

무흡광색소 식물의 감광수용체 개발 연구(II)
- 표고버섯의 광감응성 mitochondrial ATPase의
유기물 및 금속이온 유입 효과 -

민태진[§]·조석우·김영순·김재웅*·민태익**

동국대학교 화학과, *유한공업전문대 식품영양학과

**한국과학기술원 유전공학센터

Studies on the Development of Photoreceptor in the
Nonchromatophore Organisms (II)
- Effects of organic compound and metal ion influx of Light-Induced
Mitochondrial ATPase in the *Lentinus edodes*(Berk.) Sing -

Tae-Jin Min[§], Suck-Woo Cho, Young-Soon Kim,

Jae-Woong Kim* and Tae-Ick Mheen**

Department of Chemistry, College of Sciences, Dongguk University, Seoul 100, Korea,

*Yuhan Technical College, Seoul 150, Korea and

**Korea Advanced Institute of Science and Technology, Seoul 131, Korea

ABSTRACT: Effects of organic compound, photosensitizer and K⁺ ion influx. On the light-induced ATPase of mitochondria in *L. edodes* purified by linear sucrose density gradient centrifugation were studied. The mitochondrial ATPase activity was investigated by various wavelength illumination at dark state. The mitochondrial ATPase was activated 139% and 128% by 10m mol dithiothreitol and 0.1m mol quinacrine, respectively. This enzyme also was activated 36% by 0.1m mol phenazine methosulfate as photosensitizer. But, 100 mg oligomycin and 1m mol phlorizin inhibited activity of enzyme to 48% and 45%, respectively. Its optimum wavelength was 690 nm on the effect of K⁺ ion influx, its optimum pH and temperature were found to be 7.2 and 55°C.

KEYWORDS: Light-Induced ATPase, *Lentinus edodes*(Berk.) Sing.

Adenosine-5'-triphosphate(ATP)를 ADP와 pi로 분해시키는 효소인 ATPase(Kielly, 1955), 즉 가용성 F₁-ATPase는 소수성 인지질인 F₀-group에 연결되어(Racker, 1976) 미토콘드리아의 내막(Kielly 등, 1953), 엽록체의 thylakoid 및 plasma membrane 등에 존재하는 것으로 보고(Leonard 등, 1976)되어 있다. 또한 F₁-group과 F₀-group이 결합된 F₁·F₀-ATPase 즉 ATP synthetase는 ADP와 pi로부터 ATP를 생성시키는 기능(Okamoto 등, 1977)을 한다.

ATPase의 유기화합물 등에 의한 활성화 변화에 관한 연구로는, sulfhydryl기의 보호제인 dithiothreitol에 의하여 상치 엽록체 중의 ATPase가 활성화된다는 보고(Underwood 등, 1979; Carmeli 등, 1972)가 있고, Hamster의 갈색지방조직 중의 ATPase가 항생제인 quinacrine에 의하여 그 활성이 억제됨이 보고(Houstek 등, 1977)되어 있다.

또한 Carmeli 등(1969)은 엽록체 중의 Ca²⁺-ATPase 및 Mg²⁺-ATPase는 phlorizin에 의하여 그 활성이 억제됨을 보고하였고, *R. rubrum* 박테리

§ 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로.

이 논문은 1986년도 문교부 대학부설연구소 지원 학술연구조성비에 의하여 연구되었음.

아의 chromatophore 중의 ATPase는 oligomycin에 의하여 그 활성이 강력히 억제됨을 보고(Horiuti 등, 1968)하였다.

그리고 광증감제로 알려진 phenazine methosulfate(PMS)에 대한 시금치 엽록체중 ATPase의 활성도 변화(Carmeli 등, 1972), *R. rubrum* 박테리아의 chromatophore 중의 ATPase(Horio 등, 1972; Horiuti 등, 1968) 및 ATP synthetase(Horio 등, 1972)의 PMS 효과는 보고되어 있다.

그러나 버섯중 ATPase에 관한 유기물 및 광증감제에 의한 활성도 변화는 연구 보고된 바 없으며, 버섯은 고등 균류에 속하는 음식 생물로서 엽록체나 박테리아성 엽록소와 같은 흡광색소가 없다. 버섯이 몇 파장의 빛을 필요로 하는지를 알기 위하여 파장 변화에 따른 ATPase 활성도 변화를 측정하였으며(제 1보), 680 nm의 빛을 5분간 조사하였을 때 버섯 ATPase의 활성이 크게 증가함을 알았다.

