

인삼 사포닌이 개 심실 형질막의 K^+ -의존성 포스파타제 활성에 미치는 영향

이신웅# · 이정수

영남대학교 약학대학

(Received February 20, 1992)

Effect of Ginseng Saponins on K^+ -Dependent Phosphatase Activity of Dog Cardiac Sarcolemma

Shin-Woong Lee[#] and Jeung-Soo Lee

College of Pharmacy, Yeungnam University, Gyongsan 712-749, Korea

Abstract—The effects of ginseng saponins, gypsophila saponin, sodium dodecyl sulfate(SDS), and Triton X-100 on membrane K^+ -dependent phosphatase activity which is lipid dependent and represents dephosphorylation step of the complete Na^+ , K^+ -ATPase reaction were investigated in this study to elucidate whether the effects of ginseng saponins are due to the detergent action, using sarcolemma enriched preparation isolated from dog ventricle. Na^+ , K^+ -ATPase and K^+ -dependent phosphatase activities of cardiac sarcolemma were about 143 $\mu\text{mol Pi/mg protein/hr}$ and 34 $\mu\text{mol p-nitrophenol/mg protein/hr}$, respectively. While ginseng saponins (triol>total>diol) inhibited K^+ -dependent phosphatase activity, gypsophila saponin, and low dose of SDS(0.4 $\mu\text{g}/\mu\text{g protein}$), and Triton X-100 (0.6 $\mu\text{g}/\mu\text{g protein}$) increased the enzyme activity, indicating disruptive effect of detergents on membrane barriers. The activating effect of low doses of Triton X-100 on membrane K^+ -dependent phosphatase appeared at concentration decreasing light scattering. However, the inhibitory effect of ginseng saponin appeared before a decrease in light scattering. These results suggest that low concentrations of ginseng saponins inhibit the membrane K^+ -dependent phosphatase by interacting directly with enzyme before membrane disruption.

Keywords □ K^+ -Dependent phosphatase, ginseng saponin, detergent, cardiac sarcolemma.

K^+ -의존성 phosphatase는 Na^+ , K^+ -ATPase의 인산화 중간생성물인 E-P를 효소와 inorganic phosphate로 전환시킴으로서 Na^+ , K^+ -ATPase에 의한 ATP 분해과정을 완결시키는 효소로서 Na^+ , K^+ -ATPase계의 일부이며 Na^+ , K^+ -ATPase 활성과 마찬가지로 그 활성이 phospholipid 의존성인 것으로 알려져 있다.¹⁻⁷⁾ Tanaka⁸⁾와 Wheeler 등⁹⁾은 microsome 분리시 고농도의 detergent를 사용하거나 분리한 microsome을 detergent로 처리했을 때는 Na^+ , K^+ -ATPase 활성과 K^+ -의존성 phosphatase 활성이 다같이

소실되었다는 점에서 K^+ -의존성 phosphatase 활성이 phospholipid와 연관이 있을 것으로 추정하였으며 이외 다른 많은 보고¹⁰⁻¹⁵⁾에서도 phospholipid가 Na^+ , K^+ -ATPase 활성과 K^+ -의존성 phosphatase 활성을 유지조절하는데 매우 중요한 역할을 하는 것으로 시사하였다.

Kim 등¹⁶⁾은 인삼 saponin이 Na^+ , K^+ -ATPase를 억제한다고 보고하였으며, Lee 등^{17,18)}은 인삼 saponin의 Na^+ , K^+ -ATPase 억제작용을 일반적으로 식물 saponin이 가지는 계면활성작용¹⁹⁾에 의한 Na^+ , K^+ -ATPase의 delipidation의 결과가 아닌 Na^+ , K^+ -ATPase와의 직접적인 상호작용의 결과일 것으로 추정

#본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로.

하였다. 그러나 이러한 인삼 saponin의 작용이 Na^+ , K^+ -ATPase와 같이 phospholipid 의존성이며 Na^+ , K^+ -ATPase의 탈인산화에 관계하는 K^+ -의존성 phosphatase와 어떤 관련이 있는지에 관해서는 현재까지도 불명하다.

본 실험에서는 인삼 saponin의 Na^+ , K^+ -ATPase 억제작용이 K^+ -의존성 phosphatase 활성억제와 관계가 있는지 알아보기 위하여 개 심실로부터 형질막을 분리하고, 형질막의 K^+ -의존성 phosphatase 활성에 미치는 인삼 saponin 및 수중 detergent의 영향을 비교 검토하였다.

