

Theobromine이 적혈구막의 NaK ATPase의 활성도에 대한 작용

경희대학교 의과대학 생리학교실

고 일 섭

=Abstract=

Action of Theobromine on Sodium-Potassium activated ATPase in Red Cell Membrane

Il Sup Koh

Department of physiology, School of Medicine, Kyung Hee University, Seoul, Korea

The action of theobromine 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 theobromine on the ATPase activity. The following results were observed.

1. The activity of the NaK ATPase from red cell membrane is stimulated by theobromine, and the concentration of theobromine for maximal activity is about 3mM.
2. The activating effect of theobromine on the ATPase, with a given concentration of potassium in the medium, is increased by raising the sodium concentration but activity ratio is decreased.
3. The activating effect of theobromine on the ATPase, with a given concentration of sodium in the medium, is increased by the raising the potassium concentration but activity ratio is decreased.
4. The NaK ATPase activity is increased by small amounts of calcium but decreased by larger amounts. The activity of the enzyme by theobromine is increased by small amounts of calcium but decreased by larger amounts.
5. The activating effect of theobromine on the ATPase was not related to the hydroxyl group of threonine and imidazole group of histidine.
6. The activating effect of theobromine on the ATPase is due to sulfhydryl group, amino group and carboxyl group of the enzyme of NaK ATPase.

서 론

세포막에서 Na이온을 세포밖으로 K이온을 세포 안으로 전기 화학적 농도구배에 역행해서 이동하는 이온의 능동적운반^{1,2)}은 세포내에서 이루어지는 해당과정에서 형성된 adenosine triphosphate (ATP)의 분해과정에서 유리되는 에너지를 사용하고 있다는 것은 널리

알려져 있다^{3,9)}.

이같은 이온의 능동적 운반과정은 사람 적혈구에서 한 분자의 ATP가 분해할때 3개의 Na이온을 세포밖으로 2개의 K이온을 세포막 안으로 능동적 운반을 하고 있다는 것을 근래에 이르러 여러 연구자들이 주장하고 있는 것이다^{10,12)}.

한편 skou¹³⁾는 개의 말초신경에서 Na이온과 K이온을 동시에 첨가했을 때에 활성화되는 adenosine triph-

osphatase (NaK ATPase) 가 있다는 것을 발견하고 이 같은 효소가 세포막에서 이루어 지는 이온의 능동적 운반과 밀접한 관계가 있다는 것을 처음으로 암시하였다. 그 후 적혈구막에서도 Na 이온과 K 이온을 동시에 첨가 하였을 때에 활성화되는 ATPase가 있으며 이 효소와 세포막에서 이루어지는 이온의 능동적 운반과 밀접한 관계가 있다는 것을 여러 연구자들^{14,15,16)}에 의하여 주장되었다. 또한 적은 농도의 ouabain은 세포막에서 이온의 능동적 운반을 억제하고 같은 농도의 ouabain은 여러 조직에서 분리된 세포막내의 Na 이온과 K 이온을 동시에 첨가하였을 때의 활성화되는 ATPase의 활성도를 억제함으로써 이같은 ouabain의 작용은 이온의 능동적 운반과 이 효소가 서로 밀접한 관계를 갖고 있다는 것을 제시하고 있는 것이다.^{17,20)}

세포막에서 이루어지는 이온의 능동적 운반과 밀접한 관계가 있는 Na 이온과 K 이온을 동시에 첨가했을 때에 활성화 되는 ATPase의 활성도에 대한 theobromine의 작용은 아직 알려져 있지 않다. 본 실험에서는 토끼 적혈구로 ghost 세포를 만들어 세포막만을 분리하여 세포막내에 있는 Na 이온과 K 이온을 동시에 첨가하였을 때에 활성화되는 ATPase의 활성도에 대한 theobromine의 작용을 규명하고 그 작용기전도 아울러 실험하였다.

실험 방법

체중 2kg 내외의 성숙한 토끼를 성의구 별없이 본 실험에 사용하였다. 심장 침자로 채혈한 혈액을 heparin으로 응고를 방지하여 15분간 1,000xg로 원심분리한 다음 혈장과 백혈구층을 제거하였다. 이렇게 해서 얻은 적혈구만을 모아서 생리식염수로 2회 원심조작으로 세척하고 다시 등장성 MgCl₂ 용액에 1mM EDTA를 함유한 용액으로 2회 세척하였다.

이렇게 세척된 적혈구만을 모아서 혈액소의 부착이 없는 적혈구막(hemoglobin-free ghosts)을 얻기 위하여 Rosenberg²¹⁾ 등의 방법에 따라서 30배 용량의 15m Osm Tris-HCl buffer 용액을 첨가하여 4°C에서 한시간 동안 방치하였다.

이렇게 용혈된 적혈구를 4°C에서 10,000xg로 15분 동안 원심분리한 다음 상등액을 제거하여 막분획만을 얻었다. 침전된 막분획을 다시 15mOsm Tris-HCl buffer 용액에 1mM EDTA를 혼합한 용액으로 2회 원심조작으로 세척한 다음 15mOsm Tris-HCl buffer 용액으로 1회 세척하였다. 이렇게 해서 얻은 막분획은

혈색소의 부착이 없는 유백색의 막분획이였으며 이것을 본 실험에 사용하였다.

