

토끼 적혈구막의 NaK ATPase의 활성화도에 대한 aconite의 작용

경희대학교 의과대학 생리학교실

고 일 섭

=Abstract=

Action of Aconite on Sodium-Potassium Activated ATPase in Rabbit Red Cell Membrane

Il Sup Koh

*Department of Physiology, School of Medicine, Kyung Hee University
Seoul, Korea*

The action of aconite on the sodium plus potassium activated ATPase activity in the rabbit red cell membrane has been investigated and the experiments were also designed to determine the mechanism of action of aconite on the ATPase activity. The following results were observed.

1. The activity of the NaK ATPase from red cell membrane is stimulated by aconite, and the concentration of aconite for maximal activity is about 80 mg%. The pH optimum for the aconite sensitive component is 8.0.
2. The activating effect of aconite on the ATPase, with a given concentration of sodium in the medium, is increased by raising the potassium concentration but activity ratio is decreased.
3. The activating effect of aconite on the ATPase, with a given concentration of potassium in the medium, is increased by raising the sodium concentration but activity ratio is decreased.
4. The action of aconite on the ATPase activity is inhibited by calcium ions and the effect of inhibition is increased by small amounts of calcium but decreased by larger amounts.
5. The activating effect of aconite on the ATPase was not related to the sulfhydryl group of cysteine, the amino group of lysine, the hydroxyl group of threonine or the imidazole group of histidine.
6. The action of aconite on the ATPase activity is due to carboxyl group of the enzyme of NaK ATPase.

서 론

신경이나 적혈구에서 Na 이온을 세포막 밖으로 K 이온을 세포막 안으로 전기 화학적 농도구배에 역행하여 이동하는 이온의 능동적 운반은 세포안에서 이루어지는 해당작용으로 형성된 adenosine triphosphate (ATP)

의 분해과정에서 유리되는 에너지를 사용하고 있다는 것은 널리 인정되고 있다¹⁻⁷.

세포막에서 이루어지는 이 이온의 능동적 운반은 사람 적혈구에서 한 분자의 ATP가 분해할 때 3개의 Na 이온을 세포막 밖으로 2개의 K 이온을 세포막 안으로 능동적 운반을 하고 있다는 것을 여러 연구자들에 의하여 주장되고 있는 것이다⁸⁻¹⁰.

Show는 계의 말초신경에서 Na 이온과 K 이온을 동시에 첨가하였을 때에 활성화되는 adenosinetriphosphatase (NaK ATPase)가 있다는 것을 발견하고 이 효소가 세포막에서 이루어지는 이온의 능동적 운반과 밀접한 관계를 가지고 있다고 처음으로 암시하였다¹¹⁾. 그후 적혈구막에서도 Na 이온과 K 이온을 동시에 첨가하였을 때에 활성화되는 ATPase가 있으며 이 효소와 세포막에서 이루어지는 Na 이온과 K 이온의 능동적 운반과 밀접한 관계를 가지고 있다는 것을 여러 연구자들에 의하여 주장되었다^{9, 12-14)}.

적은 농도의 ouabain은 이온의 능동적 운반을 억제하고 같은 농도의 ouabain은 여러 조직에서 Na 이온과 K 이온으로 활성화되는 ATPase의 활성도도 억제하고 있으므로 이같은 ouabain의 작용은 이온의 능동적 운반과 이 효소가 서로 관계를 가지고 있다는 것을 제시하고 있는 것이다¹⁵⁻¹⁸⁾.

세포막에서 이온의 능동적 운반과 밀접한 관계를 가지고 있는 Na 이온과 K 이온을 동시에 첨가하였을 때에 활성화되는 ATPase의 활성도에 대한 aconite의 작용은 아직 알려져 있지 않으므로 본실험에서는 토끼 적혈구로 ghost 세포를 만들어 세포막만을 분리하여 세포막내에 있는 Na 이온과 K 이온으로 활성화되는 ATPase의 활성도에 대한 aconite의 작용을 구명하고 그 작용기전도 아울러 실험하였다.

실험방법

체중 2kg 내외의 성숙한 토끼를 성의 구별없이 사용하였다. 심장 침자로 채혈한 혈액을 heparin으로 응고를 방지하여 15분간 1,000xg로 원심분리한 다음 혈장과 백혈구층을 제거하였다. 적혈구만을 모아서 생리 식염수로 2회 원심조작으로 세척한 다음 다시 등장성 MgCl₂용액에 1mM EDTA를 함유한 용액으로 2회 세척하였다.

이렇게 세척된 적혈구만을 모아서 혈액소의 부착이 없는 적혈구막(hemoglobin-free ghosts)을 얻기 위하여 Resenberg¹⁹⁾등의 방법에 따라서 30배 용량의 15 mOsM Tris-HCl buffer (pH 7.5, 8.5mM Tris-6.5 mM HCl 혼합액)를 첨가하여 4°C에서 한시간 동안 방치하였다.

이렇게 용혈된 적혈구를 4°C에서 10,000xg로 15분간 원심분리한 다음 상등액을 제거하여 막분획만을 얻었다. 침전된 막분획을 다시 15 mOsM Tris-HCl buffer 용액에 1mM EDTA를 혼합한 용액으로 2회 원

심조작으로 세척한 다음 15mOsM Tris-HCl buffer 용액으로 1회 세척하였다. 이렇게 해서 얻은 막분획은 혈액소의 부착이 없는 유백색의 단분획이었으며 이것을 본실험에 사용하였다.