실험방법

시약—본 실험에 사용한 시약은 adenosine-5'-triphosphate disodium salt(Na_2ATP , Vanadium free, Boehringer), ethyleneglycol-bis-(β -amino ethylether) N,N,N',N'-tetraacetic acid(EGTA, Sigma), sodium dodecyl sulfate(SDS, Sigma), L-histidine(Sigma), p-nitrophenylphosphate(Boehringer), Tris (hydroxymethyl) aminomethane(Tris, Sigma), Triton X-100(Sigma), ouabain octahydrate(Sigma), 은시호 saponin(Sigma) 등이었으며, 인삼 saponin은 충남대학교 약대학 배기환 교수로부터 제공받았다.

개 심실 형질막의 분리—형질막은 Lee 등의 방법²⁰⁾에 의하여 분리하였다. 개 심장을 도살 즉시 적출하고 심방 및 기타 주위조직을 제거, 무게를 단 후 가위로 세절하였으며, 세절된 심실근을 무게의 5배가 되는 10 mM NaHCO_3 및 5 mM NaN_3 를 함유하는 용액 (pH 7.0, Med. A) 중에 가하고 polytron(PT-20)으로 0.5 max에서 5초 동안 2회 균질화한 다음 8,700×g에서 20분 동안 원심분리하였다. Pellet에 5배 용량의 Med. A를 다시 가하고 glass homogenizer 중에서 teflon pestle을 1번 통과, 원심분리(8,700×g, 20 min)한 후 pellet에 심실무게의 6배 용량의 medium B(10 mM Tris·Cl, pH 7.4)를 가하고, teflon pestle을 4번 통과시킨 후 원심분리(8,700×g, 20 min)하였다. 이 과정을 3회 반복하고 매회 상정액을 모아 35,000×g에서 20분 동안 원심분리한 후 microsome을 얻었으며 medium B에 부유시킨 microsome 7~10 ml를 20 ml의 24% sucrose(w/v)용액 표면에 섞이지 않도록 조심하면서 가하여 microsome층이 되게한 후 73,

400×g에서 30분간 원심분리하였다. Sucrose층과 medium B 사이에 생긴 우유빛의 형질막층을 채취하고 약 10배 용량의 medium B를 가한 후 73,400×g에서 30분간 다시 원심분리하였으며, 형질막 단백질농도가 1.5~2 mg/ml 되도록 pellet에 소량의 medium B를 가하여 균질화한 다음 -70°C 에 보관, 실험에 사용하였다. 분리한 분획의 단백질 농도는 Lowry 등의 방법²¹⁾에 의하여 측정하였다.

ATPase 활성측정—ATPase 활성측정은 spectrophotometric coupled-enzyme assay²²⁾에 의하여었다. 즉 100 mM NaCl, 10 mM KCl, 5 mM MgCl_2 , 5 mM Na_2ATP , 25 mM L-histidine(pH 7.4), 0.4 mM NADH (Sigma), 1 mM phosphoenolpyruvate, 14 units pyruvate kinase/20 units lactate dehydrogenase(Sigma)를 함유하는 용액중에 형질막 단백질을 가한 후 340 nm에서 NADH 산화에 기인한 흡광도의 감소를 기록하므로써 측정하였으며, 반응농도는 37°C 로 유지하였고 반응액의 최종용적은 2.5 ml로 하였다.

Mitochondrial ATPase 활성은 total ATPase 활성에서 5 mM NaN_3 존재하에서 나타나는 ATPase 활성을 빼 값으로 하였으며, ouabain sensitive ATPase (Na^+ , K^+ -ATPase)활성은 2.5×10^{-4} M ouabain으로 억제되는 ATPase 활성으로 하였다. 또 5 mM NaN_3 , 2.5×10^{-4} M ouabain 및 100 μM EGTA 존재하에서 나타나는 ATPase 활성을 residual ATPase 활성으로, residual ATPase 활성에서 200 μM CaCl_2 를 가하므로써 증가되는 ATPase 활성을 Ca^{2+} -ATPase 활성으로 하였다.

형질막의 Na^+ -의존성 인산화—형질막의 Na^+ -의존성 인산화는 30 mM histidine(pH 7.4), 2 mM MgCl_2 , 100 mM NaCl, 5 mM NaN_3 , 100 μM EGTA 및 20 μg 의 형질막 단백질을 함유하는 반응액 중에 100 μM [γ - ^{32}P] ATP를 가하여 최종용액이 0.5 ml 되게한 후 0°C 에서 15초 동안 시행하였다. [γ - ^{32}P] ATP를 가하고 정확히 15초 후에 10% trichloroacetic acid, 0.6 mM ATP, 0.6 mM H_3PO_4 를 함유하는 빙냉의 세척액 5 ml를 시험관에 가하여 반응을 종료시키고, 0.45 μm methylcellulose filter 상에서 흡입여과하였으며 filter를 빙냉의 세척액 5 ml로 3회 세척하였다. 세척한 filter를 scintillation vial에 넣고 8 ml scintillation fluid를 가한 다음 12시간 동안 방치, liquid scintillation counter로 그 radioactivity를 측정하였다. 상기

