

## 음이온에 의한 토마토 뿌리조직 마이크로솜 H<sup>+</sup>-ATPase 활성 저해

신대섭 · 김영기\*

충북대학교 농과대학 농화학과

(2001년 2월 19일 접수, 2001년 3월 20일 수리)

식물 뿌리세포의 원형질막 및 액포막에 위치하는 H<sup>+</sup>-ATPase들은 세포의 여러 가지 생리활성에 중요한 역할을 수행한다. H<sup>+</sup>-ATPase의 생리활성 특성을 조사하기 위하여 토마토 뿌리조직으로부터 마이크로솜을 분리하고, H<sup>+</sup>-ATPase 활성에 미치는 음이온의 효과를 조사하였다. 다양한 종류의 음이온들이 H<sup>+</sup>-ATPase의 활성을 저해함을 확인하였으며, 이들 중 특히 효소의 저해정도가 다른 citrate와 인산을 선택하여 작용특성을 조사하였다. Citrate에 의한 ATPase 활성저해는 3 mM 이상에서 나타났고, 20 mM citrate는 활성을 50-60% 저해하였다. 그러나, citrate의 저해효과는 Mg<sup>2+</sup>의 농도를 증가시킬수록 감소하여, citrate에 의해 저해된 ATPase 활성은 Mg<sup>2+</sup>에 의해 회복되는 것으로 나타났다. 즉, 7 mM Mg<sup>2+</sup>을 첨가하였을 때, citrate에 의한 활성저해는 관측되지 않았고 ATPase 활성은 대조활성과 비슷한 수준으로 회복되었다. 이러한 결과로부터 citrate는 Mg<sup>2+</sup>을 chelation함으로써 H<sup>+</sup>-ATPase의 활성을 저해함을 확인하였다. 한편, 인산에 의한 ATPase 활성저해는 3 mM 이상의 농도에서 나타났고, 30 mM 인산은 ATPase의 활성을 50% 저해하였다. 인산에 의해서 저해된 ATPase의 활성은 Mg<sup>2+</sup>의 농도증가에 의해 회복되지 않아, 인산에 의한 저해효과는 Mg<sup>2+</sup>과 무관하였다.

**Key words :** 음이온, citrate, 인산, H<sup>+</sup>-ATPase, 토마토뿌리

### 서 론

식물은 생육기간 중 여러 가지 환경요인과 접하며, 세포의 생리활성 조절을 통하여 환경변화에 적응한다. 식물세포의 원형질막과 액포막에 분포하고 있는 ion transporter들은 세포의 생리활성 조절에 중요한 역할을 수행하는 막효소로서 이온의 이동, 양분의 흡수, 세포질의 삼투압 조절, 막전위 유지 등 다양하고 필수적인 기능을 수행한다. 생체막에는 능동적으로 이온을 이동시키는 여러 종류의 ATPase들과 확산에 의한 수동적 이온이동을 매개하는 carrier 및 이온 channel 등이 있으며, 세포는 이들의 상호 연관된 활성조절을 통하여 세포질을 생리적으로 적정상태가 되도록 유지한다. 대부분의 식물체에서는 원형질막과 액포막에 존재하는 H<sup>+</sup>-ATPase가 세포의 활성유지에 중심적인 역할을 수행함이 잘 알려져 있다.<sup>1)</sup> H<sup>+</sup>-ATPase는 원형질막이나 액포막을 경계로 수소이온 이동을 유발하여 pH 기울기를 형성하며, 이러한 수소이온의 농도 기울기는 secondary transporter들의 작용에 필요한 에너지원으로 이용된다. 따라서, H<sup>+</sup>-ATPase의 활성은 각종 양이온이나 음이온 및 당, 아미노산 등 용질이동의 원동력을 제공하여, Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter, H<sup>+</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup> symporter, H<sup>+</sup>/sucrose symporter 등의 활성과 연관이 있음이 알려져 있다.<sup>2,3)</sup>

세포질에는 유기산을 포함한 다양한 종류의 음이온들이 존재하며, 이러한 음이온의 세포내 이동은 H<sup>+</sup>-ATPase의 활성과 연관되어 있음이 밝혀졌다. 식물체에서 citrate는 TCA 대사경로의 중간물질로서 세포질에 다량 존재하며, 주로 액포에 높은 농도로 저장된다.<sup>6)</sup> 액포막에서 citrate의 uptake를 유발하는

transporter는 H<sup>+</sup>-ATPase의 활성에 의해 좌우되는 2차 능동수송임이 확인되었다.<sup>6,9)</sup> Citrate는 malate와 더불어 세포의 pH 유지를 위한 주된 성분으로서 식물의 대사에서 중요한 역할을 수행함은 물론 Al<sup>3+</sup>과 같은 금속이온에 의한 생육장애시 뿌리조직에서 금속이온을 chelation하여 세포독성을 줄여주는 역할이 연구되었다.<sup>10,11)</sup>

Citrate나 인산은 세포질에 다량 존재하는 성분으로 citrate의 경우 고무나무(*Hevea brasiliensis*)의 세포질과 액포에 각각 5.7 mM과 50 mM의 높은 농도로 존재한다고 보고되었다.<sup>7,12)</sup> 따라서, 이들 유기산에 의한 세포의 생리활성 조절기능이 예상됨에도 불구하고 자세한 생리적 기능은 조사되어지지 않았다. 본 연구에서는 H<sup>+</sup>-ATPase의 활성에 미치는 음이온의 효과를 citrate와 인산을 선발하여 조사하였으며, 이들은 효소활성을 억제하며 저해기작이 각기 다름을 확인하였다.

