

# 버섯의 Adenosinetriphosphatase(ATPase)에 관한 연구(I) - 표고버섯(*Lentinus edodes*) 중 F<sub>1</sub>-ATPase의 정제 및 그 성질 -

민태진 · 박혜련

동국대학교 이과대학 화학과

## Studies on the Adenosinetriphosphatase in the Mushroom (I) - Purification and Properties of F<sub>1</sub>-ATPase in *Lentinus edodes* (Berk.) Sing

Tae-Jin Min and Hye-Lyoun Park

Department of Chemistry, Dongguk University, Seoul 100-715, Korea

**ABSTRACT:** Adenosine-5'-triphosphatase(F<sub>1</sub>-ATPase) in the *Lentinus edodes* was fractionated by ammonium sulfate 30% saturation and purified by Sephadex G-200 gel filtration in three times. Three kinds of protein fractions of F<sub>1</sub>-ATPase were isolated from this mushroom, and fraction I and II showed its activity for the substrate, adenosine-5'-triphosphate. Its optimum pH and temperature were found to be pH 7.6 and 58°C, and its thermal stability was stable for 30 min. at 20-30°C. The Km value of this enzyme was 1.81 mM.

**KEYWORDS:** Purification, properties, ATPase, *Lentinus edodes* (Berk.) Sing

ATPase(EC 3.6.1.3)는 F<sub>1</sub>-ATPase와 F<sub>1</sub>·F<sub>0</sub>-ATPase의 총칭으로서 F<sub>1</sub>-ATPase는 ATP를 ADP와 Pi로 분해하는 기능(Kielly, 1955)을 가지므로 편의상 ATPase라 한다. F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPase는 F<sub>1</sub>-ATPase가 Oligomycin Sensitive Conferring Protein(OSCP)에 의하여 F<sub>0</sub>-group에 연결되어(Racker, 1976) 있으며 ADP와 Pi로부터 ATP를 생성하는 기능(Okamoto *et al.*, 1977; Senior, 1988)을 갖기 때문에 ATP synthase라고도 한다. Genus에 따라 조금씩 다르지만 F<sub>1</sub>-group은 5종류의 subunit의 수가  $\alpha_3 \beta_3 \gamma \delta \epsilon$ 로 구성된 단백질의 복합체이고(Racker, 1976), F<sub>0</sub>-group은 소수성 인지질로 구성된 3종류의 subunit(Cain *et al.*, 1988)로 구성되어 미토콘드리아의 내막(Kielly and Kielly, 1953), 엽록체의 thylakoid 및 plasma membrane(Leonard and Van Der Woude, 1976)에 존재하고 H<sup>+</sup> 유통을 매개하는 역할(Walker *et al.*, 1984; Hoppe *et al.*, 1984; Schneider *et al.*, 1984)을 하는 것으로 보고되어 있다.

ATPase의 종류로는 Mg<sup>2+</sup>-ATPase(Gilmour *et al.*, 1952; Hoges, 1973), Ca<sup>2+</sup>-ATPase(Jr *et al.*, 1988), Ca<sup>2+</sup>·Mg<sup>2+</sup>-ATPase(Munkong, 1988), K<sup>+</sup>-ATPase(Leonard *et al.*, 1976) 및 Na<sup>+</sup>·K<sup>+</sup>-ATPase(Pedemont *et al.*, 1988; Tamura *et al.*, 1988) 등의 이온 펌프에 대한 그 mechanism은 보고되어 있다.

버섯은 고등 담자균에 속하는 음식 생물로서 chlorophyll이나 bacterial chlorophyll과 같은 흡광 색소가 잘 알려져 있지 않다. 표고버섯 중 광감응성 mitochondrial ATPase(Min *et al.*, 1987<sup>a</sup>, 1987<sup>b</sup>) 및 ATP synthase(Min *et al.*, 1989<sup>a</sup>, 1989<sup>b</sup>)의 효소적 특성을 실험한 결과 전자는 680 nm 빛을 5분, 후자는 470 nm 빛을 15초 동안 조사할 때 이들 효소의 활성도가 크게 증가되었고, 470 nm 빛을 흡광하는 물질은 flavin계 화합물임을 보고(Park and Min, 1989, 1991)하였다. 또한 버섯의 종류에 따른 빛의 효과를 알기 위하여 느타리 버섯 중 광감응성 mitochondrial ATPase(Lee and Min, 1989<sup>a</sup>) 및 ATP

