

무흡광 색소생물의 감광수용체 개발 연구(IV)
- 표고버섯 중의 광감응성 Mitochondrial ATP synthase 의
유기물 및 금속이온 유입효과 -

민태진[§] · 이완기 · 김재웅* · 민태익**

동국대학교 이과대학 화학과 *유한공업전문대학 식품영양학과

**한국과학기술원 유전공학센터

Studies on the Development of Photoreceptor in the
Nonchromatophore Organisms (IV)
- Effects of organic compound and metal ion influx of light-induced
Mitochondrial ATP synthase in *Lentinus edodes* (Berk.) Sing -

Tae-Jin Min, Wan-Gie Lee, Jae-Woong Kim* and Tae-Ick Mheen**

Department of Chemistry, College of Sciences, Dongguk University, Seoul 100-715,

*Yuhan Technical College, Seoul 422-100 and **Korea Advanced Institute of Science and Technology,
Seoul 136-791, Korea.

ABSTRACT: Effects of organic compounds, photosensitizers and influx of metal ions on the light-induced mitochondrial ATP synthase in *Lentinus edodes* purified by stepped sucrose density gradient centrifugation were studied. In our previous work, the activation wavelength and the illumination time of mitochondrial ATP synthase were 470 nm and 15 sec, respectively. This enzyme was activated 85% by 1 mmole 2,6-dichlorophenol indopheol and inhibited by 1 mmole 2,4-dinitrophenol, 10 μ mole 2-heptyl-4-hydroxyquinoline-N-oxide and 100 μ g oligomycin per ml of ethanol. Particularly, the enzyme was activated 414% by 10 mmole phenazine methosulfate as photosensitizer at 470 nm light. In the influx effects of Fe^{3+} and Fe^{2+} ion, the activity of the above enzyme increased under the optimal light condition compared with nonillumination state.

KEYWORDS: Light-induced mitochondrial ATP synthase, *Lentinus edodes*

ATP synthase 즉, $F_1 \cdot F_0$ -ATPase 는 ADP 와 P_i 로부터 ATP를 생성 촉진하는 효소이다. 이는 5개의 subunit로 된 (Catteral 등, 1971) 가 용성 F_1 -group이 OSCP에 의하여 소수성 인지 질로 구성된 F_0 -group에 결합(Racker 등, 1976) 되어 있다. 이 때 F_1 -ATPase는 ATP를 ADP와 P_i 로 분해시키는 역할(Kielly, 1955)을 한다.

$F_1 \cdot F_0$ -ATPase는 미토콘드리아의 내막(Kielly,

1953), 엽록체의 thylakoid 및 plasma membrane(Leonard 등, 1976)에 존재하고, 전자전달계에 관여하는 효소로 알려져 있다.

R. rubrum 박테리아의 chromatophore 중의 ATP synthase는 oligomycin 2,4-dinitrophenol (DNP) 및 2,6-dichlorophenol indopheol (DCPI) 등에 의하여 그 활성이 강력히 억제됨이 보고(Horiuti 등, 1968)되어 있다. 또한, 광증감

§본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로.

이 논문은 1987년도 문교부 대학부설연구소 지원 학술연구조성비와 과학재단연구비에 의하여 연구되었음

제로 알려진 phenazine methosulfate (PMS)에 대한 ATP synthase (Horio 등, 1972)의 활성도 변화 등이 연구되어 있다.

본 연구실에서는 고등균류에 속하는 음지생물로서 엽록체나 박테리아성 엽록소와 같은 흡광색소가 없는 표고버섯의 체내대사 및 성장에 관한 빛의 영향을 규명하기 위한 기초 연구로서, 미토콘드리아성 ATPase가 680 nm 빛을 5분간 조사할 때 가장 활성화됨을 보고 (Min 등, 1987a) 하였고 그에 대한 유기물, 금속이온, 음이온 및 광증감제에 의한 활성도 변화를 보고 (Min 등, 1987b) 한 바 있다.

또한, 과장변화에 따른 미토콘드리아성 ATP synthase의 활성도 변화를 측정하여, 470 nm의 빛을 15초 동안 조사할 때 가장 활성화됨을 알았다. (제 III보).

