

아미노산의 능동 수송계에 미치는 NH_4^+ 이온의 영향

조봉희

수원대학교 자연과학대학 생명과학부

Effect of NH_4^+ Ion on the Transport System of Amino Acids

CHO, Bong Heuy

Division of Life Science, the University of Suwon, Suwon, 445-743, Korea

ABSTRACT Glucose - induced arginine transport system was induced by a exogenous application of NH_4^+ ion. The uptake rate of arginine (Arg) depended on the external NH_4^+ ion concentration. The uptake rate was inhibited by the presence of NH_4^+ ion within 1 min, whereas it increased maximally after 30 min. Glucose and NH_4^+ ion induced the same arginine transport system. K_m value of Arg transport systems was $2 \mu\text{M}$, and V_{max} was $60 \mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{h} \cdot \text{g fresh weight}^{-1}$ for NH_4^+ ion and $174 \mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{h} \cdot \text{g fresh weight}^{-1}$ for glucose induced transport system. But, the transport system of Glu for glucose and NH_4^+ ion induced had different K_m values. K_m value of Glu was $285 \mu\text{M}$ for glucose - and $58 \mu\text{M}$ for NH_4^+ ion induced transport system. Thus, NH_4^+ ions play a important role as inducer for the glutamine transport system. NH_4^+ ion induced glutamine system was inhibited over 90% by cycloheximide. We concluded that a new carrier protein for glutamine was induced by NH_4^+ ion.

Key words: Arginine, glutamine, transport system, ammonium ion

서 론

녹조류 (*Chlorella*)는 세포내에 하나의 커다란 엽록체를 지니고, 광합성 작용으로 필요한 양분을 공급하는 독립영양 생물로서 환경변화에 잘 적응하고, 쉽게 배양할 수 있는 잇점 때문에 실험 재료로 사용되고 있다 (Cho et al. 1981).

녹조류는 선천적으로 당류 (Tanner and Kandler 1967)와 아미노산 능동 수송계를 지니는 (Cho and Komor 1985) 외에 포도당으로 유도될 수 있는 당류 능동 수송계 (Tanner and Kandler 1967)와 아미노산 능동 수송계 (Cho et al. 1981)를 지니고 있다. 포도당으로 유도될 수 있는 아미노산 능동 수송계는 환경의 변화에 따라 specific proline 능동 수송계, arginine 능동 수송계 (Cho and Komor 1984)와 중성 아미노산 능동 수송계를 유도시킨다 (Cho et al. 1981 ; Cho and Komor 1983).

이들 능동 수송계 중에는 포도당인 탄소원과 질소원이 동시에 존재해야 수송계가 최대로 유도된다는 사실이 확인되었으나 (Cho 1984), 질소원인 NH_4^+ 이온이 물질 수송계를 유도시키는 유도자 (inducer)로 작용한다는 연구보고는 아직 없었다. 따라서 본 연구는 탄소원인 포도당과 마찬가지로 질소원이 아미노산 능동 수송계에서 유도자의 역할을 하는 지를 밝혀보고자 한다.

재료 및 연구방법

세포배양

*Chlorella vulgaris*는 39.6 mM potassium nitrate, 7.4 mM potassium dihydrogen phosphate, 5.4 mM potassium chloride, 0.74 mM ferric chloride, 0.1% EDTA, CO_2 gas 공급과 0.1% Hoagland's trace element로 구성된 배지에서 5일간 배양하였다.

*Corresponding author. Tel 0331-220-2482

E-mail bhecho@mail.suwon.ac.kr

능동 수송계의 유도

5일 배양된 세포는 4,000 g에서 15분간 원심분리시킨 후 세포 밀도를 25 μL packed cell volume (PC)/mL로 맞춘 후 25 mM sodium phosphate buffer (pH 6.0)에 25 mM 포도당을 첨가하여 3시간 동안 (27°C) 배양하여 능동 수송계를 유도시켰다. 능동 수송계가 완전히 유도된 후 앞에서와 같은 완충액으로 남아 있는 포도당을 제거시켰다.

아미노산 능동 수송계의 측정

NH_4^+ 이온의 존재 하에서 수송 속도가 증가되는 아미노산을 선택하여 NH_4^+ 이온이 아미노산 수송계의 유도자로 작용하는 지를 분석하기 위해, Arg 능동 수송계로 (Cho and Komor 1984) Arg과 중성 아미노산 능동 수송계로 (Cho and Komor 1983) Glu를 선택하였다.

