

La³⁺에 의한 토마토 뿌리조직 마이크로솜 H⁺-ATPase 활성저해

조광현 · 김영기*

충북대학교 농과대학 농화학과

(2003년 4월 3일 접수, 2003년 4월 16일 수리)

H⁺-ATPase의 활성을 조절할 수 있는 물질을 찾기 위하여 토마토 뿌리조직으로부터 마이크로솜을 분리하고, La³⁺의 효과를 조사하였다. 원형질막 및 액포막에 위치하는 H⁺-ATPase의 활성은 각각의 선택적 저해제인 vanadate와 NO₃⁻를 처리하여 저해되는 활성으로 평가하였다. La³⁺은 농도 의존적으로 H⁺-ATPase의 활성을 저해하였으며, La³⁺의 활성저해 효과는 vanadate와 NO₃⁻의 처리시 감소하여, La³⁺이 원형질막 및 액포막 H⁺-ATPase 활성을 모두 저해함을 확인하였다. 원형질막과 액포막 H⁺-ATPase 활성을 50% 저해하는 La³⁺ 농도인 Ki 값은 각각 57, 78 μM이었다. La³⁺에 의한 저해효과는 Triton X-100을 처리한 leaky 마이크로솜에서도 얻어져, La³⁺이 이온채널의 존재와 관계없이 H⁺-ATPase의 활성을 직접적으로 저해함을 확인하였다. 한편, La³⁺의 활성저해 효과는 ATP 농도 증가로 감소하였고, ATP의 효과는 농도 의존적으로 나타났으며, 7 mM ATP에 의해 La³⁺에 의한 H⁺-ATPase 활성 저해가 완전히 억제되었다. 이러한 결과로부터 La³⁺은 원형질막과 액포막의 H⁺-ATPase들에 결합하여 ATP 결합친화력을 감소시킴으로써 활성을 저해하며, 뿌리조직 H⁺-ATPase의 활성조절제로 이용이 가능함을 확인하였다.

Key words: lanthanum, H⁺-ATPase, 토마토뿌리

서 론

식물세포에서 양분의 흡수, 이온이동, 세포질의 삼투압 조절, 막전위 유지 등 필수적인 기능들은 생체막에서 이루어지며, 생체막에 위치하는 다양한 종류의 운반체 효소들에 의한다.^{1,3)} 생체막에는 능동수송을 촉매하는 여러 종류의 ATPase와 촉진확산에 의해 물질이동을 매개하는 transporter 및 이온채널 단백질들이 있으며, 세포는 이들의 상호 연관된 조절을 통하여 생리활성을 적정상태가 되도록 유지한다. 특히, 식물에서 원형질막 및 액포막에 존재하는 H⁺-ATPase들은 생체막을 경계로 수소이온 농도구배를 형성하며, 이것은 각종 양이온이나 음이온 및 당, 유기산, 아미노산 등 다양한 용질들의 2차 능동수송에 필요한 에너지원으로 이용된다.^{4,5)} 식물체에서 이들 두 효소는 세포의 생리활성 유지에 중심적인 역할을 수행함이 잘 알려져 있다.⁶⁾

La³⁺은 lanthanide 계열의 원소로서 La³⁺과 Ca²⁺간의 유사성에 의하여 효소의 Ca²⁺ 결합부위를 조사할 수 있는 탐침자로 사용되어 왔으나,⁷⁾ La³⁺의 결합이 효소의 Ca²⁺ 결합부위에만 국한되는 것이 아니라, Mg²⁺ 또는 다른 양이온의 결합부위에도 비특이적으로 결합할 수 있음이 보고되었다.⁸⁾ 이러한 이유로 La³⁺은 3차 구조를 밝히기 어려운 막단백질의 구조적, 기능적 특성을 밝히는데 좋은 도구로 사용되어왔다. 특히, 동물세포의 근소포체에 위치하는 Ca²⁺-ATPase의 경우에 La³⁺은 효소반응의 보조인자인 Mg²⁺과 경쟁함으로써 효소의 활성을 저해한다고 알려져 있다.⁹⁾ 또한, La³⁺은 Ca²⁺-ATPase의 Ca²⁺ 결합부위에 결합

