

# Anthraquinone 이 토끼 적혈구막의 NaK ATPase 의 활성도에 대한 작용

경희대학교 의과대학 생리학교실

고 일 섭

=Abstract=

## Action of Anthraquinone on Sodium-Potassium activated ATPase in Rabbit Red Cell Membrane

Il Sup Koh

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

Action of anthraquinone 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 anthraquinone on the ATPase activity. The following results were obtained

1. The activity of the NaK ATPase from red cell membrane is inhibited by anthraquinone and the concentration of anthraquinone for maximal inhibition is about 5mM.
2. The ratio of inhibition of NaK ATPase by anthraquinone, with a giving concentration of sodium in the medium, is increased by raising the potassium concentration.
3. The ratio of inhibition of NaK ATPase by anthraquinone, with a given concentration of potassium in the medium, is increased by raising the sodium concentration.
4. The action of anthraquinone on the NaK ATPase activity is inhibited by calcium ions and the ratio of inhibition is increased by small amounts of calcium but almost constant by larger amounts.
5. The inhibitory action of anthraquinone on the NaK ATPase activity was not related to the amino group of lysine, the hydroxyl group of threonine or the imidazole group of histidine.
6. The inhibitory action of anthraquinone on the ATPase activity is due to sulfhydryl group or the carboxyl group of the enzyme of NaK ATPase.

### 서 론

사람 적혈구에서 Na 이온을 세포막 밖으로 K 이온을 세포막 안으로 진기 화학적농도 구배에 역행하여 이동하는 이온의 펌프작용은 세포내에서 해당작용으로 형성된 adenosine triphosphate (ATP)의 분해과정에서 유리되는 에너지를 사용하고 있다는 것은 널리 알려져 있다<sup>1-3)</sup>.

생체 세포막에서 이루어지는 이온의 능동적 운반은

사람 적혈구에서 한 분자의 ATP가 분해할 때 3개의 Na 이온을 세포막 밖으로 2개의 K 이온을 세포막 안으로 능동적 운반을 하고 있다는 사실은 연구자들에 의하여 보고된바 있다<sup>4-6)</sup>.

한편 Skou<sup>7)</sup>는 계의 말초신경에서 Na 이온과 K 이온을 동시에 첨가하였을 때에 활성화되는 adenosinetriphosphatase (NaK ATPase)가 있다는 것을 발견하고 이 효소가 세포막에서 이루어지는 이온의 능동적 운반 작용과 밀접한 관계가 있다는 것을 처음으로 암시 하였다. 그후 적혈구막에서도 Na 이온과 K 이온을 동시

에 첨가하였을 때에 활성화되는 ATPase 가 있으며 이 효소와 세포막에서 이루어지는 Na 이온과 K 이온의 능동적 운반과 밀접한 관계가 있다는 것을 여러 연구자들에 의하여 제시되었다<sup>5,8-10</sup>. 또한 적은 농도의 ouabain 은 이온의 능동적 운반을 억제하고 같은 농도의 ouabain 은 여러 조직에서 Na 이온과 K 이온으로 활성화되는 ATPase 활성화도도 억제하고 있으므로 이온의 능동적 운반과 이 효소에서 서로 관련되어 있다는 증거이기도 하다<sup>11-13</sup>.

세포막에서 이온의 능동적 운반과 밀접한 관계를 가지고 있는 Na 이온과 K 이온으로 활성화되는 ATPase 의 활성화에 대한 anthraquinone 의 작용은 아직 알려지지 않음으로 본실험에서는 토끼 적혈구로 ghost 세포를 만들어 세포막만을 분리하여 세포막내에 있는 Na 이온과 K 이온으로 활성화되는 ATPase 의 활성화에 대한 anthraquinone 의 작용을 규명하고 그 작용기전도 아울러 실험하였다.

## 실험방법

체중 2 kg 내외의 성숙한 토끼를 성의 구별없이 사용하였다. 심장 침자로 채혈한 혈액을 heparin 으로 응고를 방지하였다. 채혈한 혈액을 1,000 xg 로 15분간 원심 분리한 다음 혈장과 적혈구 상층에 있는 백혈구를 제거하고 생리식염수로 2회 세척하고 다시 등장성 MgCl 용액에 1 mM EDTA 를 함유한 용액으로 2회 세척하였다.

세척된 적혈구만을 모아 혈색소의 부착이 없는 적혈구막(hemoglobin-free ghost)을 얻기 위하여 Rosenberg<sup>14</sup> 등의 방법에 따라 30배 용량의 15 mOsM Tris-HCl buffer 용액을 가하여 4°C 에서 한시간 동안 방치하였다.

이렇게 용혈된 적혈구를 4°C 에서 10,000 xg 로 15분간 원심분리한 다음 상등액을 제거하여 막분획만을 얻었다. 침전된 막분획을 다시 15 mOsM Tris-HCl buffer 용액에 1 mM EDTA 를 혼합한 용액으로 2회 원심조작으로 세척한 다음 15 mOsM Tris-HCl buffer 용액으로 1회 세척하였다. 이렇게 해서 얻은 막분획은 혈색소의 부착이 없는 유백색을 나타냈으며 이것을 본 실험에 사용하였다.

