

근소포체의 단백질 및 당단백질 조성에 관한 연구

박영철

공주사범대학 생물교육학과

토끼의 골격근에서 근소포체를 순수 분리하여 SDS-polyacrylamide gel 전기영동법과 ^{125}I -concanavalin A 표지법으로 단백질과 당단백질의 조성을 조사하였다.

전기영동상에 나타난 대표적인 단백질은 Ca^{2+} -ATPase, 80Kd protein, calsequestrin, high affinity calcium binding protein, intrinsic glycoprotein이었으며, 160Kd protein, 94Kd protein, 38Kd protein, 34Kd protein, 24Kd protein도 존재하였다. 특히, 막성계에 있는 heat shock protein으로 알려져 있는 80Kd protein은 본 연구를 통해 주로 근소포체의 terminal cisternae에 들어 있음이 확인되었다. 한편, ^{125}I -concanavalin A 표지에 의해 전기영동상에 나타난 대표적인 당단백질은 160Kd glycoprotein, 94Kd glycoprotein, calsequestrin, intrinsic glycoprotein의 4 종이었다. 이 가운데 94Kd glycoprotein은 94Kd glucose-regulated protein으로 추정되며, 본 연구를 통해 근소포체에서도 특히 T-tubule에 다량으로 존재함이 밝혀졌다.

KEY WORDS: Sarcoplasmic reticulum, ^{125}I -concanavalin A, Glycoprotein.

골격근에 내에 복잡하게 퍼져있는 근소포체는 근원세포가 근세포로 분화하는 과정에서 형성되는 것으로 근세포의 기능에 관계되는 각종 신호와 화학물질을 접수하고, 이것들을 세포 안팎으로 전달하는 기능을 가지고 있다. 전자현미경적 소견에 의하면 근소포체는 근세포막의 연장이라고 볼 수 있는 transverse sarcoplasmic reticulum으로 구성되어 있으며, 이 접합부를 거쳐 T-tubule로부터 신경 충격이 근소포체로 전달되는 것으로 믿고 있으나, 그 과정은 아직 규명되지 않고 있다. 근래에는 근소포체에 있는 triad 부위의 기능과 Ca^{2+} 투과에 관계하는 막단백질에 대한 연구가 활발하다. 특히 Ca^{2+} -ATPase, calsequestrin(CS), high affinity calcium binding protein(HACBP) 등 Ca^{2+} 의 수송과 저장에 관계하는 단백질에 대한 많은 보고가 있다(Meissner, 1975; Jorgensen *et al.*, 1977, 1979; Zubrzycha *et al.*, 1978; Michalak *et al.*, 1980). 현재까지 Ca^{2+} -

ATPase는 Ca^{2+} 의 수송, CS는 근소포체 내의 calcium buffer의 기능을 가지고 있는 것으로 알려져 있으나, HACBP의 존재와 기능에 대해서는 학자들간에 의견이 일치하지 않고 있다.

Meissner(1975)에 의해 근소포체를 light sarcoplasmic reticulum vesicle과 heavy sarcoplasmic reticulum vesicle로 분획하는 기술이 개발되고, 그 후 여러 학자들(Lau *et al.*, 1977; Sarzala and Michalak, 1978; Zubrzycka *et al.*, 1978)에 의하여, heavy sarcoplasmic reticulum vesicle을 T-tubule, terminal cisternal light vesicle, terminal cisternal heavy vesicle로 재분획하는 기술이 개발된 이래, 근소포체의 각 부위의 막 조성에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있다. Meissner (1975)는 CS와 일종의 55Kd protein이 주로 heavy vesicle에 존재한다고 보고하였고, Caswell 등(1979)과 Lau 등(1979)은 heavy vesicle 중에서도 terminal cisternal vesicle에 CS가 존재한다고 보고하였다. Jorgensen 등 (1979) 역시 immunofluorescent 염색법으로 ATPase는 근소포체 전체에 골고루 존재하지만, CS는 terminal

본 연구는 1986년도 문교부 자유과제 학술연구 조성비에 의해 수행되었음.

cisternal vesicle에 존재함을 확인하고 있다.

한편, Michalak 등 (1980)은 ^{125}I -concanavalin A 표지법으로 근소포체에 intrinsic glycoprotein (IG)이 존재함을 최초로 보고하였다. 또한 그들은 근소포체 각 분획의 단백질 전기영동상에 나타나는 분자량이 약 55Kd인 몇개의 단백질 중에서 HACBP와 CS의 존재를 확인하였으며, T-tubule에는 HACBP는 풍부하나 IG는 거의 존재하지 않는다고 보고하고 있다.

Lau 등(1979)의 보고에 의하면, 근소포체의 각 분획에 들어있는 인지질의 조성과 함량이 다르다. 즉, T-tubule의 인지질 함량으로 $1.57\ \mu\text{mol}/\text{mg}$ 으로 제일 많고, terminal cisternae는 $0.53\ \mu\text{mol}/\text{mg}$ 으로 제일 낮다. 이와같이 근소포체의 단백질과 인지질의 조성은 각 부분에 따라 다르다. 따라서 본 연구에서는 근소포체의 각 부분의 단백질의 조성을 조사하여 타연구 결과와 비교 분석하고, 나아가서 당단백질의 조성을 밝혀 근소포체의 막구조를 밝히는 데 그 목적을 두었다.