본 연구에서는 표고버섯의 미토콘드리아 내의 광감응성 ATP synthase에 대한 유기물, 금속이온 유입효과 및 광증감제인 phenazine methosulfate에 대한 활성도 변화 등을 측정하여 빛과 미토콘드리아성 ATP synthase와의 관계를 연구하였다.

材料 및 方法

재료

시료는 경기도 광릉에서 채취한 야생표고버섯, *Lentinus edodes* (Berk.) Sing.을 사용하였고, 본 실험에서 사용한 adenosine-5'-diphosphate (ADP), bovine albumin (BA), 2,4-dinitrophenol (DNP), 2-heptyl-4-hydroxyquinoline-N-oxide (HHQNO), 2,6-dichlorophenol indophenol (DCPI), phenazin methosulfate (PMS) 및 oligomycin 등은 Sigma Co. 제품을, phosphoric acid (Pi), tris(hydroxymethyl) aminoethane (Tris), 1-amino-2-naphtol-4-sulfonic acid (ANSA), trichloroacetic acid (TCA) 및 perchloric acid 등은 Wako Co. 특급제품을, ammonium molybdate (AM)는 Fisher Scientific Co. 제품을, coomassie brilliant blue G-250 (CBB G-250) 등은 Merck Co. 제품을 사용하였

으며, 그 외의 시약들은 분석용 특급시약을 사용하였다. 본 실험에 사용한 물은 탈이온수 (전도도: 10^{-7} cm^{-1})를 사용하였다.

미토콘드리아의 분리 정제

제 I보에서와 언급한 바와 같이 (Min 등, 1987a), Blair (1967) 및 Cooper (1969)의 방법을 인용하여 분리 정제하였고, 전자현미경으로 정제를 확인하였다.

미토콘드리아성 ATP synthase의 빛조사 실험

제 III보에서와 동일한 방법으로, 분리 정제한 미토콘드리아를 470 nm의 빛을 15초 동안 조사 (최적광조사 조건)하여 실험하였다.

미토콘드리아성 ATP synthase의 활성도 측정

제 III보에서 언급한 바와 같이 Rorive 등 (1972)의 방법을 인용하여 측정하였다. 단백질 정량은 Sedmak 등 (1977)의 방법을 인용하여 측정하였으며, 효소의 비활성도 단위는 37°C에서 매 분당 효소단백질 1 mg이 기질로부터 감소시키는 1 μ mole의 Pi를 1단위로 하였다.

미토콘드리아성 ATP synthase의 유기물효과

최적광조사 조건에서 빛을 조사한 미토콘드리아성 ATP synthase의 유기물효과는 0.05-1.0 mmole DNP, 0.1-10 μ mole HHQNO 및 0.001-1.0 mmole DCPI를 농도별로 각각 가하여 최적 pH, 7.5와 37°C 조건에서 10분 동안 반응시킨 후 Rorive 등 (1972)의 방법에 따라 각각의 활성도 변화를 측정하였다.

Oligomycin 효과는 0.1-100 μ g을 ethanol에 각각 녹인 용액을 사용하여 측정하였다. 이때 각 유기물을 가하지 않은 group을 대조구로 하였다.

광증감제에 의한 활성도 변화

분리 정제된 미토콘드리아에 PMS를 농도별로 가하여 최적광조사 조건으로 빛을 조사한 후 활성도를 측정하였으며, 또한 PMS를 가하지 않은 group을 대조구로 하였다.

금속이온의 유입효과

분리 정제된 미토콘드리아에 Fe^{3+} 및 Fe^{2+} 이온을 각각의 농도별로 가하여 최적광조사 조건으로 빛을 조사하여 Fe^{3+} 및 Fe^{2+} 이온을 유입시킨 다음, 원심분리 (50,000 rpm, 10min)하여 유입되지 않은 금속이온을 제거한 후 초음파 (Ultrasonifier,

Fisher Co.)로 60초 동안 처리하여 막이 파괴된 미토콘드리아성 ATP synthase의 활성도를 측정하였다.

結果 및 考察

미토콘드리아성 ATP synthase의 유기화합물 효과

최적 광조사 조건(470 nm, 15 초)으로 빛을 조사하여 얻은 ATP synthase의 각 유기물효과는 Table I과 같고, DNP의 효과는 Fig.1과 같다.