### 재료 및 방법

**재료.** 토마토는 홍농종묘의 서광토마토(*Lycopersicon esculentum* L.; Pink Forcer) 종자를 발아용 스펀지를 이용하여 빛을 주지 않은 상태로 25°C를 유지하며 증류수에서 약 3-5일간 발아시켜 얻었다. 발아 후 양액이 담긴 플라스틱 용기에 이식하였으며, 양액의 조성은 Cho 등<sup>13)</sup>의 방법에 따라 제조하였다. 이식된 토마토는 온도를 28-32°C로 유지하며 약 5주간 온실에서 재배한 후, 뿌리조직을 채취하여 본 실험의 재료로 사용하였다.

양액 제조에 사용한 시약은 모두 1급 이상의 국산 및 일본산 시약이었고, 완충액용 자당은 Fluka Biochemical(Switzerland)의 제품을 사용하였다. Pyruvate kinase(PK), lactate dehydrogenase(LDH), 및 ATPase 활성측정에 사용한 시약은 모두

\*연락처자

Phone: 82-43-261-2560; Fax: 82-43-271-5921

E-mail: ykkim10@cbucc.chungbuk.ac.kr

Sigma Chemical Co.(St. Louis, USA)에서 구입하였다.

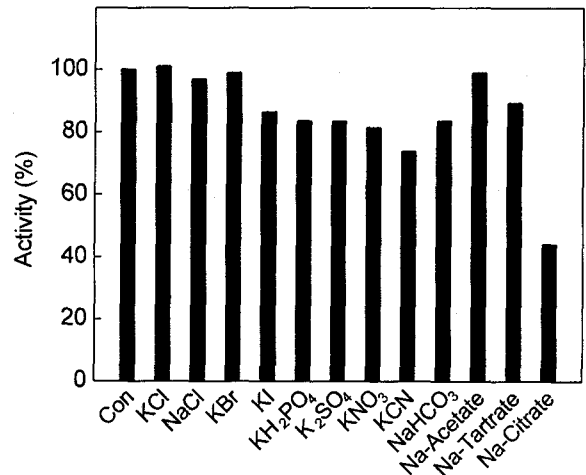
**토마토 뿌리조직에서의 마이크로솜 분리.** 토마토 뿌리조직으로부터 마이크로솜 분리는 Cho 등<sup>13)</sup>의 방법에 따라 초고속 원심분리법으로 이루어졌다. 분리한 마이크로솜 분획은 액체질소에서 순간냉동시켜 사용전까지  $-80^{\circ}\text{C}$ 의 초저온 냉동고에 보관하였다. 마이크로솜 분리의 전과정은  $4^{\circ}\text{C}$ 에서 수행하였으며, 단백질 농도는 Lowry방법<sup>14)</sup>으로 결정하였다.

**마이크로솜 ATPase 활성측정.** 토마토 뿌리조직으로부터 분리한 마이크로솜 ATPase의 평균활성은 Niggli 등<sup>15)</sup>의 enzyme-coupled assay를 변형한 Cho 등<sup>13)</sup>의 방법으로 측정하였다. 이 방법에서 마이크로솜 ATPase 활성측정은 혐기적 해당과정의 일부를 이용한 nicotinamide adenine dinucleotide(NADH) 산화와 연결되어 있다. NADH는 340 nm에서 최대 흡광도를 나타내지만, 산화된  $\text{NAD}^+$ 는 340 nm에서 흡광도를 나타내지 않으므로, ATPase 활성은 340 nm에서의 흡광도 감소로 나타나며, 이때 시간에 따른 평균 흡광도 감소율을 이용하여 활성을 측정하였다. 흡광도 감소는 자외선 분광광도계(Hitachi U-2000, Japan)를 이용하여 측정하였으며, 반응용액(120 mM KCl, 50  $\mu\text{M}$   $\text{CaCl}_2$ , 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.4 mM NADH, 2 mM phosphoenolpyruvate (PEP), 10 mM KCN, 30 mM *N*-(2-hydroxyethyl) piperazine-*N'*-(2-ethanesulfonic acid)(HEPES), pH 7.4) 500  $\mu\text{l}$ 에 약 25  $\mu\text{g}$ 의 단백질을 포함하는 양의 마이크로솜을 가한 후, PK(1 IU)와 LDH(1 IU)를 혼합하고, 1 mM ATP를 가하여 효소반응을 시작하였다.

음이온들에 의한 ATPase의 활성변화는 유기산 및 무기산들을 반응용액 중에 첨가하여 측정하였고, 음이온의 첨가로 나타나는 반응용액의 pH 변화 및 이에 따르는 ATPase의 활성변화 가능성은 반응용액의 pH를 7.4로 조절하여 제거하였다.

## 결과 및 고찰

**음이온들에 의한  $\text{H}^+$ -ATPase의 활성변화.** 음이온이 ATPase의 활성에 미치는 효과를 조사하기 위하여 토마토 뿌리조직의 원형질막과 액포막 등으로부터 유래된 마이크로솜을 분리하였으며, 여러 가지 음이온을 20 mM의 농도로 반응용액에 첨가한 후, 마이크로솜 ATPase의 활성변화를 측정하였다. 반응용액을 이용한 대조실험에서 마이크로솜 ATPase의 총활성은  $839 \pm 30$  nmol/min/mg protein이었다. 각각의 음이온을  $\text{K}^+$  또는  $\text{Na}^+$ 의 염 형태로 처리하였을 때, citrate는 마이크로솜 ATPase의 총활성을 60%,  $\text{CN}^-$ 는 30%,  $\text{I}^-$ 와  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{HCO}_3^-$ , tartrate들은 15-20%를 저해한 반면,  $\text{Br}^-$ 와 acetate는 저해 효과를 보이지 않았다(Fig. 1). 한편, ATPase의 활성은 1가 양이온인  $\text{Na}^+$ 과  $\text{K}^+$ 에 의해 영향을 받을 수 있음이 알려져 있어, ATPase의 활성저해 효과가 음이온에 의한 효과인지, 또는  $\text{K}^+$ 이나  $\text{Na}^+$ 의 효과인지를 조사하였다. KCl과 NaCl을 각각 20 mM 농도로 반응용액에 첨가시킨 후, 활성변화를 측정하였을 때, 활성저해 효과는 작거나 관측되지 않았다. 이것은 활성 측정용 반응용액에 이미 생리적인 조건인 120 mM KCl이 포함되어 있어 추가적인 KCl이나 NaCl의 첨가가 활성에 큰 영향을 주지 않는다는 이전의 결과와도 일치한다.<sup>13)</sup> 따라서,



