

토마토 뿌리조직에서 분리한 마이크로솜 이온펌프의 특성

조광현 · 사공 정 · 김영기*

충북대학교 농과대학 농화학과

초 록 : 토마토의 뿌리조직에 존재하는 여러 가지 이온이동 기작을 밝혀내기 위하여 뿌리조직으로부터 마이크로솜을 분리하였고, 마이크로솜에 존재하는 이온펌프(ATPase)의 활성을 측정하였다. 원형질막과 액포막에 위치하는 H⁺-ATPase들의 활성은 각각의 선택적 저해제인 vanadate와 NO₃⁻를 이용하여 평가하였고, 이들의 활성은 각각 마이크로솜 ATPase 총활성의 ~30%, ~38%로 나타났다. 이들 두 가지 저해제 효과는 additive하게 나타났으며, 전체활성의 약 50~70%를 저해함을 확인하였다. 마이크로솜 ATPase의 활성은 pH의 영향을 받으며, 최대 활성은 pH 7.4에서 나타났다. ATPase 활성은 또한 10 mM 이상의 K⁺에 의해서 약 30% 증가를 보였으며, K⁺에 의한 활성촉진 효과는 Na⁺에 의해서 완전히 저해되었다. K⁺에 의한 ATPase 활성증가 기작을 조사하기 위해, 반응용액의 K⁺ 농도를 조절하면서 선택적 저해제들의 효과를 측정하였다. 반응용액에 K⁺이 없는 조건과 120 mM K⁺을 함유하는 조건에서 vanadate는 ATPase 활성을 동일하게 27% 저해하였으나, NO₃⁻는 각각의 조건에서 32%, 40% 저해하였다. 이것은 NO₃⁻에 민감한 액포막의 H⁺-ATPase 활성이 K⁺에 의해서 촉진된다는 것을 시사한다. 마이크로솜 ATPase 활성은 Ca²⁺에 의해서도 저해되었으며, NO₃⁻는 Ca²⁺에 의한 저해효과를 억제하였다. 이상의 결과는 토마토 뿌리조직의 마이크로솜 ATPase중 액포막의 H⁺-ATPase 활성이 K⁺에 의해서 증가하며, Ca²⁺에 의해서 저해되는 것을 보여준다.(1998년 1월 30일 접수, 1998년 2월 25일 수리)

서 론

토양 중에서 식물체에 의한 무기양분의 능동적 흡수는 농도기울기를 역행하여 일어나며, 이때 대부분의 경우 뿌리의 상피세포막에 위치하는 H⁺-ATPase(H⁺ 펌프)가 primary transporter로서 무기양분 흡수를 위한 에너지를 공급한다. 즉, 세포막 H⁺-ATPase는 ATP의 가수분해시 발생하는 에너지를 이용하여 세포 밖으로 H⁺을 이동시키며, 결과적으로 세포막을 경계로 pH 기울기 및 막전위 형성을 유발한다. 이러한 H⁺-ATPase의 활성은 다양한 생리현상을 조절함으로써 식물 생육에 중심적 역할을 수행한다.¹⁾ 액포막에 위치한 H⁺ 펌프도 액포 내부의 산성 pH를 유지하는 역할을 수행하며, 이것은 액포의 무기 및 유기양분의 이동과 관련된 생체 내 기능에 필수적이다. 액포막에서의 H⁺ 펌프는 현재까지 ATP를 가수분해하는 H⁺-ATPase와 PPi를 가수분해하는 H⁺-PPase의 두 종류가 알려져 있으며, 이들중 H⁺-ATPase는 V-type H⁺-ATPase로서 특성이 밝혀져있다.^{2,3)}

식물뿌리는 이온 및 물질의 이동이 가장 활발하게 일어나는 곳들 중의 하나이며, ion transporter가 관계하여 여러 가지 생리적 작용을 수행하고 있다. 식물체의 뿌리조직에서는 여러 종류의 이온펌프와 이온채널 단백질 등의 존재 및 생리적 역할이 보고되고 있으며, 특히 세포막에 위치한 H⁺-ATPase는 식물체의 성장과 분화에,^{4,5)} Ca²⁺-ATPase는 세포질내의 칼슘이온 농도를 낮춤으로써 세포의 생리활성 변화 조절에,^{6,7)} NO₃⁻/H⁺ cotransporter는 NO₃⁻의 흡수에,^{8,9)} Na⁺/H⁺

antiporter는 염류저항성에¹⁰⁾ 각각 중요한 생리적 역할을 수행하는 것이 밝혀졌다. 또한 액포에서는 H⁺-ATPase,^{11,12)} Na⁺/H⁺ antiporter가 염장애의 극복과 관련되어,^{13,14)} Ca²⁺ 채널이^{15,17)} 세포의 생리활성과 관련하여 연구되어져왔다.

본 연구는 토마토의 뿌리조직에서 이온의 이동에 관련된 생리기작을 이해하여, 염류집적 토양에서의 작물생육 개선 방안을 모색하기 위한 기초연구로서 수행되었다. 토양중과 집적된 염류는 작물에 환경 스트레스 원인으로 생육 및 생장에 장애요인이거나, 많은 연구가 앞에 국한되어 있어 뿌리생장에 대한 적절한 연구결과는 부족한 실정이다.¹⁸⁾ 이에, 본 연구에서는 양액재배한 토마토 뿌리조직 생체막으로부터 마이크로솜을 분리하고, 원형질막 및 액포막에 위치하는 H⁺-ATPase들의 활성에 영향을 미치는 H⁺, Na⁺, K⁺, Ca²⁺ 등의 여러 가지 이온들과 선택적 저해제들의 효과를 조사하였다.

재료 및 방법

재료

토마토의 종자는 홍농종묘의 서광토마토(*Lycopersicon esculentum* L.; Pink Forcer)를 사용하였다. 종자는 발아용 스폰지를 이용하여 빛을 주지 않은 상태로 25°C를 유지하면서 증류수에서 약 3일간 발아시켰으며, 발아후 양액이 담긴 플라스틱 용기에 이식하였다. 양액은 4.21 mM Ca(NO₃)₂, 5 mM KNO₃, 1 mM NH₄NO₃, 1 mM KH₂PO₄, 2 mM MgSO₄, 54.5 μM Fe · Na-EDTA, 32.4 μM H₃BO₃, 8.3 μM MnSO₄,

찾는말 : H⁺-ATPase, Tomato roots, Ca²⁺ effect, Vanadate, Nitrate.

