

# Pilocarpine 이 토끼 적혈구막의 NaK ATPase 의 활성도에 대한 작용

경희대학교 의과대학 생리학교실

고 일 섭

=Abstract=

## Action of Pilocarpine on Sodium-Potassium activated ATPase in Rabbit Red Cell Membrane

Il Sup Koh

*Department of Physiology, School of Medicine, Kyung Hee University, Seoul, Korea*

The action of pilocarpine on the sodium plus potassium activated ATPase activity in the rabbit red cell membrane has been investigated and the experiments were also designed to determine the mechanism of action of pilocarpine on the ATPase activity. The following results were observed.

1. The activity of the NaK ATPase from red cell membrane is stimulated by pilocarpine, and the concentration of pilocarpine for maximal activity is about 3mM. The pH optimum for the pilocarpine sensitive component is 8.0.
2. The activating effect of pilocarpine on the ATPase, with a given concentration of sodium in the medium, is increased by raising the potassium concentration but activity ratio is decreased
3. The activating effect of pilocarpine on the ATPase, with a given concentration of potassium in the medium, is increased by raising the sodium concentration but activity ratio is decreased
4. The NaK ATPase activity is increased by small amounts of calcium but decreased by larger amounts. The activity ratio of the enzyme by pilocarpine is decreased by small amounts of calcium but decreased by larger amounts.
5. The activating effect of pilocarpine on the ATPase was not related to the sulfhydryl group of cysteine, the hydroxyl group of threonine or the imidazole group of histidine.
6. The activating effect of pilocarpine on the ATPase is due to amino group and carboxyl group of the enzyme of NaK ATPase

### 서 론

생체 세포막에서 Na 이온을 세포 밖으로 K 이온을 세포 안으로 전기 화학적농도 구배에 역행해서 이동하는 이온의 능동적 운반<sup>1-3)</sup>은 세포내에서 이루어지는 해당 과정에서 형성된 adenosine triphosphate (ATP)의 분

해과정에서 유리되는 에너지를 사용하고 있다 함은 널리 인정되어 있다<sup>4-9)</sup>.

사람 적혈구에서 한 분자의 ATP가 분해할 때 3개의 Na 이온을 세포막 밖으로 2개의 K 이온은 세포막 안으로 능동적 운반을 하고 있다는 것을 근래에 이르러 여러 연구자들이 주장하고 있는 것이다<sup>10-12)</sup>.

Skou<sup>13)</sup>는 계의 말초신경에서 Na 이온과 K 이온을 동

시에 첨가했을 때에 활성화되는 adenosine triphosphatase (NaK ATPase)가 있다는 것을 발견하고 이 같은 효소가 세포막에서 이루어지는 이온의 능동적 운반과 밀접한 관계가 있다는 것을 처음으로 암시하였다. 그후 적혈구막에서도 Na 이온과 K 이온을 동시에 첨가하였을 때 활성화되는 ATPase 가 있으며 이 효소와 세포막에서 이루어지는 이온의 능동적 운반과 밀접한 관계가 있다는 것을 여러 연구자들<sup>8,14,15,16</sup>에 의하여 주장되었다.

적은 농도의 ouabain 은 이온의 능동적 운반을 억제하고 같은 농도의 ouabain 은 여러 조직에서 Na 이온과 K 이온으로 활성화되는 ATPase 의 활성도를 억제하고 있음으로 이같은 ouabain 의 작용은 이온의 능동적 운반과 이 효소가 서로 관계를 갖고 있다는 것을 제시하고 있는 것이다<sup>17-20</sup>.

세포막에서 이루어지는 이온의 능동적 운반과 밀접한 관계가 있는 Na 이온과 K 이온을 동시에 첨가하였을 때에 활성화되는 ATPase 의 활성도에 대한 pilocarpine 의 작용은 알려져 있지 않다.

본 실험에서는 토끼 적혈구로 ghosts 세포를 만들어 세포막만을 분리하여 세포막내에 있는 Na 이온과 K 이온으로 활성화되는 ATPase 의 활성도에 대한 pilocarpine 의 작용을 규명하고 그 작용기전도 아울러 실험하였다.

## 실험 방법

체중 2 kg 내외의 성숙한 토끼를 성의 구별없이 사용하였다. 심장 점자로 채혈한 혈액을 heparin 으로 응고를 방지하여 15분간 1,000 xg 로 원심분리한 다음 혈장과 백혈구층을 제거하였다. 이렇게 해서 얻은 적혈구막을 모아서 생리식염수로 2회 원심조작으로 세척한 다음 다시 등장성 MgCl<sub>2</sub> 용액에 1 mM EDTA 를 함유한 용액으로 2회 세척하였다.

이렇게 세척된 적혈구막을 모아서 혈색소의 부착이 없는 적혈구막(hemoglobin-free ghosts)을 얻기 위하여 Rosenberg<sup>21</sup>등의 방법에 따라서 30배 용량의 15 mOsM Tris-HCl buffer 용액을 첨가하여 4°C 에서 한시간 동안 방치하였다.

이렇게 용혈된 적혈구를 4°C 에서 10,000 xg 로 15분간 원심분리한 다음 상등액을 제거하여 막분획만을 얻었다. 침전된 막분획을 다시 15 mOsM Tris-HCl buffer 용액에 1 mM EDTA 를 혼합한 용액으로 2회 원심조작으로 세척한 다음 15 mOsM Tris-HCl buffer 용

액으로 1회 세척하였다. 이렇게 해서 얻은 막분획은 혈색소의 부착이 없는 유백색의 막분획이었으며 이것은 본 실험에 사용하였다.

ATPase 의 활성도는 Dunham<sup>16</sup>등의 방법에 따라서 측정하였다. 10 ml 의 여러 실험관내에 막분획과 여러 반응액을 각각 0.1 ml 씩을 첨가하고 증류수로 조절하여 총량을 1 ml 로 하여 44°C 에서 한시간동안 water bath 에 부치하였다. 여러 실험관에 여러 반응액을 넣은 다음 15 mM ATP 를 가할 때는 15초 간격으로 첨가하고 한시간 동안 반응을 시킨 다음에는 다시 15분 간격으로 얼음으로 냉각시킨 물속으로 실험관을 이동시켜서 1분간 냉각시켰다.

