

심근 Mitochondria의 Na^+ - Ca^{++} 교환에 관한 연구

중앙대학교 의과대학 약리학교실
서울대학교 의과대학 약리학교실*

신 상 구 · 김 명 석* · 임 정 규*

= Abstract =

The Study on Na^+ - Ca^{++} Exchange in Heart Mitochondria

Sang Goo Shin, Myung Suk Kim* and Jung Kyo Lim*

Dept. of Pharmacology, College of Medicine, Chung-Ang University

*Dept. of Pharmacology, College of Medicine, Seoul National University**

The Na^+ - and K^+ -induced Ca^{++} release was measured isotopically by millipore filter technique in pig heart mitochondria. With EGTA-quenching technique, the characteristics of mitochondrial Ca^{++} -pool and the sources of Ca^{++} released from mitochondria by Na^+ or K^+ were analyzed.

The mitochondrial Ca^{++} -pool could be distinctly divided into two components; internal and external ones which were represented either by uptake through inner membrane, or by energy independent passive binding to external surface of mitochondria, respectively. In energized mitochondria, a large portion of Ca^{++} was transported into internal pool with little external binding, while in de-energized state, a large portion of transported Ca^{++} existed in the external pool with limited amount of Ca^{++} in the internal pool which was possibly transported through the Ca^{++} -carrier present in the inner membrane.

Na^+ induced the Ca^{++} release from both internal pool and external pool and external binding pool of mitochondria. In contrast, K^+ did not affect Ca^{++} of the internal pool, but, displaced Ca^{++} bound to external surface of the mitochondria.

When the Ca^{++} -reuptake was blocked by EGTA, the Ca^{++} release from the internal pool by Na^+ was rapid; the rate of Ca^{++} -efflux appeared to be a function of $[\text{Na}^+]^2$ and about 8 mM Na^+ was required to elicit half-maximal velocity of Ca^{++} -efflux. So it was revealed that Ca^{++} -efflux velocity was particularly sensitive to small changes of the Na^+ concentration in physiological range.

Energy independent Ca^{++} -binding sites of mitochondrial external surface showed unique characteristics. The total number of external Ca^{++} -binding sites of pig heart mitochondria was 29 nmoles per mg protein and the dissociation constant(Kd) was 34 μM . The Ca^{++} -binding to the external sites seemed to be competitively inhibited by Na^+ and K^+ ; the inhibition constant(Ki) were 9.7 mM and 7.1 mM respectively. Considering the intracellular ion concentrations and large proportion of Ca^{++} uptake in energized mitochondria, the external Ca^{++} -binding pool of the mitochondria did not seem to play a significant role on the regulation

본 연구는 1981년도 문교부 연구비 보조에 의하여 이루어졌음.

of intracellular free Ca^{++} concentration.

From this experiment, it was suggested that a small change of intracellular free Na^+ concentration might play a role on regulation of free Ca^{++} concentration in cardiac cell by influencing Ca^{++} -efflux from the internal pool of mitochondria.

서 론

Ca^{++} 은 세포내 messenger 로써 생체 세포의 기능 조절에 관여하고 있음이 인정되고 있다. 심근은 excitation-contraction coupling (E-C coupling) 과정에서 근 세포막 탈분극에 의해서 발생된 활동전압이 T-tubule 계를 통하여 내부로 전파됨에 따라 심근세포내 유리 Ca^{++} 이 증가되고 세포내 증가된 유리 Ca^{++} 은 troponin 과 결합하여 actomyosin 에 대한 troponin-tropomyosin 의 방해작용을 제거하므로써 근육축이 일어난다고 추정되고 있다 (Fozzard, 1977). 이와같이 근세포의 E-C coupling 에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 세포내 Ca^{++} 이온의 조절 기구로써는 plasma membrane, sarcoplasmic reticulum 과 mitochondria 가 인정되고 있으며 (Bygrave, 1978), 골격근에서는 sarcoplasmic reticulum 이 주역할을 할 것으로 추정되고 있다 (Ebashi, 1976; Fuchs, 1974). 그러나 심근 세포는 sarcoplasmic reticulum 의 양이 적을뿐 아니라 체계적으로 배열되어 있지 않고 (Page et al., 1973) sarcoplasmic reticulum 의 Ca^{++} 운반능력이 골격근에 비해 미약한 반면 (Ebashi et al., 1968), mitochondria 는 심근세포에 풍부히 존재하며 (Laguens, 1971), mitochondria 의 Ca^{++} 과의 친화성 및 결합속도로 볼때 심근의 수축이완을 조절하고도 남을 충분한 Ca^{++} 운반능력을 지닌다 보고하고 있다 (Carafoli, 1974; Carafoli et al., 1978; Lehninger, 1970).

생리적 조건하에서의 심근 mitochondria 의 Ca^{++} -uptake 기전은 잘 알려져 있으며 (Crompton & Heid, 1978; Lötscher et al., 1980), mitochondria 에서의 Ca^{++} 유리는 1974년 Carafoli 등이 심근 mitochondria 에서 Na^+ 에 의한 Ca^{++} 유리를 보고한 이래, Na^+ 에 의한 Ca^{++} 의 유리는 mitochondria 내막에 존재하는 carrier 를 통한 Na^+ - Ca^{++} 교환에 의하여 이루어짐이 알려졌고 (Crompton et al., 1976; 1977), 세포막의 전기적 흥분 현상과 연관되어 나타나는 세포내 이온 농도의 변화가 또한 mitochondria 의 Ca^{++} 조절작용에 영향을 미치는 생리적 인자의 하나로 보여 이에 관한 많은 연구가 진행되고 있다. 한편 mitochondria 의 Ca^{++}

은 에너지 존재하에서 내막을 통하여 흡수 (uptake)된 내부 Ca^{++} -pool 과 에너지 비존성으로 외면에 결합 (binding)되어 있는 외부 Ca^{++} -pool 의 상태로 존재하고 있으며, 내부 pool 뿐만 아니라 외부 pool 도 Ca^{++} 수용능력으로 볼때 세포내 유리 Ca^{++} 농도 조절에 또한 중요한 역할을 할 수 있으리라 추정되고 있다 (Reynafarje et al., 1969; Carafoli, 1974; Reed et al., 1974b; 1975; Noack et al., 1977).

본 연구에서는 mitochondria 의 각 Ca^{++} -pool 의 성상을 분석하고 세포막 전기적 흥분현상과 관련한 Na^+ 및 K^+ 이 mitochondria 각 Ca^{++} -pool 에 미치는 효과와 이들 이온에 의한 Ca^{++} 유리의 동력학적 분석을 시행하므로써 세포내 유리 Ca^{++} 농도 조절에 있어서의 mitochondrial Ca^{++} -pool 및 Na^+ , K^+ 의 생리적 의의를 고찰코자 하였다.

실험재료 및 방법

1) 실험재료

EGTA, murexide, rotenone, oligomycin, antimycin, 2,4-dinitrophenol 및 ruthenium red 는 Sigma 제 시약을 사용하였으며, 방사성 동위원소 $^{45}\text{Ca}^{++}$ 는 Amersham UK 제의 22 mCi/mg 의 activity 를 지니는 것을 사용하였다.

2) 실험방법

(1) 심근 mitochondria 의 추출 : 실험동물로는 돼지를 사용하였으며 Sulakhe & Dhalla (1971)의 방법에 준하여 심실근에서 추출 하였다. 적출 심실근을 냉 homogenizing 용액 (250 mM sucrose, 10 mM tris-HCl, pH 7.4, 0.1 mM EDTA)에 넣고 잘게 썰은 다음 10배 용량의 homogenizing 용액에서 Polytron 조 직분쇄기 (Brinkman, Model PT-20)로 rheostat 5에서 7초동안 homogenation 한 후, 1,000 g에서 20분간 냉 동원심분리하여 심근섬유, 조직편, 핵, 결체조직등을 제거하고 상등액을 분리하여 4결의 가제로 여과하였다. 여액을 10,000 g에서 20분동안 냉동 원심 분리하여 얻은 잔사를 4배 용량의 homogenizing 용액에 부유시켜 10,000 g에서 15분동안 다시 냉동 원심 분리하

여 세척하였으며, 이후 이러한 세척을 2회 반복하였고 최종 세척시에는 EDTA를 제거한 homogenizing 용액을 사용하였다. 최종 얻어진 mitochondria는 250 mM sucrose, 10 mM tris-HCl, pH 7.4 용액에 단백질농도가 15~20 mg/ml 되게 부유시켜 실험에 공여하였다.

모든 mitochondria 추출조작은 0~4°C에서 시행하였으며 단백질농도는 folin-phenol 시약을 사용한 Lowry 등(1951)의 방법으로 측정하였다.

(2) Mitochondria의 Ca^{++} -transport 및 유리의 측정: Mitochondria의 Ca^{++} -transport 및 유리는 방사성 동위원소 $^{45}\text{Ca}^{++}$ 를 사용하여 Lee and Choi(1966)의 millipore filter 방법으로 측정하였다.