본 연구에서는 표고버섯중 미토콘드리아에 680 nm 빛을 5분 동안 조사하여 얻은 미토콘드리아성 ATPase에 대한 유기물 효과로 dithiothreitol, quina-crine, oligomycin 및 phlorizin에 대한 활성도 변화와, 광증감제인 phenazine methosulfate를 처리하고 680 nm의 빛을 5분 동안 조사하여 미토콘드리아성 ATPase의 활성도 변화를 측정하였고, 빛에 의한 금속이온 유입 효과의 실험으로, K⁺ 이온 유입에 따른 버섯의 미토콘드리아성 ATPase의 특성을 조사하여 빛의 파장과의 관계를 실험하였다.

材料 및 方法

재 료

경기도 광릉에서 채취한 야생 표고버섯, *Lentinus edodes* (Berk.) Sing을 사용하였고, adenosine-5'-triphosphate(ATP), bovine albumin(BA), dithiothreitol(DTT), phenazine methosulfate(PMS), quinacrine, phlorizin 및 oligomycin 등은 Sigma Co. 제품을 tris (hydroxymethyl)aminoethane(Tris), sucrose, 1-amino-2-naphtol-4-sulfonic acid(ANSA)는 Wako Co. 제품을, ammonium molybdate(AM) 및 Coomassie brilliant blue G 250(CBB G 250)은 Merk Co. 제품을 사용하였고, 그외의 시약은 분석용 특급시약을 사용하였으며, 본 실험에 사용한 물은 탈이온수(전도도; $10^{-7} \Omega \text{cm}^{-1}$)를 사용하였다.

미토콘드리아의 분리 정제

제 1보에서 언급한 바와 같이, Blair(1967) 및 Cooper(1969)의 방법을 인용하여 분리 정제하였고, 전자현미경으로 확인하여 사용하였다.

파장별 광조사

제 1보에서 언급한 방법으로, 미토콘드리아성 ATPase의 유기물 효과 실험에서는 680 nm 빛을 5분간 조사(최적 광조사 조건)하여 실험하였으며, K⁺ 이온 유입 효과 실험에서는 각 파장별 빛을 30분 동안 조사(광량; 2.0×10^{14} 광자/cm²)하여 실험하였다.

ATPase의 활성도 측정

제 1보에서 언급한 바와 같이 Rorive 등(1972)의 방법으로 측정하였으며, 단백질 정량은 Sedmak 등(1977)의 방법에 따라 실험하였고, 활성도 단위는 37°C에서 매 분당 효소 단백질 1mg이 ATP로부터 1 μmol의 Pi를 유리시키는 양을 1단위로 하였다.

유기물 효과

최적 광조사 조건하에서 빛을 조사하여 얻은 미토콘드리아성 ATPase의 유기물 효과는 0.1~10 mmol DTT, 0.01~1.0 mmol phlorizin 및 0.01~0.1 mmol, quinacrine을 각각 가하여 최적 pH, 최적 온도하에서 10분 동안 처리한 다음, 활성도를 측정하였으며, oligomycin 효과는 0.1~100 mg의 oligomycin을 에탄올에 각각 녹인 다음 이를 각각 가하여 활성도를 측정하였다.

광증감제에 의한 활성도 변화

분리 정제된 미토콘드리아 1 ml를 각각 취하여, 0.01~0.1 mmol PMS를 각각 가하고, 최적 광조사 조건하에서 빛을 조사하여 얻은 미토콘드리아성 ATPase의 최적 pH 및 최적 온도하에서 활성도를 측정하였다. 또한 PMS를 가하고 빛을 조사하지 않은 실험구를 대조구로 하였다.

파장 변화에 따른 K⁺ 이온의 유입 효과

분리 정제된 미토콘드리아 1 ml를 각각 취하여 3 mmol KCl을 각각 가하여 각 파장별(400 nm~700 nm) 빛을 30분 동안 조사하여 K⁺ 이온을 유입시킨 다음, 액체 질소 중에서 반응을 정지시킨 다음, 녹여 17,000 rpm으로 10분 동안 원심분리하여 유입되지 않은 K⁺ 이온을 제거하고 위와같은 방법으로 미토콘드리아성 ATPase의 비활성도를 측정하였다

K⁺ 이온 유입 효과에 따른 최적 pH

미토콘드리아성 ATPase에 3 mmol의 KCl을 가하여 최적 파장인 690 nm의 빛을 5분간 조사한 후, 제

1보의 방법과 같이, pH를 각각 변화시켜 측정하였다.