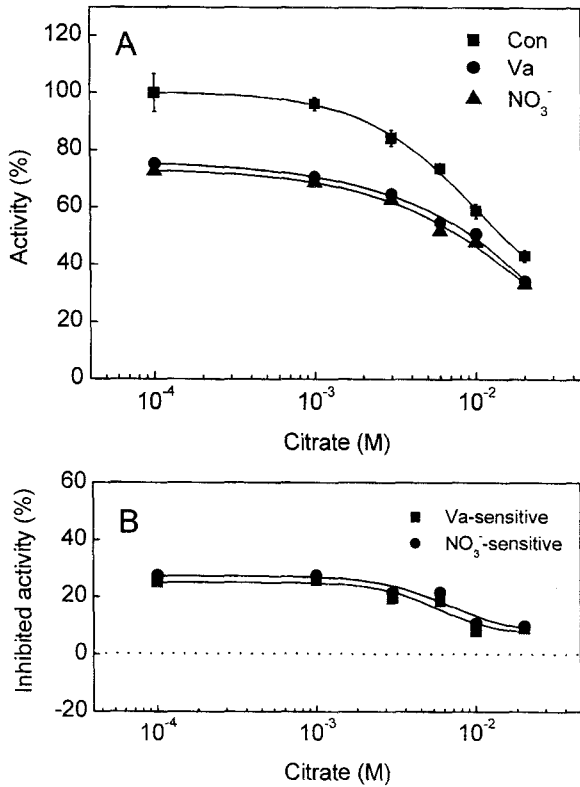
**Fig. 1. Effects of various anions on the activity of  $\text{H}^+$ -ATPases.** Microsomes were prepared from the root tissues of tomato plants. The activity of microsomal ATPase was measured in an assay medium consisting of 120 mM KCl, 30 mM HEPES (pH 7.4), 2 mM PEP, 0.4 mM NADH, 50  $\mu\text{M}$   $\text{CaCl}_2$ , 10 mM KCN, and 1 mM  $\text{MgCl}_2$ . The concentration of each anion salt was 20 mM.

ATPase의 활성저해 효과는  $\text{K}^+$  또는  $\text{Na}^+$  염의 형태로 첨가된 여러 음이온들에 의한 것임을 확인하였다.

위의 실험에서 사용한 대부분의 음이온들은 ATPase 활성을 다양하게 저해하는 것으로 나타났다. 이들 중 citrate에 의한 ATPase 활성저해는 다른 음이온들보다 약 2-3배 정도 크게 나타나, citrate의 효과가 다른 음이온들에 의한 ATPase 활성저해와는 차이가 있음을 확인하였다. 따라서, 본 연구에서는 저해 정도가 다른 citrate와 인산을 선별하여 이들이 ATPase의 활성 변화에 미치는 특성을 조사하였다.

**Citrate에 의한  $\text{H}^+$ -ATPase 활성저해.** 식물에서 citrate의 생리적 기능 여부를 밝히기 위하여 citrate가 ATPase 활성에 미치는 효과를 조사하였다. 원형질막과 액포막의  $\text{H}^+$ -ATPase들의 활성은 각각의 선택적 저해제인 vanadate와  $\text{NO}_3^-$ 에 의한 저해 정도를 평가하여 측정하였으며, citrate의 농도 변화에 따른 두 효소의 활성변화를 조사하였다. Citrate의 농도를 100  $\mu\text{M}$ 에서 20 mM 까지 단계적으로 증가시킴에 따라 마이크로솜 ATPase의 활성은 3 mM 이상의 농도에서 급격히 감소하였으며, 20 mM citrate의 첨가시 총활성의 50-60%가 저해되었다(Fig. 2A, Con). Citrate의 각 농도에 1 mM vanadate와 50 mM  $\text{NO}_3^-$ 를 각각 첨가하였을 때, vanadate와  $\text{NO}_3^-$ 에 의하여 저해되는 ATPase의 활성은 citrate의 농도를 증가시킴에 따라 감소하였다(Fig. 2B). Citrate의 농도를 3 mM 이하로 첨가하였을 때, vanadate와  $\text{NO}_3^-$ 에 의한 추가저해는 각각 25%와 27%로 나타나지만, 3 mM 이상으로 증가시킴에 따라 vanadate와  $\text{NO}_3^-$ 에 의한 추가적인 저해는 감소하여 10 mM 이상에서는 10% 정도로 나타났다.