재료 및 방법

근소포체의 분리와 재분획

근소포체의 분리는 Meissner(1975)의 방법을 약간 변형하여 사용하였다. 특히, extrinsic membrane protein이 KCl 용액에서 용출되는 경우가 있기 때문에 세척 단계에서 0.6M KCl을 사용하지 않았다.

먼저, 6개월된 토끼의 대퇴부 골격근을 저온실 ($0\sim 4^\circ\text{C}$)에서 0.2M sucrose 용액에 넣어 40초간 Waring blender로 분쇄한 다음, 약 1,000g의 homogenate를 $1,600 \times \text{g}$ 로 10분간 원심분리하였다. 이것의 supernatant를 취하여 거어즈로 걸른 다음, $9,000 \times \text{g}$ 에서 30분간 원심분리하여 얻은 pellet를 Beckman 45-Ti rotor를 사용하여 60분간 $127,000 \times \text{g}$ 로 다시 원심분리하여 순수한 근소포체를 얻었다.

근소포체의 분획과 재분획에는 Lau 등 (1977)의 방법을 사용하였다. 근소포체를 $4\text{mg}/\text{mL}$ 가 되도록 완충액(0.25M sucrose, 1mM HEPES, pH 7.4)에 녹여서 French Pressure cell (Aminco)에

넣어 파쇄시켰으며, 이때의 압력은 1,000~2,000 psi이었다. 이것을 12.5%~50%의 linear gradient sucrose에 넣은 다음, $95,000 \times \text{g}$ 로 하룻밤 동안 원심분리하였으며, 20%~45% sucrose에 들어있는 근소포체의 vesicle를 7구간으로 나누어 분획하여 실험에 사용하였다.

한편, heavy sarcoplasmic reticulum vesicle를 T-tubule(TT), terminal cisternal light vesicle (TCL), terminal cisternal heavy vesicle(TCH)로 재분획하기 위해서는 먼저 근소포체의 linear gradient sucrose에서 39%~41% sucrose 부위에 있는 heavy vesicle을 취하였다. 이것을 위와 같은 방법으로 French pressure cell를 통과시킨 다음, linear gradient sucrose의 22%~24% sucrose에서 TT를, 30%~32% sucrose에서 TCL을, 39%~41% sucrose에서 TCH를 분획하여 본 실험에 사용하였다.

근소포체의 막단백질 분석

막단백질 분석을 위한 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis는 Laemmli의 방법(1970)에 따랐다.

먼저 근소포체의 각 분획을 sonicator로 파쇄한 후, 5% SDS, 5% 2-mercaptoethanol, 6% glycerol, 50mM Tris-HCl의 용액(pH 6.8)에 넣어 100°C 에서 5분간 가열하였고, 여기에 tracking dye로 소량의 bromophenol blue를 첨가하였다.

이렇게 마련된 시료를 6%~12% gradient slab gel(두께 1.7mm)에서 18~20시간 동안 50~100V로 전기영동하였으며, 이어서 ^{125}I -concanavalin A로 당단백질을 표지한 후 0.2% Coomassie blue로 염색하여 단백질상을 분석하였다.

각 시료의 단백질량은 Lowry 등 (1951)의 방법으로 측정하였으며, 분자량 추정을 위한 표준 단백질로 myosin(200Kd), β -galactosidase(116.5Kd), phosphorylase β (94 Kd), bovine serum albumin(68 Kd), ovalbumin (43 Kd), carbonic anhydrase (30 Kd), soybean trypsin inhibitor (21 Kd), lysozyme (14.3 Kd)을 시료와 같이 전기영동하였다.

당단백질의 ^{125}I -concanavalin A표지

근소포체의 당단백질은 ^{125}I -con A의 표지에는 Michalak 등의 방법 (1980)을 사용하였다.

전기영동을 마친 직후 gel을 25% isopropyl alcohol (V/V)-10% acetic acid 용액이 들어있는 플라스틱 접시에 넣어 하루밤 동안 단백질을 고정함과 동시에 SDS를 제거하였다. 이어서 10%(V/V) isopropyl alcohol -7% acetic acid 용액에 2~3시간 담갔다가 500mL의 PBC buffer(0.5M NaCl, 0.05M NaH_2PO_4 , 0.01% NaNO_3 , pH 6.5)에 gel을 옮겨 2시간 간격으로 3회 신선한 buffer로 교체하여 고정액을 gel에서 완전 제거하였다. 이어서 약 200mL의 상기 buffer에 10^8 cpm의 ^{125}I -con A를 첨가하여 소포체의 단백질을 6~8시간 동안 표지하였다. ^{125}I -con A는 Greenwood 등 (1963)의 chloramine-T 방법으로 만들었으며, 이 경우 chloramine-T의 농도는 절반으로 줄였고, 시간은 60초로 연장하였다.

