

성별에 따른 넙치 근원섬유단백질의 생화학적 특성

김태진 · 윤희동 · 이상민* · 김경길
국립수산진흥원, *순천향대학교 자원과학부

Biochemical Properties of Myofibrillar Protein in Olive Flounder by the Sex

Tae-Jin KIM, Ho-Dong YOON, Sang-Min LEE* and Kyung-Gyl KIM

National Fisheries Research and Development Agency, Pusan 619-900, Korea

*Dept. of Biological Resources, Soonchun Hyang university, Asan 336-600, Korea

Myofibrillar ATPase activity, thermostability and composition of muscle protein were investigated to elucidate biochemical properties regard with rearing period and sex of olive flounder. Myofibrillar ATPase activity of male olive flounder reared for 6, 12 and 20 months was stronger than that of female one. $Mg^{2+} (+Ca^{2+})$ -ATPase activity of both female and male fish decreased with the elapse of rearing period, and the activity of male was higher than that of female far beyond the rearing periods. The high correlation between the weight gain and myofibrillar ATPase activity was observed. The thermostability of male myofibrillar protein was higher than that of female. Subunit composition of the myofibrillar and sarcoplasmic protein did not show difference between the both sex of the fish.

Key words : ATPase activity, thermostability, myofibrillar protein, sarcoplasmic protein

서 론

최근 연근해 수산자원의 고갈로 어획량의 감소에 따라 양식에 의한 증산의 중요성은 점차 증대되고 있다. 어류 양식에 있어서 성장은 생산율과 함께 경제적 측면에서 대단히 중요하다. 일반적으로 양식에 있어서 성장은 양식되고 있는 집단의 전체적 양적 성장에 의하여 성장속도를 판별하였으나, 동일 어종에서도 성별에 따라 성장의 차이를 보이는 종류가 있어 이에 관한 연구가 많은 관심을 끌고 있다 (Jo, 1988; Kim et al., 1993). 성별에 따라서 성장에 차이를 보이는 어종에는 담수산으로는 암컷에 비하여 수컷의 성장이 빠른 틸라피아를 들수있고 (Gueerrero, 1975; Jensen, 1976), 해산어류종의 넙치는 암컷이 수컷에 비하여 성장이 현저히 빠른 것을 예로 들수있다 (Tabata, 1991). 넙치는 부화 후 3~4일째 부터 성분화가 일어나기 시작하여 전장 5~6 cm가 되면 완료되며 (Tanaka, 1987), 사육 8~10개월째 부터는 암수의 성장속도가 현저한 차이를 보여 만 2년이 경과하면 체중이 약 1.5~2배의 차이를 보이는 것으로 알려져 있다 (Tabata, 1991). 따라서 넙치의 경우 성분화가 일어나는 시기에 호르몬을 먹이 또는 사육조에 투여하여 성장이 빠른 암컷만을 유도하는 연구가 진행되고 있다 (Tanaka,

1988). 이와 같이 성별에 따른 성장의 차이는 성장 호르몬이나 생체내 대사 및 에너지 전환효율과 같은 내적요인과 밀접한 관련이 있을 것으로 생각되나, 성장에 따라 단백질의 특성과 관련된 연구는 충분히 되어 있지 않다. 따라서 본 연구에서는 성별에 따라 성장과정중에 있어 근육단백질의 대부분을 차지하고 있는 근원섬유의 생화학적인 특성을 비교, 검토하였다.

재료 및 방법

1. 재료

국립수산진흥원 양식개발과에서 각각 6개월, 12개월, 그리고 20개월간 사육한 넙치를 6~8마리씩을 시료로 취하여 즉살한 다음, 생식소에 따라 암 수로 구분하여 실험에 사용하였다.

2. 방법

(1) 근원섬유 및 근형질의 조제

근원섬유는 Perry와 Grey (1956)의 방법을 일부 개량하여 조제하였으며, 시료조제를 위한 모든 조작은 별도의 언급이 없는 한 4°C 전후의 저온에서 행하였다. 근원섬유의 추출은 마쇄한 넙치 보통육에 25 mM KCl · 39 mM H₃BO₃ 붕산완충액 (pH 7.1)을 5배 가하

여 균질화 한 후, 원심분리 (600×g, 15분)하였다. 침전물에 대하여 동일한 조작을 1회 반복한 다음 침전물 상층부의 미세한 부분만을 취하여 4배량의 0.1 M KCl · 39 mM H₃BO₃ 붕산완충액 (pH 7.1)에 현탁한 뒤, 원심분리 (600×g, 15분)하여 침전되는 결합조직을 제거하였다. 같은 조작을 3회 반복하여 결합조직을 완전히 제거한 후 같은 완충액에 현탁하여 이를 근원섬유로 하였다.

