

콩 뿌리조직에서의 Ca^{2+} 에 의한 마이크로솜 이온펌프 활성저해

조광현 · 조경수 · 이은형 · 김영기*

충북대학교 농과대학 농화학과

초록 : 콩 뿌리조직의 이온 흡수와 관련된 생리활성을 조사하기 위하여 뿌리조직으로부터 마이크로솜을 분리하였고, 마이크로솜 ATPase (이온펌프) 활성을 분광학적 방법인 enzyme-coupled 분석방법에 따라 측정하였다. 마이크로솜 ATPase의 활성에 미치는 여러 가지 이온의 효과 또는 ATPase의 이온선택성을 조사하기 위하여 10 mM Na^+ 과 120 mM K^+ 을 포함하는 대조용액에서의 평균활성을 측정한 결과 190 nmol/min/mg protein으로 나타났다. 대조활성에 비하여 Na^+ 을 포함하지 않은 130 mM K^+ 용액에서는 활성이 150%로 증가하였고, K^+ 을 포함하지 않은 130 mM Na^+ 용액에서는 활성이 63%로 감소되었다. 반응용액의 K^+ 농도에 따른 활성변화를 측정한 결과, ATPase의 활성은 외부용액의 K^+ 농도 증가에 따라 활성이 증가됨을 알 수 있었다. 또한 마이크로솜 ATPase 활성은 반응용액의 pH 감소에 따라 증가되어 pH 6~7에서는 비교적 높은 활성을 보였으나, pH 8 이상에서는 급격히 활성이 감소되었고, pH 9에서는 80% 이상의 활성이 저해되었다. Ca^{2+} 에 의한 이온펌프의 활성조절 여부를 평가하기 위해서 마이크로솜 내부 및 외부의 Ca^{2+} 에 의한 ATPase 활성변화를 측정하였다. 마이크로솜 ATPase의 활성은 반응액의 Ca^{2+} 농도가 낮아질수록 증가하여 10^{-9} M 이하에서 최대활성이 관측되었고, Ca^{2+} 농도가 증가할수록 활성은 감소하여 500 μ M 전후에서 50%의 활성이 감소하였다. 또한 ATPase의 활성은 마이크로솜 내부의 Ca^{2+} 농도 증가에 의해서 저해되어, Ca^{2+} ionophore A23187 처리에 의한 외부의 Ca^{2+} 유입에 의해서 약 30%의 활성감소를 보였으며, EGTA 처리에 의한 Ca^{2+} chelation에 의해서 마이크로솜 내부의 Ca^{2+} 농도가 감소되었을 때, ATPase 활성은 증가하였다. 위의 조건에서 실제 마이크로솜 내부로의 Ca^{2+} 유입 여부는 $^{45}Ca^{2+}$ 를 이용하여 확인하였다. 이상의 결과는 마이크로솜 막에 위치한 ATPase의 내부 및 외부에 Ca^{2+} 에 의한 효소활성 조절부위가 각각 존재함을 시사한다. (1997년 3월 31일 접수, 1997년 4월 25일 수리)

서 론

식물은 생장과과정에서 생육을 저해할 수 있는 다양한 환경변화에 직면하며, 생리생화학적 활성조절을 통하여 환경장애요인에 적응한다. 식물체에서 생리활성 조절은 세포막 및 세포내 소기관 막에 위치하는 이온이동과 관련된 이온펌프 및 이온채널 등의 활성조절을 통하여 세포질의 이온 농도를 생육에 맞도록 조절함으로써 이루어지고 있다. 이러한 생리적 기능을 수행하기 위해서 식물세포 내부의 여러 가지 생체막들, 예를 들면, 원형질막, 액포막, endoplasmic reticulum (ER), 또는 미토콘드리아의 내막 등에는 여러 종류의 이온펌프와 이온채널들이 존재하며, 이들은 생리활성과 관련 있는 이온의 농도를 능동적, 또는 수동적으로 조절한다. 능동적 이온이동과 관련된 생체막 효소들의 활성은 ATP의 가수분해와 직접 또는 간접적으로 연결되어 있으며, 막을 경계로 이온의 농도 기울기를 형성한다. 이렇게 형성된 이온의 비대칭적 분포는 식물세포에서 유기 및 무기 양분의 능동적 흡수, 막전위 및 화학전위 형성 등 생리활성 조절의 에너지원으로서 중요한 역할을 수행한다.¹⁾

식물세포들은 다른 세포들과 유사하게 세포질내 유리(遊離) 상태의 Ca^{2+} 농도를 10~100 nM 수준으로 유지하고 있으며,²⁾ 이것은 이온펌프를 통한 액포내로 혹은 세포 밖으로

Ca^{2+} 의 능동적 수송에 의해서 이루어진다.^{3,4)} 세포질내의 Ca^{2+} 농도는 세포외부나 액포, ER에 비하여 매우 낮아서 쉽게 변화될 수 있으며, 세포는 외부신호에 응답하여 세포질내의 Ca^{2+} 농도변화를 유발한다.⁵⁾ 세포질내 Ca^{2+} 농도변화의 양상은 외부의 신호에 따라 다양하여, 농도변화의 강약, 농도변화의 지속시간, 농도변화의 세포내 공간적 분포 등에 차이가 나타나며, 이러한 차이는 세포활성의 미세한 조절을 가능하게 한다.^{5,6)} 외부의 신호에 따른 세포질내 Ca^{2+} 농도변화는 세포내 이온펌프, 이온채널 등을 포함한 여러 효소들의 활성을 2차적으로 조절하여 세포의 생리활성 변화를 유발시킬 뿐만 아니라,⁷⁾ 단백질 인산화나 유전자 발현 등 다양한 조절작용을 수행하는 것이 잘 알려져 있다.^{8,9)}

본 연구는 작물의 뿌리조직에서 이온의 이동 및 조절과 관련된 생리기작을 이해하기 위해서 수행되었으며, 뿌리의 생리기작을 밝혀 염류집적 토양에서의 작물생육 개선방안을 모색하는 데 장기적 목적을 두고있다. 이를 위하여 콩 뿌리조직을 구성하는 생체 막으로부터 유래된 마이크로솜을 분리하여, 이들의 막에 존재하는 이온펌프의 기본 특성들 및 이온펌프 활성에 미치는 Ca^{2+} 의 효과를 조사하였고, 이온펌프 활성을 반영하는 마이크로솜 ATPase의 활성이 마이크로솜 내부 및 외부의 Ca^{2+} 에 의해서 저해되는 것을 확인하였다.

