

버섯의 Adenosinetriphosphatase(ATPase)에 관한 연구(II) -표고버섯(*Lentinus edodes*)중 정제 F₁-ATPase의 금속이온 및 음이온 효과

민태진 · 박혜련
동국대학교 이과대학 화학과

Studies on the Adenosinetriphosphatase in the Mushroom(II) -Effects of Metal ion and Anion of Purified F₁-ATPase in *Lentinus edodes*(Berk) Sing

Tae-Jin Min and Hey-Lyoun Park
Department of Chemistry, Dongguk University, Seoul 100-715, Korea

ABSTRACT: Activities of the F₁-ATPase purified from *Lentinus edodes* were stimulated by Fe³⁺, Fe²⁺, Cd²⁺, Mg²⁺, K⁺ and Co²⁺ but were inhibited by Zn²⁺, Ca²⁺, Cu²⁺ and Ni²⁺ ion. The enzyme activities were increased 130, 65, 65, 68, 105% and 23% by the 5 mM Fe³⁺, 10 mM Fe²⁺, 1 mM Cd²⁺, 5 mM Mg²⁺, 5 mM K⁺ and 5 mM Co²⁺ ion addition, respectively, as compared with those not added. The enzyme activities were decreased 18, 19, 27 and 30% by 10 mM Zn²⁺, 10 mM Ca²⁺, 0.5 mM Cu²⁺ and 10 mM Ni²⁺ ion, respectively. Anion effects of 10 mM CO₃²⁻, 20 mM CN⁻, 20 mM CH₃COO⁻ and 20 mM NO₃⁻ ion were inhibited to the enzyme activities of 98, 95, 70 and 50%, respectively. As increasing of SO₄²⁻ ion concentration, the enzyme activity was stimulated and 20 mM SO₄²⁻ ion was shown increased of 21%.

KEYWORDS: Effect of ions, purified ATPase, *Lentinus edodes*(Berk) Sing

ATPase(EC 3.6.1.3)은 F₁-group과 F₀-Group으로 된 단백질 복합체와 인지질 복합체로 연결(Racker, 1976)되어 있는 효소이다. 친수성 F₁-group은 ATP를 ADP와 Pi로 분해시키는 기능(Kielly, 1955)을 하기 때문에 F₁-ATPase 또는 ATPase라 하고, 소수성 F₀-group에 F₁-group이 결합된 F₀F₁-ATPase는 ADP와 Pi로부터 ATP를 생성하는 기능(Okamoto *et al.*, 1977; Senior, 1988)을 하기 때문에 ATP Synthase라고도 한다.

이 효소는 미토콘드리아 내막(Kielly and Kielly, 1953), 엽록체의 thylakoid 및 plasma membrane (Leonard and Van Der Woude, 1976) 등에 존재하고, H⁺ 유동을 매개하는 역할(Walker, 1984; Hoppe *et al.*, 1984; Schneider *et al.*, 1984)을 하는 것으로 보고되어 있다.

이는 Mg²⁺-ATPase(Gilmour *et al.*, 1952; Hoges,

1973), Ca²⁺-ATPase, Ca²⁺, Mg²⁺-ATPase(Munkonge, 1988; Ribreiro and Vianna, 1973), K⁺-ATPase(Leonard and Van Der Woude, 1976) 및 Na⁺, K⁺-ATPase(Pedenmonte *et al.*, 1988; Tamura *et al.*, 1988; Fahn *et al.*, 1968) 등 그 이온펌프에 대한 mechanism과 관련된 것으로 보고 되어 있다.

앞서 표고버섯 및 느타리버섯 중 광 감응성 mitochondrial ATPase(F₁-ATPase)의 효소적 특성(Min *et al.*, 1987a, 1987b, Lee and Min, 1989a)과 빛에 의하여 활성화 되는 표고버섯 중 mitochondrial ATP Synthase의 빛을 흡광하는 물질이 Flavin계 화합물임을 보고(Park and Min, 1989, 1991)한 바 있다.

본 연구에서는 광 감응성 mitochondrial ATPase와 순수히 분리 정제된 ATPase의 효소적 특성을 비교 검토하기 위하여, 표고버섯 중 ATPase를 순수히 분리 정제하여 금속이온 및 음이온들의 효

과를 실험하였기에 이에 보고한다.