*연락처자

0.77 μM ZnSO₄, 0.2 μM CuSO₄, 0.082 μM Na₂MoO₄로 구성되어있다.¹⁹⁾ 성장조절기의 온도는 28~32°C를 유지하며 약 4주간 재배하여 뿌리를 취해 실험에 사용하였다.

양액의 제조에는 모두 1급 이상의 시약을 사용하였고, 완충액용 sucrose는 Fluka Biochemical사(Switzerland)의 제품을 사용하였으며, EGTA, NADH 등을 포함한 모든 시약들 및 pyruvate kinase, lactate dehydrogenase 등의 효소들은 Sigma Chemical Co.(St. Louis, U.S.A.)에서 구입하였다.

토마토 뿌리조직에서의 마이크로솜 분리

토마토 뿌리조직으로부터 마이크로솜을 분리하는 방법은 콩 뿌리조직에서 마이크로솜을 분리하는 방법²⁰⁾을 약간 변형하였다. 간략히 서술하면, 토마토의 잔뿌리 부분을 절개하여 증류수로 3회 이상 씻어낸 후, 뿌리 약 100 g에 완충액(250 mM sucrose, 2 mM dithiothreitol, 0.5 mM PMSE, 0.1% BSA, 25 mM Tris-Mes, pH 7.0) 200 ml를 가하여 food processor로 잘게 분쇄한 후, 4겹의 거즈로 여과하였다. 여과액은 glass-Teflon homogenizer로 완전히 분쇄시킨 후, 8,500 rpm(10,000×g)으로 30분간 원심분리하여 섬유조직 및 미토콘드리아 등을 제거하고, 상층액을 초고속원심분리기에서 Beckman SW-28 rotor로 22,000 rpm(80,000×g)으로 1시간 동안 초원심분리하였다. 원심분리로 얻어진 침전은 위의 완충액 8 ml를 가한 후, glass homogenizer로 균질화하였다. 마이크로솜 분획은 액체질소로 순간냉동시켜 deep freezer(약 -70°C)에 사용시까지 보관하였으며, 3개월 이내에 사용하였다. 모든 과정은 4°C에서 수행하였으며, 마이크로솜 분획의 단백질 농도는 Lowry방법²¹⁾으로 결정하였다.

마이크로솜 ATPase 활성측정

뿌리조직으로부터 분리된 마이크로솜 ATPase의 평균활성은 enzyme-coupled assay 방법에 의하여 측정하였다.²²⁾ 간략히 서술하면, 마이크로솜 ATPase의 활성은 혐기적 해당과정의 일부와 연결되어 NADH 산화를 유발한다. NADH는 340 nm에서 최대 흡광도를 보이나, 산화된 NAD⁺는 340 nm에서 광을 흡수하지 않으므로, ATPase 활성은 340 nm에서의 흡광도 감소로 나타나며, 이때 시간에 따른 평균 흡광도 감소율을 이용하여 활성을 측정하게 된다.²³⁾ 흡광도 감소는 spectrophotometer(Hitachi U-2000, Japan)를 이용하여 측정하였으며, assay buffer(120 mM KCl, 50 μM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 0.4 mM NADH, 2 mM phosphoenolpyruvate, 10 mM KCN, 30 mM HEPES, pH 7.4) 500 μl에 약 25 μg의 단백질이 함유된 마이크로솜을 가한 후, pyruvate kinase(1 IU), lactate dehydrogenase(1 IU)를 혼합하고, 0.5 mM ATP를 가하여 효소반응을 관측하였다. 일부의 ATPase 활성측정시에 나타나는 오염된 미토콘드리아막의 ATPase는 assay buffer에 KCN을 10 mM 농도로 첨가하여 저해하였다. K⁺ 효과를 측정하기 위한 실험에서는 미토콘드리아의 오염이 적은 시료를 사용하였으며, K⁺ 농도가 대조실험(120 mM)에 비하여 낮은 조건에서의 활성측정시에는 KCl의 감소된 양에 해당하는 TEA-Cl을 가하여 이루어졌다.

Ca²⁺ 농도별 용액의 제조

마이크로솜 ATPase 활성의 Ca²⁺ 농도 의존성은 반응완충액에서의 유리상태 Ca²⁺ 농도를 조절한 후 측정하였다. 반응완충액 내의 유리상태 Ca²⁺ 농도조절에 필요한 EGTA의 농도는 Fabiato의 stability constant²⁴⁾들을 이용한 컴퓨터 프로그램으로 계산하였고, 해당 량의 EGTA를 첨가하여 반응완충액의 Ca²⁺ 농도를 조절하였다.

결과 및 고찰

마이크로솜 ATPase의 저해특성

토마토의 뿌리조직에서 이온이동과 관련된 생리활성을 측정하기 위해서 원형질막, 액포막, ER 등에서 유래된 마이크로솜 분획을 분리하였으며, 마이크로솜 분획에서의 ATPase 활성을 측정하였다. 마이크로솜 ATPase 활성은 ATP 분해에 따른 ADP 생성과 정량적으로 연결된 NADH의 산화를 340 nm에서의 흡광도 감소율로 측정하는 enzyme-coupled assay 방법을 이용하여 측정하였다(Fig. 1A). 마이크로솜 ATPase의 총활성은 재배시기 및 조건, 마이크로솜 분리과정, 마이크로솜 분획의 단백질 농도 측정에 따라 어