다시 얼음으로 냉각된 10% trichloroacetic acid 를 1 ml 씩을 같은 시간 간격으로 첨가하여 반응을 정지시킨 다음 15분간 1,000 xg 로 원심분리하여 단백질을 침전시키고 그 상등액 1.5 ml 내에 유리된 inorganic phosphate 를 Fiske-Subbarow<sup>22</sup>법에 의하여 측정하여 ATPase 의 활성도를 나타내었다.

## 실험 성적

### 1. Pilocarpine 의 농도의 영향

반응액내의 pilocarpine 의 농도를 0에서 8 mM 까지 증가시키면서 NaK ATPase 의 활성도에 미치는 영향을 제 1 도에 도시하였다.

반응액내의 pilocarpine 의 농도를 0에서 8 mM 까지 증가시키는데 따라서 NaK ATPase 의 활성도는 증가

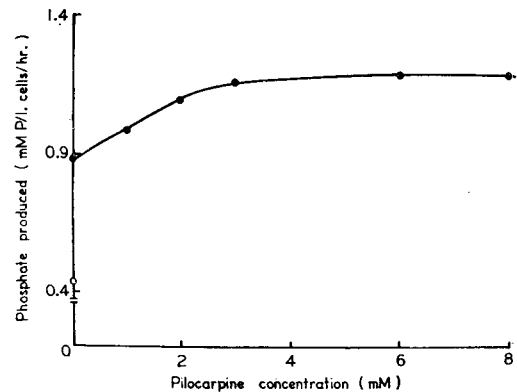


Fig. 1. The effect of pilocarpine concentration on the ATPase activity of red cell ghosts. Temp. 44°C; pH 7.6; ATP 1.5 mM; Mg 2 mM; Na 80 mM; K 17 mM. Duration 1 hr. Each point represents the mean of three experiments.

되나 0에서 3 mM까지는 급격히 활성도는 증가되나 3 mM에서 8 mM까지는 활성도는 증가되지 않고 일정하게 나타난다.

Pilocarpine은 NaK ATPase의 활성도를 증가시키는 작용이 있으며 활성도에 대한 최적 농도는 3 mM이다.

### 2. pH의 영향

제 2 도에는 pilocarpine 4 mM은 작용하였을 때와 작용하지 않았을 때의 pH의 변동에 따라서 나타나는 영향을 도시하였다.

이 실험에서 반응액내의 pH는 0.2M Tris와 0.2 M HCl을 혼합하여 pH를 6.8에 9.0까지 변동시켜서 NaK ATPase의 활성도의 변동을 측정하였다. 반응액내의 pH의 변동에 따라서 NaK ATPase의 활성도는 영향을 받으며 pilocarpine을 작용하였을 때와 작용하지 않았을 때의 별다른 차이를 나타내지 않았으며, 최적 pH는 8.0이다.

### 3. K이온의 농도의 영향

반응액내의 Na이온의 농도를 일정하게 유지하고 K

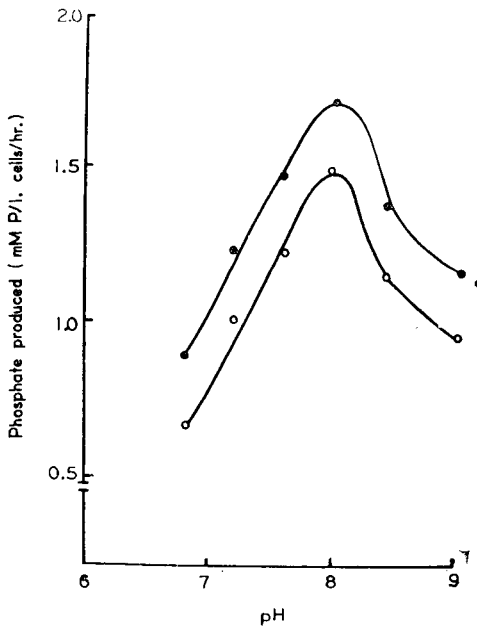


Fig. 2. The effect of pH on the ATPase activity of red cell ghosts in the presence and absence of pilocarpine. Temp. 44°C; ATP 1.5 mM; Mg 2 mM; Na 80 mM; K 17 mM. Duration 1 hr. ○ pilocarpine absent; ● pilocarpine 4 mM. Each point represents the mean of two experiments.

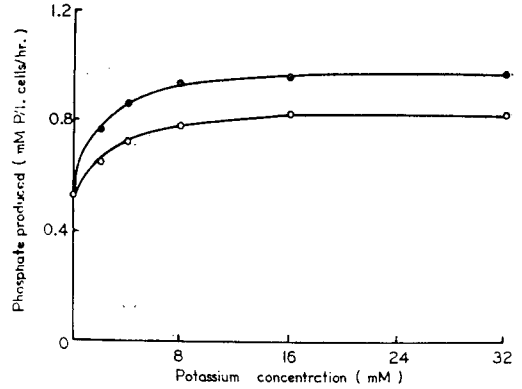


Fig. 3. The effect of potassium concentration on the ATPase activity of red cell ghosts in the presence and absence of pilocarpine. Temp. 44°C; pH 7.6, ATP 1.5 mM; Mg 2 mM; Na 80 mM; Duration 1 hr. ○ pilocarpine absent; ● pilocarpine 4 mM. Each point represents the mean of three experiments.

이온의 농도를 변동시키면서 ATPase의 활성도의 변동과 여기에 일정농도의 pilocarpine을 첨가하였을 때 나타나는 ATPase의 변동을 동시에 관찰한 실험을 제 3도에 도시하였다. 반응액내의 Na이온의 농도를 80 mM로 일정하게 유지하고 K이온의 농도를 0에서 32 mM까지 증가시킨 실험에서 K이온의 농도가 8 mM에 도달할 때까지는 ATPase의 활성도는 점차적으로 증가되나 그 이상의 농도에서는 농도증가에 따라서 효소의 활성도의 증가는 나타나지 않고 거의 일정하게 나타난다.