K⁺ 이온 유입 효과에 따른 최적 온도

미토콘드리아성 ATPase에 3mmol의 KCl을 가하여 최적 파장인 690 nm의 빛을 5분간 조사한 후, 제 1보의 방법으로, 온도를 각각 변화시켜, 활성도를 측정하였다.

結果 및 考察

유기물 효과

최적 광조건으로 빛을 조사하여 얻은 미토콘드리아성 ATPase의 최적 pH 7.5 및 최적 온도 59°C에서 측정된 유기물들의 효과는 Table I과 같다.

Table I. Effects of organic compound on the mitochondrial ATPase activity after illumination for 5 min at 680 nm.

Compound	Concentration (mmole)	Relative activity (%)
None		100
DTT	0.01	121
	0.10	124
	1.00	132
	5.00	176
	10.00	239
Quinacrine	0.01	78
	0.02	114
	0.03	133
	0.10	228
Oligomycin*	0.1	86
	1.0	66
	10.0	61
Phlorizin	100.0	52
	0.01	61
	0.10	58
PMS**	1.00	55
	0.01	116
	0.05	123
	0.10	136

* The concentration of oligomycin was mg/0.1 ml
 ** Mitochondrial ATPase activity after treated with PMS as photosensitizer and illumination for 5 min at 680 nm

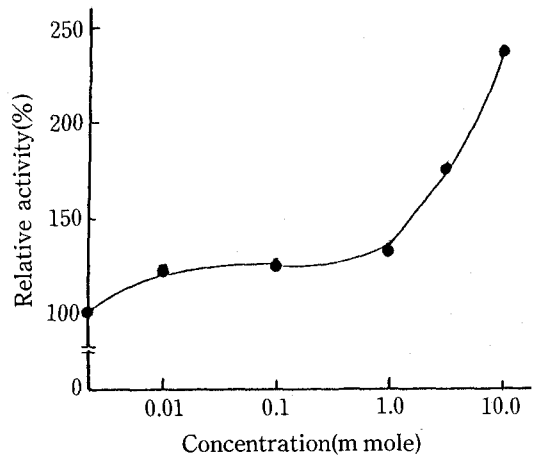


Fig.1. Effect of DTT on the mitochondrial ATPase activity after illumination for 5 min at 680 nm.

DTT의 농도 증가에 따른 활성도 변화는 Fig. 1과 같고, 0.01mmol에서 1mmol까지는 완만한 활성도 증가를 보이나, 10mmol에서는 139% 활성화됨을 보여주고 있다.

이 결과는 sulfhydryl기의 보호제인 DTT에 의하여 상처 염색체 중의 ATPase(Carmeli 등, 1972, Underwood 등, 1979)가 활성화된다는 보고와 일치하였고, 이는 효소의 활성 부위에 존재하는 SH기가 산화 방지되어 활성이 크게 증가하는 것으로 사

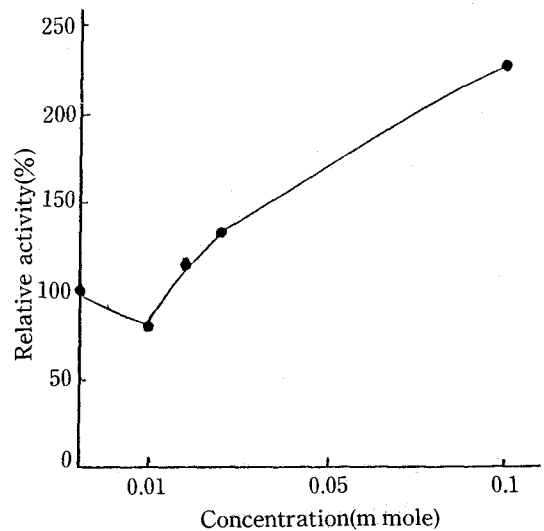


Fig.2. Effects of quinacrine on the mitochondrial ATPase activity after illumination for 5 min at 680 nm.