하거나, Ca²⁺과 무관한 또 다른 부위에 결합하여 효소활성을 저해한다는 보고도 있다.¹⁰⁾ 식물세포에서도 La³⁺은 Ca²⁺-ATPase의 저해제로 보고되었으나,¹¹⁾ La³⁺의 ATPase 활성저해 기작은 동물세포의 경우에서와 같이 자세히 알려지지 않았을 뿐만 아니라, 식물세포 생체막의 주된 ATPase인 원형질막 및 액포막 H⁺-ATPase에 대한 La³⁺의 효과는 거의 밝혀지지 않았다. 한편, La³⁺은 ATPase 활성 저해제로 알려져 있을 뿐만 아니라, 동물세포에서 Ca²⁺ 채널 활성을 특이적으로 저해하고,^{12,13)} 식물세포에서는 Ca²⁺ 채널¹⁴⁾과 비선택적 양이온 채널¹⁵⁾을 모두 저해함이 알려져 있다. 최근 식물세포에서 세포의 생리현상을 좌우하는 여러 이온 운반체에 대한 많은 연구가 진행되고 있음에도 불구하고, La³⁺에 의한 ATPase 활성조절 또는 이온채널 활성화 등의 특성조사는 매우 부족한 실정이다.

본 연구실에서는 시설재배지 토양에서 빈발하는 작물의 염류장애 현상에 대한 생리학적 기작을 밝혀내기 위하여 토마토 뿌리조직에서 원형질막 및 액포막 H⁺-ATPase들의 다양한 특성을 조사하여왔다. 그럼에도 불구하고, 생육장애 조건에서 이들 두 효소의 생리적 역할을 구명하기 위해서는, 이들의 활성을 조절할 수 있는 인위적인 촉진제나 저해제가 필수적으로 요구된다. 따라서, 본 연구에서는 동물조직에서 ATPase의 활성 저해제로 알려진 La³⁺의 효과를 조사하였고, La³⁺이 토마토 뿌리조직의 H⁺-ATPase 활성을 직접적으로 저해함을 확인하였다. 이것은 La³⁺이 작물의 염류장애에 따른 염류이동의 변화 특성을 구명하는 데 활성조절제로 유용하게 이용될 수 있음을 보인다.

재료 및 방법

재료. 토마토는 홍농종묘의 서광토마토(*Lycopersicon esculentum* L.; Pink Forcer) 중자를 받아들용 스펀지를 이용하여

*연락처

Phone: 82-43-261-2560, Fax: 82-43-271-5921

E-mail: ykkim10@cbucc.chungbuk.ac.kr

빛을 주지 않은 상태로 25°C를 유지하며, 증류수에서 약 3-5일 간 발아시켜 얻었다. 발아 후 양액이 담긴 플라스틱 용기에 이식하였으며, 양액의 조성은 Cho 등¹⁶⁾의 방법에 따라 제조하였다. 이식된 토마토는 온도를 28-32°C로 유지하며 약 5주간 온실에서 재배한 후, 뿌리조직을 채취하여 본 실험의 재료로 사용하였다.

양액 제조에 사용한 시약은 모두 1급 이상의 국산 및 일본산 시약이었고, 완충액용 자당은 Fluka Biochemical (Switzerland)의 제품을 사용하였다. ATPase 활성측정에 사용한 시약은 모두 Sigma Chemical Co.(St. Louis, USA)에서 구입하였다.

토마토 뿌리조직에서의 마이크로솜 분리. Cho 등¹⁶⁾의 방법에 따라 초고속 원심분리법으로 토마토의 뿌리조직으로부터 마이크로솜을 분리하였다. 마이크로솜 분획은 액체질소를 사용하여 순간냉동시켜 초저온 냉동고(-80°C)에 보관하면서, 3개월 이내에 사용하였다. 모든 과정은 4°C에서 수행하였으며, 마이크로솜 분획의 단백질 농도는 Lowry 방법¹⁷⁾으로 결정하였다.

마이크로솜 ATPase 활성측정. 뿌리조직으로부터 분리한 마이크로솜 ATPase의 평균활성은 Sommarin 등¹⁸⁾의 인산정량법으로 측정하였다. 즉, 이 방법은 ATPase의 활성에 따라 생성된 무기인산을 molybdate가 함유된 용액과 혼합하여 molybdate-착화합물의 형성을 유도하고, ascorbic acid와 SnCl₂를 이용하여 착화합물을 환원시킴으로써 발색이 일어나도록 하는 비색법이다. 이때, 발색된 시료의 흡광도는 파장 680 nm에서 무기인산의 농도에 따라 정량적으로 증가한다. 흡광도는 분광광도계 (Hitachi U-2000, Japan)를 이용하여 측정하였으며, ATPase의 활성은 반응용액(120 mM KCl, 10 mM KCN, 50 μM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 30 mM HEPES, pH 7.4) 550 μl에 약 147 μg의 단백질을 포함하는 양의 마이크로솜을 가한 후, 2 mM ATP를 첨가함으로써 개시되었다. 배양 10분 후, 증류수 2 ml와 용액 A(3.57 mM ammonium molybdate를 포함한 0.8 M H₂SO₄) 1.5 ml, 용액 B(2.22 mM SnCl₂, 15.26 mM ascorbic acid를 포함한 0.3 M H₂SO₄) 1 ml를 첨가하여 ATPase의 반응을 종결시켰다. 이 용액은 발색을 위하여 실온에서 3시간 배양하였고, 과량의 molybdate는 10% sodium citrate를 1.5 ml 첨가하여 chelation시킨 상태에서 흡광도를 측정하였다. 실험에 사용한 모든 초자기구는 실험 전 0.3 M H₂SO₄ 용액으로 세척하였고, ATPase 활성 측정시 나타날 수 있는 비선택적 탈인산화효소의 활성은 반응용액에 100 μM sodium molybdate를 첨가하여 저해하였으며,¹⁹⁾ ATP를 첨가하지 않은 공실험 조건에서 나타난 활성도 제거하였다. 무기인산의 정량을 위한 표준곡선은 매 실험마다 작성하였으며, 반응용액을 이용해 1 mM KH₂PO₄ 용액을 제조하여 무기인산의 농도가 0-270 nmol이 되도록 만들었다.