근형질은 넘치육을 마쇄하여 2.5배의 0.1 M KCl · 39 mM H₃BO₃ 붕산완충액 (pH 7.1)을 가하여 균질화한 후에 원심분리 (600×g, 20분)하여 얻어진 상층액을 근형질로 하였다.

(2) ATPase 활성의 측정

근원섬유의 ATPase활성은 25°C에서 여러가지 조건하에서 측정하였는데, Mg²⁺-ATPase활성은 5 mM MgCl₂, 0.1 M KCl, 20 mM Tris-maleate 완충액 (pH 7.0), 2 mM ATP, 0.5 mg myofibril/ml 및 0.25 mM CaCl₂, 또는 1 mM EGTA (ethylene glycol bis (β-amino ethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid)의 반응액으로 측정하였다. 그리고 Ca²⁺ 및 K⁺ (EDTA)-ATPase활성은 25 mM Tris-maleate 완충액 (pH 7.0), 2 mM ATP 및 0.5 mg myofibril/ml에 각각 5 mM CaCl₂ 및 0.05 M KCl, 또는 1 mM EDTA 및 0.5 M KCl을 첨가한 반응액에서 측정하였다. ATP를 가하여 반응이 시작후 1분, 2분, 4분 그리고 6분에 각각 2 ml씩을 취하여 15% TCA 1 ml로 반응을 정지시켰다. 유리된 γ-무기인산은 Fiske와 Subbarow (1925)의 방법에 따라 측정하고 ATPase 활성으로 환산하였다.

(3) 근원섬유의 열안정성

근원섬유의 열안정성은 0.1 M KCl · 39 mM H₃BO₃ 붕산완충액 (pH 7.1)에 근원섬유를 5 mg/ml 농도로 하여 40°C에서 0~15분간 열처리한 후, 25°C에서 25 mM Tris-maleate 완충액 (pH 7.0), 0.5 M KCl, 5 mM CaCl₂, 1 mM ATP 및 0.2 mg myofibril/ml의 조건에서 잔존하는 Ca²⁺-ATPase활성을 측정하였다. 변성속도항수 (K_D)는 Yasui et al. (1968)의 방법에 따라 1차 반응식으로 부터 계산하였다.

(4) 전기영동

전기영동은 Laemmli (1970)의 방법에 따라 0.1% SDS

(sodium dodecyl sulfate)를 함유한 7.5~20% polyacrylamide slab gel을 사용하였다. 분자량 결정을 위한 표준단백질은 Sigma제의 토끼골격근 myosin heavy chain (205 kDa), 대장균 β-galactosidase (116kDa), 토끼골격근 phosphorylase b (97.4kDa), 소 혈청 albumin (66kDa)과 ovalbumin (45kDa) 및 소 적혈구 carbonic anhydrase (29kDa)를 사용하였다.

(5) 단백질의 농도

단백질의 농도는 bovine serum albumin을 표준물질로 하여 biuret법으로 측정하였다. 그밖의 실험에서 얻어진 모든 실험결과는 Student's t-test로 평균간의 유의차를 검정하였다.

결과 및 고찰

성별에 따른 체중 및 체장변화

넙치는 암, 수에 따라서 성장의 차이를 보이는 대표적인 어종으로 이러한 성장의 차이는 수산물의 경제성 면에서 대단히 중요하다. 본 실험에 사용한 넙치의 암, 수에 따른 체중 및 체장의 변화는 Table 1에 나타난 바와 같이 6개월간 사육하였을 때 넙치 수컷의 체중이 암컷에 비하여 증증율은 85%에 불과하였으며 사육기간이 길어질수록 더 높은 차이를 보여 12개월째에는 75%, 20개월째에는 65%에 지나지 않아 암컷의 성장이 훨씬 빠르게 진행되었다. 또한 체장의 변화에 있어서도 체중의 변화와 비슷한 결과를 나타내었다.

근원섬유의 ATPase 활성

넙치 암 수 성별에 따른 성장의 차이는 대사산물인 단백질에 영향을 미쳐 근육단백질중 많은 비율을 차지하는 근원섬유의 특성과 깊은 관계가 있을 것으로 생각된다. 근원섬유는 근육단백질의 생리적 특성을 상당 부분 담당하고 있는데, 특히 생체내의 에너지 대사와 많은 관련이 있다 (岡本, 1987; 丸田, 1989).