ATPase의 활성도는 Dunham¹⁴⁾등의 방법에 따라서 측정하였다. 10ml의 여러 실험관에 막분획과 여러 반응액을 각각 0.1ml씩을 첨가하고 증류수로 조절하여 총량을 1ml로 하여 44°C에서 한시간 동안 water bath에 부치하였다. 여러 실험관에 막분획과 여러 반응액을 넣은 다음 15mM ATP를 가할 때는 15초 간격으로 첨가하고 한시간 동안 반응을 시킨 다음에는 다시 15초 간격으로 얼음으로 냉각시킨 물속으로 실험관을 이동시켜서 1분간 냉각시켰다.

다시 얼음으로 냉각된 10% trichloroacetic acid를 1ml씩을 같은 시간 간격으로 첨가하여서 반응을 정지시킨 다음 15분간 1,000xg로 원심분리하여 단백질을 침전시키고 그 상등액 1.5ml내에 유리된 inorganic phosphate를 Fiske-Subbarow²⁰⁾법에 의하여 측정하여 ATPase의 활성도를 나타내었다.

본실험에 사용된 aconite는 aconitum napellus의 건조된 뿌리를 세척하여 methanole을 첨가하여 54시간 가열하여 추출하였다. 이 추출액을 다시 30~40°C에서 16시간 건조시켜서 추출물을 얻어 0.2M HCl 용액에 용해시켜서 증류수를 희석하여 본실험에 사용하였다.

실험성적

1. Aconite의 농도의 영향

반응액내의 aconite의 농도를 0에서 120 mg%까지 증가시켜서 NaK ATPase의 활성도에 미치는 영향을 제 1도에 도시하였다.

반응액내의 aconite의 농도를 0에서 80 mg%까지 증가시키면 NaK ATPase의 활성도는 농도의 증가에 따라서 증가하나 80 mg%에서 120 mg%까지의 농도의 증가에 따라서는 활성도의 증가는 나타나지 않고 거의 일정한 활성도를 나타내었다.

Aconite는 NaK ATPase의 활성도를 촉진시키는 작용이 있으며 활성도에 대한 최적농도는 80 mg%이다.

2. pH의 영향

제 2도에는 aconite 60 mg%를 작용시켰을 때와 aconite를 작용시키지 않았을 때의 pH의 영향을 도시하

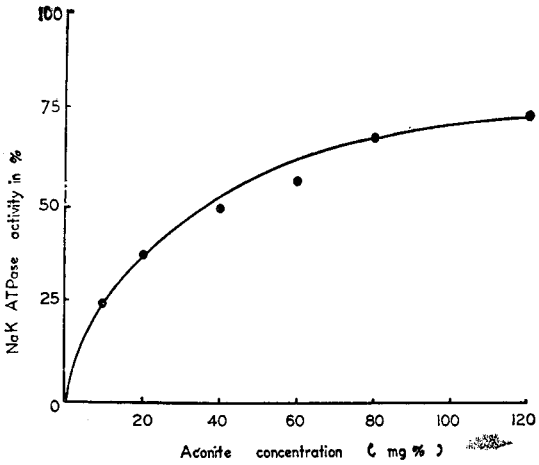


Fig. 1. The effect of aconite concentration on the ATPase activity of red cell ghosts. Temp. 44°C; pH 8.0; ATP 1.5mM; Mg 2mM; Na 80mM; K 17 mM; Duration 1 hr.

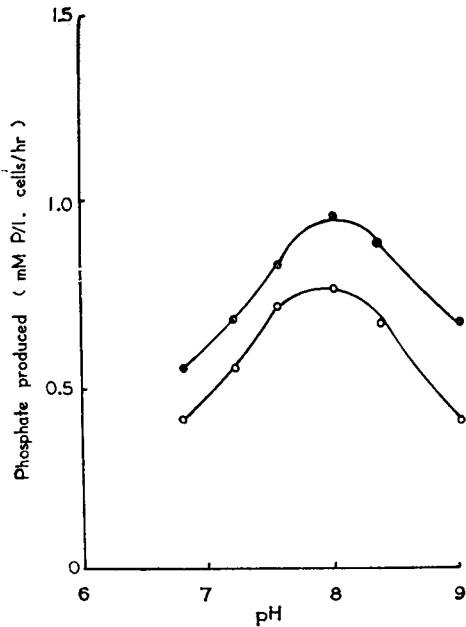


Fig. 2. The effect of pH on the ATPase activity of red cell ghosts. Temp. 44°C; ATP 1.5 mM; Mg 2 mM; Na 80 mM; K 17 mM; Duration 1 hr. ○ aconite absent; ● aconite 60mg%.

였다.

이 실험에서 용액의 pH는 0.2M Tris와 0.2M HCl을 혼합하여 pH를 6.8에서 9.0까지 변동시켜서 NaK ATPase의 활성도의 변동을 측정하였다. 반응액내의 pH의 변동에 따라 NaK ATPase의 활성도는 aconite

를 작용시켰을 때와 시키지 않았을 때의 별다른 차이를 나타내지 않았으며 최적 pH는 8.0이었다.

3. K 이온의 농도의 영향

반응액 내의 Na 이온의 농도를 일정하게 유지하고 K 이온의 농도를 변동시키면서 ATPase의 활성도의 변동과 여기에 일정농도의 aconite를 첨가하였을 때에 나타나는 ATPase의 활성도의 변동을 관찰한 실험을 제 3 도에 도시하였다. 반응액 내의 Na 이온의 농도를 80 mM로 일정하게 유지하고 K 이온의 농도를 0에서 32 mM까지 증가시킨 실험에서 K 이온의 농도가 8mM에 도달할 때까지는 ATPase의 활성도는 점차적으로 증가되나 그 이상의 농도에서는 농도증가에 따라서 효소

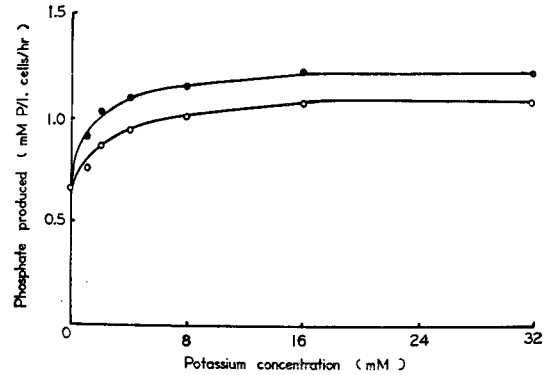


Fig. 3. The effect of potassium concentration on the ATPase activity of red cell ghosts in the presence and absence of aconite. Temp. 44°C; pH 8.0; ATP 1.5 mM; Mg 2 mM; Na 80 mM; Duration 1hr. ○ aconite absent; ● aconite 100 mg%.