모든 실험은 25°C의 항온진탕 수욕조에서 기본반응액(250 mM sucrose, 10 mM tris-HCl, pH 7.4)에 mitochondria의 농도가 1~2 mg/ml 농도가 되도록 첨가하여 시행하였으며, 반응액내의 Ca^{++} 농도는 실험 결과에서 지시하는 바에 따라 적의 첨가하고 $^{45}\text{Ca}^{++}$ 는 0.4 $\mu\text{Ci/ml}$ 되게 하였다. 반응액내에 기존하고 있는 Ca^{++} 은 murexide 지시약을 사용한 Walser(1960)의 방법에 의하여 dual wavelength spectrophotometer(Aminco-Chance)에서 isosbestic point 507 nm를 대조로 하여 540 nm에서 측정하였으며 기존 Ca^{++} 농도는 평균 5 μM 정도였다. 에너지원이 필요한 조건에서의 Ca^{++} -transport 반응은 mitochondria 호흡 기질로써 5 mM의 tris-succinate, pH 7.4를 첨가하여 시작하였다. 에너지원을 차단한 상태에서의 실험에서는 반응액에 succinate를 첨가하지 않고 mitochondria 호흡 억제제인 rotenone(1 μM)과 antimycin(0.25 $\mu\text{g/mg}$. protein) 존재하에서 시행하였다. $^{45}\text{Ca}^{++}$ 방사성동위원소를 이용한 Ca^{++} -transport 실험시에는 mitochondria에 이미 내재하여 있는 Ca^{++} 에 의한 동위원소의 회색문제(Reed et al., 1974 b)를 감안해야 하므로 실험에 따라서는 mitochondria를 호흡억제제 존재하에서 25°C, 5~7분 전처치하여 내재하는 Ca^{++} 을 유리시킨 후 냉각된 기본반응액으로 다시 세척, 냉동원심분리하여 실험에 사용하였다.

실험 결과에서 지시하는 조건에 따라 mitochondria를 반응시킨 다음 그 반응액 0.25 ml을 취하여 millipore filter(HAWP 13 mm, pore size 0.45 micron)로 즉시 여과하였으며, 여액 0.1 ml를 10 ml의 liquid scintillation cocktail(Aquasol®; New England Nuclear)에 첨가하고 liquid scintillation spectrometer(Packard, Tri-Carb, Model 3375)로 방사능을 측정하여 mitochondrial Ca^{++} 및 유리 Ca^{++} 양을 계산하였다.

(3) Mitochondria Ca^{++} -pool의 분석 및 이에 대한 Na^+ 및 K^+ 의 효과: Mitochondria의 Ca^{++} -pool은 내막을 통한 Ca^{++} -uptake에 의하여 이루어지는 내부 pool과 외막 및 내막의 외면에 결합된 외부 pool로 구분될 수 있다. 본 실험에서는 양 pool을 각각 구분하고 그 성질을 분석하기 위하여 mitochondria 외막은 자유로히 투과하나 내막은 통과할 수 없는 Ca^{++} -chelator인 EGTA(Reed et al., 1974 b)를 이용하였다. 즉 Reed 등(1974 b, 1975)의 방법에 준하여 반응액에서 동시에 취한 동일양(0.25 ml)의 두 채취액중 한 채취액에는 2 mM EGTA-tris, pH 7.4를 첨가하여 20초 동안 처치 후 millipore filter를 통하여 여과하고, 다른 채취액은 EGTA를 가하지 않고 즉시 여과하여 각기의 방사능을 측정하여 각 pool의 크기를 계산하였다. 또한 실험에 따라서는 상기한 바와 같이 Ca^{++} -pool을 분리하고 각 Ca^{++} -pool에서의 Ca^{++} 유리 및 이에 대한 Na^+ , K^+ 들의 효과를 관찰 분석하였다.

실험 결과

1) Na^+ 및 K^+ 에 의한 Mitochondrial Ca^{++} 의 유리

정상심근의 세포내 Ca^{++} 이온 농도에 가까운 낮은 농도의 Ca^{++} (13.3 nmol/mg. protein)과 5 mM trissuccinate 존재하에서 보이는 mitochondria의 에너지 의존성 Ca^{++} -transport는 대단히 활발하여 3분후 반응액내 Ca^{++} 의 95~99%가 흡수되어 상당시간 지속되었으며, 이때 Na^+ 또는 K^+ 의 첨가는 전반적으로 첨가 직후 소량의 Ca^{++} 유리를 보이나, 곧 일정수준을 유지하였다. 즉 Na^+ 첨가시 20 mM에서 transport된 Ca^{++} 의 8%, 50 mM에서 15%가 유리됐고, K^+ 첨가시는 20 mM에서 3%, 50 mM에서 4%의 Ca^{++} 유리만이 있었다(Fig. 1a, b). 한편 대조 실험으로 흡수 반응 5분후, 첨가한 Na^+ 및 K^+ 에 해당하는 삼투압을 나타내는 sucrose를 첨가한 경우에는 mitochondrial Ca^{++} 양의 변화는 관찰할 수 없었다.

Rotenone(1 μM)과 antimycin(0.25 $\mu\text{g/mg}$. protein)으로 25°C에서 5분 전처치하여 내재하는 Ca^{++} 을 제거 세척한 mitochondria를 에너지원이 존재치 않는 조건에서 반응시켰을 경우 Ca^{++} -transport는 에너지 의존성인 Ca^{++} 흡수의 46~61%정도였으며 30초 후 거의 일정수준에 달하였고 5분후 부터는 시간 경과에 따라 10%미만의 Ca^{++} 유리가 일어나는 양상을 보였다. 이때 Na^+ 또는 K^+ 첨가는 mitochondrial Ca^{++} 의 현저한

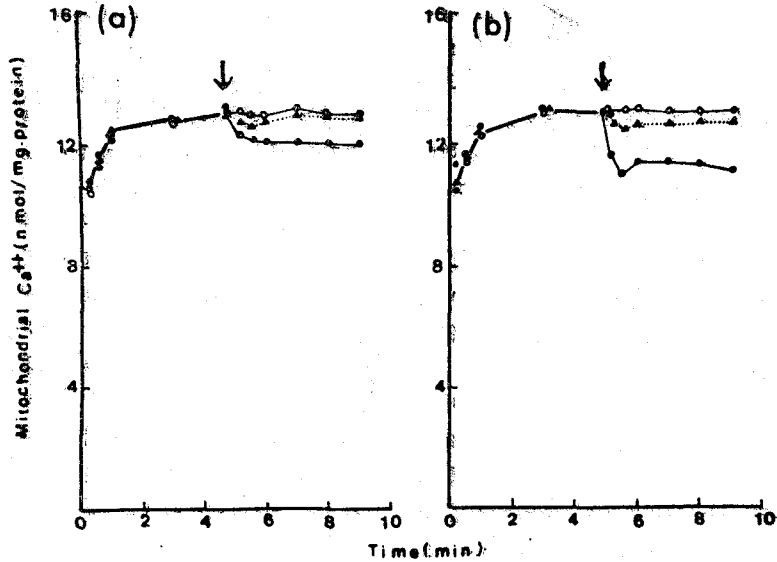


Fig. 1. Effect of Na⁺ or K⁺ on the release of Ca⁺⁺ from mitochondria. Mitochondria (1.5 mg. protein/ml of reaction medium) were incubated at 25°C in a 4 ml medium containing 250 mM sucrose, 10 mM tris-HCl, pH 7.4, 5 mM tris-succinate and 13.3 nmol CaCl₂/mg. protein. 0.25 ml of aliquote was taken and used for determination of miocthondrial Ca⁺⁺-transport and release as described in the method. After 5 min incubation(↓), Ca⁺⁺ release was induced by additions of either 40 mM sucrose(○), 20 mM KCl(▲), and 20 mM NaCl(●) in (a) or 100 mM sucrose(○), 50 mM KCl(▲), and 50 mM NaCl(●) in (b).

유리를 초래하여 Na⁺ 1~20 mM에 의해서 9~53%가 유리되었고(Fig. 2 a) K⁺의 경우에도 1~20 mM 첨가시 14~59%의 Ca⁺⁺유리를 나타내었다(Fig. 2 b).