ATPase 의 활성화는 Dunham<sup>10</sup> 등의 방법에 따라 측정하였다. 10 ml 의 여러 실험관내에 막분획과 여러 반응액을 각각 0.1 ml 씩을 첨가하고 증류수로 조절하여 총량을 1 ml 로 하여 44°C 에서 한시간 동안 water

bath 에 부치하였다. 여러 실험관에 막분획과 여러 반응액을 넣은 다음 15 mM ATP 를 가할 때는 15초 간격으로 첨가하고 한시간 동안 반응을 시킨 다음에는 다시 15초 간격으로 얼음으로 냉각시킨 물속으로 실험관을 이동시켜서 1분간 냉각시켰다. 다시 냉각된 10% trichloroacetic acid 를 1 ml 씩을 같은 시간 간격으로 첨가하여서 반응을 정지시킨 다음 15분간 1,000 xg 로 원심 분리한 다음 단백질을 침전시키고 그 상등액 1.5 ml 내에 유리된 inorganic phosphate 를 Fiske-Subbarow<sup>15</sup> 법에 의하여 측정하여 ATPase 의 활성도를 나타내었다.

## 실험성적

### 1. Anthraquinone 의 농도의 영향

반응액내의 anthraquinone 의 농도를 0에서 15 mM 까지 증가시켜서 NaK ATPase 의 활성화에 미치는 영향을 제 1 도에 도시 하였다.

반응액내의 anthraquinone 의 농도를 0에서 15 mM 까지 증가시키면 NaK ATPase 의 활성화는 농도의 증가에 따라서 억제되나 10 mM 에서 15 mM 까지의 농도의 증가에 따라서는 활성도의 억제작용은 나타나지 않고 거의 일정한 활성도를 나타내었다.

Anthraquinone 은 NaK ATPase 의 활성도를 억제하는 작용이 있으며 10 mM 에서 최대의 억제작용이 나타난다.

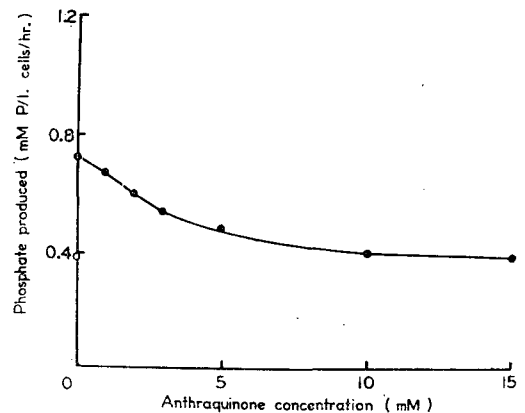


Fig. 1. The effect of anthraquinone concentration on the ATPase activity of red cell ghosts. Temp. 44°C; pH 7.6; ATP 1.5 mM; Mg 2 mM; Na 80 mM; K 17 mM. Duration 1 hr. Each point represents an average of three experiments.

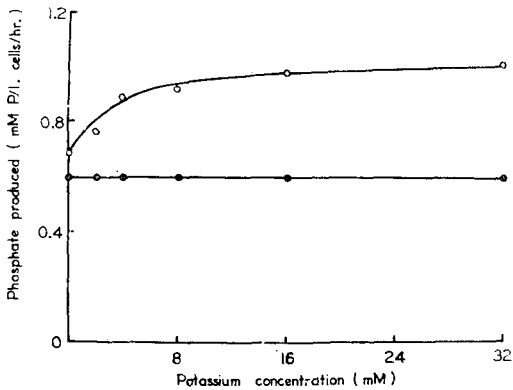


Fig. 2. The effect of potassium concentration on the ATPase activity of red cell ghosts in the presence and absence of anthraquinone. Temp. 44°C; pH 7.6; ATP 1.5 mM; Mg 2 mM; Na 80 mM. Duration 1hr. ○ anthraquinone absent; ● anthraquinone 5 mM. Each point represents an average of three experiments.

2. K 이온의 농도의 영향

반응액내의 Na 이온의 농도를 일정하게 유지하고 K 이온의 농도를 변동시키면서 ATPase 의 활성도의 변동과 여기에 일정농도의 anthraquinone 을 첨가하였을 때에 나타나는 ATPase 의 활성도의 변동을 관찰한 실험을 제 2 도에 도시하였다.

반응액 내의 Na 이온의 농도를 80 mM 로 일정하게 유지하고 K 이온의 농도를 0에서 32 mM 까지 증가시킨 실험에서 K 이온의 농도가 8 mM 에 도달할 때까지는 ATPase 의 활성도는 점차적으로 증가되나 그 이상의 농도에서는 농도증가에 따라서 효소의 활성도의 증가는 나타나지 않고 거의 일정하게 나타난다.

Anthraquinone 을 첨가하였을 때의 ATPase 의 활성도의 억제율은 K 이온의 농도를 증가시키는데 따라서 증가하였다(제 1 표).

3. Na 이온의 농도의 영향

반응액내의 K 이온의 농도를 일정하게 유지하고 Na 이온의 농도를 변동하여 ATPase 의 활성도의 변동과 일정농도의 anthraquinone 을 첨가하였을 때의 ATPase 의 활성도의 변동을 제 3 도에 표시하였다.