ATPase의 활성도는 Dunham¹⁶⁾ 등의 방법에 따라서 측정하였다. 10ml의 여러 실험관내에 막분획과 여러 반응액을 각각 0.1ml씩을 첨가하고 증류수로 조절하여 총량을 1ml로 하여 44°C에서 한시간동안 water bath에 부치하였다. 여러 실험관에 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 첨가하여 반응을 정지시킨 다음 15분 동안 1,000xg로 원심분리하여 단백질을 침전시키고 그 상등액 1.5ml내에 유리된 inorganic phosphate를 Fiske-Subbarow²²⁾ 법에 따라서 측정하여 ATPase의 활성도를 나타냈다.

실험 성적

1. Theobromine의 농도의 영향

반응액내의 theobromine의 농도를 0에서 9mM까지 증가시키면서 NaK ATPase의 활성도에 미치는 영향을 제 1도에 도시하였다.

반응액내의 theobromine의 농도를 0에서 9mM까지 증가시키는데 따라서 NaK ATPase의 활성도는 0에서

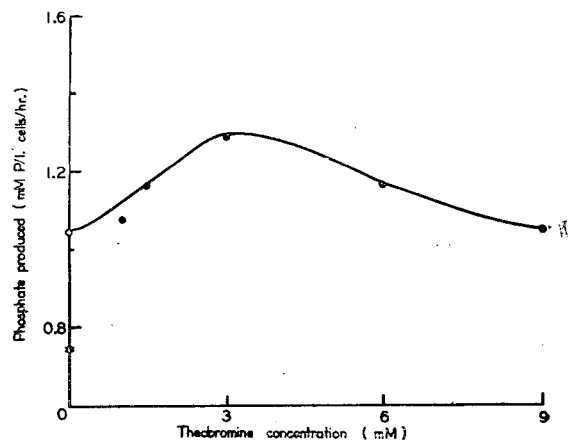


Fig. 1. The effect of theobromine concentration on the ATPase activity of red cell ghosts. Temp. 44°C; pH 7.6; ATP 1.5mM; Mg 2mM; Na 80mM; K 17mM. Duration 1hr. Each point represents an average of three experiments.

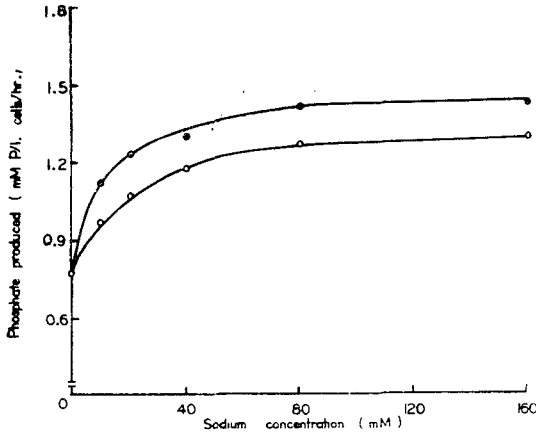


Fig. 2. The effect of sodium concentration on the ATPase activity of red cell ghosts in the presence and absence of theobromine, Temp. 44°C; pH 7.6; ATP 1.5mM; Mg 2mM; K 17mM, Duration 1hr. ○ Theobromine absent; ● Theobromine 3mM. Each point represents an average of three experiments.

3mM까지는 증가되나 3mM에서 9mM까지는 활성도가 감소되었다.

Theobromine은 NaK ATPase의 활성도를 촉진시키는 작용이 있으며 활성도에 대한 최적 농도는 3mM이다.

2. Na 이온의 농도의 영향

반응액내의 K 이온의 농도를 일정하게 유지하고 Na 이온의 농도를 변동하여 ATPase의 활성도의 변동과 여기에 일정농도의 theobromine을 첨가하였을 때의 ATPase의 활성도의 변동을 동시에 관찰한 실험을 제 2도에 도시하였다.

반응액내의 K 이온의 농도를 17mM로 일정하게 유지하고 Na 이온의 농도를 0에서 160mM까지 증가시키면 ATPase의 활성도는 Na 이온의 농도가 80mM에 도달할 때까지는 점차적으로 증가하나 그 이상의 농도에서는 농도의 증가에 따라서 증가되지 않고 일정하게 나타난다.

반응액내에 theobromine을 첨가하였을 때의 ATPase의 활성도의 증가율은 Na 이온의 농도를 증가시키는데 따라서 감소되었다(제 1표).

3. K 이온의 농도의 영향

반응액의 Na 이온의 농도를 일정하게 유지하고 K 이온의 농도를 변동시키면서 ATPase의 활성도의 변동과 여기에 일정농도의 theobromine을 첨가하였을 때 나타나는 ATPase 활성도의 변동을 동시에 관찰한

Table 1. The effect of sodium concentration on stimulation by theobromine of the ATPase activity of red cell ghosts.

Na concentration (mM)	Total ATPase activity (mM P/I, cells/hr.)	Activity in the presence of theobromine (3mM) (mMP/I, cells/hr.)	Activation (%)
0	0.77		
10	0.97	1.12	75.0
20	1.07	1.12	50.0
40	1.18	1.30	29.3
80	1.28	1.42	27.5
160	1.32	1.45	23.6

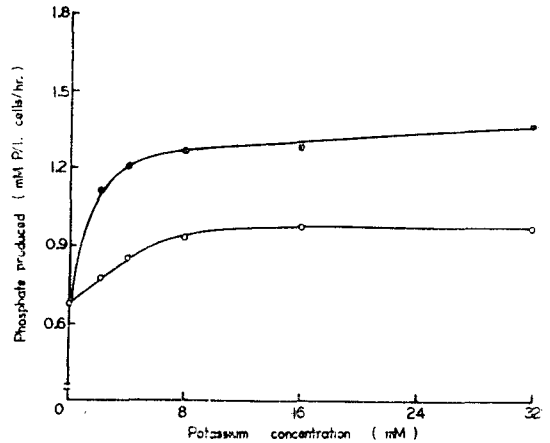


Fig. 3. The effect of potassium concentration on the ATPase activity of red cell ghosts in the presence and absence of ascorbic acid. Temp. 44°C; pH 7.6; ATP 1.5mM; Mg 2mM; Na 80mM Duration 1hr. ○ theobromine absent; ● theobromine 3mM. Each point represents an average of three experiments.