^{125}I -con A의 표지를 마친 gel은 PBS buffer에 넣어서 3~5시간 동안에 3차례에 걸쳐 유리 ^{125}I -con A를 세척한 다음, Coomassie blue로 염색하였다. 탈색에 이어 건조시킨 gel에 Kodak X-ray film을 덮어 실온에서 1~3일간 방치하여 autoradiogram을 작성한 후 당단백질의 유무를 확인하였다.

결 과

근소포체의 막단백질 조성

(1) Light vesicle과 heavy vesicle의 막단백질 조성

Sucrose gradient 원심분리에 의해 얻어진 각 분획을 Laemmli의 방법(1970)으로 전기영동한 결과는 그림 1A와 같다. 본 전기영동상에 myosin heavy chain(225 Kd), actin(43 Kd) 등의 단백질 band가 거의 나타나지 않는 점으로 보아 근소포체가 비교적 순수하게 분리되었음을 알 수 있다.

근소포체의 각 분획의 전기영동상에서는 이미 잘 알려져 있는 Ca^{2+} -ATPase(105 Kd)과 calsequestrin (CS, 64 Kd), 그리고 HACBP(55Kd),

intrinsic glycoprotein(IG, 53Kd), 80Kd protein 등을 볼 수 있다. 뿐만 아니라 160Kd protein과, 그리고 분자량이 34Kd, 38Kd, 24Kd에 해당하는 단백질이 관찰된다. CS와 80Kd protein은 light vesicle(20% sucrose fraction)에서 heavy vesicle로 갈수록 그 양이 증가하지만, IG는 반대로 약간 감소한다. 한편, 160Kd protein은 light vesicle에만, 그리고 HACBP는 heavy vesicle에만 나타난다. 그리고 Ca^{2+} -ATPase는 T-tubule과 근소체의 모든 분획에 다량으로 들어있는 것으로 나타났다.

(2) Heavy vesicle의 각 분획의 막단백질 조성

근소포체의 heavy vesicle를 French pressure cell에 넣어 파괴한 다음, sucrose gradient 원심분리에 의해 TT, TCL, TCH로 분획하여 전기영동한 결과는 그림 2A와 같다.

그림 1A에 나타난 각 종의 막단백질을 관찰할 수 있었지만 그 조성은 TT, TCL, TCH에서 상당히 달랐다. Ca^{2+} -ATPase는 모든 분획에 다량으로 들어있어서 분획간 차이가 거의 없다. 그러나 TT 분획에서는 TCL 분획과 TCH 분획에서는 볼 수 없는 160 Kd protein과 65~68Kd에 해당하는 몇개의 단백질 band가 나타났다. 또한 TCL 분획과 TCH 분획에는 TT 분획에서와는 달리 CS가 Ca^{2+} -ATPase만큼 다량으로 존재하며, 80 Kd protein의 band도 뚜렷하다. 한편, IG는 TT와 TCH 분획에, 그리고 HACBP는 TCH 분획에서 뚜렷하며, TCL, TCH 분획에 나타나는 24-, 31-, 34-, 38-Kd에 해당하는 단백질도 주목된다.

근소포체의 당단백질 조성

근소포체를 sucrose gradient 원심분리와 French pressure cell를 이용하여 분획하여 얻은 여러 분획의 당단백질 전기영동상은 그림 1B와 그림 2B에서 보는 바와 같다.

먼저 주목되는 점은 TT분획의 전기영동상에 나타나는 분자량 160Kd과 94Kd에 해당하는 다량의 당단백질이다(그림 2B). 이들 당단백질은 그림 1B에서 보는 바와 같이 근소포체의 모든 분획에서 나타나지만, 특히 TT 분획에 많으며 TCH