이상의 결과는 citrate 농도 증가에 따라 vanadate와  $\text{NO}_3^-$ 에 의해 저해되는 원형질막 및 액포막의  $\text{H}^+$ -ATPase 활성이 감소함을 보여주는 것으로, citrate가 원형질막 및 액포막의  $\text{H}^+$ -ATPase 활성을 모두 농도의존적으로 저해함을 의미한다. 한편, citrate 농도 증가에 따른 vanadate와  $\text{NO}_3^-$ 의 추가적인 저해효과가 매우 유사하게 나타났으며, 이것은 원형질막 및 액포막  $\text{H}^+$ -

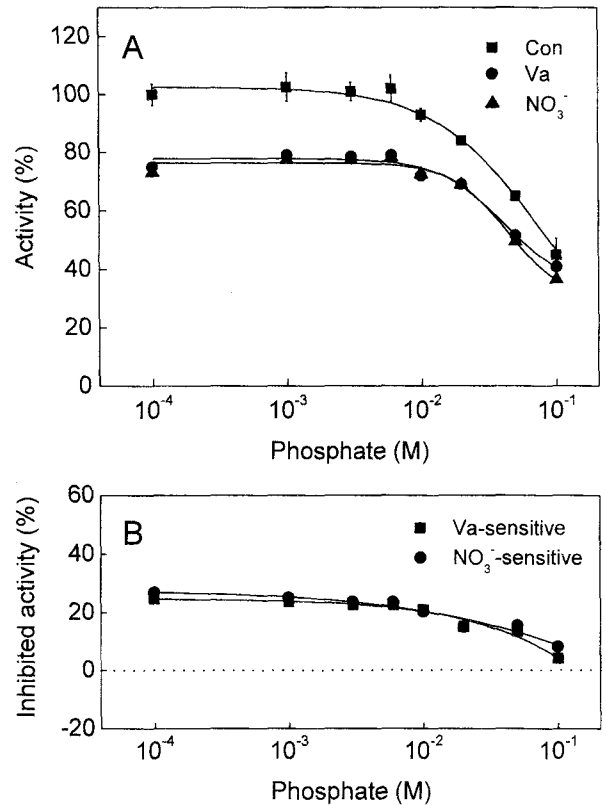


**Fig. 2.** Effect of citrate on vanadate- and nitrate-sensitive H<sup>+</sup>-ATPases. (A) Vanadate and nitrate were used as specific inhibitors to plasma membrane and vacuolar H<sup>+</sup>-ATPases, respectively. Dose responses of microsomal H<sup>+</sup>-ATPases to citrate were measured in the presence of 1 mM vanadate (Va) and 50 mM nitrate (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>). (B) Inhibited activities by vanadate and nitrate. The inhibited activity was calculated by subtracting the activity obtained in the presence of vanadate or nitrate from the corresponding control activity.

ATPase들이 citrate에 의해 같은 정도로 저해되어 이들에 대한 citrate의 저해가 유사한 기작에 의하여 나타날 가능성을 보인다.

**인산이온에 의한 H<sup>+</sup>-ATPase 활성저해.** 인산에 의한 원형질막과 액포막의 H<sup>+</sup>-ATPase 저해특성을 조사하기 위하여 각각의 선택적 저해제인 vanadate와 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>의 존재하에 인산의 농도를 증가시키며 ATPase 활성을 측정하였다. 인산의 농도를 100 μM에서 100 mM까지 단계적으로 증가시키며 따라 마이크로솜 ATPase의 대조활성은 10 mM 이상의 농도에서 저해되었으며, 100 mM 첨가시 총활성의 약 60%가 저해되었다(Fig. 3A, Con). 원형질막과 액포막의 ATPase 활성에 대한 인산의 효과를 각각 조사하기 위하여 대조활성 측정시에 이용된 인산에 선택적 저해제인 1 mM vanadate와 50 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup>를 첨가하였을 때, 저해제의 효과는 Fig. 2A에서의 경우와 유사하게 총활성을 저해하였다. 즉, vanadate와 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>는 10 mM 이하의 인산존재시 각각 약 20%의 저해효과를 보였고, 그 이상의 인산농도에서는 저해정도가 감소하였다.

인산에 의해 저해되는 각 효소의 활성은 Fig. 3B에 보였다. 인산의 농도를 10 mM 이하로 첨가하였을 때, vanadate 및 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>에 의해 저해되는 활성은 25-30%로 일정하게 나타났으나, 인산의 농도를 10 mM 이상으로 증가시키며 따라 점차 감소하였다. 인산 100 mM의 농도에서는 vanadate와 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>에 의해

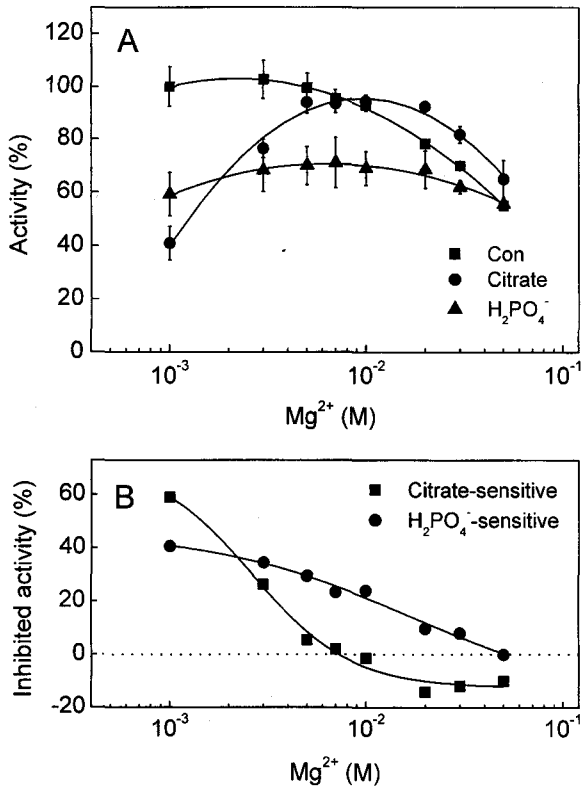


**Fig. 3.** Effect of phosphate on vanadate- and nitrate-sensitive H<sup>+</sup>-ATPases. (A) Dose responses of microsomal H<sup>+</sup>-ATPases to phosphate were measured in the absence (Con) or in the presence of 1 mM vanadate and 50 mM nitrate. (B) The inhibited activities by vanadate and nitrate were calculated at the indicated phosphate concentration. The inhibited activity was calculated by subtracting the activity obtained in the presence of vanadate or nitrate from the corresponding control activity.