찾는말 : microsomal ATPase, ion pump, Ca^{2+} regulation, soybean roots
*연락처자

재료 및 방법

재료

실험에 사용된 Ca²⁺ ionophore A23187, EGTA, NADH 등을 포함한 시약들 및 pyruvate kinase, lactate dehydrogenase 등의 효소들은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, U.S.A.)에서 구입하였으며, ⁴⁵CaCl₂는 Du Pont-NEN (Boston, U.S.A.) 제품을 이용하였다.

뿌리조직에서의 마이크로솜 분리

콩나물 (soybean sprout, *Glycine max* L.)은 실험당일 오전에 시장에서 가능한 신선하며 뿌리가 긴 것을 구입하였으며, 끝부분에서 약 2 cm의 잔뿌리 부분만을 절개한 후, 증류수로 씻어 사용하였다. 잔뿌리 약 120 g을 완충액 A (250 mM sucrose, 2 mM dithiothreitol, 1 mM PMSF, 0.1% bovine serum albumin, 25 mM Tris-Mes, pH 7.0) 200 ml를 가하여 food processor로 잘게 분쇄한 후, 거즈로 여과하였다. 여과액은 glass-Teflon homogenizer로 완전히 분쇄시킨 후, 8,000 rpm (10,000×g)으로 30분간 원심분리하여 섬유조직 및 mitochondria를 제거하고, 상정액을 22,000 rpm에서 1시간동안 SW 28 rotor (Beckman Instruments, Inc.)를 이용하여 원심분리하였으며, 침전을 모아 5 ml의 완충액 A를 가한 후, glass-Teflon homogenizer로 균질화하였다. 얻어진 마이크로솜 분획은 액체질소로 순간냉동시켜 deep freezer (약 -70°C)에 사용시까지 보관하였다. 모든 과정은 4°C에서 수행하였으며, 마이크로솜의 단백질 농도는 Lowry 방법¹⁰⁾으로 결정하였다.

마이크로솜 ATPase 활성측정

콩 뿌리조직으로부터 분리된 마이크로솜 ATPase의 평균 활성은 enzyme-coupled assay 방법에 의하여 측정하였다.¹¹⁾ 간략히 서술하면, 마이크로솜 ATPase의 활성은 혐기적 해당과정의 일부와 연결되어 NADH 산화를 유발한다. NADH는 340 nm에서 최대 흡광도를 보이나, 산화된 NAD⁺는 340 nm에서 광을 흡수하지 않으므로, ATPase 활성은 340 nm에서의 흡광도 감소로 나타나며 이때 시간에 따른 평균 흡광도 감소율을 이용하여 활성을 측정하게 된다. 흡광도 감소는 spectrophotometer (Hitachi U-2000, Japan)를 이용하여 측정하였으며, assay buffer (120 mM KCl, 50 μM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 0.4 mM NADH, 2 mM phosphoenolpyruvate, 10 mM KCN, 30 mM HEPES, pH 7.4) 500 μl에 약 10 μg의 단백질이 함유된 마이크로솜을 가한 후, pyruvate kinase (1IU), lactate dehydrogenase (1IU)를 혼합하고, 1 mM ATP를 가하여 효소반응을 관측하였다. NaCN 또는 KCN을 마이크로솜 분리 과정 중에 오염되었을 미토콘드리아 막의 ATPase를 저해하기 위하여 assay buffer에 10 mM 농도로 첨가하였다. 또한 Ca²⁺ ionophore A23187과 Ca²⁺-ionomycin은 95% ethanol에 녹여 1 mM stock solution으로 만들어 사용하였다. 반응 완충액에 첨가되는 Ca²⁺ ionophore A23187의 최종농도는 10 μM

로 사용하였고, 처리시 첨가되는 ethanol의 농도는 반응 완충액의 1% (v/v)를 넘지 않게 사용하였으며, 첨가된 ethanol에 의한 효소활성 변화는 관측되지 않았다.

마이크로솜에 의한 ⁴⁵Ca²⁺ uptake

마이크로솜에 의한 ⁴⁵Ca²⁺ uptake 측정은 방사성 동위원소 ⁴⁵Ca²⁺를 이용한 여과방법에 의하여 이루어졌다.¹²⁾ ⁴⁵Ca²⁺ uptake는 1.83 μM ⁴⁵CaCl₂, 50 μM CaCl₂, 120 mM KCl, 30 mM HEPES (pH 7.4), 1 mM MgCl₂가 함유된 uptake 반응용액 (총 부피 500 μl)에 약 35~45 μg의 단백질이 함유된 마이크로솜을 넣은 후, 1 mM ATP의 첨가로 반응을 시작하였다. 마이크로솜 내에 uptake되지 않은 ⁴⁵Ca²⁺은 여과지(Whatman, GF/B)에서 세척하여 제거하였으며, 세척용액에 10 mM CaCl₂를 첨가하여 세척과정에서 마이크로솜 내부로부터 ⁴⁵Ca²⁺의 유출을 방지하였다. 세척된 마이크로솜을 함유한 여과지를 ⁴⁵Ca²⁺ 측정용 용기로 옮겨 Aquasol-2 (Packard Inc., U.S.A.) 5 ml와 혼합한 후, LSC (Liquid Scintillation Counter)를 이용하여 마이크로솜내의 잔존 ⁴⁵Ca²⁺의 양을 측정하였다.