Table I—ATP_{ase} activity of sarcolemmal fraction prepared from dog ventricle

ATP _{ase}	Activity (μmol Pi/mg protein/hr)
Total	156.4 ± 12.1
Azide sensitive(Mitochondrial-)	3.5 ± 0.1
Ouabain sensitive(Na ⁺ , K ⁺ -)	142.6 ± 12.3
EGTA sensitive(Ca ²⁺ -)	2.3 ± 0.1
Residual(Mg ²⁺ -)	8.0 ± 2.9

Sarcolemma (20 μg) was treated with 0.4 mg of SDS per mg of sarcolemmal protein as described in Method. Aliquots of the SDS treated sarcolemma were added to cuvettes containing the media(for spectrophotometric determination of ATP_{ase} activity, see Methods). Values are Mean ± SEM of six different assays.

반응액 중에 5 mM unlabeled ATP를 가했을 때 나타나는 radioactivity를 non-specific radioactivity로 간주하였으며 total radioactivity에서 이 수치를 감하여 specific radioactivity로 하였다.

K⁺-dependent phosphatase 활성 측정—K⁺-의존성 phosphatase 활성을 측정하기 위하여 50 mM L-histidine(pH 7.4), 10 mM MgCl₂, 8 mM p-nitrophenyl-phosphate 및 10 mM KCl 존재 혹은 부재하에서 25 μg의 형질막 단백질을 가하고 최종 용적이 2 ml되게 한 후 37°C에서 15분간 incubation 하였으며, KCl 존재하에서 생성된 p-nitrophenol에 의한 흡광도의 변화를 410 nm에서 측정하였다. K⁺-의존성 phosphatase 활성은 10 mM KCl 존재하에서 측정된 값으로부터 KCl이 없을때 측정된 값을 빼어준 것으로 하였다.

Saponin, SDS 및 Triton X-100의 처리—Saponin, SDS 및 Triton X-100의 영향을 관찰한 실험에서는 형질막을 미리 saponin, SDS 또는 Triton X-100으로 37°C에서 10분간 처리 한 후 효소활성을 측정하였다. 이때 형질막 단백질 양과 최종용적은 각각 80 μg 및 0.16 ml로 고정하고 농도를 달리하는 saponin, SDS 또는 Triton X-100을 가하였으며 light scattering 실험시만은 형질막 단백질의 양과 최종용적을 2배로 증가시켰다. 약물의 농도는 형질막 단백질 μg당 처리된 약물의 w/w로 표시하였다.

Light scattering 실험—대조형질막 또는 saponin, SDS 및 Triton X-100으로 처리한 형질막 부유액(0.5

Table II—Na⁺-dependent phosphorylation of dog cardiac sarcolemma

[³² P] Bound(pmol Pi/mg)	Turnover number(×10 ⁶ hr ⁻¹)
254.2 ± 13.6	0.42 ± 0.04

Phosphorylation of dog cardiac sarcolemma (20 μg/0.5 ml) was carried out at 0°C in the presence of 100 μM[γ-³²P]ATP, as described in method. Turnover number was calculated by the equation, V = kE(k: turnover number, V: enzyme activity, E: active site concentration). Data were expressed as mean ± SEM from three different preparations.

mg/ml) 0.2 ml를 0.8 ml의 증류수에 가하여 최종용적이 정확히 1 ml되게 하고, 증류수를 reference로 하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 대조군과 처리군에서의 흡광도 차이를 비교하였다.

실험결과

형질막의 성질—개 심실로부터 분리한 형질막 분획중 형질막 이외의 subcellular fraction이 얼마나 오염되어 있는지를 알아보기 위하여 분리한 형질막 분획의 mitochondrial ATP_{ase}, Ca²⁺-ATP_{ase} 및 residual ATP_{ase} 활성을 측정하여 보았다.(Table I) 형질막 분획의 total ATP_{ase} 활성은 약 156 μmol Pi/mg protein/hr로서 NaN₃ 또는 EGTA에 의해서는 각각 약 2% 및 1.5%의 억제만 보였으나 ouabain(10⁻³ M)에 의해서는 거의 대부분 소실되었다. 1 mM ouabain으로 억제된 ATP_{ase} 활성은 약 143 μmol Pi/mg protein/hr로서 분리한 분획중 함유된 ATP_{ase}중 약 92%가 형질막에 기인한 Na⁺, K⁺-ATP_{ase}임을 추정할 수 있었다. 또한 형질막 분획의 Na⁺-의존성 인산화는 약 254 pmol Pi/mg protein이었으며, 효소활성과 인산화로부터 계산된 turnover number(molecular activity)는 0.42 × 10⁶ hr⁻¹로서, 본 실험에서 분리한 분획이 매우 양호한 형질막 분획임을 알 수 있었다.(Table II)