저해되는 활성이 각각 4%와 8%로 나타났다. 이상의 결과로 citrate와 마찬가지로 인산도 3 mM 이상에서 원형질막과 액포막의 H<sup>+</sup>-ATPase들을 농도의존적으로 저해함을 확인하였으며, 두 효소들에 대한 인산의 저해는 유사한 농도에서 나타나 저해상수(K<sub>s</sub>)는 대략 30 mM 전후였다.

**Citrate와 인산에 의한 ATPase 활성저해 기작.** Citrate는 tricarboxylic acid로서 금속 양이온과 효과적으로 결합할 수 있으며, 동물조직에서는 citrate가 Mg<sup>2+</sup>이나 Ca<sup>2+</sup> 등의 양이온을 chelation함으로써 유리 Mg<sup>2+</sup>이나 Ca<sup>2+</sup>의 농도를 감소시키는 것으로 알려져 있다.<sup>16)</sup> Mg<sup>2+</sup>은 ATPase의 활성을 위해서 반드시 요구되는 보조인자로서, 반응용액 중에 유리상태 이온으로 존재하여야 한다. 따라서, citrate와 인산의 첨가로 나타나는 ATPase의 활성저해가 반응용액 중에서 citrate 또는 인산이 유리 상태의 Mg<sup>2+</sup>과 결합함으로써 나타나는 chelation 효과인지, 또는 이들이 효소에 직접 결합하여 활성을 저해하는지 여부를 조사하였다.

Mg<sup>2+</sup> 농도변화에 따른 ATPase의 활성을 측정하기 위하여 Mg<sup>2+</sup>의 농도를 1 mM에서 50 mM까지 단계적으로 증가시키며 활성을 측정하였을 때, 5 mM 이상의 Mg<sup>2+</sup>에서 ATPase 활성은 점차 감소하였다(Fig. 4A, ■). 이것은 ATPase의 활성이 5 mM 이상의 Mg<sup>2+</sup>에 의해 저해됨을 보인다. Mg<sup>2+</sup> 농도에 따른 대조

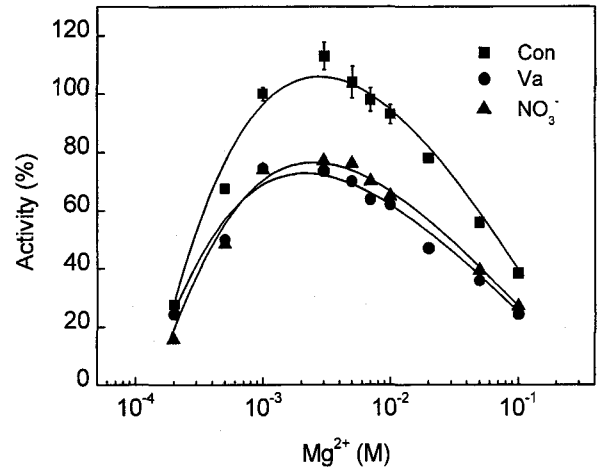


**Fig. 4. Inhibitory effects of citrate and phosphate at various concentration of Mg<sup>2+</sup>.** (A) Citrate- and phosphate-induced inhibitions of microsomal ATPases. Control activity was obtained at the indicated concentration of Mg<sup>2+</sup> (Con). The concentrations of citrate and phosphate were 20 and 50 mM, respectively. (B) Inhibited activities by citrate and phosphate. The inhibited activity was calculated by subtracting the activity obtained in the presence of citrate or phosphate from the corresponding control activity.

활성에 대하여 citrate와 인산의 효과는 반응용액에 20 mM citrate와 50 mM 인산을 각각 첨가시킨 후, Mg<sup>2+</sup>의 농도를 증가시키며 ATPase의 활성변화로 측정하였다.

먼저, 1 mM Mg<sup>2+</sup>의 존재하에서 20 mM citrate와 50 mM 인산을 첨가시켰을 때, ATPase의 활성은 각각 대조활성의 40%와 60%로 감소하였다. 이렇게 citrate에 의해 저해된 활성은 Mg<sup>2+</sup>의 농도를 1 mM에서 10 mM까지 증가시키며 점차 회복되었으며, 7 mM에서는 대조활성과 비슷한 수준으로 증가하였다(Fig. 4A, ●). 이에 더하여 10-50 mM의 농도로 Mg<sup>2+</sup>를 첨가하였을 때는, ATPase 활성이 대조활성과 비교하여 오히려 약 10% 정도 높게 나타났다. 또한, citrate의 존재하에서도 고농도의 Mg<sup>2+</sup>에 의한 저해효과는 대조활성에서와 마찬가지로 관측되었다. 한편, 50 mM 인산을 첨가하였을 때, ATPase의 활성은 Mg<sup>2+</sup>의 농도 증가와 관계없이 거의 일정하게 측정되었다(Fig. 4A, ▲).

