

백서 뇌 K⁺-dependent p-Nitrophenylphosphatase 활성에 관한 연구

부산대학교 의과대학 신경정신과학교실

<지도 박 조 열 부교수>

부산대학교 의과대학 생리학교실

<지도 이 상 호 부교수>

구 진 일

=Abstract=

Studies on the K⁺-dependent p-Nitrophenylphosphatase activity of the rat brain

Jin Il Koo, M.D.

Department of Neuropsychiatry, College of Medicine, Busan National University

(Director: Assoc. Prof. Cho Yul Park, M.D.)

Department of Physiology, College of Medicine, Busan National University

(Director: Assoc. Prof. Sang Ho Lee, M.D.)

In recent years much interesting information about the mechanism of the Na⁺-K⁺ activated ATPase has been obtained from investigation of the K⁺-activated phosphatase activity which appears to be catalysed by the same enzyme.

Also several studies have indicated that a K⁺-activated p-nitrophenylphosphatase activity is intimately related to the ATPase activity. And then the exact relation of p-nitrophenylphosphatase activity to Na⁺-K⁺ ATPase activity is not known.

The effects of some ions and drugs on the p-nitrophenylphosphatase activity of the rat brain were investigated and the results were summarized as follows.

1. The p-nitrophenylphosphatase was stimulated markedly by low concentrations of K⁺, while the activity was activated slightly in the presence of Na⁺ and oligomycin.
2. Addition of both ATP and Na⁺ caused a remarkable increase in the activity of the K⁺-dependent phosphatase at low concentrations of K⁺.
3. In the presence of Na⁺ and low concentrations of K⁺, oligomycin activated the p-nitrophenylphosphatase.
4. Oligomycin inhibited the stimulation of the enzyme activity caused by Na⁺+ATP.
5. Ouabain inhibited the K⁺-dependent p-nitrophenylphosphatase activity more in the presence of ATP and Na⁺ than in their absence.
6. Quinidine inhibited both Na⁺-K⁺ ATPase and p-nitrophenylphosphatase. These inhibitory effects of the drug were partially antagonized by increasing K⁺ concentrations. The sensitivity of the K⁺-dependent p-nitrophenylphosphatase to quinidine was greater than the that of Na⁺-K⁺ ATPase.

본 논문의 요지는 1974년 11월 제26회 대한생리학회에서 발표하였음.

서 론

Skou¹⁾가 1957년 최초로 계의 말초신경막내에서 Na⁺-K⁺ activated Mg²⁺ dependent adenosinetriphosphatase (Na⁺-K⁺ ATPase)를 발견한 후 여러가지 종류의 조직에 이 효소계가 존재하고 있음이 밝혀졌는데 즉 적혈구막²⁾, 뇌³⁾, 신장⁴⁻⁷⁾, 눈의 모양체 및 망막⁸⁾, avian salt gland⁹⁾, electrophorus electricus의 전기 기관¹⁰⁾ 및 심장 조직^{11,12)}등에 광범위하게 존재한다 함은 잘 알고 있는 사실이다.

이 효소계가 Na⁺과 K⁺과 같은 양 이온의 능동적인 이동에 carrier mechanism을 이루고 있는 것으로 믿고 있으나¹³⁾ 그 본체에 대해서는 아직 확실히 밝혀지지 않고 있다.

그런데 최근에 Na⁺-K⁺ ATPase의 분해과정에 대한 흥미 있는 많은 지식이 동일한 효소에 의하여 이루어진다고 하는 K⁺-activated phosphatase활성의 연구로부터 얻어졌다¹⁴⁻¹⁶⁾.

Whittam 및 Wheeler¹⁷⁾에 의하면 K⁺-activated p-nitrophenylphosphatase활성이 Na⁺-K⁺ ATPase활성과 밀접한 관련이 있으며 ATP분해로 유도하는 연쇄반응의 최종단계에 작용할 것이라고 하였다.

Askari 및 Rao¹⁸⁾에 의하면 ATPase활성에 대한 p-nitrophenylphosphatase활성의 명확한 관계는 아직 불명이나, 두 활성도는 동일한 효소 단백질에 의하여 촉매되며 p-nitrophenylphosphatase는 Na⁺-K⁺ ATPase의 일부 혹은 두개의 다른 뚜렷한 효소일 것이라고 한다.

일반으로 Na⁺-K⁺ ATPase에 의하여 촉매되는 반응은 두 부분을 함유하고 있다고 하는데^{19,20)}, 첫째는 효소의 Na⁺-dependent phosphorylation이고, 둘째는 phosphorylated intermediate의 K⁺-dependent dephosphorylation이 그것이다. Nagai 등¹⁴⁾과 Bader 및 Sen²¹⁾에 의하면 Mg²⁺과 K⁺존재하에 Na⁺-K⁺ ATPase표본에서 나타나는 phosphatase활성은 여러가지 점에서 Na⁺-K⁺ ATPase의 반응과 비슷하다고 한다.