한편 Fig. 1에서와 같이 에너지 존재하에서 보이는 Na⁺ 및 K⁺에 의한 Ca⁺⁺유리가 현저하지 못한 것은 일단 유리되었던 Ca⁺⁺이 다시 mitochondria 내막을 통하여 에너지 의존적으로 재흡수 되는 결과 때문이라 여겨졌으므로, Na⁺ 또는 K⁺에 의한 mitochondrial Ca⁺⁺의 절대 유리량을 관찰하기 위하여 Na⁺ 및 K⁺첨가 30초전에 ruthenium red(2 nmol/mg. protein)을 첨가하여 mitochondria 내막에 존재하는 에너지 의존성 Ca⁺⁺-uptake를 차단한 조건에서 실험하였던 바, Na⁺ 1~50 mM 첨가시 4분후 용량의 의존적으로 흡수되었던 Ca⁺⁺의 8~57%가 유리되었으며(Fig. 3a), K⁺에 의해서는 13%이내의 유리만을 보였고 농도 증가에 따른 용량 의존적인 양상도 보이지 않았다(Fig. 3 b). 그러나 Na⁺농도에 따른 Ca⁺⁺의 유리는 Carafoli 등(1974)과 Crompton 등(1976; 1977)의 백서 mitochondria에서의 보고보다 낮은 Ca⁺⁺유리율을 보였는데, 이는 본 실험에 사용한 ruthenium red의 낮은 순도에 기인할

것으로 추정되나, 상기 농도보다 3배의 고농도로 처치 시에도 적은 Ca⁺⁺유리율을 보여 실험동물의 종에 따른 Ca⁺⁺-carrier의 감수성 차이때문일 수 있는 가능성도 배제할 수는 없었다.

Fig. 1에서와 동일한 조건에서 Ca⁺⁺흡수 반응을 개시한후 시간 경과에 따라 각 시각에 0.25 ml씩의 두 채취액을 얻어 한 채취액은 즉시 millipore filter로 여과하고, 다른 채취액은 2 mM EGTA-tris, pH 7.4로 20초 처치후 여과하여 방사능을 측정하므로써 mitochondria의 Ca⁺⁺-pool을 나누었다. 즉 EGTA처치에 의하여 chelation 되지 않은 비가역성인 Ca⁺⁺으로부터 mitochondria 내막을 통하여 내부 pool에 흡수된 Ca⁺⁺양을 계산하였고, 총 mitochondrial Ca⁺⁺과 내부 Ca⁺⁺-pool의 차이로 외부 Ca⁺⁺-pool의 양을 측정할 바, 반응 15초에 총 mitochondrial Ca⁺⁺의 54%정도가 외부 pool에 결합된 상태로 존재하였으나 시간 경과에 따라 점차 감소하여 3분 이후에는 12~16%정도만이 외부 pool에 결합되어 있었고 대부분의 Ca⁺⁺은 내부 pool로 흡수되는 결과를 보였다(Fig. 4). 따라서 실제로 흡수된, 즉 mitochondria 내부 Ca⁺⁺-pool에서의 Na⁺

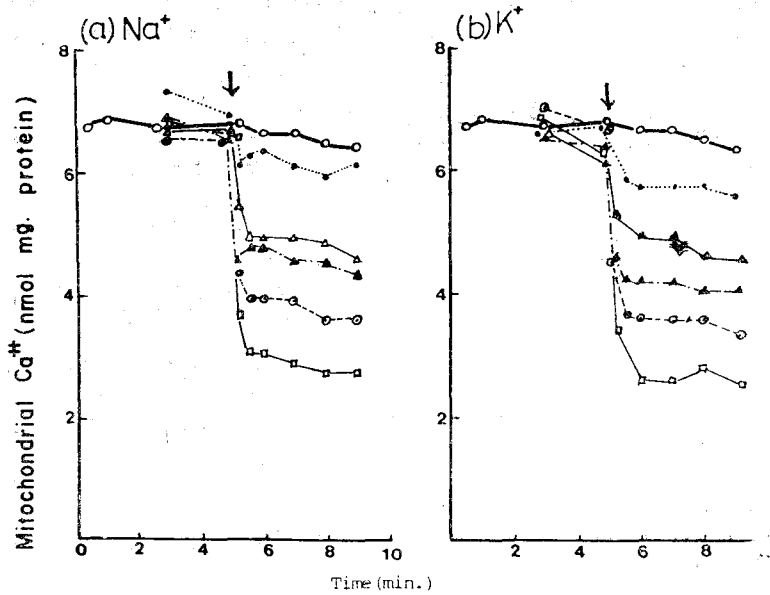


Fig. 2. Effect of Na^+ or K^+ on the release of Ca^{++} from the de-energized mitochondria. Mitochondria were pretreated for 5 min with both rotenone ($1 \mu\text{M}$) and antimycin ($0.25 \mu\text{g}/\text{mg. protein}$) to deplete endogenous Ca^{++} and washed by centrifugation before incubation. The mitochondria ($1.5 \text{ mg}/\text{mg}$ of medium) were incubated in a 4 ml medium containing 250 mM sucrose, 10 mM tris-HCl, pH 7.4, $13.3 \text{ nmol } \text{CaCl}_2/\text{mg. protein}$, $1 \mu\text{M}$ rotenone and antimycin $0.25 \mu\text{g}/\text{mg. protein}$. Mitochondrial Ca^{++} -transport and release were determined as described in Fig. 1. After 5 min incubation (\downarrow), Ca^{++} release was induced by additions of 1(\circ), 3(Δ), 5(\blacktriangle), 10(\odot), and 20 mM(\square) of NaCl in (a) or KCl in (b), and 40 mM sucrose(\circ).

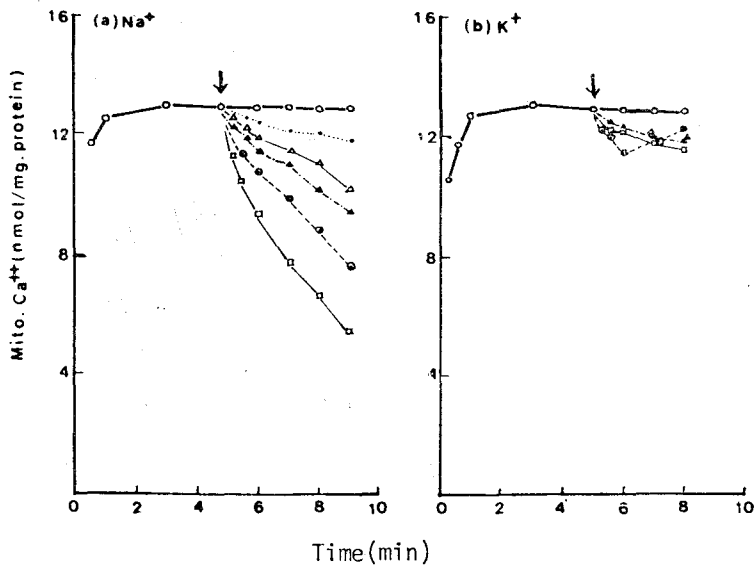


Fig. 3. Release of mitochondrial Ca^{++} by Na^+ or K^+ in the presence of ruthenium red. Experimental conditions were exactly same as in Fig. 1, except that ruthenium red ($2 \text{ nmol}/\text{mg. protein}$) was added 30 sec before induction of Ca^{++} release from the mitochondria by additions of 1(\circ), 5(Δ), 10(\blacktriangle), 20(\odot), and 50 mM(\square) of either NaCl in (a) or KCl in (b), and 40 mM sucrose(\circ).

또는 K⁺에 의한 Ca⁺⁺유리를 관찰하기 위하여 반응 개시 5분 후 1 mM EGTA-tris, pH 7.4 처리로 외부 pool Ca⁺⁺의 chelation과 동시에 Ca⁺⁺-reuptake를 차단한 상태에서 각 이온을 첨가하였다.

Fig. 5에서와 같이 Na⁺에 의한 mitochondria 내부 pool에서 부터의 Ca⁺⁺의 유리는 현저하여 4분 경과후

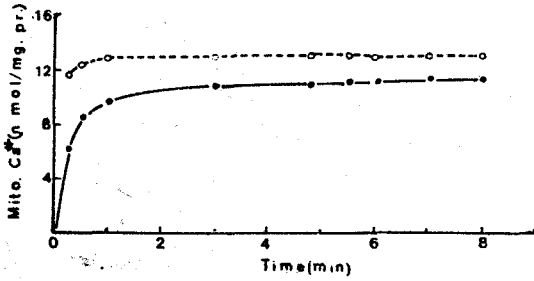


Fig. 4. Time courses of mitochondrial Ca⁺⁺-binding and uptake. Medium conditions were the same as in Fig. 1. Two aliquotes (0.25 ml each) were taken simultaneously. One (○) was filtered instantly and the other (●) filtered 20 sec after rapid mixing with 2 mM EGTA-tris and assayed for radioactivity.

1~10 mM 첨가에 따라 18~90%의 Ca⁺⁺유리를 보였고 (Fig. 5 a) 20 mM 투여시는 3분에 거의 완전히 유리되는 결과를 보였다. 이에 반해, K⁺은 50 mM의 고농도에서도 내부 pool에서의 Ca⁺⁺유리는 보이지 않았다 (Fig. 5 b).

