

## 배양액의 ATP 첨가 및 이온 농도에 따른 *Amoeba proteus* 수축포의 배출작용

최범선 · \*주윤수 · 안태인

서울대학교 사범대학 생물교육과, \*수도여자고등학교

담수산 대형 아메바인 *Amoeba proteus*의 위상차 현미경 관찰 및 사진 분석을 통하여 수축포의 배출활동을 조사하였다. Chalkley's 무기염류 배양액에 첨가한 0.1 mM ATP(disodium salt)에 의해 수축포의 배출속도는 270%로 증가하였으며, 이 ATP의 효과는 Na<sup>+</sup> 이온농도가 0.46 mM 이상일 때 유효하였다. 실험용액의 NaCl 농도를 10 mM까지 증가시켰을 때 배출작용은 230%에 이르기까지 완만한 직선적 증가를 보였으며, 0.1 mM ATP를 첨가했을 때는 소폭의 NaCl농도 증가(0.50 mM)에 대하여 급격한 상승을 보였다. 이 배출 촉진은 Na<sup>+</sup> 이온에 대해서 선별적으로 이루어졌으며 K<sup>+</sup> 이온으로는 대체될 수 없었다. 배출속도는 CaCl<sub>2</sub>를 제외한 Chalkley's 액에 50 μM EDTA(disodium)를 첨가하였을 때에는 290%로 증가하였으며, CaCl<sub>2</sub> 농도가 증가됨에 따라 현격한 감소를 보였다. Chalkley's 용액의 CaCl<sub>2</sub>, NaCl을 함께 제외한 경우 배출속도는 대조군 수준에 미달된 데 비하여 0.2 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM NaCl 첨가시에는 대조군의 180%였다. 아메바 수축포의 배출작용이 Na<sup>+</sup> 이온 배출기구로 보고(Pothier *et al.*, 1987) 이들 결과를 종합해볼때 아메바의 세포막에는 Na<sup>+</sup> 이온의 투과수단으로 칼슘제거에 의해서 촉진확산되는 것과 Na<sup>+</sup> 이온 농도증가에 따른 단순확산이 있을 것으로 사료된다.

**KEY WORDS:** Contractile vacuole, ATP, Ion transport, *Amoeba proteus*

수축포는 원생동물 기관으로 내게는 담수산 섬모, 키크모 및 근족동물에서 관찰되지만, 동일 생물군의 해산, 기생성 종에서도 나타나며 많은 단세포조류 및 균류의 생활사 단계중에서도 나타난다(Paterson, 1980). 담수산 대형 아메바(*Amoeba proteus*)는 한개의 투명한 구형의 수축포를 가지고 있으며 광학 현미경하에서 명확한 특징이 가능하다(Ahmad and Couillard, 1974). 이 아메바의 수축포 활동 주기는 uroid의 직전 수축 부위에서 일군의 소낭들이 융합하여 하나의 작은 수축포를 형성하는 때서 비롯되며 이시기를 합착기(coalescencephase)라고 한다. 이 작은 수축포는 대세포질의 흐름을 따라서 핵쪽으로 이동하면서 지속적으로 20-200 nm 크기의 소낭들이(Pothier *et al.*, 1984) 융합하면서 부피가 증대되는 지속적 성장기(continuous growth phase)가 있으며, 일단 핵에 이르면 다시 uroid 방향으로 이동하면서 수축포는 최대 크기가 된 후, 세포막에 일시적인 구멍을 형성하면서 수축에 의해 내용물을 세포 밖

으로 배출한다(Akbarieh and Couillard, 1988).

아메바의 수축포 액은 micropuncture 기법에 의해서 빙점 강하를 직접적으로 측정해본 결과 삼투농도가 32 mOsm/kg으로 세포질(100 mOsm/kg)에 비해서 저장성인 것으로 밝혀졌으며(Schmidt-Nielsen and Schrauger, 1963), 이를 근거로 아메바 수축포의 주요 기능은 삼투압 조절에 있는 것으로 알려져왔다. 그러나 아메바는 수축포의 Na<sup>+</sup> 이온의 농도가 20 mM로 세포질에 비해 30배나 높은 반면 K<sup>+</sup>의 농도는 낮다는 사실(Riddick, 1968)로부터, 수축포는 Na<sup>+</sup> 이온 배출 기관이라는 의견이 제시되었다(Bruce and Marshall, 1965).

세포 외부의 ATP와 수축포 배출작용과의 상호관계에 대한 연구는 수축포의 수축력 근원에 대한 연구에서 비롯되었다. 아메바에서 분리한 수축포는 *in vitro*에서 ATP를 첨가하였을 때 수축작용이 이루어졌으며 이때 마그네슘이 필수적인 것으로 보아 수축포는 자신이 수축력을 발휘하는 것으로

제안 되었다(Prusch and Dunham, 1970). Pothier 등(1984)은 수축포의 생장 및 배출에 따르는 일련의 autonomy에 대한 연구에서 아메바 배양액에 ATP를 첨가해 보았다. 첨가한 ATP가 5 mM일 때 아메바는 내세포질의 유동이 정지되면서도 배출작용은 촉진되는 양상을 보였으며, 낮은 농도(0.125 mM)일 때는 정상적인 내세포질의 유동이 이루어지면서 수축포의 배출작용이 촉진되었다. 따라서 세포의 외부에 주어진 이 ATP의 작용 강도에 대한 이해가 필요하게 되었다.