Ca²⁺ 농도별 용액의 제조

마이크로솜 ATPase 활성의 Ca²⁺ 농도 의존성은 반응 완충액에서의 유리상태 Ca²⁺ 농도를 조절한 후 측정하였다. 반응 완충액 내의 유리상태 Ca²⁺ 농도조절에 필요한 EGTA의 농도는 Fabiato의 stability constant¹³⁾들을 이용한 컴퓨터 프로그램으로 계산하였고, 해당 량의 EGTA를 첨가하여 반응 완충액의 Ca²⁺ 농도를 조절하였다.

결과 및 고찰

마이크로솜 ATPase 활성에 미치는 K⁺과 Na⁺의 영향

콩 뿌리조직으로부터 분리된 마이크로솜은 세포막 및 액포, ER 등에서 유래된 막성분의 혼합물이며, 이들 마이크로솜 시료에서 측정된 ATPase 총 활성은 primary ion transporter로서의 ATPase 특성을 포함한다. 콩 뿌리조직으로부터 분리된 마이크로솜의 ATPase활성은 활성이 클수록 NADH의 산화증가로 340 nm에서의 흡광도 감소율이 증가하는 enzyme-coupled assay 방법을 이용하여 측정하였다 (Fig. 1A). 본 연구에서는 먼저 콩 뿌리조직의 ATPase에 대한 작용특성을 구명하는 기본적인 조사로서 ATPase의 활성에 영향을 미치는 K⁺과 Na⁺, H⁺, Ca²⁺ 등의 효과를 측정하였다. 반응 완충액의 K⁺과 Na⁺의 농도를 조절하면서 ATPase 활성에 의한 340 nm에서의 흡광도 감소율을 측정하면, 120 mM K⁺과 10 mM Na⁺을 함유하는 대조실험에서의 평균활성은 190 nmol/min/mg protein으로 나타났다 (Fig. 1B). 그러나 130 mM K⁺만을 함유한 K⁺-완충액에서의 활성은 285 nmol/min/mg protein으로 약 50%증가하였고, 130 mM Na⁺만을 함유한 Na⁺-완충액에서는 활성이 대조구에 비교하여 119 nmol/min/mg protein으로 현저히 감소함을 보였다. 이러한 결과로 미루어 마이크로솜에 위치한

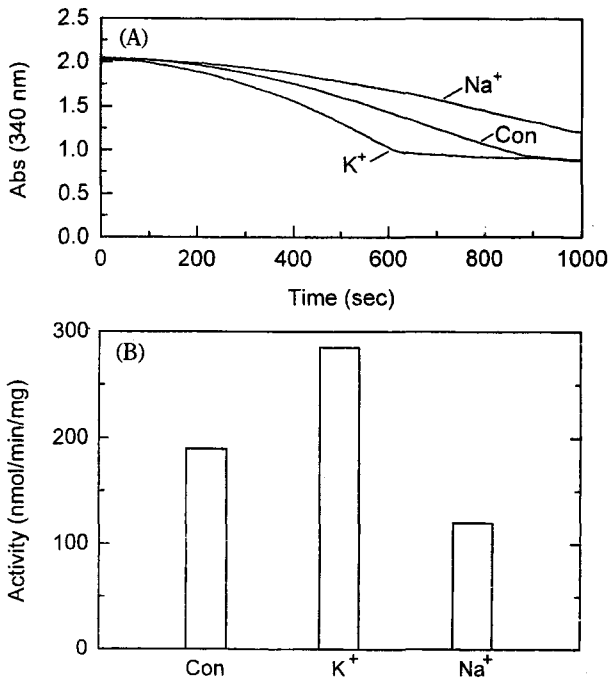


Fig. 1. Effects of K^+ and Na^+ on the activity of microsomal ATPases. (A) The activity of microsomal ATPase was measured under the different ionic conditions: in the normal solution containing 120 mM K^+ and 10 mM Na^+ (Con), in a solution containing 130 mM K^+ without Na^+ (K^+), and in a solution containing 130 mM Na^+ without K^+ (Na^+). (B) The average activities of microsomal ATPases in above conditions. The activity was calculated from the slope of absorbance decrease in each condition. The data shown are representative of 5 independent experiments.

ATPase의 활성은 반응 용액내 K^+ 이온의 농도증가에 의해서 증가되는 것을 알 수 있었다.

K^+ 에 의한 ATPase의 활성증가 현상을 조사하기 위하여 반응 완충액의 K^+ 농도를 변화시키면서 활성을 측정 한 결과, K^+ 의 농도가 증가할수록 ATPase 활성은 증가하는 것을 알 수 있었다 (Fig. 2). 반응 완충액의 K^+ 농도를 50, 120, 190, 240 mM로 증가시켰을 때, 활성은 대조구인 120 mM K^+ 에 비하여 190 mM에서는 132%, 240 mM에서는 141%로 증가하였고, 반면에 낮은 농도인 50 mM에서는 68%로 감소하였다. 이러한 결과는 콩나물 뿌리조직의 마이크로솜 ATPase 활성이 K^+ 농도증가에 따라 농도 의존적으로 증가함을 나타낸다.