결과 및 고찰

마이크로솜 H⁺-ATPase의 활성 측정. 마이크로솜 H⁺-ATPase의 활성에 미치는 La³⁺의 영향을 측정하기 위하여 토마토의 뿌리조직에서 원형질막 및 액포막으로부터 마이크로솜을 분리하였으며, 인산정량법을 이용하여 H⁺-ATPase의 활성변화를 측정

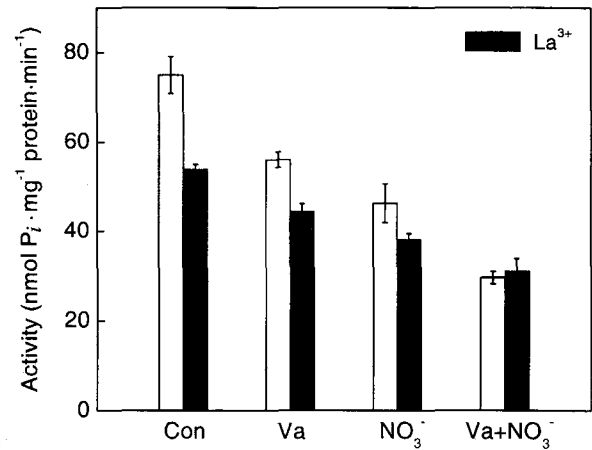


Fig. 1. Inhibitory effects of La³⁺ on the plasma and vacuolar membrane H⁺-ATPases. Microsomes were incubated for 10 min and the average ATPase activity was calculated. Vanadate and nitrate were used as specific inhibitors to plasma and vacuolar membrane H⁺-ATPases, respectively. The activity was measured in the absence (□) or in the presence (■) of 80 μM La³⁺ under the indicated conditions, in the presence of vanadate (Va), NO₃⁻, and both (Va+NO₃⁻). The concentrations of vanadate and NO₃⁻ were 1 mM and 50 mM, respectively. Values are means ± SD (n=9).

하였다. 그간에 본 연구실에서는 마이크로솜 H⁺-ATPase의 활성을 측정하기 위하여 혐기적 해당과정의 일부인 pyruvate kinase(PK)와 lactate dehydrogenase(LDH)를 사용하는 enzyme-coupled assay를 사용하였다.^{16,20)} 그러나, 이 방법은 La³⁺이 PK 혹은 LDH를 저해함으로 사용할 수 없었으며,²¹⁾ 본 연구에서는 인산정량법¹⁸⁾을 이용하여 La³⁺에 의한 마이크로솜 ATPase 활성변화를 측정하였다. 반응용액에 마이크로솜과 ATP를 첨가하고 배양시간을 증가시킴에 따라, 마이크로솜 H⁺-ATPase의 총활성은 시간에 따라 증가하였으며, 배양 시간 10분 후에 총활성은 약 740 nmol Pi · mg⁻¹ protein으로 거의 최대치에 도달하였다. 따라서, 마이크로솜 H⁺-ATPase의 활성은 10분간 측정하였으며, 평균활성인 74 nmol Pi · mg⁻¹ protein · min⁻¹으로 나타내었다.