아미노산의 능동 수송은 세포에 ^{14}C -로 표지한 아미노산에 농도별로 표지하지 않은 아미노산을 혼합하여 세포에 첨가시켜 수송 속도를 측정하였다. 시료를 10초 간격으로 0.5 mL씩 꺼낸 후 0.8 μm pore size로 여과시킨 후 차거운 동량의 아미노산으로 여과시켰다. 여과지와 세포는 즉시 세포내로 수송된 물질의 농도를 측정하는 데 사용되었다.

포도당으로 유도된 세포는 포도당, NH_4^+ 이온 또는 포도당과 NH_4^+ 이온을 동시에 첨가하여 아미노산 능동 수송계를 유도하였다. 단백질 합성 억제 물질인 cycloheximide는 아미노산 능동 수송계를 유도시키기 20분 전에 전 처리하여 단백질 유도를 억제하였다.

아미노산 능동 수송계의 kinetic의 측정

아미노산의 능동 수송계의 수송 속도를 앞에서와 같은 방법으로 측정된 후 얻어진 결과를 Lineweaver-Burk plot로 나타내어 아미노산의 K_m 값과 V_{max} 값을 구하였다.

결과 및 고찰

아미노산 수송계에 대한 NH_4^+ 이온의 영향

녹조류는 여러 개의 아미노산 능동 수송계를 지니고 있으나 (Cho and Komor 1985), 선천적인 능동 수송계를 통해서 수송되는 물질의 양은 매우 적다 (Cho and Komor 1985). 그러나 녹조류는 주위 환경의 변화에 따라서 아미노산 수송계를 유도시켜 아미노산을 급속도로 세포내로 수송하고, 고농도로 축적시키는 능력을 지니고 있다 (Cho and Komor 1984; Cho and Komor 1985). 그 중에 Arg 능동 수송계는 포도당을

처리하였을 때는 수송 속도가 $84.1 \mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{h} \cdot \text{g fresh weight}^{-1}$ 였으나 NH_4^+ 이온에 처리로 수송 속도가 $156.6 \mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{h} \cdot \text{g fresh weight}^{-1}$ 로 증가되었다 (Table 1). Arg의 수송 속도는 NH_4^+ 이온 처리로 포도당 처리 때와 비교해서 1.9배 정도 더 증가되었으나, 중성 아미노산 능동 수송계는 NH_4^+ 이온에 의하여 몇 개의 아미노산만이 유도되었다 (Table 1). 이 결과는 포도당에 의하여 유도된 중성 아미노산 능동 수송계의 속하는 모든 아미노산들이 (Cho et al 1981) NH_4^+ 이온 처리로 수송 속도가 증가되는 것이 아니므로 Arg 수송계와는 다름을 보여 주는 것이다.

Arg 능동 수송계는 외부배지에 존재하는 NH_4^+ 이온의 농도에 따라서 Arg의 수송 속도가 좌우되고 (Table 2), 10 mM NH_4^+ 이온에 존재 하에서 최대의 수송 속도를 나타내었다. 이 결과는 포도당만으로는 Arg의 능동 수송계가 최대로 유도

Table 1. Effect of glucose and ammonium ion on the transport systems of amino acids. The uptake rate was determined by uptake kinetics of 50 μM amino acids at a cell density of 10~20 μL packed cells per mL. The glucose (25 mM) and NH_4^+ ion (1 mM) were preincubated 3 hrs before beginning of uptake.

| Amino Acids | Uptake rate ($\mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{h} \cdot \text{g fresh weight}^{-1}$) | | |
|---------------|--|--------------------|--------------------------------------|
| | - glucose | glucose pretreated | glucose + NH_4^+ pretreated |
| Alanine | 0.5 | 14.9 | 28.6 |
| Glycine | 0.7 | 19.6 | 31.1 |
| Serine | 0.7 | 4.2 | 10.4 |
| Arginine | 0.8 | 84.1 | 156.6 |
| Lysine | 1.2 | 24.2 | 54.2 |
| Glutamine | 0.7 | 3.7 | 12.7 |
| Histidine | 0.1 | 1.6 | 2.7 |
| Threonine | 0.3 | 1.9 | 0.9 |
| Methionine | 0.1 | 4.6 | 12.9 |
| Aspartate | 0.4 | 1.7 | 1.1 |
| Phenylalanine | 0.2 | 1.9 | 1.8 |
| Leucine | 0.1 | 0.2 | 2.6 |
| Isoleucine | 0.2 | 0.1 | 1.3 |
| Valine | 0.2 | 0.2 | 2.5 |
| Glutamate | 0.4 | 0.2 | 1.2 |
| Tyrosine | 0.2 | 1.2 | 3.0 |
| Cysteine | 0.5 | 0.1 | 0.1 |