그래서 저자는 백서 뇌 microsome분획내 K⁺-dependent p-nitrophenylphosphatase의 성상과 몇몇 촉진제 및 억제제가 이 효소 활성화에 미치는 영향을 관찰하고 아울러 Na⁺-K⁺ ATPase와 이 효소와의 상호 관계도 구명하려고 본 실험을 하였다.

실험재료 및 방법

a. 실험동물

체중 180 g 이상의 건강한 백서를 자용 구별없이 사

용하였다.

b. 뇌 피질 조직의 microsome분획의 분리

경동맥을 절단하여 출혈사를 일으킨 후 뇌를 적출하여 백질을 제거한 뇌 피질 조직을 Inesi 등²²⁾의 방법으로 뇌 피질 조직의 microsome분획을 분리하였다. 분리시 모든 조각은 1~3°C에서 하였다.

c. 단백질의 측정

뇌 피질 microsome분획내에 함유되어 있는 단백질량은 Biuret²³⁾방법으로 측정하였다.

d. p-Nitrophenylphosphatase활성도의 측정

이 phosphatase활성도는 Bessey²⁴⁾등의 방법으로 측정하였다. 기질로는 p-nitrophenylphosphate disodium을 사용하였고, incubation medium의 조성중 buffer는 Tris-Cl(pH 7.4)를 사용하였다. 37°C에서 30분간 incubation한 다음 단백질을 제거한 후 냉각된 0.02 N NaOH 10 ml를 가하여 Coleman junior spectrophotometer로 파장 410 mμ에서 흡광도를 읽고 유리된 p-nitrophenol량을 미리 작성한 표준 곡선으로부터 환산하여 p-nitrophenol liberated, μM/mg protein/hr로 표시하였다.

e. 무기인산의 측정

무기 인산량은 Fiske-Subbarow²⁵⁾방법으로 측정하였다.

f. ATPase활성도의 측정

백서 뇌 피질 microsome분획내 ATPase활성도는 Lee 및 Yu²⁶⁾방법으로 측정하였다. 실험과정에 있어 incubation은 37°C에서 하였고, 본 실험에 사용한 각종 용액은 재증류수를 사용하여 만들었다. 실험성적은 각각 재료를 달리한 4~5회 실험성적의 평균치이다.

g. 시 약

본 실험에 사용한 중요 시약은 다음과 같다.

Tris(hydroxymethyl) amino methane(Sigma), Glycine buffer(Sigma), Histidine(Sigma), Bovine serum albumin(Sigma), p-Nitrophenylphosphate(Sigma), Adenosine triphosphate(Sigma), Disodium ethylene diamine tetraacetic acid(EDTA, Sigma), Oligomycin(Sigma), Ouabain(Sigma), Quinidine-sulfate(Sigma).

실험성적

1. p-Nitrophenylphosphatase활성에 미치는 K⁺의 효과

Na⁺과 oligomycin이 존재시와 존재하지 않을시 K⁺농도 변동이 phosphatase활성에 미치는 효과를 관찰하

여 제 1 도에 표시하였다.

Incubation medium의 조성은 50 mM Tris-Cl buffer (pH 7.4), 5 mM MgCl₂, 20 mM NaCl, 4 mM p-nitrophenylphosphate, 2 μg/ml oligomycin 및 1 mM EDTA 등이다. 제 1 도에 보는 바와 같이 Na⁺과 oligomycin이 존재하지 않을시 이효소 활성은 K⁺의 농도가 20 mM에 이를때까지 현저히 증가되었으나 그 이상의 농도에서는 점차 억제되었으며, Na⁺과 oligomycin 존재시는 앞서보다 그 활성 양상이 훨씬 경미하였다.

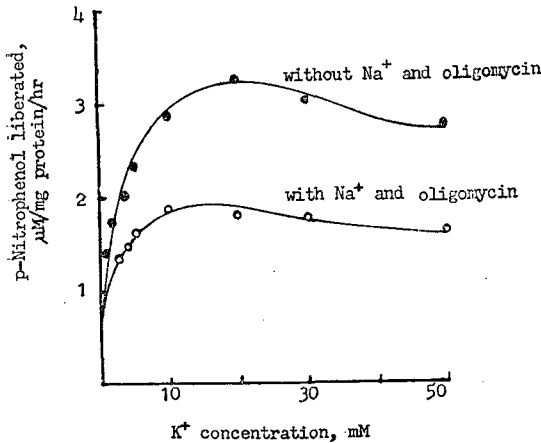


Fig. 1. Effects of varying concentrations of K⁺ on the p-nitrophenylphosphatase in the presence and absence of Na⁺ and oligomycin. [Incubation medium contained 50 mM Tris-Cl buffer (pH 7.4), 5 mM MgCl₂, 20 mM NaCl, 4 mM p-nitrophenylphosphate, 2 μg/ml oligomycin, 1 mM EDTA and various concentrations of KCl].