러된다.

Quinacrine의 농도 증가에 따른 활성화 변화는 Fig. 2와 같다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 0.01m mol에서는 처리하지 않았을 때보다 활성을 22% 억제하였으나 그 이상의 농도에서는 농도 증가에 따라 효소의 활성을 증가시켜 0.1m mol 때 128% 활성화됨을 보여주고 있다.

이 결과는 Hamster의 갈색지방조직 중의 ATPase가 항생제인 quinacrine에 의하여 1.35 μ mol 때 그 활성을 20% 억제시키나 그 농도가 증가함에 따라 활성도가 크게 증가한다는 보고(Houstek 등, 1977)와 농도차는 있으나 같은 경향을 보였다.

Oligomycin의 농도 변화에 따른 활성화도 효과는 Fig. 3과 같고, 농도 증가에 따라 그 활성이 크게 감소하는 경향을 보여 oligomycin 100 μ g을 처리하였을 때 48%의 활성도를 억제시켰다.

Horiuti 등(1968)은 *R. rubrum* 박테리아의 chromatophore 중의 ATPase는 3.3 μ g의 oligomycin에 의하여 그 활성도가 90% 억제됨을 보고하였으나, 버섯 중의 ATPase는 100 μ g의 oligomycin 처리때 48%의 활성도를 억제시켜 상이하였다.

Phlorizin에 의한 활성화도 변화는 Fig. 4와 같고, 농도 증가에 따라 그 활성을 크게 억제시켰으며, 1m mol 처리에서 45%의 활성도를 억제시켰다.

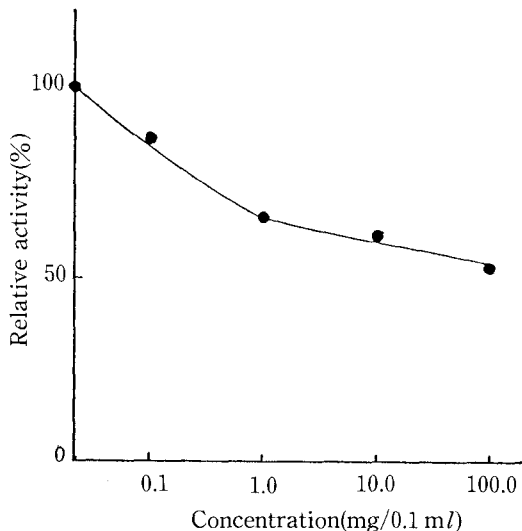


Fig. 3. Effect of oligomycin on the mitochondrial ATPase activity after illumination for 5 min at 680 nm.

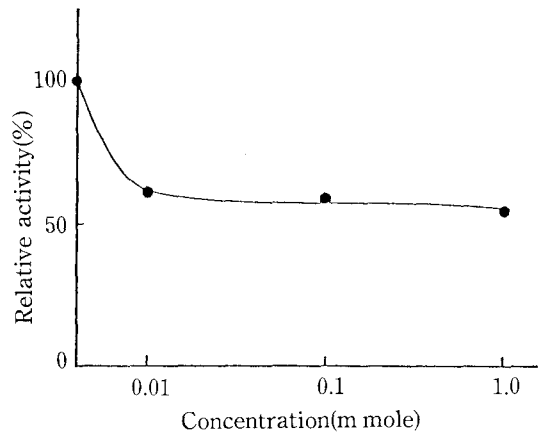


Fig. 4. Effect of phlorizin on the mitochondrial ATPase activity after illumination for 5 min at 680 nm.

이 결과는 엽록체 중의 Ca^{2+} -ATPase는 7.5m mol phlorizin에 의하여 그 활성도가 53% 억제된다는 보고(Carmeli 등, 1969)와 Mg^{2+} -ATPase가 1m mol phlorizin에 의하여 40%의 활성을 억제시킨다는 보고(Carmeli, 1969)와 유사하였다.

광증감제에 의한 활성화도 변화

포고버섯중 미토콘드리아에 680 nm의 빛을 흡광하는 물질이 있는지 없는지를 알기 위한 기초 연구로서 광증감제로 알려진 PMS(Horiuti 등, 1968, Carmeli, 1969)에 대한 효과는 Fig. 5와 같다.