材料 및 方法

시약

경기도 광릉에서 채취한 자연산 표고버섯(*L. edodes*)을 사용하였고, adenosine-5'-triphosphate(ATP), 2(N-morpholino)ethanesulfonic acid(MES), bovine plasma albumin(BA) 및 sephadex G-200 등은 Sigma 제품을 사용하였으며, ammonium molybdate(AM), 1-amino-2-naphthol-4-sulfonic acid(ANSA), trichloroacetic acid(TCA), Coomassie brilliant blue R-250(CBB R-250), Coomassie brilliant blue G-250(CBB G-250) 및 tris(hydroxymethyl)aminoethane(Tris)은 Merk제품을, 그리고 금속이온 효과 실험에서 사용한 시약은 금속의 염화물을, 음이온 효과에서는 음이온의 나트륨염을 사용하였으며, 이들을 포함한 그 외의 시약은 Wako 특급시약을 사용하여 실험하였다.

ATPase의 분리정제

Leonard 등(1976)의 방법을 인용 변형하여 Min 등이 보고한 (I)보에서와 같은 방법으로 분리 정제하여, 정제 확인된 시료를 사용하여 실험하였다.

ATPase의 활성도 측정

Rorive 등(1972)의 방법을 인용 변형하여 Min 등(1987a)의 방법으로 다음과 같이 실험하였다. 효소용액 0.1 ml에 농도별 각 금속 이온을 각각 가하여 37°C에서 10분간 반응시킨 후 0.2 M Tris-MES 완충용액(최적 pH 7.6)과 15 mM ATP수용액 0.25 ml를 각각 가하여 최종 부피를 1 ml로 만든 다음 온도 37°C에서 정확히 10분동안 반응시킨 후 10% TCA 수용액 2 ml를 가하여 반응을 정지시키고, Syringe여과(pore size 0.45 μm, Millipore Co.)하여 침전물을 제거한 여액 2.5 ml에 2.5% AM 용액 2 ml, 0.25% ANSA 용액 0.4 ml와 같은 완충용액 5.1 ml를 가하여 30분 동안 발색시켜 660 nm에서 흡광도를 측정한 후 Pi 검량곡선에 의하여 생성된 Pi를 정량하였다. 단백질 정량은 Bradford 법(1976)에 따라 정량하였다. 효소의 활성도 단위는 최적 온도하에서 매 분당 효소 단백질 1 mg이 1 μg의 Pi를 유리시키는 양을 1단위로 하였다.

금속이온 효과

금속이온 효과는 Fe²⁺, Fe³⁺, K⁺, Cd²⁺, Mg²⁺, Na⁺, Co²⁺, Ni²⁺, Ca²⁺ 및 Zn²⁺이온의 염화물의 농도 별 수용액을 효소용액 0.1 ml에 각각 가하여 37°C에서 10분 동안 반응 시킨 후 Rorive 등(1972)의 방법을 인용하여 Min 등(1987a)의 방법으로 활성도를 측정하였다.

음이온 효과

음이온 효과는 SO₄²⁻, NO₃⁻, CH₃COO⁻, CN⁻ 및 CO₃²⁻의 나트륨 염의 각 농도별 수용액을 만든 다음, 이들 효소용액 0.1 ml에 각각 가하여 실온에서 10분동안 반응시킨 후 Rorive 등(1972)의 방법을 인용하여 Min 등(1987b)의 방법으로 활성도를 측정하였다.

結果 및 考察

금속이온 효과

금속이온에 의한 이 효소의 활성도 변화를 측정한 결과는 Table 1에 나타내었으며, 이들의 농도 변화에 따른 효소 활성도는 Fig. 2 및 Fig. 3에 나타내었다. Fig. 1과 같이 Fe³⁺의 농도증가에 따라 ATPase의 활성도가 크게 증가하였고, 5.0 mM일 때에 130% 활성도 증가를 보이다가, 그 이상의 농도에서는 감소하는 경향을 보였다. Fe²⁺ 이온 효과는 0.1 mM에서는 40%, 10 mM에서는 65% 활성도 증가를 보였고, 20 mM에서는 오히려 78%의 억제효과를 보였다. 그리고 Cd²⁺ 이온효과는 0.5 mM 이하의 농도에서는 그 영향이 없었고, 1.0 mM일 때 65%의 활성도 증가를 보이다가, 그 이상의 농도에서는 감소하는 경향을 보였다. Fig. 2에서와 같이 Mg²⁺이온효과는 0.1 mM에서 43%, 5.0 mM에서 68%로 농도증가에 따라 활성도 증가를 보였으며, 그 이상의 농도에서는 감소하였다. 그리고 K⁺ 및 Co²⁺ 이온은 다같이 0.1 mM에서 5 mM까지 농도증가에 따라 활성화하는 경향을 보여 5 mM에서 각각 105% 및 23%의 활성도 증가를 보였고, 그 이상의 농도에서는 감소하였다.