2. ATP가 존재시와 존재치 않을시 K⁺-dependent phosphatase 활성에 미치는 Na⁺의 효과

이 실험에 있어서는 0.1 mM의 ATP가 존재시와 존재하지 않을 때 이 효소 활성에 미치는 Na⁺의 영향을 관찰하였다. Incubation medium의 조성은 Fig. 1과 같으며 K⁺의 농도는 0.5 mM이다. ATP가 존재시는 Na⁺의 농도가 10~30 mM에 이르도록 이 phosphatase 활성은 현저히 증가되었으나 그 이상의 Na⁺농도에서는 점차 감소되었다. 한편 ATP가 존재하지 않을시는 3에서 100 mM에 이르는 Na⁺농도 변동에 따라 이 효소 활성은 그다지 영향을 받지 아니하였다.

3. Oligomycin이 존재시와 존재치 않을시 p-nitrophenylphosphatase 활성에 미치는 Na⁺의 효과

2 μg/ml의 oligomycin이 존재시와 존재하지 않을시

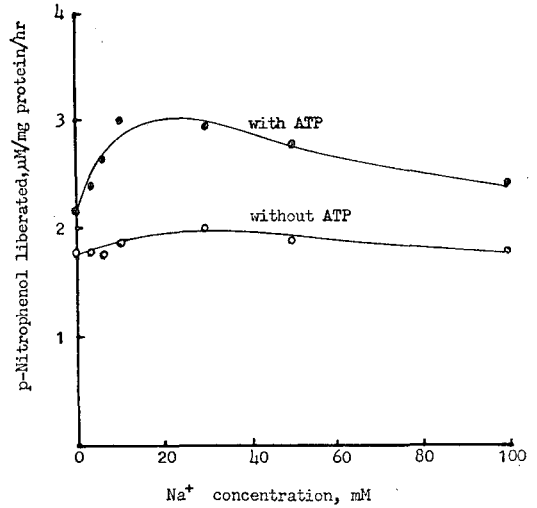


Fig. 2. Effects of varying concentrations of Na⁺ on ATP stimulation of p-nitrophenylphosphatase activity. [Incubation medium was the same as described for Fig. 1 except K⁺].

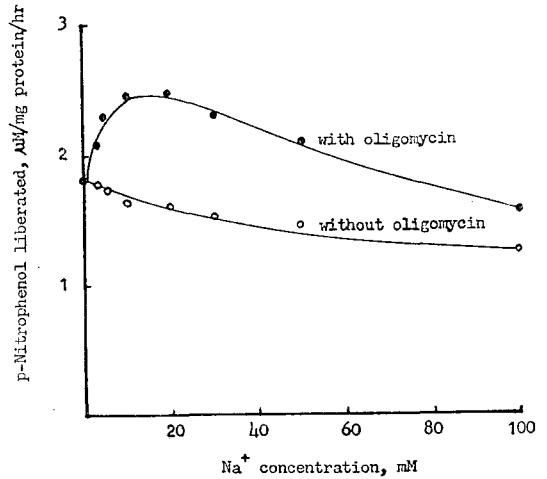


Fig. 3. Effects of varying concentrations of Na⁺ on the p-nitrophenylphosphatase activity in the presence and absence of oligomycin. [Incubation medium contained 50 mM Tris-Cl buffer (pH 7.4), 5 mM MgCl₂, 0.5 mM KCl, 4 mM p-nitrophenylphosphate, with and without oligomycin (2 μg/ml), 1 mM EDTA and various concentrations of NaCl].

Na⁺농도를 3에서 100 mM까지 변동시켜 이 phosphatase 활성에 미치는 영향을 실험하여 그 성적을 제 3 도에 나타내었다.

여기서 보는 바와 같이 저 농도의 oligomycin 이 존재시는 Na⁺농도가 3에서 20mM에 이르도록 이 효소 활성도가 활성화 되었다가 그 이상의 Na⁺농도에서는 점차 감소되었다. 한편 oligomycin 이 존재하지 않을때는 Na⁺농도 증가에 따라 점차 경미하게 감소되었다.

4. p-Nitrophenylphosphatase 활성에 미치는 oligomycin 의 효과

Oligomycin 의 농도를 5에서 80 μg/ml 까지 변동시켜 0.5 mM K⁺과 0.1 mM ATP 존재시와 존재치 않을시 이 phosphatase 활성에 미치는 영향을 관찰하여 그 성적을 제 4 도에 표시하였다. 여기서 보는 바와 같이 K⁺과 ATP가 존재시는 oligomycin 의 농도가 5에서 20 μg/ml로 증가함에 따라 현저히 억제되었으나, 그 이상의 농도에서는 큰 영향을 볼 수 없었는데, K⁺과 ATP가 존재치 않을시는 oligomycin 의 농가 증가에 따라 이 phosphatase 활성은 별 영향을 받지 아니하였다.