반응액내의 K 이온의 농도를 17 mM 로 일정하게 유지하고 Na 이온의 농도를 0에서 160 mM 까지 증가시키면 ATPase 의 활성도는 Na 이온의 농도가 80 mM

Table 1. The effect of potassium concentration on inhibition by anthraquinone of the ATPase

K concentration (mM)	Total ATPase activity (mM P/l. cells/hr)	Activity in the presence of anthraquinone (5mM) (mM P/l. cells/hr)	Inhibition (%)
0	0.68	0.59	42.9
2	0.76	0.59	58.6
4	0.88	0.59	70.7
8	0.91	0.59	72.7
16	0.97	0.59	76.0
32	0.99	0.59	76.9

Mg ATPase activity 0.47 (mM P/l. cells/hr.)

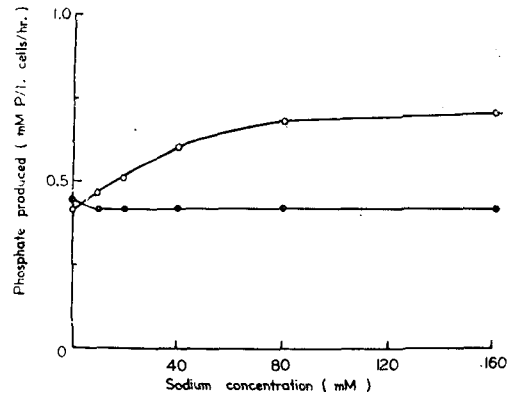


Fig. 3. The effect of sodium concentration on the ATPase activity of red cell ghosts in the presence and absence of anthraquinone. Temp. 44°C; pH 7.6; ATP 1.5 mM; Mg 2 mM; K 17mM. Duration 1hr. ○ anthraquinone absent; ● anthraquinone 5 mM. Each point represents an average of three experiments.

에 도달할때까지는 점차적으로 증가하나 그 이상의 농도에서는 농도의 증가에 따라서 활성도는 증가되지 않고 일정하게 나타난다.

반응액내의 anthraquinone 을 일정 농도를 첨가한때서는 ATPase 의 활성도의 억제율은 Na 이온의 농도의 증가에 따라서 증가되었다(제 2 표).

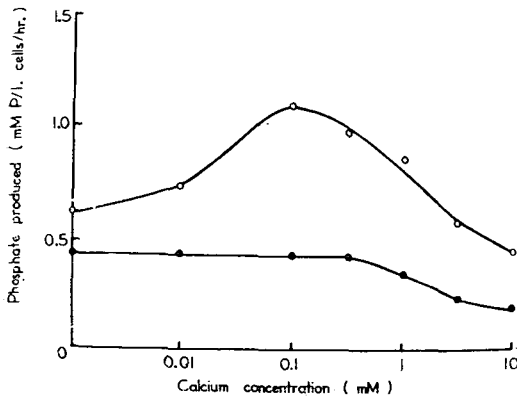
4. Ca 이온의 농도의 영향

Ca 이온의 농도를 변동시키면서 NaK ATPase 의 활성도에 미치는 영향과 여기에 일정농도의 anthraquinone 을 첨가하였을 때의 활성도의 변동을 제 4 도에 도시하였다.

**Table 2.** The effect of sodium concentration on inhibition by anthraquinone of the ATPase

Na concentration (mM)	Total ATPase activity (mM P/l. cells/hr.)	Activity in the presence of anthraquinone (5mM) (mM P/l. cells/hr.)	Inhibition (%)
10	0.47	0.41	50.0
20	0.51	0.41	50.0
40	0.60	0.41	65.5
80	0.67	0.41	72.2
160	0.70	0.41	74.4

Mg ATPase activity 0.31 (mM P/l. cells/hr.)

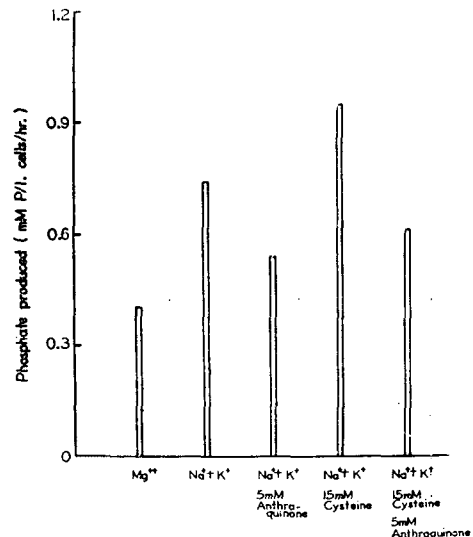
**Fig. 4.** The effect of calcium concentration on the ATPase activity of red cell ghosts in the presence and absence of anthraquinone. Temp. 44°C; pH 7.6; ATP 1.5mM; Mg 2 mM; Na 80 mM; K 17 mM. Duration 1hr. ○ anthraquinone absent; ● anthraquinone 5 mM. Each point represents the mean of three experiments.

Ca 이온의 농도를 0에서 10 mM 까지 증가시키면서 NaK ATPase 의 활성화도의 변동을 관찰한 실험에서 Ca 이온의 농도가 0.1 mM 에 도달할 때까지는 이 효소의 활성화도는 증가되나 더운 농도를 증가시키면 활성화도는 억제되었다.