Fig. 3에서 Zn²⁺, Cu²⁺ 및 Ni²⁺ 이온은 다같이, 이 효소의 활성을 억제하였으나, Zn²⁺ 및 Ni²⁺ 이온은 10.0 mM에서, Cu²⁺이온은 1.0 mM에서 각각 이 효소의 반응을 가장 크게 억제하였다. 그리고 Ca²⁺ 이온은 0.1 mM에서는 10% 정도 활성화시켰으나

Table I. Effects of cation of ATPase

Cation	Concentration (μ)	Relative activity (%)
None		100
Fe ³⁺	0.1	98
	0.5	134
	1.0	170
	5.0	230
	10.0	181
Fe ²⁺	0.1	140
	0.5	138
	1.0	138
	5.0	157
Cd ²⁺	10.0	165
	0.1	109
	0.5	106
	1.0	165
	5.0	160
Mg ²⁺	10.0	150
	0.1	143
	0.5	140
	1.0	140
	5.0	168
K ⁺	10.0	160
	0.1	110
	0.5	125
	1.0	107
	5.0	205
Co ²⁺	10.0	155
	0.1	102
	0.5	106
	1.0	109
	5.0	123
Zn ²⁺	10.0	95
	0.1	98
	0.5	95
	1.0	93
	5.0	89
Ca ²⁺	10.0	82
	0.1	110
	0.5	103
	1.0	101
	5.0	97
Cu ²⁺	10.0	81
	0.1	80
	0.5	73
	1.0	75
	5.0	80
Cu ²⁺	10.0	87
	0.1	80
	0.5	73
	1.0	75
	5.0	80
Ni ²⁺	10.0	87
	0.1	88
	0.5	86
	1.0	84
	5.0	93
10.0	70	

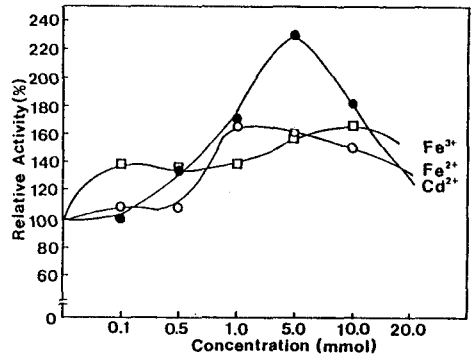


Fig. 1. Effects of Fe³⁺, Fe²⁺ and Cd²⁺ ion of ATPase.

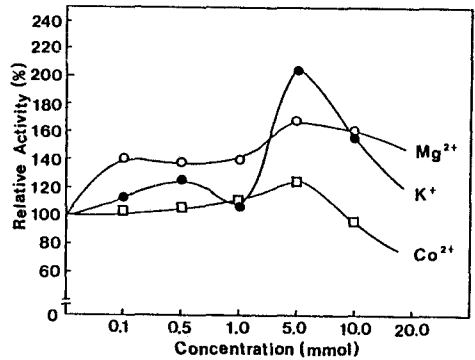


Fig. 2. Effects of Mg²⁺, K⁺ and Co²⁺ ion of ATPase.

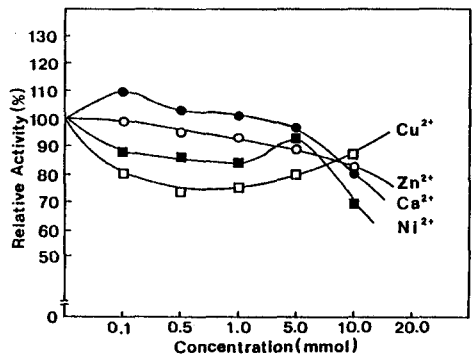


Fig. 3. Effects of Zn²⁺, Ni²⁺, Ca²⁺ and Cu²⁺ ion of ATPase.

그 농도증가에 따라 이 효소의 활성을 억제하였다. 이상의 결과는 신관 적혈구막 중의 ATPase가 Mg²⁺ 및 Ca²⁺ 이온에 의하여 활성화된다는 보고 (Rorive and Kleineller, 1972)가 있으나, 포코버섯 중의 ATPase가 Ca²⁺ 이온농도 증가에 따라 활성도가 감소하는 경향을 보인 것과는 상이하였다. 또한

Table II. Effects of Anion of ATPase

Anion	Concentration (mμ)	Relativeactivity (%)
None		100
CO ₃ ²⁻	1.0	44
	3.0	20
	5.0	7
	10.0	2
	20.0	2
CN ¹⁻	1.0	64
	3.0	32
	5.0	18
	10.0	7
	20.0	5
CH ₃ COO ⁻	1.0	98
	3.0	66
	5.0	49
	10.0	35
	20.0	30
NO ₃ ⁻	1.0	105
	3.0	92
	5.0	79
	10.0	55
	20.0	50
SO ₄ ²⁻	1.0	104
	3.0	106
	5.0	108
	10.0	110
	20.0	121