Pilocarpine을 첨가하였을 때의 ATPase의 활성도의 증가비율은 K이온의 농도를 증가시키는데 따라서 감소되었다(제 1 표).

### 4. Na이온의 농도의 영향

반응액내의 K이온의 농도를 일정하게 유지하고 Na이온의 농도를 변동하여 ATPase의 활성도의 변동과 여기에 일정 농도의 pilocarpine을 첨가하였을 때의 ATPase의 활성도의 변동을 동시에 관찰한 실험을 제 4도에 도시하였다.

반응액내의 K이온의 농도를 17 mM로 일정하게 유지하고 Na이온의 농도를 0에서 160 mM까지 증가시키면 ATPase의 활성도는 Na이온의 농도가 50 mM에 도달할 때까지는 점차적으로 증가하나 그 이상의 농도에서는 농도의 증가에 따라서 활성도는 증가되지 않고 일정하게 나타난다.

Table 1. The effect of potassium concentration on stimulation by pilocarpine of the ATPase activity of red cell ghosts

| K concentration (mM) | Total ATPase activity (mM p/l. cells/hr.) | Activity in the presence of pilocarpine (4 mM) (mM p/l. cells/hr.) | Activation (%) |
|----------------------|---|--|----------------|
| 0                    | 0.53                                      |  |                |
| 2                    | 0.64                                      | 0.76   | 109.1          |
| 4                    | 0.72                                      | 0.85   | 68.4           |
| 8                    | 0.77                                      | 0.96   | 58.3           |
| 16                   | 0.81                                      | 0.95   | 50.0           |
| 32                   | 0.82                                      | 0.97   | 51.7           |

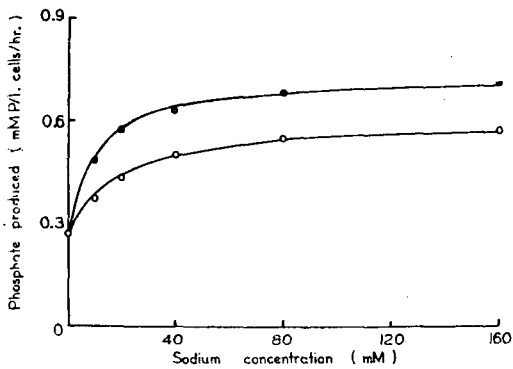


Fig. 4. The effect of sodium concentration on the ATPase activity of red cell ghosts in the presence and absence of pilocarpine. Temp. 44°C; pH 7.6; ATP 1.5mM; Mg 2 mM; K 17 mM. Duration 1 hr. ○ pilocarpine absent; ● pilocarpine 4mM. Each point represents the mean of two experiments.

반응액 내에 pilocarpine 을 첨가하였을 때의 ATPase 의 활성도의 증가율은 Na 이온의 농도를 증가하는데 따라서 감소되었다(제 2 표).

### 5. Ca 이온의 농도의 영향

Ca 이온의 농도를 변동시키면서 NaK ATPase 의 활성도에 미치는 영향과 여기에 일정농도의 pilocarpine 을 첨가하였을 때의 활성도의 변동을 제 5도에 도시하였다.

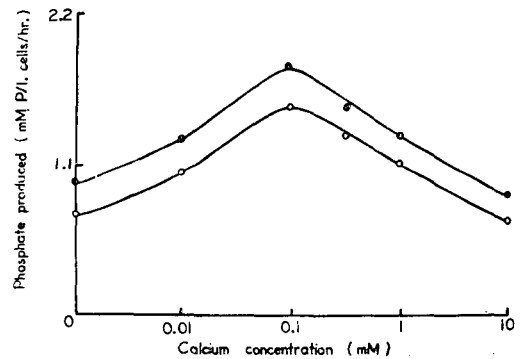


Fig. 5. The effect of calcium concentration on the ATPase activity of red cell ghosts in the presence and absence of pilocarpine. Temp. 44°C; pH 7.6; ATP 1.5 mM; Mg 2 mM; Na 80 mM; K 17 mM. Duration 1 hr. ○ pilocarpine absent; ● pilocarpine 4mM. Each point represents the mean of three experiments.

Table 2. The effect of sodium concentration on stimulation by pilocarpine of the ATPase activity of red cell ghosts

| Na concentration (mM) | Total ATPase activity (mM p/l. cells/hr) | Activity in the presence of pilocarpine (4 mM) (mM p/l. cells/hr) | Activation (%) |
|-----------------------|--|---|----------------|
| 0                     | 0.27                                     |   |                |
| 10                    | 0.38                                     | 0.48  | 90.9           |
| 20                    | 0.43                                     | 0.57  | 87.5           |
| 40                    | 0.50                                     | 0.62  | 52.2           |
| 80                    | 0.54                                     | 0.68  | 51.9           |
| 160                   | 0.57                                     | 0.71  | 46.7           |

**Table 3. The effect of calcium concentration on stimulation by pilocarpine of the ATPase activity of red cell ghosts**

| Ca concentration (mM) | Total ATPase activity (mM p/l. cells/hr.) | Activity in the presence of pilocarpine (4 mM) (mM p/l. cells/hr.) | Activation (%) |
|-----------------------|---|--|----------------|
| 0                     | 0.74                                      | 0.97   | 31.1           |
| 0.01                  | 1.05                                      | 1.29   | 22.9           |
| 0.1                   | 1.53                                      | 1.81   | 17.7           |
| 0.5                   | 1.31                                      | 1.52   | 16.0           |
| 1.0                   | 1.12                                      | 1.32   | 17.9           |
| 10.0                  | 0.70                                      | 0.89   | 27.2           |

Ca 이온의 농도를 0에서 10 mM 까지 증가시켜서 NaK ATPase 의 활성도의 변동을 관찰한 실험에서 Ca 이온의 농도가 0.1 mM 에 도달할 때 까지는 이 효소의 활성도는 증가되나 더욱 농도를 증가시키면 활성도는 억제되었다.