2) Mitochondria 내부 pool에서의 Na⁺에 의한 Ca⁺⁺유리 kinetics

Mitochondria 내부 Ca⁺⁺-pool에서의 Na⁺에 의한 Ca⁺⁺유리를 동력학적으로 분석하기 위하여 rotenone 1 μg/mg protein으로 25°C에서 7분 전처리하여 내재하여 있는 Ca⁺⁺을 격감시킨 mitochondria를 25 nmol/mg. protein의 Ca⁺⁺존재하에서 succinate를 에너지원으로 7분 반응시킨 후 1 mM EGTA-tris를 첨가하고 Na⁺에 의한 Ca⁺⁺유리속도를 측정하였다. 이러한 조건에서 Na⁺첨가에 따른 최초 1분간의 Ca⁺⁺유리는 직선적인 양상을 보였으므로, Na⁺첨가후 1분간 유리되는 Ca⁺⁺양을 측정하여 초기 Ca⁺⁺유리속도로 계산하였다. Na⁺에 의한 Ca⁺⁺유리속도는 최대 분당 11.44±0.59 nmol/mg. protein이었고 sigmoid 양상의 Na⁺농도의존도를 보였다. 이러한 결과는 Na⁺-Ca⁺⁺교환 carrier의 Na⁺결합부는 multimer로 존재하며 Na⁺결합시 결

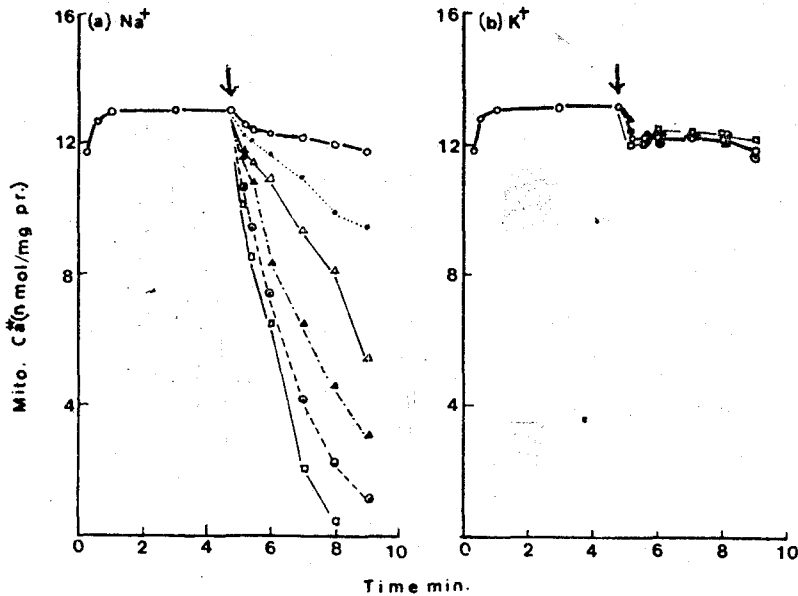


Fig. 5. Release of mitochondrial Ca⁺⁺ by Na⁺ or K⁺ in the presence of EGTA. Experimental conditions were the same as in Fig. 1, but at 5 min (↓), Ca⁺⁺ release was made by adding 1 (●), 3 (△), 5 (▲), 10 (⊙) and 20 mM (□) of either NaCl in (a) or KCl in (b) with 1 mM EGTA-tris; 1 mM EGTA-tris only (○).

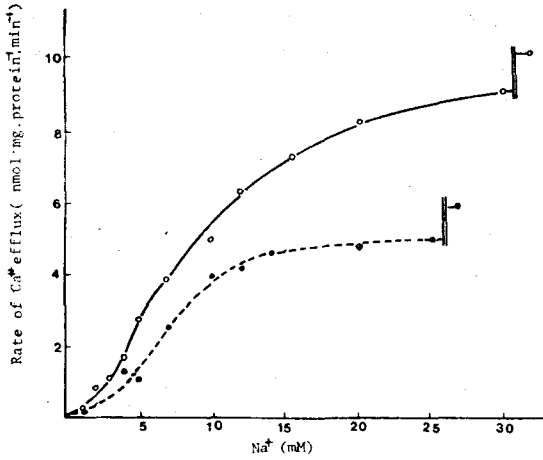


Fig. 6. Na⁺ induced Ca⁺⁺-efflux from heart mitochondria. Mitochondria were pretreated with rotenone(1 μg/mg. protein) for 7 min to deplete endogenous Ca⁺⁺ and, after washing, the mitochondria were incubated in the same conditions as in Fig. 1 except that the amount of mitochondria was 1 mg/ml and concentration of Ca⁺⁺, 25 nmol/mg. protein. After 7 min incubation, EGTA (final concentration 1 mM) was added to chelate externally bound Ca⁺⁺, and, 1 min later, Ca⁺⁺ efflux was observed by adding varying concentrations of Na⁺ without (○) or with (●) contact of rotenone(1 μM) and antimycin(0.5 μg/mg. protein) for 2 min before Na⁺ addition. Ca⁺⁺ efflux rate was taken as the amount of Ca⁺⁺ released for the first one min after addition of Na⁺.

Table I. The kinetic constants obtained from Hill plots as in Fig. 7

	(a) Energized (6)*	(b) De-energized (5)**
V _{max} (nmol/mg. protein/min)	11.44±0.59	6.81±1.58**
Hill coefficient	1.83±0.09	1.70±0.17
[Na ⁺] _{0.5} (mM)	8.58±0.48	7.66±0.48

Numbers represent Mean±S.E.

*; No. of experiments

**; Statically different from energized mitochondria, 0.01 < p < 0.02

함부간에 협동성이 존재하기 때문인 것으로 여겨졌으므로, 이를 Hill equation에 적용시켰다. 이때 Hill plot의 기울기는 1.83±0.09이었고 최대 Ca⁺⁺유리속도

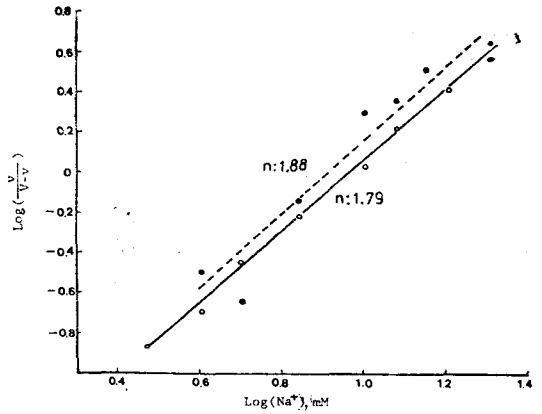


Fig. 7. A Hill plot of the data obtained from Fig. 6, where v is the velocity of Ca⁺⁺ efflux (nmol/mg. protein/min) and V is the maximum velocity of efflux at saturating Na⁺ concentrations. Energized(○) and de-energized(●) mitochondria.

의 50%를 나타내는 Na⁺의 농도([Na⁺]_{0.5})는 8.58±0.48 mM이었다(Fig. 6,7, Table 1). 한편 succinate를 기질로 하여 Ca⁺⁺-uptake를 유도한 후 rotenone(1 μM)과 antimycin(0.5 μg/mg. protein)을 첨가하여 에너지원을 차단한 상태에서 위에서와 같이 Ca⁺⁺유리를 관찰하였을 경우 호흡차단제의 첨가는 내부 pool로 흡수된 Ca⁺⁺을 서서히 유리시켰으며, 이때 Na⁺에 의한 최대 Ca⁺⁺유리 속도는 분당 6.81±1.58 nmol/mg. protein로 감소되었다. 이때의 Hill plot의 기울기는 1.70±0.17이었고, [Na⁺]_{0.5}는 7.66±0.48 mM이었다(Fig. 6,7, Table 1).

3) De-energized Mitochondria의 Ca⁺⁺-transport에 대한 Na⁺ 및 K⁺의 효과

Fig. 2에서와 같이 호흡차단제인 rotenone과 antimycin으로 전처리한 mitochondria를 차단제와 Ca⁺⁺ 3 nmol/mg. protein 존재하에서 반응시킨후 EGTA를 처리하여 에너지비의존성인 Ca⁺⁺-transport를 각 pool에 따라 분석한 결과 2 mM EGTA-tris 처리에 가역성인 외부 Ca⁺⁺-pool이 비가역성 pool보다 현저히 컸으며, EGTA 비가역성인 Ca⁺⁺-pool은 시간에 따라 증가하는 양상을 보이나 상당 시간경과후에는 다시 서서히 약간 감소하는 경향을 보였다(Fig. 8 a).