근원섬유의 ATPase활성은 Table 2에 나타난 바와 같이 6개월 사육한 수컷에서 Mg²⁺ (-Ca²⁺)-, Mg²⁺ (+Ca²⁺)-, Ca²⁺- 및 EDTA-ATPase 활성이 0.128 ± 0.047 μmole

Table 1. Changes in body weight (g) and body length (cm) during rearing periods of olive flounder

Rearing period (month)	Body weight		Body length	
	Male	Female	Male	Female
6	285 ± 12	332 ± 24	23.8 ± 1.0	26.4 ± 1.8
12	472 ± 31	622 ± 37	27.5 ± 1.1	33.5 ± 1.5
20	788 ± 40	1,210 ± 52	31.8 ± 1.6	39.2 ± 1.8

Data were given by mean ± S.D. with 6~8 individuals.

Table 2. Myofibrillar ATPase activities of male and female olive flounder reared for 6 months

Sex	Mg ²⁺		Ca ²⁺	EDTA
	-Ca ²⁺	+Ca ²⁺		
Male	0.128 ± 0.047 ¹	0.776 ± 0.018	0.678 ± 0.028	0.118 ± 0.010
Female	0.091 ± 0.019	0.515 ± 0.034	0.571 ± 0.006	0.101 ± 0.019
	NS	p<0.01 ²	p<0.01	NS ³

¹ Data were given by mean ± S.D. with 6~8 individuals.

² Differences between male and female olive flounder are significant in student's t-test.

³ Differences between male and female olive flounder are not significant in student's t-test (p>0.05).

Table 3. Myofibrillar ATPase activities of male and female olive flounder reared for 12 months

Sex	Mg ²⁺		Ca ²⁺	EDTA
	-Ca ²⁺	+Ca ²⁺		
Male	0.040 ± 0.006 ¹	0.573 ± 0.018	0.494 ± 0.007	0.085 ± 0.030
Female	0.033 ± 0.005	0.470 ± 0.017	0.466 ± 0.001	0.052 ± 0.015
	NS	p<0.01 ²	p<0.01	NS ³

¹⁻³ Refer to the foot note of Table 2.

Table 4. Myofibrillar ATPase activities of male and female olive flounder reared for 20 months

Sex	Mg ²⁺		Ca ²⁺	EDTA
	-Ca ²⁺	+Ca ²⁺		
Male	0.080 ± 0.015 ¹	0.541 ± 0.006	0.431 ± 0.019	0.086 ± 0.003
Female	0.054 ± 0.004	0.388 ± 0.015	0.324 ± 0.014	0.075 ± 0.002
	NS	p<0.01 ²	p<0.01	NS ³

¹⁻³ Refer to the foot note of Table 2.

Pi/mg/min, 0.776 ± 0.018 μmole Pi/mg/min, 0.678 ± 0.028 μmole Pi/mg/min 및 0.118 ± 0.010 μmole Pi/mg/min으로, 암컷의 0.091 ± 0.019 μmole Pi/mg/min, 0.515 ± 0.034 μmole Pi/mg/min, 0.571 ± 0.006 μmole Pi/mg/min 및 0.101 ± 0.019 μmole Pi/mg/min 보다 높았으며, 특히 Mg²⁺ (+Ca²⁺)- 와 Ca²⁺-ATPase 활성에서 수컷이 암컷에 비하여 유의적 (P<0.01)으로 높은 경향을 나타내었다. 12개월간 사육한 넙치는 Table 3에서와 같이 수컷이 암컷에 비하여 높아 6개월간 사육한 결과와 같은 경향을 보였으며, Mg²⁺ (+Ca²⁺)- 및 Ca²⁺-ATPase 활성에서 역시 유의성을 나타내었다.

20개월간 사육한 넙치는 성어에 해당하는 것으로 Table 4에서 보는 바와 같이 수컷이 암컷에 비하여 높은 ATPase 활성을 보였으며, 특히 Mg²⁺ (+Ca²⁺)- 와 Ca²⁺-ATPase 활성이 수컷은 0.541 ± 0.006 μmole Pi/mg/min와 0.431 ± 0.019 μmole Pi/mg/min으로 암컷의 0.388 ± 0.015 μmole Pi/mg/min, 0.324 ± 0.014 μmole Pi/mg/min에 비하여 상대적으로 높았다. 이와 같이 근원섬유의 AT-

Pase 활성 가운데 Mg²⁺ (+Ca²⁺)-ATPase 활성이 가장 높았는데, 이는 각 성장단계에 있어서 운동성의 높고 낮은 수준을 보여주고 있으며, Mg²⁺ (+Ca²⁺)-ATPase 활성의 상승으로 상대적으로 가는 섬유인 actin과 결합하는 능력이 강함을 시사하고 있다.