마이크로솜 H⁺-ATPase 활성에 대한 La³⁺의 효과. 총활성을 구성하는 주된 성분²¹⁾인 원형질막과 액포막의 H⁺-ATPase 활성은 각각의 선택적 저해제인 1 mM vanadate²²⁾와 50 mM NO₃⁻의²³⁾ 처리에 의하여 저해되는 활성으로 측정하였다. 이러한 정량적 평가에서 원형질막의 H⁺-ATPase 활성은 전체 활성의 약 30%, 액포막의 H⁺-ATPase 활성은 약 38%로 나타나, Cho 등¹⁶⁾ 및 Shin 등²¹⁾의 결과와 유사하였다. 한편, 대조실험 조건에 80 μM La³⁺을 첨가하면 총활성은 약 30% 감소하였다(Fig. 1). La³⁺에 의한 원형질막 및 액포막의 H⁺-ATPase 활성저해 여부를 확인하기 위하여 vanadate와 NO₃⁻를 처리한 후, 80 μM La³⁺을 처리하였을 때, 활성은 각각 20%와 19%가 추가로 감소하였으며, vanadate와 NO₃⁻를 동시에 처리한 후 La³⁺을 처리하면 더 이상 저해효과를 보이지 않았다. 이것은 La³⁺이 원형질막과 액포막의 H⁺-ATPase를 모두 저해하며, La³⁺의 작용이 비선택적임을 보인다.

La³⁺에 의한 원형질막과 액포막의 H⁺-ATPase 저해특성을 조사하기 위하여 La³⁺의 농도증가에 따른 NO₃⁻와 vanadate의 추

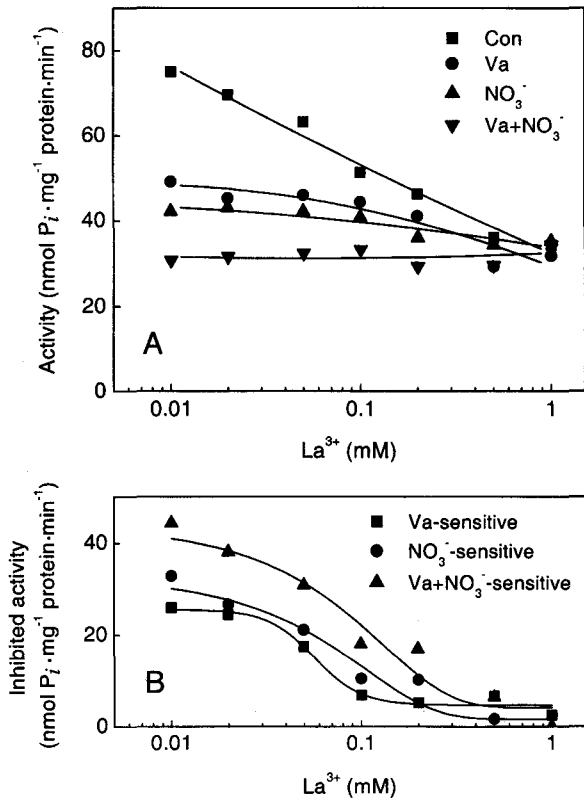


Fig. 2. Dose response to La³⁺ of vanadate- and nitrate-sensitive H⁺-ATPases. (A) ATPase activity was measured in the absence (Con) or presence of vanadate (Va), NO₃⁻, and both (Va+NO₃⁻) at various concentrations of La³⁺. The data were fitted to either a polynomial or a sigmoidal function, represented by solid line. (B) Inhibited activities at various concentrations of La³⁺ were calculated by subtracting the activity obtained in the presence of inhibitor from the corresponding control activity.

가적인 저해여부를 관측하였다. 먼저, La³⁺의 농도를 10 μM에서 1 mM로 단계적으로 증가시킴에 따라 마이크로솜 ATPase의 활성은 농도의존적으로 저해되었다(Fig. 2A, Con). 이러한 조건에서 La³⁺의 각 농도에 vanadate와 NO₃⁻를 각각 첨가하였을 때, 이들에 의하여 저해되는 H⁺-ATPase들의 활성은 La³⁺의 농도를 증가시킴에 따라 점차 감소하였다(Fig. 2B). La³⁺의 농도 20 μM 이하에서는 vanadate와 NO₃⁻에 의한 저해가 위의 대조 실험과 같은 정도로 나타나 La³⁺의 저해효과가 관측되지 않았다. 그러나, La³⁺의 농도를 20 μM 이상으로 증가시킴에 따라 vanadate와 NO₃⁻에 의한 추가적인 저해는 점차 감소하였고, 500 μM 이상에서는 더 이상 이들에 의한 추가저해가 관측되지 않았다. 이상의 결과로부터 원형질막 및 액포막에 위치하는 H⁺-ATPase들의 활성을 50% 저해하는 La³⁺의 K_i 값은 각각 57, 78 μM임을 확인하였다. 한편, vanadate와 NO₃⁻에 의해 저해되지 않는 다른 ATPase의 활성은 La³⁺의 농도를 1 mM 이상 높여도 저해되지 않았다(미제시 자료). 이것은 La³⁺이 원형질막과 액포막 H⁺-ATPase만을 저해하며, 이들 두 효소사이에 공통적인 La³⁺ 저해 기작이 있음을 보인다.