Table 2. Effect of glucose and ammonium ion on the transport system of arginine. The uptake rate was determined by uptake kinetics of 50 μM amino acids at a cell density of 10 μL packed cells per mL. Alga were preincubated 3 hrs for glucose and 1 hr for NH_4^+ ion before beginning of uptake.

| Condition | Uptake rate ($\mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{h} \cdot \text{g fresh weight}^{-1}$) |
|---------------------------------|--|
| Native Alge | 0.8 |
| Glucose induced | 84.1 |
| + 0.1 mM NH_4Cl | 116.0 |
| + 1 mM NH_4Cl | 149.0 |
| + 3 mM NH_4Cl | 160.0 |
| + 10 mM NH_4Cl | 207.0 |
| + 15 mM NH_4Cl | 206.9 |

되지 못하고, Arg의 능동 수송계가 최대로 유도되기 위해서는 질소원이 필요한 것이다.

NH₄⁺ 이온은 그 자체가 uncoupler의 역할을 하여 생체 내에서 전자 전달계의 방해 또는 에너지 대사를 방해하여 물질의 수송을 방해하는 것으로 잘 알려져 있다. 그 결과로 지금까지 NH₄⁺ 이온을 물질의 유도자로 사용하지 않았다. 이론과는 달리 녹조류에 NH₄⁺ 이온을 처리하면, Arg 수송 속도가 처리 후 1분 이내에 억제되었고, NH₄⁺ 이온 처리 후 30분이 경과하면 Arg의 수송 속도가 최대로 증가되었다 (Table 3). 이 결과는 NH₄⁺ 이온은 일시적으로 능동 수송계를 억제하였으나 일정한 시간 안에 Arg 능동 수송계의 유도자로 작용하였다.

NH₄⁺ 이온으로 유도된 능동 수송계

NH₄⁺ 이온으로 유도된 능동 수송계와 포도당으로 유도된 능동 수송계가 같은 운반자를 지니고 있는지, 아니면 NH₄⁺ 이온은 다른 운반자를 유도시키는지를 알아 본 결과, 포도당

Table 3. Effect of duration of ammonium treatment on the arginine transport system. The uptake rate was determined by uptake kinetics of 50 μM amino acids at a cell density of 10 μL packed cells per mL. Alga were preincubated 3 hrs for glucose before beginning of uptake. The concentration of NH₄Cl applied was 10 mM.

| Condition | Uptake rate (μmol ⁻¹ · h · g fresh weight ⁻¹) |
|-----------------------------|--|
| Glucose induced | 84.1 |
| + 1 min NH ₄ Cl | 21.3 |
| + 5 min NH ₄ Cl | 109.4 |
| + 10 min NH ₄ Cl | 153.2 |
| + 20 min NH ₄ Cl | 194.1 |
| + 30 min NH ₄ Cl | 207.0 |
| + 60 min NH ₄ Cl | 207.2 |

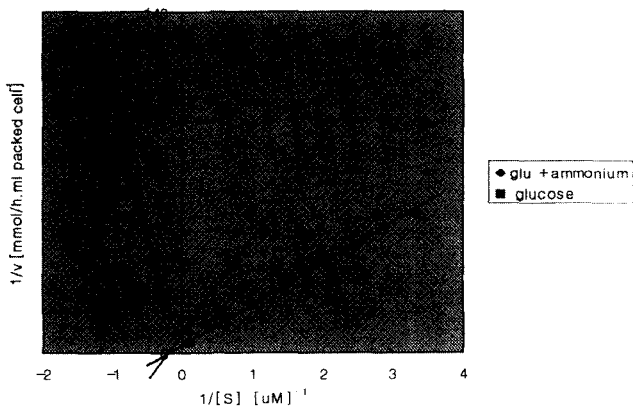


Figure 1. Kinetics of glucose only and NH₄⁺ ion induced transport system of arginine. The uptake rate was determined by uptake kinetics in the range of 10 μM 50 μM amino acids at a cell density of 5 μL packed cells per mL. Alga were pretreated 3 hrs for glucose and 1 hr for NH₄⁺ ion beginning of uptake.

과 NH₄⁺ 이온으로 유도된 Arg 능동 수송계는 같은 K_m 값인 2 μM을 보여 주는 것으로 보아 포도당과 NH₄⁺ 이온은 같은 운반자를 유도함을 알 수 있었다 (Figure 1). V_{max} 는 NH₄⁺ 으로 유도된 능동 수송계는 60 μmol⁻¹ · h · g fresh weight⁻¹ 이고, 포도당으로 유도된 능동 수송계는 174 μmol⁻¹ · h · g fresh weight⁻¹이다. 그러므로 포도당과 NH₄⁺ 이온이 동시에 유도자로 존재할 때에 Arg 능동 수송계는 최대의 속도를 유지한다고 볼 수 있다. 이 결과는 NH₄⁺ 이온이 유도자로 작용하는 지금까지 한번도 언급한 바 없는 결과로 본다.