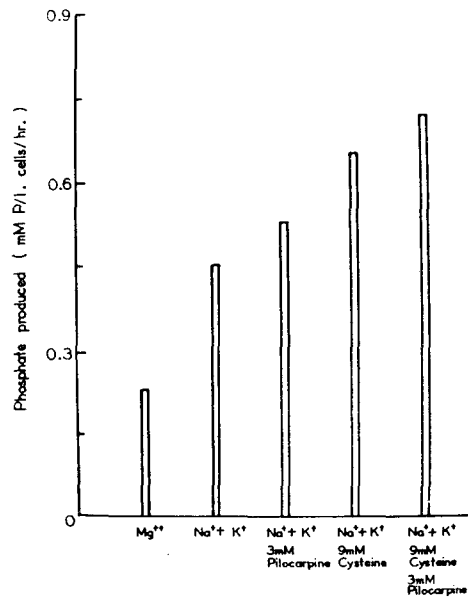
Ca 이온의 농도를 증가시키는데 따라서 pilocarpine 의 작용으로 나타나는 NaK ATPase 의 활성도의 증가는 낮은 농도에서 감소되나 높은 농도에서는 증가되었다(제 3 표).

**6. Cysteine 의 영향**

NaK ATPase 이 활성도에 대한 pilocarpine 의 촉진 작용에 cysteine 을 작용시켜서 나타나는 영향을 본 실험을 제 6 도에 도시하였다.

이 실험에서 Mg 이온만을 첨가하여 나타나는 Mg ATPase 의 활성도 보다 Mg 이온에 Na 이온과 K 이온을 동시에 첨가하여 활성화되는 NaK ATPase 의 활성도는 현저한 촉진작용이 나타났다. 이 NaK ATPase 에 pilocarpine 만을 첨가하면 K 이온과 Na 이온으로 활성화된 ATPase 의 활성도 보다 더욱 촉진 작용이 나타난다. Na 이온과 K 이온을 첨가하고 cysteine 만을 작용시키면 Na 이온과 K 이온만을 첨가하여 나타나는 ATPase 의 활성도보다 더 촉진작용이 나타나는데 이는 cysteine 의 첨가로 인한 이 효소의 보완작용으로 나타나는 것으로 사료된다. Na 이온과 K 이온을 첨가한 다음 cysteine 으로 ghosts 를 천치치고 pilocarpine 을 작용시키면 cysteine 만을 작용하였을 때 보다 더 촉진작용이 나타난다.

Na 이온과 K 이온을 첨가하여 활성화되는 NaK ATPase 의 활성도는 pilocarpine 의 첨가로 촉진되는데, 이 촉진작용과 cysteine 으로 ghosts 를 천치치한 다음 pilocarpine 을 첨가하고 나타나는 촉진작용과는 아무 차이가 나타나지 않는다. 이것은 NaK ATPase 의 활성도에 대한 pilocarpine 의 촉진작용에 cysteine 이 함유



**Fig. 6. The effect of cysteine in the presence of pilocarpine on the ATPase activity of red cell ghosts. Temp. 44°C; pH 7.6; ATP 1.5 mM; Mg 2 mM; Na 80mM; K 17 mM; cysteine 9 mM; pilocarpine 3 mM. Duration 1 hr. Each column represents an average of four experiments.**

하고 있는 SH 기는 아무 관계가 없다는 것을 암시하고 있는 것이다.

**7. Lysine 의 영향**

NaK ATPase 의 활성도에 대한 pilocarpine 의 촉진 작용에 lysine 의 첨가로 인한 영향을 관찰한 실험을 제 7 도에 도시하였다.

이 실험에서 Na 이온과 K 이온을 동시에 첨가하였을 때 활성화되는 ATPase 에 pilocarpine 을 첨가하면 pilocarpine 의 첨가로 인해서 NaK ATPase 의 활성도

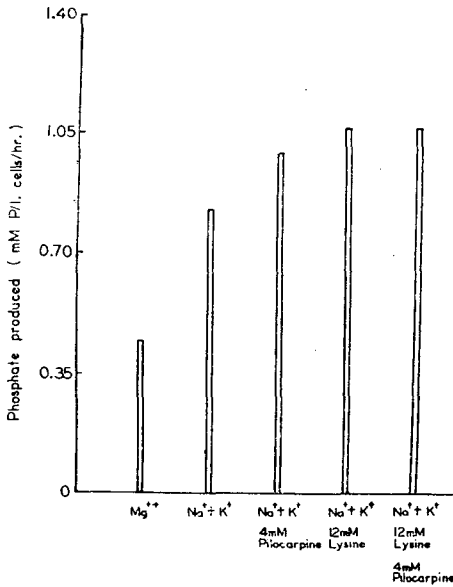


Fig. 7. The effect of lysine in the presence of pilocarpine on the ATPase activity of red cell ghosts. Temp. 44°C; pH 7.6; ATP 1.5 mM; Mg 2 mM; Na 80 mM; K 17 mM; lysine 12 mM; pilocarpine 4 mM. Duration 1 hr. Each column represents an average of six experiments.

는 현저한 촉진작용이 나타난다.

NaK ATPase 에 lysine 만을 첨가하였을 때에 나타나는 이 효소의 활성도는 lysine 을 첨가하지 않았을 때의 NaK ATPase 의 활성도보다 증가되는데 이 현상은 이 효소에 대한 lysine 의 보완작용에 기인하는 것으로 사료된다.

Ghosts 를 lysine 으로 전처리한 다음 pilocarpine 을 작용하여 나타나는 NaK ATPase 의 활성도는 lysine 만을 첨가하였을 때에 비해서 pilocarpine 으로 인한 촉진작용이 나타나지 않는다.

이 실험결과는 NaK ATPase 의 활성도에 대한 pilocarpine 의 촉진작용이 lysine 의 첨가로 나타나지 않는 것으로 이 효소에 대한 pilocarpine 의 촉진작용은 lysine 이 함유하고 있는 NH<sub>2</sub>기와 관계를 갖고 있다는 것을 암시하고 있는 것이다.