또한 사육기간별 Mg²⁺ (+Ca²⁺)-ATPase 활성은 성장이 가장 왕성한 6개월째에 수컷과 암컷이 각각 0.776 ± 0.018 μmole Pi/mg/min, 0.515 ± 0.034 μmole Pi/mg/min으로 12월간 사육한 암 수 0.573 ± 0.018 μmole Pi/mg/min, 0.470 ± 0.017 μmole Pi/mg/min보다 높았으며, 20개월간 사육한 넙치는 암 수 각각 0.541 ± 0.006 μmole Pi/mg/min, 0.388 ± 0.015 μmole Pi/mg/min으로 가장 낮았다. 근원섬유의 Mg²⁺ (+Ca²⁺)-ATPase 활성과 성장시기 또는 사육기간에 따른 상관관계를 보면 Fig. 1과 같다. 즉, 넙치 수컷은 Y = -0.1161X + 0.8632 였고, 암컷은 Y = -0.0621X + 0.5815 였으며, 이때의 상관계수는 각각 0.8229와 0.8846 이었다. 이로 부터 성장의 시기와 근원섬유의 ATPase 활성간에 상관성이 높음을 확인할 수 있었다. 또한

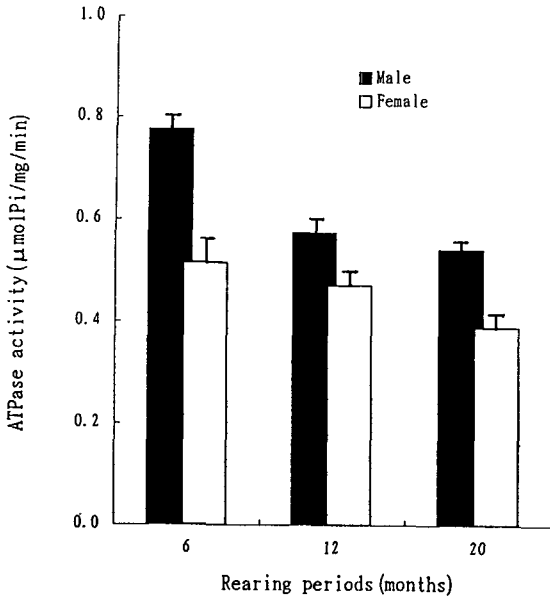


Fig. 1. Relationship between myofibrillar Mg²⁺ (+ Ca²⁺)-ATPase activity and rearing periods in male and female of olive flounder.

수컷의 근원섬유 ATPase활성이 암컷에 비하여 높는데, 이는 수컷이 근육운동에 소비하는 에너지량이 커서 상대적으로 암컷의 성장이 높은 것으로 추정된다.

Kim et al. (1995)은 근원섬유의 ATPase 활성이 자연산과 양식산 간에도 차이가 있고 계절적인 차이도 있다고 하였으며, 특히 같은 어종을 각각 다른 환경에 적응시켰을때는 다르게 나타나는데 이는 어류가 변화된 환경에 적응하고자 생리적 또는 근육의 생화학적 특성이 변화한 때문이며 (Johnstone et al., 1973); 이와 같은 변화

는 그 구성단백질의 구조가 변화되었을 가능성을 시사하고 있다고 하였다 (Hwang et al., 1990, 1991). 이와같은 성별에 따른 근원섬유의 ATPase활성의 차이는 그들 단백질의 생화학적인 성상에 차이가 있음을 보여주는 것이며, 동일 환경조건이라도 에너지 이용효율 내지는 체내 대사에 영향을 미쳐 성장속도에 차이를 유도한 것으로 생각된다.