Ca 이온의 농도를 증가시키는데 따라서 anthraquinone 의 작용으로 나타나는 NaK ATPase 의 활성화도는 Ca 이온의 농도가 낮은 데서는 억제가 증가되나 농도가 높은 데서는 억제는 거의 일정하게 나타났다 (제 3 표).

**Table 3.** The effect of calcium concentration on inhibition by anthraquinone of the ATPase activity of red cell ghosts

Ca concentration (mM)	Total ATPase activity (mM P/l. cells/hr.)	Activity in the presence of anthraquinone (5mM) (mM P/l. cells/hr.)	Inhibition (%)
0	0.61	0.44	27.9
0.01	0.73	0.42	42.5
0.1	1.08	0.42	61.1
0.5	0.97	0.42	56.7
1.0	0.86	0.35	59.3
5.0	0.58	0.23	60.4
10.0	0.45	0.19	57.8

**Fig. 5.** The effect of cysteine in the presence of anthraquinone on the ATPase activity of red cell ghosts. Temp. 44°C; pH 7.6; ATP 1.5 mM; Mg 2 mM; Na 80 mM; K 17 mM; cysteine 15 mM; anthraquinone 5 mM. Duration 1hr. Each column represents an average of ten experiments.

### 5. Cysteine 의 역할

NaK ATPase 의 활성화도에 대한 anthraquinone 의 억제작용에 cysteine 을 작용시켜서 나타나는 영향을 관찰한 실험을 제 5 도에 도시하였다.

이 실험에서 Na 이온과 K 이온을 동시 첨가하면 Mg ATPase 의 활성화도는 증가되고 Na 이온과 K 이온을 첨가하고 anthraquinone 을 작용시키면 NaK ATPase 의 활성화도는 anthraquinone 의 작용으로 현저한 억제가 나

타난다. NaK ATPase에 cysteine 만을 작용하면 NaK ATPase의 활성도는 cysteine을 첨가하지 않았을 때보다 증가되나 이것은 이 효소에 대한 cysteine의 보완작용에 기인되어 나타나는 현상으로 사료된다.

NaK ATPase에 cysteine으로 전처리 하고 anthraquinone을 첨가하였을때에 나타나는 NaK ATPase의 활성도는 cysteine만 첨가하였을 때에 비해 현저한 억제작용이 나타난다.

이 실험으로 NaK ATPase에 anthraquinone만 작용하여 나타나는 억제작용 보다 cysteine으로 전처리 한다음 anthraquinone을 첨가하여 나타나는 억제작용이 더욱 현저하게 나타나는 것을 알수 있다.

NaK ATPase에 cysteine으로 전처리 하고 anthraquinone을 작용하였을 때에 억제작용이 더욱 현저하게 나타나는 것은 anthraquinone의 억제작용이 cysteine의 SH기와 관련을 가지고 있다는 것을 암시하고 있는 것이다.

### 6. Lysine의 영향

NaK ATPase의 활성도에 대한 anthraquinone의 억제작용에 lysine을 작용시켜서 나타나는 영향을 제 6도에 도시하였다.

이 실험에서 NaK ATPase에 lysine만 첨가하였

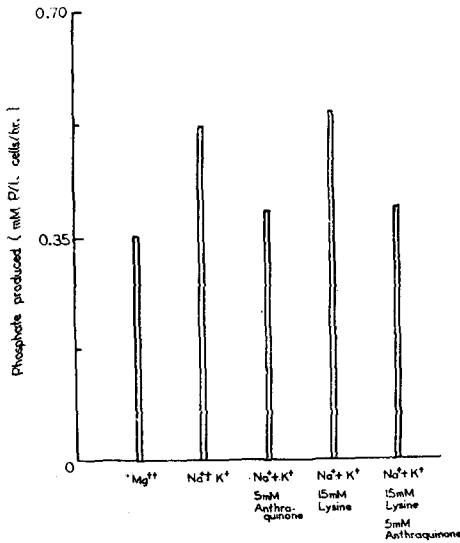


Fig. 6. The effect of lysine in the presence of anthraquinone on the ATPase activity of red cell ghosts. Temp. 44°C; pH 7.6; ATP 1.5 mM; Mg 2 mM; Na 80 mM; K 17 mM; lysine 15 mM; anthraquinone 5 mM. Duration 1 hr. Each column represents an average of four experiments.

을 때에 나타나는 활성도는 lysine을 첨가하지 않았을 때보다 약간 증가되나 이것은 이 효소에 대한 lysine의 보완작용으로 사료된다.

NaK ATPase에 lysine을 전처리한 다음 anthraquinone을 첨가하였을 때에 나타나는 억제작용은 NaK ATPase에 anthraquinone만 작용하였을 때의 억제작용과 아무 차이가 나타내지 않는다.

이것은 lysine의 전처리로 NaK ATPase의 활성도에 대한 anthraquinone의 억제작용은 아무 영향을 주지 못하는 것으로 생각된다.

이는 anthraquinone의 NaK ATPase의 활성도에 대한 억제작용에 lysine이 함유하는 NH<sub>2</sub>기가 아무 영향을 주지 않는 것을 암시하고 있는 것이다.

### 7. Threonine의 영향

Anthraquinone의 작용으로 나타나는 NaK ATPase의 활성도에 대한 억제작용에 threonine의 첨가로 인한 영향을 제 7도에 도시하였다.

