca^{++}-sensitivity를 나타내게하는 tropomyosin like protein으로 부터 troponin을 分離하고 이 蛋白이 Ca^{++} 結合에 對한 높은 感受性을 가지고 있음을 證明하고 Tropnin이 單獨으로 存在할때는 Ca^{++} sensitivity를 나타내지 못하나 tropomyosin과 함께 存在할때 비로서 Ca^{++} sensitivity를 나타내게 됨을 報告하였다.

이와같은 試驗管內에서의 Ca^{++} sensitivity는 生體內 筋肉의 excitation-contraction coupling 過程에서 actin과 myosin의 相互作用에 있어서의 物理化學的 變化에 對한 遊離 Ca^{++}의 作用이라고 풀이되고 있다.

朴[7]등은 "Perry myosin B"의 superprecipitation은 EGTA에 依하여 影響을 받지 않으며 Perry myosin B에 troponin 또는 tropomyosin이 單獨으로 存在할때에는 亦是 EGTA에 依한 영향 即 Ca^{++} sensitivity가 나타나지 않음을 觀察 報告하였으며 또한 "Perry myosin B"에 troponin과 tropomyosin을 同時에 첨가시켜 actomyosin superprecipitation에서의 Ca^{++} sensitivity가 나타남을 觀察하여 Ebashi 等의 實驗事實들을 뒷바침하였다. 本實驗에서 "Perry myosin B"의 ATPase 活性度가 EGTA로써 影響을 받지 않은 事實(圖 5) 또 圖 6 및 7에서 보이는 것과 같은 "Perry myosin B"의 ATPase 活性度가 troponin이나 tropomyosin 單獨으로 存在할때 EGTA에 依하여 영향을 받지 않았으며 "Perry myosin B"에 troponin과 tropomyosin을 同時에 첨가함으로써 그 ATPase 活性度가 EGTA에 依하여 影響을 받았음은(圖 8) 筋肉收縮機轉에 있어서 即 actin-myosin association에는 Ca^{++}에 依하여 活性化되는 ATPase를 必要로 함을 보여주고 있다. Actomyosin의 superprecipitation 또는 ATPase 活性은 以上의 Ca^{++}에 對한 效果以外에도 反應液의 ionic strength, Mg^{++}濃度 및 ATP 濃度에 依하여 影響받는다. 即 이들 濃度가 높을수록 活性은 抑制되고 낮을 수록 促進됨을 볼 수 있다.[22-24]

그러나 이들 要素에 依한 actomyosin 相互作用에 對한 影響은 Ca^{++}濃度가 μ mole 程度의 變化로써 影響을 미치는데 反하여 m mole 程度의 많은 濃度變化가 있어야 影響을 미친다. 따라서 Ca^{++}以外의 이들 要素들이 actomyosin 相互作用에 影響을 미친다는 것은 事實이나 生理的으로 筋收縮機轉에 調節役을 하리라고는 생각하기 힘들다.[26] 따라서 筋肉의 excitation-contration coupling에 있어서의 最終的인 調節役을 하는것은 Ca^{++}일 것이라는 것이 一般的인 見解이다.[4,5,10,25]

以上의 여러 實驗的 事實들은 筋收縮機轉의 究明에는 많은 도움을 주고 있으나 弛緩過程의 說明에는 充分치 못하다.

심지어 actomyosin superprecipitation에서의 clearing phase를 筋肉弛緩現象으로 볼것인지에 關하여도 疑問視 되고 있다.

다만 Ca^{++}이 筋收縮機轉에서의 最終調節役을 한다면 actin myosin association 途中에 反應液中의 Ca^{++}濃度를 變化시킴으로써 dissociation을 일으킬 수 있으리라고 생각할 수 있다.

本 實驗結果(圖 4) 및 朴[7]등의 實驗結果는 이같은 可能性에 着眼하여 actomyosin superprecipitation 途中 EGTA를 加함으로써 反應液中의 Ca^{++}濃度를 變化시켜 superprecipitation의 停止를 觀察한 것이다.

이는 actin-myosin association 進行途中 Ca^{++} 濃度를 調節함으로써 dissociation을 이르킬수 있음을 나타낸 結果라 할수있다.