실험을 제3도에 도시하였다.

반응액내의 Na이온의 농도를 80mM로 일정하게 유지하고 K이온의 농도를 0에서 32mM까지 증가시킨 실험에서 K이온의 농도가 8mM에 도달할 때까지는 ATPase의 활성도는 점차적으로 증가되나 그 이상의 농도에서는 농도증가에 따라서 이 효소의 활성도는 증가되지 않고 일정하게 나타난다.

일정농도의 theobromine을 반응액내에 첨가하였을 때의 ATPase의 활성도의 증가율은 K이온의 농도를 증가시키는데 따라서 감소되었다(제 2 표).

Table 2. The effect of potassium concentration on stimulation by theobromine of the ATPase activity of red cell ghosts.

K concentration (mM)	Total ATPase activity (mM P/I, Cells/hr.)	Activity in the presence of theobromine (3mM) (mMP/I, cells/hr.)	Activation (%)
0	0.66		
2	0.77	1.11	309.1
4	0.85	1.20	184.2
8	0.93	1.26	122.2
16	0.97	1.28	100.0
32	0.97	1.32	112.9

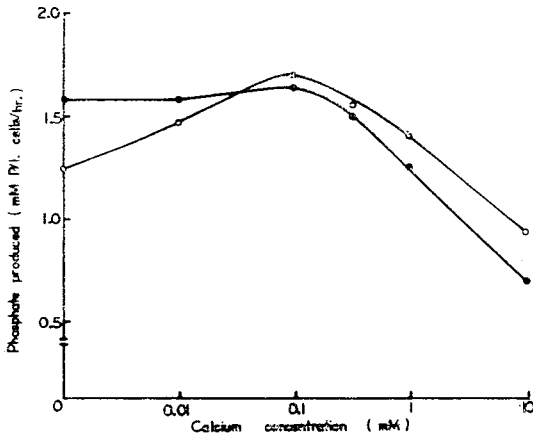


Fig. 4. The effect of calcium concentration on the ATPase activity of red cell ghosts in the presence and absence of theobromine. Temp. 44°C; pH 7.6; ATP 1.5mM; Mg 2mM; Na 80mM; K 17mM. Duration 1hr. ○ theobromine absent; ● theobromine 3mM. Each point represents the mean of three experiments.

4. Ca 이온의 농도의 영향

반응액내의 Ca이온의 농도를 변동시키면서 NaK ATPase의 활성도에 미치는 영향과 여기에 일정농도의 theobromine을 첨가하였을 때의 활성도의 변동을 동시에 관찰한 실험을 제 4도에 도시하였다.

반응액내의 Ca이온의 농도를 0에서 10mM까지 증가시키면서 NaK ATPase의 활성도의 변동을 관찰한 실험에서 Ca이온의 농도가 0.1mM에 도달할 때 까지는 이 효소의 활성도는 증가되나 더욱 농도를 증가시키면 활성도는 점차적으로 억제되었다.

Ca이온의 농도를 증가시키는데 따라서 theobromine

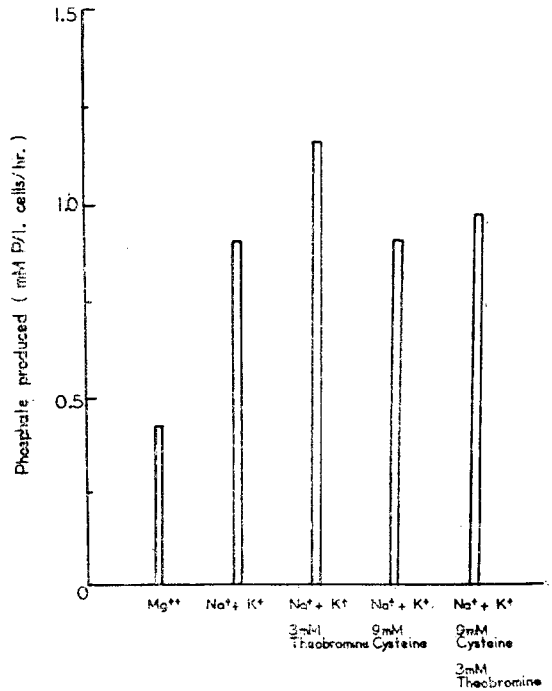


Fig. 5. The effect of cysteine presence of theobromine on the ATPase activity of red cell ghosts. Temp. 44°C; pH 7.6; ATP 1.5mM; Mg 2mM; Na 80mM; K 17mM; Cysteine 9mM; Theobromine 3mM. Duration 1hr. Each column represents an average of six experiments.

의 작용으로 나타나는 NaK ATPase의 활성도는 Ca이온의 농도가 낮은 곳에서는 약간 증가되나 높은 곳에서는 억제되었다.

5. Cysteine의 영향

NaK ATPase의 활성도에 대한 theobromine의 촉진 작용에 cysteine을 작용시켜서 나타나는 영향을 관찰한 실험을 제 5도에 도시하였다.

