

토마토 뿌리조직에서 분리한 마이크로솜의 Ca^{2+} 흡수 특성

조광현 · 김영기*

충북대학교 농과대학 농화학과

초 록 : 식물세포의 세포질 Ca^{2+} 이동과 관련된 Ca^{2+} 수송 특성을 조사하기 위하여, 토마토 뿌리조직으로부터 마이크로솜을 분리하고, $^{45}Ca^{2+}$ 흡수 실험을 수행하였다. 반응용액에 P-type ATPase의 선택적 저해제인 1 mM vanadate와 액포막 H^+ -ATPase의 선택적 저해제인 50 mM NO_3^- 를 첨가하였을 때, $^{45}Ca^{2+}$ 흡수는 각각 20%와 33%가 저해되었고, 두 가지 저해제를 동시에 첨가하였을 때, 약 47%가 저해되었다. 이러한 저해효과의 특성을 밝히기 위하여 protonophore인 gramicidin을 처리하여 막을 경계로 형성된 H^+ 의 농도기울기를 감소시켰을 때, $^{45}Ca^{2+}$ 흡수는 30% 가량 저해되어, 토마토 뿌리조직 마이크로솜에 Ca^{2+}/H^+ antiporter가 존재할 가능성을 확인하였다. Gramicidin의 저해효과는 vanadate에 의한 $^{45}Ca^{2+}$ 흡수 저해 이후에도 대조실험과 같은 정도로 얻어져 vanadate의 저해효과와는 무관한 것이 확인되었다. 그러나, NO_3^- 를 처리하여 $^{45}Ca^{2+}$ 흡수를 저해시킨 후, gramicidin에 의한 추가저해는 거의 관측되지 않았다. 한편, 동물조직 ER/SR-type Ca^{2+} -ATPase의 선택적 저해제인 thapsigargin은 마이크로솜 $^{45}Ca^{2+}$ 흡수를 농도 의존적으로 저해하였으며, 10 μ M 농도에서 최대 저해효과를 나타냈다. Thapsigargin에 의한 저해효과는 NO_3^- 를 사용하여 액포막 H^+ -ATPase 활성을 저해하였을 때와 gramicidin을 사용하였을 때, 현저하게 감소하였으며, vanadate의 효과와는 무관하였다. 이러한 결과는 vanadate가 직접적으로 Ca^{2+} -ATPase를 저해하며, NO_3^- 와 thapsigargin은 액포막에 위치한 H^+ -ATPase의 활성을 저해하여 간접적으로 Ca^{2+}/H^+ antiporter를 저해함을 의미한다. 결론적으로, 본 연구의 결과는 토마토 뿌리조직에 Ca^{2+} 이동을 유발하는 주요 효소로서 Ca^{2+} -ATPase와 액포막 Ca^{2+}/H^+ antiporter가 존재함을 보여준다.(1999년 3월 8일 접수, 1999년 4월 8일 수리)

서 론

세포질내 Ca^{2+} 은 2차 신호전달자로서 외부자극에 따라 세포의 여러 가지 생리작용을 조절한다.¹⁾ 활성화되지 않은 정상세포는 세포질내의 Ca^{2+} 농도를 30~200 nM²⁾ 수준으로 매우 낮게 유지하며, 세포 외부나 ER, 액포와 같은 세포내 소기관 내부의 Ca^{2+} 농도를 세포질에 비하여 1,000배 이상 높게 유지하고 있다.³⁾ 현재까지 식물세포에서 Ca^{2+} 수송에 중요한 역할을 수행하는 것으로 알려진 단백질로는 원형질막과 세포내 소기관 막에 존재하는 이온펌프로 Ca^{2+} -ATPase^{4,5)}와 액포막의 Ca^{2+}/H^+ antiporter^{6,8)} 등이 있으며, 축진화산을 매개하는 이온채널로 원형질막의 막전위-민감성 Ca^{2+} 채널⁹⁾과 액포막 등의 $InsP_3$ receptor,¹⁰⁾ ryanodine receptor¹¹⁾ 등이 확인되었다. 세포질 내부의 Ca^{2+} 농도는 이러한 효소 및 단백질의 다양하고 균형 있는 Ca^{2+} 수송 기작에 의해 조절되고 있으며, 세포의 생리, 생화학적 활성변화는 세포질 Ca^{2+} 농도의 변화로 미세하게 조절되고 있다.

그간의 연구에서 식물세포의 원형질막 또는 세포내 소기

관 막에 위치하는 Ca^{2+} -ATPase는 vanadate, erythrosin B, ruthenium red 등에 의하여 저해되는 반면, azide, NO_3^- , oligomycin에 의해 저해되지 않음이 보고되었다.^{3,12-14)} 식물체에서 발견된 Ca^{2+} -ATPase는 125 kD의 P-type ATPase로서 진핵세포 대부분에서 발견되는 효소들과 구조적 유사성을 갖는 것으로 알려져 있다.¹⁵⁾ 한편, 식물세포의 Ca^{2+}/H^+ antiporter는 H^+ -ATPase에 의해 발생하는 H^+ 농도기울기를 이용하여 세포질 내부의 Ca^{2+} 이동을 유발하여, 결국 세포질내 Ca^{2+} 농도를 낮추는 기능을 수행하고 있다.³⁾

식물세포에서는 생육환경의 변화에 따라 Ca^{2+} 수송 활성이 민감하게 변화됨이 알려져 있으며,¹⁵⁾ 이것은 Ca^{2+} 이 환경스트레스와 관련된 식물세포의 활성 변화에 주된 역할을 수행할 수 있음을 의미한다. 따라서, 식물세포의 Ca^{2+} 수송 기작에 대한 분자적 구명은 세포의 활성변화에 대한 조절 기작의 이해를 도와 환경스트레스로 유발되는 생육저해 현상의 원인을 밝히고 대책 수립을 가능하게 할 수 있을 것이다. 본 연구는 토마토의 뿌리조직에서 세포질내 Ca^{2+} 농도 조절기작에 관한 생리, 생화학적 특성을 조사함으로써, 세포의 Ca^{2+} 과 관련된 활성조절 기작을 밝히기 위한 기초 연구로 수행되었다. 특히, 본 논문에서는 토마토 뿌리조직으로부터 얻은 마이크로솜을 이용하여 $^{45}Ca^{2+}$ 흡수의 특성을 조사하였고, 액포에 의한 Ca^{2+} 흡수는 주로 액포막에 위치한 Ca^{2+}/H^+ antiporter의 활성에 의해 일어남을 확인하였으며, 원형질막이나 ER 등에 Ca^{2+} -ATPase 활성이 존재할 가능성을 제시하였다.