이 실험에 Na이온과 K이온을 동시에 첨가하였을 때에 활성화되는 ATPase의 활성도는 anthraquinone의 첨가로 억제작용이 나타난다. NaK ATPase에 threonine만 첨가하였을 때에 나타나는 활성도는 threonine을 첨가하지 않았을 때의 NaK ATPase의 활성

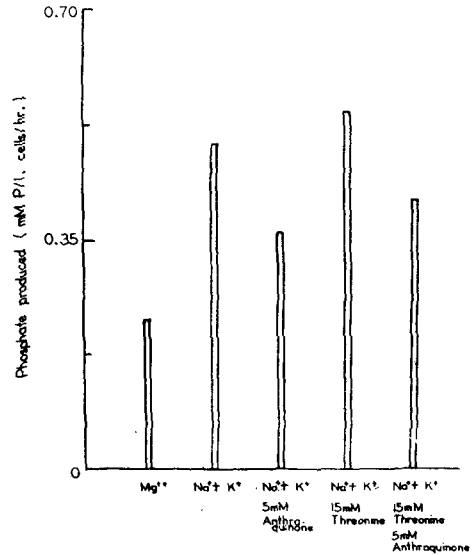


Fig. 7. The effect of threonine in the presence of anthraquinone on the ATPase activity of red cell ghosts. Temp. 44°C; pH 7.6; ATPase 1.5 mM; Mg 2 mM; Na 80 mM; K 17 mM; threonine 15 mM; anthraquinone 5 mM. Duration 1 hr. Each column represents an average of six experiments.

도보다 약간 증가되나 이는 이 효소에 대한 threonine 의 보완작용에 기인되는 것으로 생각된다.

NaK ATPase 에 threonine 으로 전처리하고 anthraquinone 을 첨가하였을 때의 이 효소의 억제작용은 NaK ATPase 에 anthraquinone 만을 작용하여 나타나는 억제작용과 아무 차이가 나타나지 않는다.

이는 NaK ATPase 에 대한 anthraquinone 의 억제작용은 threonine 과는 아무 관련이 없다는 것을 알 수 있다.

이것은 NaK ATPase 의 활성화에 대한 anthraquinone 의 억제작용은 threonine 이 함유하고 있는 OH 기와는 아무 관계가 없다는 것을 암시하고 있는 것이다.

### 8. Aspartic acid 의 영향

NaK ATPase 의 활성화에 대한 anthraquinone 의 억제작용에 aspartic acid 를 작용시켜서 나타나는 영향을 본 실험을 제 8 도에 도시하였다. 이 실험에서 Na 이온과 K 이온을 동시에 첨가하였을 때에 활성화되는 ATPase 의 활성화도는 anthraquinone 의 첨가로 억제된다.

NaK ATPase 에 aspartic acid 만을 첨가하면 aspartic acid 를 첨가하지 않았을 때 보다 활성화도는 증가되

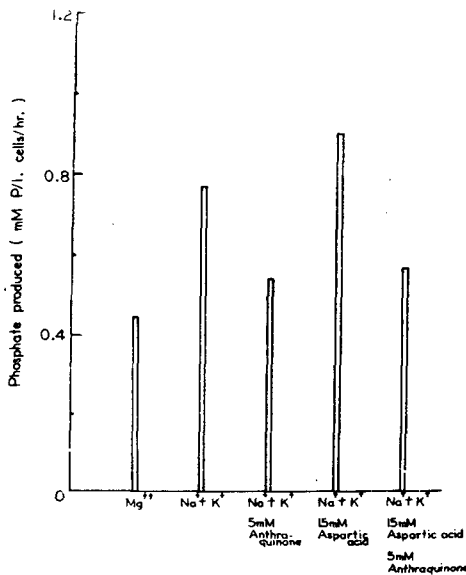


Fig. 8. The effect of aspartic acid in presence of anthraquinone on the ATPase activity of red cell ghosts. Temp. 44°C; pH 7.6; ATP 1.5 mM; Mg 2 mM; Na 80 mM; K 17 mM; aspartic acid 15 mM; anthraquinone 5 mM. Duration 1 hr. Each column represents an average of eight experiments.

나 이는 이 효소에 대한 aspartic acid 의 보완작용으로 생각된다.

NaK ATPase 에 aspartic acid 로 전처리한 다음 anthraquinone 을 작용시키면 NaK ATPase 에 aspartic acid 만을 작용하였을 때 보다 현저한 억제작용이 나타난다.

NaK ATPase 을 aspartic acid 로 전처리 한 다음 anthraquinone 을 첨가하면 aspartic acid 만으로 전처리한 것에 비해서 현저한 억제작용이 나타나는데 이 억제작용은 NaK ATPase 에 anthraquinone 만을 작용하여 나타나는 억제작용보다 더 현저하게 나타난다.

이는 NaK ATPase 의 활성화에 대한 anthraquinone 의 억제작용은 aspartic acid 가 함유하고 있는 COOH 기와 관계가 있다는 것을 암시하고 있는 것이다.

### 9. Histidine 의 영향

Anthraquinone 의 작용으로 나타나는 NaK ATPase 의 활성화에 대한 억제작용에 histidine 의 첨가로 인한 영향을 관찰한 실험을 제 9 도에 도시하였다.