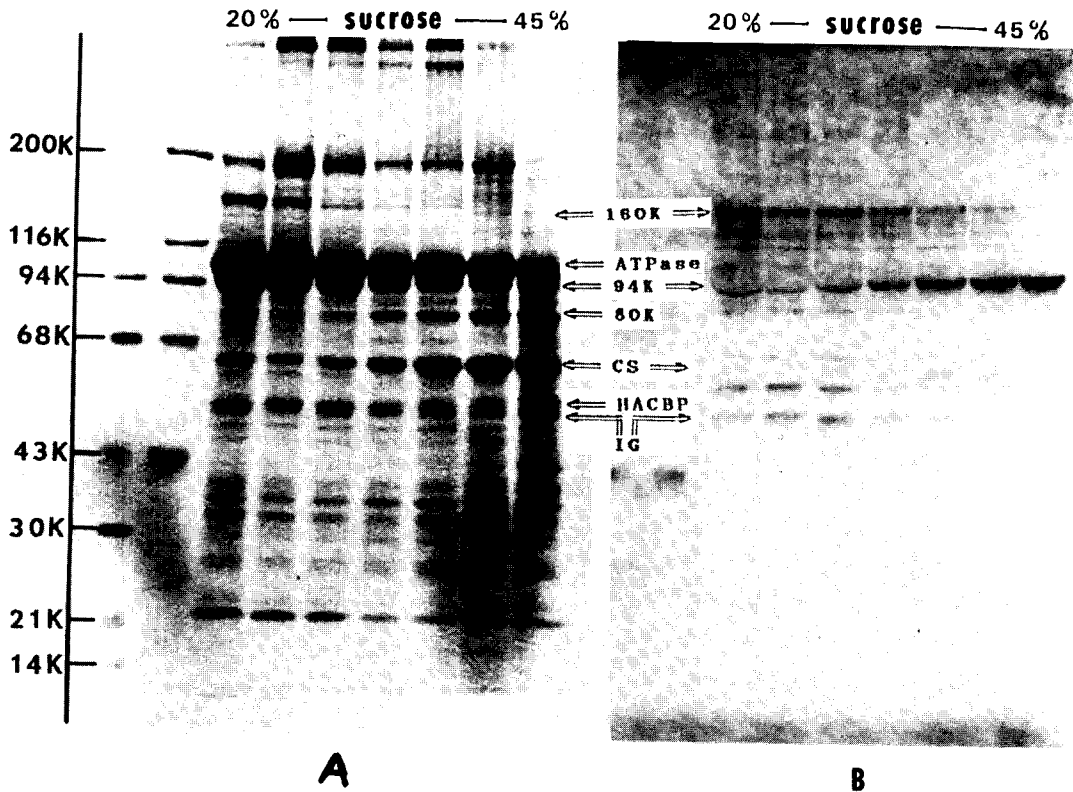


Fig. 1. A. SDS Laemmli slab gel protein pattern of SR subfractions pooled after isopycnic centrifugation in a continuous sucrose gradient (12.5%-50%). 100 μ g was applied to each slot. The standard protein applied in the last two slots in the left side of the gel are myosin, 200 Kd; β -galactosidase, 116.5 Kd; phosphorylase β 94 Kd; bovine serum albumin, 68 Kd; ovalbumin, 43 Kd; carbonic anhydrase, 30 Kd; soybean trypsin inhibitor, 21 Kd and lysozyme, 14.3 Kd. Notice that only ovalbumin, a glycoprotein, is specifically labeled by concanavalin A. **B.** Autoradiographic image of the gel in A after [125 I]-concanavalin A labeling.

분획에는 소량 들어있고, TCL 분획에는 94Kd의 당단백질만 존재한다. 94Kd 당단백질은 그림 1A와 2A에서 보는 바와 같이 Ca^{2+} -ATPase와 이동속도가 거의 동일하여 단백질 영동상에서는 상호간에 분리된 band로 나타나지 않으며, 근단백질의 전기영동상에서 나타나는 phosphorylase β 의 위치와 거의 일치한다.

CS는 근소포체의 모든 분획에서 볼 수 있지만, 특히 heavy vesicle 중 terminal cisternae에 해당하는 TCH에 많고, T-tubule에는 거의 없다. CS는 당 함량이 적기 때문에 125 I-con A로 표지할 경우 autoradiogram에 흐리고 확산된 band로 나타나는 것으로 생각된다. IG의 경우, 그림 1B에서 보는 바와 같이 저농도의 sucrose gradient에서 더

욱더 진한 band로 나타났다. 그러나 heavy vesicle을 좀 더 세분해보면, 그림 2B에서처럼 TCL에는 거의 없고, TT와 TCH에 많이 들어 있음을 알 수 있다.

한편, 160Kd 당단백질과 94 Kd 당단백질 사이에 2개의 흐릿한 당단백질 band가 모든 분획에 존재한다. 그리고, 그림 1B에서는 CS band 위와 아래에 2개의 당단백질 band가 보이거나 그림 2B에서는 동일 위치에서 이것들이 관찰되지 않아서 이들 당단백질의 존재를 확신하기는 어렵다.