인삼 saponin 및 은시호 saponin이 형질막의 K⁺-의존성 phosphatase활성에 미치는 영향—K⁺-의존성 phosphatase활성에 미치는 인삼 saponin 및 은시호 saponin의 영향을 검토하기 위하여 형질막을 미리 인삼 saponin 또는 은시호 saponin으로 처리한 다음

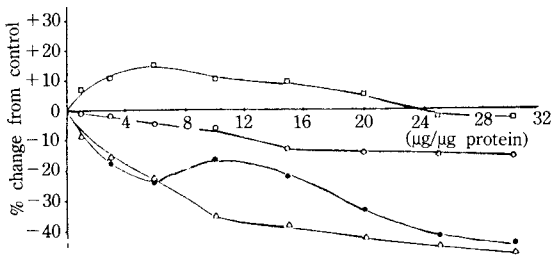


Fig. 1—Effect of ginseng and gypsophila saponin on K^+ -dependent phosphatase activity of dog cardiac sarcolemma.

Sarcolemma (25 μ g) was incubated for 10 min at 37°C with 50 mM L-Histidine (pH 7.4), 10 mM $MgCl_2$, and 8 mM p-nitrophenyl phosphate in total volume of 2 ml. Activity was assayed by measuring the absorbance at 410 nm. Sarcolemma (80 μ g) was incubated with adequate concentration of total saponin (●), diol saponin (○), triol saponin (△), and gypsophila saponin (□), for 10 min at 37°C in a final volume of 0.16 ml before measurement of enzyme activity. The positive and negative signs indicate percent activation and inhibition by saponin, respectively. Control: 32.1 ± 2.1 μ mol of p-nitrophenol/mg/hr. Mean values for three assays are given.

본 효소활성을 측정하였다. 인삼 saponin 중 diol saponin과 triol saponin은 처리농도에 의존하는 효소활성억제를 보였으나 total saponin은 biphasic한 억제양상을 보였다. 한편, 은시호 saponin은 저농도에서 효소활성을 오히려 증가시켰으며 형질막 단백질 μ g당 200 μ g의 은시호 saponin처리로도 효소활성의 억제는 관찰되지 않았다.(Fig. 1)

형질막의 K^+ -의존성 phosphatase활성은 약 34 μ mol p-nitrophenol/mg protein/hr로서 Na^+ , K^+ -ATPase활성의 약 24%에 해당되었으며 형질막 단백질 μ g당 10 μ g의 인삼 saponin 처리로 효소활성이 diol, total 및 triol saponin에서 각각 약 15%, 35% 및 43% 억제되었다.(Table III) 이러한 성적은 인삼 saponin에 의한 효소활성억제 정도가 triol, total, diol saponin순으로 강할 뿐 아니라 본 효소에 대한 인삼 saponin의 작용기전이 은시호 saponin과 상이함을 시사하고 있다.

SDS 및 Triton X-100이 K^+ -의존성 phosphatase

Table III—Activity of K^+ -dependent phosphatase of control and ginseng saponin treated dog cardiac sarcolemma

Ginseng saponin K^+ -dependent phosphatase activity (20 μ g/ μ g protein) (μ mol of p-nitrophenol/mg protein/hr)	
Control	34.2 ± 2.7
Diol	29.1 ± 1.9
Total	22.6 ± 1.4
Triol	19.5 ± 0.8

Sarcolemma(25 μ g) was incubated for 10 min at 37°C with 50 mM L-histidine(pH 7.4), 10 mM $MgCl_2$, and 8 mM p-nitrophenyl phosphate in a total volume of 2 ml. Activity was assayed by measuring the absorbance at 410 nm, as described in Methods.

Values are mean \pm SEM of three different assays.

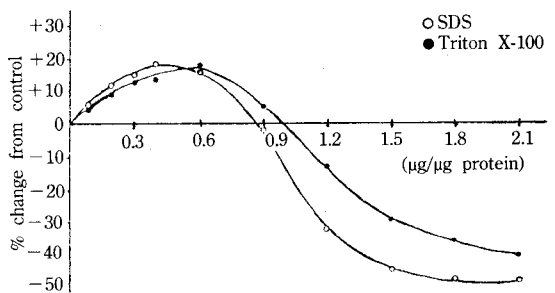


Fig. 2—Effect of SDS and Triton X-100 on K^+ -dependent phosphatase activity.

Legends are the same as described in Fig. 1. ●: Triton X-100 treated enzyme. ○: SDS treated enzyme. Control: 32.1 ± 2.1 μ mol of p-nitrophenol/mg/hr.