Uncoupled 마이크로솜에서 La³⁺의 효과. 마이크로솜 막에 위치한 이온펌프 활성은 같은 막에 존재하는 이온채널의 활성

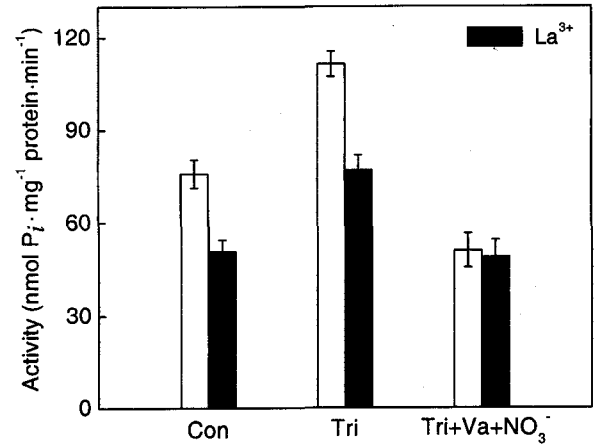


Fig. 3. Effect of La³⁺ obtained from the Triton X-100-treated microsomes. The microsomes were made leaky by the addition of 0.05% (v/v) Triton X-100. Microsomal ATPase activity was measured in the absence (□) or presence (■) of 80 μM La³⁺ under the indicated conditions, in the absence of Triton X-100 (Con), in the presence of Triton X-100 (Tri), and in the presence of Triton X-100 plus inhibitors of H⁺-ATPases (Tri+Va+NO₃⁻). The concentrations of vanadate and NO₃⁻ were 1 mM and 50 mM, respectively. Values are means ± SD (n=5).

과 연관되어 있으며, 이온채널의 활성증가는 일반적으로 막을 경계로 한 이온의 농도기울기를 감소시킴으로써 이온펌프의 활성을 증가시키며, 이것은 coupling 효과로서 알려져 있다.^{24,25} La³⁺을 포함한 중금속들은 이온펌프 뿐만 아니라 이온채널의 활성도 변화시킬 수 있으므로, La³⁺이 직접적으로 H⁺-ATPase의 활성을 저해하는 지 여부를 확인하기 위하여 비이온성 계면활성제인 Triton X-100을 사용하여 leaky 마이크로솜을 만들어 uncoupling 조건에서 La³⁺의 효과를 확인하였다.

대조실험으로 마이크로솜에 0.05%(v/v) Triton X-100을 처리하였을 때, 마이크로솜 ATPase의 총활성은 약 45% 증가하였다(Fig. 3, Tri). 활성이 tight-sealed 마이크로솜에 비하여 leaky 마이크로솜에서 증가한 것은 마이크로솜에서 이온펌프와 이온채널간의 coupling 효과가 있음을 나타낸다.^{23,26} 계면활성제를 처리한 leaky 마이크로솜에서 La³⁺에 의해 ATPase 활성은 약 30% 저해되었으며, vanadate와 NO₃⁻를 첨가하여 두 가지 H⁺-ATPase 활성을 모두 저해한 후에는 La³⁺에 의한 잔류활성의 저해가 나타나지 않았다. 이것은 Fig. 2에서의 결과와 같이 La³⁺이 두 가지 H⁺-ATPase 활성을 모두 직접적으로 저해함을 보이며, 이온채널의 활성과는 무관함을 의미한다.

La³⁺에 의한 H⁺-ATPase의 가역적 저해. La³⁺에 의한 H⁺-ATPase의 활성저해 특성을 알아내기 위하여, La³⁺과 ATP, Mg²⁺간의 상호작용을 조사하였다. 먼저, 기질인 ATP의 농도를 조절하면서 La³⁺에 의한 마이크로솜 H⁺-ATPase의 활성저해 효과를 측정하였다. 대조실험으로 반응용액에 ATP의 농도를 0.1 mM에서 7 mM로 증가시킴에 따라, 마이크로솜 H⁺-ATPase의 활성은 0.1-2 mM 범위에서 급격히 증가하였으며, 2 mM 이상의 농도에서 최대치를 보였다(Fig. 4). 동일한 조건에서 반응용액에 80 μM La³⁺을 가하고 ATP의 농도를 0.1-7 mM로 증가시켰을 때, La³⁺에 의한 H⁺-ATPase의 활성저해 효과는 ATP의 농도가