Fig. 5에서 보는 바와 같이, PMS를 가하지 않고

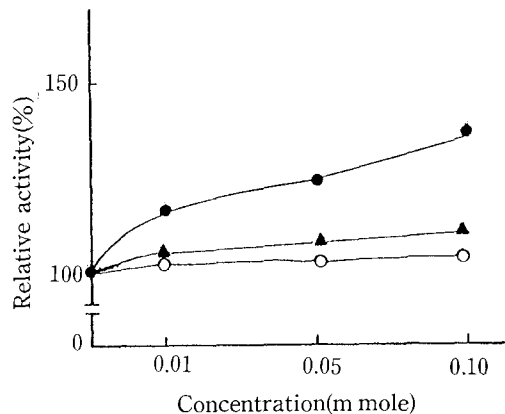


Fig. 5. Mitochondrial ATPase activity after treatment with PMS as photosensitizer and illumination for 5 min at 680 nm.

○; dark state in the presence of each PMS
 ▲; complex wavelength in the presence of each PMS
 ●; illumination in the presence of each PMS

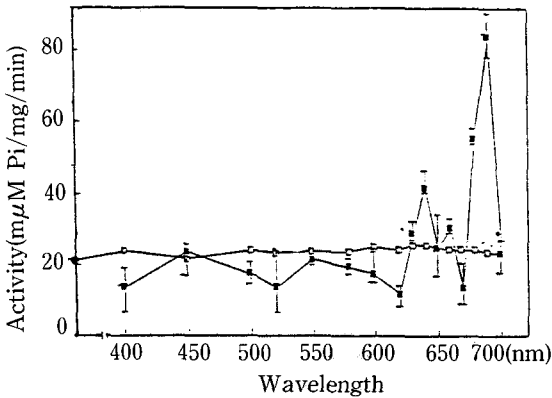


Fig. 6. Compared with mitochondrial ATPase activity on the illumination of each wavelength light after treated with 3 m mole KCl and control group.

□; complex wavelength, ■; illumination, ●; dark state

빛을 조사한 상태를 100으로 하고, 농도별 PMS를 가한 후 빛을 조사하지 않은 상태와 복합파장의 빛을 5분 동안 조사하여 측정할 활성도를 각각 대조구로 하였을 때, 농도별 PMS를 각각 가하여 680 nm의 빛을 5분간 조사할 경우, PMS의 농도 증가에 따라 활성화되는 경향을 보였으며, 0.1m mol에서 36%의 가장 큰 활성도 증가를 나타내었다.

이 결과는 포고버섯중의 미토콘드리아성 ATPase에 680 nm 빛을 흡광하는 미지의 저분자량의 물질이 존재함에 따른 것으로 추정된다.

파장 변화에 따른 K⁺ 이온 유입 효과

파장 변화에 따른 금속이온의 유입 효과를 실험하기 위하여 미토콘드리아 1m에 3m mol KCl을 가하고 각 파장별 빛을 30분 동안 조사하여 얻은 미토콘드리아성 ATPase의 비활성도는 Fig. 6과 같다.

3m mol KCl을 가한 후 빛을 조사하지 않은 상태와 복합파장의 빛을 조사하였을 때의 비활성도는 각각 21과 23.41이었다. 그러나 파장별 빛을 조사하여 얻은 활성도는 640 nm, 660 nm, 680 nm 및 690 nm에서는 주기적으로 그 활성도가 증가함을 보였고 특히 690 nm에서는 비활성도가 85.8로 대조구에 비하여 3.7배 증가함을 보였다.

이 결과를 통하여 파장 변화에 따른 K⁺ 이온의 유입 효과에서 ATPase의 활성은 690 nm에서 가장 활성화됨을 알았다.

파장변화에 따른 미토콘드리아성 ATPase의 비활성도 변화와 K⁺ 이온의 유입 효과에 의한 활성도 변화를 비교한 결과는 Fig. 7과 같다.