이 두 Ca⁺⁺-pool에 대한 성상을 분석하기 위하여

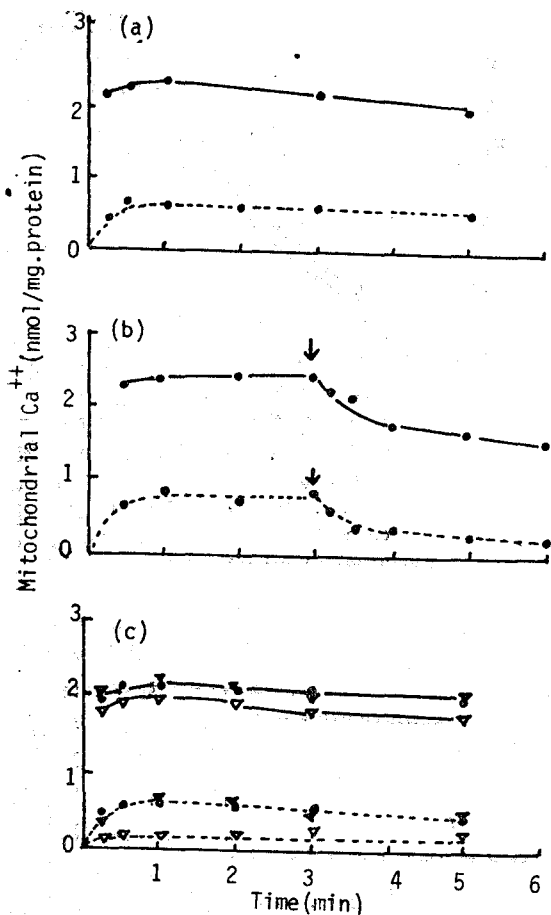


Fig. 8. EGTA-reversible and-irreversible components of mitochondrial Ca^{++} -pool in the de-energized state. The pretreatment with rotenone and antimycin and incubation of mitochondria were done in the same conditions to those as in Fig. 2, except that the concentration of Ca^{++} was 3 nmol/mg. protein. Two aliquotes(0.25 ml each) were taken simultaneously, and filtered without (—) or with(⋯) 2 mM EGTA-tris and assayed for radioactivity.
 (a): without any addition.
 (b): The same condition as in (a) but addition of 2,4-dinitrophenol(50 μM) at the time indicated by arrow.
 (c): Incubated without any addition(●) and with 50 μM 2,4-dinitrophenol(Δ) or 2.5 μg /mg. protein oligomycin(\blacktriangle).

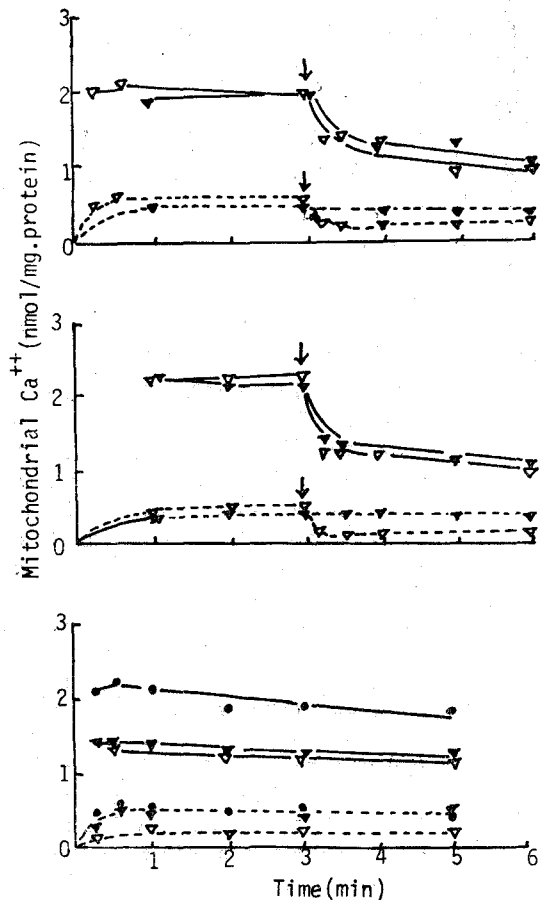


Fig. 9. Effect of Na^+ or K^+ on EGTA-reversible and-irreversible Ca^{++} -pool of de-energized mitochondria. The experimental conditions were the same as in Fig 8. Two aliquotes were taken simultaneously, filtered without(—) and with(⋯) 2 mM EGTA-tris.
 (a): Addition of 10mM of either NaCl (Δ) or KCl (\blacktriangle) at 3 min of incubation(\downarrow)
 (b): Addition of 20 mM of either NaCl (Δ) or KCl (\blacktriangle) at 3 min of incubation(\downarrow).
 (c): Incubated without(●) or with 10 mM NaCl (Δ) or KCl (\blacktriangle).

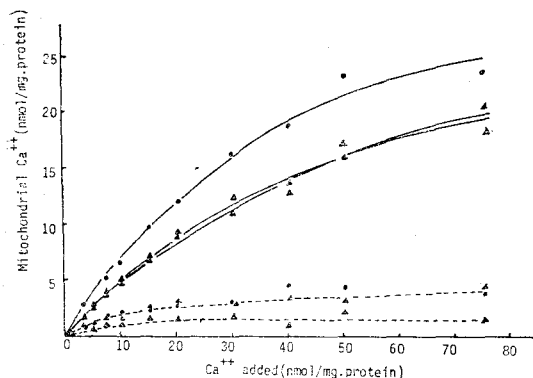


Fig. 10. Effect of Na⁺ or K⁺ on energy independent Ca⁺⁺-binding of de-energized mitochondria. Experimental conditions were the same as in Fig. 2, but pretreated mitochondria were incubated for 3 min with varying concentrations of Ca⁺⁺ in the absence (●) or presence of 9 mM of NaCl (△) or KCl (▲). Two aliquotes (0.25 ml each) were taken simultaneously, filtered directly (—) or with rapid mixing with 2 mM EGTA-tris for 20 sec (---) and assayed for radioactivity.

oxidative-phosphorylation 차단제인 2,4-dinitrophenol 50 μm을 처리한 경우 EGTA 비가역성 Ca⁺⁺-pool은 급격한 감소를 보였으나 외부 Ca⁺⁺-pool은 별 영향을 받지 않았으며 (Fig. 8 b), 전처치시부터 호흡 차단제와 더불어 dinitrophenol을 같이 첨가하여 반응을 시켰을 때도 역시 EGTA 비가역성 pool의 감소만 확인할 수 있었다 (Fig. 8 c). 한편 호흡 차단제 첨가시에 보이는 EGTA 비가역성 pool의 존재는 mitochondria에 내재하여 있는 ATP에 의한 Ca⁺⁺-uptake일 수 있는 가능성도 배제할 수 없기 때문에 mitochondrial ATPase 억제제인 oligomycin (2.5 μg/mg. protein)을 처리하였으나 별차이를 볼 수 없었다 (Fig. 8 c).

De-energized mitochondria에서의 Na⁺ 및 K⁺에 의한 Ca⁺⁺유리를 각 Ca⁺⁺-pool에 따라 분석하였던 바 10~20 mM Na⁺은 EGTA 비가역성 pool의 신속한 감소와 더불어 외부 Ca⁺⁺-pool 또한 현저히 감소시켰으나 (Fig. 9 a, b), 이에 반해, K⁺에 의해서는 EGTA 비가역성 pool의 변화는 인지할 수 없었으며 외부 Ca⁺⁺-pool만의 현저한 감소를 보였다 (Fig. 9 a, b). Na⁺ 또는 K⁺ 10 mM을 처음부터 첨가한 반응 조건에서도 각 pool의 크기에 미치는 효과는 같은 결과였다 (Fig. 9 c).

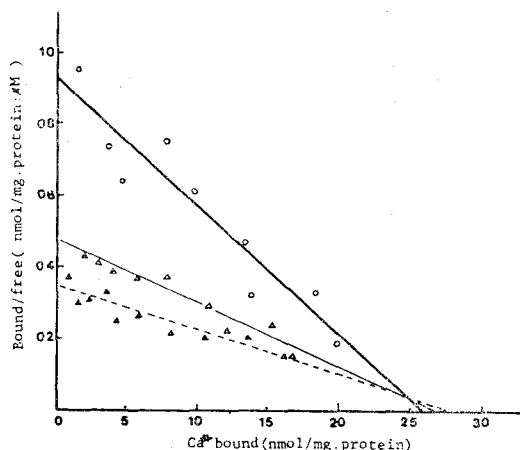


Fig. 11. Scatchard plot of EGTA-reversible external Ca⁺⁺-binding of de-energized mitochondria. The data were obtained from the experiments shown in Fig. 10, in the absence (○) and presence of 9 mM NaCl (△) or KCl (▲). The concentration of free Ca⁺⁺ was calculated from the radioactivity of the EGTA-untreated filtrates, whereas the bound Ca⁺⁺ was calculated from the differences between the EGTA-treated and-untreated filtrates.

4) Mitochondria 외부 Ca⁺⁺-pool의 성상 및 Na⁺, K⁺의 효과

호흡 차단제의 처리로 에너지 공급을 차단한 mitochondria를 3~75 nmol/mg. prot.의 Ca⁺⁺이 존재하는 조건에서 3분간 반응시킨 후 각 Ca⁺⁺-pool을 나누고 이에 대한 Na⁺ 및 K⁺의 영향을 관찰하였다. Fig. 10에서와 같이 총 mitochondria Ca⁺⁺ 및 EGTA 비가역성 pool은 Ca⁺⁺농도의 증가에 따라 점차 증가하는 포화곡선을 보였으며, 이때 Na⁺ (9 mM)의 첨가는 총 mitochondria Ca⁺⁺ 및 EGTA 비가역성 pool의 감소를 유도하였고, K⁺ (9 mM)은 총 mitochondria Ca⁺⁺의 감소만을 나타내었다.