Table 1. The effect of potassium concentration on activation by aconite of the ATPase activity of red cell ghosts

K concentration(mM)	ATPase activity(mM p /l. cells/hr.)	Activity in the presence of aconite (100mg%) (mMp/l. cells/hr.)	Activation (%)
0	0.66		
0.5	0.76(0.10)	0.90(0.14)	140.0
2	0.88(0.22)	1.02(0.14)	63.6
4	0.92(0.26)	1.10(0.18)	69.2
8	0.97(0.31)	1.14(0.17)	54.8
16	1.02(0.36)	1.19(0.17)	47.2
32	1.04(0.38)	1.21(0.17)	44.7

의 활성화도의 증가는 나타나지 않고 거의 일정하게 나타난다.

Aconite를 첨가하였을 때의 ATPase의 활성화도의 증가비율은 K이온의 농도를 증가시키는데 따라서 감소되었다(제 1 표)

4. Na 이온의 농도의 영향

제 4 도에는 반응액 내의 K이온의 농도를 일정하게 유지하고 Na 이온의 농도를 변동하여 ATPase의 활성화도의 변동과 여기에 일정농도의 aconite를 첨가하였을 때의 ATPase의 활성화도의 변동을 동시에 도시하였다.

반응액 내의 K이온의 농도를 17 mM로 일정하게 유지하고 Na 이온의 농도를 0에서 150 mM까지 증가

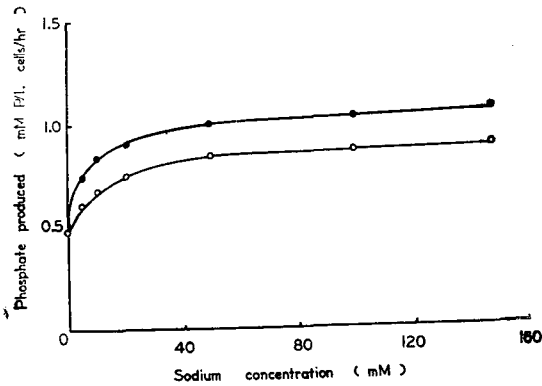


Fig. 4. The effect of sodium concentration on the ATPase activity of red cell ghosts in the presence and absence of aconite. Temp. 44°C; pH 8.0; ATP 1.5 mM; Mg 2 mM; K 17 mM; Duration 1 hr. ○ aconite absent; ● aconite 100 mg%.

Table 2. The effect of sodium concentration on activation by aconite of the ATPase activity of red cell ghosts

Na concentration(mM)	ATPase activity (mM p/l. cells/hr.)	Activity in the presence of aconite (100 mg%) (mM p/l. cells/hr.)	Activation (%)
0	0.49		
5	0.61(0.12)	0.76(0.15)	125.0
10	0.68(0.19)	0.83(0.15)	79.0
20	0.72(0.23)	0.88(0.16)	69.6
50	0.76(0.27)	0.92(0.16)	59.3
100	0.83(0.34)	0.98(0.15)	44.1
150	0.85(0.36)	1.00(0.15)	41.7

시키면 ATPase의 활성화도는 Na 이온의 농도가 50 mM에 도달할 때까지는 점차적으로 증가하나 그 이상의 농도에서는 농도의 증가에 따라서 활성화도는 증가되지 않고 일정하게 나타난다.

반응액 내의 aconite를 첨가하였을 때의 ATPase의 증가율은 Na 이온의 농도증가에 따라서 감소되었다(제 2 표).

5. Ca 이온의 농도의 영향

Ca 이온의 농도를 변동시키면 NaK ATPase의 활성화도에 미치는 영향과 여기에 일정농도의 aconite를 첨가하였을 때의 변동을 제 5 도에 도시하였다.

Ca 이온의 농도를 0에서 10 mM까지 증가시켜서 NaK ATPase의 활성화도의 변동을 관찰한 실험에서 Ca 이온의 농도가 0.1 mM에 도달할 때까지는 이 효소의 활성화도는 증가되나 더욱 농도를 증가시키면 활성화도는 억제되었다.

Ca 이온의 농도의 증가에 따라서 aconite의 작용으로 나타나는 NaK ATPase의 활성화도는 억제되었다. Ca 이온의 농도를 0.01 mM에서 0.1 mM까지 증가시키면 aconite의 작용으로 나타나는 NaK ATPase의 활성화도에 대한 억제작용은 증가되고 그 이상의 농도에서는 억제작용은 점차 감소되었다.

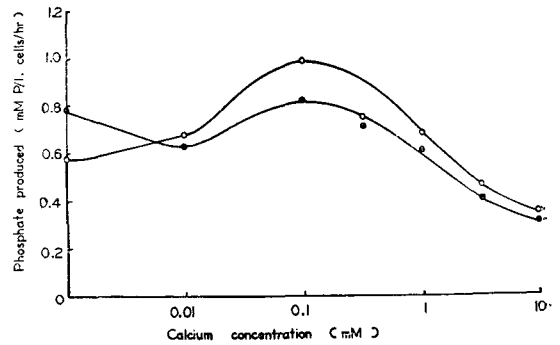


Fig. 5. The effect of calcium concentration on the ATPase activity of red cell ghosts in the presence and absence of aconite. Temp. 44°C; pH 8.0; ATP 1.5 mM; Mg 2 mM; Na 80 mM; K 17 mM; Duration 1 hr. ○ aconite absent; ● aconite 80 mg%.