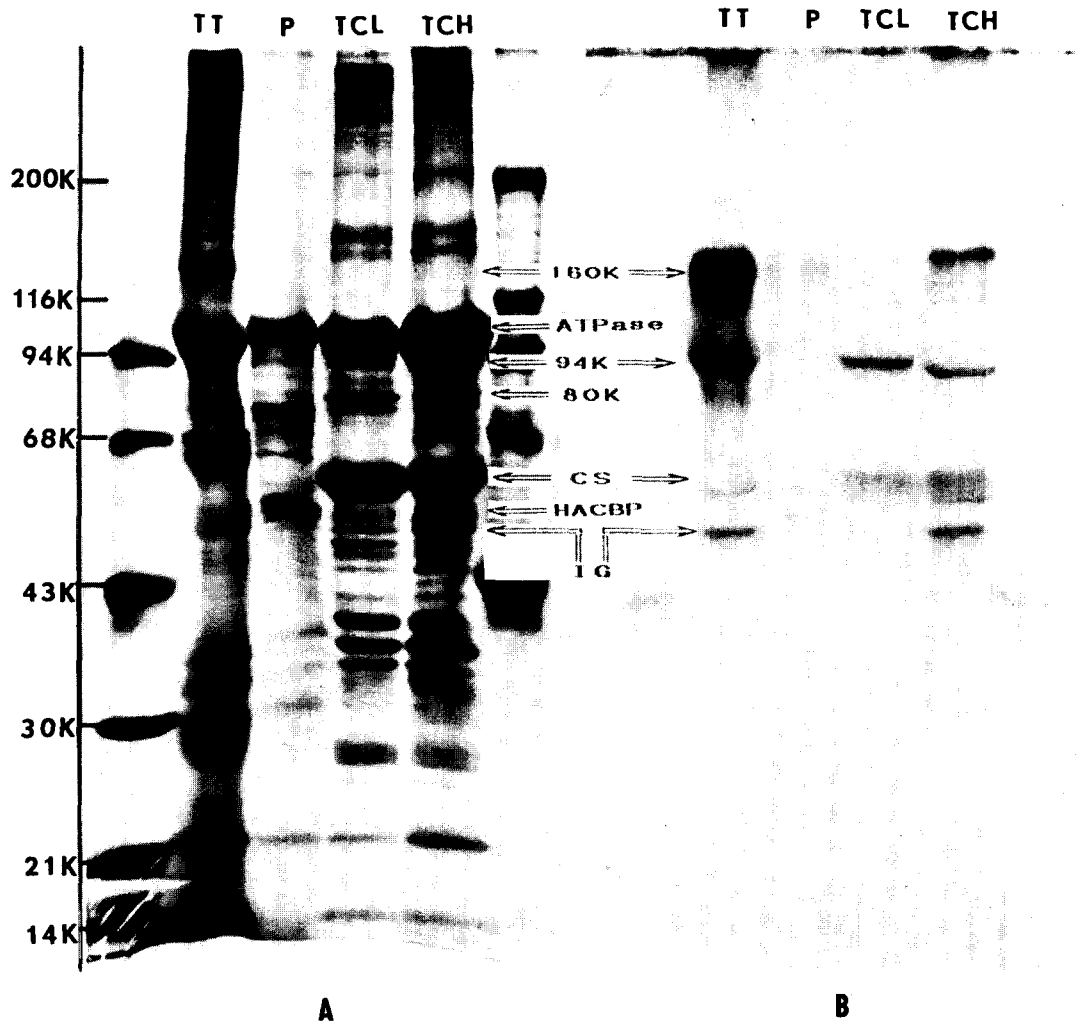


Fig. 2. A. SDS gel showing protein patterns of isolated T-tubules(TT), terminal cisternal light (TCL) and heavy (TCH) vesicles after French Press treatment and subsequent sucrose density gradient centrifugation. The pellet (P) at the bottom of the gradient after further purification of TT by Ca^{2+} oxalate loading is also shown. The protein standards were as described in Legend of Figure 1. B. Autoradiographic image of the gel in A after [¹²⁵I]- concanavalin A labeling.

고찰

근소포체의 막단백질 조성

본 연구에서는 토끼의 골격근의 근소포체를 sucrose gradient 원심분리와 French press법으로 여러 부분으로 분획하여 각 부분의 막단백질 조성 과 당단백질 조성을 비교 분석하였다. 이미 잘 알

려진 대표적인 막단백질인 Ca^{2+} -ATase는 모든 분획에서 나타나며, 막단백질의 대부분을 차지하였다. Sarzala와 Michalak(1978)의 보고에 의하면, Ca^{2+} -ATase는 근소포체의 light vesicle 에서는 총단백질의 75%~80%, heavy vesicle의 70%를 차지하는데 본 조사에서도 light vesicle에서 heavy vesicle에서 보다 더 많은 Ca^{2+} -

ATPase가 존재하였다. 그리고, heavy vesicle에서는 TCH 부위에 더욱 많았다(그림 1A와 2A). CS는 Ca^{2+} -ATPase와는 달리 heavy vesicle에 더욱 많이 들어있다. 그리고 heavy vesicle을 French press법으로 TT, TCL 및 TCH로 재분획한 경우에는 그림 2A에서 보는 바와 같이 TT 분획에는 CS가 거의 없고, TCL과 TCH에서는 Ca^{2+} -ATPase의 양과 거의 같은 정도로 많이 들어있다. 이와 같은 결과는 다른 보고(Meissner *et al.*, 1975; Lau *et al.*, 1979; Jorgensen *et al.*, 1979; Campbell *et al.*, 1980; Michalak *et al.*, 1980)와 일치한다. 한편, Sarzala와 Michalak(1978), Zubrzycka 등 (1978)에 의하면 CS는 peripheral protein으로 근소포체를 KCl 용액으로 처리하면, 쉽게 분리되는 것으로 알려져있다.