근원섬유의 열안정성

근원섬유를 40°C에서 열처리하여 잔존 Ca²⁺-ATPase를 측정된 결과, Table 5와 같이 성별에 따라 근원섬유의 열안정성이 차이를 나타내었다. 6개월, 12개월 및 20개월 간 각각 사육한 넙치는 수컷이 2.1×10⁻³s⁻¹, 1.6×10⁻³s⁻¹, 3.0×10⁻³s⁻¹로 암컷의 1.7×10⁻³s⁻¹, 0.9×10⁻³s⁻¹, 1.9×10⁻³s⁻¹ 보다 높아 (P<0.01) 수컷의 근원섬유가 암컷에 비하여 열안정성이 떨어지는 것을 보여주었으며, 이러한 결과로부터 넙치의 성별에 따른 근원섬유 ATPase 활성이나 열안정성에 차이를 보여 근원섬유의 특성이 다를 수 있었다.

근원섬유 및 근형질의 구성subunit의 조성

Fig. 2는 넙치 암 수 근원섬유와 근형질 단백질의 7.5~20% polyacrylamide gel 전기영동도를 나타내고 있다. 넙치 암·수간에 근원섬유를 구성하는 subunit의 패턴에는 차이를 볼 수 없었다. 근형질 단백질 구성 subunit도 넙치 암·수 간의 차이를 보이지 않았는데, 자연산과 양식산 넙치의 경우 근형질의 하부구조가 SDS-PAGE상에서는 동일한 패턴을 보였으나, 2차원 전기영동상에서는 subunit의 차이를 뚜렷이 나타내었다 (Kim et al., 1995). 온도

Table 5. Inactivation rate constant (K_D) for myofibrillar protein of male and female olive flounder reared for 6, 12 and 20 months

Rearing period (month)	K _D × 10 ³	
	Male	Female
6	2.1 ± 0.2 ¹	1.7 ± 0.7
12	1.6 ± 0.2	0.9 ± 0.2
20	3.0 ± 0.1	1.9 ± 0.2

¹ Data were given by mean ± S.D. with 6~8 individuals.

² Differences between male and female olive flounder are significant in student's t-test. Two mg myofibrils/ml in 39 mM borate buffer (pH 7.1) containing 0.1 M KCl was heated at 40°C for 0~15 min. The remaining Ca²⁺-ATPase activity was measured in a reaction mixture containing 20 mM Tris-maleate (pH 7.0), 0.5 MKCl, 5 mM CaCl₂, 1 mM ATP and 0.2 mg myofibrils/ml. K_D was calculated from the first order reaction (s⁻¹).

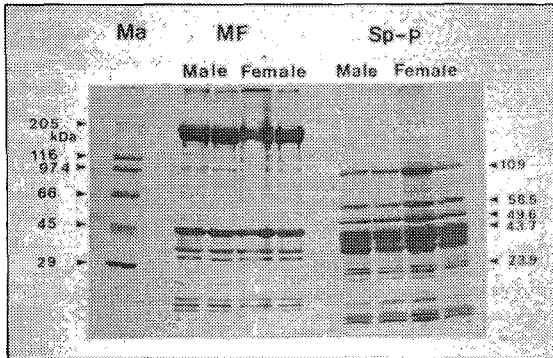


Fig. 2. SDS-PAGE patterns of myofibrillar and sarcoplasmic protein in the male and female olive flounder. 50 μ g myofibrils and sarcoplasmic protein were applied to 7.5~20% gradient polyacrylamide slab gel containing 0.1% SDS. Abbreviations used : Ma, marker protein; MF, myofibrillar protein; Sp-p, sarcoplasmic protein.

순화한 잉어의 근형질의 subunit 조성에서도 64kDa과 50 kDa에 해당하는 단백질이 차이를 보였는데, 이는 환경적응에 의하여 근육을 구성하는 단백질의 구조가 바뀌어졌기 때문이라고 하였다 (Watabe et al., 1993).

이상의 결과로 부터 판단할때 넙치 암·수를 따로 사육하여 이들의 성장기간별로 근원섬유의 특성을 주로 담당하고 있는 myosin의 생화학적 특성을 상세히 알아볼 필요가 있는 것으로 생각된다.