Fig.1에서 보는 바와 같이 DNP의 농도가 0.05 mmole에서 1mmole로 증가함에 따라 효소의 활성도를 억제하였으며, 1 mmole 농도일 때

Table 1. Effects of organic compounds on the mitochondrial ATP synthase activity after illumination for 15 sec. at 470 nm.

Compound	Concentration (mmole)	Relative activity (%)
None		100
DNP	0.05	71
	0.1	49
	0.5	47
	1.0	39
	1.0	39
HHQNO	0.1 (μ mole)	64
	1.0 (μ mole)	62
	10.0 (μ mole)	51
Oligomycin*	0.1	100
	1.0	97
	10.0	96
	100.0	88
DCPI	0.001	105
	0.01	125
	0.1	155
	1.0	185
PMS	0.01	120
	0.1	167
	1.0	174
	10.0	514

*The concentration of oligomycin was g/ml.

61%로 가장 크게 억제함을 보였다. 0.1-10 μ mole HHQNO 효과는 Fig.2와 같고 Fig.2에서 보는 바와 같이 농도가 증가함에 따라, 그 활성도를 억제시키는 경향을 보여 10 μ mole로 처리하였을 때, 49%의 활성도를 억제함을 보였다. 또한, 미

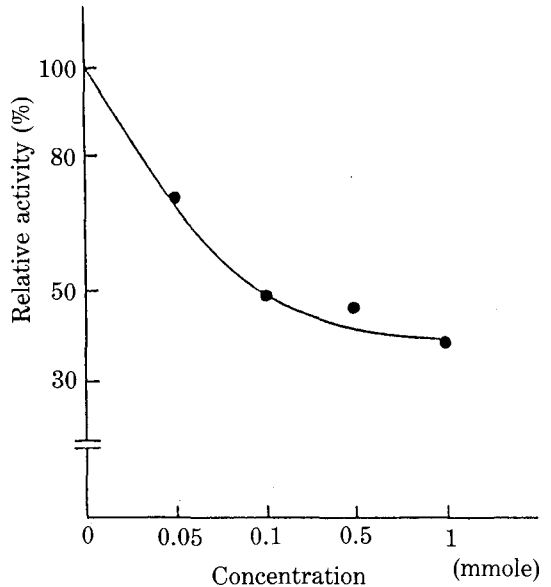


Fig. 1. Effect of DNP on the mitochondrial ATP synthase activity after illumination for 15 sec. at 470 nm.

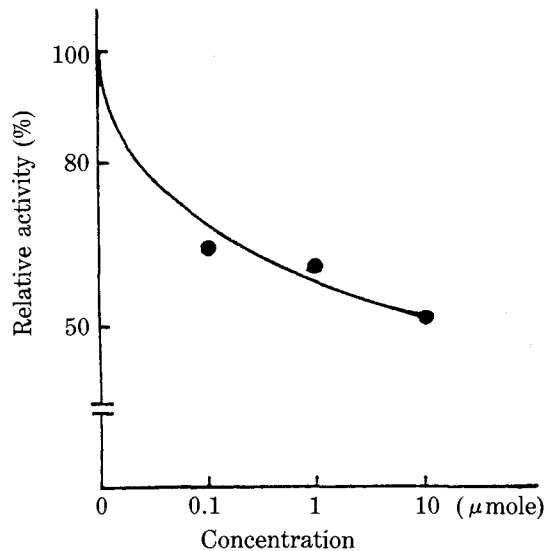


Fig. 2. Effect of HHQNO on the mitochondrial ATP synthase activity after illumination for 15 sec. at 470 nm.

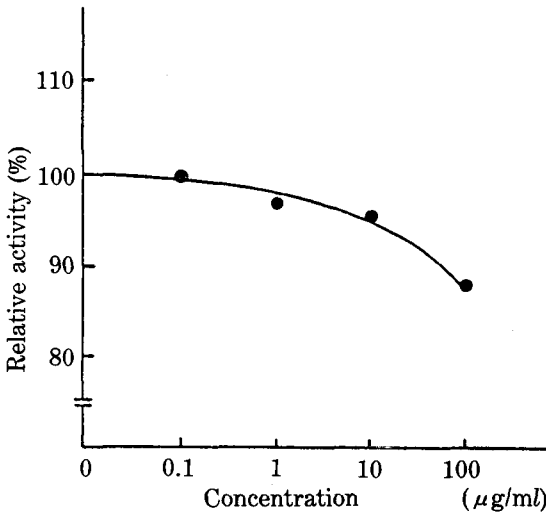


Fig. 3. Effect of oligomycin on the mitochondrial ATP synthase activity after illumination for 15 sec. at 470 nm.