찾는말 : Ca^{2+} 흡수, Ca^{2+} 펌프, Ca^{2+}/H^+ antiporter, nitrate, thapsigargin, 토마토뿌리, vanadate

약어 : CCCP, carbonylcyanide *m*-chlorophenylhydrazone; ER, endoplasmic reticulum; SR, sarcoplasmic reticulum; HEPES, N-(2-hydroxyethyl)piperazine-N'-(2-ethanesulfonic acid); $InsP_3$, inositol 1,4,5-trisphosphate

*연락처

재료 및 방법

재료

토마토 종자는 흥농종묘의 서광토마토(*Lycopersicon esculentum* L.; Pink Forcer)를 사용하였다. 종자는 발아용 스폰지를 이용하여 빛을 주지 않은 상태로 25°C를 유지하여 증류수에서 약 3일간 발아시켰으며, 발아후 Cho 등¹⁶⁾의 방법에 따라 양액이 담긴 플라스틱 용기에 이식하였다. 토마토 뿌리조직은 성장조절기 내부의 온도를 28~32°C를 유지하며 약 4주간 재배하여 취하였다.

양액의 제조에는 모두 1급 이상의 시약을 사용하였고, 완충액용 sucrose는 Fluka Biochemical사 (Switzerland)의 제품을 사용하였으며, ⁴⁵CaCl₂는 NEN Life Science사 (Boston, USA)로부터 구입하였고, gramicidin, CCCP, nigericin과 thapsigargin 등을 포함한 모든 시약들은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, USA)에서 구입하였다.

토마토 뿌리조직에서의 마이크로솜 분리

토마토 뿌리조직으로부터 마이크로솜 분리는 Cho 등¹⁶⁾의 방법에 따라 초고속 원심분리법으로 이루어졌다. 마이크로솜 분획은 액체질소로 순간냉동시켜 deep freezer에서 -70°C로 보관하였으며, 3개월 이내에 사용하였다. 모든 과정은 4°C에서 수행하였으며, 마이크로솜 분획의 단백질 농도는 Lowry방법¹⁷⁾으로 결정하였다.

마이크로솜의 ⁴⁵Ca²⁺ 흡수 측정

마이크로솜에 의한 ⁴⁵Ca²⁺ 흡수 측정은 방사성 동위원소 ⁴⁵Ca²⁺를 이용한 Kim 등¹⁸⁾의 여과 방법으로 수행되었다. ⁴⁵Ca²⁺ 흡수는 1.83 μM ⁴⁵CaCl₂, 50 μM CaCl₂, 120 mM KCl, 30 mM HEPES (pH 7.4), 10 mM KCN, 1 mM MgCl₂가 함유된 흡수 반응용액(총 부피 500 μl)에 약 35~45 μg의 단백질이 함유된 마이크로솜을 넣은 후 측정하였으며, 이때 1 mM ATP의 첨가로 반응을 시작하였다. 마이크로솜은 Whatman 여과지(GF/B)를 이용하여 세척하였으며, 세척용액에는 10 mM CaCl₂를 첨가하여 세척시에 마이크로솜에서 ⁴⁵Ca²⁺의 유출을 방지하였다. 세척된 마이크로솜을 함유한 여과지를 ⁴⁵Ca²⁺ 측정용 용기로 옮겨 Aquasol 5 ml와 혼합한 후, Liquid Scintillation Counter를 이용하여 마이크로솜내의 흡수된 잔존 ⁴⁵Ca²⁺의 양을 측정하였다.

결 과

마이크로솜에 의한 ⁴⁵Ca²⁺ 흡수 특성과 저해제의 효과

토마토의 뿌리조직에서 Ca²⁺ 수송 특성을 조사하기 위하여 원형질막, 액포막, ER 등에서 유래된 마이크로솜을 분리하였으며, 마이크로솜 분획을 이용하여 ⁴⁵Ca²⁺ 흡수를 측정하였다. 대조실험에서 마이크로솜에 의한 ⁴⁵Ca²⁺ 흡수는 반응 시간의 경과에 따라 점차 증가하였으며, 반응시작 7분 후에 거의 최대 수준에 도달하였다(Fig. 1A). 반응용액에 ATP를 첨가하지 않은 상태에서 단순 확산에 의해 일어나