8. Aspartic acid 의 영향

NaK ATPase 의 활성도에 대한 pilocarpine 의 촉진작용에 aspartic acid 를 첨가하여 나타나는 영향을 본 실험을 제 8 도에 도시하였다.

이 실험에서 Na 이온과 K 이온을 동시에 첨가하여 활성화되는 NaK ATPase 의 활성도는 pilocarpine 의

작용으로 현저한 촉진작용을 나타낸다.

Na 이온과 K 이온을 첨가하고 aspartic acid 를 작용하면 Na 이온과 K 이온만을 첨가하여 활성화되는 ATPase 의 활성도보다 증가되는데 이것은 이 효소에 대한 aspartic acid 의 보완작용에 기인하는 것으로 사료된다.

Na 이온과 K 이온을 첨가하고 ghosts 를 aspartic acid 로 전처리한 다음 pilocarpine 을 작용시키면 aspartic acid 만을 첨가하였을 때보다 억제작용이 나타난다. 이것은 aspartic acid 의 보완작용을 고려한다면 aspartic acid 의 첨가로 pilocarpine 의 촉진작용이 나타나지 않았다는 것을 뜻하는 것이다.

이 실험결과는 NaK ATPase 에 대한 pilocarpine 의 촉진작용은 aspartic acid 의 전처리로 나타나지 않으며 이 효소에 대한 pilocarpine 의 촉진작용은 aspartic acid 가 함유하고 있는 COOH 기와 관계가 있다는 것을 암시하고 있는 것이다.

9. Threonine 의 영향

Pilocarpine 의 작용으로 나타나는 NaK ATPase 의 활성도에 대한 threonine 의 영향을 관찰한 실험을 제 9 에 도시하였다.

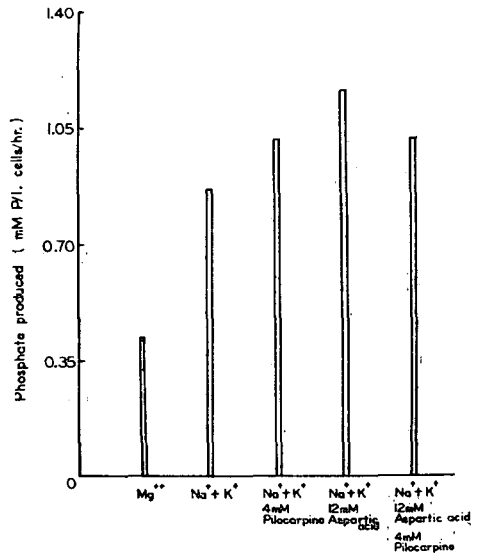


Fig. 8. The effect of aspartic acid in the presence of pilocarpine on the ATPase activity of red cell ghosts. Temp. 44°C; pH; ATP 1.5 mM; Mg 2 mM; Na 80 mM; K 17 mM; aspartic acid 12mM; pilocarpine 4mM. Duration 1hr. Each column represents an average of six experiments.

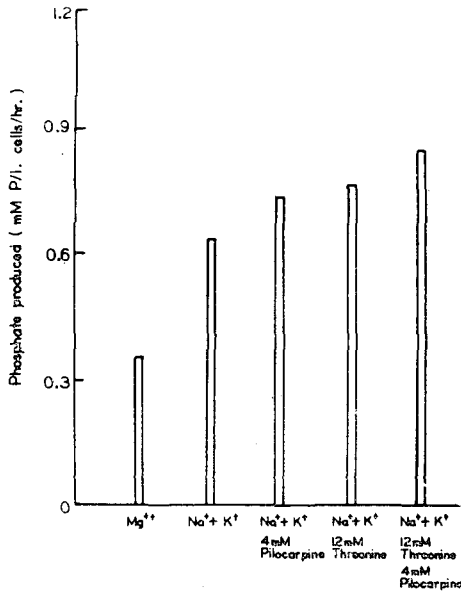


Fig. 9. The effect of threonine in the presence of pilocarpine on the ATPase activity of red cell ghosts. Temp. 44°C; pH 7.6; ATP 1.5 mM; Mg 2 mM; Na 80 mM; K 17 mM; threonine 12mM; pilocarpine 4mM. Duration 1hr. Each column represents an average of five experiments.

이 실험에서 Na 이온과 K 이온을 첨가하고 pilocarpine 을 작용시키면 이 효소의 활성도는 Na 이온과 K 이온만을 첨가하였을 때보다 현저한 촉진작용이 나타난다. NaK ATPase 에 threonine 만을 작용시키면 NaK ATPase 의 활성도 보다 증가되는데 이 촉진작용은 이 효소에 대한 threonine 의 보완작용에 기인되는 것으로 생각된다.

NaK ATPase 에 threonine 만을 작용하였을 때보다 Na 이온과 K 이온을 첨가하고 ghosts 를 threonine 으로 전처리한 다음 pilocarpine 을 작용하면 이 효소의 활성도는 증가된다. NaK ATPase 에 pilocarpine 만을 첨가하여 촉진되는 이 효소의 활성도의 증가율과 threonine 으로 전처리한 다음 pilocarpine 의 작용으로 촉진되는 증가율은 아무 차이를 나타내지 않는다. 이것은 NaK ATPase 의 활성도에 대한 pilocarpine 의 촉진작용은 threonine 의 첨가로 아무 영향을 받지 않는다는 것을 뜻하는 것으로 threonine 이 함유하고 있는 OH 기는 pilocarpine 의 이 효소에 대한 촉진작용과 관계가 없다는 것을 암시하고 있는 것이다.