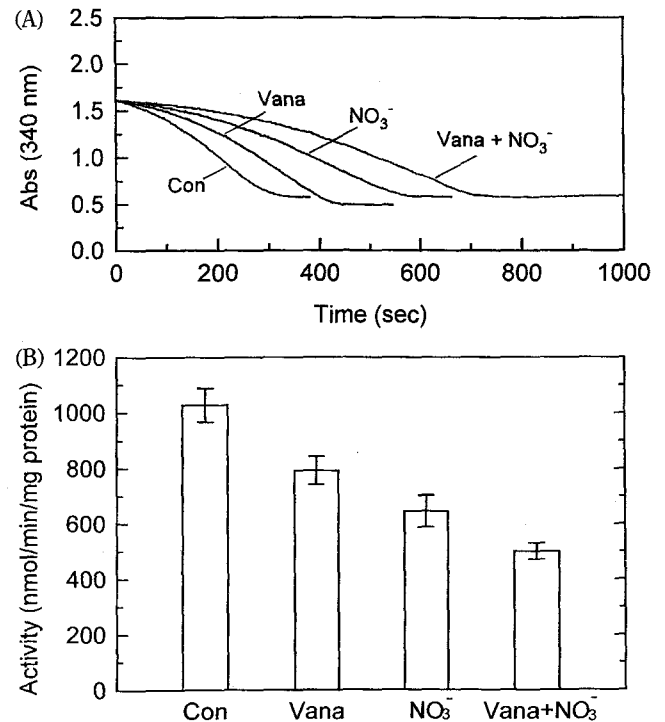


Fig. 1. The effects of vanadate and nitrate on microsomal ATPase activity.

(A) Microsomes were prepared from the roots of one-month-old tomato. The activity of microsomal ATPase was measured by an enzyme-coupled method, monitoring the time-dependent changes of absorbance at 340 nm. The concentrations of vanadate (Vana) and nitrate (NO₃⁻) were 1 mM and 50 mM, respectively. (B) Average activities of microsomal ATPases in the presence of above inhibitors. Values are means ± SD (n>10).

느정도 변화를 보였으며, 특히 겨울과 여름에 재배된 시료에서는 총활성의 차이가 컸다. 그럼에도 불구하고 재배시기에 상관없이 각 시료에서의 대조 총활성에 대한 vanadate, NO_3^- 등 모든 저해제의 효과는 비교적 일정하게 얻어졌다. 그러므로, 본 연구에서는 각 실험에서 대조실험의 총활성에 대한 저해제 효과를 측정함으로써 마이크로솜 시료에 따른 차이를 최소화 하였다.

식물체에서 주된 ATPase로 알려진 원형질막의 H^+ -ATPase 활성과 액포막의 H^+ -ATPase 활성은 각각의 특이적 저해제인 vanadate²⁵⁾와 NO_3^- ²⁶⁾를 이용하여 평가하였다. 원형질막의 H^+ -ATPase 활성을 특이적으로 저해하는 Vanadate의 K_i 값은 5~20 μM 로 알려져 있으며, 100 μM 이상의 농도에서 원형질막의 H^+ -ATPase 활성을 완전히 저해한다고 보고되었다.²⁷⁾ 또한, NO_3^- 는 50 mM 농도에서 액포막의 H^+ -ATPase 활성을 90% 이상 저해함이 알려져있고, K_i 값은 대략 5 mM 전후를 보여 액포막의 H^+ -ATPase에 대한 선택적 저해제로 널리 사용되고 있다.²⁸⁾

토마토 뿌리조직에서 분리한 마이크로솜 ATPase의 총활성은 $1,028 \pm 60$ nmol/min/mg protein으로 측정되어 다른 작물에 비하여 큰 활성을 보였다.²⁹⁾ 원형질막에 위치하는 H^+ -ATPase의 선택적 저해제인 1 mM vanadate와 액포막 H^+ -ATPase의 선택적 저해제인 50 mM NO_3^- 에 의하여 총활성은 각각 792 ± 51 , 644 ± 58 nmol/min/mg protein으로 감소하여 원형질막의 H^+ -ATPase 활성은 전체활성의 약 23%, 액포막의 H^+ -ATPase 활성은 약 38%로 나타났다. 그러나 vanadate와 NO_3^- 를 함께 첨가하면 활성은 499 ± 29 nmol/min/mg protein으로 감소하여, 이들 두 가지 선택적 저해제들의 효과가 유의성있는 additive 효과로 관측되었으며, 원형질막과 액포막의 H^+ -ATPase 활성은 최소한 총활성의 약 50~70% 가량으로 평가되었다(Fig. 1B). 이때 잔류활성으로 나타난 30~50% 활성의 특성은 밝혀지지 않았으나, 생체막에 존재하며 vanadate나 NO_3^- 에 의해 저해되지 않는 ATPase 활성으로 생각된다. 위의 결과는 유사한 방법으로 수행된 콩 뿌리조직에서 원형질막과 액포막의 H^+ -ATPase 활성이 총활성의 약 ~30%를 차지하는 것에 비교하여 높은 수준이며,²⁹⁾ 식물종의 차이에 의하여 H^+ -ATPase 활성 정도가 다르게 나타나는 것을 보여준다.

pH 효과

토마토 뿌리조직에서 분리한 마이크로솜 ATPase는 pH 7~8 사이에서 최대의 활성을 보였다(Fig. 2). pH에 따른 활성의 변화는 pH 5.0, 6.0, 7.0, 7.4, 8.0, 9.0에서 측정되었으며, 120 mM K^+ 을 포함한 대조실험 조건에서의 각 pH에 따른 활성은 0, 743, 1,052, 1,122, 1,048, 593 nmol/min/mg protein으로 각각 나타났다. 즉, 마이크로솜 ATPase의 최대 활성은 pH 7~8에서 나타났으며, 이보다 낮거나 높은 pH에서는 활성이 감소하는 bell-shape의 활성곡선을 보였다. 또한 K^+ 이 함유되지 않은 반응용액에서의 마이크로솜 ATPase 활성은 위의 각각의 pH에서 0, 400, 656, 744, 736, 176 nmol/min/mg protein으로서, 가장 높은 활성은 pH 7.4에서

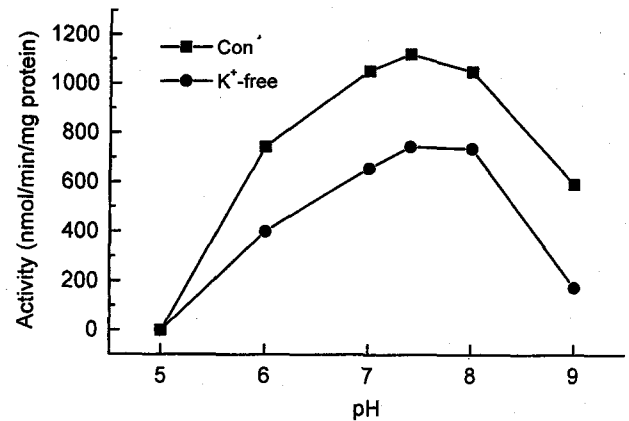


Fig. 2. The pH-dependence of microsomal ATPase activity.