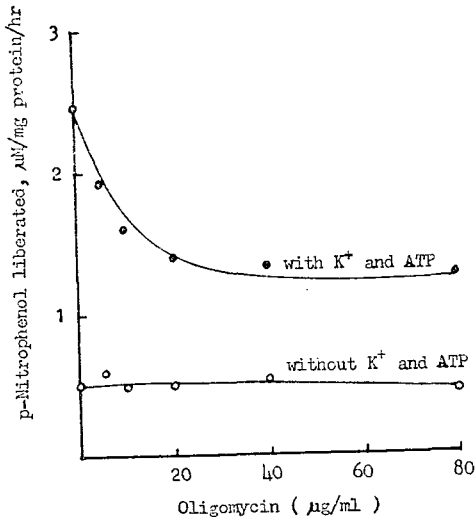


Fig. 4. Effects of varying concentrations of oligomycin on the p-nitrophenylphosphatase activity in the presence and absence of K⁺ or ATP. [Incubation medium contained 50 mM Tris-Cl buffer (pH 7.4), 5 mM MgCl₂, 20 mM NaCl, 4 mM p-nitrophenylphosphate, 1 mM EDTA, with and without K⁺ plus ATP, and various concentrations of oligomycin].

5. Na⁺과 ATP 존재시 K⁺-dependent phosphatase 활성에 미치는 ouabain 의 효과

이 실험은 Na⁺과 ATP 존재시 K⁺-dependent phosphatase 활성에 미치는 ouabain 의 감수성 변동을 관찰

하기 위한 것이다. 제 5도에 보는 바와 같이 5 mM K⁺ 단독 존재시 보다 5 mM K⁺과 20 mM Na⁺ 및 0.1 mM ATP 존재시에 ouabain 의 이 phosphatase 억제 효과가 더 현저하였으며, 더우기 K⁺과 ATP 및 고농도의 Na⁺(100 mM) 존재시에 가장 현저히 이 효소 활성이 억제됨을 관찰할 수 있었다.

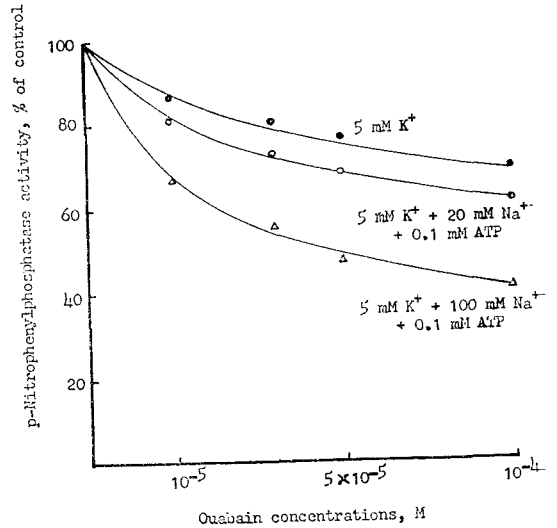


Fig. 5. Effect of ouabain on p-nitrophenylphosphatase in the presence of Na⁺ and ATP.

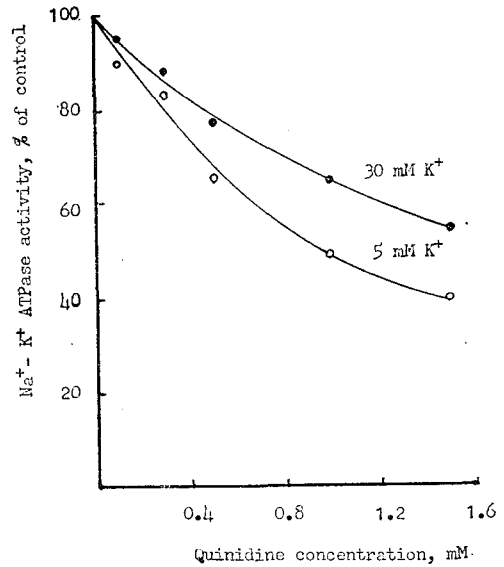


Fig. 6. Effects of varying concentrations of quinidine on the Na⁺ + K⁺ ATPase activity of rat brain microsomal fraction. [Incubation medium contained 50 mM Tris-Cl (pH 7.4), 1.5 mM MgCl₂, 100 mM Na⁺, 1.5 mM ATP, 0.1 mM EDTA and 5 or 30 mM KCl].