요 약

6개월, 12개월 및 20개월간 사육한 넙치를 죽살하여 암수를 구분한 후 등육을 취하여 각각의 사육기간 별로 근원섬유의 ATPase 활성, 열안정성 및 각 단백질의 subunit조성을 실험, 검토하였다. 6개월 사육한 수컷의 근원섬유의 ATPase 활성은 암컷에 비하여 높았으며, 특히 $Mg^{2+} (+Ca^{2+})-$ 와 $Ca^{2+}-$ ATPase 활성에서 현저한 차이를 나타내었다. 12개월간 사육한 넙치에 있어서도 6개월간 사육한 것과 비슷한 경향을 보였으며, 20개월간 사육한 넙치 역시 유사한 경향을 나타내어 주었다. 또한 사육기간에 따라서 근원섬유의 ATPase 활성이 차이를 나타내었는데, 특히 $Mg^{2+} (+Ca^{2+})-ATPase$ 활성이 성장이 활발한 6개월째 사육한 넙치에서 가장 높았으며, 그 다음으로 12개월과 20개월간 사육한 순으로 나타나 성장

속도와 근원섬유의 ATPase 활성간에 높은 상관관계가 있음을 암시하였다. 근원섬유의 열안정성에 있어서도 수컷이 암컷에 비하여 현저히 떨어지는 경향을 보였다.

참 고 문 헌

Fiske, C. K. and Y. Subbarow. 1925. The colorimetric determination of phosphorous. J. Biol. Chem., 66, 375~400.

Gueerrero, R. D., 1982. Control of tilapia reproduction. In *The Biology and Culture of tilapias*. (R. S. V. Pullin and R. H. Lowe-Macconnel, Editors). International Center for Living Aquatic Resources Management, Manila, 309~316.

Hwang, G. C., S. Watabe and K. Hashimoto. 1990. Changes of carp myosin ATPase induced by temperature acclimation. J. Comp. Physiol B, 160, 233~239.

Hwang, G. C., Y. Ochiai, S. Watabe and K. Hashimoto. 1991. Changes of carp myosin subfragment-1 induced by temperature acclimation. J. Comp. Physiol B, 161, 141~146.

Jensen, G. L., 1976. The effect of several naturally occurring estrogens on *Sarotherodon aureus* (Steindachner) and their potential application to yield monosex genetic male. M. S. Thesis, Auburn, Alabama.

Jo, J.-Y., 1988. Effects of 17 α -methyltestosterone in the diet of sex reversal growth body composition and gonadosomatic indices of *Tilapia aurea* and on sex reversal and growth of *T. nilotica*. Ph. D. Thesis, Auburn, Alabama.

Johnstone, I. A., N. Frearson and G. Goldspink. 1973. The effects of the environmental temperature on the properties of myofibrillar adenosine triphosphatase from various species of fish. Biochem. J., 133, 735~738.

Kim, T. J., H. D. Yoon, G. C. Hwang and S. J. Kim. 1995. Physicochemical properties of wild and cultivated flounder muscle protein. Bull. Nat. Fish. Res. Dev. Agency, 49, 187~195 (in Korean).

Kim, Y., K. K. Kim, I. C. Bang and J. K. Lee, 1993c. Studies on the production of all-female populations of olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. I. Introduction of gynogenetic diploid and its growth. J. Aquat. 6, 285~293.

Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227, 680~685.

Perry, S. V. and T. C. Grey. 1956. A study of effects of substrate concentration and certain relaxing factors on the magnesium activated myofibrillar adenosine triphosphatase. Biochem. J. 64, 184~192.

Tabata, K. 1991. Application of chromosomal manipulation

- in aquaculture of hirame, *Paralichthys olivaceus*. Bull. Hyogo Pref. Fish. Exp. Stn. 28, 1~134.
- Tanaka, H. 1987. Gonadal sex differentiation in flounder, *Paralichthys olivaceus*. Bull. Natl. Res. Inst. Aquat. 11, 7~19.
- Tanaka, H. 1988. Effects of estradiol-17 β on gonadal sex differentiation in flounder, *Paralichthys olivaceus*. Bull. Natl. Res. Inst. Aquat. 13, 17~23.
- Watabe, S., G. C. Hwang, H. Ushio, and K. Hashimoto. 1989. Biochemical responses to thermal acclimation in muscle proteins of carp. Current topics in marine biochemistry, Tokyo, 323~326.
- Watabe, S., K. Kikuchi and K. Aida. 1993. Cold- and warm-temperature acclimation induces specific cytosolic proteins in goldfish and carp. Nippon Suisan Gakkaishi, 59, 151~156.
- Yasui, T., H. Kawakami and F. Morita. 1968. Thermal inactivation of myosin adenosine triphosphatase in the presence of F-actin. Agric. Biol. Chem., 32, 225~233.
- 岡本 洋. 1987. ミオシンATPase. 蛋白質 核酸 酵素, 32, 142~152.
- 丸田 浩. 1989. ミオシンの構造と機能の多様性. 蛋白質 核酸 酵素, 34, 1310~1315.

1996년 8월 28일 접수

1997년 5월 6일 수리