최근 K^+ 의 high-affinity uptake와 관련된 효소가 식물체에서 발견되어 일반적 특성 및 유전자의 염기서열이 밝혀졌으나,¹⁴⁾ 아직도 K^+ 과 관련된 primary ion transporter의 존재 및 특성은 명확하게 확인되지 않고 있으며, 본 연구에서 사용된 콩 뿌리조직에서 ATPase 활성의 주된 성분은 원형질막과 액포막에서 유래된 H^+ -ATPase로서 밝혀졌다 (manuscript in preparation). 위의 결과는 K^+ 이 직접 혹은 간접적으로 ATPase의 활성에 영향을 미치는 인자임을 보여주며, 이것은 이미 식물체에서 K^+ 에 의해서 활성화되는 ATPase의 특성이 많이 보고되어 있는 것과 일치한다.^{15,16)} 한편, Na^+ 은 일반적으로 높은 농도에서 식물의 생육 및 성

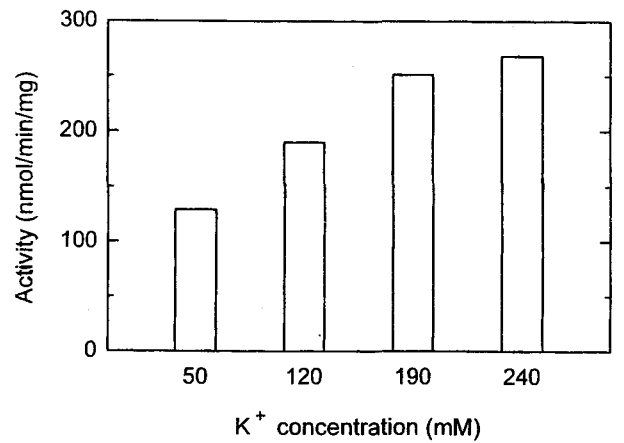


Fig. 2. K^+ -dependent increase in the microsomal ATPase activity. The activities of microsomal ATPases were measured in solutions containing various concentration of K^+ . Each activity shown is an average value of two independent experiments. All solutions also contain 10 mM NaCl.

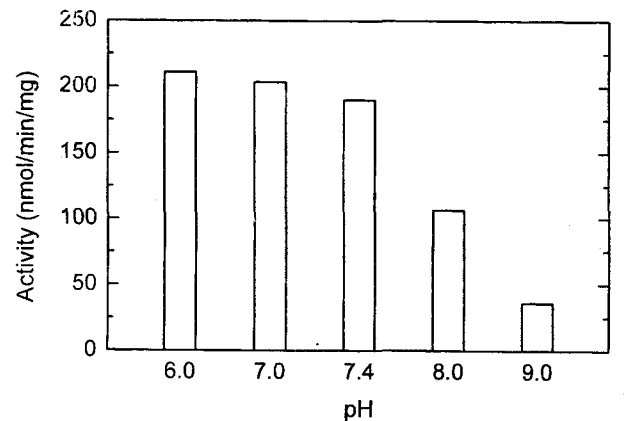


Fig. 3. Effect of pH on the microsomal ATPase activity. The changes of absorbance at 340 nm were measured in the solutions of various pH and the activity of microsomal ATPases was calculated from the slope of absorbance decrease. Each activity shown is an average value of at least two experiments.

장에 장애를 입히는 이온으로 알려져 있으며,¹⁷⁾ 생화학적 척도에서의 Na^+ 에 의한 저해작용은 완전히 밝혀지지 않았지만, 삼투압의 교란, inwardly-rectifying K^+ 채널의 활성 감소 등을 유발시켜 식물세포의 생리활성을 저해하는 것으로 알려져 있다.¹⁸⁾ 이상의 사실들을 고려할 때, K^+ 과 Na^+ 이 콩나물 뿌리조직의 마이크로솜 ATPase의 활성에 영향을 미치는 중요한 이온임을 알 수 있었다.

pH 효과

pH에 의한 마이크로솜 ATPase의 활성 변화는 Fig. 3에서와 같이 확인되었다. 대조실험 조건인 pH 7.4에서의 활성은 190 nmol/min/mg protein으로 측정되었고, pH 6.0에서는 활성이 210 nmol/min/mg protein으로, pH 7.0에서는 활성이 203 nmol/min/mg protein으로 대조활성에 비하여 각각 11%, 7% 증가하였다. 그러나 반응 완충액의 pH가 높아짐에