이 실험에서 Mg이온만을 첨가하여 나타나는 Mg ATPase의 활성도보다 Mg이온에 Na이온과 K이온을 동시에 첨가하여 나타나는 NaK ATPase의 활성도는 현저하게 촉진되었다. 또한 NaK ATPase에 theobromine을 첨가하여 나타나는 이 효소의 활성도는 Na이온과 K이온을 동시에 첨가하여 나타나는 NaK ATPase의 활성도보다 현저한 촉진작용이 나타난다. NaK ATPase에 cysteine만을 첨가하여 나타나는 활성도는 NaK ATPase의 활성도 보다 아무 차이를 나타내지 않았다. 이것은 cysteine은 NaK ATPase의 활성도에 아무 영향을 주지 않는다는 것을 의미하는 것이다.

NaK ATPase에 cysteine으로 전처리한 다음에 theobromine을 첨가하여 나타나는 활성도는 ghosts에 cysteine으로 전처리하지 않고 theobromine만을 첨가하여 나타나는 활성도의 촉진작용을 억제하고 있는 것이다. 이는 cysteine의 전처리로 NaK ATPase에 대한 theobromine의 촉진작용이 억제되었다는 것을 의미하는 것이며 theobromine이 NaK ATPase의 활성도를 촉진하는 작용은 cysteine이 함유하고 있는 SH기와 관계되어 있다는 것을 암시하는 것이다.

6. Lysine의 영향

Theobromine이 NaK ATPase의 활성도를 촉진시키는 작용에 lysine의 첨가로 인한 영향을 관찰한 실험을 제 6 도에 도시하였다.

이 실험에서 Na이온과 K이온을 동시에 첨가하였을 때 활성화되는 ATPase에 theobromine을 첨가하면 theobromine의 첨가로 인해서 NaK ATPase의 활성도는 현저한 촉진작용이 나타난다.

NaK ATPase에 lysine만을 첨가하여서 나타나는 이 효소의 활성도는 lysine을 첨가하지 않았을 때에 나타

나는 NaK ATPase의 활성도보다 약간 증가되는데 이 현상을 이 효소에 대한 lysine의 보완작용에 기인하는 것으로 사료된다.

Ghosts을 lysine으로 전처리한 다음 theobromine을 첨가하여 나타나는 NaK ATPase의 활성도는 lysine으로 전처리하지 않고 theobromine만을 첨가하여 나타나는 NaK ATPase의 활성도에 대한 촉진작용이 나타나지 않는다. 이 현상은 lysine의 전처리로 NaK ATPase에 대한 theobromine의 촉진작용이 억제되었다는 것을 의미하는 것으로 lysine이 함유하고 있는 NH₂기가 theobromine이 NaK ATPase의 활성도의 촉진작용과 관련을 갖고 있다는 것을 암시하는 것이다. Ghosts에 lysine으로 전처리하면 lysine이 함유하고 있는 NH₂기가 많이 공급됨으로 여기에 theobromine를 첨가하면 theobromine은 NH₂기와 결합하여 이 효소와는 작용하지 못하게 되어 이 효소에 대한 촉진작용이 나타나지 않는 것으로 사료된다. 이 실험결과는 theobromine이 NaK ATPase의 활성도를 촉진하는 작용은 이 효소내의 NH₂기와 결합하여 활성도를 촉진시키는 작용을 하는 것을 암시하는 것이다.

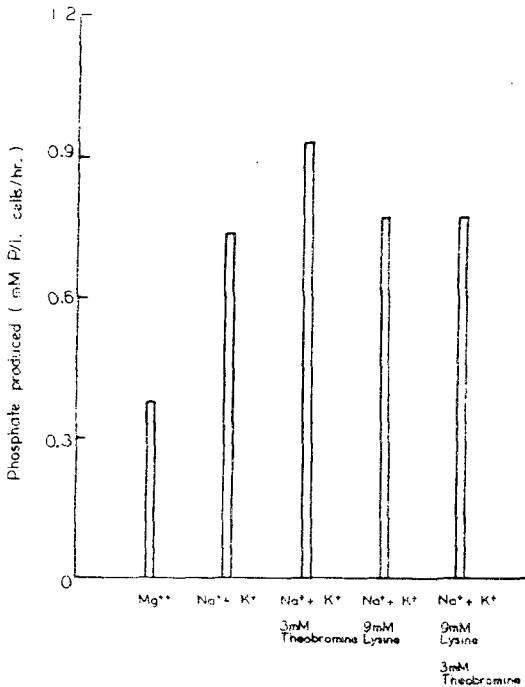


Fig. 6. The effect of lysine in the presence of theobromine on the ATPase activity of red cell ghosts. Temp. 44°C; pH 7.6; ATP 1.5mM; Mg 2mM; Na 80mM; K 17mM; Lysine 9mM; Theobromine 3mM. Duration 1hr. Each column represents an average of six experiments.

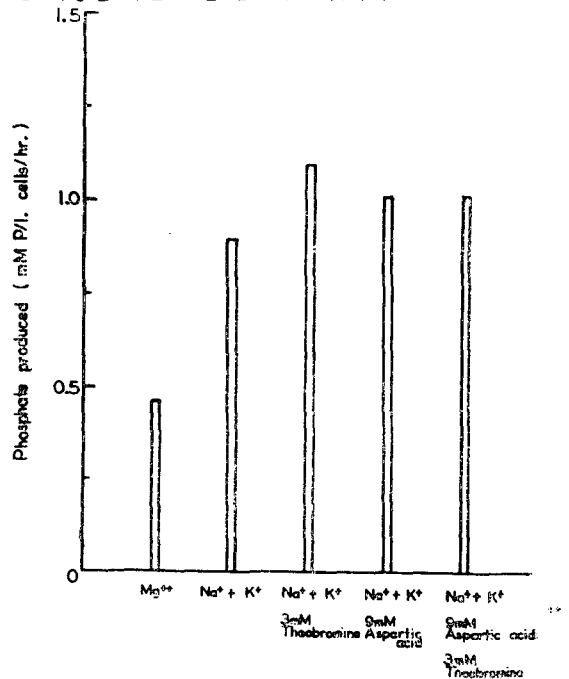


Fig. 7. The effect of aspartic acid in the presence of theobromine on the ATPase activity of red cell ghosts. Temp. 44°C; ATP 1.5mM; Mg 2mM; Na 80mM; K 17mM; Aspartic acid 9mM; Theobromine 3mM. Duration 1hr. Each column represents of six experiments.