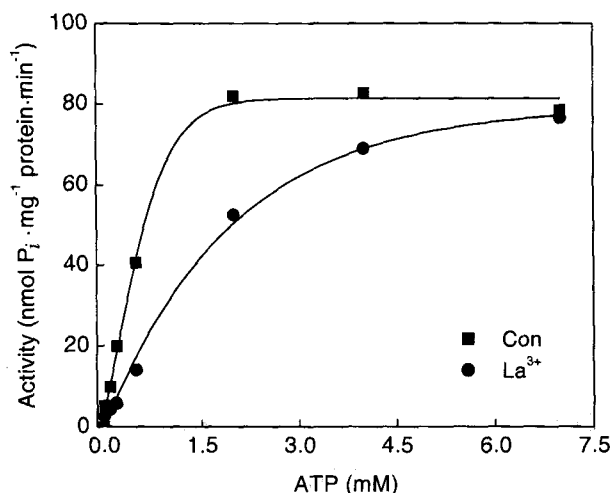


Fig. 4. Effect of ATP on the La³⁺-induced inhibition of H⁺-ATPase. Microsomal ATPase activity was measured at various concentrations of ATP in the control condition (■) and in the presence of 80 μM La³⁺ (●). The data represent the average value of two separate triplicated experiments.

증가함에 따라 점차 감소하였다. ATP를 4 mM 처리하였을 때, La³⁺의 저해효과는 약 50% 감소하였으며, ATP의 농도를 7 mM 이상으로 증가시키면 저해효과는 완전히 제거되어, La³⁺에 의한 H⁺-ATPase 활성저해가 ATP의 농도증가에 의해 가역적으로 회복됨을 보여 준다. 이때, 마이크로솜 H⁺-ATPase의 ATP에 대한 Km 값은 대조실험과 La³⁺을 처리한 조건에서 각각 0.44, 2.14 mM로 나타났다. 최대활성에 변화없이 La³⁺에 의한 Km 값의 증가는 경쟁적 저해의 일반적 특징이지만, La³⁺과 ATP가 서로 구조적 유사성이 없음을 고려할 때, 이들이 효소의 한 결합 부위에 대하여 경쟁하기보다는 각각의 결합부위가 따로 존재하며, La³⁺의 결합이 효소의 ATP 결합친화력을 감소시킬 것으로 추측된다. Henao 등²⁷⁾은 근소포체의 Ca²⁺-ATPase에서 binding assay를 통하여 La³⁺이 ATP의 존재 여부와 관계없이 효소에 고유 결합부위를 가질 가능성을 제시하였다.

한편, La³⁺이 마이크로솜 H⁺-ATPase의 활성화에 필수적인 Mg²⁺의 결합부위에 결합하여 활성을 저해하거나, 혹은 La³⁺·ATP 복합체 형성으로 H⁺-ATPase 활성저해를 유발할 가능성도 배제할 수 없다. 이러한 가능성을 확인하기 위하여, 반응용액 중 ATP 또는 Mg²⁺의 농도를 조절하면서 La³⁺의 마이크로솜 H⁺-ATPase 활성저해 특성을 조사하였다. 먼저, La³⁺이 마이크로솜 ATPase의 Mg²⁺ 결합부위에 결합하여 Mg²⁺과 경쟁적으로 활성을 저해하는지 여부를 확인하기 위하여, 반응용액에 Mg²⁺을 1 mM에서 4 mM로 증가시켰다(Fig. 5). 만약, La³⁺이 Mg²⁺의 결합부위에 결합한다면, Mg²⁺ 농도를 증가시키면 따라 La³⁺에 의한 마이크로솜 H⁺-ATPase 활성저해 효과가 감소될 것이나, 대조실험에 비하여 4 mM Mg²⁺을 첨가하였을 때에도, La³⁺의 저해효과는 변함이 없었다. 이러한 결과는 La³⁺이 H⁺-ATPase의 Mg²⁺ 결합에는 영향을 미치지 않음을 보여준다.

다음으로, La³⁺에 의한 La³⁺·ATP 복합체 형성 가능성을 확인하기 위하여 반응용액에 7 mM ATP와 4 mM Mg²⁺을 동시에 처리하였다. ATP의 농도가 7 mM로 높아짐에 따라 Mg²⁺의 존