분자량이 약 55 Kd인 HACBP에 대해서는 학자들 간에 이견이 많다. 본 실험에서는 그림 1A와 2A에서 보는 바와 같이 heavy vesicle, 특히 terminal cisternae에 많고, light vesicle과 T-tubule에서는 HACBP의 band가 확인되지 않았다. 이러한 결과는 Michalak 등 (1980)의 보고와는 일치하지 않는다. 그들은 HACBP가 intrinsic protein으로 특히 T-tubule에 다량 함유되어 있다고 보고한 바 있다. 그러나, Meissner(1975)와 Yu 등(1976)은 HACBP가 heavy vesicle의 안쪽에 있는 extrinsic protein이어서 KCl이나 EDTA 처리로 쉽게 막에서 분리되지 않는다고 보고하였다. 한편, Sarzala와 Michalak(1978), Zubrzycka 등 (1978)은, light vesicle은 heavy vesicle과는 달리 막의 안팎이 뒤집어 있다고 보고하였다. 따라서, HACBP가 막의 안쪽에 있는 extrinsic protein이고, light vesicle이 뒤집혀 있다면, 골격근으로부터 근소포체를 분리하는 과정에서, light vesicle로부터 HACBP가 분리되어 나갔을 것으로 추측되지만, 앞으로 좀 더 확실히 규명해야할 것으로 사료된다.

본 연구에서 가장 주목되는 단백질은 분자량이 약 80 Kd인 단백질이다. 이 단백질은 CS와 비슷한 양상으로 light vesicle에서 보다 heavy vesicle에 많고, 특히 대부분 terminal cisternae에 들어있다. 80 Kd protein은 Wu 등 (1981)과 Park (1981)에 의해 배양 근세포의 막성계의 존재하는

phosphoprotein인 것으로 최초로 확인 보고되었다. 그리고, 최근에는 이 단백질이 포유류의 배양 세포에 있는 여러 heat shock(stress) protein 중의 하나이며, 배양액 중의 포도당의 농도에 그 합성이 영향을 받는 glucose-regulated protein이라는 사실이 밝혀졌다(Welch *et al.*, 1983; Lee *et al.*, 1984; Welch and Feramisco, 1985). 또한, Zala 등 (1980)과 Lee 등(1984)에 의해 소포체에 들어있는 phosphoprotein이라는 사실도 재확인되었다. 본 연구에서는 이 단백질이 근소포체 내에서도 주로 terminal cisternae에 들어있는 것으로 확인됨으로서 그 소재가 한층 명확히 밝혀진 것이다. 그런, 이 heat shock protein이 근소포체의 기능과 어떠한 관계가 있는 지는 앞으로 밝혀야 할 흥미있는 과제라 하겠다.

한편, Michalak 등 (1980)은 근소포체에서 분자량이 190 Kd과 160 Kd인 glycoprotein의 존재를 보고하였고, Campbell 등 (1980)은 heavy vesicle에서 30Kd과 33Kd인 intrinsic proteins와 34Kd와 38Kd인 extrinsic proteins의 존재를 확인하고, 이들 단백질이 sarcoplasmic reticulum feet를 구성하는 단백질일 것으로 추측하였다. 본 실험에서도 160 Kd glycoprotein과 heavy vesicle의 terminal cisternae에서 34 Kd와 38 Kd인 protein의 존재가 확인되었으나, Michalak가 주장한 190Kd glycoprotein은 나타나지 않았다.

근소포체의 당단백질 조성

근소포체의 각 분획의 전기영동상에서 뚜렷하게 나타난 glycoprotein은 CS, intrinsic glycoprotein(IG), 160Kd glycoprotein, 94Kd glycoprotein 등 모두 4종이다.

분자량이 160 Kd인 glycoprotein은 Michalak 등 (1980)에 의해 최초로 보고된 glycoprotein으로 근소포체의 모든 분획에 들어있으나, T-tubule에는 소량인 것으로 나타났다. 그런, 본 연구에서는 longitudinal sarcoplasmic reticulum에 해당하는 light vesicle에 가장 많으며 (그림 1B), heavy vesicle에서는 그림 2B에서 보는 바와 같이 T-tubule에 대단히 많아서 Michalak 등의 보고와 일치하지 않았다. 그리고 이 당단백질이 Coomassie blue로 염색한 gel에서보다 ^{125}I -con A로 표지

한 경우에 더욱 짙은 band로 나타나는 것으로 보아 당함량이 많은 단백질일 것으로 추정된다.

94 Kd glycoprotein은 그림 1B에서 보는 바와 같이 light vesicle에서는 극소량이고 heavy vesicle에 이르기까지 점차 증가하는 경향을 보이며, 이러한 경향은 CS와 유사하다. 한편, 근소포체의 heavy vesicle의 각 분획을 보면(그림 2B), T-tubule에 이 당단백질이 가장 많다. 따라서 그림 1B의 heavy vesicle에서 이 당단백질이 많은 것으로 나타나는 것은 heavy vesicle의 terminal cisternae에 T-tubule이 traide를 이루어 결합되어 있기 때문인 것으로 사료된다. 최근 포유류의 배양세포에서 분자량이 약 94 Kd인 glucose-regulated glycoprotein이 소포체에 다량으로 존재한다는 사실이 보고된 바 있다(Lee *et al.*, 1984; Koch *et al.*, 1986; Smith and Koch, 1987). 이 보고의 94Kd glycoprotein은 본연구에서 나타난 94 Kd glycoprotein과 동일한 것으로 추정되며, 본 연구를 통해 이 단백질이 근소포체에서도 특히 T-tubule에 다량으로 존재함이 처음으로 밝혀진 것이다.