### 10. Histidine 의 영향

NaK ATPase 의 활성도에 대한 pilocarpine 의 촉진

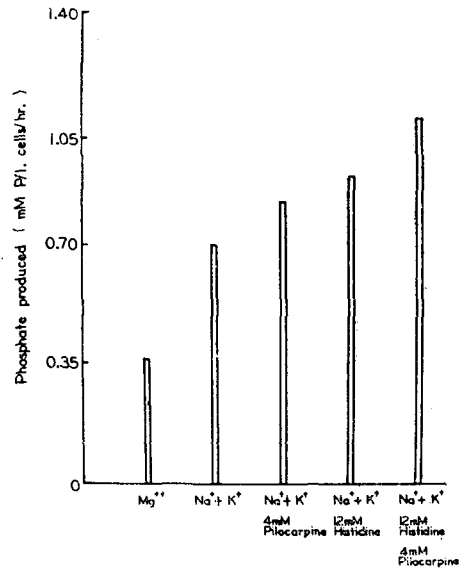


Fig. 10. The effect of histidine in the presence of pilocarpine on the ATPase activity of red cell ghosts. Temp. 44°C; pH 7.6; ATP 1.5 mM; Mg 2 mM; Na 80 mM; K 17 mM; histidine 12 mM; pilocarpine 4 mM. Duration 1hr. Each column represents an average of four experiments.

작용에 미치는 histidine 의 영향을 관찰한 실험을 제 10도에 도시하였다.

이 실험에서 Na 이온과 K 이온으로 활성화되는 ATPase 의 활성도는 pilocarpine 의 작용으로 증가되었다. NaK ATPase 에 histidine 만을 첨가하면 이 효소의 활성도는 histidine 을 첨가하지 않았을 때보다 증가되는데 이 증가현상은 이 효소에 대한 histidine 의 보완작용에 기인하는 것으로 사료된다.

Na 이온과 K 이온을 첨가하고 ghosts 를 histidine 으로 전처리한 다음 pilocarpine 을 작용시키면 이 효소의 활성도는 Na 이온과 K 이온을 첨가하고 histidine 만을 작용하였을 때보다 증가되었다. NaK ATPase 에 pilocarpine 만을 작용하여 pilocarpine 으로 촉진되는 이 효소의 활성도의 증가율은 histidine 으로 ghosts 를 전처리한 다음 pilocarpine 의 첨가로 촉진되는 증가율과 아무 차이를 나타내지 않는다. 이것은 NaK ATPase 의 활성도에 대한 pilocarpine 의 촉진작용이 histidine 의 첨가로 아무 영향을 받지 않는다는 것을 뜻하는 것으로 이 효소의 대한 pilocarpine 의 촉진작용과 histidine 이 함유하는 imidazole 기와는 아무 관계가 없다는 것을 암시하고 있는 것이다.

## 고 찰

세포막 내에는 Na 이온과 K 이온을 동시에 첨가하였을 때에 활성화되는 ATPase 는 사람 적혈구<sup>16,23,24</sup>에서 분리될 뿐만 아니라 여러 다른 조직<sup>25-27</sup>에서도 분리되며 이런 여러 조직의 세포막내에 있는 ATPase 은 양적으로 차이가 있으나 근본적으로 같은 특징을 가지고 있어 세포막에서 이루어지는 이온의 능동적 운반과 밀접한 관계를 가지고 있다는 사실은 여러 연구자들이<sup>10,14-16</sup> 주장하고 있다.

토끼 적혈구막에도 Na 이온과 K 이온으로 활성화되는 ATPase 가 분리되며 이 ATPase 의 활성화도는 pilocarpine 의 작용으로 촉진되었다. Pilocarpine 의 농도를 증가시키는데 따라서 NaK ATPase 의 활성화도는 증가되며 pilocarpine 의 최적농도는 3mM 이다.

세포막에서 Na 이온을 세포막 밖으로 K 이온을 세포막 안으로 능동적으로 운반하는 작용과 밀접한 관계가 있는 이 효소의 활성도를 pilocarpine 이 촉진시키고 있다는 것은 pilocarpine 은 세포막에서 이온의 능동적 운반을 촉진시키는 작용이 있다는 것을 암시하는 것이다. 세포막에서 이온의 능동적 운반이 촉진되면 세포막 밖의 Na 이온의 농도는 증가되고 세포막 안의 K 이온의 농도의 증가를 초래하는 것으로 사료된다.

Whittam<sup>24</sup>, Glynn<sup>28</sup>과 Baker<sup>29</sup> 등은 세포막의 효소계에는 Na 이온과 친화성을 가지고 활성화되는 반응부위와 K 이온과 친화성을 가진 반응부위가 있어 Na 이온의 반응부위는 세포막 내부측에 K 이온은 외부측에 놓여 있다고 주장한 바 있다. 한편 ghosts 세포막은 Na 이온이나 K 이온에 대한 투과성이 높으므로 이들 이온들이 반응액내에 가해지면 친화성을 가진 부위와 작용하게 될 것이다.

반응액내의 Na 이온의 농도를 일정하게 유지하고 K 이온의 농도를 증가시키면서 NaK ATPase 의 활성화도의 변동을 본 실험에서 K 이온의 농도의 증가에 따라서 이 효소의 활성화도는 증가되고 일정농도에 도달하면 활성화도의 증가는 나타나지 않는다. 이 현상은 K 이온의 농도가 낮은 부위에서는 K 이온과 Na 이온의 농도비율은 낮아져 있어 Na 이온이 K 이온의 반응부위와 치환이 일어나서 일부의 K 이온의 반응부위는 Na 이온으로 점유될 것이나 K 이온의 농도가 낮으므로 K 이온의 반응부위는 일부밖엔 활성화되지 못함으로 이 효소의 활성화도는 감소된다.

K 이온의 농도가 높은부위에서는 K 이온과 Na 이온의 농도비율이 높아지게 되어 Na 이온이 K 이온의 반응부위와 치환이 일어날 것이나 극히 적은 양밖에 이

루어지지 못하고 K 이온의 농도증가로 인한 K 이온의 반응부위가 활성화되므로 이 효소의 활성화도는 증가되는 것으로 생각된다.