6. Cysteine의 영향

NaK ATPase의 활성화도에 대한 aconite의 촉진작용에 cysteine을 작용시켜서 나타나는 영향을 본 실험을 제 6 도에 도시하였다.

이 실험에서 Na 이온과 K 이온을 동시에 첨가하면 Mg ATPase의 활성도는 증가되고 aconite의 첨가로 NaK ATPase의 활성도는 더욱 증가되었다. NaK ATPase에 cysteine만을 첨가하면 NaK ATPase의 활성도 보다 약간 증가되나 이 증가는 이 효소에 대한 cysteine의 보완작용에 기인되어 나타나는 현상으로 사료된다.

NaK ATPase에 aconite와 cysteine을 함께 작용하여 나타나는 NaK ATPase의 활성도는 NaK ATPase에 aconite만을 작용하였을 때 보다 약간 증가되나 cysteine만을 작용하였을 때의 나타나는 cysteine의 보완작용을 고려한다면 aconite의 NaK ATPase에 대한 촉진작용에는 cysteine은 아무 영향을 주지 않는 것으로 사료된다.

NaK ATPase의 활성도에 대한 aconite의 촉진작용에 cysteine의 SH기는 아무 관계가 없다는 것을 암시하고 있는 것이다.

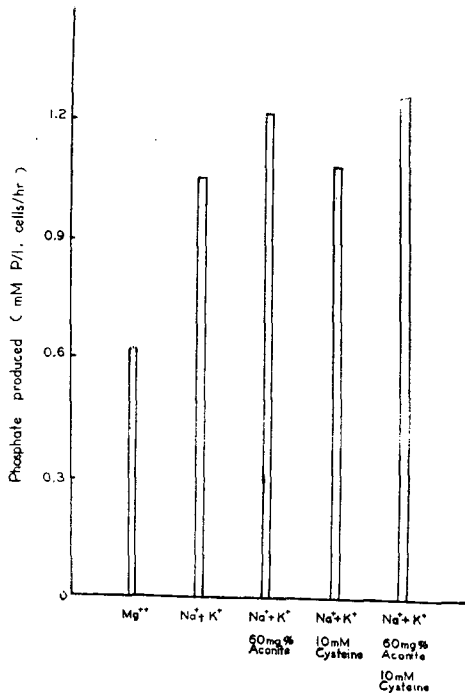


Fig. 6. The effect of cysteine in the presence of aconite on the ATPase activity of red cell ghosts. Temp. 44°C; pH 8.0; ATP 1.5mM; Mg 2 mM; Na 80 mM; K 17 mM; cysteine 10 mM; aconite 80 mg%. Duration 1 hr.

7. Lysine의 영향

Aconite의 작용으로 나타나는 NaK ATPase의 활

성도의 촉진작용에 대한 lysine의 첨가로 인한 영향을 관찰한 실험을 제 7도에 도시하였다.

이 실험에서 Na 이온과 K 이온을 동시에 첨가하였을 때 활성화되는 ATPase에 aconite를 첨가하면 NaK ATPase의 활성도는 현저한 촉진작용이 나타난다. NaK ATPase에 lysine만을 첨가하였을 때 나타나는 활성도는 lysine을 첨가하지 않았을 때의 NaK ATPase 활성도보다 약간 증가되어 있는데 이 증가는 이 효소에 대한 lysine의 보완작용에 기인하는 것으로 생각된다.

NaK ATPase에 lysine과 aconite를 동시에 작용하여 나타나는 활성도는 aconite만을 작용하였을 때의 NaK ATPase의 활성도 보다 약간 증가되나 lysine만을 NaK ATPase에 작용하였을 때 나타나는 보완작용을 고려한다면 aconite의 NaK ATPase에 대한 촉진작용에는 lysine은 아무 영향을 주지 않는 것으로 생각된다.

NaK ATPase의 활성도에 대한 aconite의 촉진작용에는 lysine의 amino기는 아무 관계가 없다는 것을 암시하고 있다.

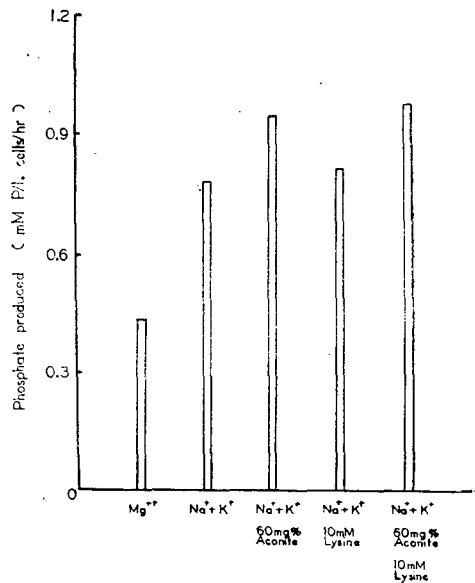


Fig. 7. The effect of lysine in the presence of aconite on the ATPase activity of red cell ghosts. Temp. 44°C; pH 8.0; ATP 1.5 mM; Mg 2 mM; Na 80 mM; K 17 mM; lysine 10 mM; aconite 60 mg%. Duration 1 hr.