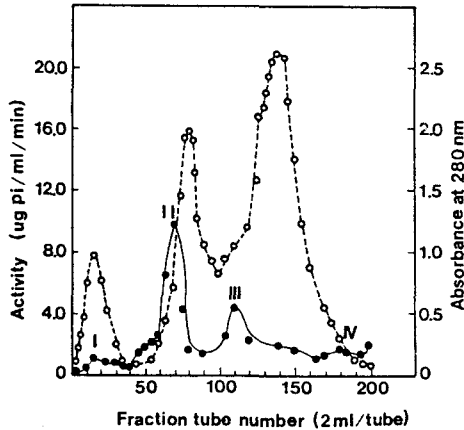


Fig. 1. Fractionation of ATPase by first sephadex G-200 gel filtration.  
 ○---○: absorbance at 280 nm, ●—●: ATPase activity.

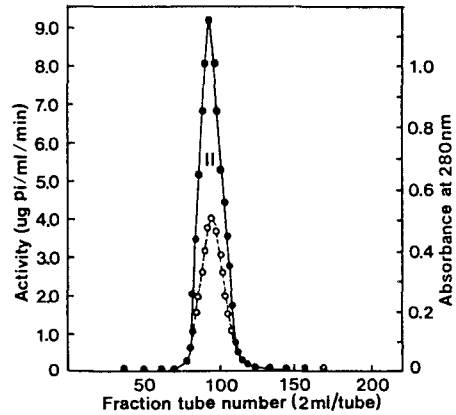


Fig. 2. Fractionation of ATPase by third gel filtration with sephadex G-200 column to fraction II.  
 ○---○: absorbance at 280 nm, ●—●: ATPase activity.

synthase(Lee and Min,1989<sup>9</sup> ; Min and Lee 1991)의 특성을 실험한 결과 전자는 580 nm 빛을 10초, 후자는 480 nm 빛을 15초 동안 조사할 때 그 활성도가 크게 증가함을 보고하였다.

본 연구에서는 광감응성 mitochondrial ATPase와 순수히 분리 정제된 ATPase의 효소적 특성을 비교 검토할 목적으로 표고버섯 중 ATPase를 분리 정제한 다음 최적 pH, 최적 온도, 열 안정성 및 Km 값을 측정하였다.

### 材料 및 方法

#### 재 료

경기도 광릉에서 채취한 자연산 표고버섯(*Lentinus edodes*)을 사용하였고, adenosine-5'-triphosphate(ATP), 2(N-morpholino)ethanesulfonic acid (MES) bovine plasma albumin(BA) 및 Sephadex G-200 등은 Sigma 제품을 사용하였고, ammonium-molybdate(AM), 1-amino-2-naphthol-4-sulfonic acid(ANSA) acrylamide, coomassie brilliant blue R-250(CBB R-250), coomassie brilliant blue G-250 (CBB G-250) 및 *tris*(hydroxymethyl) aminoethane (Tris)는 Merk 제품을 그리고 그 외의 시약은 Wako 특급 시약을 사용하여 실험하였다.

#### ATPase의 분리 정제

Leonard 등(1976)의 방법을 인용 변형하여 시료

450g에 25 mM Tris-MES 완충용액(pH 7.2)을 가하여 균질화한 다음 15,000×g로 30분간 원심분리하여(Dupont Sorvall, OTB-75B) 상층액을 얻은 후 이에 황산암모늄 30% 포화로 분별 침전시켜 15,000×g로 30분 동안 원심분리하여 침전물을 얻었다. 이를 25 mM Tris-MES 완충용액(pH 7.2) 중에서 3일 동안 투석하여 냉동 농축한 시료를 같은 완충용액으로 평형시킨 Sephadex G-200 column(2.2×60 cm)으로 겔 여과하여 단백질 분획과 활성분획 I, II, III 및 IV를 얻었다(Fig. 1). 활성분획 II를 따로 모아 같은 column으로 2차 재 겔여과하여 정제하였다(Fig. 2). 이를 HPLC(Waters Co.) 및 disc-polyacrylamide 겔 전기이동(disc-PAGE)으로 정제 확인하였다. 이 정제된 용액을 증류수 중에서 3일 동안 투석하여 냉동 건조하였다. 위 모든 조작은 4℃에서 행하였다.