Mg<sup>2+</sup> 농도에 따른 citrate와 인산의 저해효과를 분석하기 위하여, Fig. 4A의 대조활성에서 citrate와 인산의 처리시 얻어진 활성을 각각 빼준 후, Fig. 4B에 나타내었다. Citrate와 인산에 의해 저해된 ATPase의 각 활성은 Mg<sup>2+</sup>의 농도를 증가시키며 따라 감소하였으나, 감소되는 양상은 상이하였다. 먼저, citrate의 효과에서(Fig. 4B, ●), Mg<sup>2+</sup> 농도 증가에 따른 citrate의

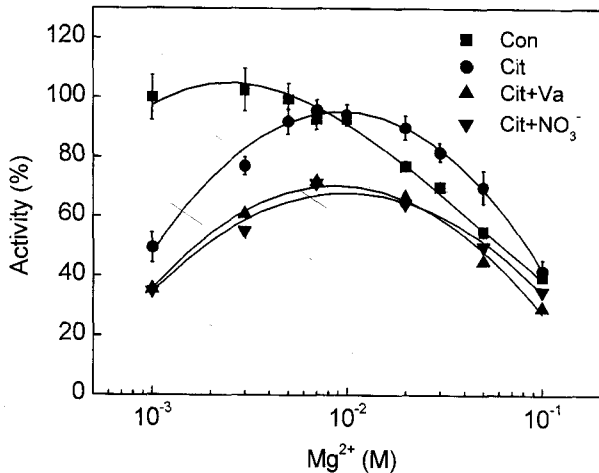


**Fig. 5. Effects of vanadate and nitrate on the activity of H<sup>+</sup>-ATPase at various concentration of Mg<sup>2+</sup>.** The effects of vanadate and nitrate on the activity of microsomal H<sup>+</sup>-ATPase were measured at the concentrations of 1 and 50 mM, respectively.

ATPase 활성저해는 급격히 감소하였고, 7 mM Mg<sup>2+</sup>에서는 citrate의 저해가 나타나지 않았다. 더욱이, 7 mM 이상의 농도에서는 citrate에 의해 오히려 ATPase 활성은 대조활성보다 증가하였다. 반면, 인산에 의한 ATPase의 활성 저해효과는 Mg<sup>2+</sup> 농도 증가에 따라 일정하게 감소하였으며, 50 mM Mg<sup>2+</sup>에서 인산에 의한 ATPase 활성감소는 나타나지 않았다(Fig. 4B, ●).

이러한 결과는 citrate가 반응용액 중 유리 Mg<sup>2+</sup>을 chelation 함으로써 ATPase의 활성을 저해시키고, citrate의 저해효과는 유리상태의 Mg<sup>2+</sup> 농도를 증가시키며 따라 극복될 수 있음을 보인다. ATPase의 대조활성의 경우 고농도의 Mg<sup>2+</sup>에 의해 저해가 나타나지만, 7 mM에서 대조활성과 citrate 존재시의 활성이 같으며, 그 이상의 농도에서는 활성이 역전되는 현상은 citrate에 의한 Mg<sup>2+</sup>의 chelation 효과를 극명하게 보여준다. 한편, 인산에 의한 ATPase의 활성저해는 Mg<sup>2+</sup>과 무관하며, 기존에 보고되었듯이 인산이 효소의 인산화부위에 결합함으로써 나타나는 효과로 판단된다.<sup>17)</sup>

**Mg<sup>2+</sup>에 의한 ATPase 활성저해.** Mg<sup>2+</sup>은 모든 ATPase의 활성을 위한 보조인자로서 1-2 mM에서 이온펌프의 활성을 촉진시키는 반면, 높은 농도의 Mg<sup>2+</sup>은 오히려 ATPase의 활성을 저해하는 것으로 나타났다. 따라서, Mg<sup>2+</sup> 농도변화에 따른 ATPase의 대조활성 변화와 원형질막 및 액포막의 ATPase 활성변화를 각각 측정하였다(Fig. 5). 대조활성의 경우, Mg<sup>2+</sup>을 200 μM부터 100 mM의 농도 범위에서 다양하게 첨가시켰을 때, 최대의 활성은 2-3 mM Mg<sup>2+</sup>에서 나타났으며, 5 mM 이상에서는 활성이 급격히 저해되었다(Fig. 5, ■). 이러한 결과는 이온이동을 유발하는 ATPase의 활성이 높은 농도의 Mg<sup>2+</sup>에 의해 저해된다는 근육세포 소포체에서 Ca<sup>2+</sup>-ATPase의 특성<sup>18)</sup>과 일치한다. 한편, Mg<sup>2+</sup> 농도에 따른 원형질막 및 액포막 H<sup>+</sup>-ATPase들의 활성변화를 조사하기 위하여, 1 mM vanadate와 50 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup>를 각각 첨가하였을 때, 각각의 저해효과는 최대의 대조활성을 보인 2-3 mM Mg<sup>2+</sup>에서 가장 크게 나타났다. 또한, 저해제 처리 후 남은 잔류 활성은 대조활성과 마찬가지로



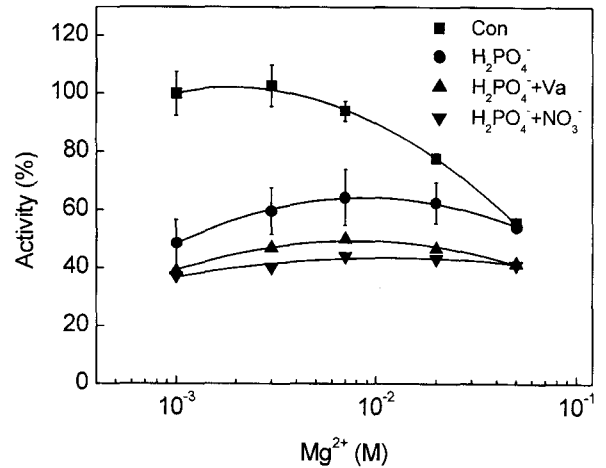
**Fig. 6. Effects of vanadate and nitrate in the presence of citrate.** The vanadate- and nitrate-induced inhibitions were measured in the presence of 20 mM citrate (Cit) in order to evaluate the activities of plasma membrane and vacuolar H<sup>+</sup>-ATPases. The concentrations of vanadate and nitrate were 1 and 50 mM, respectively.