7. Aspartic acid의 영향

NaK ATPase의 활성도에 대한 theobromine의 촉진 작용에 aspartic acid의 영향을 관찰한 실험을 제 7 도에 도시하였다.

NaK ATPase에 theobromine만을 첨가하면 이 효소의 활성도는 NaK ATPase의 활성도보다 현저한 촉진 작용을 나타낸다.

NaK ATPase에 aspartic acid만을 첨가하여 나타나는 이 효소의 활성도는 aspartic acid를 첨가하지 않았을 때 나타나는 NaK ATPase의 활성도보다 약간의 촉진 작용이 나타난다. 이 현상은 aspartic acid의 첨가로 인한 이 효소의 보완작용에 기인 되는 것으로 사료된다.

Ghosts에 aspartic acid으로 전처치 한 다음 theobromine을 첨가하면 이 효소의 활성도는 aspartic acid로 전처치하지 않고 theobromine만을 첨가하여 나타나는 활성도 촉진작용은 aspartic acid로 인한 이 효소에

대한 보완작용을 고르한다면 전혀 나타나지 않는다.

이것은 aspartic acid의 전처치로 인하여 theobromine의 NaK ATPase의 활성도를 촉진시키는 작용을 억제하고 있다는 것을 의미한다. Ghosts에 aspartic acid로 전처치하게 되면 aspartic acid가 함유하는 COOH기가 많이 공급됨으로 첨가된 theobromine은 이 COOH기와 결합하여 이 효소에 작용할 수 없으므로 aspartic acid로 전처치하지 않았을 때에 나타나는 활성도에 대한 촉진작용이 나타나지 않는 것으로 사료된다. 이 실험결과와는 theobromine이 NaK ATPase의 활성도를 촉진시키는 작용은 이 효소의 COOH기와 결합하여 나타나는 현상임을 뒤받침하고 있는 것이다.

8. Threonine의 영향

Theobromine이 NaK ATPase의 활성도를 촉진시키는 작용에 threonine의 영향을 관찰한 실험을 제 8 도에 도시하였다.

Na⁺이온과 K⁺이온을 동시에 첨가하여 나타나는 NaK ATPase의 활성도는 여기에 theobromine만을 첨가하면 이 효소의 활성도는 theobromine의 작용으로 인

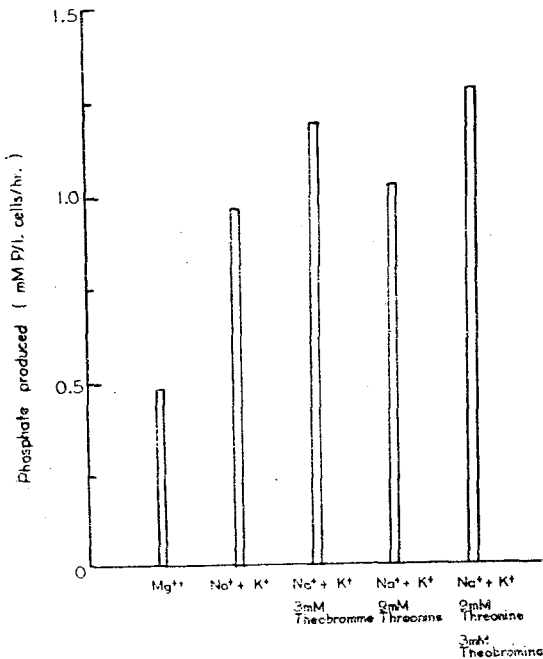


Fig. 8. The effect of threonine in the presence of theobromine on the ATPase activity of red cell ghosts, Temp. 44°C; pH 7.6; ATP 1.5 mM; Mg 2mM; Na 80mM; K 17mM; Theobromine 3mM; Threonine 9mM, Duration 1hr. Each column represents an average of six experiments.

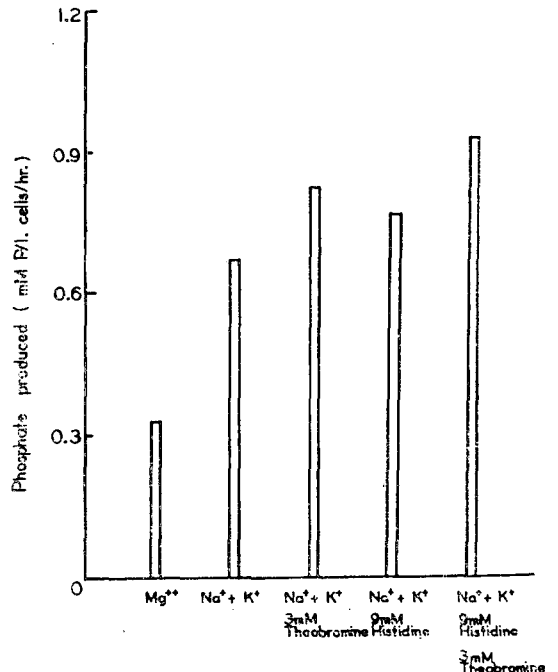


Fig. 9. The effect of histidine in the presence of theobromine on the ATPase activity of red cell ghosts, Temp. 44°C; pH 7.6; ATP 1.5mM; Mg 2mM; Na 80mM; K 17mM; Histidine 9mM; Theobromine 3mM, Duration 1hr. Each column represents an average of six experiments.

