P-103

Human milk의 막성분중에서 발견된 Ca^{2+}-ATPase의 효소학적 기능특성

조 진 국 · Kanno Choemon* · Azuma Norihiro*

건국대학교 축산대학 동물자원연구센터, *日本 宇都宮大學 食品生化學(研)

Human milk의 막성분으로부터 최적pH가 7.0이며, 최대활성에는 0.45mM의 Ca^{2+}을 필요로 하는 Ca^{2+}-ATPase가 존재하는 것이 발견되어 그의 효소활성 특성이 밝혀졌으나 그의 분자량 및 기능특성은 밝혀지지 않았다. 그러므로, 본 연구에서는 부분정제한 Ca^{2+}-ATPase획분을 이용하여 Ca^{2+}-pump로서 작용할 때 나타나는 인산화반응과 Ca^{2+}-uptake율을 측정하였고 아울러 이효소에 대한 단일클론항체의 특성을 소개하고자 한다.

Ca^{2+}-uptake의 실험은 phosphatidyl choline을 이용하여 liposome을 형성하고 Con A affinity chromatography으로 부분정제한 효소획분을 liposome에 삽입하여 1mM의 ATP기질을 첨가한 효소반응액으로 liposome안에 수송된 ^{45}Ca양을 시간별로 추적하였다. 인산화실험은 약 75% 부분정제한 Ca^{2+}-ATPase의 시료를 0.45mM $CaCl_2$, 0.45mM $CaCl_2$+ 0.1mM EGTA, 0.45mM $CaCl_2$ + hydroxylamine을 각각 포함한 20mM Imidazole-Histidine완충액(pH 7.0)에 넣고 100μM의 [γ-^{32}P]ATP(4000 Ci/mmol)을 첨가하여 얼음중에서 10초간 반응시킨후 20% Trichloroacetic acid와 원심분리를 이용하여 반응물질을 침전시키고 2% SDS를 포함하는 가용화용액으로 가용화하여 SDS-PAGE하고 전기영동gel을 X선 필름에 autoradiography를 행하였다.

본 효소에 대한 단일클론항체의 조제는 부분정제한 효소 10μg을 45일 동안 3회 주사하여 면역된 mouse의 비장세포와 골수종세포(myeloma)를 45% polyethylene glycol을 이용하여 융합한 후, ELISA와 western blotting을 이용하여 선별하였다.

실험결과, 80kDa과 38kDa를 동시에 인식하는 단일크론항체는 38Kda만을 특이적으로 인식하는 단일크론항체보다 Ca^{2+}-ATPase의 활성을 완전하게 저해하므로 본효소 활성의 발현에는 양peptide들이 모두 필요한 것으로 나타났다. 38kDa와 80kDa의 양 peptide는 Ca^{2+}의 존재하에 [γ-^{32}P]ATP에 의해 인산화중간체를 형성하였고, 이는 hydroxylamine처리에 대해 안정하였다. 또한 재구성 liposome에 있어서의 Ca^{2+}의 uptake율은 ATP에 의존하여 반응시간의 경과와 함께 증가하고 40분에서 최대치를 나타내었다. 이상의 결과로부터 Human milk의 Ca^{2+}-ATPase는 활성이나 기능발현에 Ca^{2+}과 ATP를 요구하는 것으로 밝혀져 P type의 ATPase인 것으로 분류되며, 분자량이나 Ca^{2+}의 uptake율과 인산화반응 특성이 기존에 알려진 적혈구나 근소포체에 존재하는 Ca^{2+}-ATPase와 다른 새로운 효소인 것이 밝혀졌다.