Mg<sup>2+</sup> 농도범위에서 bell-shape의 곡선을 보였다.

**Citrate와 인산효과에 대한 Mg<sup>2+</sup>의 영향.** 원형질막 및 액포막 ATPase의 선택적 저해제인 vanadate와 NO<sub>3</sub>를 각각 처리하면서 citrate의 활성저해 효과를 Mg<sup>2+</sup>의 농도 1-100 mM 범위에서 측정하였다. 반응용액에 citrate가 존재할 때 Mg<sup>2+</sup>의 농도를 증가시키기에 따라 나타난 활성의 변화곡선은 Fig. 4에서의 결과와 같았다(Fig. 6, ●). Citrate와 함께 1 mM vanadate와 50 mM NO<sub>3</sub>를 각각 동시에 처리함으로써 측정된 활성은 추가적인 저해를 보였다(Fig. 6, ▼, ▲). Citrate와 함께 처리된 vanadate와 NO<sub>3</sub>는 7 mM의 Mg<sup>2+</sup> 농도에서 ATPase 활성을 각각 28%와 29%로 최대 저해하였으며, 20 mM 이상의 Mg<sup>2+</sup> 농도에서는 이들의 저해가 점차 감소하였다.

Citrate와 함께 처리된 vanadate와 NO<sub>3</sub>에 의해 ATPase의 활성이 저해된 후 나타난 잔류활성은 Mg<sup>2+</sup>의 농도에 따라 Fig. 5에서의 경향과 같이 bell-shape을 보였다. 최대의 잔류활성은 10 mM Mg<sup>2+</sup>에서 얻어져 고농도 방향으로 이동되었음을 알 수 있었다. 또한, vanadate와 NO<sub>3</sub>에 의한 저해효과도 10 mM Mg<sup>2+</sup>에서 최대로 나타나, 원형질막과 액포막 H<sup>+</sup>-ATPase들의 활성도 같은 정도로 이동되었다. 이러한 결과는 citrate에 의한 원형질막 및 액포막 ATPase의 활성저해가 citrate에 의한 유리 Mg<sup>2+</sup>의 chelation에 기인함을 재확인하는 것으로, citrate가 원형질막 또는 액포막 ATPase의 저해부위에 직접 결합함으로써 나타나는 활성저해가 아님을 의미한다.

마찬가지로, 원형질막 및 액포막 H<sup>+</sup>-ATPase 활성에 미치는 인산의 효과를 조사하기 위하여, 인산의 존재 하에 Mg<sup>2+</sup>의 농도 증가에 따른 vanadate 및 NO<sub>3</sub>의 저해효과를 조사하였다. 인산을 50 mM로 첨가한 후, Mg<sup>2+</sup>의 농도를 1에서 50 mM로 조절하며 활성을 측정하였을 때, Mg<sup>2+</sup> 농도에 따른 ATPase 활성 저해는 큰 변화를 보이지 않아 Fig. 4A에서의 결과와 같이 인산의 효과는 Mg<sup>2+</sup>의 농도와 무관하게 나타났다(Fig. 7, ●). 인산과 함께 처리된 vanadate와 NO<sub>3</sub>의 저해효과는 인산의 단독 저해와 비교



**Fig. 7. Effects of vanadate and nitrate in the presence of phosphate.** The vanadate- and nitrate-induced inhibitions were measured in the presence of 20 mM phosphate for the evaluation of plasma membrane and vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase activities. Mg<sup>2+</sup> was increased from 1 to 50 mM. The concentrations of vanadate and nitrate were 1 and 50 mM, respectively.

하여 Mg<sup>2+</sup> 농도범위에서 일정하게 나타났다(Fig. 7, ▲, ▼). 이러한 결과는 인산이 원형질막과 액포막의 ATPase는 물론 vanadate와 NO<sub>3</sub>에 의해 저해되지 않는 잔류활성도 저해함을 의미한다.

이상의 결과들로부터 citrate와 인산에 의한 ATPase 활성저해는 각기 다른 기작에 의하여 나타나며, 특히 citrate에 의한 ATPase의 활성저해는 Mg<sup>2+</sup>을 chelation함으로써 유리 Mg<sup>2+</sup>의 농도를 감소시켜 일어남을 확인하였다. 따라서, 원형질막이나 액포막의 H<sup>+</sup>-ATPase가 citrate에 의해 같은 정도로 저해된 Fig. 2의 결과는 이 효소들이 Mg<sup>2+</sup>이나 Mg<sup>2+</sup>·ATP에 대한 친화력이 유사한 것을 의미한다. 현재까지 식물 세포에서 citrate와 유리 Mg<sup>2+</sup> 또는 ATPase 활성과의 관계에 관한 기작은 자세히 밝혀지지 않았다. 식물 세포에서 citrate는 널리 분포하는 유기산 중의 하나로서, citrate가 ATPase 활성을 위해 반드시 필요한 Mg<sup>2+</sup>을 chelation 할 수 있다는 사실은 citrate의 농도변화가 H<sup>+</sup>-ATPase 활성조절을 통하여 세포의 생리활성에 영향을 미칠 수 있음을 시사한다.

## 감사의 글

본 논문은 한국과학재단지정 충북대학교 첨단원예기술개발연구센터의 지원에 의한 것입니다.