Glu 수송계의 경우는 Arg과는 조금 다른 양상을 보였다. 선천적인 Glu 능동 수송계의 K_m 은 31 μM, 포도당만으로 유도된 Glu 능동 수송계의 K_m 은 285 μM이었다 (Figure 2). 선천적인 Glu 능동 수송계의 V_{max} 는 21.9 nmol⁻¹ · h · g fresh weight⁻¹ 이고, 포도당으로 유도된 Glu 능동 수송계의 V_{max} 는

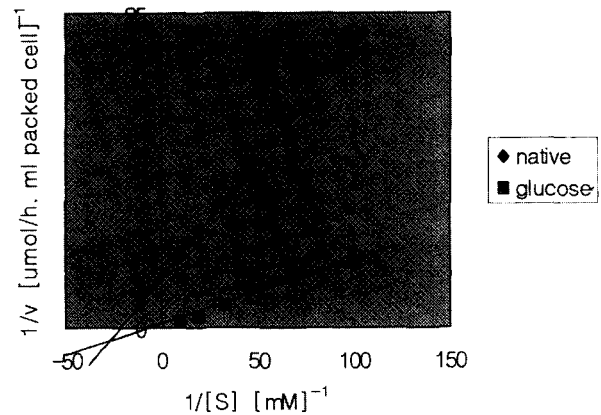


Figure 2. Kinetics of glucose only and NH₄⁺ ion induced transport system of glutamine. The uptake rate was determined by uptake kinetics in the range of 0.01 mM 0.1 mM amino acids at a cell density of 10 μL packed cells per mL. Alga were pretreated 3 hr for glucose and 1 hr for NH₄⁺ ion beginning of uptake.

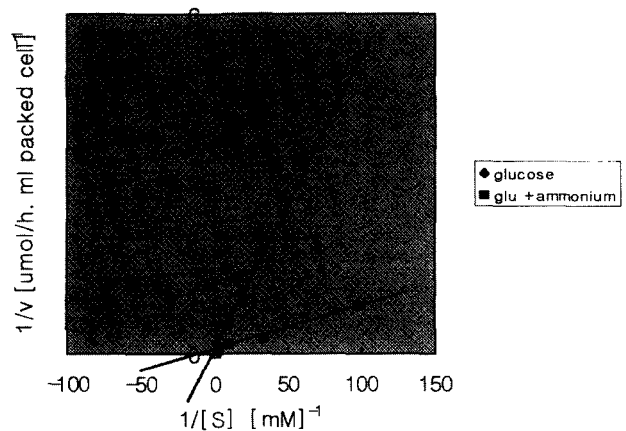


Figure 3. Kinetics of glucose only and NH₄⁺ ion induced transport system of glutamine. The uptake rate was determined by uptake kinetics in the range of 0.01 mM 1 mM amino acids at a cell density of 10 μL packed cells per mL. Alga were pretreated 3 hr for glucose and 1 hr for NH₄⁺ ion beginning of uptake.

Table 4. Effect of cycloheximide on the ammonium- induced arginine transport system. The uptake rate was determined by uptake kinetic of 50 μM amino acids at a cell density of 10 μL packed cells per mL. Cycloheximide was pretreated 20 min before beginning of the induction. Alga were preincubated 3 hrs for glucose and 1 hr for NH_4^+ ion beginning of uptake.

| Condition | Uptake rate ($\mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{h} \cdot \text{g fresh weight}^{-1}$) |
|---|--|
| Glucose induced | 84.1 |
| + 10 mM NH_4Cl | 207.0 |
| + 10 mM NH_4Cl + 15 μM cycloheximide | 158.0 |

Table 5. Effect of cycloheximide on the ammonium induced glutamine transport system. The uptake rate was determined by uptake kinetics of 50 μM amino acids at a cell density of 10 μL packed cells per mL. Cycloheximide was pretreated 20 min before beginning of induction. Alga were preincubated 3 hrs for glucose and 1 hr for NH_4^+ ion beginning of uptake.

| Condition | Uptake rate ($\mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{h} \cdot \text{g freshweight}^{-1}$) |
|---|---|
| Native alge | 0.7 |
| Glucose induced | 3.9 |
| + 10 mM NH_4Cl | 37.8 |
| + 10 mM NH_4Cl + 15 μM cycloheximide | 7.3 |