CS는 근소포체에서 다른 당단백질보다 일찍 발견된 당단백질이며, 근소포체내에서 calcium buffer의 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Ikemoto *et al.*, 1976; MacLennan and Holland, 1975). Michalak(1980)의 보고에 의하면, CS는 light vesicle에는 소량 들어있고 heavy vesicle에 다량 들어 있으며, 더욱이 heavy vesicle 중에서도 T-tubule에는 거의 없고 terminal cisternae에 다량 들어 있다. 이러한 보고 내용은 본 실험의 결과와도 완전히 일치하며, 과거의 여러 보고(Caswell *et al.*, 1979; Lau *et al.*, 1979; Jorgensen *et al.*, 1979)를 뒷받침해 주는 것이다. 그림 2B에서 보면, CS의 band가 흐리게 나타나는데 이러한 현상은 이 당단백질의 당함량이 적어서 ^{125}I -con A로 잘 표지되지 않기 때문인 것으로 알려져 있다(Jones *et al.*, 1979).

IG는 분자량이 약 53 Kd으로 추정된다. Jones 등 (1979)에 의해 심근의 microsome에서 분자량이 약 55 Kd인 당단백질이 보고된 바 있으나, 골격근의 소포체에서는 Michalak 등 (1980)에 의해 처음으로 발견된 당단백질이다. 그들의 보고에 의하면, 근소포체의 모든 분획에 들어있으나, 특

히 T-tubule에 극히 소량 함유되어 있다. 그러나 본 연구에서는 T-tubule과 TCH에 비슷한 양으로 들어있고, TCL에는 거의 없어서 Michalak 등의 결과와는 일치하지 않는다.

한편 160 Kd glycoprotein과 94 Kd glycoprotein 사이에 나타난 흐릿한 2개의 당단백질 band는 본 연구에서 처음으로 나타난 것으로 이들의 확실한 존재 여부는 앞으로 좀 더 확인해야 될 것으로 사료된다.

인용문헌

- Campbell, K. P., C. Franzini-Armstrong, and A. E. Shammoo, 1980. Further characterization of light and heavy sarcoplasmic reticulum vesicles; Identification of the sarcoplasmic reticulum feet associated with heavy sarcoplasmic reticulum vesicles. *Biochem. Biophys. Acta* **602**:97-116
- Caswell, A. H., Y. H. Lau, M. Garcia, and J-P. Brunschwig, 1979. Recognition and junction formation by isolated transverse tubules and terminal cisternae of skeletal muscle, *J. Biol. Chem.* **254**:202-208.
- Clarke, S. M. and L. M. Fink, 1977. Studies on iodinated surface membrane proteins and concanavalin A agglutination of transformed Syrian hamster cells. *Biochem. Biophys. Acta* **464**:433-441.
- Clemetson, K. J., S. L. Pfueller, E. F. Luscher, and C. S. P. Jenkins, 1977. Isolation of the membrane glycoproteins of human blood platelets by lectin affinity chromatography. *Biochem. Biophys. Acta* **464**:493-508.
- Comings, D. E. and L. W. Cohen, 1979. Two-dimensional gel electrophoresis of ^{125}I -labeled surface proteins of human fibroblasts. *Biochem. Biophys. Acta* **578**:61-67.
- Greenwood, F. C. and W. M. Hunter, 1963. The preparation of ^{131}I -labeled human growth hormone of high specific radioactivity. *Biochem. J.* **89**:114-123.
- Jones, L. R., H. R. Besch, J. W. Fleming, M. M. McConnaughey, and A. M. Watanabe., 1979. Separation of vesicles of cardiac sarcolemma from vesicles of cardiac sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **254**:530-539.
- Jorgensen, A. O., V. I. Kalnins, E. Zubrzycka, and D. H. MacLennan, 1977. Localization by immunofluorescence of sarcoplasmic reticulum proteins in differentiating rat skeletal muscle cell cultures. *J. Cell Biol.* **74**:287-298.
- Jorgensen, A. O., V. I. Kalnins, and D. H. MacLennan, 1979. Lokalization of sarcoplasmic reticulum proteins in rat skeletal muscle by immunofluorescence. *J. Cell*