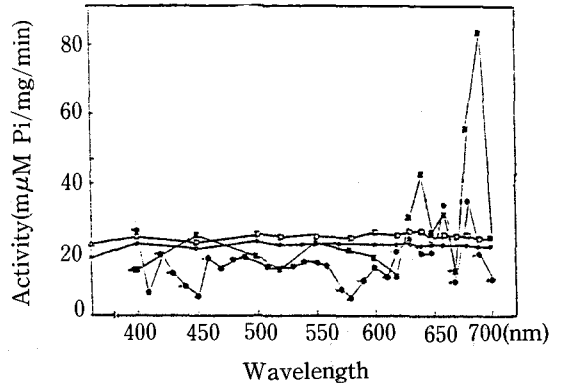


Fig. 7. Comparison of mitochondrial ATPase activity after wavelength light illumination for 30 min and its control group and mitochondrial ATPase activity on the illumination of each wavelength light after treated with 3 m mole KCl and its control group.

○; complex wavelength without 3 m mole KCl, □; complex wavelength with 3 m mole KCl, ●; illumination without 3 m mole KCl, ■; illumination with 3 m mole KCl, △; dark state with 3 m mole KCl, ▲; dark state without 3 m mole KCl

Fig. 7에서 보는 바와 같이 K⁺ 이온이 없을 때 대조구의 비활성도는 21.1이었고, K⁺ 이온이 있을 때

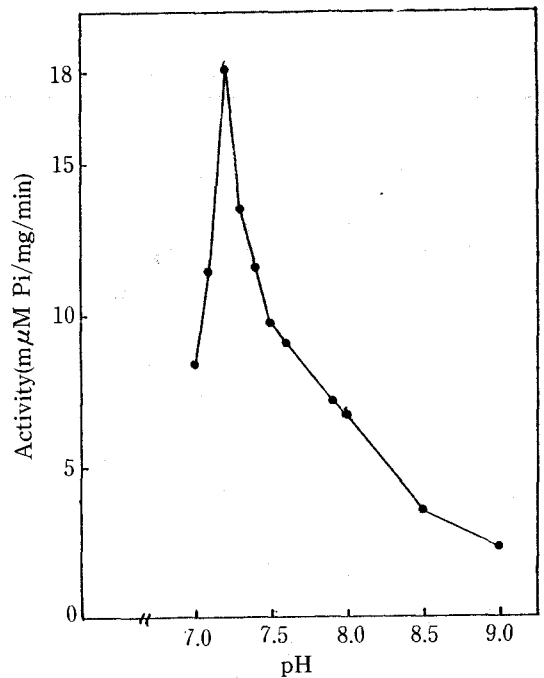


Fig. 8. pH effect of mitochondrial ATPase after treated with 3 m mole KCl and illumination for 5 min at 690 nm.

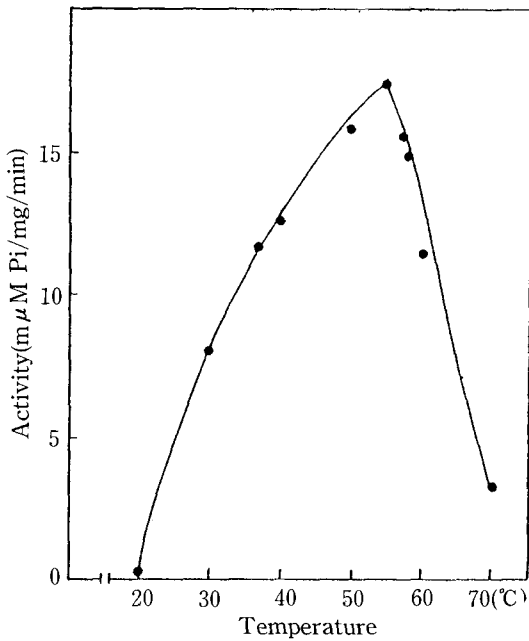


Fig.9. Temperature effect of mitochondrial ATPase after treated with 3 m mole KCl and illumination for 5 min at 690 nm.

대조구의 비활성도는 23.4로 약간 증가함을 보였다.

파장 변화에 따라 K⁺ 이온이 없을 때의 비활성도는 K⁺ 이온 유입 효과에 의한 비활성도보다 크게 감소하는 경향을 보였으며, 이때 최적 파장의 차는 10 nm였다.

이 결과는 K⁺ 이온의 유입에 따라 미토콘드리아성 ATPase의 입체구조가 변하는 것으로 사려된다.

K⁺ 이온 유입 효과에 따른 최적 pH

K⁺ 이온의 유입 효과에서, pH 변화에 따른 활성도 변화는 Fig. 8과 같고, 이때 최적 pH는 7.2였다.