이 실험에서 NaK ATPase 에 대한 anthraquinone 만을 작용하였을 때에 나타나는 억제작용은 histidine 으로 전처리한 다음 anthraquinone 을 작용하여 나타

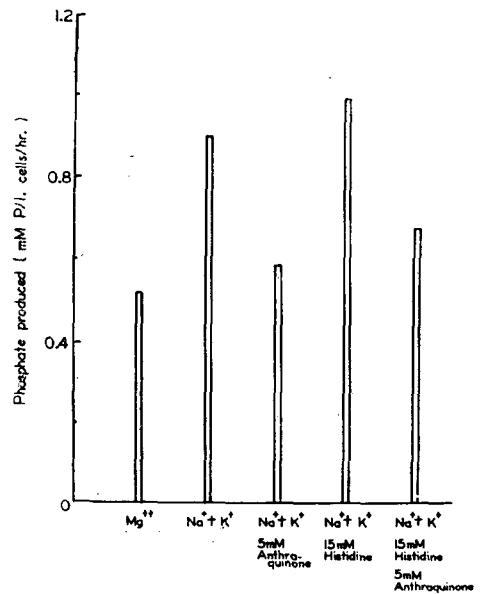


Fig. 9. The effect of histidine in the presence of anthraquinone on the ATPase activity of red cell ghosts. Temp. 44°C; pH 7.6; ATP 1.5 mM; Mg 2 mM; Na 80 mM; K 17 mM; histidine 15 mM; anthraquinone 5 mM. Duration 1 hr. Each column represents an average of four experiments.

나는 억제작용과 아무 차이를 나타내지 않았다.

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

## 고 찰

토끼 적혈막에서 Mg 이온 만으로 활성화되는 Mg ATPase 와 Na 이온과 K 이온을 동시에 첨가하였을 때에 활성화되는 ATPase 가 분리된다. 세포막에서 Na 이온과 K 이온을 동시에 첨가하였을 때에 활성화되는 ATPase 는 사람 적혈구<sup>8,10</sup>나 squid 의 축삭돌기 접질<sup>16</sup> 또는 콩팥의 세포막<sup>17</sup>과 간 세포막<sup>18</sup>에서도 분리되며 이들 여러 조직의 세포막내에 있는 ATPase 는 양적으로는 차이가 있으나 근본적으로 같은 특징을 가지고 있어 세포막에서 이루어지는 이온의 능동적 운반과 밀접한 관계를 가지고 있다는 사실은 여러 연구자들<sup>4-6</sup>이 주장하고 있다.

토끼 적혈구막에서 분리된 Na 이온과 K 이온을 동시에 첨가했을때에 활성화되는 ATPase 의 활성도는 anthraquinone 의 작용으로 억제된다. Anthraquinone 의 농도의 증가에 따라서 NaK ATPase 의 활성도의 억제율은 증가되며 10 mM 에서 최대의 억제작용이 있다.

세포막에서 Na 이온을 세포막 밖으로 K 이온을 세포막 안으로 능동적 운반하는 작용과 밀접한 관계가 있는 이 효소의 활성도를 anthraquinone 이 억제하고 있다는 것은 anthraquinone 이 세포막에서 이루어지는 이온의 능동적 운반을 억제하고 있다는 것을 암시하고 있는 것이다. 세포막에 이온의 능동적 운반이 억제되면 Na 이온을 세포막 밖으로 K 이온을 세포막 안으로 운반하는 작용이 억제됨으로 세포막 밖의 Na 이온과 세포막 안의 K 이온의 농도의 감소를 초래하게 되어 막전위에 영향을 주는 것으로 생각된다.

Whittam<sup>19</sup>, Glynn<sup>20</sup>과 Baker<sup>21</sup> 등은 세포막 효소계에는 Na 이온과 친화성을 가지고 활성화되는 반응부위와 K 이온과 친화성을 가진 반응부위가 있어 Na 이온의 반응부위는 세포막 내부측에 K 이온의 반응부위는 세포막 외부측에 놓여 있다고 주장한 바 있다. 한편 ghost 세포막은 Na 이온이나 K 이온에 대한 투과성이 높으므로 이들 이온들이 반응액내에 가해지면 친화성을 가진 부위와 용이하게 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 활성도는 증가되지 않고 거의 일정하게 나타난다.

이 현상은 K 이온의 농도가 낮은 부위에서는 K 이온과 Na 이온의 농도비율이 낮아져 있어 Na 이온이 K 이온의 반응부위와 치환이 일어나서 일부의 K 이온의 반응부위는 Na 이온으로 점유될 것이나 K 이온의 농도가 낮으므로 활성화되는 K 이온의 반응부위는 일부분에 그치게 되어 이 효소의 활성도는 감소되는 것으로 사료된다. K 이온의 농도가 높은 부위에서는 K 이온과 Na 이온의 농도비율이 높아져서 Na 이온이 K 이온의 반응부위와 치환이 일어날 것이나 극히 적은 양 밖에 이루어지지 못하고 K 이온의 농도증가로 인한 K 이온의 반응부위가 활성화되므로 이 효소의 활성도는 증가되는 것으로 생각된다.