하여 현저한 촉진작용이 나타난다.

NaK ATPase에 threonine만을 작용시키면 threonine을 작용하지 않았을때에 나타나는 NaK ATPase의 활성화도보다 약간 촉진되는데 이 촉진작용이 나타나는 것은 이 효소에 대한 threonine의 보완작용에 기인되는 것으로 사료된다.

Threonine으로 ghosts를 전처리한 다음 theobromine을 첨가하여 나타나는 NaK ATPase의 활성화도의 촉진작용은 threonine으로 전처리하지 않고 theobromine만을 작용시켜서 나타나는 활성화도의 촉진작용과 threonine만을 첨가하였을 때의 이 효소에 대한 보완작용을 고려한다면 아무 차이를 나타내지 않는다. 이 현상은 theobromine의 NaK ATPase의 활성화도에 대한 촉진작용은 threonine이 함유하는 OH기와 아무 관계가 없다는 것을 의미하는 것으로 theobromine은 OH기와는 아무 관계없이 이 효소의 활성화도를 촉진하고 있다는 것을 암시하는 것이다.

9. Histidine의 영향

Na이온과 K이온을 동시에 첨가했을 때에 활성화되는 ATPase의 활성화도에 대한 theobromine의 촉진작용에 histidine이 미치는 영향을 본 실험을 제9도에 도시하였다.

NaK ATPase에 histidine만을 첨가하면 histidine을 첨가하지 않았을 때보다 이 효소의 활성화도는 약간 증가 되는데 이 현상은 histidine의 첨가로 인한 이 효소의 보완작용에 기인되어 나타나는 현상으로 사료된다.

Histidine으로 ghosts를 전처리한 다음 theobromine을 작용하였을 때에 활성화되는 NaK ATPase의 활성화도는 이 효소에 histidine으로 전처리하지 않았을 때에 나타나는 효소의 활성화도보다 histidine으로 인한 보완작용을 고려한다면 아무 차이가 나타나지 않는다. 이것은 histidine이 함유하는 imidazole기가 theobromine의 NaK ATPase의 활성화도를 촉진하는 작용과 아무 관계가 없다는 것을 의미하고 있는 것이다.

고 찰

세포막내에서 Na이온과 K이온을 동시에 첨가하였을 때에 활성화되는 ATPase는 사람 적혈구^{16,23)}에서 분리될뿐만 아니라 여러 다른 조직^{24,25,26,27,28,29,30,31)}에서도 분리되며 이런 조직의 세포막에 있는 ATPase은 양적으로 많은 차이가 있으나 근본적으로 같은 특징³¹⁾을 갖고 있어 세포막에서 이온의 능동적 운반과 밀접한 관계를 갖고 있다고 여러 연구자들^{10,14,16)}이 주장하

고 있다.

세포막에서 이온의 능동적 운반작용과 밀접한 관계를 가지고 있는 효소인 Na이온과 K이온으로 활성화되는 ATPase은 토끼 적혈구 막에서도 분리되며 이 효소의 활성화도는 theobromine의 작용에 의하여 촉진되었다.

세포막에서 Na이온을 세포막 밖으로 K이온을 세포막안으로 능동적으로 운반하는 작용과 밀접한 관계를 갖고 있는 이 효소의 활성화도를 theobromine이 촉진한다는 것은 theobromine이 세포막에 작용하면 Na이온을 세포막 밖으로 K이온을 세포막 안으로 운반하는 작용을 촉진하게 될 것이다. 이같이 Na이온을 세포막 밖으로 K이온을 세포막 안으로 운반하는 작용이 촉진되면 세포내의 K이온의 양과 세포막외의 K이온의 양의 비율이 증대하게 되며 이 비율의 증대는 세포의 막전위의 과분극사태를 초래하게 되는 것으로 사료된다.

Whittam³²⁾, Glynn³³⁾과 Baker³⁴⁾등은 세포막의 효소계에는 Na이온과 친화성을 가지고 활성화되는 반응부위와 K이온과 친화성을 가진 반응부위가 있어 Na이온의 반응부위는 세포막 내부측에 K이온의 반응부위는 세포막 외부측에 놓여 있다고 주장한 바있다. 한편 ghost세포막은 Na이온이나 K이온에 대한 투과성이 높으므로 이들 이온들이 반응액내에 가해지면 친화성을 가진 부위와 작용하게 될 것이다.

반응액내의 K이온의 농도를 일정하게 유지하고 Na이온의 농도를 증가시키는데 따라서 ATPase의 활성화도의 변동을 본 실험에서 Na이온의 농도를 증가시키는데 따라서 이 효소의 활성화도는 증가되나 일정농도에 도달하면 그 이상 Na이온의 농도를 증가시켜도 활성화도는 증가되지 않는다. 이 현상은 Na이온의 농도가 낮은 부위에서는 K이온과 Na이온의 농도비율이 높아져서 K이온은 Na이온의 반응과위와 치환이 일어날 것이나 Na이온의 농도가 낮으므로 Na이온의 반응부위가 일부 분말게 활성화시키지 못하므로 효소의 활성화도는 감소되고 Na이온의 농도가 높은 부위에서는 K이온과 Na이온의 농도비율이 낮아져 있어서 Na이온이 K이온의 반응부위와 치환이 일어나겠으나 Na이온의 농도가 높으므로 Na이온의 반응부위가 포화되어서 이반응 부위가 활성화되므로 효소의 활성화도는 증가되는 것으로 사료된다.