8. Aspartic acid의 영향

NaK ATPase의 활성도에 대한 aconite의 촉진작용

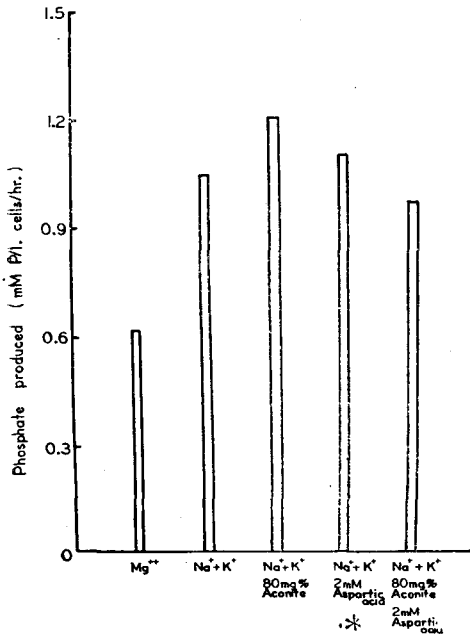


Fig. 8. The effect of aspartic acid in the presence of aconite on the ATPase activity of red cell ghosts. Temp. 44°C; pH 8.0; ATP 1.5 mM; Mg 2 mM; Na 80 mM; K; 17 mM; aspartic acid 2 mM; aconite 80 mg%. Duration 1 hr.

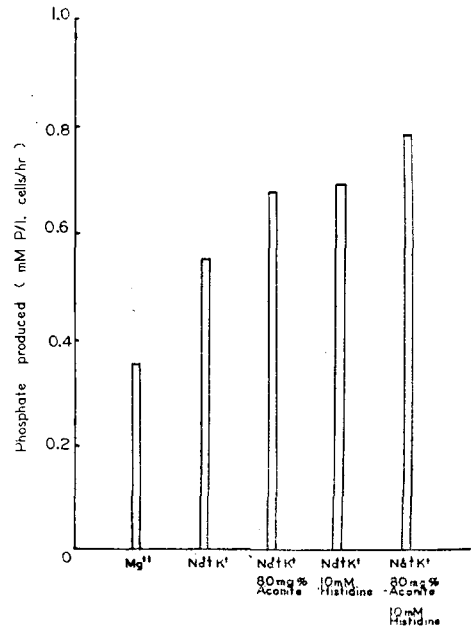


Fig. 9. The effect of threonine in the presence of aconite on the ATPase activity of red cell ghosts. Temp. 44°C; pH 8.0; ATP 1.5 mM; Mg 2 mM; Na 80 mM; K 17 mM; threonine 20 mM; aconite 80 m%. Duration 1 hr.

에 aspartic acid를 작용하여 나타나는 영향을 본 실험을 제 8도에 도시하였다.

Na 이온과 K 이온으로 활성화된 ATPase 에 aconite 만을 첨가하면 NaK ATPase 의 활성도 보다 현저한 촉진작용이 나타난다.

NaK ATPase 에 aspartic acid 만을 작용시키면 이 효소의 활성도는 NaK ATPase 의 활성도 보다 약간 증가되나 이것은 이 효소에 대한 aspartic acid 의 보완작용에 기인하는 것으로 생각된다.

NaK ATPase 에 aspartic acid 와 aconite 를 동시에 작용하였을 때에 나타나는 활성도는 NaK ATPase 에 aspartic acid 만을 첨가하여 나타나는 보완작용을 고려한다면 aconite 로 나타나는 NaK ATPase 의 활성도의 촉진작용은 aspartic acid 의 첨가로 현저한 억제작용이 일어나 있다는 것을 알 수 있다.

이는 NaK ATPase 의 활성도에 대한 aconite 의 촉진작용은 aspartic acid 가 함유하고 있는 COOH 기와 관계가 있다는 것을 암시하고 있는 것이다.

9. Threonine 의 영향

NaK ATPase 의 활성도에 대한 aconite 의 촉진작

용에 threonine 을 작용시켜서 나타나는 영향을 본 실험을 제 9도에 도시하였다.

이 실험에서 Na 이온과 K 이온을 동시에 첨가하였을 때의 활성화되는 NaK ATPase 에 threonine 만을 첨가하여 나타나는 활성도는 threonine 을 첨가하지 않았을 때의 NaK ATPase 의 활성도 보다 증가되나 이는 이 효소에 대한 threonine 의 보완작용으로 생각된다.

Threonine 과 aconite 를 동시에 첨가하였을 때의 NaK ATPase 의 활성도는 aconite 만을 첨가하였을 때의 NaK ATPase 의 활성도보다 증가되나 threonine 의 NaK ATPase 에 대한 보완작용을 고려한다면 threonine 의 첨가로 aconite 의 NaK ATPase 의 활성도를 촉진시키는 작용에는 아무 영향을 주지 못하는 것으로 생각된다.

이는 aconite 의 NaK ATPase 의 활성도에 대한 촉진작용에 threonine 이 함유하고 있는 OH기는 아무 영향을 주지 않는 것을 암시하고 있는 것이다.

10. Histidine 의 영향

Aconite 의 작용으로 나타나는 NaK ATPase 의 활성도에 대한 histidine 의 첨가로 인한 영향을 관찰한

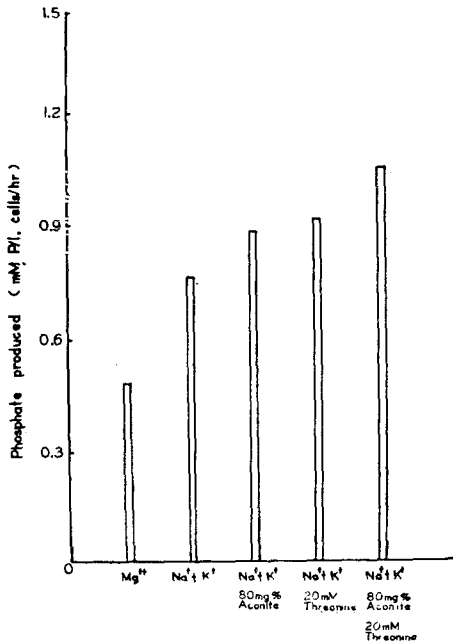


Fig. 10. The effect of histidine in the presence of aconite on the ATPase activity of red cell ghosts. Temp. 44°C; pH 8.0; ATP 1.5 mM; Mg 2 mM; Na 80 mM; K 17 mM; histidine 10 mM; aconite 80 mg%. Duration 1hr.