$2.3 \mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{h} \cdot \text{g fresh weight}^{-1}$ 이다 그러나 NH_4^+ 이온으로 유도된 Glu 능동 수송계의 K_m 은 $58 \mu\text{M}$ 이고, V_{max} 는 $12 \mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{h} \cdot \text{g fresh weight}^{-1}$ 이다 (Figure 3). 이처럼 Glu의 K_m 값이 NH_4^+ 이온으로 유도된 능동 수송계와 포도당으로 유도된 능동 수송계와는 (Cho et al. 1981) 전혀 다르므로 두 종류의 유도자에 의하여 Glu 능동 수송계는 다른 운반자가 유도되었다고 볼 수 있고, Arg 능동 수송계의 결과와는 다를 것을 보여 주고 있다.

NH_4^+ 이온으로 유도된 능동 수송계의 단백질 합성 억제 물질의 영향

NH_4^+ 이온으로 유도된 Arg 능동 수송계는 단백질 합성 억제 물질인 cycloheximide에 의하여 40%가 억제되었다 (Table 4). NH_4^+ 이온으로 유도된 Glu 능동 수송계는 포도당만으로 유도된 능동 수송계에 비해 9.7 배가 더 유도되었으며, Arg 능동 수송계와는 달리 포도당보다는 NH_4^+ 이온에 의해 더 유도되었다 (Table 5). NH_4^+ 이온으로 유도된 Glu 능동 수송계는 cycloheximide에 의해서 90% 이상이 억제되었다. 이 결과는 Glu 능동 수송계는 Arg 능동 수송계와는 달리 NH_4^+ 이온에 의하여 다른 운반자가 유도됨을 보여 주고 있다.

적 요

포도당으로 유도된 Arg 능동 수송계는 NH_4^+ 이온에 의해서도 유도되었으며, Arg 수송 속도는 NH_4^+ 이온 농도에 의존되었다. Arg 수송 속도는 NH_4^+ 이온 처리 후 1분 이내에 억제되었으나, 30분 후에는 수송 속도가 증가되어 Arg 수송 속도는 최대치를 보였다. 포도당으로 그리고 NH_4^+ 이온으로 유도된 Arg 능동 수송계는 같은 K_m 값인 $2 \mu\text{M}$ 을 보여서 같은 운반자가 유도됨을 알 수 있었다. V_{max} 는 NH_4^+ 이온으로 유도된 Arg 능동 수송계는 $60 \mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{h} \cdot \text{g fresh weight}^{-1}$ 이었고, 포도당으로 유도된 Arg 능동 수송계는 $174 \mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{h} \cdot \text{g fresh weight}^{-1}$ 이었다. 그러나 Glu 능동 수송계는 포도당으로 그리고 NH_4^+ 이온에 의하여 다른 운반자가 유도됨을 알 수 있었다. 포도당으로 유도된 Glu 능동 수송계의 K_m 값은 $284 \mu\text{M}$ 이고 NH_4^+ 이온으로 유도된 Glu 능동 수송계의 K_m 값은 $58 \mu\text{M}$ 로 다른 운반자가 유도되었다. Glu 능동 수송계에서는 포도당 그리고 NH_4^+ 이온이 다른 유도자로 작용하였다. NH_4^+ 이온으로 유도된 Glu 능동 수송계는 cycloheximide에 의하여 90% 이상이 억제되었다.

인용문헌

- Tanner W, Kandler O (1967) Die Abhangigkeit der Adaptation der Glucoseaufnahme von der oxidativen und der photosynthetischen Phosphorylierung bei *Chlorella vulgaris*. Z Pflanzenphysiol **58**: 24-32
- Cho BH (1984) Charakterisierung der Transportsysteme fuer Aminosaeure, Zucker und organische Saeren von *Chlorella vulgaris*, *Ricinus communis* Keimblatt und suspensionszellen. Dissertation
- Cho BH, Komor E (1983) Mechanism of proline uptake by *Chlorella vulgaris*. Biochem Biophys Acta **735**: 361-366
- Cho BH, Komor E (1984) Mechanism of arginine transport in *Chlorella*. Planta **162**: 23-29
- Cho BH, Komor E (1985) The amino acid transport systems of the autotrophically grown alga *Chlorella*. Biochem Biophys Acta **821**: 384-392
- Cho BH, Saure N, Komor E, Tanner T (1981) Glucose induces two amino acid transport system in *Chlorella*. Proc Natl Acad Sci USA **78**: 3591-3594