한편 Ca⁺⁺농도에 따른 EGTA 가역성 Ca⁺⁺-pool의 변화를 Scatchard plot로 분석하였을 경우 Fig. 11에서와 같이 직선을 나타내었다. 이러한 결과는 mitochondria의 에너지 비의존성인 외부 Ca⁺⁺-pool은 단일 특성을 갖는 Ca⁺⁺결합부로 이루어져 있을 것임을 시사하는 것으로 여겨졌으며 총 결합부의 수는 28.74 ± 2.87

Table II. The kinetic parameters of external Ca⁺⁺-binding in de-energized mitochondria obtained from Scatchard plots as in Fig. 11

No. Ca ⁺⁺ binding site (nmol/mg.prot.)	Dissociation constant for Ca ⁺⁺ (μ M)	Inhibition constant	
		Na ⁺ (mM)	K ⁺ (mM)
28.74 \pm 2.87	33.59 \pm 2.75	9.65 \pm 1.29	7.09 \pm 1.16

Numbers represent Mean \pm S.E. obtained from 4 experiments.

nmol/mg.prot., Ca⁺⁺해리상수(Kd)는 33.59 \pm 2.75 μ M 이었다. 또한 Na⁺ 또는 K⁺처치시에는 이들 이온에 의해 경쟁적으로 Ca⁺⁺결합이 억제되는 양상이었고 Na⁺ 및 K⁺의 억제상수(Ki)는 각각 9.65 \pm 1.29 mM 과 7.09 \pm 1.16 mM 이었다(Table II).

고 찰

심장근의 excitation-contraction coupling 과정에 관여하는 세포내 유리 Ca⁺⁺을 조절하는 기구로서의 mitochondria의 Ca⁺⁺-transport에 관하여는 그간 많은 연구가 진행되어 왔다. Mitochondria의 Ca⁺⁺운반능력은 1961년 Vasington 등이 처음 보고한 이후 Ca⁺⁺-uptake는 mitochondria 호흡으로 형성되는 proton-motive force($\Delta\psi$)와 ATP 분해에 의해서 일어남이 밝혀졌다(Crompton and Heid, 1978; Heaton et al., 1976; Löttscher et al., 1980; Rottenberg et al., 1974). Mitochondria의 Ca⁺⁺-uptake는 ruthenium red와 lanthanides에 의해서 억제되며(Mela, 1968; Reed et al., 1974 a; Vasington et al., 1972), lanthanides에 의한 억제는 ionic radius와 유관한 비특이적인 하전 효과 때문일 것으로 추정되나, ruthenium red에 의한 억제는 아마도 Ca⁺⁺-uniport carrier로 추측되는 Ca⁺⁺-binding glycoprotein에 작용하리라 추정되고 있다(Carafoli, 1980).

Na⁺에 의한 mitochondrial Ca⁺⁺의 유리는 심근 mitochondria에서 처음으로 알려졌고(Carafoli et al., 1974), 그후 뇌세포, 부신피질 및 골격근등에서도 Na⁺에 의한 Ca⁺⁺유리가 밝혀졌으며, 간세포, 신장, 폐조직등에서는 Na⁺에 의한 Ca⁺⁺유리는 없는 것으로 보고되었다(Crompton and Moser, 1978). 한편 심장근 mitochondria에서의 Na⁺에 의한 Ca⁺⁺유리는 Ca⁺⁺-uptake 과정을 차단하는 ruthenium red에 의해서는 억제되지 않으나(Crompton and Capano, 1976), lanthanides에 의하여는 억제된다는 점에서 심근 mitoc-

hondria 내막에는 uptake carrier와는 다른 Na⁺-Ca⁺⁺ 교환으로 Ca⁺⁺유리가 일어나도록 촉매하는 carrier가 존재할 것이라는 보고가 있었으며(Crompton et al., 1977), 이와 더불어 Crompton 등(1978)은 mitochondria에는 Ca⁺⁺-uniport, Na⁺/Ca⁺⁺-antiport 및 Na⁺/H⁺-antiport system 등이 존재하며 mitochondria의 Na⁺, Ca⁺⁺ 및 H⁺은 이 carrier들과 상호 연관을 갖고 조절될 것으로 추정하였다.

한편 심근 수축에 있어, Akera 등(1978)은 computer 모방 실험결과 심근의 매 수축—이완주기에 따라 수축 초기에 세포내 유리 Na⁺이 증가했다가(Na⁺-transient) 이완기에서 다시 원상수준으로 돌아간다고 보고하고 있어, 이러한 세포내 이온들의 심근 수축—이완에 따른 농도 변화가 심근세포내 Ca⁺⁺조절기구에 영향을 미치고, 따라서 세포내 유리 Ca⁺⁺농도의 조절에 관여할 수 있지 않을까 추정할 수 있다.

Proton-motive force($\Delta\psi$)가 형성되는 상태에서도 mitochondrial Ca⁺⁺의 약 10%정도는 외부 Ca⁺⁺-binding site에 결합되어 존재하고 있으며, mitochondria의 에너지 비의존성 외부 Ca⁺⁺-binding pool의 Ca⁺⁺결합능력 또한 상당히 크다는 점(Carafoli, 1974; Reed et al., 1974 b)을 감안할때, Na⁺ 또는 K⁺에 의한 mitochondrial Ca⁺⁺의 유리에 대한 정확한 분석을 위해서는 유리되는 Ca⁺⁺의 mitochondria 내에서의 출처를 규명해야 될 필요가 있을 것이다. 따라서 본 실험에서는 mitochondria의 내막은 투과치 못하나 외면에 결합된 Ca⁺⁺은 chelation할 수 있는 EGTA를 사용함으로써 mitochondrial Ca⁺⁺을 내부 및 외부 pool로 나누고 이들 pool에서의 Ca⁺⁺유리를 측정, 분석하고자 하였다.

이러한 EGTA-quenching 방법에 의하여 mitochondria에서의 Ca⁺⁺유리를 분석하였을 때, K⁺에 의한 mitochondrial Ca⁺⁺의 유리는 단지 외부 Ca⁺⁺-pool에 결합된 Ca⁺⁺만의 유리에 의함을 알 수 있었고, 이에 반해 Na⁺은 내부 pool의 Ca⁺⁺도 현저히 유리시켰을 알 수 있었다. Na⁺에 의한 내부 pool에서의 Ca⁺⁺유리는 1~3 mM의 저농도에서도 현저하였으며, 이는 심근의 매수축 이완시 심근 섬유와 원형질 사이에 교환되는 Ca⁺⁺양이 조직 gm 당 25 nmol이며 심근세포내 Ca⁺⁺이 mitochondria에 의해서만 조절된다고 가정하여도 매 수축시 mitochondria의 Ca⁺⁺유리량이 0.4 nmol/mg. mitochondria라는점(Carafoli, 1975; Kim, 1978)을 감안해 볼때, 세포내의 적은 Na⁺농도의 증가는 심근 mitochondria 내막에서 Na⁺-Ca⁺⁺교환기전으

로 심근수축에 관여하는 충분한 양의 Ca⁺⁺을 유리할 수 있으리라 추정된다. 한편 Ca⁺⁺-uptake 과정을 차단치 않은 상태에서의 Na⁺에 의한 mitochondrial Ca⁺⁺의 유리는 미약한 net Ca⁺⁺유리를 보였는데 이는 Ca⁺⁺-uptake carrier의 Ca⁺⁺-uptake 속도가 Na⁺에 의한 Ca⁺⁺유리 속도보다 현저히 크기 때문일 것으로 여겨졌다. 그러나 이러한 현상은 Mg⁺⁺이 심근 mitochondria의 Ca⁺⁺-uptake 속도를 현저히 감소시킨다는 보고 (Crompton and Siegel, 1976; Jacobus et al., 1975)에서 볼때 in vivo에서는 큰 의의를 갖지 않을 것이며, 세포내 Na⁺농도 변화로 mitochondria의 Ca⁺⁺운반은 충분히 영향을 받을 수 있고 Mg⁺⁺등의 타 세포내 이온의 농도에 따라 변조되어 조절된 것으로 사료된다.