6. Na⁺-K⁺ ATPase 활성에 미치는 quinidine의 효과

Quinidine의 농도를 0.1에서 1.5 mM 까지 변동시켜 5 mM K⁺과 30 mM K⁺ 존재시 Na⁺-K⁺ ATPase 활성에 미치는 영향을 관찰하여 제 6 도에 나타내었다. 여기서 보는 바와 같이 30 mM K⁺ 존재시 보다 저 농도인 5 mM K⁺ 존재시에 quinidine의 농도 증가에 따라 Na⁺-K⁺ ATPase 활성이 더욱 현저히 억제되었다.

7. K⁺-dependent p-nitrophenylphosphatase 활성에 미치는 quinidine의 효과

Quinidine의 농도를 0.1에서 1.5 mM 까지 달리하여 5 mM K⁺과 30 mM K⁺ 존재시 K⁺-dependent p-nitrophenylphosphatase 활성에 미치는 영향을 관찰하여 그 성적을 제 7 도에 나타내었다. Medium의 조성은 앞서 이 효소 활성에 관한 실험때와 동일하다.

제 7 도에 보는 바와 같이 30 mM K⁺이나 5 mM K⁺ 존재시 공히 이 phosphatase 활성이 현저히 억제되었으며, 저농도의 K⁺(5 mM) 존재시에 더 심히 억제되었다. 그리고 앞서 실험 6의 quinidine의 Na⁺-K⁺ ATPase 활성에 미치는 영향과 비교하여 보면 같은 K⁺과

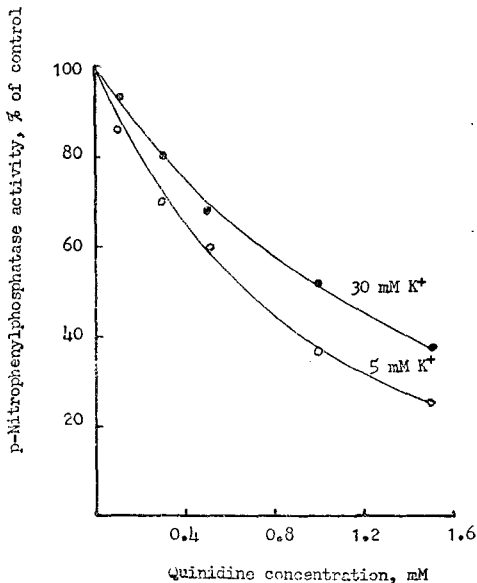


Fig. 7. Effects of varying concentrations of quinidine on the K⁺-dependent p-nitrophenylphosphatase of rat brain microsomal fraction. [Incubation medium contained 50 mM Tris-Cl buffer (pH 7.4), 5 mM MgCl₂, 5 or 30 mM KCl, 20 mM NaCl, 4 mM p-nitrophenylphosphate, 1 mM EDTA and various concentrations of quinidine].

quinidine 농도하에서 Na⁺-K⁺ ATPase 보다 p-nitrophenylphosphatase 활성이 더 현저히 억제되었다.

고 찰

Skou¹⁾에 의하여 membrane-bound Na⁺-K⁺ ATPase가 발견되어, 그 후 여러 업적을^{27,28)} 보면, 이 효소군은 혈장막을 통한 Na⁺과 K⁺의 energy dependent translocation과 밀접한 관련이 있다고 주장되고 있다.

그러나 이온 이동에 대한 이 효소 활성의 밀접한 관련기전은 아직 확실히 밝혀지지 않고 있다.

Albers²⁹⁾에 의하면 ATP분해는 최소 두 단계를 내포하고 있다고 한다. 하나는 효소의 Na⁺ dependent phosphorylation이고, 다른 한 단계는 형성된 acylphosphate(E~P)의 K⁺에 의한 분해이다.

위의 연구를 바탕으로 Na⁺과 K⁺의 능동적 이동에 대한 제시된 기전으로 혈장막내에서 E~P의 전환과 이온 이동과를 관련 짓는데 이르게 되었다²⁹⁾. 그러나 실제로 기능적으로 완전한 막에서 이 전환과 이온 이동 사이의 관련을 입증하기는 불가능하다.

최근 Askari 및 Koyal¹⁶⁾의 보고에 의하면 Na⁺-K⁺ ATPase 표본에 의한 단순한 유기 인산(acetyl-phosphate 및 p-nitrophenylphosphate)의 K⁺에 의한 분해는 ATPase 군내에서 E~P의 K⁺에 의한 분해와 비등할 것이라는 가설을 강력히 지지하기에 이르렀다.