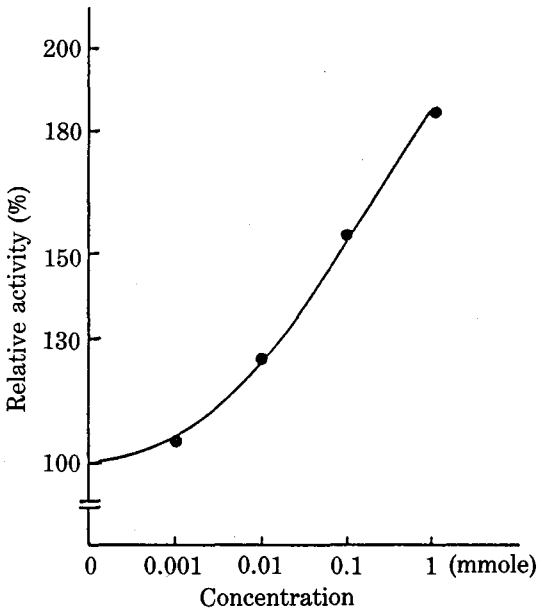


Fig. 4. Effect of DCPI on the mitochondrial ATP synthase activity after illumination for 15 sec. at 470 nm.

토콘드리아성 ATP synthase의 oligomycin 효과는 Fig.3과 같다. 0.1-100 µg을 처리하였을 때 그 농도가 증가됨에 따라 활성도를 감소시키는 경향을 보였으며, 100 µg을 처리하였을 때 12%의 활성도를 억제하였다.

그리고, DCPI의 효과는 Fig.4와 같고 0.001

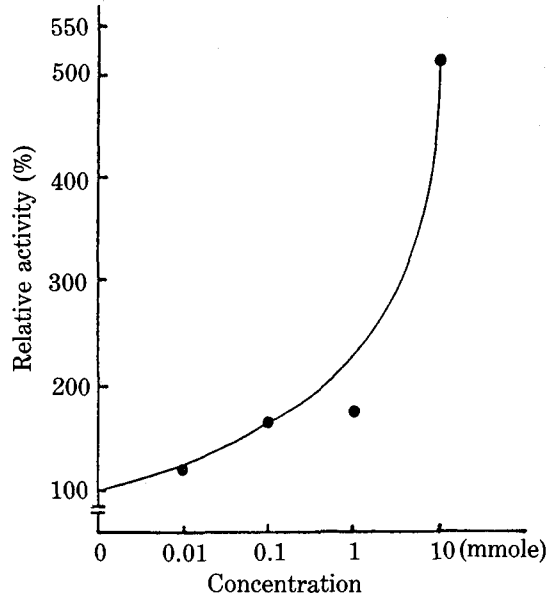


Fig. 5. Effect of PMS on the mitochondrial ATP synthase activity after illumination for 15 sec. at 470 nm.

mmole에서 1.0 mmole로 농도가 증가함에 따라 활성도가 크게 증가하는 경향을 보였으며, 1 mmole 처리시 그 활성도는 85% 증가하였다.

이와 같은 결과들은 *R. rubrum* 박테리아의 chromatophore 중의 ATP synthase(Horiuti 등, 1968)가 uncoupler(Arnon 등, 1956; Lehninger, 1982)로 알려진 1 mmole의 DNP에 의하여 그 활성도가 50% 억제되었다는 보고와 ascorbate 존재하에서 0.64 mmole DCPI를 처리할 때 그 활성이 100% 증가된 결과(Arnon 등, 1956)와 유사하였다. 또한, 억제제로 알려진 HHQNO와 oligomycin(Horio 등, 1972) 효과는 0.1 mmole HHQNO와 3.3 µg/ml의 oligomycin의 농도에서 효소의 활성을 완전히 억제한다는 보고가 있으나, 본 실험에서는 10 µmole HHQNO와 100 µg/ml oligomycin에 의하여 각각 49% 및 42%의 효소활성을 억제함으로써 그 정도에 있어서 많은 차이가 있음을 알았다.