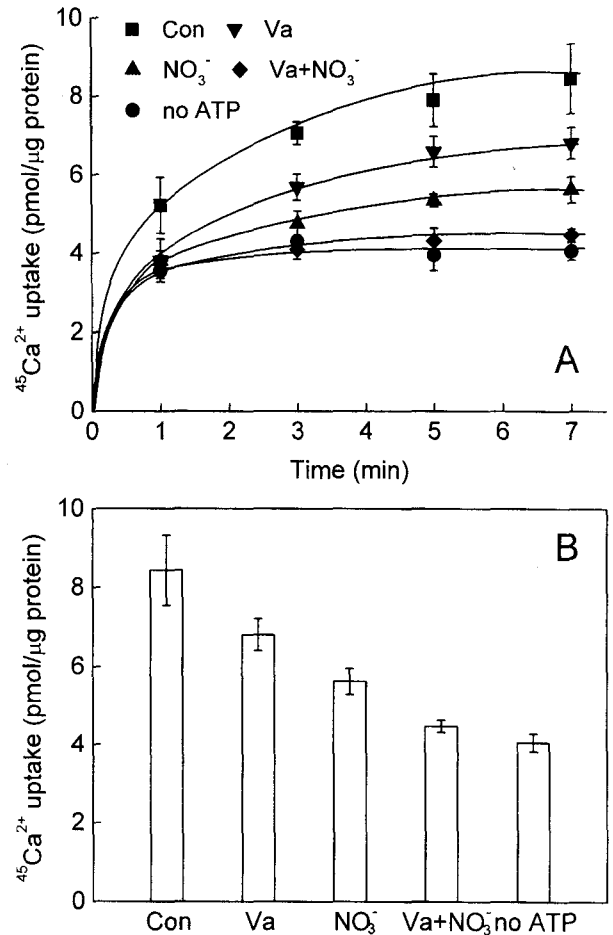


Fig. 1. Microsomal ⁴⁵Ca²⁺ uptakes in the presence of various inhibitors. (A) Time course of microsomal ⁴⁵Ca²⁺ uptake. The microsomal ⁴⁵Ca²⁺ uptakes were measured in the presence of 1 mM vanadate (Va), 50 mM nitrate (NO₃⁻), or both inhibitors (Va+NO₃⁻) after the incubations of 1, 3, 5, and 7 min. Passive ⁴⁵Ca²⁺ uptakes were obtained in the absence of ATP (no ATP). (B) Specific microsomal ⁴⁵Ca²⁺ uptakes were calculated from the data shown in Fig. 1A after 7 min of incubation. Values are means ± SD (n=5~7).

는 ⁴⁵Ca²⁺ 흡수는 시간에 따른 변화가 크지 않았으며, 대조실험에서의 최대치에 비하여 약 50%의 수준을 보였다(Fig. 1A, no ATP).

마이크로솜에 의한 ⁴⁵Ca²⁺ 흡수의 특성을 조사하기 위하여 Ca²⁺-ATPase를 포함한 P-type ATPase의 선택적 저해제인 vanadate^{12,13)}와 액포막 H⁺-ATPase의 선택적 저해제인 NO₃⁻¹⁹⁾를 처리하였을 때, 각각의 ⁴⁵Ca²⁺ 흡수는 대조실험에 비하여 20%와 33%가 저해되었고, 두 가지 저해제를 동시에 첨가하였을 때는 47%의 저해효과를 보여, 이들 두 가지 저해제들에 의한 저해 효과가 부가적으로 나타남을 확인하였다(Fig. 1B). Vanadate에 의한 ⁴⁵Ca²⁺ 흡수 저해효과는 토마토 뿌리조직으로부터 얻어진 마이크로솜에 P-type의 Ca²⁺-ATPase가 존재할 가능성을 보여준다. 또한, NO₃⁻에 의한 저해효과는 NO₃⁻가 토마토에서 액포막에 존재하는 H⁺-ATPase를 선택적으로 저해하는 것을 고려할 때, 액포막의 H⁺-ATPase와 기능적으로 연결된 Ca²⁺/H⁺ antiporter가 존재할 가능성을 시

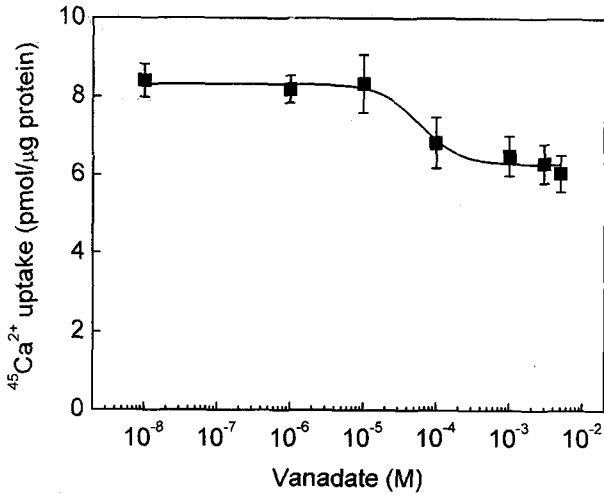


Fig. 2. Dose-dependent effect of vanadate on the microsomal ⁴⁵Ca²⁺ uptake. Microsomal ⁴⁵Ca²⁺ uptake was measured in the presence of various concentration of vanadate and passive ⁴⁵Ca²⁺ uptake was not subtracted. The data were fitted to a sigmoidal function, represented by the solid line. Values are means±SD (n=5).

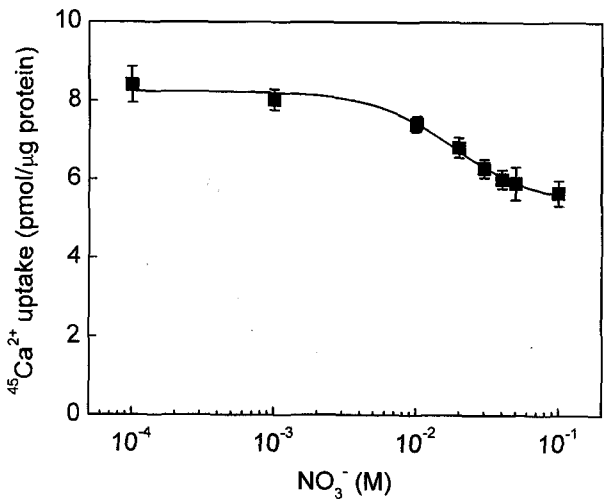


Fig. 3. Dose-dependent effect of NO₃⁻ on the microsomal ⁴⁵Ca²⁺ uptake. Microsomal ⁴⁵Ca²⁺ uptake was measured in the presence of various concentration of NO₃⁻. The data were fitted to a sigmoidal function. Values are means±SD (n=5).