이들은 0.1 mM ATP 및 삼인산 유사물질이 아메바의 수축포 배출작용을 촉진시키며, 그 효과가 나트륨을 제외한 경우 또는 함께 첨가한 0.1 mM  $Ca^{2+}$ 이나 0.02 mM  $La^{3+}$ 에 의해서 무효화되는 것으로 미루어 ATP는 세포막의 칼슘을 유리시킴으로 세포막의 양이온, 그중에도  $Na^+$ 에 대한 투과도를 상승시키며 이에 따라 수축포의 배출이 증가되는 것으로 보고 수축포의 주된 기능은 나트륨 배설임을 실험적으로 입증한 바 있다(Pothier *et al.*, 1987).

그러나 Pothier 등(1984, 1987)은 그들의 실험에 ATP 및 그 유도체 화학물질의 임의 형태를 밝히지 않고 있다. 이들 화학물질은 대개 임의 형태로 생산되며 Chalkley's 용액은 무기염류의 농도가 낮고(Table 1) 삼투농도도 1.4 mOsm/Kg 정도이기 때문에 첨가한 화학 물질의 임의 형태가 어떤 것이기에 따라서 mM 단위로 첨가된 화학 물질은 0.1-10 mM 또는 그 이상의 임분 농도 차이를 낳을 수 있다.

본 연구에서 이를 감안한 ATP의 첨가 및 아메바의 무기염류 배양액의 NaCl, KCl,  $CaCl_2$ 의 농도 조절 및 EDTA의 첨가에 따른 *Amoeba proteus*의 수축포활동 양상을 분석해 봄으로써 첨가된 ATP의 구체적인 효과를 알아보고 아메바 수축포의 배출작용 기작을 유추해보고자 한다.

### 재료 및 방법

*Amoeba proteus*는 Table 1에 보인 바와 같은 수정된 Chalkley's 무기염류 배양액에 *Colpidium sp*을 먹이로 하여 아메바를 저장배양하고 *Tetrah-*

**Table 1.** Chemical and ionic compositions of Chalkley's solution.

Chemicals	Conc.(mM)	Ions	Conc.(mM)
NaCl	0.50	$Na^+$	0.56
KCl	0.05	$K^+$	0.05
$NaHCO_3$	0.05	$Ca^{2+}$	0.05
$Na_2HPO_4$	0.007	Cl	0.65
$CaCl_2$	0.05	$HCO_3^-$	0.05
		$HPO_4^-$	0.007

Calculated osmolarity 1.4 mOsmol/kg.

*mena*를 먹이로 대량배양하였다(Ahn and Kwak, 1986). 아메바는 먹이를 준 후 3일간 굶기서 식료로 인한 수축포의 관찰에 혼동이 없게 하였다.

아메바는 해부현미경 시야에서 긴강한 개체를 mouth pipette를 사용하여 central cavity microscopic slide에 올려 놓은 후 23°C로 조절된 암실에 옮겨 30분 동안 방치한 후 cover glass를 덮고 위장사 현미경(400×)을 사용하여 수축포의 배출활동을 관찰하였다. 이 때 광원에 의한 영향을 최소화하기 위해 암실을 통해 가동한 한 낮은 광도에서 관찰하였으며 매 수축주기마다 걸린 시간을 초단위로 측정하여 기록하였다.

각 아메바는 실험용액 처리에 앞서 Chalkley's 배양 용액에서 5주기를 관찰 및 사진촬영하여 이를 상대적 배출량을 계산하는 대조군으로 하고 이어서 스포이드로 새로운 실험 용액을 cover glass의 한쪽 끝에 올려놓고 cover glass의 반대쪽 측면에 여과지를 올려놓아 배양액을 교체한 다음 관찰을 계속하였다.

수축포의 직경을 측정하기 위하여 현미경은 배율 400×에서 micrometer를 사용하여 calibration 시켰으며 수축 직전에 사진을 촬영하고 이를 4배로 확대 인화한 후 수축포의 직경을 정밀 측정하여 1회 배출량을 계산하는 자료로 사용하였다. 배출속도는 매 수축시의 배출량을 수축 주기에 소요된 시간으로 나누어 계산하였고 최초의 정상 배양액에서의 배출 속도를 기준으로 증감의 비율을 계산하였다.