광증감제에 의한 효소의 활성도 변화

표고버섯 중의 미토콘드리아 내에 미토콘드리아성 ATP synthase의 최적 파장인 470 nm의 빛을 흡광하는 물질이 있는지의 여부를 알기 위하여

광증감제로 알려진 PMS(Geller 등, 1960; Kamen, 1963)에 의한 활성도 변화를 측정된 결과는 Fig.5에 나타내었다. Fig.5에서 보는 바와 같이 그 농도를 0.01 mmole에서 10 mmole까지 각각 변화시켰을 때 농도증가에 따라 활성도가 급격히 증가하는 경향을 보였으며 10 mmole 처리시 무려 414%의 활성증가를 보였다.

앞서 보고한 표고버섯 중의 미토콘드리아성 ATPase(Min 등, 1987b)의 경우 0.1 mmole PMS에 의하여 36%의 효소활성이 증가되었으나, 본 실험에서는 414%의 효소활성이 증가되는 것으로 보아 미토콘드리아성 ATP synthase 중에는 470 nm의 빛을 흡광하여 효소를 활성화하는 미지의 흡광물질이 존재하는 것으로 추정된다.

최적광조사 조건에서의 금속이온 유입효과

최적파장 470 nm, 최적시간 15초 동안 빛을 조사할 때, 금속이온의 농도변화에 따른 미토콘드리아성 ATP synthase의 Fe³⁺ 및 Fe²⁺ 이온의 유입효과는 Table II 및 Fig.6과 같다. Fig.6에서 보는 바와 같이 빛이 없었을 때에 비하여 각각 14%와 12%의 효소활성을 증가시켰다.

이와 같은 결과는 제 III보의 미토콘드리아성 ATP synthase의 금속이온 효과에서 1 mmole Fe³⁺ 이온이 26%의 효소활성을 증가시키는 것과는 상이하였으며 0.5 mmole의 Fe²⁺ 이온이 25%의 효소활성을 증가시키는 것과는 증가정도의 차

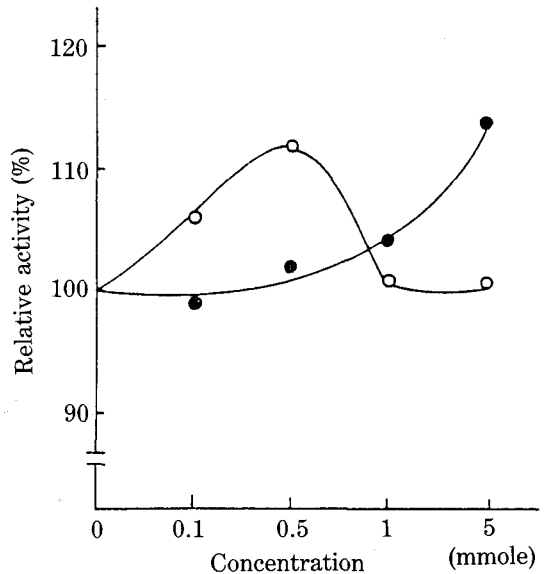


Fig. 6. Effects of Fe³⁺ and Fe²⁺ ion on the mitochondrial ATP synthase activity after illumination for 15 sec. at 470 nm.

이는 있으나 같은 농도에서 Fe²⁺ 이온유입효과를 나타내었다.

이 실험을 통하여 Fe³⁺ 및 Fe²⁺ 이온이 미토콘드리아성 ATPsynthase를 활성화시키는 물질로 작용하고, 이들 이온은 빛에 의하여 유입되는 효과로 추정된다.

摘 要

1. 최적광조사 조건, 470 nm에서 15초 동안 빛을 조사한 미토콘드리아성 ATP synthase는 1 mmole DCPI에 의하여 그 활성이 85% 증가되었다.