이 결과는 K⁺ 이온을 유입시키지 않았을 때의 미토콘드리아성 ATPase의 최적 pH 7.5와는 차이가 있었다.

K⁺ 이온 유입 효과에 따른 최적 온도

K⁺ 이온 유입 효과에서, 이 효소의 온도 변화에 따른 활성도 변화는 Fig. 9와 같고, 이때 최적 온도는 55°C였다. 이 결과는 K⁺ 이온을 유입시키지 않았을 때의 최적 온도 59°C와는 4°C의 차이를 보였다.

摘 要

표고버섯의 미토콘드리아는 설탕밀도 선형기울기

원심분리법으로 정제하여, 광감응성 mitochondrial ATPase의 유기물 효과, 광증감제 효과 및 파장 변화에 따른 K⁺ 이온의 유입 효과를 실험하였다.

1. 이 효소는 10m mol dithiothreitol 및 0.1m mol quinacrine에 의하여 각각 139% 및 128%의 활성도를 증가시켰다.

2. 100 μg의 oligomycin과 1m mol phlorizin은 이 효소의 활성을 각각 48% 및 45% 억제시켰다.

3. 광증감제인 0.1m mol phenazine methosulfate는 이 효소의 활성도를 36% 촉진시켰다.

4. K⁺ 이온 유입 효과의 최적 파장은 690 nm였고, 이때의 최적 pH 및 최적 온도는 각각 7.2 및 55°C였다.

參考文獻

- Blair, P.V.(1967): The large-scale preparation and properties of hart mitochondrial from slaughterhouse material. *Methods Enzymol.* **10**: 78-81.
- Carmeli, C.(1969): Properties of ATPase in chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta.* **189**: 256-266.
- Carmeli, C. and Avron, M.(1972): Light-Triggered and Light-Dependent ATPase activities in chloroplasts. *Methods Enzymol.* **24**: 92-96.
- Cooper, T.G. and Beevers, H.(1969): Mitochondria and glyoxysomes from castor bean endosperm. *J. Biol. Chem.* **244**: 3507-3512.
- Horio, T., Horiuti, Y., Yamamoto, N. and Nishikawa, K.(1972): Light-Influenced ATPase activity; Bacterial. *Methods Enzymol.* **24**: 96-103.
- Horiuti, Y., Nishikawa, K. and Horio, T.(1968): Oxidation-reduction potential-dependent ATPase activity of chromatophore from *Rhodospirillum rubrum*. *J. Biochem.* **64**: 577-587.
- Housteck, J. and Drahota, Z.(1977): Purification and properties of mitochondrial Adenosine Triphosphatase of Hamster Brown Adipose Tissue. *Biochim. Biophys. Acta.* **484**: 127-139.
- Kielly, W.W. and Kielly, R.K.(1953): A specific ATPase of liver mitochondria. *J. Biol. Chem.* **200**: 213-219.
- Kielly, W.W.(1955): Mitochondrial ATPase. *Methods Enzymol.* **2**: 593-598.
- Leonard and Woude(1976): Isolation of plasma membranes from corn roots by sucrose density gradient centrifugation. *Plant Physiology* **57**: 105-112.

- Okamoto, H., Sone, N., Hirata, H. and Kagawa, Y. (1977): Purified proton conductor in proton translocating Adenosine Triphosphatase. *J. Biol. Chem.* **252**: 6125-6131.
- Racker, E.(1976): The possible organization of the polypeptides of $F_1 \cdot F_0$ -ATPase. *Trends Biochem. Sci.* **1**: 244-255.
- Rorive, G. and Kleinzeller, A.(1972): The effect of ATP and Ca^{2+} on the cellvolume in isolated Kidney. Tubules. *Biochim. Biophys. Acta.* **274**: 226-239.
- Sedmak, J.J. and Grossberg, S.E.(1977): A rapid, sensitive and versatile assay for protein using Coomassie brilliant blue. G 250. *Anal. Biochem.* **79**: 544-552.
- Underwood, C. and Gould, J.M.(1979): Proton efflux through the chloroplast ATP synthase($cF_0 \cdot cF_1$) in the presence of sulfhydryl-modifying agents. *Biochim. Biophys. Acta.* **589**: 287-297.
- Accepted for Publication 28 December 1987**