#### ATPase의 활성도 측정

이 효소의 활성도는 Rorive 등(1972)의 방법을 인용, 변형하여 Min 등(1987a)의 방법으로 다음과 같이 측정하였다. 2.5 mM ATP 수용액 0.25 ml에 50 mM MgCl<sub>2</sub> 용액 0.1 ml와 0.2 M Tris-MES 완충용액(pH 7.4) 0.25 ml를 가하고 이에 효소 용액 0.1 ml를 가하여 37℃에서 10분 동안 반응시킨 후 10% trichloroacetic acid(TCA) 수용액 2 ml를 가하여 반응을 정지시키고 syringe 여과(pore size 0.45 μm, Millipore Co.)로 침전물을 제거한 여액 2.5 ml에 2.5

**Table 1.** The data of purification of ATPase from the *Lentinus edodes* (Berk.) Sing

Procedure step	Volume (ml)	Unit	Total activity	Specific activity ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ of protein)	Yield (%)
Cell homogenate	1,100	0.95	10,419	13.34	100.0
30% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	225	1.94	4,374	44.18	42.0
1st gel filtration	64	2.84	1,818	34.63	17.5
2nd gel filtration	50	3.38	1,685	47.60	16.2
3rd gel filtration	30	5.24	1,584	229.56	15.2

\*이 효소의 1단위(unit)는 37°C에서 매분당 효소 단백질 1 mg이 1  $\mu\text{g}$ 의 Pi를 유리 시키는 양으로 하였다.

% AM 용액 2 ml, 0.25% ANSA 용액 0.4 ml와 완충용액 5.1 ml를 가하여 30분 동안 발색시켜 660 nm에서 흡광도를 측정하여 인산이온(Pi) 검량곡선에 의하여 생성된 Pi를 정량하였다. 단백질 정량은 Bradford법(1976)에 따라 정량하였다. 효소의 활성도 단위는 37°C에서 매 분당 효소 단백질 1 mg이 1  $\mu\text{g}$ 의 Pi를 유리시키는 양을 1단위(unit)로 하였다.

#### 정제 확인

Disc-PAGE는 Webber법(1969)을 인용하여 6% Polyacrylamide gel(PAG)와 인산 완충용액(pH 7.2)을 사용하여 5°C에서 겔 관 당 5 mA, 65V로 7시간 전기 이동하여 0.25% Coomassie brilliant blue R-250(CBB R-250) 용액으로 염색 후 탈색하여 Densitometer(Toyo DMU-33C)로 slit 0.2×2 mm, 620 nm에서 측정하였고, HPLC는 protein column I-125, mobile phase : 0.05 M phosphate buffer(pH 6.8), flow rate ; 1 ml, chart speed : 0.5 cm/min, wave length : 280 nm에서 측정하였다.

#### 최적 pH, 최적 온도 및 열 안정성

이 효소의 최적 pH는 Tris-HCl 완충용액을 사용하여 pH 7.0에서 9.0까지 각각 변화시켜 37°C에서 10분 동안 반응시킨 후 활성도를 측정하였다.

최적 온도는 이 효소의 최적 pH에서 20°C에서 80°C까지의 온도 범위에서 각각 10분 동안 반응시켜 활성도를 측정하였고, 열 안정성은 효소를 20°C에서 80°C 온도 범위에서 각각 30분 동안 열처리 후 최적 pH에서 활성도를 측정하였다.

#### Km값 측정

ATP의 농도를 0.5 mM에서 4.0 mM까지 각각 변화시켜 이 효소의 최적 pH와 37°C에서 실험하였고, Lineweaver-Burk double reciprocal plot하여 Km 값을 구하였다.

## 結果 및 考察

### ATPase의 분리 정제

정제과정에 따른 이 효소의 활성도 변화는 Table 1과 같다. Table 1에서 정제 초기 단계인 균질 용액의 비활성도는 13.34 단위였으나, 정제 최종 단계인 3차 겔 여과 단계에서는 229.56 단위로 이 효소가 17배 정제되었음을 알 수 있었다.