The microsomal ATPase activity in control solution containing 120 mM K^+ was maximal at pH 7~8 (■—■). The activity was decreased at above or below this pH range, forming a bell-shaped activity curve. In K^+ -free solution, the activity was measured in whole range of pH (●—●), also forming a bell-shaped activity curve. The data shown are average value of two experiments.

나타났으며, 대조실험과 유사한 bell-shape의 활성곡선이 pH 변화에 따라 관측되었다. 그러나 K^+ 이 함유되지 않은 반응용액에서의 활성은 K^+ 을 포함한 대조실험에 비하여 전반적으로 25~30% 감소되었다.

마이크로솜 ATPase 총활성에 미치는 K^+ , Na^+ 의 영향

토마토의 뿌리조직으로부터 분리한 마이크로솜 ATPase 활성에 미치는 K^+ 의 영향을 조사하였다(Fig. 3). 마이크로솜 ATPase의 활성은 반응용액에 K^+ 을 함유하지 않는 조건에서 840 ± 25 nmol/min/mg protein으로 측정되었으나, K^+ 의 농도를 0.1, 1, 10, 120 mM로 증가시키면 활성은 K^+ 농도 증가에 따라 각각 992 ± 32 , 990 ± 37 , $1,082 \pm 60$, $1,088 \pm 63$ nmol/min/mg protein으로, 최고 ~30%까지 증가되었다. K^+ 농도 증가에 따른 활성의 증가는 0.1 mM 이상의 K^+ 존재하

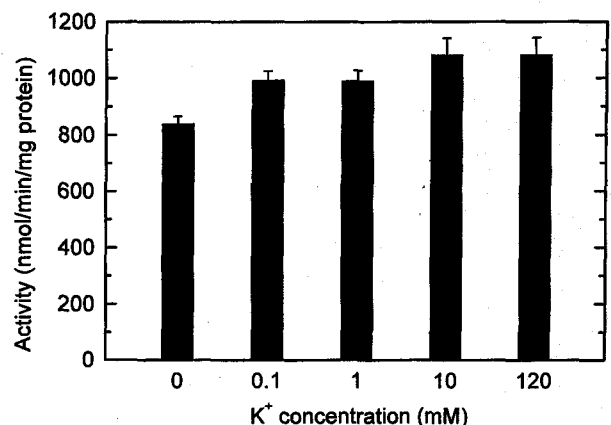


Fig. 3. The effect of K^+ on the activity of microsomal ATPase.

The activity of microsomal ATPase was measured in solutions containing various concentrations of K^+ . K^+ increased the activity of microsomal ATPase at the concentration of K^+ above 0.1 mM as a dose-dependent manner. Values are means \pm SD (n=3).

에서 나타났으며, 10 mM 이상의 농도에서는 최대치를 보였다. 이러한 결과는 마이크로솜 ATPase 활성의 K⁺ 의존성을 보여주며, K⁺-ATPase의 존재 가능성을 시사한다. 그러나, 아직까지 식물세포에서 K⁺을 이동시키는 primary ion transporter의 존재여부가 확인되지 않고 있어,³⁰ K⁺에 의한 ATPase의 활성증가는 마이크로솜 막에 존재하는 ATPase의 활성에 직접 또는 간접적인 영향을 미치는 인자로서의 K⁺-stimulated ATPase등으로 보고되고 있다.^{31,34}

한편, K⁺ 농도증가에 의하여 촉진되는 마이크로솜 ATPase 활성은 Na⁺에 의해서 저해되었다(Fig. 4). 먼저, K⁺이 함유되어있지 않은 반응용액에서 활성은 640±46 nmol/min/mg protein이며, 10 mM, 120 mM Na⁺을 첨가하면 활성은 680±28, 587±12 nmol/min/mg protein으로서 ATPase 활성에 미치는 Na⁺의 효과는 크지 않았다. 또한, K⁺의 농도를 10 mM로 증가시키면 활성은 827±52 nmol/min/mg protein으로 증가하며, 이때 10 mM, 120 mM Na⁺을 첨가하면 활성은 829±55, 637±53 nmol/min/mg protein으로 120 mM Na⁺에 의한 저해효과가 관측되었다. K⁺의 농도를 120 mM로 증가시키면 활성은 845±60 nmol/min/mg protein으로 10 mM K⁺ 조건에 비하여 더 이상 증가하지 않았다. 그러나 120 mM K⁺ 조건에서, Na⁺을 10 mM, 120 mM로 증가시키에 따라 활성은 각각 784±55, 554±9 nmol/min/mg protein으로 감소하였다. 이러한 결과는 마이크로솜 ATPase의 활성이 10 mM 이상의 K⁺에서 최대로 나타나며, 10 mM Na⁺에는 별다른 영향을 받지 않음을 보여준다. 그러나 120 mM Na⁺의 첨가는 K⁺에 의하여 증가한 ATPase 활성을 효과적으로 저해하였다. 본 결과는 K⁺에 의한 ATPase의 활성증가 효과가 Na⁺에 의해서 저해되는 것을 보여준다.