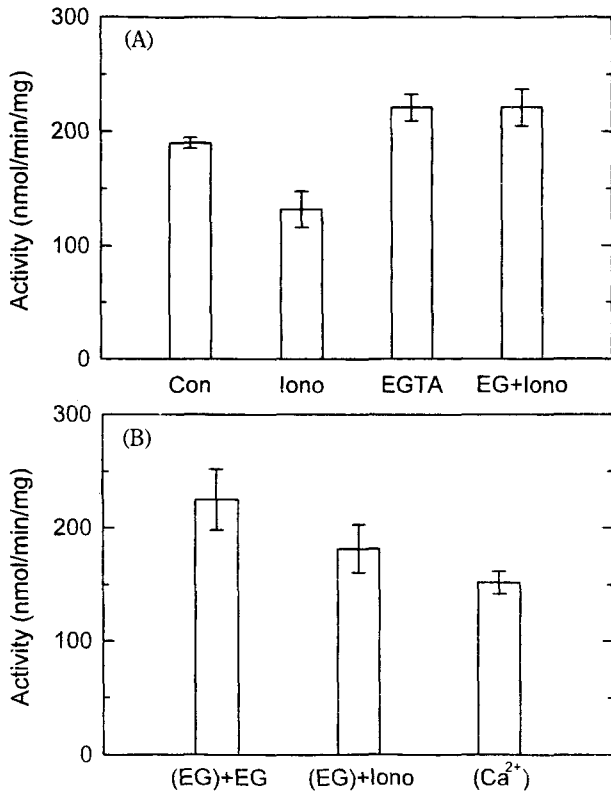


Fig. 4. The effect of Ca²⁺ on the microsomal ATPase activity. (A) The microsomal ATPase activities measured under various conditions; in the normal solution containing 50 μ M Ca²⁺ (Con), in a solution containing 10 μ M Ca²⁺ ionophore A23187 (Iono), in a solution containing 1 mM EGTA (EGTA), and in a solution containing both Ca²⁺ ionophore and EGTA (EG+Iono). The concentration of extramicrosomal free Ca²⁺ was 50 μ M before the addition of EGTA. (B) Effect of luminal Ca²⁺ on the microsomal ATPase activity. Microsomes were incubated in the solution containing 10 mM EGTA (EG) or in the solution containing 10 μ M Ca²⁺ (Ca²⁺) at 5°C for 8 hours. The microsomal ATPase activities of the incubated microsomes were measured in the solution containing 50 μ M Ca²⁺ plus following: EGTA-treated microsomes with 1 mM EGTA [(EG)+EG], EGTA-treated microsomes with 10 μ M Ca²⁺ ionophore A23187 [(EG)+Iono], and Ca²⁺-treated microsomes (Ca²⁺).

따라 활성은 감소하여, pH 8.0에서는 활성이 106 nmol/min/mg protein, pH 9.0에서는 활성이 36 nmol/min/mg protein으로 각각 대조활성의 56%, 19%로 감소하는 경향을 나타내었다. 위의 결과들로부터 마이크로솜 ATPase 활성은 pH 6~9 범위에서 pH가 낮아질수록 높아지는 것을 알 수 있으며, 이것은 위에서 밝혔듯이 H⁺-ATPase가 콩 뿌리조직의 주된 ATPase라는 사실을 지지하며, pH 감소에 따른 활성증가는 이들 H⁺-ATPase 활성증가에 기인할 것이다.

총 활성의 Ca²⁺ 의존성

마이크로솜 ATPase의 활성은 Ca²⁺ 의존성을 보여주고 있다 (Fig. 4). 실험에 사용된 마이크로솜 내부의 Ca²⁺ 농도는 nominally free 상태에서 마이크로솜 분리용 완충액의 제조시 증류수에서 오염된 Ca²⁺ 농도인 3~5 μ M과 같거나 낮을 것이다. 특히 마이크로솜 내부에 Ca²⁺ 결합 단백질의

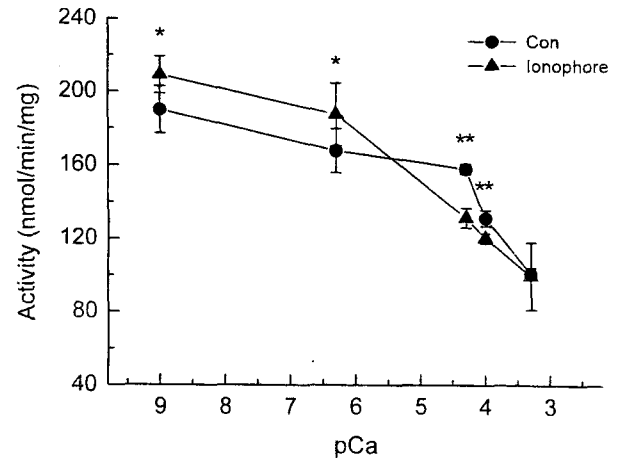


Fig. 5. The Ca²⁺-dependence of microsomal ATPase activity. The activity of microsomal ATPase was measured in the presence of extramicrosomal Ca²⁺ from 1 nM to 1 mM (Con). Ca²⁺ ionophore A23187 (10 μ M) was added in above conditions (Ionophore). Values are means \pm SD (n=3~10). *not significant, **p<0.01 by Anova test.

존재시 내부의 유리상태 Ca²⁺ 농도는 더 낮아질 수 있다.^{19,20} 위와 같은 조건에서 마이크로솜 외부의 Ca²⁺을 50 μ M로 하였을 때, 대조실험 조건에서의 ATPase 활성은 190 \pm 4.6 nmol/min/mg protein이었다. 그러나 마이크로솜 막의 Ca²⁺ 투과성을 증가시키는 Ca²⁺-ionomycin 또는 Ca²⁺ ionophore A23187을 처리하여 마이크로솜 내부의 Ca²⁺ 농도를 외부와 같이 50 μ M로 조절하였을 때, 활성은 132 \pm 16 nmol/min/mg protein으로 약 30% 감소하는 것이 확인되었다. 이것은 마이크로솜 막의 Ca²⁺ 투과성 증가로 외부의 Ca²⁺이 마이크로솜 내부로 유입되어 나타난 결과이다. 이에 반해 반응용액에 선택적인 Ca²⁺ chelator인 1 mM EGTA를 첨가하여 마이크로솜 외부의 유리상태 Ca²⁺ 농도를 3.4 nM로 낮추었을 때, ATPase 활성은 221 \pm 12 nmol/min/mg protein으로 약 16% 증가하였다. 한편, EGTA와 Ca²⁺ ionophore A23187을 함께 처리하여 마이크로솜의 내부 및 외부의 유리상태의 Ca²⁺ 농도를 3.4 nM로 감소시켰을 때, 활성은 221 \pm 16 nmol/min/mg protein으로서 더 이상의 유의성있는 증가는 관측되지 않았다 (Fig. 4A).