Na이온의 농도를 증가시키는데 따라서 theobromine의 작용으로 인한 ATPase 활성화도의 증가율은 감소되었다. Na이온의 농도가 낮은 부위에서는 K이온과 Na이온의 농도비율은 높아져 있어 K이온이 Na이온의 반응부위와 일부치환이 될 것이나 Na이온의 농도가 낮

음으로 Na이온의 반응부위는 일부밖에 점유되지 못하게 되어 이 반응부위에 대한 theobromine이 친화성이 증가되어 효소의 활성도를 증가시키고 Na이온의 농도가 높은부위에서는 K이온과 Na이온의 농도비율은 낮아져서 Na이온이 K이온의 반응부위와 치환이 일어날 것이나 Na이온의 농도가 높으므로 Na이온의 반응부위는 포화되어 이 반응부위에 대한 theobromine의 친화성이 낮아져서 효소의 활성도를 감소시키므로 Na이온의 농도증가에 따라서 효소의 활성도의 증가율은 감소되는 것으로 생각된다.

반응액내의 Na이온의 농도를 일정하게 유지하고 K이온의 농도를 증가시키면서 ATPase의 활성도의 변동을 본 실험에서 K이온의 농도의 증가에 따라서 이 효소의 활성도는 증가되고 일정농도에 도달하면 그 이상 활성도의 증가는 나타나지 않는다. 이 현상은 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 일부분 밖에 활성화되지 못함으로 이 효소의 활성도는 감소된다.

K이온의 농도가 높은 부위에서는 K이온과 Na이온의 농도비율의 높아지게 되어 Na이온이 K이온의 반응부위와 치환이 일어날 것이나 극히 적은 양밖에 이루어지지 못하고 K이온의 농도증가로 인한 K이온의 반응부위가 활성화되므로 이 효소의 활성도는 증가되는 것으로 생각된다.

K이온의 농도를 증가시키는데 따라서 theobromine의 작용으로 ATPase의 활성도의 증가율은 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 못하고 이 반응부위에 대한 theobromine의 친화성이 낮아져서 효소의 활성도를 증가시키고 K이온의 농도가 높은 부위에서는 K이온과 Na이온의 농도비율이 높아져서 Na이온이 K이온의 반응부위와 일부 치환이 일어나 점유될 것이나 K이온의 농도가 증가되어 있으므로 K이온의 반응부위는 포화되므로 이 반응부위에 대한 theobromine의 친화성이 감소되어 이 효소의 활성도의 증가율은 K이온의 농도를 증가시키는데 따라서 감소되는 것으로 생각된다.

반응액내에 cysteine, lysine 및 aspartic acid를 각각 첨가하여 ghosts를 전처리한 다음 theobromine을

첨가하여 NaK ATPase의 활성도를 관찰한 실험에서 theobromine의 이 효소에 대한 촉진작용이 나타나지 않았다. 이 현상은 cysteine, lysine 및 aspartic acid으로 각각 ghosts를 전처리하면 cysteine이 함유하는 SH기나 lysine의 NH₂기 및 aspartic acid의 COOH기가 많이 공급이 됨으로 여기에 첨가된 theobromine이 SH기나 NH₂ 및 COOH기와 결합하여 효소와는 작용할 수없게 됨으로 효소의 활성도의 촉진작용이 나타나지 못하는 것으로 사료된다.

이 실험결과는 theobromine이 NaK ATPase의 활성도를 촉진시키는 작용기전이 이 효소가 함유하고 있는 NH₂기나 SH기 및 COOH기와 결합하여 효소의 활성도를 촉진시키는 작용을 하는 것을 암시하고 있는 것이다.

반응액내에 theobromine이나 histidine을 각각 첨가하여 ghosts를 전처리한 다음 theobromine을 작용시켜서 NaK ATPase의 활성도에 대한 작용을 관찰한 실험에서 theobromine으로 인한 촉진작용에는 아무 영향을 주지 못하였다. 이는 theobromine이 함유하고 있는 OH기나 histidine이 함유하는 imidazole기가 이 효소에 대한 theobromine의 촉진작용과는 아무 관련을 가지고 있지 않다는 것을 뜻하는 것이다.

결 론

적혈구막 내에 있는 Na이온과 K이온으로 활성화되는 ATPase의 활성도에 대한 theobromine의 작용을 알고자 토끼 적혈구로 ghost세포를 만들어 세포막만을 분리하여 막내의 NaK ATPase의 활성도에 대한 theobromine의 작용과 작용기전도 아울러 실험하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1) Theobromine은 NaK ATPase의 활성도를 촉진시키는 작용이 있으며 theobromine의 최적농도는 3mM이다.

2) Na이온의 농도증가로 theobromine의 NaK ATPase의 활성도를 증가시키나 증가율은 감소되었다.

3) K이온의 농도증가로 theobromine은 NaK ATPase의 활성도를 촉진시키나 증가율은 감소되었다.

4) 낮은 농도의 Ca이온은 NaK ATPase의 활성도를 증가시키고 높은 농도의 Ca 이온은 감소시킨다. Ca이온으로 Theobromine의 이 효소에 대한 활성도는 낮은 농도에서 증가되나 높은 농도에서 감소된다.