사한다.

따라서, 각 저해제들을 이용하여 마이크로솜 ⁴⁵Ca²⁺ 흡수 특성을 조사하였다. 먼저, 저해제의 농도에 따른 마이크로솜 ⁴⁵Ca²⁺ 흡수를 측정하였을 때, vanadate에 의한 ⁴⁵Ca²⁺ 흡수의 저해효과는 0.01~1 mM 농도구간에서 나타났으며, 1 mM 이상의 농도에서 저해되는 정도는 약 20%로 나타났고, 단순확산에 의한 ⁴⁵Ca²⁺ 흡수를 고려하면 능동수송된 양의 약 42%를 저해하였음을 알 수 있었다(Fig. 2). NO₃⁻에 의한 ⁴⁵Ca²⁺ 흡수의 저해효과도 vanadate의 경우와 유사하게 관측되었으나, 저해효과는 10 mM 이상의 농도에서 나타났으며, 50 mM 이상에서 최대 30%까지 감소함을 확인하였다 (Fig. 3).

Protonophore에 의한 NO₃⁻-민감성 ⁴⁵Ca²⁺ 흡수의 저해

Vanadate와 NO₃⁻의 처리에 따른 마이크로솜 ⁴⁵Ca²⁺ 흡수 저해가 Ca²⁺-ATPase의 활성저해에 의한 것인지, 또는 이들에 의한 H⁺-ATPase의 활성저해가 간접적으로 Ca²⁺/H⁺ antiporter의 활성감소를 유발하는 것인지 여부를 확인하기 위하여, vanadate와 NO₃⁻를 각각 처리하면서 protonophore인 gramicidin의 효과를 조사하였다. 대조실험과 비교하여 10 μM gramicidin의 처리시 마이크로솜에 의한 ⁴⁵Ca²⁺ 흡수는 약 30%가 감소하였다(Fig. 4, Con). 동일한 조건에서 vanadate와 NO₃⁻를 각각 처리하였을 때, ⁴⁵Ca²⁺ 흡수는 대조실험치에 비하여 각각 20%와 33%가 저해되었으며, 여기에 이들 두 가지 저해제와 gramicidin을 동시에 처리하였을 때, gramicidin에 의한 추가저해는 각각 대조실험치의 27%와 6%로 나타났다. 그러나, 이들 두 가지 저해제를 동시에 처리하거나, ATP를 첨가하지 않은 조건에서는 gramicidin에 의한 추가 저해는 관측되지 않았다(Fig. 4).

이러한 결과는 vanadate의 처리시 vanadate에 의한 마이크로솜 ⁴⁵Ca²⁺ 흡수의 감소 후에도 gramicidin에 의한 추가저해가 대조실험과 같은 정도로 일어났음을 보여준다. 그러나, NO₃⁻를 이용하여 ⁴⁵Ca²⁺ 흡수를 저해한 후, gramicidin을 첨가하였을 때는 gramicidin에 의한 추가저해가 거의 나타나지 않았다. 마찬가지로 gramicidin과 기능상 유사한 nigericin, CCCP와 같은 protonophore에 의해서도 마이크로솜 ⁴⁵Ca²⁺ 흡수는 약 30% 가량 저해되어 protonophore들간의 ⁴⁵Ca²⁺ 흡수 저해효과는 비슷한 수준으로 나타났고, 이들 각 protonophore의 처리후에도 vanadate에 의한 추가적인 ⁴⁵Ca²⁺ 흡수의 저해효과가 부가적으로 관측되었다(data not shown).

Gramicidin등의 protonophore는 막을 통한 H⁺ 확산을 유발하여 Ca²⁺/H⁺ antiporter에 의한 능동적 Ca²⁺ 흡수를 저해한다.³⁹⁾ 따라서, gramicidin의 처리에 의한 Ca²⁺/H⁺ antiporter의 활성저해 후에도 나타나는 vanadate의 추가적인 ⁴⁵Ca²⁺

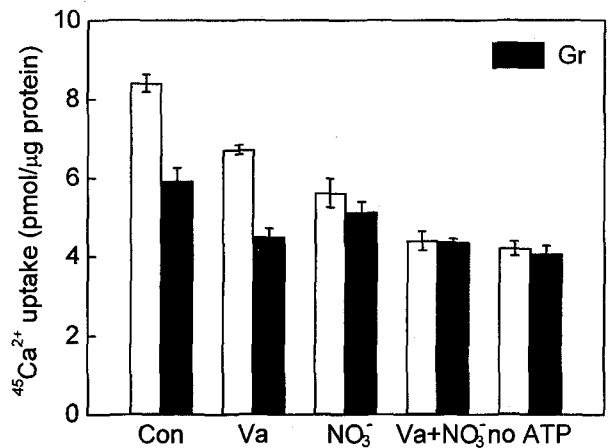


Fig. 4. Effect of gramicidin on the microsomal ⁴⁵Ca²⁺ uptake. Microsomal ⁴⁵Ca²⁺ uptakes were measured in the absence (□) or in the presence (■) of 10 μM gramicidin (Gr) under the presence of vanadate (Va), nitrate (NO₃⁻), and both (Va+NO₃⁻). The concentrations of vanadate and nitrate were 1 mM and 50 mM, respectively. Values are means±SD (n=5~7).