## 참고문헌

1. Sze, H., Li, X. and Palmgren, M. (1999) Energization of plant cell membranes by H<sup>+</sup>-pumping ATPases: Regulation and biosynthesis. *Plant Cell* **11**, 677-689.
2. Garbarino, J. and Dupont, M. F. (1998) NaCl induces a Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiport in tonoplast vesicles from barley roots. *Plant Physiol.* **86**, 231-236.
3. Kiegle, E. A. and Bisson, M. A. (1996) Plasma membrane Na<sup>+</sup>

- transport in a salt-tolerant charophyte. *Plant Physiol.* **111**, 1191-1197.
4. Blumwald, E. and Poole, R. J. (1987) Salt tolerance in suspension cultures of sugar beet. *Plant Physiol.* **83**, 884-887.
  5. Blumwald, E. and Poole, R. J. (1985)  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiport in isolated tonoplast vesicles from storage tissue of *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.* **78**, 163-167.
  6. Oleski, N., Mahdavi, P. and Bennett, A. B. (1987) Transport properties of the fruit tonoplast. *Plant Physiol.* **84**, 997-1000.
  7. Rentsch, D., Görlach, J., Vogt, E., Amrhein, N. and Martinoia, E. (1995) The tonoplast-associated citrate binding protein (CBP) of *Hevea brasiliensis*. *J. Biol. Chem.* **270**, 30525-30531.
  8. Brune, A., Gonzalez, P., Goren, R., Zehavi, U. and Echeverria, E. (1998) Citrate uptake into tonoplast vesicles from acid lime (*Citrus aurantifolia*) juice cells. *J. Membr. Biol.* **166**, 197-203.
  9. Marin, B. (1983) Evidence for an electrogenic adenosine-triphosphatase in *Hevea* tonoplast vesicles. *Planta* **157**, 324-330.
  10. Kochian, L. V. (1995) Cellular mechanisms of aluminum toxicity and resistance in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **46**, 237-260.
  11. Ma, J. F., Hiradate, S. and Matsumoto, H. (1998) High aluminum resistance in buckwheat. II. Oxalic acid detoxifies aluminum internally. *Plant Physiol.* **117**, 753-759.
  12. Marin, B., Smith, J. A. C. and Lüttge, U. (1981) The electrochemical proton gradient and its influence on citrate uptake in tonoplast vesicles of *Hevea brasiliensis*. *Planta* **153**, 486-493.
  13. Cho, K. H., Sakong, J. and Kim, Y. K. (1998) Characterization of microsomal ATPases prepared from tomato roots. *Agric. Chem. Biotechnol.* **41**, 130-136.
  14. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
  15. Niggli, V., Penniston, J. T. and Carafoli, E. (1979) Purification of the  $(\text{Ca}^{2+}\text{-Mg}^{2+})\text{-ATPase}$  from human erythrocyte membranes using a calmodulin affinity column. *J. Biol. Chem.* **254**, 9955-9958.
  16. Mercan, D., Bastin, G., Lambermont, M. and Dupont, E. (1997) Importance of magnesium measurement for monitoring of citrate-anticoagulated plateletpheresis. *Transfusion* **37**, 418-422.
  17. Vara, L. E. and Medina, G. (1990) Phosphorylation by inorganic phosphate of the plasma membrane  $\text{H}^+\text{-ATPase}$  from red beet (*Beta vulgaris* L.). *Plant Physiol.* **94**, 1522-1527.
  18. Bishop, J. E. and Al-shawi, M. K. (1988) Inhibition of sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}\text{-ATPase}$  by  $\text{Mg}^{2+}$  at high pH. *J. Biol. Chem.* **263**, 1886-1892.

#### Inhibition of Microsomal $\text{H}^+$ - ATPases Prepared from Tomato Roots by Various Anions

Dae-Seop Shin and Young-Kee Kim\* (Department of Agricultural Chemistry, Chungbuk National University, Cheongju, Chungbuk 361-763, Korea)

**Abstract :**  $\text{H}^+\text{-ATPases}$  located on plasma and vacuolar membranes play major roles in various cellular physiological processes. In order to investigate the physiological roles of  $\text{H}^+\text{-ATPases}$ , microsomes were prepared from tomato roots and the effects of various anions were measured on the activities of  $\text{H}^+\text{-ATPases}$ .  $\text{H}^+\text{-ATPase}$  was inhibited by various anions. Citrate and phosphate were chosen to investigate detailed inhibitory mechanisms on  $\text{H}^+\text{-ATPases}$  since they showed different levels of inhibition. Inhibitory effect of citrate was observed at the concentrations above 3 mM. When 20 mM citrate was added, the ATPase activity was decreased by 50-60%. However, the inhibitory effect of citrate was decreased by increasing the concentration of  $\text{Mg}^{2+}$ . The citrate-induced inhibited activity was recovered by the addition of  $\text{Mg}^{2+}$ . Addition of 7 mM  $\text{Mg}^{2+}$  completely removed the inhibitory effect of citrate and the activity recovered to the level of the control experiment. These results imply that citrate chelates  $\text{Mg}^{2+}$  and thus inhibits  $\text{H}^+\text{-ATPases}$ . Meanwhile, the inhibitory effect of phosphate was observed at the concentration above 3 mM and the activity was decreased by 50% in the presence of 30 mM phosphate. Further addition of  $\text{Mg}^{2+}$  showed no recovery on the activity. These results imply that the inhibitory effect of phosphate is not dependent upon the concentration of  $\text{Mg}^{2+}$ .

Key words : anion, citrate, phosphate,  $\text{H}^+\text{-ATPase}$ , tomato roots

\*Corresponding author