위의 결과를 종합하면 대조실험에서의 마이크로솜 ATPase 활성에 비하여 Ca²⁺ ionophore A23187의 처리로 마이크로솜 내부의 Ca²⁺ 농도를 외부와 같은 50 μ M로 높였을 때 활성은 감소되었고, EGTA, 또는 Ca²⁺ ionophore A23187과 EGTA를 동시에 처리함으로써 외부 및 내부의 유리상태 Ca²⁺의 농도를 10⁻⁹ M 수준으로 감소시켰을 때, 활성의 증가가 일어났다. 이것은 마이크로솜 ATPase의 활성이 마이크로솜 내부의 Ca²⁺ 농도증가에 의해서 감소되는 Ca²⁺ 의존성을 보여준다. 그러나 EGTA 단독 또는 Ca²⁺ ionophore A23187과 EGTA를 동시에 처리하였을 때 활성에 변화가 크지 않은 것은 마이크로솜 내부에서 외부로의 Ca²⁺ 이동이 외부로부터 내부로의 이동보다 상대적으로 쉽게 일어남을 의미한다. 이와 같은 Ca²⁺ 이동에 관한 방향성은 본 연구에

서 사용된 마이크로솜 시료에서 H^+ -ATPase의 활성과 연계되어 마이크로솜 내부로 Ca^{2+} 을 이동시킬 수 있는 Ca^{2+}/H^+ antiport 활성이 작거나 없음을 의미한다.³²⁾ 위의 여러 조건에서의 마이크로솜 내부의 Ca^{2+} 축적여부는 방사성 동위원소 $^{45}Ca^{2+}$ 을 이용한 실험에서도 확인되었다 (Fig. 6).

마이크로솜 ATPase의 Ca^{2+} 의존특성을 조사하기 위하여 마이크로솜 내부의 Ca^{2+} 농도를 조절하면서 ATPase의 활성을 조사하였다 (Fig. 4B). 마이크로솜을 10 mM EGTA를 포함하는 용액이나 10 μ M Ca^{2+} 을 포함하는 용액에서 각각 5°C에서 약 8시간 동안 배양하여 평형에 이르게 함으로써 마이크로솜 내부의 Ca^{2+} 농도를 0.1 nM 이하 및 10 μ M로 각각 조절하였다. 먼저 반응용액에 1 mM EGTA를 처리하여 Ca^{2+} 농도를 3.4 nM로 조절한 후, EGTA에 배양한 마이크로솜을 첨가하면 마이크로솜 내부의 Ca^{2+} 농도는 0.1 nM 이하에서 3.4 nM로 증가되며 이때 활성은 225 ± 27 nmol/min/mg protein으로 나타났다 [(EG)+EG]. 그러나 EGTA를 처리한 마이크로솜을 50 μ M Ca^{2+} 을 포함하는 반응용액에서 Ca^{2+} ionophore A23187을 처리하면 마이크로솜 내부의 Ca^{2+} 농도는 67 nM로 증가되며, 이때 활성은 182 ± 21 nmol/min/mg protein으로 측정되었다 [(EG)+Iono]. 한편 50 μ M Ca^{2+} 이 함유된 반응용액에 마이크로솜 내부의 Ca^{2+} 농도를 10 μ M로 유지시킨 마이크로솜을 첨가하면 활성은 152 ± 10 nmol/min/mg protein으로 감소하였다 [(Ca²⁺)]. 결론적으로 마이크로솜에서의 ATPase 활성은 마이크로솜 내부의 Ca^{2+} 농도 증가에 의해서 저해되었으며, 이것은 마이크로솜 내부에 ATPase의 활성을 저해하는 Ca^{2+} 결합부위가 존재함을 시사한다.

마이크로솜 ATPase의 활성은 또한, 마이크로솜 외부의 Ca^{2+} 농도 변화에 의해서도 영향을 받는 것으로 나타났다 (Fig. 5). 반응 완충액의 Ca^{2+} 농도를 1 nM, 500 nM, 50 μ M, 100 μ M, 500 μ M로 증가시켰을 때, 활성은 각각 190 ± 13 , 168 ± 12 , 158 ± 3 , 131 ± 4 , 101 ± 3 nmol/min/mg protein으로 나타나 ATPase 활성은 마이크로솜 외부의 Ca^{2+} 농도증가에 의하여 감소하는 것을 확인하였다. 흥미롭게도 위의 각 Ca^{2+} 농도에서 Ca^{2+} ionophore A23187의 첨가로 ATPase 활성은 각각 209 ± 10 , 187 ± 17 , 131 ± 5 , 120 ± 3 , 99 ± 18 nmol/min/mg protein으로 변화하였는데 1~500 nM Ca^{2+} 에서는 Ca^{2+} ionophore A23187의 첨가로 평균활성이 약 10% 증가하였으나 유의성은 낮았다 ($n=7$). 그러나 Ca^{2+} 농도 50~100 μ M 수준에서는 Fig. 4A에서의 결과와 같은 유의성있는 ATPase 활성감소 (약 8~17%)를 보였다. 한편, 500 μ M Ca^{2+} 에서는 Ca^{2+} ionophore A23187의 첨가에 의한 활성의 차이를 보이지 않았다.