Askari 및 Rao¹⁸⁾는 Na⁺의 ouabain sensitive efflux는 Na⁺을 함유하고 있지 아니한 medium에 p-nitrophenylphosphate와 K⁺이 첨가될때 시작되고 또한 Na⁺ efflux는 Na⁺을 함유하고 있는 medium에 K⁺, p-nitrophenylphosphate 및 nucleotide의 동시적인 존재를 요한다고 하였고, Na⁺ efflux가 촉진될 때 p-nitrophenylphosphate 분해가 증가됨을 보고하였다. 이와같은 사실로 보아 p-nitrophenylphosphatase는 이온의 이동과 밀접한 관련을 갖고 있음을 짐작할 수 있겠다.

K⁺이 p-nitrophenylphosphatase 활성에 미치는 효과를 관찰한 실험에서 Na⁺과 oligomycin이 존재하지 않을시 이 효소 활성은 저 농도의 K⁺에서 현저히 활성화되었으며, Na⁺과 oligomycin이 존재시에는 그 활성 정도가 경미함을 알 수 있었다.

ATP나 Na⁺ 단독 첨가시에는 K⁺-dependent phosphatase를 억제한다고 하는데^{14,15)}, 본 실험에서 ATP나 Na⁺을 함께 첨가시에는 저 농도의 K⁺에서 이 효소 활성을 증가시켰는데 이와 같은 결과는 K⁺과 이 효소와의 친화성이 ATP와 Na⁺ 존재시에 증가되는 것으로

사료된다.

Askari 및 Koyal¹⁶⁾과 Inturrisi 및 Titus³⁰⁾에 의하면 oligomycin 은 Na⁺-K⁺ ATPase 를 억제하나 K⁺-dependent p-nitrophenylphosphatase 에는 영향을 주지 않는다고 한다.

K⁺ 농도를 일정하게 하고 Na⁺ 농도를 변동하면서 oligomycin 의 phosphatase 에 미치는 활성효과를 관찰하였던바 oligomycin 의 활성효과에는 적절한 Na⁺농도가 존재함을 알 수 있었다.

p-Nitrophenylphosphatase 에 미치는 oligomycin 의 영향을 관찰한 실험에서 Na⁺과 ATP 존재로 증가된 K⁺-dependent p-nitrophenylphosphatase 는 부분적으로 oligomycin 에 감수성이 있음을 보았다. 이와 같은 결과는 두가지로 해석되는데 즉 oligomycin 이 이 효소에 Na⁺과 ATP 의 활성 효과를 방해하는 것과 이 효소가 단지 Na⁺과 ATP 존재시에 oligomycin 감수성을 요하는 것 등인데 첫째 해석이 보다 적절한 해석이라고 사료된다.

Ouabain 은 정형적인 Na⁺-K⁺ ATPase 의 억제제로 알려져 있는 바³¹⁾, 본 실험에서 ouabain 은 K⁺-dependent phosphatase 를 억제하였다. 그런데 ouabain 에 대한 K⁺-dependent p-nitrophenylphosphatase 활성도의 감수성은 Na⁺과 ATP 의 첨가에 의하여 더욱 증가되었고, 특히 100 mM Na⁺존재시에 현저하였는데 이는 K⁺-dependent acetylphosphatase¹⁵⁾의 활성과 유사함을 보여 주었다.

Matsui 및 Schwartz³²⁾에 의하면 Na⁺-K⁺ ATPase 표본에 대한 심장배당체(cardiac glycoside)의 결합은 Na⁺과 nucleotide 에 의하여 생긴 구조적 변화에 기인한다고 한다.

본 실험 결과에서 Na⁺과 ATP 존재시 증가된 효소활성이 이 효소의 친화성이 관련될 것이라고 생각되고 이때 증가된 효소활성은 ouabain 에 의하여 억제되었는데, 그것은 일반적으로 ouabain 과 K⁺의 작용부위는 동일한 것으로 생각되기 때문이다.

Na⁺과 nucleotide 가 효소의 구조적 변화를 일으키는 과정에는 두가지 가능성이 있는데, 하나는 phosphorylated intermediate 의 형성이 K⁺에 대한 효소의 친화성을 증가시키는것 같고, 다른 하나의 가능성은 nucleotide 가 phosphorylation 없이 효소와의 결합에 의하여 효과기로서 효소에 직접 작용하는 것 등을 들 수 있겠다.

Quinidine 은 Na⁺-K⁺ ATPase 를 강력히 억제한다³³⁾ 함은 이미 알려진 사실이다. 이 실험에 있어서는 좀더 자세히 quinidine 이 Na⁺-K⁺ ATPase 와 p-nitrophenylphosphatase 에 미치는 억제 효과를 비교관찰하고 저

농도와 고 농도의 K⁺존재시 억제 효과도 실험하였다. Quinidine 은 Na⁺-K⁺ ATPase 와 p-nitrophenylphosphatase 를 현저히 억제하였는데, 이 억제 효과는 K⁺의 농도를 5 mM 에서 30 mM 로 증가함에 따라 quinidine 에 의한 억제 효과는 감소되어 길항적으로 나타났다. 그리고 같은 K⁺농도에서 p-nitrophenylphosphatase 가 Na⁺-K⁺ ATPase 보다 더 현저히 억제되었는데 이와같은 결과는 K⁺-dependent p-nitrophenylphosphatase 의 quinidine 에 대한 감수성이 Na⁺-K⁺ ATPase 보다 더 크다는 것을 의미한다고 생각된다.