K 이온의 농도를 증가시키는데 따라서 anthraquinone 의 작용으로 NaK ATPase 의 활성도의 억제율은 증가되었다. K 이온의 농도가 낮은 부위에서는 억제율을 급격히 증가되나 높은 부위에서는 억제율의 증가는 서서히 이루어진다. K 이온의 농도가 낮은 부위에서 K 이온과 Na 이온의 농도비율은 낮아져 있어 Na 이온이 K 이온의 반응부위와 치환이 일어나서 일부의 K 이온의 반응부위는 Na 이온으로 점유될 것이나 K 이온의 농도가 낮음으로 K 이온의 반응부위는 일부밖에 활성화되지 못하고 이 반응부위에 대한 anthraquinone 의 친화성이 높아져서 효소의 활성도의 억제율이 증가되고 K 이온의 농도가 높은 부위에서는 K 이온과 Na 이온의 농도비율은 높아져 Na 이온이 K 이온의 반응부위와 일부 치환이 일어나서 점유될 것이나 K 이온의 농도가 증가되어가므로 K 이온의 반응부위는 포화되므로 이 반응부위에 대한 anthraquinone 의 친화성이 감소되어 효소의 활성도의 억제율은 서서히 증가되는 것으로 생각된다.

반응액내의 K 이온의 농도를 일정하게 유지하고 Na 이온의 농도를 증가시키는데 따라서 NaK ATPase 의 활성도의 변동을 본 실험에서 Na 이온의 농도를 증가시키는데 따라서 이 효소의 활성도는 증가되나 일정농도에 도달하면 그 이상 Na 이온의 농도를 증가시켜도 활성도는 증가되지 않았다. 이 현상은 Na 이온의 농도가 낮은 부위에서는 K 이온과 Na 이온의 농도비율이 높아져서 K 이온이 Na 이온의 반응부위와 치환이 일어날 것이나 Na 이온의 농도가 낮으므로 Na 이온의 반응부위가 일부분 밖에 활성화시키는 못하므로 효소의 활성

도는 감소되고 Na 이온의 농도가 높은 부위에서는 K 이온과 Na 이온의 농도비율은 낮아져 있어서 Na 이온이 K 이온의 반응부위와 치환이 일어나겠으나 이온의 농도가 높으므로 Na 이온의 반응부위가 포화되어서 효소의 활성화도는 증가되는 것으로 생각된다.

Na 이온의 농도를 증가시키는데 따라서 anthraquinone 의 작용으로 NaK ATPase 의 활성화도의 억제율은 증가되었다. Na 이온의 농도가 낮은 부위에서는 K 이온과 Na 이온의 농도 비율은 높아져 있어 K 이온이 Na 이온의 반응부위와 일부 치환이 될 것이나 Na 이온의 농도가 낮음으로 Na 이온의 반응부위는 일부밖에 점유되지 못하게 되어 이 반응부위에 대한 anthraquinone 의 친화성이 증가되어 효소의 활성화도를 억제시키고 Na 이온의 농도가 높은 부위에서는 K 이온과 Na 이온의 농도비율은 낮아져서 Na 이온은 K 이온의 반응부위와 치환이 일어날 것이나 Na 이온의 농도가 높으므로 Na 이온의 반응부위는 포화되어서 이 반응부위에 대한 anthraquinone 의 친화성은 낮아져서 이 효소의 활성화도에 대한 억제율은 약간 증가되는 것으로 생각된다.

Anthraquinone 은 이 효소의 Na 이온이나 K 이온의 반응부위와 결합할 수 있다는 것을 암시하는 것이다.

반응액내의 Ca 이온의 농도를 증가시키면서 NaK ATPase 의 활성화도의 변동을 본 실험에서 Ca 이온의 농도가 낮은 부위에서는 NaK ATPase 의 활성화도를 억제시키고 높은 농도에서 활성화도를 더욱 감소시킨다. 일정 농도의 anthraquinone 을 작용시키고 Ca 이온의 농도를 증가시키면서 NaK ATPase 의 활성화도를 관찰한 실험에서 Ca 이온의 농도가 낮은 부위에서는 이 효소의 활성화도의 억제율은 급격히 증가하나 높은 농도에서는 억제율의 증가는 거의 일정하게 나타난다.

반응액내에 lysine, threonine 및 histidine 등을 각각 ghosts 에 전처리한 다음 anthraquinone 을 작용시켜서 NaK ATPase 의 활성화도에 대한 작용을 관찰한 실험에서 anthraquinone 으로 인한 억제작용은 아무 영향을 받지 않았다. 이는 lysine 의  $\text{NH}_2$  기, threonine 의 OH 기 및 histidine 의 imidazole 기가 이 효소에 대한 anthraquinone 의 억제작용과 아무 관련을 가지고 있지 않다는 것을 뜻하는 것이다.

반응액내에 cysteine 이나 aspartic acid 로 각각 ghosts 를 전처리한 다음 anthraquinone 을 작용시켜서 NaK ATPase 의 활성화도에 대한 작용을 관찰한 실험에서 anthraquinone 만을 작용하였을 때 보다 효소의 활성화도에 대한 억제작용이 더욱 현저하게 나타났다. 이는 cysteine 이 함유하고 있는 SH 기나 aspartic acid 가 함유하고 있는 COOH 기등이 anthraquinone 의 NaK

ATPase 활성화도를 억제하는 작용과 관련을 가지고 있다는 것을 뜻하는 것이다. 이 실험결과를 anthraquinone 이 NaK ATPase 의 활성화도를 억제하는 작용은 이 효소내에 있는 SH 기 및 COOH 기와 결합하여 나타나는 현상이라는 것을 암시하고 있는 것이다.