실험 용액에 첨가된 ATP disodium salt, ATP monocalcium salt 및 EDTA disodium salt는 Sigma(St. Louis, Mo)로 부터 구입하였으며

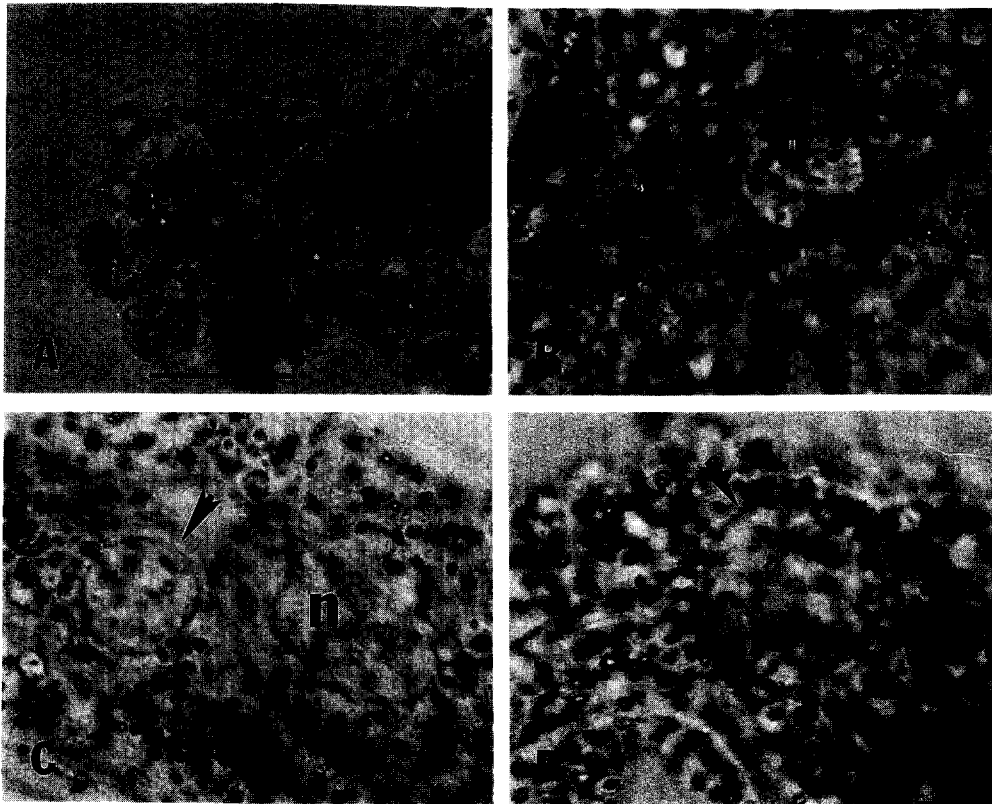
모든 실험 용액의 제조에는 3차 증류수를 사용하였다.

### 결과 및 고찰

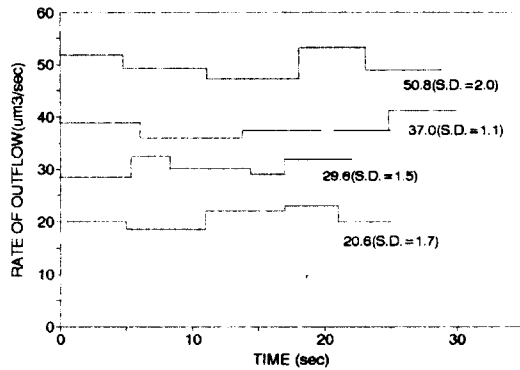
아메바 수축포의 일련의 배출 과정은 Fig. 1에 나타낸 바와 같았으며 대조군인 Chalkley's 배양액(Table 1)에서 수축포의 배출 속도를 81개체에 측정해본 결과  $29.1 \pm 10.7 \mu\text{m}^3/\text{sec}$  ( $\bar{X} \pm \text{S.D.}$ )로 개체에 따라 차이가 심하나 동일 개체에서는 표준편차가 평균치의 3-8% 정도로 계속되는 수축 주기동안 큰 차이가 없었다(Fig. 2).

Chalkley's 용액에 0.1 mM ATP(disodium salt)나 비투과성인 sucrose를 첨가하여 등장액

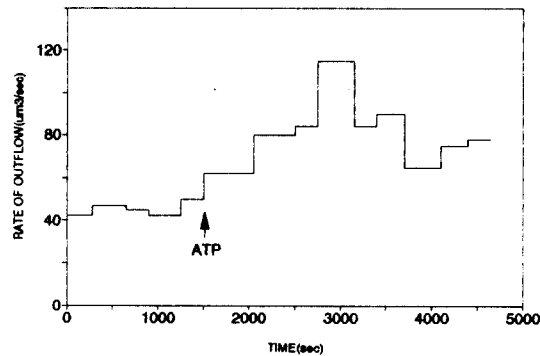
(100 mOsmol/kg)에서 수축포의 배출 속도를 분석해본 결과 0.1 mM ATP가 첨가된 배양액(0.76 mM  $\text{Na}^+$ )에서 수축포의 배출 속도는 4주기 내에 대조군의 270%까지 증가되었으며 이후 150% 수준으로 안정되었다(Fig. 3). 비 투과성인 sucrose 등장액(0.56 mM  $\text{Na}^+$ )에서는 수축포의 배출 속도는 4주기 내에 대조군의 15% 수준으로 감소하였으며, 실험용액을 0.1 mM ATP(disodium salt)가 함유된 등장액(0.76 mM  $\text{Na}^+$ )으로 대체하였을 때 수축포의 배출속도는 6주기 내에 대조군의 170% 수준까지 증가하여 이후 3-4주기 동안 비슷한 수준을 유지하다가 30-40% 수준으로 급격히 감소하였다(Fig. 4). 이들 결과는 Pothier 등(1987)의 것과 비교하여 sucrose 등장액에 첨가한 ATP의 효과는 1.7배로 그들의 3배증가에 비