한편 superprecipitation이 以上에 言及한바와 같이 actin myosin 相互作用에 依하여 일어나는 現象임은 잘 알려진 事實이며 그 association 및 dissociation이 Ca^{++}의 濃度를 變化시킴으로서 調節된다는 事實로서 actomyosin의 association 및 dissociation 間에 있어서 ATPase 活性의 變化가 있을 것을 推理할 수 있다. 本實驗結果(圖 9)는 actomyosin에 依한 ATP 加水分解 反應途中에 EGTA를 加함으로써 反應液中의 Ca^{++}濃度를 0.1μM로 減少 시켰을때 actomyosin ATPase 活性이 顯著하게 抑制됨을 나타낼 수 있어서 actomyosin superprecipitation과 ATPase 活性間의 聯關性을 보여주었다.

이와같은 Ca^{++}濃度 變化에 對한 反應은 "Perry myosin B"에서는 일어나지 않았다. 따라서 Ca^{++}의 actin-myosin association에서의 點火役割 및 dissociation의 調節役割은 troponin과 tropomyosin의 存在를 必要로 함을 알수있다. 또한 이와 같은 事實은 Ebashi 等이 Ca^{++}과 troponin 과의 binding constant 等을 들어 Ca^{++}의 binding site가 troponin 임을 主張한 事實을 뒷바침한다.

以上의 實驗結果를 綜合 檢討하여 보면 Ca^{++}은 troponin-tropomyosin 複合體와 結合함으로써 後者에 依하여 抑制되었던 actomyosin ATPase를 풀어줌으로써 actin-myosin 相互作用을 일으켜 association을 點火

하고 Ca^{++}의 濃度가 減少되면 다시 troponin-tropomyosin 複合體에 依한 ATPase 活性의 抑制가 일어나서 actin-myosin association 乃至 dissociation이 調節될 것으로 생각할수 있겠다.

結　　論

토끼의 背筋으로부터 抽出한 "Perry myosin B"와 tropomyosin과 troponin을 利用한 反應에서 Ca^{++}濃度를 EGTA로서 調節하므로써 actomysoin ATPase 活性을 觀察하여 다음과 같은 結果를 얻었다.

1) "Perry myosin B"에 troponin과 tropomyosin이 同時에 存在할때 反應液中 EGTA가 包含되므로써 superprecipitation이 대단히 遲延되었다. 또한 superprecipitation 반응도중 즉 half-maximal superprecipitation 때에 EGTA를 加하므로써 superprecipitation이 停止함을 보았다.

2) "Perry myosin B"의 ATpase 活性은 EGTA의 첨가로써 變化를 일으키지 않았다.

3) "Perry myosin B"에 troponin 또는 tropomyosin을 單獨으로 첨가하였을때 亦是 EGTA에 依하여 影響을 받지 않았다.

4) "Perry myosin B"에 troponin과 tropomyosin이 同時에 存在할때 EGTA는 actomyosin ATPase 活性度를 抑制하였다.

5) "Perry myosin B"에 troponin과 tropomyosin이 同時에 存在하는 反應에서 그 反應途中 EGTA를 加하므로써 ATPase 活性이 對照速度 보다 50% 減少하였다.

以上의 結果로 보아 actin myosin 相互作用은 Ca^{++}에 依하여 調節되며 이와같은 Ca^{++}의 調節役은 troponin과 tropomyosin이 存在할때 나타난다. 그리고 Ca^{++}은 actin-myosin association 뿐 아니라 dissociation도 調節하므로써 筋收縮 弛緩의 最終調節役을 하는 것으로 思料된다.

ABSTRACT

The Role of Ca^{++} on Contractile mechanism of Skeletal Muscle

Han Jin Kim, M. D.

Deparment of Urology, College of Medicine, Seoul National University, Seoul, Korea

(Diretors: prof. Kun Weon Choo, M. D., and Assist. prof. Chan Woong Park, M. D. *)

* *Department of pharmacology*

Superprecipitation of actomyosin has been considered to be an in vitro model of the muscle contraction, and intimate correlation has been found between superprecipitation and ATPase activity of actomyosin.

In order to elucidate the precise role of calcium on interaction of actin-myosin, the effect of the EGTA on ATPase activity of "Perry myosin B" with or without troponin and/or tropomyosin was studied in rabbit skeletal muscle.

The results are as follows:

1) Superprecipitation of "Perry myosin B" with both of troponin and tropomyosin was markedly delayed by EGTA, and stopped by addition of EGTA during the reaction.

2) ATPase activity of "Perry myosin B" was not influenced by EGTA.

3) ATPase activity of: "Perry myosin B" with only troponin or tropomyosin was also not influenced by EGTA. but both of troponin and tropomyosin added "Perry myosin B" revealed depressed ATPase activity by EGTA.

4) In the system "Perry myosin B" with both of troponin and tropomyosin, addition of EGTA during the reaction caused depression of ATPase activity.