K 이온의 농도를 증가시키는데 따라서 pilocarpine 의 작용으로 NaK ATPase 의 활성화도의 증가율은 감소되었다. K 이온의 농도가 낮은 부위에서는 K 이온과 Na 이온의 농도비율은 낮아져 있어 Na 이온이 K 이온의 반응부위와 치환이 일어나서 일부의 K 이온의 반응부위는 Na 이온으로 점유될 것이나 K 이온의 농도가 낮으므로 K 이온의 반응부위는 일부밖에 활성화되지 못하고 이 반응부위에 대한 pilocarpine 의 친화성이 높아져서 효소의 활성도를 증가시키고 K 이온의 농도가 높은 부위에서는 K 이온과 Na 이온의 농도비율이 높아져서 Na 이온이 K 이온의 반응부위와 일부 치환이 일어나 점유될 것이나 K 이온의 농도 증가되어 있음으로 K 이온의 반응부위는 포화되므로 이 반응부위에 대한 pilocarpine 의 친화성이 감소되어 이 효소의 활성화도의 증가율은 K 이온의 농도를 증가시키는데 따라서 감소되는 것으로 생각된다.

반응액내의 K 이온의 농도를 일정하게 유지하고 Na 이온의 농도를 증가시키는데 따라서 ATPase 의 활성도를 본 실험에서 Na 이온의 농도를 증가시키는데 따라서 이 효소의 활성화도는 증가되나 일정농도에 도달하면 그 이상 Na 이온의 농도를 증가시켜도 활성화도는 증가되지 않는다. 이 현상은 Na 이온의 농도가 낮은 부위에서는 K 이온과 Na 이온의 농도비율은 높아져서 K 이온이 Na 이온의 반응부위와 치환이 일어날 것이나 Na 이온의 농도가 낮으므로 Na 이온의 반응부위가 일부분밖에 활성화시키지 못하므로 효소의 활성화도는 감소되고 Na 이온의 농도가 높은 부위에서는 K 이온과 Na 이온의 농도비율은 낮아져 있어서 Na 이온이 K 이온의 반응부위와 치환이 일어나겠으나 Na 이온의 농도가 높으므로 Na 이온의 반응부위가 포화되어서 이 반응부위가 활성화되므로 효소의 활성화도는 증가되는 것으로 사료된다.

Na 이온의 농도를 증가시키는데 따라서 pilocarpine 의 작용으로 인한 NaK ATPase 의 활성화도의 증가율은 감소되었다. Na 이온의 농도가 낮은 부위에서는 K 이온과 Na 이온의 농도비율은 높아져 있어 K 이온이 Na 이온의 반응부위와 일부치환이 될 것이나 Na 이온의 농도가 낮으므로 Na 이온의 반응부위는 일부밖에 점유되지 못하게되어 이 반응부위에 대한 pilocarpine 의 친화성이 증가되어 효소의 활성도를 증가시키고 Na 이온의 농도가 높은 부위에서는 K 이온과 Na 이온의



농도비율은 낮아있어 Na 이온이 K이온의 반응부위와 치환이 일어날 것이나 Na 이온의 농도가 높으므로 Na 이온의 반응부위는 포화되어 이 반응부위에 대한 pilocarpine의 친화성이 낮아져서 효소의 활성도를 감소시키므로 Na 이온의 농도증가에 따라서 효소의 활성도의 증가율은 감소되는 것으로 생각된다.

반응액내의 Ca 이온의 농도를 증가시키면서 NaK ATPase의 활성도를 관찰한 실험에서 Ca 이온의 농도가 낮은 부위에서는 이 효소의 활성도가 증가되고 높은 농도에서는 활성도가 감소되며 Ca 이온의 최적농도는 0.1 mM이다. 일정농도의 pilocarpine을 작용시키고 Ca 이온의 농도를 증가시키면 Ca 이온의 농도가 낮은 부위에서는 pilocarpine의 작용으로 나타나는 이 효소의 활성도의 증가율은 감소되고 높은 농도에서는 증가율이 증가된다.

반응액내에 cysteine, threonine 및 histidine을 각각 첨가하여 ghosts를 전처리한 다음 pilocarpine을 작용시켜서 NaK ATPase의 활성도에 대한 작용을 관찰한 실험에서 pilocarpine으로 인한 촉진작용에는 아무 영향을 주지 못하였다. 이는 cysteine의 SH기나, threonine의 OH기 및 histidine의 imidazole기가 이 효소에 대한 pilocarpine의 촉진작용과 아무 관련을 가지고 있지 않다는 것을 뜻하는 것이다.

반응액내에 lysine 및 aspartic acid로 ghosts를 각각 전처리한 다음 pilocarpine을 첨가하여 NaK ATPase의 활성도에 대한 작용을 관찰한 실험에서 lysine 및 aspartic acid의 전처리로 pilocarpine의 이 효소에 대한 촉진작용이 현저하게 억제되었다. 이는 lysine이 함유하고 있는 NH<sub>2</sub>기나 aspartic acid가 함유하는 COOH기가 pilocarpine의 NaK ATPase의 활성도를 촉진시키는 작용과 관계가 있다는 것을 암시하는 것이다. 이것은 NaK ATPase의 활성도를 pilocarpine이 촉진하는 작용은 이 효소내에 있는 NH<sub>2</sub>기 및 COOH기와 결합하여 나타나는 현상이라는 것을 뜻하는 것이다.

Pilocarpine은 세포막 내에 있는 NaK ATPase의 활성도를 촉진시키는 것으로 미루어 보아 이 효소와 밀접한 관계가 있는 Na 이온을 세포막 밖으로 K이온을 세포막 안으로 능동적 운반작용을 촉진시키는 작용이 있다는 것을 암시하고 있으며 이같은 작용은 이 효소내의 NH<sub>2</sub>기 및 COOH기가 관여되는 것으로 사료된다.

## 결 론

적혈구막 내에 있는 Na 이온과 K이온으로 활성화되

는 ATPase의 활성도에 대한 pilocarpine의 작용을 알고저 토끼 적혈구로 ghosts 세포를 만들어 세포막만을 분리하여 막내의 NaK ATPase의 활성도에 대한 pilocarpine의 작용과 작용기전도 아울러 실험하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1) Pilocarpine은 NaK ATPase의 활성도를 촉진시키는 작용이 있으며 pilocarpine의 최적농도는 3 mM이다. 이 효소에 대한 pilocarpine의 작용은 pH의 영향을 받으며 최적 pH는 8.0이다.

2) K이온의 농도증가로 NaK ATPase의 활성도에 대한 pilocarpine의 촉진작용은 증가되나 증가율은 감소되었다.