**Fig. 1.** Phase contrast micrographs of an amoeba undergoing a systolic cycle of the contractile vacuole. The cycle starts at uroid where the previous systole ended (A), then the contractile vacuole (arrow head) moves toward the nucleus (N) along endoplasmic streaming. On contacting with nucleus (B), it starts to move backward to uroid (C). Along the cycle the vacuole grows gradually and maximized in size (D) at the uroid, and breaks open within seconds. The bar in (A) represents 25  $\mu\text{m}$  for all pictures.



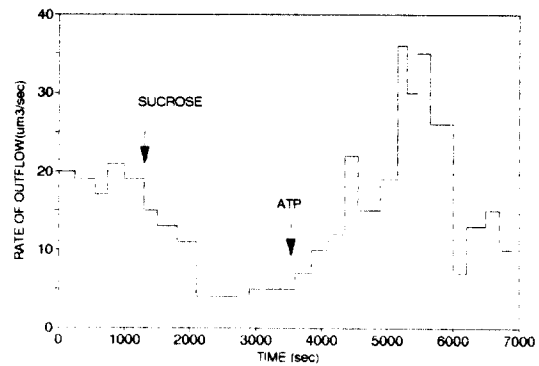
**Fig. 2.** Comparisons of the rate of output (average  $\pm$  S.D.) of contractile vacuole among 5 different amoebae. Individual amoeba showed much variation in the rate of output. The average output measured in 81 amoebae was  $29.1 \pm 10.7 \mu\text{m}^3/\text{sec}$ . But the rate of output in an amoeba was almost constant as shown in this figure.



**Fig. 3.** Effect of 0.1 mM ATP on the activity of contractile vacuole in an amoeba. After recording 5-cystolic cycles in Chalkley's medium (control), the solution was replaced with the Chalkley's containing 0.1 mM ATP (disodium salt) at arrow. The rate of output increased to 270% of the control in 4 cycles.

하여 약하였지만 전체적인 양상에는 차이가 없었으며 아메바 수축포의 배출작용은 Chalkley's 액 또는 sucrose 등장액에 첨가된 ATP에 의해서 촉진됨이 재확인되었다.

삼투 구배가 역전된 sucrose 등장액에서도 ATP 첨가의 효과가 나타나는 것으로 보아 세포막에서 물의 투과 상승은 어려운 것으로 보이며, 이때 수축포를 통해서 배출되어야 할 내용물은 물이 아닐 것으로 보인다. 따라서 첨가된 ATP에 의한 배출 상승 원인을 알아보기 위해서 Chalkley's 액의 1가 양이온 농도를 조절하였다. Chalk-



**Fig. 4.** Effect of ATP in the Chalkley's containing isotonic sucrose on the output of contractile vacuole. In isotonic sucrose, the rate of output was decreased to 15% of control. But the output was increased to 170% of control by adding 0.1 mM ATP (disodium salt).

ley's 액의 NaCl 농도를 조절하여 그 효과를 분석해본 결과는 Fig. 5에 보인 바와 같았다. NaCl-free 상태 ( $0.064 \text{ mM Na}^+$ )에서 배출 속도는 대조군의 70% 수준으로 감소하였고, NaCl 농도가 증가됨에 따라 배출 속도는 완만한 직선적인 증가를 보였으며, 10 mM NaCl에서는 대조군의 230%까지 증가되었다. Chalkley's 용액의 주된 염은 NaCl이기 때문에 NaCl 첨가는 동시에 삼투 농도 증가에 기여한다. 10 mM NaCl이 첨가되었을 때 실험용액의 NaCl 농도는 Chalkley's 액(대조군)의 20배, 삼투 농도는 약 15배나 되는데 역으로 배출작용이 230%로 증가하였음은 수축포의 역할이 단순한 수분 조절기구가 아님을 명확히 보여주고 있다.