Ca^{2+} ionophore A23187을 처리하지 않은 마이크로솜에 있어서도 ATPase의 활성이 외부의 Ca^{2+} 농도증가에 따라 감소되는 것은 마이크로솜 외부로 향한 ATPase 단백질 부분에도 역시 Ca^{2+} 에 의해서 저해되는 조절부위가 존재함을 시사한다. 또한 Fig. 4에서 확인되었듯이 반응 완충액의 Ca^{2+} 농도를 10⁻⁹ M 수준으로 낮출 때, Ca^{2+} ionophore A23187의 첨가로 평균활성이 증가한 것은 마이크로솜 내

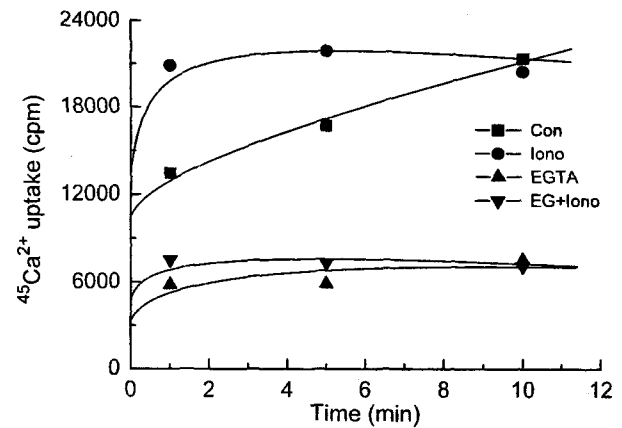


Fig. 6. The time course of microsomal $^{45}Ca^{2+}$ uptake. $^{45}Ca^{2+}$ uptake was measured under the following conditions: in the normal solution containing 50 μ M Ca^{2+} and 1.83 μ M $^{45}Ca^{2+}$, in the normal solution plus 10 μ M Ca^{2+} ionophore A23187 (Iono), in the normal solution plus 1 mM EGTA (EGTA), and in the normal solution plus both Ca^{2+} ionophore A23187 and EGTA (EG+Iono). The microsomal $^{45}Ca^{2+}$ taken up was determined after washing through a Whatman filter (GF/B) in each experiment.

부의 3~5 μ M Ca^{2+} 이 마이크로솜 외부로 유출되어 마이크로솜 내부의 Ca^{2+} 농도가 반응 완충액의 Ca^{2+} 농도로 낮아지며 나타난 것으로 생각되어 진다. 반대로 반응 완충액의 Ca^{2+} 농도가 10⁻⁶ M 이상의 수준에서는 Ca^{2+} ionophore A23187을 통해 반응 완충액의 Ca^{2+} 이 마이크로솜 내부로 유입됨으로써, 마이크로솜 내부의 Ca^{2+} 농도가 반응 완충액의 Ca^{2+} 농도로 증가하여 활성이 감소한다. 이것은 Fig. 4에서의 결과와 마찬가지로 마이크로솜 내부의 Ca^{2+} 농도에 의하여 ATPase의 활성이 조절됨을 의미하는 것이다. 그러나 현재까지의 결과로는 마이크로솜 내부 및 외부의 Ca^{2+} 이 저해하는 ATPase가 동일한 효소인가 아니면 각기 다른 ATPase들을 저해하는가를 확실히 규명할 수 없었다. 한편 대조활성과 Ca^{2+} ionophore A23187 처리시 측정된 활성이 교차되는 용액내 Ca^{2+} 농도는 마이크로솜 내부에 원래부터 존재하는 Ca^{2+} 농도 (nominally free concentration)를 반영한다.

마이크로솜에 의한 $^{45}Ca^{2+}$ uptake

콩나물 뿌리조직으로부터 분리한 마이크로솜의 ATPase 활성을 조절하는 Ca^{2+} 의 효과는 Ca^{2+} ionophore A23187과 EGTA의 단독적인 처리에 의한 효과가 아니라 마이크로솜 내부로의 Ca^{2+} 유출입에 의존적이라는 사실을 밝히기 위하여 $^{45}CaCl_2$ 을 이용하여 $^{45}Ca^{2+}$ uptake 실험을 수행하였다 (Fig. 6). $^{45}Ca^{2+}$ uptake 용액에서 마이크로솜에 의한 $^{45}Ca^{2+}$ uptake는 1분 이내에 90%이상 일어났고, 1분 이후에는 직선적으로 증가하는 biphasic한 경향으로 일어나는 것이 관측되었다. Fig. 4의 실험에서와 같이 Ca^{2+} ionophore A23187, EGTA, 그리고 Ca^{2+} ionophore A23187과 EGTA를 동시에 처리한 후 마이크로솜에 의한 $^{45}Ca^{2+}$ uptake를 관측한 결과, Ca^{2+} ionophore A23187에 의하여 $^{45}Ca^{2+}$ 은 대조실험보다 빠르게 마이크로솜 내부로 유입되었다 (●—●). 이와는 대조적으로 대조실험에서는 $^{45}Ca^{2+}$ uptake가 1분 후에도 직선적

으로 증가하고 있어 마이크로솜 막에 Ca²⁺ transporter나 밝혀지지 않은 leakage 경로가 있음을 시사한다 (■—■). 그러나 EGTA처리(▲—▲)와 EGTA, Ca²⁺ ionophore A23187을 함께 처리(▼—▼)시 마이크로솜 내부로의 ⁴⁵Ca²⁺ uptake는 오히려 감소되었다. 이러한 결과는 마이크로솜 외부의 EGTA에 의한 완충효과로 Ca²⁺ ionophore A23187, 또는 Fig. 4에서 언급하였듯이 마이크로솜 내부에서 외부로 Ca²⁺이 확산되는 기작에 의해서 Ca²⁺ uptake가 감소하는 것을 의미한다.

감사의 글

본 연구는 1995년도 한국학술진흥재단의 공모과제 연구비의 지원에 의하여 수행되었음.