실험을 제10도에 도시하였다.

이 실험에서 histidine 만을 NaK ATPase 에 첨가하였을 때의 활성도는 histidine 을 첨가하지 않았을 때의 활성도 보다 증가되나 이것은 이 효소에 대한 histidine 의 보완작용으로 생각된다.

NaK ATPase 에 histidine 과 aconite 를 동시에 첨가하여 나타나는 활성도는 이 효소에 대한 histidine 의 보완작용을 고려한다면 aconite 만을 첨가하였을 때의 NaK ATPase 의 활성도와는 아무 차이를 나타내지 않았다.

이는 NaK ATPase 에 대한 aconite 의 촉진작용에는 histidine 이 함유하고 있는 imidazole 기가 아무 영향을 주지 않는 것을 암시하고 있는 것이다.

고 찰

세포막에 Na 이온과 K 이온을 동시에 첨가하였을 때에 활성화되는 ATPase 는 사람 적혈구나^{14,21)} squid 의 축삭돌기 접질²²⁾ 또는 콩팥의 세포관²³⁾과 간세포막²⁴⁾에서도 분리되며 이른 여러 조직의 세포막 내에 있는

ATPase 는 양적으로는 차이가 있으나 근본적으로는 같은 특징²⁵⁾을 가지고 있어 세포막에서 이루어지는 이온의 능동적 운반과 밀접한 관계를 가지고 있다는 사실은 여러 연구자들^{9,12-14)}이 주장하고 있다.

토끼 적혈구막에서도 Na 이온과 K 이온으로 활성화되는 ATPase 가 있으며 이 ATPase 의 활성도는 ATPase 의 작용으로 촉진되었다. Aconite 의 농도의 증가에 따라서 NaK ATPase 의 활성도는 증가되며 aconite 의 최적농도는 80 mg%이다.

세포막에서 Na 이온을 세포막 밖으로 K 이온을 세포막 안으로 능동적 운반하는 작용과 밀접한 관계가 있는 이 효소의 활성도를 aconite 가 촉진시키고 있다는 것은 aconite 가 세포막에서 이온의 능동적 운반을 촉진시키고 있다는 것을 암시하고 있는 것이다. 세포막에서 이온의 능동적 운반이 촉진되면 세포막 안의 K 이온의 농도가 증가가 일어나서 음이온을 중화시키게 되므로 세포막 안의 음이온의 감소가 일어나게 되고 이에 대응하여 세포막 밖의 양이온의 감소가 일어나게 되므로 세포막은 저분극상태가 되어서 막전위는 감소하게 되어서 세포는 흥분성이 증가되는 것으로 생각된다.

Whittam²⁶⁾, Glynn²⁷⁾과 Baker²⁸⁾등은 세포막의 효소계에는 Na 이온과 친화성을 가지고 활성화되는 반응부위와 K 이온과 친화성을 가진 반응부위가 있어 Na 이온의 반응부위는 세포막 내부측에 K 이온은 외부측에 놓여 있다고 주장한 바 있다. 한편 ghost 세포막은 Na 이온이나 K 이온에 대한 투과성이 높으므로 이들 이온들이 반응액내에 가해지면 친화성을 가진 부위와 작용하게 될 것이다.

반응액내의 K 이온의 농도를 증가시키면서 NaK ATPase 의 활성도의 변동을 본 실험에서 Na 이온의 농도를 일정하게 유지하고 K 이온의 농도만을 증가시키면 농도의 증가에 따라서 이 효소의 활성도는 증가되고 일정한 농도에 도달하면 활성도의 증가는 나타나지 않는다.

이 현상은 K 이온의 농도가 낮은 부위에서는 K 이온과 Na 이온의 농도비율은 낮아져 있어 Na 이온이 K 이온의 반응부위와 친환이 일어나서 일부의 K 이온의 반응부위는 Na 이온으로 점유될 것이나 K 이온의 농도가 낮으므로 활성화되는 K 이온의 반응부위는 일부분에 그치게 되어 이 효소의 활성도는 감소된다. K 이온의 농도가 높은 부위에서는 K 이온과 Na 이온의 농도비율은 높아지게 되어 Na 이온이 K 이온의 반응부위와 친환이 일어날 것이나 극히 적은 양밖에 이루어지지 못

하고 K이온의 농도증가로 인한 K이온의 반응부위가 활성화되므로 이 효소의 활성도는 증가되는 것으로 생각된다.

K이온의 농도를 증가시키는데 따라서 aconite의 작용으로 NaK ATPase의 활성도의 증가율을 감소되었다. K이온의 농도가 낮은 부위에서는 K이온과 Na이온의 농도비율은 낮아져 있어 Na이온이 K이온의 반응부위와 치환이 일어나서 일부의 K이온의 반응부위는 Na이온으로 점유될 것이나 K이온의 농도가 낮으므로 K이온의 반응부위는 일부밖에 활성화되지 못하므로 이 반응부위에 대한 aconite의 친화성이 높아져서 효소의 활성도를 증가시키고 K이온의 농도가 높은 부위에서는 K이온과 Na이온의 농도비율은 낮아지나 Na이온이 K이온의 반응부위와 일부 치환이 일어나서 점유될 것이나 K이온의 농도가 증가되어 가므로 K이온의 반응부위는 포화되므로 이 반응부위에 대한 aconite의 친화성이 감소되어 이 효소의 활성도의 증가율은 K이온의 농도를 증가시키는데 따라서 감소되는 것으로 사료된다.