It is concluded that the actin-myosin interaction is controled by the minute change of calcium concentration only in the presence of both troponin and tropomyosin through association and dissociation process.

REFERENCES

1. Szent-György, A.; *Chemistry of muscular contraction. New York Academic, 1947.*
2. Huxley, H.E.: *The mechanism of muscular contraction. Science, 164:1356-1366, 1969.*
3. Levy, H.M. and Ryan, E.M.: *Evidence that the contraction of actomyosin requires the reaction of ATP and Mg^{++} at two different sites. Biochem. Zeitsch., 345; 132-147, 1966.*
4. Ebashi, S.: *Third Component participating in the superprecipitation of natural actomyosin. Nature, 200:1010, 1963.*
5. Katz, A.M.: *Purification and properties of a tropomyosin containing protein fraction that sensitizes reconstituted actomyosin to calcium binding agent. J. Biol. Chem., 241:1522-1529, 1966.*
6. Ashely, C.C.: *Calcium and the activation of*

skeletal muscle. Endeavour, 9:18-25, 1971.

7. 박찬웅, 정명희, 오진섭 : 골격근 *contractile protein* 에 대한 Ca^{++}의 영향. 대한약리학잡지. *8:145-151. 1972.*
8. Ebashi, S. : *Personal communication.*
9. Perry, S. V., V. Davies, and D. Hayter: *Natural tropomyosin and the factor sensitizing actomyosin APTase to EGTA. Biochem. J., 99:1C-2C, 1966.*
10. Ebashi, S., A. Kodama, and F. Ebashi: *Troponin. J. Biochem. (Tokyo) 64:465-477, 1968.*
11. Katz, A. M. : *Influence of tropomyosin upon the reactions of actomyosin at low ionic strength. J. Biol. Chem., 239:3304-3311, 1964.*
12. Katz, A. M., D. I. Repke, J. E. Upshaw, and M. A. Polascik: *Characterization of dog cardiac microsomes. Biochem. Biophys. Acta, 205:473-490, 1970.*
13. Green, I., J. R. Brown, and W. F. H. M. Mommaerts: *Adenosine-triphosphatase systems of muscle. II Identification of the reaction products. J. Biol. Chem., 205:493-501, 1953.*
14. Infante, A. A., and R. E. Davies: *The effect of 2, 4-dinitrobluorobenzene on the activity of striated muscle. J. Biol Chem., 240:3996-4001, 1965.*
15. Mommaerts, W. F. H. M. and K. Seraidarian: *A study of the adenosine triposphatase activity of myosin and actomyosin. J. Gen. Physiol., 30: 401-422, 1947.*
16. Mommaerts, W. F. H. M. and I. Green: *Adonosin triphosphatase system in muscle. III A survey of the adenosin triphosphatase activity of myosine. J. Bio. Chem., 208:833-843. 1954.*
17. Weber, H. H.: *Muskelproteine. Biochem, Biophys. Acta, 4:12-23, 1950.*
18. Mommaerts, W. F. H. M. : *The reaction between actomyosin and adenosine triphosphate. J. Gen. Physiol., 31:361-375, 1948.*
19. Ebashi, S. : *Calcium binding activity of vesicular relaxing factor. J. Biochem. (Tokyo) 50:236-244, 1961.*
20. Katz, A. M., D. I. Repke, and B. B. Rubin: *The adenosine triphosphatase activity of cardiac myosin. Comparison of the enzymatic activities and activation by actin of dog cardiac, rabbit cardiac, rabbit white skeletal and rabbit red skeletal myosin, Ciroulation Res.,*
21. Ebashi, S., F. Ebsahi, and A. Kodma: *Troponin as the $Ca^{\ddagger}$ receptive protein in the contractile system. J. Biochem, (Tokyo) 62:137-138, 1967.*
22. Maruyama, K. and S. Watanabe: *The role of magnesium in the superprecipitation of myosin B. J. Biol, Chem., 237:3437-3442, 1962.*
23. Watanabe, S. and S. Yasui: *The Effect of $Mg^{\ddagger}$ and $Ca^{\ddagger}$ on the superprecipitation of myosin B. J. Biol. Chem., 240:105-111, 1965.*
24. 홍사악, 박찬웅, 김병석, 정명희 : *Mitochondria* 의 *calcium uptake* 에 미치는 *ouabain* 의 영향. 대한약리학잡지 *8:67-75, 1972.*
25. Katz. A. M. : *Contractile proteins of heart. Physiol. Rev., 50:63-153, 1970.*