Na⁺은 식물의 생육 및 성장에 장애를 입히는 이온으로 알려져 있으며, 실제 토양수에 20~200 mM Na⁺이 함유되면 생장의 저해가 일어난다.³⁰ 따라서 식물세포 특히, 내염성

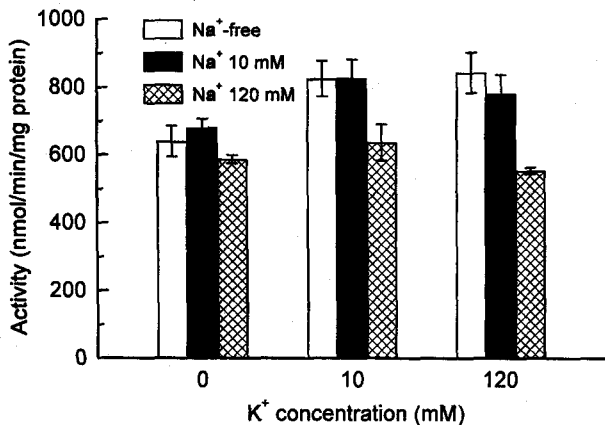


Fig. 4. Na⁺ inhibits the effect of K⁺ on the activity of microsomal ATPase.

The activity of microsomal ATPase was measured in various conditions containing 10 mM or 120 mM of K⁺ and Na⁺. For instance, the blank bars represent the activities measured in the absence of Na⁺ and in the presence of indicated K⁺ concentration. Values are means ± SD (n=5).

식물의 세포들은 능동적으로 Na⁺을 세포 밖으로 방출하거나, 세포내 저장소인 액포 등으로 저장하는 Na⁺/H⁺-antiporter의 높은 활성을 갖고 있다. 세포질내 Na⁺을 제거하기 위한 Na⁺/H⁺-antiporter의 활성에는 H⁺-ATPase 활성에 의해서 형성된 H⁺ 농도 기울기가 이용되며, 따라서 염분이 많은 환경에서 성장하여 염장해를 받은 식물은 원형질막과 액포막의 H⁺-ATPase의 활성이 염장해를 받지 않은 환경에서 자란 식물의 H⁺-ATPase 활성보다 증가함이 알려져 있다.¹¹ 한편, 내염성식물이 아닌 식물에서 분리된 마이크로솜 ATPase 활성이 반응용액에 첨가한 50 mM의 Na⁺에 의하여 별다른 저해효과를 보이지 않았다는 보고가 있으나,¹³ 콩 뿌리조직에서 분리된 마이크로솜 ATPase의 총활성은 Na⁺의 존재시에 현저하게 감소됨이 보고되었고,²⁰ 토마토의 경우에도 Na⁺은 K⁺에 의하여 증가되는 활성을 저해하였다(Fig. 4). 이러한 결과는 콩과 토마토의 마이크로솜 ATPase 활성에 Na⁺이 저해적 인자로서 작용할 수 있음을 보여준다.

K⁺에 의한 액포의 H⁺-ATPase 활성증가

이상의 결과에서 토마토 뿌리조직으로부터 분리한 마이크로솜 ATPase 총활성은 50% 이상이 H⁺-ATPase에 의해서 나타남을 확인하였고, 또한 K⁺에 의해서 마이크로솜 ATPase 총활성이 증가함을 관측하였다. 그러므로, 앞에서 보인 K⁺ 의존적 ATPase 활성과 마이크로솜 H⁺-ATPase 활성 사이의 관계를 조사하기 위하여 마이크로솜 ATPase 활성에 대한 K⁺의 효과를 측정하였다(Fig. 5). 먼저, K⁺이 없는 반응용액에서의 ATPase 활성은 840±2 nmol/min/mg protein으로 관측되었으나, 120 mM K⁺ 존재시에는 1,082±61 nmol/min/mg protein으로 앞에서와 같은 K⁺에 의한 증가를 보였다. 각각의 K⁺ 농도 조건에서 원형질막 H⁺-ATPase의 선택적 저해제인 vanadate를 처리하였을 때, 활성은 617±35 및 792±51 nmol/min/mg protein으로 두 경우 모두 각각의 대조실험에 의해서 얻어진 총활성에 비하여 약 27%가 저해되었다(Table 1). 한편, 액포막 H⁺-ATPase의 선택적 저

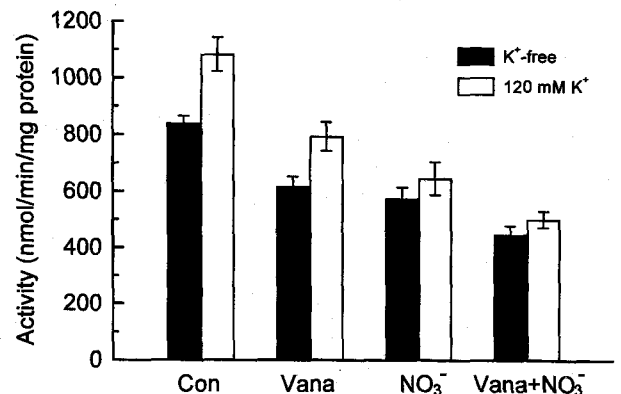


Fig. 5. K⁺-induced increase in microsomal ATPase activity was sensitive to nitrate (NO₃⁻).

The vanadate-resistant and NO₃⁻-resistant ATPase activities were measured in the absence of K⁺ or in the presence of 120 mM K⁺. The concentrations of vanadate (Vana) and NO₃⁻ were 1 mM and 50 mM, respectively. Values are means ± SD (n=5).

Table 1. Vanadate- and nitrate-induced inhibitions in microsomal ATP-ase activity under conditions of K⁺-free and 120 mM K⁺

	Inhibition (%)*	
	Vanadate	Nitrate
K ⁺ -free	27±4	32±5
K ⁺ -120 mM	27±4	40±5

*Inhibition (%): each inhibitor-sensitive activity was compared with the activity obtained in corresponding control condition shown in Fig. 5. Values are means±SD (n=5).

해제인 NO₃⁻의 처리시 K⁺이 없는 경우 활성은 574±40 nmol/min/mg protein으로 약 32%가 저해되었으나, 120 mM K⁺을 함유하는 반응용액에서 645±58 nmol/min/mg protein으로 약 40%의 저해효과를 보였다.