이상의 여러가지 실험결과를 종합하여 보건데 Cotterrell 및 Whittam³⁴⁾이 시사한바와 같이 여러가지 이론(異論)에도 불구하고 Na⁺펌프에 의한 p-nitrophenylphosphate 의 분해와 ATP 분해와의 사이에는 밀접한 관련이 있는 것으로 사료된다.

결 론

저자는 백서 뇌 microsome 분획내 K⁺-dependent p-nitrophenylphosphatase 활성에 미치는 몇몇 이온과 약물의 영향과 Na⁺-K⁺ ATPase 활성과의 관련을 실험하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. K⁺-dependent p-nitrophenylphosphatase 는 저농도의 K⁺에 의하여 현저히 활성화 되었으며, Na⁺과 oligomycin 존재시 는 그 활성도가 훨씬 경미하다.
2. Na⁺과 ATP 의 첨가는 저농도의 K⁺에서 K⁺-dependent p-nitrophenylphosphatase 를 현저히 활성화한다.
3. Na⁺과 저농도의 K⁺존재시 oligomycin 은 p-nitrophenylphosphatase 를 활성화 한다.
4. Oligomycin 은 Na⁺과 ATP 에 의하여 증가된 효소활성을 억제한다.
5. Ouabain 은 ATP 와 Na⁺존재시에 존재치 않을시 보다 더 K⁺-dependent p-nitrophenylphosphatase 활성도를 억제한다.
6. Quinidine 은 Na⁺-K⁺ ATPase 와 p-nitrophenylphosphatase 모두 심히 억제한다. 이 약물의 억제 효과는 K⁺농도를 증가함에 따라 부분적이나마 길항한다. 그리고 이 약물에 대한 K⁺-dependent p-nitrophenylphosphatase 의 감수성은 Na⁺-K⁺ ATPase 보다 더 높다.

REFERENCES

- 1) Skou, J.C.: *The influence of some cations on an*

- adenosine triphosphatase from peripheral nerves.*
Biochim. Biophys. Acta 23:394, 1957
- 2) Post, R.L., Merritt, C.R., Kinsolving, C.R. and Albricht, C.D.: *Membrane adenosine triphosphatase as a participant in the active transport of sodium and potassium in the human erythrocytes.* *J. Biol. Chem.*, 235:1796, 1960.
 - 3) Dunham, E.T. and Glynn, I.M.: *Adenosine triphosphatase activity and the active movement of alkali metal ions.* *J. Physiol.*, 156:274, 1961.
 - 4) Skou, J.C.: *Further investigations on Mg^{2+} , Na^{+} -activated ATPase, possibly related to the active, linked transport of Na^{+} and K^{+} across the nerve membrane.* *Biochim. Biophys. Acta* 42:6, 1960.
 - 5) Landon, E.J. and Norris, J.L.: *Sodium and potassium dependent adenosine triphosphatase activity in a rat kidney endoplasmic reticulum fraction.* *Biochim. Biophys. Acta* 71:266, 1963.
 - 6) Charnock, J.S. and Post, R.L.: *Studies of the mechanism of cation transport. I. The preparation and properties of a cation stimulated adenosine-triphosphatase from guinea pig kidney cortex.* *Aust. J. Exptl. Biol. Med. Sci.*, 41:547, 1963.
 - 7) Wheeler, K.P. and Whittam, R.: *Some properties of a kidney adenosine triphosphatase relevant to active cation transport.* *Biochem. J.*, 85:495, 1962.
 - 8) Bonting, S.L., Simon, K.A. and Hawkins, N.M.: *Studies on sodium-potassium-activated adenosine triphosphatase. I. Quantitative distribution in several tissues of the cat.* *Arch. Biochem. Biophys.*, 95:416, 1961.
 - 9) Hokin, M.P.: *Studies on a $Na^{+}+K^{+}$ -dependent, ouabain-sensitive adenosine triphosphatase in the avian salt gland.* *Biochim. Biophys. Acta* 77:108, 1963.
 - 10) Glynn, I.M.: *An adenosine triphosphatase from electric organ activated by sodium and potassium and inhibited by ouabain and oligomycin.* *Biochem. J.*, 84:79, 1962.
 - 11) Matsui, H. and Schwartz, A.: *Purification and properties of a highly active ouabain-sensitive $Na^{+}K^{+}$ dependent adenosinetriphosphatase from cardiac tissue.* *Biochim. Biophys. Acta* 128:380, 1966.
 - 12) Auditore, J.V. and Murray, L.: *Cardiac (microsomal) $Na^{+}K^{+}$ adenosinetriphosphatase and its possible relationship to the active $Na^{+}K^{+}$ transport system.* *Arch. Biochem. Biophys.*, 99:372, 1962.
 - 13) Katz, A.I. and Epstein, F.H.: *The physiological role of sodium-potassium activated adenosine triphosphatase in the active transport of cations across biological membranes.* *Israel J. Med. Sci.* 3:155, 1967.
 - 14) Nagai, K., Izumi, F. and Yoshida, H.: *Studies on potassium dependent phosphatase: its distribution and properties.* *J. Biochem.*, Tokyo, 59:295, 1966.
 - 15) Israel, Y. and Titus, E.: *A comparison of microsomal ($Na^{+}+K^{+}$)-ATPase with K^{+} acetylphosphatase.* *Biochim. Biophys. Acta* 139:150, 1967.
 - 16) Askari, A. and Koyal, D.: *Different oligomycin sensitivities of the $Na^{+}+K^{+}$ -activated adenosinetriphosphatase and its partial reactions.* *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 32:227, 1968.
 - 17) Whittam, R. and Wheeler, K.P.: *Transport across cell membranes.* *Ann. Rev. Physiol.*, 32:21, 1970.
 - 18) Askari, A. and Rao, S.N.: *Functional organization of the partial reactions of $Na^{+}+K^{+}$ -activated ATPase within the red cell membrane.* *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 36:631, 1969.
 - 19) Charnock, J.S., Rosenthal, A.S. and Post, R.L.: *A phosphorylated intermediate compound in ATP-dependent sodium and potassium transport.* *Fed. Proc.*, 22:212, 1963.
 - 20) Albers, R.W., Fahn, S. and Koval, G.J.: *The role of sodium ions in the activation of electrophorus electric organ adenosine triphosphatase.* *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, 50:474, 1963.
 - 21) Bader, H. and Sen, A.K.: *K^{+} -dependent acyl phosphatase as part of the ($Na^{+}+K^{+}$)-dependent*