활성에 미치는 영향— K^+ -의존성 phosphatase활성에 미치는 인삼 saponin과 은시호 saponin의 영향이 다르게 나타났으므로 detergent로 일반적으로 흔히 사용되는 SDS와 Triton X-100이 본 효소활성에 미치는 영향을 관찰하여 보았다.

형질막을 여러 농도의 SDS와 Triton X-100으로 미리 처리하고 phosphatase 활성을 측정하였던 바 저농도에서 효소활성의 증가를, 고농도에서는 효소활성의 감소를 보였으며, 단백질 μ g당 SDS 0.4 μ g 또는 Triton X-100 0.6 μ g을 처리했을 때 약 20%의 최대 효소활성의 증가를 나타내었다.(Fig. 2)

Triton X-100이 형질막의 light scattering에 미치는 영향—저농도 SDS와 Triton X-100 처리에 의한 형

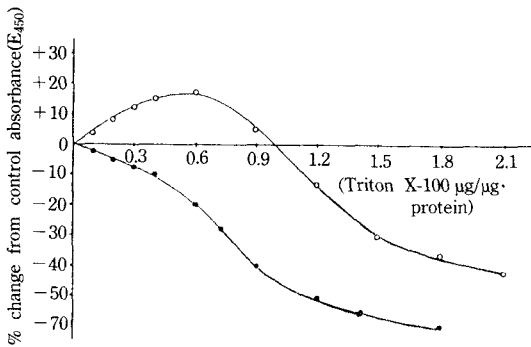


Fig. 3—Relationship between changes in K⁺-dependent phosphatase activity and decrease in light scattering of sarcolemma by Triton X-100. Measurement of K⁺-dependent phosphatase activity and treatment of Triton X-100 to sarcolemma were carried out as described in Fig. 1. Absorbances of suspension containing 0.1 mg of control and Triton X-100 treated sarcolemma in final volume of 1 ml were measured at 450 nm. Percent changes from control activity and light scattering(absorbance) were plotted against Triton X-100 concentration. Control activity and absorbance were 32.1±2.1 µmol of p-nitrophenol/mg/hr and 0.1, respectively. ●: absorbance, ○: K⁺-dependent phosphatase activity. Mean values for three assays are given.

질막의 K⁺-의존성 phosphatase 활성화가 형질막의 붕괴와 관계가 있는지 즉 효소활성증가가 light scattering 감소와 병행하여 나타나는지 알아보기 위하여 형질막의 light scattering 실험을 시행하여 보았다.

Fig. 3은 형질막 분해를 여러 농도의 Triton X-100으로 37°C에서 10분간 처리한 후 Triton X-100 처리에 의한 흡광도의 변화를 Triton X-100으로 처리하지 않은 대조 형질막 부유액의 흡광도의 백분율로 표시하고 아울러 Triton X-100 각 농도에서의 K⁺-의존성 phosphatase 활성변화를 대조군의 백분율로 나타낸 것으로 흡광도는 Triton X-100 처리농도에 의존하여 감소하였으나 효소활성은 저농도에서는 증가되고 고농도에서는 감소되는 양상을 보였다.

이러한 Triton X-100의 본 효소계에 대한 작용으로 미루어 chemical detergents는 저농도에서는 막 지질제거에 의한 막의 붕괴로 효소활성부위를 증가시키고, 고농도에서는 효소활성에 필요한 효소계의 pho-

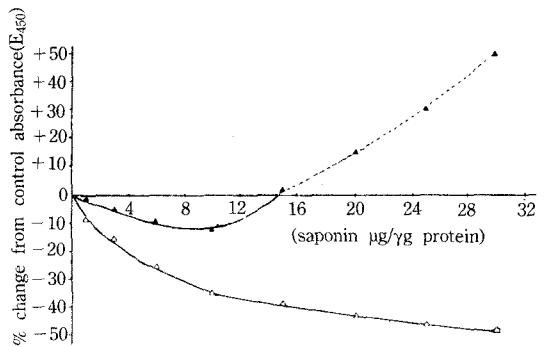


Fig. 4—Relationship between changes in K⁺-dependent phosphatase activity and in light scattering of sarcolemma by triol saponin. Legends are the same as described in Fig. 3. ▲: absorbance, △: K⁺-dependent phosphatase activity.

spholipid까지 제거하므로서 효소활성을 억제하는 것으로 추측된다.

인삼 saponin이 형질막의 light scattering에 미치는 영향—인삼 saponin이 이들 detergent와 유사한 작용기전으로 형질막의 K⁺-의존성 phosphatase활성에 영향을 미친다면 특정농도에서 형질막 분해의 K⁺-의존성 phosphatase활성을 증가시켜야 할 것이다.