위의 결과에서 vanadate에 의한 마이크로솜 ATPase 활성 저해는 K⁺의 존재와 관계없이 일정한 수준인 27%로 나타났으며, 이것은 vanadate에 의해서 저해되지 않는 액포막 H⁺-ATPase 활성이 K⁺에 의하여 대조실험과 같은 비율로 증가하였음을 정성적으로 보여준다. 그러나, NO₃⁻ 존재시 저해되지 않은 마이크로솜 ATPase 활성은 K⁺이 없는 조건에서 574±40 nmol/min/mg protein, 120 mM K⁺ 조건에서 645±58 nmol/min/mg protein으로 나타나, K⁺ 존재시 약간 증가하였으나 신뢰구간 95%에서 유의차는 보이지 않았다 (Anova test: p=0.16, n=10). 이러한 결과는 vanadate 처리로 원형질막 H⁺-ATPase 활성을 저제한 후에도 K⁺의 촉진효과가 나타나나, NO₃⁻ 처리에 의한 액포막 H⁺-ATPase 활성 저해시에는 K⁺의 효과가 나타나지 않았음을 보여준다. 종합하면, NO₃⁻에 의해 저해되는 액포의 H⁺-ATPase 활성이 K⁺에 의해서 활성화됨을 시사한다.

Ca²⁺에 의한 액포의 H⁺-ATPase 활성저해

콩 뿌리조직에서 분리한 마이크로솜 ATPase와 마찬가지로 토마토 뿌리조직으로부터 분리한 마이크로솜 ATPase도 Ca²⁺에 의해서 저해되는 것을 확인하였다. 반응용액의 Ca²⁺ 농도가 증가할수록 총활성은 감소되는 경향을 보여(Fig. 6A), 1 nM Ca²⁺ 농도에서 활성은 1,082±49 nmol/min/mg protein으로 관측되었고, Ca²⁺ 농도 1 mM에서는 총활성이 712±20 nmol/min/mg protein으로 감소되었다. 이것은 토마토의 마이크로솜 ATPase 활성이 1 mM Ca²⁺ 수준에서 ~35% 저해됨을 보여준다.

한편, 반응용액에 vanadate를 첨가하였을 때 활성은 각 Ca²⁺ 농도에서 대조실험과 유사한 Ca²⁺ 의존성을 나타냈다 (Fig. 6A, ●). 그러나 NO₃⁻의 첨가시 vanadate 효과와는 다르게 ATPase 활성의 Ca²⁺ 의존성은 감소되었다(▲). 즉, NO₃⁻의 처리시 50 μM 이하의 Ca²⁺ 농도에서는 대조실험에서와 같은 Ca²⁺에 의한 완전한 활성감소는 관측되지 않았으며, 50 μM 이상의 Ca²⁺ 농도에서는 대조실험과 유사하게 활성이 감소하였다. Ca²⁺ 농도에 따른 총활성의 vanadate와 NO₃⁻에 의한 저해정도를 계산해 보면, NO₃⁻에 의한 총활성의 저해는 반응용액의 Ca²⁺ 농도가 1 nM, 1 μM, 250 μM, 1 mM

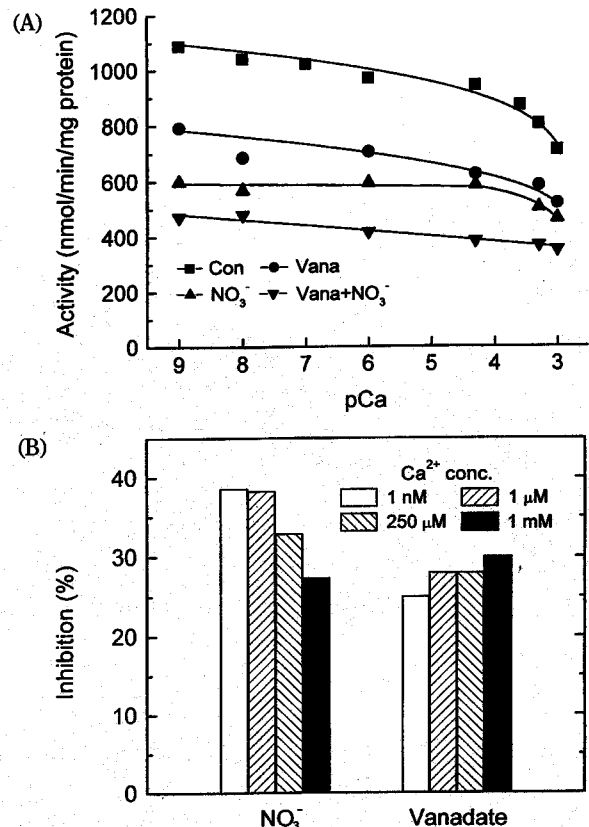


Fig. 6. Ca²⁺ inhibits the activity of NO₃⁻-sensitive vacuolar H⁺-ATPase.

(A) Microsomal ATPase activity was measured at various concentrations of Ca²⁺. The ATPase activity at 1 nM Ca²⁺ was 1082±49 nmol/min/mg protein in control condition. Similar experiments were done in the presence of vanadate and NO₃⁻. The concentrations of vanadate (Vana) and NO₃⁻ were 1 mM and 50 mM, respectively. (B) Inhibitions in ATPase activity by vanadate and NO₃⁻ at various concentrations of Ca²⁺. The data shown are representative of three sets of experiments.

로 증가함에 따라 39%, 38%, 33%, 27%로 각각 감소하는 경향을 나타냈으나, vanadate에 의해 저해되는 활성은 Ca²⁺ 농도증가에 따라 완만하게 증가하는 경향을 보였다(Fig. 6B). 이러한 결과는 Ca²⁺이 NO₃⁻에 의해서 저해되는 액포막의 H⁺-ATPase 활성을 저해함을 의미하며, Ca²⁺에 의한 저해효과와 vanadate에 의한 저해효과는 무관하다는 것을 보여준다.