Na⁺과 mitochondria 내부 pool의 Ca⁺⁺의 교환은 sigmoid 양상의 saturation kinetics를 보여 매 교환 cycle마다 2개 이상의 Na⁺이 관여할 가능성이 시사되었다. Crompton & Capano(1976)는 ruthenium red로 Ca⁺⁺-uptake를 차단한 조건에서 Hill coefficient가 3에 가까우며 antimycin으로 에너지원을 차단한 경우 최대 Ca⁺⁺유리속도가 감소함을 보고 Na⁺-Ca⁺⁺교환의 기전은 electrogenic 교환일 것으로 추정하였다. 그러나 이 실험조건은 외부 Ca⁺⁺-pool에서의 Ca⁺⁺유리가 또한 가미되는 조건인 문제점이 있다. 본 실험에서는 Hill coefficient는 2에 가까웠으며 이는 Carafoli(1980)의 succinate 첨가에 의한 Ca⁺⁺-uptake pool에서의 Na⁺에 의한 Ca⁺⁺유리시 mitochondria의 막전압이 변하지 않는다는 보고로 미루어 볼때 mitochondria의 Na⁺/Ca⁺⁺-antiport carrier에 의한 Na⁺-Ca⁺⁺교환은 electro-neutral한, 즉 막 내외부 하전의 변화를 초래치 않는 2Na⁺-1Ca⁺⁺의 교환이 일어날 것으로 추정된다. 한편 antimycin 처리로 에너지원을 차단한 경우 Ca⁺⁺유리의 최대속도가 감소하는 결과는 Na⁺-Ca⁺⁺교환은 mitochondria의 에너지 준위에 의존함을 보이는 결과로 사료되며 Na⁺-Ca⁺⁺교환시의 에너지원에 대한 검토가 요구된다. [Na⁺]_o는 mitochondria의 에너지 준위에 관계없이 평균 8 mM 정도로 나타났으며 이는 Crompton & Capano(1976)와 Crompton & Künzi(1977)의 결과와 유사하였고 Ca⁺⁺유리속도가 [Na⁺]²에 비례하는 양상은, Lee & Fozzard(1975)의 cation-selective microelectrode에 의한 가토 심실 유두근 세포내 유리 Na⁺의 농도가 6~7 mM이라는 점을 감안할때, 세포내 Na⁺농도의 적은 변화도 mitochondria와 원형질간의 Ca⁺⁺분포를 큰 폭으로 조절할 것으로 사료된다.

Mitochondria의 내부 Ca⁺⁺-pool 이외에 또 하나의

pool인 에너지 비의존성 외부 Ca⁺⁺-binding pool의 생리적 의미와 이에 대한 Na⁺ 및 K⁺의 효과를 관찰키 위해 에너지원이 없이 mitochondria 호흡억제제 존재하에서 mitochondria의 Ca⁺⁺-transport를 EGTA-quenching으로 분석하였다. 이때 mitochondrial Ca⁺⁺은 명백히 EGTA 비가역성 pool과 가역성 pool로 구분되었으며, 비가역성 pool은 EGTA에 의해서 chelation이 되지 않고, 시간경과에 따라 증가양상을 보이며, Ca⁺⁺농도 증가에 따라 saturation kinetics를 보임으로써 이 pool로의 Ca⁺⁺-transport는 단순 확산에 의한 것이 아닐 것으로 생각되었으며, 또한 EGTA 비가역성 pool이 dinitrophenol 처리로 즉각 감소하며, Na⁺에 의해서 감소되나 K⁺에 의해서는 감소되지 않는 점과, Reed 등(1974 b)의 보고에서의 같이 ruthenium red 및 La⁺⁺⁺에 의해 차단되는 점으로 미루어 이는 Ca⁺⁺-uptake carrier를 통한 mitochondria 내부로의 Ca⁺⁺-uptake의 한 과정으로 사료된다. 한편 Reynafarje 등(1969)과 Carafoli(1971)는 같은 조건에서 high affinity binding site와 low affinity binding site의 두 종류의 binding site를 보고하였다. 그러나 이들이 high affinity binding site로 추정하는 것은 상기의 EGTA 비가역성 pool과 동일성질을 지니는 것으로 여겨진다. 즉 이들이 보고한 결합수용체의 수가 EGTA 비가역성 pool(1.08~4.90 nmol/mg. protein)과 유사할 뿐만 아니라, Southard(1974)의 high affinity binding site는 호흡 억제제 농도 증가에 따라 감소한다는 보고와, 호흡억제 mitochondria에서도 Ca⁺⁺-carrier를 통해 Ca⁺⁺의 electrochemical gradient에 의해 Ca⁺⁺투과가 일어난다는 보고(Selwyn, 1979)를 고려할 때 본 실험에서의 EGTA 비가역성 pool은 Reynafarje 등(1969)의 high affinity binding과 동일한 것이며 이는 제한된 active transport일 것으로 추측된다. 또한 가역성 Ca⁺⁺-pool인 외부 pool의 binding site는 Scatchard plot에서 대조 및 Na⁺, K⁺ 처리시에도 단일 종류의 binding site를 보여 이론적으로 생각할때 Ca⁺⁺-carrier에 결합상태로 있는 양은 극히 적으며 이에 대한 추구는 다른 실험조건에서 시행해야 하리라 생각된다. 총 binding site의 수는 평균 28.74 nmol/mg. protein이며, Ca⁺⁺해리상수는 33.59 μM로써 Reed(1974 b)의 백서외 간세포 mitochondria와 Noack 등(1977)의 백서심근 실험에서와 유사하였으며 Na⁺ 및 K⁺은 외부 Ca⁺⁺-binding site의 Ca⁺⁺결합을 경쟁적으로 억제하며, Na⁺ 및 K⁺의 억제상수는 평균 9.65 mM과 7.09 mM을 나타내었다. 따라서,

mitochondria 외부 Ca⁺⁺-pool의 수용능력은 세포내 유리 Ca⁺⁺ 조절에 충분하나, 생체에서와 같은 energized mitochondria에서는 대부분의 mitochondrial Ca⁺⁺이 내부 pool에 존재하고 정상적으로 높은 세포내 K⁺의 농도를 고려할때 세포막 탈분극에 의한 전기적 현상으로 초래되는 이온 농도의 적은 변화폭에 따른 세포내 Ca⁺⁺ 동원출처로서의 기여도는 mitochondria의 내부 pool에 비해 그 의의가 훨씬 적을 것으로 사료된다.

이상의 실험결과로 보아 현재로서는 심근 세포막 탈분극과 결부하여 나타나는 세포내 Na⁺ 및 K⁺의 순간적인 변화를 측정하기가 곤란하기 때문에 세포내로의 Na⁺ 유입량과 Na⁺ 농도의 변화폭을 정확히 알 수는 없으나 세포내 Na⁺은 적은농도 변화로도 mitochondria 내막에서의 Na⁺-Ca⁺⁺ 교환기전을 통한 세포내 Ca⁺⁺ 농도 조절에 상당한 역할을 하리라 생각된다.

결 론

꽤 심장근에서 추출한 mitochondria에서 Ca⁺⁺-pool 및 Na⁺과 K⁺에 의한 Ca⁺⁺ 유리효과를 관찰하였다.

1) Mitochondria에 운반된 Ca⁺⁺은 내막을 통한 Ca⁺⁺-uptake pool과 mitochondria 내외막에 결합된 상태의 외부 pool로 구분되어 존재하였다. Energized mitochondria에서는 대부분의 mitochondrial Ca⁺⁺이 내부 pool에 존재하였고 de-energized mitochondria에서는 운반된 Ca⁺⁺의 많은량이 외부 pool에 결합된 상태로 존재하였다.

2) Mitochondria의 두 Ca⁺⁺-pool에 대하여 K⁺이온은 외부 pool에 결합된 Ca⁺⁺의 유리만을 일으켰으나, Na⁺은 외부 Ca⁺⁺-pool뿐만 아니라, 내부 pool에서도 Ca⁺⁺의 유리를 일으켰다.

3) Mitochondria의 내부 pool에 흡수된 Ca⁺⁺은 소량의 Na⁺에 의해서 신속히 유리되었으며, Na⁺에 의한 최대 Ca⁺⁺유리속도는 분당 11.44±0.59 nmol/mg.protein 이고, 이때 [Na⁺]_{0.5}는 8.58±0.48 mM이었으며 Hill coefficient는 1.83±0.09이었다. 한편 mitochondria 호흡을 차단했을 시에는 내부 pool에서의 Ca⁺⁺유리에 있어 [Na⁺]_{0.5}와 Hill coefficient의 변화는 없었으나 최대 Ca⁺⁺유리속도는 6.81±1.58 nmol/mg.protein/min.로 유의한 감소를 보였다.

4) Mitochondria의 energy 비의존성 외부 Ca⁺⁺-pool은 단일종의 Ca⁺⁺결합수용체로 이루어진 양상을 나타내었으며 Ca⁺⁺수용능력은 28.74±2.87 nmol/mg.protein, Ca⁺⁺에 대한 해리상수(Kd)는 33.59±2.75 μM

이었다. 또한 mitochondria 외부 Ca⁺⁺결합부의 Ca⁺⁺의 결합은 Na⁺ 및 K⁺에 의해 경쟁적으로 억제되었으며, Na⁺ 및 K⁺의 억제상수(Ki)는 각 9.65±1.29 mM과 7.09±1.16 mM이었다.