표고버섯 중의 단백질을 Sephadex G-200 겔 여과로 분리한 크로마토그램은 Fig. 1과 같다. 3 종류의 단백질 분획을 얻었으며 기질 ATP에 대한 활성분획 I, II, III 및 IV를 얻었다. 활성분획 II를 따로 모아 같은 column으로 겔 여과한 후 주 분획을 다시 2번 겔 여과한 크로마토그램은 Fig. 2와 같다.

Fig. 2에서 단일 단백질 분획과 단일 활성 분획을 보여 정제되었음을 보여주었다. 이를 HPLC 및 disc-PAGE로 정제 확인한 결과는 Fig. 3 및 4와 같다. 각각 단일 peak를 보여 이 효소가 정제되었음을 재확인할 수 있었다. 이 효소의 분자량 및 subunit 조성에 관한 연구는 따로 보고하려 한다.

### 최적 pH

pH 변화에 따른 이 효소의 활성도 변화를 측정한 결과는 Fig. 5와 같다. 정제된 이 효소의 최적 pH는 7.6이었다. 이 결과는 syrian hamster의 지방조직 중 mitochondrial ATPase의 최적 pH 8.5(Housteck and Drahota, 1977), thermophilic aerobic bacterium(ps 3)에서 얻은 ATPase의 최적 pH 8.6(Sone *et al.*, 1975), 쥐의 간 중 mitochondrial ATPase의 최적 pH 8.5(Kielly and Kielly, 1953), 신관의 적혈구 막  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase의 최적 pH 7.8(Rorive and Kleinzeller, 1972), 곤충 근육 중 mitochondrial  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase의 최적 pH 7.8(Gilmour and Calaby,

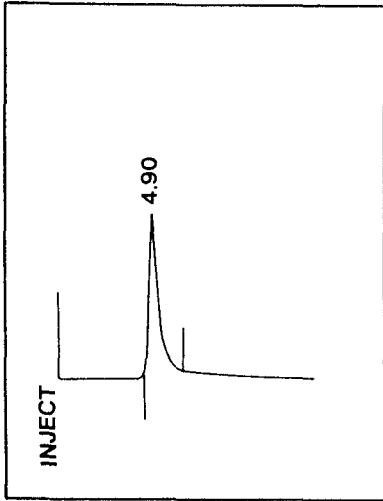


Fig. 3. HPLC chromatogram of ATPase by third gel filtration with sephadex G-200 column to fraction II. Column: protein column I-125, Mobile phase: 0.05 M phosphate buffer (pH 6.8), Flow rate: 1 ml/min, Intensity: 0.1, Chart speed: 0.5 cm/min, Wave length: 280 nm.

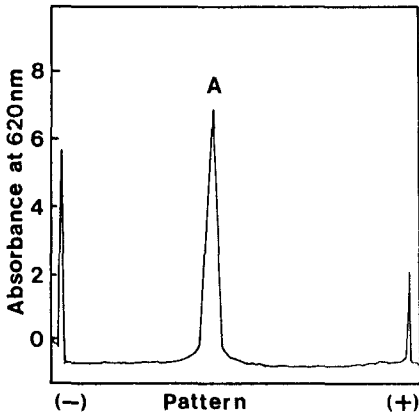


Fig. 4. Densitometric pattern obtained with disc-polyacrylamide gel electrophoresis to purified ATPase.

1952)과는 달랐으며, 소 심장의 mitochondrial ATPase의 최적 pH 7.5(Penefsky and Warner, 1965), 그리고 본 연구실에서 보고한 표고버섯 중 광감응성 mitochondrial ATPase의 최적 pH 7.5(Min *et al.*, 1987a), 느타리버섯 중 광감응성 mitochondrial ATPase의 최적 pH 7.4(Lee and Min, 1989<sup>a</sup>)와는 거의 유사하였다.

최적 온도

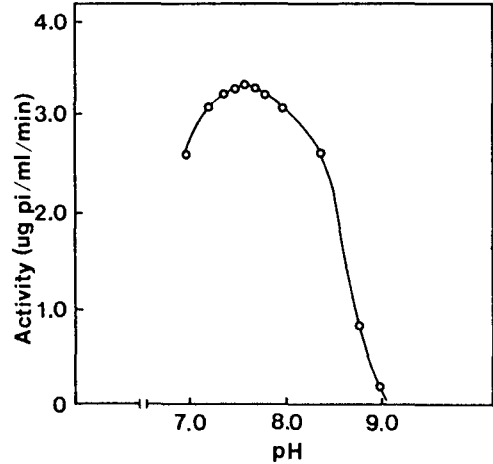


Fig. 5. Optimum pH of ATPase.