흡수 감소효과는 vanadate가 Ca²⁺/H⁺ antiporter와는 무관하게 Ca²⁺-ATPase를 저해함을 의미한다. 이러한 결과는 Fig. 4에서 Ca²⁺/H⁺ antiporter를 공동으로 저해하는 NO₃⁻와 gramicidin의 동시 처리시 ⁴⁵Ca²⁺ 흡수 감소효과가 Ca²⁺-ATPase와 Ca²⁺/H⁺ antiporter를 각각 저해하는 vanadate와 gramicidin의 동시처리 경우에 비하여 적게 나타남으로도 설명되어진다. 한편, NO₃⁻에 의한 ⁴⁵Ca²⁺ 흡수 저해는 gramicidin을 처리한 후 현저히 감소하여, NO₃⁻가 액포막 H⁺-ATPase를 저해하여 간접적으로 Ca²⁺/H⁺ antiporter에 의한 ⁴⁵Ca²⁺ 흡수를 저해하였음을 의미하는 것이며, 이것은 액포막에 Ca²⁺/H⁺ antiporter가 존재함을 보여준다.

Thapsigargin에 의한 NO₃⁻-민감성 ⁴⁵Ca²⁺ 흡수 저해

Thapsigargin은 동물조직 ER/SR-type Ca²⁺-ATPase의 선

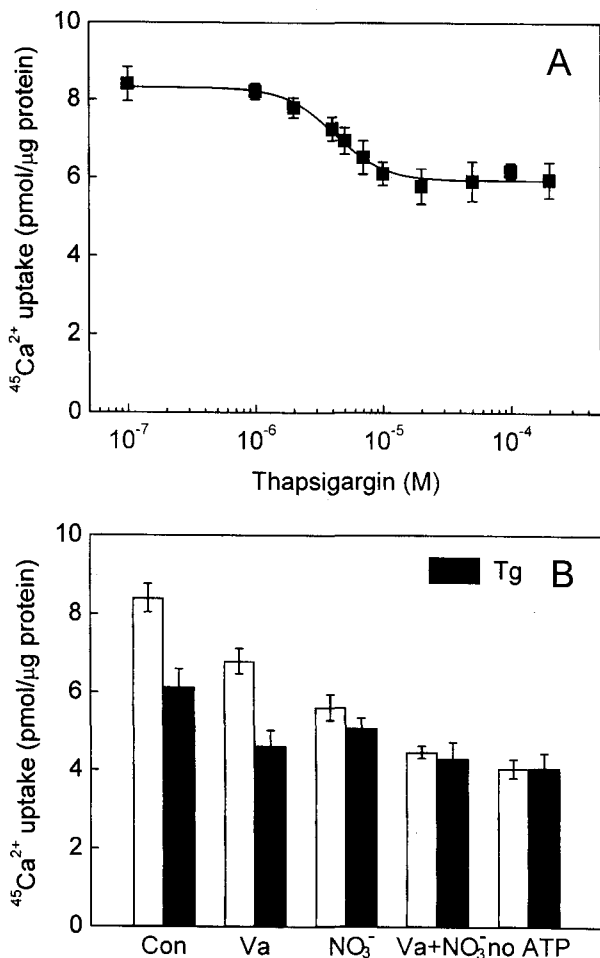


Fig. 5. Thapsigargin-induced inhibition of microsomal ⁴⁵Ca²⁺ uptake. (A) Dose-dependent effect of thapsigargin on the microsomal ⁴⁵Ca²⁺ uptake. Microsomal ⁴⁵Ca²⁺ uptake was measured in the presence of indicated concentration of thapsigargin. The data were fitted to a sigmoidal function, represented by the solid line. (B) The effect of thapsigargin in the presence of various inhibitors. Microsomal ⁴⁵Ca²⁺ uptakes were measured in the absence (□) or in the presence (■) of 10 μM thapsigargin (Tg) under the presence of vanadate (Va), nitrate (NO₃⁻), and both (Va+NO₃⁻). The concentrations of vanadate and nitrate were 1 mM and 50 mM, respectively.

택적 저해제²⁰로 알려져 있으나, 식물세포에서는 현재까지 thapsigargin의 작용 특성이 명확히 밝혀져 있지 않다. 본 연구에서는 토마토의 뿌리조직에서 분리된 마이크로솜의 Ca²⁺ 흡수에 대한 thapsigargin의 효과를 조사하였다. 반응용액에 thapsigargin의 처리농도를 증가시킬 때, 마이크로솜 ⁴⁵Ca²⁺ 흡수는 1~10 μM 범위에서 농도 의존적으로 감소하였다 (Fig. 5A). Thapsigargin은 10 μM 이상의 농도에서 최대 저해효과를 보였으며, ⁴⁵Ca²⁺ 흡수의 25~30%를 저해하였다. 이것은 thapsigargin이 토마토 뿌리조직으로부터 얻어진 마이크로솜에 의한 ⁴⁵Ca²⁺ 흡수를 효과적으로 저해함을 의미하며, 위에 제시한 원형질막의 Ca²⁺-ATPase, 혹은 액포막의 Ca²⁺/H⁺ antiporter에 의한 ⁴⁵Ca²⁺ 흡수를 저해할 가능성을 시사한다. 따라서, ⁴⁵Ca²⁺ 흡수에 미치는 thapsigargin의 저해효과를 vanadate와 NO₃⁻ 등의 저해효과와 비교하였다 (Fig. 5B). 대조실험에서 thapsigargin은 마이크로솜 ⁴⁵Ca²⁺ 흡수를 약 30% 저해하였으며, vanadate에 의한 ⁴⁵Ca²⁺ 흡수의 감소 후에도 thapsigargin에 의한 추가저해가 대조실험과 같게 관측되었다. 그러나, NO₃⁻에 의한 ⁴⁵Ca²⁺ 흡수의 저해 후에는 thapsigargin에 의한 추가저해는 나타나지 않았다(Fig. 5B, NO₃⁻).