5) NaK ATPase의 활성도에 대한 theobromine의 촉진작용은 threonine의 OH기나 histidine의 imidazole기는 아무 영향을 미치지 못한다.

6) Theobromine의 NaK ATPase의 활성도에 대한 촉진작용은 이 효소내의 SH기, NH₂기 및 COOH기와 결합해서 나타나는 형상이다.

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.T.: *The influence of the metabolism of human erythrocytes on potassium content. J. Biol. Chem.* 145:579, 1941.
- 3) Maizels, M.: *Cation control in human erythrocytes J. Physiol.* 108:247, 1949.
- 4) Caldwell, P.C., and Keynes, R.D.: *The utilization of phosphate bond energy for sodium extrusion from giant axon. J. Physiol.* 137: 12, 1959.
- 5) Caldwell, P.C., Hodgkin, A.L. and Shaw, T.I.: *Injection of compound containing energy rich phosphate bond into giant nerve fibers. J. Physiol.* 147:18, 1959.
- 6) Caldwell, P.C.: *The phosphorus metabolism of squid axons and its relationship to the active transport of sodium. J. Physiol.* 152:545, 1956.
- 7) Dunham, E.T.: *Linkage of active cations transport to ATP utilization. Physiologist* 1:23, 1957.
- 8) Hoffman, J.F.: *The link between metabolism and the active transport of Na in human red cell ghosts. Federation Proc.* 19:127, 1960.
- 9) Whittam, R.: *Potassium movements and ATP in human red cells. J. Physiol.* 140:479, 1958.
- 10) Sen, A.K. and Post, R.L.: *Stoichiometry and localization of adenosine triphosphate-dependent sodium and potassium transport in the erythrocytes J. Biol. Chem.* 239:345, 1964.
- 11) Whittam, R. and Ager, M.E.: *Connexion between active cation transport and metabolism in erythrocytes. Biochem. J.* 47:2141, 1955.
- 12) Garrahan, P.L. and Glynn, I.M.: *The stoichiometry of the sodium pump. J. Physiol.* 142:217, 1967.
- 13) Shou, I.C.: *The influence of some cations on adenosine triphosphatase from peripheral nerves. Biochim. Biophys. Acta* 23:344, 1957.
- 14) Post, R.L. and Jolly, P.C.: *Linkage of sodium, potassium and ammonium active transport across human erythrocyte membrane. Biochim. Biophys. Acta.* 25:119, 1957.
- 15) 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.
- 16) Dunham, E.T. and Glynn, I.M.: *Adenosinetriphosphatase activity and active movement of alkali metal ions. J. Physiol.* 1961.
- 17) Glynn, I.M.: *Action of cardiac glycosides on ion movements. Pharmacol. Rev.* 16:381, 1964.
- 18) 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.
- 19) Caldwell, P.C. and Keynes, R.D.: *Effect of ouabain on eflux of sodium from squid giant axon. J. Physiol.* 148:8, 1959.
- 20) Jodoh, J.D. and Ahmed, K.: *Inhibitors of transport and cation activated ATPase. J. Cell & Comp. Physiol.* 64:355, 1964.
- 21) Rosenherg, S.A. and Guidotti, G.: *The protein of human erythrocyte membrane. I. Preparation, solubilization and partial characterization. J. Biol. Chem.* 243:1985, 1968.
- 22) Fiske, C.H. and Sufferow, Y.: *The colorimetric determination of phosphorous. J. Biol. Chem.* 65:375, 1925.
- 23) 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.* 235:1976, 1960.
- 24) Bonting, S.L. and Caravaggio, L.L.: *Sodium-potassium-activated adenosine triphosphatase in squid giant axon. Nature (London)* 194: 1180, 1962.
- 25) Wheeler, K.P., and Whittam, R.: *Structural*

- and enzymic aspects of hydrolysis of adenosine triphosphate by membrane of kidney cortex and erythrocytes. *Biochem. J.* 93:349, 1964.
- 26) Skou, J.C.: Preparation from mammalian brain and kidney of enzyme system involved active transport of Na^+ and K^+ , *Biochem. biophys. acta.* 58:314, 1962.
- 27) Schawrtz, A.: $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ -stimulated adenosine triphosphatase in "microsomal" fractions from rat liver. *Biochem. Biophys. Acta.* 67:329, 1964.
- 28) Turkington, R.W.: Thyrotropin-stimulated adenosine triphosphatase in isolated thyroid cell membranes. *Biochem. Biophys. Acta.* 65: 386, 1962.
- 29) Albers, R.W., and Koval, G.J.: Properties of sodiumdependent ATPase of *Electrophorus electricus*. *Life Sc.* 1:219, 1962.
- 30) Bonting, S.L., Simon, K.A. and Hawkins, N. M.: Studies on sodium-potassium-activated adenosine triphosphatase. I. Quantitative distribution in several tissues of cat. *Arch. Biochem.* 95:416, 1961.
- 31) Katz, A.I. and Epstein, F.H.: Physiological role of sodium-potassium-activated adenosine triphosphatase in the transport of cations across biological membranes. *New Eng. J. Med.* 278:253, 1968.
- 32) Whittam, R.: Asymmetrical stimulation of membrane adenosine triphosphatase in relation to active cation transport. *Biochem. J.* 84: 110, 1962.
- 33) Glynn, I.M.: Activation of adenosinetriphosphatase activity in a cell membrane by external potassium and internal sodium. *J. Physiol.* 160:18, 1962.
- 34) Baker, P.F.: The relationship between phosphorus metabolism and the sodium pump in intact nerve. *Biochim. Biophys. Acta.* 75: 287, 1963.