Ca²⁺에 의한 H⁺-ATPase 활성의 저해효과는 이미 많은 보고가 있었다. Cho 등³⁹은 해바라기의 원형질막 H⁺-ATPase 활성이 0.5~1 mM Ca²⁺ 수준에서 약 50% 정도 저해되며, Ca²⁺의 농도가 낮을수록 활성이 증가함을 보고하였다. 또한 Cho 등²⁰은 콩 뿌리조직으로부터 분리한 마이크로솜 ATPase의 경우 총활성이 ~100 μM Ca²⁺에 의하여 50% 저해되는 결과를 보고하였다. 현재까지 H⁺-ATPase에 대한 Ca²⁺의 작용기작은 확실치 않으나, 세포질내 Ca²⁺ 농도의 증가가 내재성의 Ca²⁺ 의존성 단백질 인산화 효소를 활성화시켜, H⁺-ATPase의 단백질 인산화부위의 인산화를 유도하며, 결과적으로 H⁺-ATPase의 삼차원적 구조변화에 따른 불활성

화를 일으킨다는 기작이 제안되었다.^{5,36)}

결론적으로 토마토의 액포막 H⁺-ATPase는 원형질막의 H⁺-ATPase 보다 K⁺과 Ca²⁺에 민감한 영향을 받는 것으로 보인다(Fig. 5 & 6). 토마토에서는 총활성의 50% 이상이 H⁺-ATPase에 의해 나타나며, 총활성의 K⁺과 Ca²⁺에 의한 영향을 조사하면, vanadate-sensitive H⁺-ATPase는 K⁺과 Ca²⁺의 농도가 증가해도 활성이 일정하게 유지되는 반면, NO₃⁻-sensitive H⁺-ATPase의 활성은 K⁺ 농도가 증가할수록 활성은 커지는 것을 관측하였고, Ca²⁺의 농도가 증가할수록 활성이 감소하는 결과를 얻었다. 이러한 결과는 토마토 뿌리조직에서 액포의 H⁺-ATPase가 K⁺과 Ca²⁺ 농도변화에 따라 세포의 활성을 조절할 수 있음을 보여준다.

본 실험에 사용된 토마토의 마이크로솜 분획에는 그간의 예비실험의 결과를 고려할 때, 주된 활성을 보이는 원형질막과 액포막의 H⁺-ATPase에 더하여 Ca²⁺ 이동 및 H⁺ 이동과 관련된 secondary transporter들 및 여러 가지 이온 채널들이 존재할 것으로 예측된다. 토마토 뿌리조직의 생리작용을 이해하기 위해서는 이들 각 성분의 활성연구가 선행되어야 할 것이며, 나아가 시설원예에서 다발하고 있는 염류장애의 원인과 대책수립을 위해서는 이온이동과 관련된 위의 여러 효소들의 활성을 종합적으로 평가하고, 염류존재시 이들의 활성변화를 측정하여 생리적 변화를 이해하여야 할 것이다.

감사의 글

본 논문은 한국과학재단지원 첨단원예기술개발센터 연구비 지원에 의한 것임(과제번호: 96-15-09-99-A-3).

참고문헌

- Michelet, B. and M. Boutry (1995) The plasma membrane H⁺-ATPase: a highly regulated enzyme with multiple physiological functions. *Plant Physiol.* **108**, 1-6.
- Nelson, N. and L. Taiz (1989) The evolution of H⁺-ATPases. *Trends Biochem. Sci.* **14**, 113-116.
- Maeshima, M., T. Mimura, and T. Sato (1994) Distribution of vacuolar H⁺-pyrophosphatase and a membrane integral protein in a variety of green plants. *Plant Cell Physiol.* **35**, 323-328.
- Sze, H. (1985) H⁺-translocating ATPases: advances using membrane vesicles. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **36**, 175-208.
- Serrano, R. (1989) Structure and function of plasma membrane ATPase. *Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.* **40**, 61-94.
- Hwang, I., D. M. Ratterman, and H. Sze (1997) Distinction between endoplasmic reticulum-type and plasma membrane-type Ca²⁺ pumps. *Plant Physiol.* **113**, 535-548.
- Dainese, P., P. James, B. Baldan, and E. Carafoli (1997) Subcellular and tissue distribution, partial purification, and sequencing of calmodulin-stimulated Ca²⁺-transporting ATPases from barley (*Hordeum vulgare* L.) and tobacco (*Nicotiana tabacum*). *Eur. J. Biochem.* **244**, 31-38.
- McClure, P. R., L. V. Kochian, R. M. Spanswick, and J. E. Shaff (1990a) Evidence for cotransport of nitrate and protons in maize roots: I. effects of nitrate on the membrane potential. *Plant Physiol.* **93**, 281-289.
- McClure, P. R., L. V. Kochian, R. M. Spanswick, and J. E. Shaff (1990b) Evidence for cotransport of nitrate and protons in maize roots: II. measurement of NO₃⁻ and H⁺ fluxes with ion-selective microelectrodes. *Plant Physiol.* **93**, 290-294.
- Braun, Y., M. Hiriarn, H. R. Lerner, and L. Reinhold (1988) Evidence for a Na⁺/H⁺ antiporter in membrane vesicles isolated from roots of the halophyte *Atriplex nummularia* L. *Plant Physiol.* **87**, 104-108.
- Reuveni, M., A. B. Bennett, R. A. Bressan, and P. M. Hasegawa (1990) Enhanced H⁺ transport capacity and ATP hydrolysis activity of the tonoplast H⁺-ATPase after NaCl adaptation. *Plant Physiol.* **94**, 524-530.
- Spickett, C. M., N. Smirnov, and R. G. Ratcliffe (1993) An in vivo nuclear magnetic resonance investigation of ion transport in maize (*Zea mays*) and spartina anglica roots during exposure to high salt concentrations. *Plant Physiol.* **102**, 629-638.
- Garbarino, J. and F. M. Dupont (1988) NaCl induces a Na⁺/H⁺ antiport in tonoplast vesicles from barley roots. *Plant Physiol.* **86**, 0231-0236.
- Tsiantis, M. S., D. M. Bartholomew, and J. A. Smith (1996) Salt regulation of transcript levels for the c subunit of a leaf vacuolar H⁺-ATPase in the halophyte *Mesembryanthemum crystallinum*. *Plant J.* **9**, 729-736.
- Pantoja, O., A. Gelli, and E. Blumwald (1992) Voltage-dependent calcium channels in plant vacuole. *Science* **255**, 1567-1570.
- Gelli, A. and E. Blumwald (1993) Calcium retrieval from vacuolar pools: characterization of a vacuolar calcium channel. *Plant Physiol.* **102**, 1139-1146.
- Allen, G. J., S. R. Muir, and D. Sanders (1995) Release of Ca²⁺ from individual plant vacuoles by both InsP₃ and cyclic ADP-ribose. *Science* **268**, 735-737.
- Rodriguez, H. G., J. K. M. Roberts, W. R. Jordan, and M. C. Drew (1997) Growth, water relations, and accumulation of organic and inorganic solutes in roots of maize seedling during salt stress. *Plant Physiol.* **113**, 881-893.
- Park, S. K., K. Y. Kim, and E. H. Lee (1990) Technology in hydroponic culture, p. 55-56, Rural Development Administration.
- Cho, K. H., K. S. Cho, E. H. Lee, and Y. K. Kim (1997) Ca²⁺-induced inhibition of microsomal ATPases in soybean roots. *Agricultural Chemistry and Biotechnology* **40**, 202-208.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. Randall (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
- Niggli, V., J. T. Penniston, and E. Carafoli (1979) Purification of the (Ca²⁺-Mg²⁺)-ATPase from human erythrocyte membranes using a calmodulin affinity column. *J. Biol. Chem.* **254**, 9955-9958.
- Kim, Y. K. (1995) Method for the measurement of ion pump (Ca²⁺-ATPase), *Agrobiotech*, **2**(2), 44-45.
- Fabiato, A. (1988) Computer programs for calculating total