이것은 thapsigargin에 의한 ⁴⁵Ca²⁺ 흡수 저해효과가 vanadate에 의하여 저해되는 Ca²⁺-ATPase와는 무관하며, NO₃⁻에 민감한 것으로 확인된 Ca²⁺/H⁺ antiporter에 의한 ⁴⁵Ca²⁺ 흡수와 연관이 있음을 의미한다. Fig. 6에서는 NO₃⁻와 gramicidin을 각각 처리하면서 thapsigargin의 추가적인 저해여부를 관측함으로써 이러한 연관성을 확인하였다. Gramicidin을 처리한 후 thapsigargin을 첨가하였을 때, thapsigargin에 의한 추가적인 ⁴⁵Ca²⁺ 흡수 저해는 나타나지 않았다. 또한, NO₃⁻의 단독처리나 gramicidin과 NO₃⁻의 동시처리 이후에도 thapsigargin에 의한 유의성있는 ⁴⁵Ca²⁺ 흡수 저해는 나타나

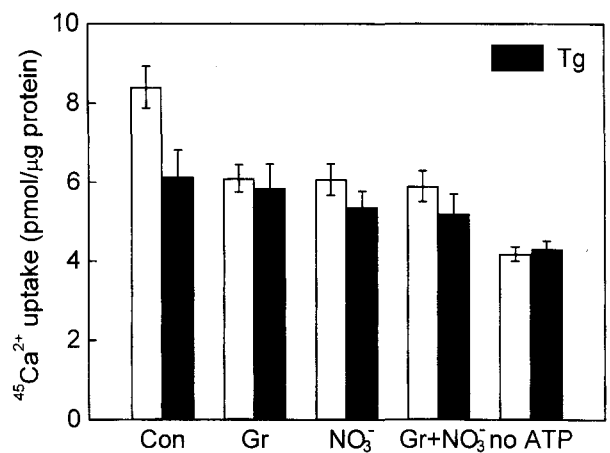


Fig. 6. Inhibitory effects of nitrate and gramicidin on the thapsigargin-sensitive ⁴⁵Ca²⁺ uptakes. Microsomal ⁴⁵Ca²⁺ uptakes were measured in the absence (□) or in the presence (■) of 10 μM thapsigargin (Tg) under the presence of gramicidin (Gr), nitrate (NO₃⁻), and both (Gr+NO₃⁻). The concentrations of vanadate, nitrate, and thapsigargin were 1 mM, 50 mM, and 10 μM respectively. Values are means ± SD (n=5~7).

지 않았다. 이것은 thapsigargin이 NO_3^- 에 의하여 저해되는 액포막 H^+ -ATPase 활성을 저해함으로써 간접적으로 $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ antiporter에 의한 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 흡수를 저해함을 의미한다.

고 찰

세포질내 Ca^{2+} 은 세포의 활성을 좌우하는 2차 신호전달자의 하나로서 최근 식물조직에서도 Ca^{2+} 의 생리, 생화학적 역할이 다양하게 밝혀지고 있다.¹³⁾ 본 연구에서는 식물세포의 세포질 Ca^{2+} 이동과 관련된 Ca^{2+} 수송 특성을 조사하기 위하여, 토마토 뿌리조직으로부터 마이크로솜을 분리하고, $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 흡수 실험을 수행하였다. 마이크로솜 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 흡수는 시간이 경과함에 따라 증가하였으며, 반응시작 7분 이후에 거의 최대 수준에 도달하였다(Fig. 1A). 마이크로솜에 의한 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 흡수 실험에서 시간에 따른 포화현상과 Ca^{2+} -ionophore A 23187을 처리하였을 때, 축적된 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 의 자발적인 방출을 관측하였다. 이러한 결과는 본 연구에서 사용된 마이크로솜의 대부분이 밀봉된 상태로 존재함을 보여준다. 한편, ATP를 가하지 않은 상태에서 얻어진 단순확산에 의한 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 흡수의 특성은 밝혀지지 않았지만, 마이크로솜 내부 및 외부의 Ca^{2+} 농도 차이로 인하여 Ca^{2+} 채널단백질 또는 특성이 밝혀지지 않은 경로를 통한 leakage 현상을 통해 Ca^{2+} 이 마이크로솜 내부로 확산됨에 기인하는 것으로 예상된다.

마이크로솜에 의한 능동적인 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 흡수의 특성을 밝히기 위해서 Ca^{2+} -ATPase의 선택적 저해제인 vanadate와 액포막 H^+ -ATPase의 선택적 저해제인 NO_3^- 를 첨가하였을 때, 두 저해제에 의한 저해 효과는 부가적으로 나타났으며, 저해 정도는 양적으로 ATP의 분해로 얻어지는 능동적인 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 흡수의 양과 같았다(Fig. 1B). 이것은 이들 두 저해제가 각각 서로 다른 Ca^{2+} 수송 현상을 저해함을 의미한다.

저자들은 토마토 뿌리조직에서 분리된 마이크로솜에 원형질막과 액포막의 H^+ -ATPase 활성이 모두 존재하며, vanadate는 원형질막으로부터 유래된 마이크로솜 중 inside-out 형태로 존재하는 마이크로솜에 위치한 H^+ -ATPase 활성을 효과적으로 저해함을 보고하였다.¹⁶⁾ 따라서, vanadate에 의한 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 흡수의 저해효과가 원형질막 성분에서 나타난다면 저해기작은 다음의 두 가지 가능성으로 설명할 수 있다. 즉, 원형질막에 $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ antiporter가 존재한다면, vanadate는 원형질막 H^+ -ATPase 활성저해를 통하여 막을 경계로한 H^+ 의 농도기울기 형성을 저해함으로써 간접적으로 원형질막 $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ antiport 활성 감소를 유발할 것이며, 다른 하나는 vanadate가 직접적으로 원형질막에 위치한 Ca^{2+} -ATPase 활성을 저해할 수 있을 것이다. 이러한 두 가지 가능성 가운데 어느것이 맞는가는 protonophore를 처리하여 막을 경계로 H^+ 의 농도기울기 형성을 억제하고, $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 흡수의 정도를 측정함으로써 확인하였다. Fig. 4는 vanadate에 의한 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 흡수의 저해효과가 gramicidin의 처리 후에도 유의성있게 나타남을 보여주며, nigericin과 CCCP의 경우에도 유사한 결과를 확인하였다. 이것은 vanadate의 저해효과가 원형질막 H^+ -ATPase 활성저해에 따른 간접적인 원형질막 $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$

antiporter의 활성감소 보다는 원형질막에 존재하는 Ca^{2+} -ATPase를 직접적으로 저해함을 의미한다. 그러나, vanadate는 ER에 존재하는 Ca^{2+} -ATPase를 역시 저해할 수 있어, vanadate에 의해 저해되는 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 흡수의 세포내 위치 확인은 추가적인 연구가 필요하다.