Anthraquinone 은 세포막내에 있는 NaK ATPase 의 활성화도를 억제하는 작용으로 미루어 보아 이 효소와 밀접한 관계를 갖고 있는 Na 이온을 세포막 밖으로 K 이온을 세포막 안으로 능동적 운반을 하는 작용을 억제하는 것을 암시하고 있으며 이같은 작용은 이 효소내의 SH 기 및 COOH 기가 관여되는 것으로 사료된다

## 결 론

세포막내에 있는 Na 이온과 K 이온으로 활성화되는 ATPase 의 활성화도에 대한 anthraquinone 의 작용을 알 고저 토끼 적혈구로 ghosts 를 만들어 NaK ATPase 에 대한 anthraquinone 의 작용과 작용기전도 아울러 실험 하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

- 1) anthraquinone 은 NaK ATPase 의 활성화도를 억제하는 작용이 있다.
- 2) K 이온의 농도증가로 NaK ATPase 의 활성화도에 대한 anthraquinone 의 억제율은 증가되었다.
- 3) Na 이온의 농도증가로 NaK ATPase 의 활성화도에 대한 anthraquinone 의 억제율은 증가되었다.
- 4) Ca 이온으로 NaK ATPase 의 활성화도에 대한 anthraquinone 의 작용은 억제되었으며 Ca 이온의 낮은 농도에서 억제율은 증가되나 높은 농도에서 억제율은 거의 일정하다.
- 5) Anthraquinone 의 NaK ATPase 의 활성화도를 억제시키는 작용에는  $\text{NH}_2$  기, OH 기 및 imidazole 기등은 아무 영향을 주지 않는다.
- 6) Anthraquinone 의 NaK ATPase 의 활성화도를 억제하는 작용에는 이 효소내에 있는 SH 기 및 COOH 기와 관계된다.

## 참 고 문 헌

- 1) Danowski, T.S.: *The transfer of potassium across the human blood cell membrane.* J. Biol. Chem. 139:693, 1941.
- 2) Harris, E.J.: *The influence of the metabolism of human erythrocytes on potassium content.* J. Biol. Chem. 145:579, 1941.
- 3) Maizels, M.: *Cation control in human erythr-*



- ocytes. *J. Physiol.* 108:247, 1949.
- 4) 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.
  - 5) Whittam, R., and Ager, M.E.: *Connection between active cation transport and metabolism in erythrocytes.* *Biochem. J.* 97: 214, 1965.
  - 6) Garrahan, P.J., and Glynn, I.M.: *The stoichiometry of the sodium pump.* *J. Physiol.* 192: 217, 1967.
  - 7) Skou, J.C.: *The influence of some cations on adenosine triphosphatase from peripheral nerves.* *Biochim. et biophys. acta.* 23:394, 1957.
  - 8) Post, R.L. and Jolly, P.C.: *Linkage of sodium, potassium, and ammonium active transport across human erythrocyte membrane.* *Biochim. et biophys. acta.* 25:118, 1957.
  - 9) Tostenson, 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.
  - 10) Dunham, E.T. and Glynn, I.M.: *Adenosine-triphosphatase activity and active movements of alkali metal ions.* *J. Physiol.* 156: 274, 1961.
  - 11) Duggan, D.E. and Noll, R.M.: *Effects of ethacrynic acid and cardiac glycosides upon membrane adenosinetriphosphatase of renal cortex.* *Arch. Biochem.* 109:388, 1965.
  - 12) Caldwell, P.C. and Keynes, R.D.: *Effect of ouabain on efflux of sodium from squid giant axon.* *J. Physiol.* 148:8, 1959.
  - 13) Judah, J.D. and Ahmed, K.: *Inhibitors of transport and cation activated ATPase.* *J. Cell. & Comp. Physiol.* 64:355, 1964.
  - 14) Rosenberg, S. A. and Guidotti, G.: *The protein of human erythrocyte membranes. I. Preparation, solubilization, and partial characterization.* *J. Biol. Chem.* 243: 1958, 1968.
  - 15) Fiske, C.H. and Subbarow, Y.: *The colorimetric determination of phosphorous.* *J. Biol. Chem.* 65: 375, 1925.
  - 16) Bonting, S.L. and Caravaggio, L.L.: *Sodium-potassium-activated adenosine triphosphatase in squid giant axon.* *Nature (London)* 194: 1180, 1964.
  - 17) Spater, H.W., Novikoff, A.B. and Masek, B.: *Adenosinetriphosphatase activity in cell membranes of kidney tubule cells.* *J. Biophys & Biochem. Cytol.* 4:476, 1958.
  - 18) 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.
  - 19) Whittam, R.: *Asymmetrical stimulation of membrane adenosinetriphosphatase in relation to active cation transport.* *Biochem. J.* 84: 110, 1962.
  - 20) Glynn, I.M.: *Activation of adenosinetriphosphatase activity in a cell membrane by external potassium and internal sodium.* *J. Physiol.* 160:18, 1960.
  - 21) Baker, P.F.: *The relationship between phosphorus metabolism and the sodium pump in intact nerve.* *Biochim. et biophys. acta.* 75: 287, 1963.