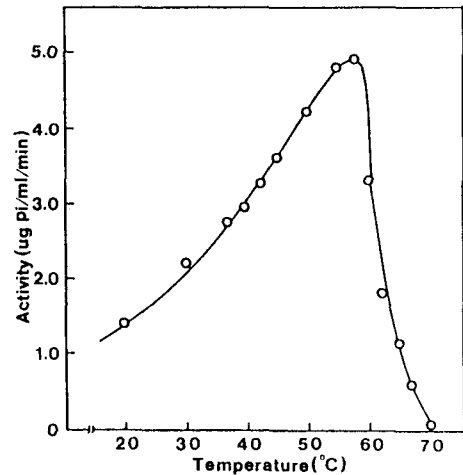


Fig. 6. Optimum temperature of ATPase.

온도 변화에 따른 이 효소의 활성도 변화는 Fig. 6 과 같다. 정제된 이 효소의 최적 온도는 58°C였다. Thermophilic aerobic bacterium(ps 3)에서 분리한 ATPase(Sone *et al.*, 1975)의 최적 온도 70°C, 곤충 근육 중 mitochondrial Mg<sup>2+</sup>-ATPase(Gilmour and Calaby, 1952)의 최적 온도 42°C와는 상이하였고, 표고버섯 중 광감응성 mitochondrial ATPase(Min *et al.*, 1987a)의 최적온도 59°C, 느타리버섯 중 광 감응성 mitochondrial ATPase(Lee and Min, 1989<sup>a</sup>)의 최적 온도 60°C와는 거의 유사하였다.

열 안정성

정제된 이 효소의 열 안정성을 측정된 결과는 Fig.

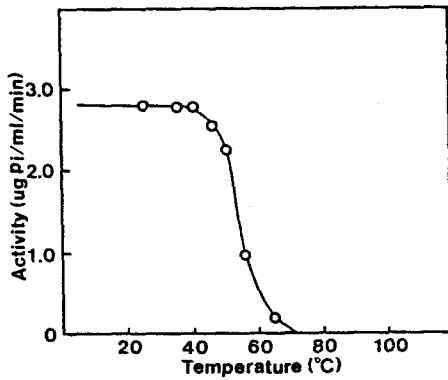


Fig. 7. Thermal stability of ATPase.

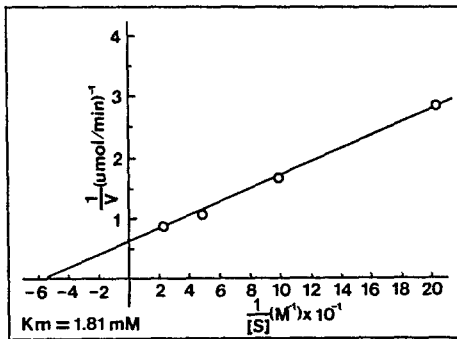


Fig. 8. Lineweaver-Burk reciprocal plot of the effect of ATP substrate concentration on the reaction velocities of ATPase.

7과 같다. 이 효소는 40°C 이상에서는 그 활성도가 급격히 감소하였고, 20-40°C 사이에서 30분 동안 안정함을 보여주고 있다.

이 결과는 시금치 열록체 중의 CF<sub>1</sub>-ATPase(Livne and Racker, 1969)가 64°C 이상에서 불활성화되는 결과와는 상이하였다.

**Km값**

ATP 기질 용액의 농도 변화에 따라 측정한 Km 값을 Lineweaver-Burk double reciprocal plot에 의하여 도기한 결과는 Fig. 8과 같고, 이 효소의 Km값은 1.81 mM이었다.