또한 NaCl 농도 조절과 더불어 0.1mM ATP (disodium salt)를 첨가하여 ATP의 효과를 분석해본 결과(Fig. 5) 배출작용은 NaCl 1 mM 미만의 좁은 농도범위에서 신속한 상승을 보였다. NaCl-free Chalkley's 액 ( $0.264 \text{ mM Na}^+$ )에서는 배출속도가 대조군의 90% 수준이었지만 NaCl 농도를 0.20, 0.56 mM로 상승시켰을 때는 각각 대조군의 190, 270%로 급상승하였다. 이로보아 ATP에 의한 배출속도의 상승은  $\text{Na}^+$  이온이 한계농도(0.46 mM) 이상일 때에만 이루어지는 것으로 보이며 아메바 세포막에는 낮은 농도의 NaCl에서 ATP 첨가로 촉진되는 투과 수단과 높은 농도에서 완만하게 이루어지는 수동적인 단순

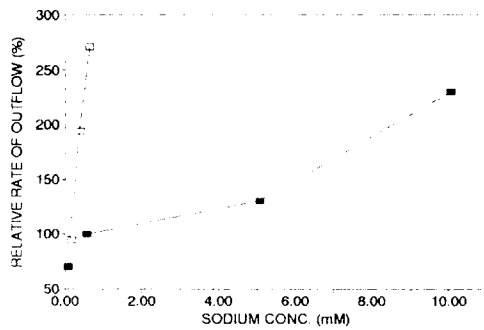


Fig. 5. Effect of sodium concentration on the rate of output of contractile vacuole in the presence (open rectangle) and absence (closed rectangle) of 0.1 mM ATP (disodium salt) in the Chalkley's. Total sodium concentration was plotted in the X-axis.

확산이 있을 가능성이 있다.

아메바 배양액의 1가 양이온으로는  $\text{Na}^+$ 와  $\text{K}^+$  이온이 있으므로 이들간의 전분력을 알아보기 위하여 NaCl을 KCl로 대체 또는 KCl의 농도를 조절된 결과(Table 2), KCl-free Chalkley's 액에서 배출속도는 대조군의 120%로 증가하는데 비하여 KCl의 농도가 1 mM일때까지는 대조군과 동일 하였으며, 5 mM KCl 첨가로 삼투농도가 대조군의 약 8배일 때 배출 속도는 10% 정도 감소되었다. 따라서 배양액의 KCl 농도 증가는 삼투 농

도에 기여하므로 수축포의 배출을 지연시키는 것으로 나타났다. 이로부터 수축포의 배출 속도는  $\text{Na}^+$  이온에 대해서만 민감적인 반응을 나타낸다. Chalkley's 액은 1.4 mOsm/kg으로 한계치에 이를 만큼 저장액이기 때문에 첨가한 염분에서의 삼투농도는 배가되더라도 이에 대한 수축포의 반응은 크지 않다. 이를테면 sucrose 등장액처럼 삼투농도가 Chalkley's 액의 71.4배나 될만큼 현저한 경우에는 대조군의 15% 수준까지 감소하지만 5 mM KCl 첨가로 삼투농도가 8배정도 증가한데 대해서는 민감하게 반응하지 않는 것으로 보인다.

다음은 Chalkley's 액의 유일한 2가 양이온인  $\text{Ca}^{2+}$ 의 효과를 알아보기 위하여  $\text{CaCl}_2$  농도를 조절하였다.  $\text{CaCl}_2$ 를 제외한 Chalkley's 용액에 0.05 mM EDTA(disodium)를 첨가하였을 때 수축포의 배출 속도는 290% 수준으로 상승하였으며 이는 Chalkley's 액에 0.1 mM ATP를 첨가한 효과와 비교된다. 실험 용액의  $\text{CaCl}_2$  농도를 0.1, 0.2 mM로 배가시켰을 때 배출 속도는 각각 대조군의 70, 50% 수준으로 감소하였다. 또한  $\text{CaCl}_2$  농도 조절과 더불어 0.1 mM ATP(monocalcium salt)를 첨가하였을 때 첨가한 ATP에 의한 배출 속도의 촉진 효과는  $\text{CaCl}_2$  농도가 증가할수록 감

Table 2. Effect of various additives to Chalkley's solution on the output of contractile vacuole in *Amoeba proteus*.

Added Components	Relative Output	Added Components	Relative Output
Control (Chalkley's)	100 (81)	$\text{CaCl}_2$ -free (50 $\mu\text{M}$ EDTA)	290 (5)
+ *ATP 0.1 mM	270 (5)	$\text{CaCl}_2$ 0.1 mM	70 (2)
Sucrose 100 mOsm/kg	15 (5)	0.2 mM	50 (2)
+ *ATP 0.1 mM	170 (5)	**ATP 0.1 mM (calcium salt)	
NaCl-free	70 (4)	+ $\text{CaCl}_2$ free	260 (3)
NaCl-5 mM	130 (8)	+ $\text{CaCl}_2$ 0.05 mM	230 (3)
10 mM	230 (3)	+ 0.01 mM	180 (3)
*ATP 0.1 mM + NaCl-free	90 (4)	+ 0.15 mM	120 (3)
+ NaCl 0.20 mM	190 (3)	+ 0.20 mM	80 (4)
KCl-free	120 (3)	$\text{CaCl}_2$ & NaCl free	85 (5)
1 mM	100 (2)	$\text{CaCl}_2$ 0.2 mM, NaCl 10 mM	180 (5)
5 mM	90 (3)		

(n): number of samples observed.