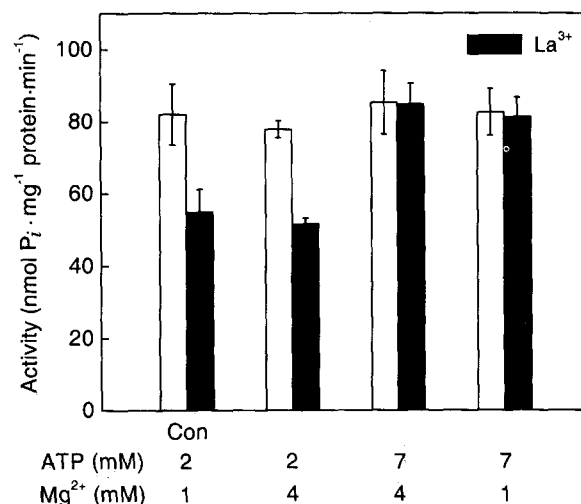


Fig. 5. Effects of ATP and Mg²⁺ on the recovery of La³⁺-induced inhibition. The effects of ATP and Mg²⁺ were measured in the absence (□) or presence (■) of 80 μM La³⁺ at various concentrations of ATP and Mg²⁺ as indicated. The control condition consists of 2 mM ATP and 1 mM Mg²⁺ (Con). Values are means ± SD (n=6).

재와 무관하게 Fig. 4의 결과에서와 같이 La³⁺의 활성저해 효과는 완전히 제거되었다(Fig. 5, 7 mM ATP + 4 mM Mg²⁺). 이러한 결과로부터 ATP 농도증가에 따른 La³⁺ 효과의 역제는 La³⁺·ATP 복합체 형성보다는 효소에 La³⁺과 ATP가 서로 별개의 결합부위를 갖으며, La³⁺과 ATP가 근소포체의 Ca²⁺-ATPase에서와 같이 서로의 결합친화력에 영향을 미침을 확인하였다.

이상의 실험 결과들로부터 La³⁺에 의한 마이크로솜 ATPase 활성저해 효과는 총활성의 60-70%를 차지하는 원형질막과 액포막 H⁺-ATPase의 활성 저해에 기인하며, 이들 두 H⁺-ATPase를 저해하는 La³⁺의 Ki 값이 유사한 것은 아마도 두 효소들에 대한 La³⁺의 결합친화력이 비슷하기 때문인 것으로 추측된다. 또한, La³⁺은 이온채널의 존재와 상관없이 H⁺-ATPase를 직접적으로 저해하고, H⁺-ATPase에 결합하여 기질인 ATP의 결합친화력에 영향을 미쳐 활성저해를 유발하며, Mg²⁺과는 무관함을 확인하였다.

감사의 글

본 논문은 한국과학재단지정 충북대학교 첨단원예기술개발연구센터의 지원에 의해 수행되었으며, 인산정량분석에 도움을 주신 서울대학교 식물생산과학부 이희재 교수님께 감사드립니다.

참고문헌

- Morsomme, P. and Boutry, M. (2000) The plant plasma membrane H⁺-ATPase: structure, function and regulation. *Biochim. Biophys. Acta* **1465**, 1-16.
- Garbarino, J. and DuPont, F. M. (1988) NaCl induces a Na⁺/H⁺ antiport in tonoplast vesicles from barley roots. *Plant Physiol.* **86**, 231-236.