Syrian hamster 지방조직의 mitochondrial ATPase에서 Mg²⁺, Co²⁺ 및 Cd²⁺ 이온에 의하여 그 활성이 촉진(Pennington, 1961; Houstek and Drahotka, 1977)된 결과와는 유사하였다. 그리고 *E. coli*중 ATPase는 Mg²⁺, Co²⁺ 이온에 의하여 활성화되지만, Cu²⁺ 및 Ni²⁺에 의하여는 영향을 받지 않는 것으로 보고(Kanner, *et al.*, 1975)되어 있으나, 본 실험결과에서 Cu²⁺ 및 Ni²⁺ 이온이 이 효소의 활성을 억제시킨 결과와는 서로 상이하였다.

본 연구실에서 앞서 보고한 표고버섯 및 느타리 버섯 중 광 감응성 mitochondrial ATPase(Min *et*

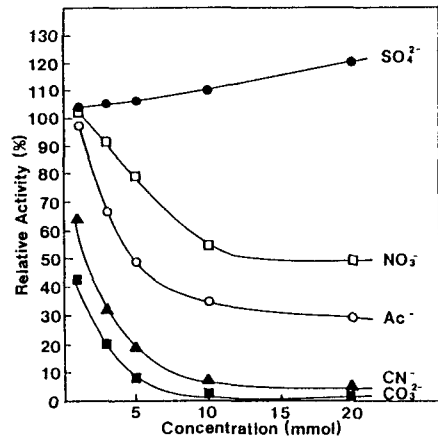


Fig. 4. Effects of each anion of ATPase.

al., 1987a; Lee and Min, 1989a)의 Fe³⁺ 및 Fe²⁺ 이온효과와 본 실험의 결과와는 활성화 차이는 있으나 같은 경향을 보였다. 그러나 두 이온이 cofactor로 작용하였는지 또는 전자전달계에 관련된 산화 환원계에 작용하여 활성화되는지를 구명하기 위한 연구가 필요하며, 현재 진행 중이다. 그리고 Mg²⁺ 이온효과에서, 이상의 2개 버섯 중 mitochondrial ATPase의 경우(Min *et al.*, 1987a; Lee and Min, 1989a)에는 0.1 mM에서 최고 활성도 증가를 보이다가 그 이상의 농도에서는 감소하였으나, 본 실험에서는 0.1 mM에서 5.0 mM까지 농도증가에 따라 증가하고, 5.0 mM에서 68%로서 가장 큰 활성도 증가를 보인 결과와는 상이하였다. 이는 순수히 정제된 ATPase와의 차이점으로 사려된다.

음이온 효과

이 효소의 음이온 효과는 Table 2 및 Fig. 4와 같다. Fig. 4에서와 같이 표고버섯 중에서 순수히 정제된 ATPase는 5 mM CO₃²⁻ 이온에 의하여 93%, 5 mM CN⁻, 5 mM CH₃COO⁻ 및 5 mM NO₃⁻ 이온에 의하여 각각 82, 51 및 21%의 활성도가 억제되었다. 그리고 이 효소는 SO₄²⁻ 이온의 농도가 증가함에 따라 그 활성도가 증가하는 경향을 보여, 20 mM에서 20%의 활성도를 증가시켰다. 이 결과는 소심장 중 mitochondrial ATPase(Penefsky and Warner, 1965)의 활성이 I⁻>NO₃⁻>Br⁻>Cl⁻>SO₄²⁻>CH₃COO⁻ 이온 순으로 억제도가 감소된다는 보고와는 상이하였다. 이는 버섯중 ATPase의

성질차이로 사려된다.

摘 要

1. 표고버섯 중 정제된 ATPase는 Fe^{3+} , Fe^{2+} , Cd^{2+} , Mg^{2+} , K^+ 및 Co^{2+} 이온에 의하여 활성화 되었으나 Zn^{2+} , Ca^{2+} , Cu^{2+} 및 Ni^{2+} 이온에 의하여는 그 활성도가 억제되었다.

2. 5 mM Fe^{3+} , 10 mM Fe^{2+} , 1 mM Cd^{2+} , 5 mM Mg^{2+} , 5 mM K^+ 및 5 mM Co^{2+} 이온은 이효소의 활성을 각각 130, 65, 65, 68, 105 및 23% 증가시켰다.