\*and \*\*denotes ATP in disodium and calcium salt form, respectively.

소되는 것으로 나타났다 (Table 2, Fig. 6).

이상의 결과에서 분배 첨가된 ATP는 세포표면의 bound calcium을 제거함으로써 Na<sup>+</sup>의 투과를 상승시키며 따라서 수축부의 배출량이 증대된다는 견해 (Brandt and Freeman, 1967; Brandt and Hendil, 1970; Josefsson, 1975; Josefsson et al., 1975)에 부합된다. 이를 더 구체적으로 확인해 보기 위하여 Chalkley's 용액의 CaCl<sub>2</sub> 및 NaCl을 함께 제거시키고 배출 속도를 측정해본 결과 대조군의 85% 수준이었다. CaCl<sub>2</sub>를 제거하여 배출 속도가 촉진되제한 상태에서도 Na<sup>+</sup> 이온의 농도가 낮으면 배출 촉진이 이루어지지 않음을 재확인시켜주었다.

그러나 이와는 반대로 CaCl<sub>2</sub>를 대조군의 4배인 0.2 mM로하여 칼슘 결합부위가 포화된 상태에서 10 mM NaCl에 의한 수축부 배출속도의 촉진 가능성을 실험한 결과 대조군의 180% 수준으로 상승되었다 (Table 2). 이는 calcium의 농도가 0.05 mM인 Chalkley's 액에 첨가된 10 mM의 NaCl이 배출속도를 230%로 상승시킨 것과 비교하여 50% 정도의 차이가 있다. 칼슘 결합 부위의 포화로 인하여 배출 촉진이 불가능할 것으로 기대되었으나 80%의 촉진효과가 있었다. *A. proteus* 세포질의 Na<sup>+</sup> 이온 농도를 다른 담수산 대형 아메바인 *C. carolinensis*와 같이 1 mM 이하로 본다면 세포막 인접에 10배의 농도 구배가 있는 셈이다. 따

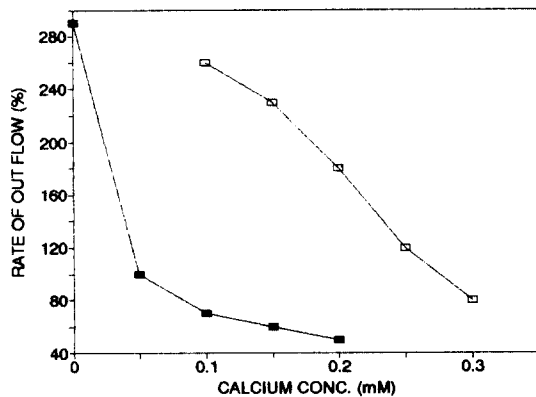


Fig. 6. Effect of calcium concentration on the rate of output of contractile vacuole in the presence (open rectangle) and absence (closed rectangle) of 0.1 mM ATP (monocalcium salt) in the Chalkley's. Total calcium concentration was plotted in X-axis.

라서 아메바의 세포막은 칼슘으로 포화되어도 농도구배를 Ca<sup>2+</sup>이 완전히 억제하지 못하거나, Na<sup>+</sup>은 칼슘에 의한 조절기구와는 다른 어떤 투과 수단으로 유입될 수 있음을 의미한다. 즉 아메바의 세포막에는 ATP 또는 EDTA에 의해서 칼슘이 제거되었을 때 촉진확산 되는 수송 수단과 칼슘으로 포화된 다음에도 농도 구배에 따라서 이루어지는 단순 확산작용이 있는 것으로 보인다.

Pothier 등(1987)은 0.1 mM ATP 첨가효과는 0.1 mM Ca<sup>2+</sup>에 의해서 무효화된다고 하였으나 본 연구에서는 총 calcium salt의 양이 0.25 mM 일 때 까지도 대조군 이상의 배출이 지속되었으며 0.3 mM일 때 대조군에 비하여 20% 정도 감소하였다. 이로보면 첨가된 0.1 mM ATP monocalcium salt는 최소한 0.15 mM 상당의 칼슘을 킬레이트하는 효과가 있다.

아메바 세포표면의 칼슘 결합부위는 Prusch와 Hannafin(1979)에 의해 추정된 바 있으며 전자 현미경적 연구로 확인 되었으나 (Stockem and Klein, 1979) 그 실체가 어떤 것인지는 밝혀지지 않았다. 아메바의 배양액에 첨가한 ATP는 칼슘을 킬레이트하는 것 외에 아메바 세포막에 또 다른 결합 부위가 있는 것으로 보고 되고 있으나 (Nachmias, 1969) 그 기능은 아직까지 규명되지 못하고 있다.