반응액내의 K이온의 농도를 일정하게 유지하고 Na이온의 농도를 증가시키는데 따라서 NaK ATPase의 활성도의 변동을 본 실험에서 Na이온의 농도를 증가시키는데 따라서 이 효소의 활성도는 증가되나 일정농도에 도달하면 그 이상 Na이온의 농도를 증가시켜도 활성도는 증가되지 않았다. 이 현상은 Na이온의 농도가 낮은 부위에서는 K이온과 Na이온의 농도비율은 높아져서 K이온이 Na이온의 반응부위와 치환이 일어날 것이나 Na이온의 농도가 낮으므로 Na이온의 반응부위가 일부분 밖에 활성화시키지 못하므로 효소의 활성도는 감소되고 Na이온의 농도가 높은 부위에서는 K이온과 Na이온의 농도비율은 낮아져 있어서 Na이온이 K이온의 반응부위와 치환이 일어나겠으나 Na이온의 농도가 높으므로 Na이온의 반응부위가 포화되어서 이 반응부위가 활성화되므로 효소의 활성도는 증가되는 것으로 생각된다.

Na이온의 농도를 증가시키는데 따라서 aconite의 작용으로 NaK ATPase의 활성도의 증가율은 감소되었다. Na이온의 농도가 낮은 부위에서는 K이온과 Na이온의 농도비율은 높아져 있어 K이온이 Na이온의 반응부위와 일부치환이 될 것이나 Na이온의 농도 낮음으로 Na이온의 반응부위는 일부밖에 점유되지 못하게 되어 이 반응부위에 대한 aconite의 친화성이 증가되어 효소의 활성도를 증가시키고 Na이온의 농도나 높은 부위에서는 K이온과 Na이온의 농도비율은 낮아

있어 Na이온의 K이온의 반응부위와 치환이 일어날 것이나 Na이온의 농도가 높으므로 Na이온의 반응부위는 포화되어서 이 반응부위에 대한 aconite의 친화성이 낮아져서 효소의 활성도를 감소시키므로 Na이온의 농도의 증가에 따라서 효소의 활성도의 증가율은 감소되는 것으로 생각된다.

Aconite은 이 효소의 Na이온이나 K이온의 반응부위와 결합할 수 있다는 것을 암시하고 있다.

반응액내의 Ca이온의 농도를 증가시키면서 NaK ATPase의 활성도의 변동을 관찰한 실험에서 Ca이온의 농도가 낮은 부위에서 이 효소의 활성도가 증가되고 높은 농도에서는 활성도가 감소되며 Ca이온의 최적농도는 0.1 mM이다. 일정농도의 aconite를 작용시키고 Ca이온의 농도를 증가시키면서 NaK ATPase의 활성도의 변동을 관찰한 실험에서 Ca이온의 이 효소에 대한 aconite의 작용을 억제하는 작용을 한다. Ca이온의 농도가 낮은 부위에서는 억제작용이 증가되나 농도가 높은 부위에서는 억제작용이 감소되고 최적농도에서 현저한 억제작용이 나타난다.

반응액내에 cysteine, lysine, threonine 및 histidine을 각각 첨가하여 ghosts를 전처리한 다음 aconite를 작용시켜서 NaK ATPase의 활성도에 대한 작용을 관찰한 실험에서 aconite로 인한 촉진작용에는 아무 영향을 주지 못하였다. 이는 cysteine의 SH기나 lysine의 NH₂기 threonine의 OH기 및 histidine의 imidazole기가 이 효소에 대한 aconite의 촉진작용과 아무 관련을 가지고 있지 않다는 것을 뜻하는 것이다.

반응액내에 aspartic acid로 ghosts를 전처리한 다음 aconite를 첨가하여 NaK ATPase의 활성도에 대한 작용을 본 실험에서 aspartic acid의 전처리로 aconite의 이 효소에 대한 촉진작용이 현저하게 억제되었다. 이는 aspartic acid가 함유하고 있는 COOH기가 aconite의 NaK ATPase의 활성도를 촉진시키는 작용과 관계가 있다는 것을 암시하는 것이다. 이 실험 결과는 aconite의 NaK ATPase의 활성도를 촉진시키는 작용은 이 효소내에 있는 COOH와 결합하여 나타나는 현상이라는 것을 암시하는 것이다.

Aconite은 세포막 내에 있는 NaK ATPase의 활성도를 촉진시키는 것으로 미루어 보아 이 효소와 밀접한 관계가 있는 Na이온을 세포막 밖으로, K이온을 세포막 안으로 능동적 운반을 하는 작용을 촉진시켜서 세포막의 흥분성을 증가시키는 작용이 있다는 것을 암시하고 있으며 이 같은 작용은 이 효소내의 COOH기가 관여되는 것으로 사료된다.

결 론

세포막 내에 있는 Na 이온과 K 이온으로 활성화되는 ATPase에 대한 aconite의 작용을 알고자 토끼 적혈구로 ghost 세포를 만들어 NaK ATPase에 대한 aconite의 작용과 작용기전도 아울러 실험하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1) Aconite은 NaK ATPase에 작용하여 활성도를 촉진시킨다. Aconite의 최적농도는 약 80 mg%이다. 이 효소에 대한 aconite의 작용은 pH의 영향을 받으며 최적 pH는 8.0이다.

2) K이온의 농도증가로 NaK ATPase의 활성도에 대한 aconite의 작용은 증가되거나 증가율은 감소되었다.