한편, 토마토 뿌리조직 마이크로솜 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 흡수는 반응용액에 NO_3^- 의 농도를 증가시킴에 따라 저해되었고, 50 mM 이상의 농도에서 저해효과가 최대로 나타나 마이크로솜에 의한 최대 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 흡수의 약 30%를 감소시켰다(Fig. 3). NO_3^- 에 의한 마이크로솜의 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 흡수 저해 기작은 protonophore인 gramicidin을 처리하여 확인하였다. 마이크로솜에 gramicidin을 처리하였을 때, $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 흡수는 약 30% 감소하였으며, gramicidin의 저해효과는 NO_3^- 를 동시에 처리하였을 때, 거의 대부분이 억제되었다(Fig. 4). 이러한 결과는 NO_3^- 와 gramicidin이 서로 같은 Ca^{2+} 수송을 저해함을 의미하며, vanadate의 경우와는 다르게 NO_3^- 는 액포막에 위치한 H^+ -ATPase를 저해하여 간접적으로 $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ antiporter에 의한 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 흡수를 저해하고 있음을 알 수 있다. 이와 같은 사실은 귀리에서 NO_3^- 가 액포막 H^+ -ATPase의 선택적 저해제로 작용하여 역시 액포막에 위치한 $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ antiporter의 활성을 간접적으로 저해한다는 보고로도 지지된다.⁸⁾

Thapsigargin은 동물조직에서 SERCA(sarcoplasmic or endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase)에 속하는 효소들을 특이적으로 저해함이 알려져 있으며,²⁰⁾ 저해효과는 여러 가지 SERCA 저해제들 가운데 가장 우세함이 알려져 있다.^{21,22)} 현재까지 식물 조직에서의 thapsigargin의 명확한 작용특성은 밝혀지지 않았으나, 저자들은 thapsigargin이 토마토 뿌리조직의 액포막에 위치한 NO_3^- -민감성 H^+ -ATPase를 선택적으로 저해함을 관찰한 바 있다(manuscript in preparation). 본 연구에서는 토마토의 뿌리조직에서 Ca^{2+} 이동을 유발하는 Ca^{2+} 수송에 대한 특성을 밝히기 위하여 thapsigargin의 효과를 조사하였다. Thapsigargin은 10 μM 농도에서 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 흡수를 최대로 저해하였으며, $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 흡수 저해효과는 25~30%로 얻어졌다(Fig. 5A). 이러한 결과는 thapsigargin이 토마토 뿌리조직에서 직접 혹은 간접적으로 Ca^{2+} -ATPase 및 $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ antiporter에 의한 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 흡수를 저해할 수 있음을 보여준다.

Thapsigargin의 작용특성을 밝히기 위한 실험에서 NO_3^- 의 처리로 $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ antiporter에 의한 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 흡수가 저해된 후, thapsigargin에 의한 저해효과는 현저히 감소됨을 확인하였다(Fig. 5B). 또한, gramicidin의 처리 후에도 thapsigargin에 의한 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 흡수의 저해효과는 억제되었다(Fig. 6). 이것은 thapsigargin이 NO_3^- 에 의하여 저해되는 액포막 H^+ -ATPase 활성을 저해함으로써 간접적으로 $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ antiporter에 의한 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 흡수를 저해함을 의미한다. 한편, $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 흡수에서 vanadate와 thapsigargin의 저해 효과는 서로 무관하게 나타나고 있어, thapsigargin의 효과는 vanadate에 의하여 저해되는 Ca^{2+} -ATPase와는 무관한 것을 확인하였다(Fig. 5B).

본 연구는 토마토 뿌리조직으로부터 얻어진 마이크로솜을 이용하여 식물세포에서 Ca^{2+} 수송의 특성을 밝히기 위하여 수행되었으며, 토마토의 마이크로솜에 의한 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 흡수

활성은 최소한 두 가지 효소에 의하여 나타남을 확인하였다. 먼저, 액포에서는 NO₃⁻ 혹은 thapsigargin에 의해서 저해되는 H⁺-ATPase의 활성화에 의해 H⁺ 농도 기울기가 형성되고, Ca²⁺/H⁺ antiporter는 형성된 H⁺ 농도기울기를 이용하여 Ca²⁺을 이동시킴을 알 수 있었다. 한편, vanadate에 민감한 ⁴⁵Ca²⁺ 흡수는 Ca²⁺-ATPase의 활성화에 의해 이루어짐을 확인하였으며, 현재 세포내에서 vanadate-민감성 ⁴⁵Ca²⁺ 수송이 일어나는 생체막의 동정을 위한 연구가 진행 중에 있다.

감사의 글

본 논문은 한국과학재단지정 충북대학교 첨단원예기술개발연구센터의 지원(과제번호 96-15-09-99-A-3)에 의한 것입니다.