이 결과는 곤충 근육 중의 mitochondrial Mg<sup>2+</sup>-ATPase(Gilmour and Calaby, 1952)의 Km값 1.6 mM, 본 연구실에서 앞서 보고한(Park, 1990) 표고버섯 중 광감응성 mitochondrial ATPase의 최적 파장 680 nm 빛을 5분 동안 조사하지 않고 측정한 Km값 1.67 mM과는 유사하였으나, 최적 파장의 빛

을 조사해서 측정한 Km값 1.02 mM 심장 근육 중 mitochondrial Mg<sup>2+</sup>-ATPase(Cantley and Hammes, 1973)의 Km값 0.34 mM 그리고 syrian hamster 지방조직 중 mitochondrial ATPase(Housteck and Drahotka, 1977)의 Km값 0.22 mM에 비하여 크게 상이함을 보여주고 있다.

**摘 要**

1. 표고버섯, *L. edodes* 중의 adenosine-5'-triphosphate를 황산암모늄 30% 포화로 분별침전 및 Sephadex G-200 겔 여과로 정제하였다.
2. 이 버섯 중에는 3 종류의 단백질 분획과 adenosine-5'-triphosphate 기질에 대한 두 종류의 활성 분획 I, II, III 및 IV를 얻었다.
3. 활성분획 II를 정제하여 얻은 이 효소의 최적 pH 및 최적 온도는 각각 7.6 및 58°C였고, 열 안정성은 20-40°C에서 30분 동안 안정하였다. 이 효소의 Km값은 1.81 mM이었다.

**감사의 글**

본 연구는 1986년도 한국과학재단의 연구비(862-0380-009-2)로 수행되었으며 이에 감사하는 바이다.

**References**

Bradford, M.M. (1976): A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Micro organism Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding *72*: 248-254.

Cain, B.D. and Simoni, R.D. (1988): Interaction Between Glu-219 and His-245 within the  $\alpha$  Subunit of F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPase in *Escherichia Coli*. *J. Biol. Chem.* **263**: 6606-6612.

Cantley, L.C. and Hammes, G.G. (1973): Activation of Beef Heart Mitochondrial Adenosine Triphosphatase, *Biochem.* **12**: 4900-490.

Gilmour, D. and Calaby, J.H. (1952): Purification of ATPase from Insect Muscle. *Arch. Biochem. Biophys.* **41**: 83-91.

Hoges, C.J. (1973): Membrane-Bound Adenosine-5'-triphosphate Activities of Oat Roots. *Plant Physiol.* **51**: 749-756.