본 실험에 사용한 인삼 saponin의 어떤 농도에서도 효소활성의 증가가 관찰되지 않았으므로 인삼 saponin은 SDS나 Triton X-100과는 달리 막붕괴 이전에 효소계 작용하여 효소활성을 감소시킬 것으로 생각된다. 이 경우 인삼 saponin의 효소활성억제작용은 형질막 붕괴에 의한 흡광도의 감소가 있기전에 나타날 것으로 예상되므로 형질막을 인삼 saponin으로 처리한 후 효소활성 감소와 흡광도의 감소를 비교하여 보았다.

Fig. 4에서 보는 바와 같이 triol saponin처리시는 효소활성감소가 흡광도의 감소에 선행하여 나타났으며 diol, total saponin 처리시에도 이와 같이 동일한 효과를 보였다. 그러나 인삼 saponin 처리량이 많아졌을 때는 detergent 처리시와는 달리 침전현상으로 인해 탁도(O.D)가 오히려 증가되었다.

고 찰

본 실험을 통하여 SDS와 Triton X-100은 양에 따라

형질막의 K^+ -의존성 phosphatase 활성을 증가 또는 감소시키는데 비해 인삼 saponin은 효소활성의 증가 없이 억제만을 보였고 은시호 saponin은 효소활성의 증가만을 보여 인삼 saponin의 작용이 은시호 saponin이나 chemical detergents의 작용과 다름을 알 수 있었다.

K^+ -의존성 phosphatase는 Na^+ , K^+ -ATP_{ase}에 의한 ATP분해과정을 완결시키는 효소이며, Na^+ , K^+ -ATP_{ase}와 마찬가지로 이 효소활성의 유지조절에는 지질이 매우 중요한 역할을 하는 것으로 알려지고 있다.¹⁻⁷⁾ 인삼 saponin이 소량에서는 일반계면활성작용과는 다른 기전으로 Na^+ , K^+ -ATP_{ase}를 억제한다는 보고¹⁷⁻¹⁸⁾가 있으나 인삼 saponin의 Na^+ , K^+ -ATP_{ase} 억제작용이 탈인산화에 관여하는 K^+ -의존성 phosphatase 활성억제와 관계가 있는지 또 본 효소에 대한 인삼 saponin의 작용이 일반계면활성제의 작용과 차이가 있는지에 관해서는 연구된 바 없으므로 개 심실로부터 형질막을 분리하여 이 점을 추후하였다.

본 실험에서 분리한 형질막 분획의 Na^+ , K^+ -ATP_{ase}활성은 약 143 $\mu\text{mol Pi/mg protein/hr}$ 이었으며 total ATP_{ase}활성의 약 92%를 차지하였고, NaN_3 나 EGTA로 그 활성이 거의 영향을 받지 않는 것으로 보아 분리한 분획중에는 mitochondria나 근소포체의 오염이 거의 없는 것으로 생각된다. 뿐만아니라 예비실험 결과 분리한 분획의 ATP 의존성 Ca^{2+} 섭취가 oxalate의 영향을 전혀 받지 않았다는 점에서 근소포체의 오염이 없는 것으로 생각하였다. 따라서 매우 낮은 활성이나마 형질막 분획에서 측정된 EGTA-sensitive Ca^{2+} -ATP_{ase} 활성은 근소포체의 Ca^{2+} -ATP_{ase}가 아닌 형질막의 Ca^{2+} -ATP_{ase}에 기인한 것으로 추측된다. 이는 근소포체의 ATP-의존성 Ca^{2+} 섭취는 oxalate에 의존하는데 반해 형질막의 ATP-의존성 Ca^{2+} 섭취는 oxalate에 영향을 받지 않는다는 점²³⁾으로 뒷받침될 수 있다.

일반적으로 식물 saponin과 chemical detergent는 이들이 가지고 있는 계면활성 작용으로 형질막의 구성성분인 지질을 제거하여 형질막을 파괴하며 고농도에서는 K^+ -의존성 phosphatase활성에 필요한 효소계의 지질까지도 제거하여 효소활성을 소실케 한다.^{19,24)} 이러한 detergent의 성질로 보아 저농도의 SDS 및 Triton X-100에 의한 형질막의 K^+ -의존성 phosphatase 활성증가는 막붕괴로 야기된 효소 활성부위의

증가에 기인하며 고농도에서는 효소계의 delipidation으로 효소활성을 억제하는 것으로 추정된다. 한편 은시호 saponin은 형질막의 본 효소 활성을 증가시킬 뿐 양을 증가 시켜도 효소 활성의 억제를 보이지 않았다. 이 결과는 은시호 saponin이 효소활성에 필요한 lipid에는 거의 영향을 주지 않고 막붕괴만을 유도할 가능성을 시사하는 것으로서 은시호 saponin이 형질막에 존재하는 효소의 latent site를 측정하는데 이상적인 unmasking agent로 이용될 수 있음을 암시하고 있다.