3. 10 mM Zn^{2+} , 10 mM Ca^{2+} , 0.5 mM Cu^{2+} 그리고 10 mM Ni^{2+} 이온은 이효소의 활성을 각각 18, 19, 27% 그리고 30%의 억제효과를 보였다.

4. 10 mM CO_3^{2-} , 20 mM CN^- , 20 mM CH_3COO^- 그리고 20 mM NO_3^- 의 음이온은 이효소의 활성을 각각 98, 95, 70% 그리고 50%를 억제시켰으나, SO_4^{2-} 이온은 농도증가에 따라 활성화 되었고, 20 mM 용액에서 21%로 활성도 증가의 최대치를 보였다.

감사의 말씀

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

References

- Bradford, M. M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
- Fahn, S. Koval, G. J. and Albers, R. W. (1968): Sodium-potassium activated ATPase of electrophorus electric organ. *J. Biol. Chem.* **243**: 1993-2002.
- 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'-triphosphatase activities of oat roots. *Plant Physiol.* **51**: 749.
- Hoppe, J. H. and Sebald, W. (1984): The proton conducting F_0 -Part of bacterial ATP synthase. *Biochim. Biophys. Acta.* **768**: 1-27.
- Housteck, J. and Drahota, Z. (1977): Purification and properties of mitochondrial ATPase of hamster brown adipose tissue; *Biochem. Biophys. Acta.* **484**: 1-10.
- Jr. J. G., Hudecki, M. S. (1988): Abnormal response to calmodulin *in vitro* of dystrophic chicken muscle membrane Ca^{2+} -ATPase activity. *Biochem.* **27**: 7619.
- Kielly, W. W. (1955): Mitochondrial ATPase. *Methods Enzymol.* **2**: 593-598.
- Kielly, W. W. and Kielly, R. K. (1953): A specific adenosine triphosphatase of liver mitochondria. *J. Biol. Chem.* **200**: 213-219.
- Konner, B. I., Nelson, N. and Gutnick, D. L. (1975): *Biochim. Biophys. Acta.* **396**: 346.
- 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.
- 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.
- 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. and Park, H. L. (1991): Studies on the ATPase in the mushroom(I) purification and properties of ATPase in *Lentinus edodes*; *Kor. J. Mycol.* **19**(3).
- Min, T. J., Cho, S. W. and Park, S. S. (1987a): Light-Induced mitochondrial ATPase in the *L. edodes* (Berk) Sing. *Kor. J. Mycol.* **15**(4): 217-223.
- Munkonge, F., Michelangeli, F. (1988): Effects of phospholipid protein ratio on the state of aggregation of the Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase, *Biochem.* **27**: 6800.
- Okamoto, H., Sone, H., Hirata, H. and Kagawa, Y. (1977): Purified proton conductor in proton translocating ATPase a thermophilic bacterium. *J. Biol. Chem.* **252**: 6125-6131.
- Park, S. S. and Min, T. J. (1989): Effects of FAD and $FADH_2$ on light-induced mitochondrial ATPase and ATP synthase in *Lentinus edodes*; *Kor. J. Mycol.* **17** (3): 161-168.
- 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 Koplan, J. H. (1988): Inhibition derivatization of the renal Na^+ , K^+ -ATPase by dihydro-4,4-diisothiocyano-stilbene-2,2'-disulfonate.

- Biochem. 27*: 7966.
- Penefsky, H. S. and Warner, R. C. (1965): Partial resolution of the enzymes catalyzing oxidative phosphorylation; *J. Biol. Chem.* **240**: 4694-4699.
- Racker, E. (1976): The possible organization of the polypeptides of F₀ · F₁-ATPase. *Trends Biochem. Sci.* **1**: 244-255.
- Ribeiro, J. M. C. and Vianna, A. L. (1973): Allosteric modification by K⁺ of the (Ca²⁺ + Mg²⁺) dependent ATPase of *Sarcoplasmic reticulum*. *J. Biol. Chem.* **253**, 3153.
- Rorive, G. and Kleinzeller, A. (1972): The effect of ATP and Ca²⁺ on the cell volume in isolated kidney tubules; *Biochem. Biophys. Acta.* **274**: 226.
- Schneider, E. and Altendorf, K. (1984): The proton-translocating of proton (F₀) of the *Escherichia coli*. *Trends Biochem. Sci.* **9**: 51-53.
- Senior, A. E. (1988): ATP synthase by oxidative phosphorylation. *Physiol. Rev.* **68**, 177-231.
- Tamura, M., Lam, T. T. and Inagami, T. (1988): Isolation and characterization of a specific endogenous Na⁺, K⁺-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.

Accepted for Publication September 13, 1991