참고문헌

- Sze, H. (1985) H⁺-translocating ATPases: advances using membrane vesicles. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **36**, 175-208.
- Helper, P. K. and R. O. Wayne (1985) Calcium and plant development. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **36**, 397-439.
- Schumaker, K. S. and H. Sze (1985) A Ca²⁺/H⁺ antiport system driven by the proton electrochemical gradient of a tonoplast H⁺-ATPase from oat roots. *Plant Physiol.* **79**, 1111-1117.
- Schumaker, K. S. and H. Sze (1986) Calcium transport into the vacuole of oat roots: Characterization of H⁺/Ca²⁺ exchange activity. *J. Biol. Chem.* **261**, 12172-12178.
- Gilroy, S., P. C. Bethke and R. L. Jones (1993) Calcium homeostasis in plants. *J. Cell Sci.* **106**, 453-462.
- Price, A. H., A. Taylor, S. J. Ripley, A. Griffiths, A. J. Trewavas and M. R. Knight (1994) Oxidative signals in tobacco increase cytosolic calcium. *Plant Cell* **6**, 1301-1310.
- Bethke, P. C. and R. L. Jones (1994) Ca²⁺-calmodulin modulates ion channel activity in storage protein vacuoles of barley aleurone cells. *The Plant Cell* **6**, 277-285.
- Blower, D. P. and A. J. Trewavas (1989) Second messengers: Their existence and relationship to protein kinases. In: *Second Messengers in Plant Growth and Development*. W. F. Boss and D. J. Morre, editors. pp. 1-28. Liss, New York.
- Braam, J. and R. W. Davis (1990) Rain-, wind-, and touch-induced expression of calmodulin-related genes in *Arabidopsis*. *Cell* **60**, 357-364.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
- Niggli, V., J. T. Penniston and E. Carafoli (1979) Purification of the (Ca²⁺-Mg²⁺)-ATPase from human erythrocyte membranes using a calmodulin affinity column. *J. Biol. Chem.* **254**, 9955-9958.
- Valdivia, C., D. Vaughan, B. V. L. Potler and R. Coronado (1992) Fast release of ⁴⁵Ca²⁺ induced by inositol 1,4,5-trisphosphate and Ca²⁺ in the sarcoplasmic reticulum of rabbit skeletal muscle: evidence for two types of Ca²⁺ release channels. *Biophys. J.* **61**, 1184-1193.
- Fabiato, A. (1988) Computer programs for calculating total from specified free from specified total ionic concentrations in aqueous solutions containing multiple metals and ligands. *Methods Enzymol.* **175**, 378-471.
- Schachtman, D. P. and J. I. Schroeder (1994) Structure and transport mechanism of a high-affinity potassium uptake transporter from higher plants. *Nature* **370**, 655-658.
- Briskin, D. P., R. T. Leonard and T. K. Hodges (1987) Isolation of the plasma membrane: membrane markers and general principles. *Methods Enzymol.* **148**, 542-558.
- Sze, H. (1982) Characterization of nigericin-stimulated ATPase from sealed microsomal vesicles of tobacco callus. *Plant Physiol.* **70**, 498-505.
- Pasternak, D. (1987) Salt tolerance and crop production. A comprehensive approach. *Annu. Rev. Phytopathol.* **25**, 271-291.
- Schroeder, J. L., J. M. Ward and W. Gassmann (1994) Perspectives on the physiology and structure of inward-rectifying K⁺ channels in higher plants: biophysical implications for K⁺ uptake. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **23**, 441-471.
- Ikemoto, N., M. Ronjat, L. G. Meszaros and M. Koshita (1989) Postulated role of calsequestrin in the regulation of calcium release from sarcoplasmic reticulum. *Biochemistry* **28**, 6764-6771.
- Michalak, M., R. E. Milner, K. Burns and M. Opas (1992) Calreticulin *Biochem. J.* **285**, 681-692.
- Blumwald, E. and R. J. Poole (1986) Kinetics of Ca²⁺/H⁺ antiport in isolated tonoplast vesicles from storage tissue of *Beta vulgaris* L. *Plant Physiol.* **80**, 727-731.

Ca²⁺-induced Inhibition of Microsomal ATPases in Soybean Roots

Kwang-Hyun Cho, Kyoung-Soo Cho, Eun-Hyoung Lee and Young-Kee Kim* (*Department of Agricultural Chemistry, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea*)

Abstract : In order to investigate the mechanisms of epithelial ion transports, microsomes of soybean roots were prepared and the activity of microsomal ATPases was measured by an enzyme-coupled assay. The effects of various ions were evaluated on the total activity of microsomal ATPases and the average activity was 190 nmol/min/mg protein in the control solution containing 10 mM Na⁺ and 120 mM K⁺. The activities were increased to 150% and decreased to 63% of the control activity in the solution containing 130 mM K⁺ without Na⁺ and in the solution containing 130 mM Na⁺ without K⁺, respectively. In general, the activity of microsomal ATPase was increased by K⁺ in a concentration-dependent manner. The activity was also increased at lower pH and relatively higher activities were observed in the pH range of 6~7. However, the activity was decreased at weak alkaline pH and ~80% of the activity was inhibited at pH 9. Since intracellular Ca²⁺ has been known to control the activity of various enzymes, we have investigated the effects of intra- and extramicrosomal Ca²⁺ on the activity of microsomal ATPases. The maximal activity was obtained at the extramicrosomal Ca²⁺ concentrations below 1 nM. The activity was gradually decreased by increasing Ca²⁺ concentration and 50% inhibition was observed at ~500 μM Ca²⁺. The increase in luminal Ca²⁺ concentration also inhibited the activity of microsomal ATPase. When the influx of external Ca²⁺ was induced by Ca²⁺ ionophore A23187 treatment, the activity was decreased by 30%; however, it was recovered by EGTA-induced chelation of Ca²⁺. These results suggest that the presence of Ca²⁺ regulation sites on both cytoplasmic and luminal sides of microsomal ATPases.

Key words : microsomal ATPase, ion pump, Ca²⁺ regulation, soybean roots.

*Corresponding author