담수산 대형 아메바를 비롯한 원생동물의 세포막에 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> 펌프의 존재여부는 Bruce와 Marshall(1965)에 의해서도 의문시된 바 있으며, 순수분리한 아메바의 세포막에서도 그 활성이 전혀 없었다 (Ahn and Jeon, 1982). 뿐만 아니라 아메바는 배양액에 첨가한 ouabain의 영향을 전혀 받지 않는 것으로 보아 Na-펌프는 결여되어 있는 것으로 알려져 있다. 따라서 첨가한 ATP가 능동 수송기작으로 이온 펌프를 가속시키는 것은 아닐 것으로 보인다.

Bingley와 Thompson(1962)에 의하면 아메바는 정상적인 세포운동시에 위축형성이 이루어지는 전방부위의 막전위는 -36 mV, 후방부위는 -70 mV로 분극되어 있어 아메바는 흥분성 세포와 유사하지만 질부적인 반응을 보이지 않는다. Pothier 등(1987)은 Chalkley's 액에 아메바가 cytolysis를 일으킬 정도로 고농도인 5 mM ATP

를 첨가하였을 때  $-64.3$  mV에서  $-33.1$  mV로 막전위 변화가 이루어 진다고 하였으나 내향성 전류의 원인 물질이  $\text{Na}^+$  이온인 것이라 확증은 없다. 그러나 ATP첨가로 수축포 배출 속도가 증가 되는 원인 물질이  $\text{NaCl}$ 인 것으로 볼 때 그 가능성은 충분히 있다.

포유류 배양세포(TA3; mouse transformed cell, 3T3, 3T6)에서 세포외부의 ATP는 많은 생리적 기능이 있으며 막의 탈분극, 막의 투과도 상승등을 야기시킨다(Hempling, 1969; Rozengurt, 1979; Friedberg *et al.*, 1985; Sung *et al.*, 1985; Steinberg and Silverstein, 1987). 또한 murine CTLL-R8 cell이나 rat의 흉선세포는 PBS에  $1$  mM ATP를 첨가 했을 때 세포질 내의 칼슘 농도가  $100$  nM에서  $500$  nM로 상승되면서 세포질의 응축, cell blebbing과 더불어 핵 및 DNA가 토막나며 궁극적으로 세포 사멸에 이르게 된다(Zheng *et al.*, 1991). 아메바는 자연상태에서 ATP와 접할 기회가 있을 것으로 상상되기는 어렵기 때문에 이와 유사한 기작이 있으리라고 상상되지는 않는다. 그러나 아메바도 배양액에 고농도( $5$  mM)의 ATP가 투여되었을 때에는 세포질 유동이 중단되며 수축포의 배출작용은 가속되지만 장시간 후에는 세포질이 가운데로 몰려 응축되면서 cytolysis된다. 따라서 포유류 세포에서 외부의 ATP에 대한 반응으로 세포질의 응축 및 cell blebbing이 심한 것은 생리식염수의  $\text{Na}^+$  이온 함량이 높을 때다가 아메바의 수축포 기능에 상응하는 기관이 없기 때문에 나타나는 현상일 가능성도 있는 것으로 보인다.

### 인용문헌

- Ahmad, M., and P. Couillard, 1974. The contractile vacuole of *Amoeba proteus*. Temperature effects. *J. Protozool.* **21**: 330-336.
- Ahn, T. I., and K. W. Jeon, 1982. Structural and biochemical characteristics of the plasmalemma and vacuole membrane in amoeba. *Exp. Cell Res.* **137**: 153-268.
- Ahn, T. I., and I. H. Kwak, 1986. Cytochemical and biochemical characteristics of cellular adhesion in *Amoeba proteus*. *Korean J. Zool.* **29** (3): 171-180.
- Akbarieh, M., and P. Couillard, 1988. ultrastructure of the contractile vacuole and its periphery in *Amoeba proteus*: Evolution of vesicles during the cycle. *J. Protozool.* **35** (1): 99-108.
- Brandt, P. W., and A. R. Freeman, 1967. Plasma membrane: Substructural changes correlated with electrical resistance and pinocytosis. *Science* **155**: 582-585.
- Brandt, P. W., and K. B. Hendil, 1970. Properties of the plasma membrane of *Amoeba*. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology* (Blank, M. ed). plenum Press. New York. Vol. 7, pp. 323-335.
- Bringley, M. S., and C. M. Thompson, 1962. Bioelectric potentials in relation to movement in *Amoeba*. *J. Theor. Biol.* **2**: 16-32.
- Bruce, D. L., and J. M. Marshall, 1965. Some ionic and bioelectric properties of the amoeba *Chaos chaos*. *J. Gen. Physiol.* **49**: 151-178.
- Friedberg, I., G. A. Weisman, and B. K. De, 1985. Permeability change in thtransformed mouse fibroblast caused by ionophores and its relationship to membrane permeabilization by exogenous ATP. *J. Memb. Biol.* **83**: 251-259.
- Hempling, H. G., C. C. Steward, and G. Gasic, 1969. Effect of exogenous ATP on the electrolyte content of TA3 cells. *J. Cell Physiol.* **73**: 133-140.
- Josefsson, J. O., 1975. Studies on the mechanism of induction of pinocytosis in *Amoeba proteus*. *Acta Physiol. Scand.* **432**: 5-65.
- Josefsson, J. O., N. G. Holmer, and S. E. hausson, 1975. Membrane potential and conductance during pinocytosis induced in *Amoeba proteus* with alkali metal ion. *Acta Physiol. Scand.* **94**: 278-288.
- Nachmias, V. T., 1969. Studies on streaming. I. Inhibition of protoplasmic streaming and cytokinesis of *Chaos chaos* by adenosine triphosphate and reversal by magnesium and calcium ions. *J. Cell Biol.* **40**: 160-166.
- Patterson, D. J., 1980. Contractile vacuoles and associated structures: their organization and function. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* **55**: 1-46.
- Pothier, F., P. Couillard, and J. Forget, 1984. ATP and the autonomy of the contractile vacuole in *Amoeba proteus*. *J. Exp. Zool.* **230**: 211-218.
- Pothier, F., J. Forget, R. Sullivan, and P. Couillard, 1987. ATP and the contractile vacuole in *Amoeba proteus*: Mechanism of action of exogenous ATP and related nucleotides. *J. Exp. Zool.* **243**: 379-387.
- Prusch, R. D., and P. D. Dunham, 1970. Contraction of isolated contractile vacuole from *Amoeba proteus*. *J. Cell Biol.* **46**: 431-434.
- Prusch, R. D., and J. A. Hannafin, 1979. Calcium distribution in *Amoeba proteus*. *J. Gen. Physiol.* **74**: 511-521.
- Riddick, D. H., 1968. Contractile vacuole in the amoeba