참고문헌

1. Hepler, P. K. and Wayne, R. O. (1985) Calcium and plant development. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **36**, 397-439.
2. Bush, D. S. (1993) Regulation of cytosolic calcium in plants. *Plant Physiol.* **103**, 7-13.
3. Bush, D. S. (1995) Calcium regulation in plant cells and its role in signaling. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **46**, 95-122.
4. Hwang, I., Ratterman, D. M. and Sze, H. (1997) Distinction between endoplasmic reticulum-type and plasma membrane-type Ca²⁺ pumps. *Plant Physiol.* **113**, 535-548.
5. Olbe, M. and Sommarin, M. (1998) The spinach plasma membrane Ca²⁺ pump is a 120-kDa polypeptide regulated by calmodulin-binding to a terminal region. *Physiol. Plant.* **103**, 35-44.
6. Joyce, D. C., Cramer, G. R., Reid, M. S. and Bennett, A. B. (1988) Transport properties of the tomato fruit tonoplast; III. temperature dependence of calcium transport. *Plant Physiol.* **88**, 1097-1103.
7. Blumwald, E. and Poole, R. J. (1986) Kinetics of Ca²⁺/H⁺ antiport in isolated tonoplast vesicles from storage tissue of *Beta vulgaris* L. *Plant Physiol.* **80**, 727-731.
8. Schumaker, K. S. and Sze, H. (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.
9. Gelli, A. and Blumwald, E. (1997) Hyperpolarization-activated Ca²⁺ permeable channels in the plasma membrane of tomato cells. *J. Membr. Biol.* **155**, 35-45.
10. Volotovski, I. D., Sokolovsky, S. G., Molchan, O. V. and Knight, M. R. (1998) Second messengers mediate increases in cytosolic calcium in tobacco protoplasts. *Plant Physiol.* **117**, 1023-1030.
11. Allen, G. J., Muir, S. R. and Sanders, D. (1995) Release of Ca²⁺ from individual plant vacuoles by both InsP₃ and cyclic ADP-ribose. *Science* **268**, 735-737.
12. Gräf, P. and Weiler, E. (1989) ATP-driven Ca²⁺ transport in sealed plasma membrane vesicles prepared by aqueous two-phase partitioning from leaves of *Commelina communis*. *Physiol. Plant.* **75**, 469-478.
13. Giannini, J. L., Gildensoph, L. H., Reynold-Niesman, I. and Briskin, D. P. (1987) Calcium transport in sealed vesicles from red beet (*Beta vulgaris* L.) storage tissue; I. characterization of Ca²⁺-pumping ATPase associated with the endoplasmic reticulum. *Plant Physiol.* **85**, 1129-1136.
14. Giannini, J. L., Ruiz-Cristin, J. R. and Briskin, D. P. (1987) Calcium transport in sealed vesicles from red beet (*Beta vulgaris* L.) storage tissue; II. characterization of ⁴⁵Ca²⁺ uptake into plasma membrane vesicles. *Plant Physiol.* **85**, 1137-1142.
15. Wimmers, L. E., Ewing, N. N. and Bennett, A. B. (1992) Higher plant Ca²⁺-ATPase: primary structure and regulation of mRNA abundance by salt. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 9205-9209.
16. Cho, K. H., Sakong, J. and Kim, Y. K. (1998) Characterization of microsomal ATPases prepared from tomato roots. *Agric. Chem. Biotechnol.* **41**, 130-136.
17. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
18. Kim, Y. K., Sakong, J., Cho, K. H. and Lee, C. O. (1998) Vanadate-sensitive microsomal ATPases and microsomal ⁴⁵Ca²⁺ uptakes in tracheal epithelial cells. *J. Biochem.* **124**, 1094-1100.
19. Bennett, A. B., O'Neill, S. D. and Spanswick, R. M. (1984) H⁺-ATPase activity from storage tissue of *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.* **74**, 538-544.
20. Lytton, J. L., Westlin, M. and Hanley, M. R. (1991) Thapsigargin inhibits the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum Ca-ATPase family of calcium pumps. *J. Biol. Chem.* **266**, 17067-17071.
21. Inesi, G. and Sagara, Y. (1994) Specific inhibitors of intracellular Ca²⁺ transport ATPases. *J. Membr. Biol.* **141**, 1-6.
22. Caspersen, C. and Treiman, M. (1995) Thapsigargin discriminates strongly between Ca²⁺-ATPase phosphorylated intermediates with different subcellular distributions in bovine adrenal chromaffin cells. *FEBS Lett.* **377**, 31-36.

Characterization of Microsomal Ca^{2+} Uptake in Tomato Root Tissues

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

Abstract : In order to characterize the property of Ca^{2+} transport in plant cell, microsomes were prepared from the roots of tomato and microsomal $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake was measured. When 1 mM vanadate, a selective inhibitor of P-type ATPases, 50 mM NO_3^- , a specific inhibitor of vacuolar H^+ -ATPase, and both of these inhibitors were treated, the microsomal $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptakes were inhibited by 20, 33 and 47%, respectively. The inhibitory effects of these two inhibitors were investigated by using a protonophore, gramicidin. When the chemical gradient of H^+ was relieved by gramicidin, the uptake was decreased by 30%, implying the presence of $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ antiporter in the microsomal membrane. In the $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake experiment, the effect of gramicidin was independent of vanadate-induced inhibition. However, when the activity of vacuolar H^+ -ATPase was inhibited by NO_3^- , the effect of gramicidin was severely decreased. Meanwhile, thapsigargin, a specific antagonist of ER/SR-type Ca^{2+} -ATPase, inhibited the microsomal $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake and the maximum inhibitory effect was obtained at 10 μM . The effect of thapsigargin was blocked by NO_3^- and gramicidin, but not by vanadate. These results imply that vanadate directly inhibits the activity of Ca^{2+} -ATPase; however, NO_3^- and thapsigargin block the activity of $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ antiporter by inhibiting the vacuolar H^+ -ATPase. In conclusion, the microsomal $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptakes are mediated by two major enzymes, Ca^{2+} -ATPase and $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ antiporter in tomato root tissue.

Key words : Ca^{2+} uptake, Ca^{2+} -ATPase, $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ antiporter, nitrate, thapsigargin, tomato roots, vanadate

*Corresponding author