- Biol.* **80**:372-383.
- Koch, G., M. Smith, D. Macer, P. Webster, and R. Mortara, 1986. Endoplasmic reticulum contains a common, abundant calcium-binding glycoprotein, endoplasm. *J. Cell Sci.* **86**:217-232
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural protein during the assembly of bacteriophage T₄. *Nature* **227**:680-685.
- Lau, Y. H., A. H. Caswell, and J-P. Brunschwing, 1977. Isolation of transverse tubules by fractionation of traid junction of skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* **252**: 5565-5574.
- Lau, Y. H., A. H. Caswell, J-P. Brunschwing, R. J. Baerwald, and M. Garcia, 1979. Lipid analysis and freeze-fracture studies on isolated transverse tubules and sarcoplasmic reticulum subfractions of skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* **254**:540-546.
- Lee, A. S., J. Bell, and J. Ting, 1984. Biochemical characterization of the 94- and 78-kilodalton glucose-regulated proteins in hamster fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **259**:4616-4621
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall, 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem* **193**:265-275.
- Malan, N. T., R. Sabbadini, D. Sacles, and G. Inesi, 1975. Functional and structural roles of sarcoplasmic reticulum protein components. *FEBS Letters.* **60**: 122-125.
- MacLenna, D. H. and P. C. Holland, 1975. Calcium transport in sarcoplasmic reticulum. *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* **4**:377-404.
- Meissner, G. and S. Fleischer, 1974. Dissociation and reconstitution of functional sarcoplasmic reticulum vesicles. *J. Biol. Chem.* **249**:302-309.
- Meissner, G. 1975. Isolation and characterization of two types of sarcoplasmic reticulum vesicles. *Biochem. Biophys Acta* **389**:51-68.
- Michalak, M., K. P. Campbell, and D. H. MacLennan, 1980. Localization of the high affinity calcium binding proetin and intrinsic glycoprotein in sarcoplsmic reticulum membranes. *J. Biol. Chem.* **255**:1317-1326.
- Park, Young Chul, 1981. Ionomycin, a Ca²⁺ ionophore, promotes the synthesis of a 80,000-dalton protein in cultured chicken muscle. *국내외 과학 기술자 종합 학술대회 논문집.* **1**:170-173.
- Rostas, J. A. P., P. T. Kelly, and C. W. Cotman, 1977. The identification of membrane glycocomponents in polyacrylamide gels: A rapid method using ¹²⁵I-labeled lectins. *Anal. Biochem.* **80**:366-372.
- Sarzala, M. G. and M. Michalak, 1978. Studies on the heterogeneity of sarcoplasmic reticulum vesicles. *Biochem. Biophys. Acta* **513**:221-235.
- Smith, H. J. and G. E. Koch, 1987. Isolation and identification of partial cDNA clones for endoplasmic, the major glycoprotein of mammalian endoplasmic reticulum. *J. Mol. Biol.* **194**:345-347
- Welch, W. J., J. I. Garrels, G. P. Thomas., J. J-C. Lin, and J. R. Feramisco, 1983. Biochemical characterization of the mammalian stress proteins and identification of two stress proteins as glucose and Ca²⁺ -ionophore -regulated proteins. *J. Biol. Chem.* **258**:7102-7111.
- Welch, W. J. and J. R. Feramisco, 1985. Rapid purification of mammalian 70,000-dalton stress protein: Affinity of the proteins for nucleotides. *Mol. Cell. Biol.* **5**:1229-1237.
- Wu, F. S., Y. C. Park, D. Roufa, and A. Martonsoi, 1981. Selectvie stimulation of the synthesis of an 80,000--dalton protein by calcium ionophores. *J. Biol. Chem.* **256**:5309-5312.
- Yu, B. P., E. J. Masaro, and T. F. Morley, 1976. Analysis of the arrangement of protein components in the sarcoplasmic reticulum of rat skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* **251**:2037-2043.
- Zala, C. A., M. Salas-Prato, W. T. Yan, B. Banjo, and J. F. Perdue, 1980. In cultured chick embryo fibroblasts the hexose transport component are not the 75,000 and 95,000 dalton polypeptides synthesized following glucose deprivation. *Can. J. Biochem.* **58**:1178-1188
- Zubrzycka, E., B. Korczak, M. G. Sarzala, and W. Drabikowski, 1978. Location of peripheral proteins in sarcoplasmic reticulum vesicles, *FEBS Letters* **90**:215-217.

(Accepted February. 28, 1990)

**Studies on the Composition of Protein and
Glycoprotein in Sarcoplasmic Reticulum of Skeletal Muscle**

Park, Young Chul (Dept. of Biology Education, Kongju Teachers' College, Kongju,
314-701, Korea)

Sarcoplasmic reticulum subfractions were isolated from rabbit sarcoplasmic reticulum vesicles using ultracentrifugation in a continuous sucrose gradient (12.5%~50%) after French pressure treatment. And proteins in sarcoplasmic reticulum were detected by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and glycoproteins were identified through the reaction with ^{125}I -concanavalin A. The electrophoresis showed that sarcoplasmic reticulum contained predominantly Ca^{2+} -ATPase and calsequestrin along with high affinity calcium binding protein, intrinsic glycoprotein, 160 Kd, 94 Kd, 80 Kd, 38 Kd, 34 Kd and 24 Kd proteins. Among these, the protein of about 80 Kd which has been known as one of heat shock proteins was especially enriched in the terminal cisternae of sarcoplasmic reticulum. Meanwhile, autoradiogram of ^{125}I -concanavalin A bound to the stained gels showed the distribution of glycoproteins which included 160 Kd glycoprotein, 94 Kd glycoprotein, calsequestrin and intrinsic glycoprotein. Among these, the protein of about 160 Kd was especially enriched in longitudinal sarcoplasmic reticulum and T-tubule, and the protein of about 94 Kd which has been known as one of glucose-regulated proteins was also enriched in T-tubule and sharply reduced in terminal cisternae.