- ATPase of cell membranes. Biochim. Biophys. Acta* 118:116, 1966.
- 22) Inesi, G., Ebashi, S. and Watanabe, S.: *Preparation of vesicular relaxing factor from bovine heart tissue. Am. J. Physiol.*, 207:1339, 1964.
- 23) Lynch, M.J., Raphael, S.S. and Mellor, L.D.: *Weichselbaum Biuret reagent: Medical laboratory technology and clinical pathology. 2nd ed., Philadelphia, Saunder, p. 204, 1969.*
- 24) Bessey, O.A., Lowry, O.H. and Brock, M.J.: *A method for the rapid determination of alkaline phosphatase with five cubic millimeters of serum. J. Biol. Chem.*, 164:321, 1946.
- 25) Fiske, C.H. and Subbarow, Y.: *The colorimetric determination of phosphorus. J. Biol. Chem.*, 66:375, 1925.
- 26) Lee, K.S. and Yu, D.H.: *A study of the sodium and potassium activated ATPase activity of heart microsomal fraction. Biochem. Pharmac.*, 12:1253, 1964.
- 27) Skou, J.C.: *Enzymatic aspects of active linked transport of Na and K through the cell membrane. Progress Biophys.*, 14:131, 1964.
- 28) Albers, R.W.: *Biochemical aspects of active transport. Ann. Rev. Biochem.*, 36:727, 1967.
- 29) Mitchell, P.: *In Advances in Enzymology, Vol. 29, F.F. Nord, Ed., New York, Interscience, p. 33, 1967.*
- 30) Inturrisi, C.E. and Titus, E.: *Kinetics of oligomycin inhibition of sodium-and potassium-activated adenosine triphosphatase from beef brain. Mol. Pharmacol.*, 4:591, 1968.
- 31) Glynn, I.M.: *The action of cardiac glycosides on ion movements. Pharmac. Rev.*, 16:381, 1964.
- 32) Matsui, H. and Schwartz, A.: *Mechanism of cardiac glycoside inhibition of the (Na⁺-K⁺)-dependent ATPase from cardiac tissue. Biochim. Biophys. Acta* 151:655, 1968.
- 33) Kennedy, K.G. and Nayler, W.G.: *The effect of quinidine on the activity of a sodium-potassium activated magnesium-dependent ATPase enzyme: isolated from toad cardiac muscle. Biochim. Biophys. Acta* 110:174, 1965.
- 34) Cotterrell, D. and Whittam, R.: *The uptake and hydrolysis of p-nitrophenyl phosphate by red cells in relation to ATP hydrolysis by the sodium pump. J. Physiol.*, 223:773, 1972.