- Pelomyxa carolinensis*. *Am. J. Physiol.* **215**: 736-740.
- Rozengurt, E., and L. A. Heppel, 1979. Reciprocal control of membrane permeability of transformed cultures of mouse liver cells by external and internal ATP. *J. Biol. Chem.* **254**: 708-714.
- Schmidt-Nielsen, B., and C. R. Schrauger, 1963. *Amoeba proteus*: Studying the contractile vacuole by micropuncture. *Science* **139**: 606-607.
- Steinberg, T. H., and S. C. Silverstein, 1987. Extracellular ATP<sup>4</sup> promotes cation fluxes in the J774 mouse macrophage cell line. *J. Biol. Chem.* **261**: 3118-3122.
- Stockem, W., and H. P. Klein, 1979. Pinocytosis and locomotion in *Amoeba*. XV. Demonstration of Ca<sup>2+</sup> binding sites during induced pinocytosis in *Amoeba proteus*. *Protoplasma* **100**: 33-43.
- Sung, S.-S. J., J. D.-E. Young, A. M. Origlio, J. M. Heiple, H. R. Kaback, and S. C. Silverstein, 1985. Extracellular ATP perturbs transmembrane ion fluxes, elevate cytosolic [Ca<sup>2+</sup>], and inhibits phagocytosis in mouse macrophages. *J. Biol. Chem.* **260**: 13442-13449.
- Zheng, L. M., A. Zychilinsky, C.-C. Liu, D. M. Ojcius, and J. D.-E. Young, 1991. Extracellular ATP as a trigger for apoptosis or programmed cell death. *J. Cell Biol.* **112**: 279-288.

(Accepted July 10, 1991)

---

#### Effect of Exogenous ATP and Ionic Concentration on the Activity of Contractile Vacuoles in *Amoeba proteus*

Bum Sun Choi, \*Yun Soo Zoo, and Tae In Ahn (Department of Biology Education, Seoul National University, Seoul 151-742; \*Soodo Girl's High School, Seoul 140-160, Korea)

The activity of the contractile vacuole of the large freshwater amoeba, *Amoeba proteus*, was studied by phase contrast microscopy and analysis of the photomicrographs. By adding 0.1 mM ATP (disodium) to the inorganic Chalkley's medium, the rate of vacuole output increased to 270%. The ATP was effective only in the presence of Na<sup>+</sup> above 0.46 mM. When [NaCl] was increased to 10 mM, the output showed a linear increase to 230%, but in the presence of 0.1 mM ATP the output increased rapidly at narrow increase (0.50 mM) of [NaCl]. Here, Na<sup>+</sup> was not replaceable with K<sup>+</sup>. By 50  $\mu$ M EDTA (disodium) added to the calcium-free Chalkley's, the output increased to 290%, and decreased rapidly by increasing [CaCl<sub>2</sub>]. In the CaCl<sub>2</sub>- and NaCl-free Chalkley's the output was less than in control solution. But the output increased to 180% in the presence of 0.2 mM CaCl<sub>2</sub> and 10 mM CaCl. Considering Na<sup>+</sup>-excretion as a major role of the contractile vacuole (Pothier *et al.*, 1987), membranes of amoeba must have a kind of carrier for facilitated diffusion which is inducible by the removal of bound calcium and a mechanism for simple diffusion responsible for Na<sup>+</sup> at elevated concentration.