- from specified free from specified total ionic concentrations in aqueous solutions containing multiple and ligands. *Methods Enzymol.* **175**, 378-471.
25. Palmgren, M. G., P. Askerlund, K. Fredrikson, S. Widell, M. Sommarin, and C. Larsson (1990) Sealed inside-out and right-side-out plasma membrane vesicles. *Plant Physiol.* **92**, 871-880.
 26. Bennett, A. B., S. D. O'Neill, and R. M. Spanswick (1984) H⁺-ATPase activity from storage tissue of *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.* **74**, 538-544.
 27. O'Neill, S. D. and R. M. Spanswick (1984) Effect of vanadate on the plasma membrane ATPase of red beet and corn. *Plant Physiol.* **75**, 586-591.
 28. Ward, J. M. and H. Sze (1992) Subunit composition and organization of the vacuolar H⁺-ATPase from oat roots. *Plant Physiol.* **99**, 170-179.
 29. Cho, K. H. (1997) Characterization of microsomal ATPases prepared from soybean roots and tomato roots. M. S. Thesis. Chungbuk National University.
 30. Schroeder, J. L., J. M. Ward, and W. Gassmann (1994) Perspectives on the physiology and structure of inward-rectifying K⁺ channels in higher plants: biophysical implications for K⁺ uptake. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **23**, 441-471.
 31. Sze, H. (1982) Characterization of nigericin-stimulated ATPase from sealed microsomal vesicles of tobacco callus. *Plant Physiol.* **70**, 498-505.
 32. Gallagher, S. R. and R. Leonard (1982) Effect of vanadate, molybdate, and azide on membrane-associated ATPase and soluble phosphatase activities of corn roots. *Plant Physiol.* **70**, 1335-1340.
 33. Briskin, D. P., R. T. Leonard, and T. K. Hodges (1987) Isolation of the plasma membrane: membrane markers and general principles. *Methods Enzymol.* **148**, 542-558.
 34. Gonzalez de la Vara, L. E. and G. Medina (1990) Phosphorylation by inorganic phosphate of the plasma membrane H⁺-ATPase from red beet (*Beta vulgaris* L.). *Plant Physiol.* **94**, 1522-1527.
 35. Cho, H. T. and Y. N. Hong (1994) Characterization of plasma membrane H⁺-ATPase from sunflower hypocotyls. *Korean Biochem. J.* **27**, 290-296.
 36. Roberts, D. M. (1992) Calcium-modulated proteins: targets of intracellular calcium signals in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **43**, 375-414.

Characterization of Microsomal ATPases Prepared from Tomato Roots

Kwang-Hyun Cho, Jung Sakong and Young-Kee Kim* (Department of Agricultural Chemistry, Chungbuk National University, Cheongju, Chungbuk, 361-763, Korea)

Abstract : Microsomes of tomato roots were prepared and the activities of microsomal ATPases were measured in order to understand the molecular mechanisms of various ion transports. The activities of plasma membrane H⁺-ATPase and vacuolar H⁺-ATPase were evaluated to ~30% and ~38% of total microsomal ATPase activity by using their specific inhibitors, vanadate and nitrate (NO₃⁻), respectively. The inhibitory effects of vanadate and NO₃⁻ were additive and the simultaneous additions of these two inhibitors decreased the total activity up to 50~70%. The microsomal ATPase activity was regulated by pH and the maximal activity was obtained at pH 7.4. The activity of microsomal ATPase was increased by K⁺ up to ~30% at the concentration of K⁺ above 10 mM. However, the K⁺-induced increase in the activity was completely inhibited by the simultaneous addition of Na⁺. To identify the ATPase activity regulated by K⁺, the effects of specific inhibitors were measured. Vanadate and NO₃⁻ inhibited total ATPase activity by 27% and 32% in the absence of K⁺ and by 27% and 40% in the presence of 120 mM K⁺, respectively. These results suggest that K⁺ increases the activity of NO₃⁻-sensitive vacuolar H⁺-ATPase but not that of vanadate-sensitive plasma membrane H⁺-ATPase since vanadate has no effect on K⁺-induced increase in ATPase activity. The microsomal ATPase activity was also decreased by increasing Ca²⁺ concentration. Interestingly, NO₃⁻ blocked the Ca²⁺-induced inhibition of microsomal ATPase activity; however, vanadate had no effect. These results imply that vacuolar H⁺-ATPase is activated by K⁺ and inhibited by Ca²⁺.

Key words : H⁺-ATPase, Tomato roots, Ca²⁺ effect, Vanadate, Nitrate.

*Corresponding author