본 실험에서 형질막의 K^+ -의존성 phosphatase에 미치는 인삼 saponin의 효과와 은시호 saponin의 효과간에는 현저한 차이가 있었다. 인삼 saponin이 은시호 saponin이나 SDS와 같은 막붕괴효과를 가지고 있다면 적당농도의 인삼 saponin 처리에 의하여 본 효소활성이 증가되어야 할 것이나 diol과 triol의 경우 용량에 의존하는 효소활성의 억제를 보였다는 점으로 미루어 저농도의 인삼 saponin은 막에 대한 계면활성작용과는 다른 K^+ -의존성 phosphatase에 대한 직접작용이 있을 것으로 추측된다. 또한 은시호 saponin에 의해서는 전술한 바와 같이 효소활성이 증가될 뿐만 아니라 농도를 증가시켜도 억제작용을 나타내지 않아 인삼 saponin의 K^+ -의존성 phosphatase 억제작용을 saponin의 일반적인 작용으로 간주할 수 없을 것으로 생각된다.

이러한 인삼 saponin과 은시호 saponin 및 chemical detergents의 형질막 K^+ -의존성 phosphatase에 대한 작용의 차이는 light scattering 실험으로 더욱 확실히 할 수 있었다. 즉 SDS나 Triton X-100경우 막붕괴에 의한 탁도(O.D)의 감소가 효소활성의 증가와 거의 동시에 나타나는 반면, 인삼 saponin의 경우 탁도의 감소보다 낮은 농도에서 효소활성을 억제하는 것으로 보아 소량의 인삼 saponin은 막붕괴 이전에 효소계에 직접작용하여 효소활성을 억제하리라고 생각된다.

결 론

개 심실로부터 형질막을 분리하고 형질막의 K^+ -의존성 phosphatase 활성에 미치는 인삼 saponin과 은시호 saponin 및 chemical detergents의 영향을 검토하였다.

1. 형질막 분획중에는 미토콘드리아나 근소포체 (sarcoplasmic reticulum)의 오염이 거의 없었다.
2. 형질막 분획의 Na⁺, K⁺-ATP_{ase} 활성은 약 143 μmol Pi/mg protein/hr로서 total ATP_{ase} 활성의 약 92%에 달하였으며, K⁺-의존성 phosphatase 활성은 약 34 μmol p-nitrophenol/mg protein/hr였다.
3. 인삼 saponin은 용량 의존적으로 K⁺-의존성 phosphatase 활성을 억제하는 반면 은시호 saponin은 저농도에서는 효소활성을 증가시키고 양을 증가시켜도 효소 활성의 억제는 보이지 않았다.
4. SDS와 Triton X-100은 저농도에서는 효소활성을 증가시켰으나 고농도에서는 효소활성을 억제하였다.
5. Triton X-100에 의한 본 효소활성의 증가는 light scattering의 감소와 거의 동시에 일어났으나 인삼 saponin의 효소활성 억제효과는 light scattering의 감소 이전부터 나타났다.
6. 이상 성적으로 미루어 인삼 saponin은 낮은 농도에서는 막에 대한 계면활성작용보다는 K⁺-의존성 phosphatase와의 직접적인 상호작용으로 효소활성을 억제하는 것으로 사료된다.

문 헌

- 1) Judah, J.D., Ahmed, K. and Mchean, A.E.M.: Ion transport and phosphoproteins of human red cells. *Biochim. Biophys. Acta*, **65**, 472 (1962).
- 2) Nagai, K., Izumi, F. and Yoshida, H.: Studies on K⁺-dependent phosphatase. Its distribution and properties. *J. Biochem.*, (Tokyo) **59**, 295 (1966).
- 3) Robinson, J.D.: Effects of phlorizin on membrane cation-dependent adenosine triphosphatase and p-nitrophenyl phosphatase activities. *Mol. Pharmacol.*, **5**, 584 (1969).
- 4) Robinson, J.D.: Kinetic studies on a brain microsomal ATP_{ase}. I. K-dependent phosphatase. *Biochemistry*, **8**, 3348 (1969).
- 5) Lane, L.K., Copenhaver, J.H., Lindenmayer, G.E. and Schwartz, A.: Purification and characterization of and [³H] ouabain binding to the transport adenosine triphosphatase from outer medulla of canine kidney. *J. Biol. Chem.*, **248**, 1797 (1973).
- 6) Jorgensen, P.L. and Skou, J.C.: Purification and characterization of (Na⁺ + K⁺)-ATP_{ase} in prepara-

tions from the outer medulla of rabbit kidneys. *Biochim. Biophys. Acta*, **233**, 366 (1971).