3. McClure, P. R., Kochian, L. V., Spanswick, R. M. and Shaff, J. E. (1990) Evidence for cotransport of nitrate and protons in maize roots. I. Effects of nitrate on the membrane potential. *Plant Physiol.* **93**, 281-289.
4. Buckhout, T. J. (1994) Kinetic analysis of the plasma membrane sucrose-H⁺ symporter from sugar beet (*Beta vulgaris* L.) leaves. *Plant Physiol.* **106**, 991-998.
5. Brune, A., Gonzalez, P., Goren, R., Zehavi, U. and Echeverria, E. (1998) Citrate uptake into tonoplast vesicles from acid lime (*Citrus aurantifolia*) juice cells. *J. Membr. Biol.* **166**, 197-203.
6. Sze, H. (1985) H⁺-translocating ATPases: advances using membrane vesicles. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **36**, 175-208.
7. Martin, R. B. and Richardson, F. S. (1979) Lanthanides as probes for calcium in biological systems. *Q. Rev. Biophys.* **12**, 181-209.
8. Girardet, J., Dupont, Y. and Lacapere, J. (1989) Evidence of a calcium-induced structural change in the ATP-binding site of the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase using terbium formycin triphosphate as an analogue of Mg-ATP. *Eur. J. Biochem.* **184**, 131-140.
9. Fujimori, T. and Jencks, W. P. (1990) Lanthanum inhibits steady-state turnover of the sarcoplasmic reticulum ATPase by replacing magnesium as the catalytic ion. *J. Biol. Chem.* **265**, 16262-16270.
10. Ogurusu, T., Wakabayashi, S. and Shigekawa, M. (1991) Functional characterization of lanthanide binding sites in the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase: do lanthanide ions bind to the calcium transport site? *Biochem.* **30**, 9966-9973.
11. Evans, D. E. and Williams, L. E. (1998) P-type calcium ATPases in higher plants-biochemical, molecular and functional properties. *Biochim. Biophys. Acta* **1376**, 1-25.
12. Raeburn, D. (1987) Calcium entry blocking drugs: their classification and sites of action in smooth muscle cells. *Med. Biol.* **65**, 175-180.
13. Beedle, A. M., Hamid, J. and Zamponi, G. W. (2002) Inhibition of transiently expressed low- and high-voltage-activated calcium channels by trivalent metal cations. *J. Membr. Biol.* **187**, 225-238.
14. Gelli, A. and Blumwald, E. (1997) Hyperpolarization-activated Ca²⁺-permeable channels in the plasma membrane of tomato cells. *J. Membr. Biol.* **155**, 35-45.
15. Lewis, B. D. and Spalding, E. P. (1998) Nonselective block by La³⁺ of Arabidopsis ion channels involved in signal transduction. *J. Membr. Biol.* **162**, 81-90.
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. Sommarin, M., Lundborg, T. and Kylin, A. (1985) Comparison of K,Mg-ATPases in purified plasmalemma from wheat and oat: substrate specificities and effects of pH, temperature and inhibitors. *Plant Physiol.* **65**, 27-32.
19. Gallagher, S. R. and Leonard, R. T. (1982) Effect of vanadate, molybdate, and azide on membrane-associated ATPase and soluble phosphatase activities of corn roots. *Plant Physiol.* **70**, 1335-1340.
20. Niggli, V., Penniston, J. T. and Carafoli, E. (1979) Purification of the (Ca²⁺-Mg²⁺)-ATPase from human erythrocyte membranes using a calmodulin affinity column. *J. Biol. Chem.* **254**, 9955-9958.
21. Shin, D. S., Cho, K. H. and Kim, Y. K. (1999) Hg²⁺-induced reversible inhibitions of microsomal H⁺-ATPases prepared from tomato roots. *J. Kor. Soc. Agric. Chem. Biotechnol.* **42**, 298-303.
22. Palmgren, M. G., Askerlund, P., Fredrikson, K., Widell, S., Sommarin, M. and Larsson, C. (1990) Sealed inside-out and right-side-out plasma membrane vesicles. *Plant Physiol.* **92**, 871-880.
23. 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.
24. Cho, K. H. (1997) Characterization of microsomal ATPases prepared from soybean roots and tomato roots. M.S. Thesis. Chungbuk National University, Cheongju, Korea.
25. Cho, K. H., Sakong, J. and Kim, Y. K. (2001) Inhibition of microsomal ATPases by high concentration of Mg²⁺ in tracheal epithelial cells. *Life Sci.* **69**, 2875-2886.
26. Larsson, C., Sommarin, M. and Widell, S. (1994) Isolation of highly purified plasma membranes and separation of inside-out and right-side-out vesicles. *Methods Enzymol.* **228**, 451-469.
27. Heno, F., Orłowski, S., Merah, Z. and Champeil, P. (1992) The metal sites on sarcoplasmic reticulum membranes that bind lanthanide ions with the highest affinity are not the ATPase Ca²⁺ transport sites. *J. Biol. Chem.* **267**, 10302-10312.

Lanthanum-induced Inhibitions of Microsomal H⁺-ATPases in the Roots of Tomato

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

Abstract: In order to find a chemical agent which is able to modulate the activity of H⁺-ATPase, microsomal preparation was obtained from the root tissue of tomato plant and the effect of La³⁺ was measured. The activities of plasma and vacuolar membrane H⁺-ATPases were analyzed by the inhibited activities using their specific inhibitors, vanadate and NO₃⁻, respectively. La³⁺ inhibited microsomal ATPases in a dose-dependent manner and the inhibitory effect of La³⁺ was suppressed by both vanadate and NO₃⁻, implying that La³⁺ inhibits both plasma and vacuolar membrane H⁺-ATPases. The K_i values of La³⁺ which inhibit 50% of the activities of plasma and vacuolar membrane H⁺-ATPases were 57 and 78 μM, respectively. The H⁺-ATPases of the leaky microsomes made by the treatment of Triton X-100 were also inhibited by La³⁺, suggesting that La³⁺ directly inhibits both enzymes. Meanwhile, the inhibitory effect of La³⁺ was decreased by increasing the concentration of ATP. The effect of ATP was also concentration-dependent and 7 mM ATP completely removed the inhibitory effect of La³⁺. These results imply that La³⁺ inhibits both plasma and vacuolar membrane H⁺-ATPases by decreasing the binding affinity of ATP and La³⁺ can be used to control the activity of root H⁺-ATPases.

Key words: lanthanum, H⁺-ATPase, tomato roots

*Corresponding author