3) Na 이온의 농도증가로 pilocarpine은 NaK ATPase의 활성도를 증가시키나 증가율은 감소되었다.

4) 낮은 농도의 Ca 이온은 NaK ATPase의 활성도를 증가시키고 높은 농도의 Ca 이온은 감소시킨다. Ca 이온으로 pilocarpine의 이 효소에 대한 활성도의 증가율은 낮은 농도에서는 감소되고 높은 농도에서는 증가된다.

5) NaK ATPase의 활성도에 대한 pilocarpine의 촉진작용은 cysteine의 SH기나 threonine의 OH기 및 histidine의 imidazole기는 아무 영향을 미치지 못하였다.

6) Pilocarpine의 NaK ATPase의 활성도를 촉진하는 작용은 이 효소내의 NH<sub>2</sub>기 및 COOH기와 작용해서 나타나는 현상이다.

## 참 고 문 헌

- 1) Danowski, T.S.: *The transfer of potassium across the human blood cell membrane. J. Biol. Chem.* 139:693, 1941.
- 2) Harris, E.T.: *The influence of the metabolism of human erythrocytes on potassium content. J. Biol. Chem.* 145:579, 1941.
- 3) Maizels, M.: *Cation control in human erythrocytes. J. Physiol.* 108:247, 1949.
- 4) Caldwell, P.C. and Keynes, R.D.: *The utilization of phosphate bond energy for sodium extrusion from giant axons. J. Physiol.* 137: 12, 1957.
- 5) Caldwell, P.C., Hodgkin, A.L. and Shaw, T.J.: *Injection of compound containing energy rich phosphate bond into giant nerve fibers J. Physiol.* 147:18, 1959.

- 6) Caldwell, P.C.: *The phosphorous metabolism of squid axons and its relationships to the active transport of sodium.* *J. Physiol.* 152: 545, 1960.
- 7) Dunham, E.T.: *Linkage of active cations transport to ATP utilization.* *Physiologist.* 1: 23, 1957.
- 8) Hoffman, J.F.: *The link between metabolism and the active transport of Na in human red cell ghosts.* *Federation Proc.* 19:127, 1960.
- 9) Whittam, R.: *Potassium movements and ATP in human red cells.* *J. Physiol.* 140:479, 1958.
- 10) Sen, A.K. and Post, R.L.: *Stoichiometry and localization of adenosine triphosphate-dependent sodium and potassium transport in the erythrocytes.* *J. Biol. Chem.* 239:345, 1964.
- 11) Whittam, R. and Ager, M.E.: *Connexion between active cation transport and metabolism in erythrocytes.* *Biochem. J.* 97:2141, 1995.
- 12) Garrahan, P.L. and Glynn, I.M.: *The stoichiometry of the sodium pump.* *J. Physiol.* 192: 217, 1967.
- 13) Skou, J.C.: *The influence of some cations on adenosine triphosphatase from peripheral nerves.* *Biochim. et biophys. acta.* 23:394, 1957.
- 14) Post, R.L. and Jolly, P.C.: *Linkages of sodium, potassium, and ammonium active transport across human erythrocyte membrane.* *Biochim. et biophys. acta.* 25:118, 1957.
- 15) Tosteson, D.C. and Hoffman, J.F.: *Regulation of cell volume by active cation transport in high and low potassium sheep red cells.* *J. Gen. Physiol.* 44:442, 1962.
- 16) Dunham, E.T. and Glynn, I.M.: *Adenosinetriphosphatase activity and active movements of alkali metal ions.* *J. Physiol.* 156:274, 1961.
- 17) Glynn, I.M.: *Action of cardiac glycosides on ion movements.* *Pharmacol. Rev.* 16:381, 1964.
- 18) Duggan, D.E. and Noll, R.M.: *Effects of ethacrynic acid and cardiac glycosides upon membrane adenosinetriphosphatase of renal cortex.* *Arch. Biochem.* 109:388, 1965.
- 19) Caldwell, P.C. and Keynes, R.D.: *Effect of ouabain on efflux of sodium from squid giant axon.* *J. Physiol.* 148:8, 1959.
- 20) Judoh, J.D. and Ahmed, K.: *Inhibitors of transport and cation activated ATPase.* *J. Cell & Comp. Physiol.* 64:355, 1964.
- 21) Rosenberg, S.A. and Guidotti, G.: *The protein of human erythrocyte membrane. I. Preparation, solubilization, and partial characterization.* *J. Biol. Chem.* 243:1985, 1968.
- 22) Fiske, C.H. and Subbarow, Y.: *The colorimetric determination of phosphorous.* *J. Biol. Chem.* 65:375, 1925.
- 23) Post, R.L., Merritt, C.R., Kinsolving, C.R. and Albright, C.D.: *Membrane adenosine triphosphatase as participant in active transport of sodium and potassium in human erythrocyte.* *J. Biol. Chem.* 235:1976, 1960.
- 24) Whittam, R.: *Asymmetrical stimulation of membrane adenosine triphosphatase in relation to active cation transport.* *Biochem. J.* 84:110, 1962.
- 25) Bonting, S.L. and Caravaggio, L.L.: *Sodium-potassium-activated adenosine triphosphatase in squid giant axon.* *Nature (London)* 194: 1180, 1962.
- 26) Spater, H.W., Novikoff, A.B. and Masek, B.: *Adenosinetriphosphatase activity in cell membrane of kidney tubule cells.* *J. Biophys. & Biochem. Cytol.* 4:765, 1958.
- 27) Essner, E., Novikoff, A.B. and Masek, B.: *Adenosinetriphosphatase and 5-nucleotidase activities in plasma membrane of liver cells revealed by electron microscopy.* *J. Biophys. & Biochem. Cytol.* 4:711, 1958.
- 28) Glynn, I.M.: *Activation of adenosinetriphosphatase activity in a cell membrane by external potassium and internal sodium.* *J. Physiol.* 160:18, 1962.
- 29) Baker, P.F.: *The relationship between phosphorus metabolism and the sodium pump in intact nerve.* *Biochim. et biophys. acta.* 75: 287, 1963.