- 7) Schwartz, A., Lindenmayer, G.E. and Allen, J.C.: The sodium-potassium adenosine triphosphatase: Pharmacological, physiological and biochemical aspects. *Pharmacol. Rev.*, **27**, 3 (1975).
- 8) Tanaka, K.: Comparison of lipid effects on K⁺ - Mg²⁺ activated p-nitrophenylphosphatase and Na⁺, K⁺, Mg²⁺ activated adenosine triphosphatase of membrane. *J. Neurochem.*, **16**, 1301 (1969).
- 9) Wheeler, K.P. and Walker, J.A.: Differential effects of lipid depletion on membrane sodium-plus-potassium ion-dependent phosphatase. *Biochem. J.*, **146**, 723 (1975).
- 10) Jarnefelt, J.: Lipid requirements of functional membrane structures as indicated by the reversible inactivation of (Na⁺ + K⁺)-activated ATP_{ase} from brain microsome. *Biochim. biophys. Acta*, **266**, 91 (1972).
- 11) Bruni, A., Contessa, A.R. and Palatini, P.: Functions of phospholipids in adenosine triphosphatase associated with membranes. In Membrane-Bound Enzymes, Vol. **14**, pp. 195-207 (1971). *Advance in Experimental Medicine and Biology*.
- 12) Wheeler, K.P. and Whittam, R.: ATP_{ase} activity of the sodium pump needs phosphatidylserine. *Nature*(London), **225**, 449 (1970).
- 13) Roelofsen, B. and Van Deenen, L.L.M.: Lipid requirement of membrane bound ATP_{ase}: Studies on human erythrocyte ghosts. *Eur. J. Biochem.*, **400**, 245 (1973).
- 14) Wheeler, K.P., Walker, J.A. and Barker, D.M.: Lipid requirement of the membrane sodium-plus-potassium ion-dependent adenosine triphosphatase system. *Biochem. J.*, **146**, 713 (1975).
- 15) Ottolenghi, P.: The reversible delipidation of a solubilized sodium-plus-potassium ion-dependent adenosine triphosphatase from the salt gland of the spiny dogfish. *Biochem. J.*, **151**, 61 (1975).
- 16) Kim, N.D., Kim, C.K. and Kim, B.K.: A study on the tonic effects of ginseng. Effects of ginseng saponins on the rat heart. *Yakhak Hoeji*, **24**, 15 (1980).
- 17) Lee, S.W., Lee, J.S. and Jin, K.P.: Effect of ginseng

- saponin on the activity, phosphorylation, [^3H] ouabain binding of purified Na^+ , K^+ -ATP_{ase} isolated from the outer medulla of sheep kidney. *Yakhak Hoeji*, **29**, 76 (1985).
- 18) Lee, S.W., Lee, J.S., Kim, Y.H. and Jin, K.D.: Effect of ginseng saponin on the Na^+ , K^+ -ATP_{ase} of dog cardiac sarcolemma. *Arch. Pharm. Res.*, **9**, 33 (1986).
- 19) Gloxhuber, C.: *Anionic surfactants: Biochemistry, Toxicology, Dermatology*. Marcel Dekker, Inc. New York and Basel, p. 41 (1981).
- 20) Lee, S.W., Schwartz, A., Adams, R.J., Yamori, Y., Whitmer, K., Lane, L.K. and Wallick, E.T.: Decrease in Na^+ , K^+ -ATP_{ase} activity and [^3H] ouabain binding sites in sarcolemma prepared from hearts of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*, **5**, 682 (1983).
- 21) Lowry, O.H., rosebrough, H.J., Farr, A.L. and Randall, R.T.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **21**, 965 (1949).
- 22) Wallick, E.T., Lane, L.K. and Schwartz, A.: Regulation of vanadate of ouabain binding to Na^+ , K^+ -ATP_{ase}. *J. Biol. Chem.*, **254**, 8107 (1979).
- 23) Wibo, M., Morel, N. and Godfraind, T.: Differentiation of Ca^{2+} pumps linked to plasma membrane and endoplasmic reticulum in the microsomal fraction from intestinal smooth muscle. *Biochim. Biophys. Acta*, **649**, 651 (1981).
- 24) Jones, L.R., Maddock, S.W. and Besch, H.R., Jr: Unmasking effect of alamethicin on the Na^+ , K^+ -ATP_{ase}, β -adrenergic receptor-coupled adenylate cyclase, and cAMP-dependent protein kinase activities of cardiac sarcolemmal vesicles. *J. Biol. Chem.*, **255**, 9971 (1980).