2. 1 mmole DNP, 10 μmole HHQNO 및 100 μg/ml의 oligomycin은 이 효소의 활성을 각각 61, 41% 및 12% 억제시켰다.

3. 최적 조건의 빛에 의한 Fe³⁺ 및 Fe²⁺ 이온의 유입효과에서, 5 mmole Fe³⁺ 및 0.5 mmole Fe²⁺ 이온에 의하여 이 효소 활성이 각각 14% 및 12% 증가되었다.

4. 광증감제인 phenazine methosulfate의 존재하에서 470 nm의 빛을 조사한 후의 효소의 활성도가 크게 증가되는 것으로 보아, 미토콘드리아

Table 2. Fe³⁺ and Fe²⁺ ion influx effects on the mitochondrial ATP synthase after illumination for 15 sec. at 470 nm.

Cation	Concentration (mmole)	Relative activity (%)
None		100
Fe ³⁺	0.1	99
	0.5	101
	1.0	104
	5.0	114
	Fe ²⁺	0.1
0.5		112
1.0		101
5.0		101

성 ATP synthase 내에 미지의 흡광물질이 존재함을 추정할 수 있었다.

參考文獻

- Arnon, D.I., Allen, M.B. and Whatley, F.R. (1956): Photosynthesis by isolated chloroplasts (IV). *Biochim. Biophys. Acta.* **20**: 449-461.
- Blair, P.V. (1967): The large-scale preparation properties of heart mitochondria from slaughter material *Methods Enzymol.* **10**: 78-81.
- Catterall, W.A. and Pederson, P.L. (1971): Adenosine triphosphatase from rat liver mitochondria. *J. Biol. Chem.* **246**: 4987-4994.
- Cooper, T.G. and Beevers, H. (1969): Mitochondria and glyoxysomes from endosperm enzyme constituents and capacity. *J. Biol. Chem.* **244**: 3507-3513.
- Geller, D.M. and Lipmann, F. (1960): Photophosphorylation in extracts of *Rhodospirillum rubrum*. *J. Biol. Chem.* **235**: 2478-2484.
- Horio, T., Horiruti, Y., Yamamoto, N. and Nishikawa, N. (1972): Light-influenced ATP ase activity: bacteria. *Methods Enzymol.* **24**: 96-103.
- Horiuti, Y., Nishigawa, K. and Horio, T. (1968): Oxidation-reduction potential-dependent adenosine triphosphatase activity of chromatophores from *R. rubrum*. *J. Biochem.* **64**: 577-587.
- Kamen, M.D. (1963): Photosynthetic phosphorylation (Bacteria). *Methods. Enzymol.* **6**, 313-318.
- Kielly, W.W. (1955): Mitochondrial ATPase. *Methods Enzymol.* **2**, 593-595.
- Kielly, W.W. and Kielly, R.K. (1953): A specific adenosine triphosphatase of liver mitochondria. *J. Biol. Chem.* **200**, 213-219.
- Lehninger, A.L. (1982): "Principles of Biochemistry" Worth Publisher, Inc. pp. 488.
- Leonard, R.T. and Woude, W.J. (1976): Isolation of plasma membrane from corn roots by sucrose density gradient centrifugation. *Plant Physiol.* **57**, 105-114.
- Min, T.J., Cho, S.W. and Park, S.S. (1987a): Studies on the development of photoreceptor in the nonchromatophore organisms (I) *Kor. J. Mycol* **15**, 2127-223.
- Min, T.J., Cho, S.W., Kim, Y.S., Kim, J.W. and Mheen, T.I. (1987b): Studies on the development of photoreceptor in the nonchromatophore organisms (II). *Kor. J. Mycol.* **15**, 224.-230
- Racker, E. (1976): The possible organization of the polypeptides of F₁ F₀-ATPase. *Trends. Biochem. Sci.* **1**, 224-255.
- Rorive, G. and Kleinzeller, A. (1972): The effects of ATP and Ca²⁺ on the cell volume in isolated kidney tubules. *Biochim Biophys. Acta.* **274**, 226-239.
- Sedmak, J.J. and Grosberg, S.E. (1977): A rapid sensitive and versatile assay for protein using coomassie brilliant blue G-250. *Anal. Biochem.* **79**, 544-552.

Accepted for Publication 13 June 1989