3) Na 이온의 농도증가로 NaK ATPase의 활성도는 증가되거나 증가율은 감소되었다.

4) Ca 이온으로 NaK ATPase의 활성도에 대한 aconite의 작용은 억제되었으며 Ca 이온의 낮은 농도에서 억제작용은 증가되거나 높은 농도에서 감소되었다.

5) Aconite의 NaK ATPase의 활성도를 촉진시키는 작용에는 SH, NH₂, OH 및 imidazole기 등은 아무 영향을 주지 않는다.

6) Aconite의 NaK ATPase의 활성도를 촉진하는 작용은 이 효소내의 COOH기와 관계된다.

REFERENCES

- 1) Caldwell, P.C. and Keynes, R.D.: *The utilization of phosphate bond energy for sodium extrusion from giant axon. J. Physiol* 137 :12, 1957.
- 2) Caldwell, P.C., Hodgkin, A.L. and Shaw, T.J.: *Injection of compound containing energy-rich phosphate bond into giant nerve fibres J. Physiol.* 147:18, 1959.
- 3) Caldwell, P.C.: *The phosphorous metabolism of squid axons and its relationship to the active transport of sodium. J. Physiol.* 152:545, 1960.
- 4) Caldwell, P.C., Hodgkin, A.L., Keynes, R.D. and Shaw, T.J.: *The effects of injecting energy-rich phosphate compounds on the active transport of ions in the giant axon of loligo, J. Physiol* 152:561, 1960.
- 5) Dunham, E.T.: *Linkage of active cation transport to ATP utilization. Physiologist* 1: 23, 1957.
- 6) Whittam, R.: *Potassium movements and ATP in human red cells. J. Physiol.* 140:479, 1958.
- 7) Hoffman, J.F.: *The link between metabolism and the active transport of Na in human red cell ghosts. Fed. Proc.* 19:127, 1960.
- 8) Sen, A.K., and Post, R.L.: *Stoichiometry and localization of adenosine triphosphate-dependent sodium and potassium transport in the erythrocyte. J. Biol. Chem.* 239:345, 1964.
- 9) Whittam, R., and Ager, M.E.: *Connexion between active cation transport and metabolism in erythrocytes. Biochem. J.* 97:214, 1965.
- 10) Garrahan, P.J., and Glynn, I.M.: *The stoichiometry of the sodium pump. J. Physiol.* 192 :217, 1967.
- 11) Shou, J.C.: *Influence of some cations on adenosine triphosphatase from peripheral nerves. Biochem et biophys acta.* 23:394, 1957.
- 12) Post, R.L., and Jolly, P.C.: *Linkage of sodium, potassium and ammonium active transport across the human erythrocyte membrane. Biochem. Biophys. Acta* 25:119, 1957.
- 13) Tosteson, D.C., and Hoffman, J.F.: *Regulation of cell volume by active cation transport in high and low potassium sheep red cells. J. Gen. Physiol.* 44:442, 1962.
- 14) Dunham, E.T., and Glynn, I.M.: *Adenosinetriphosphatase activity and active movements of alkali metal ions. J. Physiol.* 156:274, 1961.
- 15) Glynn, I.M.: *Action of cardiac glycosides on ion movements. Pharmacol, Rev.* 16:381, 1964.
- 16) Duggan, D.E., and Noll, R.M.: *Effects of ethacrynic acid cardiac glycosides upon membrane adenosinetriphosphatase of renal cortex. Arch. Biochem.* 109:388, 1965.
- 17) Caldwell, P.C., and Keynes, R.D.: *Effect of ouabain on efflux of sodium from squid giant axon. J. Physiol.* 148:8, 1959.

- 18) Judah, J.D., and Ahmed, K.: *Inhibitors of transport and cation activated ATPase. J. cell & comp. Physiol.* 64:355, 1964.
- 19) Resenberg, S.A., and Guidotti, G.: *The protein of human erythrocyte membranes. I. Preparation, solubilization, and partial characterization. J. Biol. Chem.* 243:1985, 1968.
- 20) Fiske, C.H., and Subbarow, Y.: *The colorimetric determination of phosphorous. J. Biol. Chem.* 65:375, 1925.
- 21) Post, R.L., Merritt, C.R., Kinsolving, C.R., and Albright, C.D.: *Membrane adenosine triphosphatase as participant in active transport of sodium and potassium in human erythrocyte. J. Biol. Chem.* 235:1796, 1960.
- 22) Bonting, S.L., and Caravaggio, L.L.: *Sodium-potassium-activated adenosine triphosphatase in squid giant axon. Nature (London)* 194:1180, 1964.
- 23) Spater, H.W., Novikoff, A.B. and Masek, B.: *Adenosinetriphosphatase activity in all membranes of kidney tubule cells. J. Biophys. & Biochem. Cytol.* 4:765, 1958.
- 24) Essner, E., Novikoff, A.B., and Masek, B.: *Adenosinetriphosphatase and 5-nucleotidase activities in plasma membrane of liver cells revealed by electron microscopy. J. Biophys & Biochem. Cytol.* 4:711, 1958.
- 25) Katz, A.I., and Epstein, F.H.: *Physiological role of sodium-potassium-activated adenosine triphosphatase in the transport of cations across biologic membranes. New Engl. Med.* 278:253, 1968.
- 26) Whittam, R.: *Asymmetrical stimulation of membrane adenosinetriphosphatase in relation to active cation transport. Biochem. J.* 84:110, 1962.
- 27) Glynn, I.M.: *Activation of adenosinetriphosphatase activity in a cell membrane by external potassium and internal sodium. J. Physiol.* 160:18, 1962.
- 28) Baker, P.F.: *The relationship between phosphorus metabolism and the sodium pump in intact nerve. Biochim. Biophys. Acta.* 75:287, 1963.