이상의 결과로 미루어 보아 mitochondria의 외부 Ca⁺⁺-pool은 energy 공급 및 세포내 Na⁺, K⁺등의 이온농도가 정상인 생리적 상태에서는 Ca⁺⁺수용능력이 내부 pool에 비하여 크지 못할뿐 아니라, Na⁺ 및 K⁺에 의하여 Ca⁺⁺결합이 경쟁적으로 억제되는 점으로 볼때 세포내 유리칼슘 농도 조절에 큰 역할을 하지 못할 것으로 추측된다. 이에 반하여 mitochondria 내부 Ca⁺⁺-pool은 Na⁺에 의해서만 선택적이고 신속한 Ca⁺⁺유리를 보이며, Ca⁺⁺유리속도가 [Na⁺]²에 비례하고 [Na⁺]_{0.5}가 생리적 세포내 Na⁺농도와 비슷한 점을 감안할때 세포내 유리 Ca⁺⁺농도 조절에 중요역할을 할 것으로 추정된다. 따라서 심근세포의 세포막 흥분현상에 결부된 세포내 유리 Na⁺농도의 적은 증가는 mitochondria 내부 Ca⁺⁺-pool로 부터의 Ca⁺⁺유리속도에 영향을 주어 세포내 유리 Ca⁺⁺농도의 변화를 야기시킬 것으로 추정된다.

REFERENCES

- 1) Akera, T., Brody, T.M.: *The role of Na⁺, K⁺-ATPase in inotropic action of digitalis. Pharmacol. Rev.*, 29:187-220, 1978.
- 2) Bygrave, F.L.: *Calcium movement in cells. TIPS. Aug.*:175-178, 1978.
- 3) Carafoli, E.: *Calcium transport in mitochondria; Advances in cytopharmacology. Vol. 1:209-227, Raven Press. N.Y. 1971.*
- 4) Carafoli, E.: *Mitochondria, calcium transport and the regulation of heart contraction and metabolism. J. Mol. Cell. Cardiol.*, 7:82-89, 1975.
- 5) Carafoli, E.: *Mitochondrial calcium transport; an overview. Calcium-binding proteins; Structure and function. p 121-130, Elsevier North-Holland Inc., 1980.*
- 6) Carafoli, E. and Crompton, M.: *The regulation of intracellular calcium by mitochondria. Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 307:269-284, 1978.
- 7) Carafoli, E., Tiozzo, R., Lugli, G., Grovetti, F. and Kratzing, C.: *The regulation of calcium*

- from heart mitochondria by sodium. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 6:361-371, 1974.
- 8) Crompton, M., Capano, M. and Carafoli, E.: The sodium-induced calcium efflux from heart mitochondria. *Eur. J. Biochem.*, 69:453-462, 1976.
 - 9) Crompton, M. and Heid, I.: The cycling of calcium, sodium and protons across the inner membrane of cardiac mitochondria. *Eur. J. Biochem.*, 91:599-608, 1978.
 - 10) Crompton, M., Künzi, M. and Carafoli, E.: The calcium-induced and sodium-induced effluxes of calcium from heart mitochondria. Evidence for a sodium-calcium carrier. *Eur. J. Biochem.*, 79:549-558, 1977.
 - 11) Crompton, M., Moser, R., Lüdi, H. and Carafoli, E.: The interrelations between the transport of sodium and calcium in mitochondria of various mammalian tissues. *Eur. J. Biochem.*, 82:25-31, 1978.
 - 12) Crompton, M., Siegel, E., Salzmann, M. and Carafoli, E.: A kinetic study of the energy-linked influx of calcium into heart mitochondria. *Eur. J. Biochem.*, 69:420-434, 1976.
 - 13) Ebashi, S.: Excitation-Contraction coupling. *Ann. Rev. Physiol.*, 38:293-313, 1976.
 - 14) Ebashi, S., Endo, M.: Calcium ion and muscle contraction. *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, 18:123-183, 1968.
 - 15) Fozzard, H.A.: Heart; Excitation-Contraction coupling. *Ann. Rev. Physiol.*, 39:201-220, 1977.
 - 16) Fuchs, F.: Striated muscle. *Ann. Rev. Physiol.* 36:461-502, 1974.
 - 17) Heaton, G.M. and Nicolls, D.G.: The calcium conductance of inner membrane of rat liver mitochondria and the determination of the calcium electrochemical gradient. *Biochem. J.*, 156:635-646, 1976.
 - 18) Jacobus, W.E., Tiozzo, R., Lugli, G., Lehninger, A.L. and Carafoli, E.: Aspects of energy linked calcium accumulation by rat heart mitochondria. *J. Biol. Chem.*, 250:7863-7870, 1975.
 - 19) Kim, M.S.: The calcium release from cardiac mitochondria by sodium and potassium. *Korean J. Pharmacol.*, 14:1-11, 1978.
 - 20) Laguens, R.: Morphometric study of myocardial mitochondria in the rat. *J. Cell. Biol.*, 48:673-676, 1971.
 - 21) Lee, C.O., Fozzard, H.A.: Activities of potassium and sodium ions in rabbit heart muscle. *J. Gen. Physiol.*, 65:695-708, 1975.
 - 22) Lee, K.S., Choi, S.J.: Effect of the cardiac glycoside on the Ca⁺⁺ uptake of cardiac sarcoplasmic reticulum. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 153:114-120, 1966.
 - 23) Lehninger, A.L.: Mitochondria and calcium ion transport. *Biochem. J.*, 119:129-138, 1970.
 - 24) Lötscher, H.R., Winterhalter, K.H., Carafoli, E. and Richter, C.: The energy-state of mitochondria during the transport of Ca⁺⁺. *Eur. J. Biochem.*, 110:211-216, 1980.
 - 25) Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.S.: Protein measurement with the folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193:265-275, 1951.
 - 26) Mela, L.: Interaction of La⁺⁺⁺ and local anesthetic drugs with mitochondrial Ca⁺⁺ and Mn⁺⁺ uptake. *Arch. Biochem. Biophys.*, 123:286-293, 1968.
 - 27) Noack, E.A. and Heinen, E.M.: A kinetic study of calcium transport by heart mitochondria. *Eur. J. Biochem.*, 79:245-250, 1977.
 - 28) Page, E., McCallister, L.P.: Quantitative electron microscopic description of heart muscle cells. *Am. J. Cardiol.*, 31:172-181, 1973.
 - 29) Reed, K.C. and Bygrave, F.L.: The inhibition of mitochondrial calcium transport by lanthanides and ruthenium red. *Biochem. J.*, 140:143-155, 1974a.
 - 30) Reed, K.C. and Bygrave, F.L.: A re-evaluation of energy-independent calcium ion binding by rat liver mitochondria. *Biochem. J.*, 142:555-566, 1974b.
 - 31) Reed, K.C. and Bygrave, F.L.: Methodology for in vitro studies of Ca⁺⁺ transport. *Analyt. Biochem.*, 67:44-54, 1975.
 - 32) Reynafarje, B. and Lehninger, A.L.: High

- affinity and low affinity binding of Ca^{++} by rat liver mitochondria. J. Biol. Chem., 211: 584-593, 1969.*
- 33) Rottenberg, H. and Scarpa, A.: *Calcium uptake and membrane potential in mitochondria. Biochem. J., 13:4811-4819, 1974.*
- 34) Southard, J.H., Green, D.E.: *High affinity binding of calcium in mitochondria; A reappraisal. Biochem. Biophys. Res. Commun., 59:30-37, 1974.*
- 35) Selwyn, H.J., Dawson, A.P., Dunnett, S.J.: *Calcium transport in mitochondria. FEBS Lett., 10:105 (cited from Carafoli, E. and Crompton, M., 1978).*
- 36) Sottocasa, G.L., Sandri, G., Panfili, E., de Bernard, B., Gazzotti, P., Vasington, F.D. and Carafoli, E.: *Isolation of a soluble Ca^{++} binding glycoprotein from ox liver mitochondria. Biochem. Biophys. Res. Commun., 47:808-813, 1972.*
- 37) Sulakhe, P.V., Dhalla, N.S.: *E-C coupling in heart. VII. Calcium accumulation; subcellular particles in congestive heart failure. J. Clin. Invest., 60:1019-1027, 1971.*
- 38) Vasington, F.D., Gazzotti, P., Tiozzo, R. and Carafoli, E.: *The effect of ruthenium red on Ca^{++} transport and respiration in rat liver mitochondria. Biochem. Biophys. Acta., 256: 43-54, 1972.*
- 39) Vasington, F.D. and Murphy, J.V.: *Fedn. Proc. Am. Soc. Exp. Biol., 20:146, 1961. (cited from Lehninger, A.L., 1970).*
- 40) Walser, M.: *Determination of free magnesium ions in body fluids; Improved methods for free calciums ions, total calcium, and total magnesium. Anal. Chem. 32:711-717, 1980.*