Hoppe, J.H. and Sebald, W. (1984): The Proton Con-

- ducting F<sub>0</sub>-part of Bacterial ATP Synthase. *Biochim. Biophys. Acta.* **768**: 1-27.
- Houstek, J. and Drahotka, Z. (1977): Purification and Properties of Mitochondrial ATPase of Hamster Brown Adipose Tissue. *Biochem. Biophys. Acta.* **484**: 127-139.
- Hudecki, Jr. J. G. (1988): Abnormal Response to Calmodulin, *in vitro* of Dystrophic Chicken Muscle Membrane Ca<sup>2+</sup>-ATPase Activity. *Biochem.* **27**: 76-19.
- Kiely, W. W. (1955): Mitochondrial ATPase. *Methods Enzymol.* **2**: 593-598.
- Kiely, W.W. and Kiely, R.K. (1953): A Specific Adenosinetriphosphatase of Liver Mitochondria. *J. Biol. Chem.* **200**: 213.
- Lee, K. D. and Min, T.J. (1989a): Studies on the Light-Induced Mitochondrial ATPase in *Pleurotus ostreatus*. *Kor. J. Mycol.* **17**(4): 169-176.
- Lee, K. D. and Min, T.J. (1989b): Studies on the Light-Induced Mitochondrial ATP synthase in *Pleurotus ostreatus*. *Kor. J. Mycol.* **17**(4): 177-183.
- Leonard, R.T. and Van Der Woude, W. J. (1976): Isolation of Plasma Membranes from Corn Roots by Sucrose Density Gradient Centrifugation. *Plant Physiol.* **57**: 105-114.
- Livne, A. and Racker, E. (1969): Partial Resolution of the Enzyme Catalyzing Photophosphorylation, *J. Biol. Chem.* **244**: 1332-1338.
- Min, T. J., Cho, S.W. and Park, S.S. (1987a): Light-Induced Mitochondrial ATPase in the *Lentinus edodes* (Berk) Sing. *Kor. J. Mycol.* **15**(4): 217-223.
- Min, T. J., Cho, S.W. and Kim, Y.S. (1987b): Effects of Organic Compound and Metal ion Influx of Light-Induced Mitochondrial ATPase in the *Lentinus edodes*(Berk) Sing. *Kor. J. Mycol.* **15**(4): 224-230.
- Min, T.J., Lee, W.G. and Park, S.S. (1989a): Light-Induced Mitochondrial ATP Synthase in *Lentinus edodes*(Berk) Sing. *Kor. J. Mycol.* **17**(2): 91-98.
- Min, T. J., Lee, W.G., Kim, J.W. and Mheen, T.I. (1989b): Effects of Organic Compound and Metal ion Influx of Light-Induced Mitochondrial ATP Synthase in *Lentinus edodes*(Berk) Sing. *Kor. J. Mycol.* **17**(2): 99-104.
- Min, T. J. and Lee, K.H. (1991): Study on the Characterization of Light-Induced Mitochondrial ATP Synthase in *Pleurotus ostreatus*. *Kor. J. Mycol.* **19**(1): 32-40.
- Munkonge, F. and Michelangeli, F. (1988): Effects of Phospholipid. Protein Ratio on the State of Aggregation of the Ca<sup>2+</sup>. Mg<sup>2+</sup>-ATPase. *Biochem.* **27**: 6800.
- Okamoto, H., Sone, H., Hirata, H. and Kagawa, Y. (1977): Purified Proton Conductor in Proton Translocating ATPase of a Thermophilic Bacterium. *J. Biol. Chem.* **252**: 6125-6131.
- Park, S. S. and Min, T.J. (1989): Effect of FAD and FADH<sub>2</sub> on Light-Induced Mitochondrial ATPase and ATP Synthase in *Lentinus edodes*. *Kor. J. Mycol.* **17**(3): 161-168.
- Park, S. S. (1990): Studies on the Photoreceptor and Characterization of the Light-Induced Mitochondrial ATPase in *Lentinus edodes*. Ph. D. Thesis.
- Park, S. S. and Min, T.J. (1991): Studies on the Photoreceptor of the Light-Induced Mitochondrial ATPase in *Lentinus edodes*. *Korean Biochem. J.* **24**(1): 26-34.
- Pedenmonte, C. H. and Kaplan, J. H. (1988): Inhibition and Derivatization of the Renal Na<sup>+</sup>·K<sup>+</sup>-ATPase by Dihydro-4,4-diisothiocyanato-stilbene-2,2'-disulfonate. *Biochem.* **27**: 7966.
- Penefsky, M. S. and Warner, R.C. (1965): Partial Resolution of the Enzyme Catalyzing Oxidative Phosphorylation, *J. Biol. Chem.* **240**: 4694-4699.
- Racker, E. (1976): The Possible Organization of the Polypeptides of F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPase. *Trends Biochem. Sci.* **1**: 244-255.
- Rorive, G. and Kleinzeller, A. (1972): The Effect of ATP and Ca<sup>2+</sup> on the Cell Volume in Isolated Kidney Tubules. *Biochem. Biophys. Acta* **274**: 226.
- Senior, A.E. (1988): ATP synthase by Oxidative Phosphorylation. *Physiol. Rev.* **68**: 177-231.
- Sone, N., Yoshida, M., Hirata, H. and Kogawa, Y. (1975): Purification and Properties of a Dicyclohexylcarbodiimide-Sensitive Triphosphatase from a Thermophilic Bacterium, *J. Biol. Chem.* **250**: 7917-7923.
- Schneider, E. and Altendorf, K. (1984): The Proton-Translocating Proton (F<sub>0</sub>) of the *Escherichia Coli*. *Trends Biochem. Sci.* **9**: 51-53.
- Tamura, M., Lam, T.T. and Inagami, T. (1988): Isolation and Characterization of a Specific Endogenous Na<sup>+</sup>·K<sup>+</sup>-ATPase inhibitor from Bovine Adrenal. *Biochem.* **27**: 4244.
- Walker, J. E. (1984): Nucleotide Sequence, Regulation and Structure of ATP synthase. *Biochem. Biophys. Acta.* **768**: 164-200.
- Webber, K. and Osborn, M. (1969): Molecular Weight Determination of Proteins by SDS-polyacrylamide gel Electrophoresis. *J. Biol. Chem.* **244**: 4406.