

토마토 뿌리조직에서 분리한 이온채널의 증금속에 의한 저해

신대섭 · 한민우 · 김영기*

충북대학교 농과대학 농화학과

(2004년 10월 8일 접수; 2004년 12월 7일 수리)

토마토 뿌리에 존재하는 이온채널의 특성을 조사하기 위하여, 마이크로솜을 분리하고 전기생리용 분석장치가 연결된 인공지질 이중막에 유입하였다. 그 결과 다섯 종류의 이온채널을 확인하였고, 이들 중 450 pS의 전기전도도를 갖는 비선택성 양이온채널을 가장 자주 관측하였다. 이 채널은 세 가지의 subconductance 상태를 보였으며, 이들의 전기전도도는 450, 257, 105 pS로 측정되었다. 모든 subconductance 상태는 막전위 변화에 따른 전류 변화가 직선적으로 나타났다. 채널의 활성화는 양의 막전위에서 열림과 닫힘이 반복되는 전이상태를 보였지만, 음의 막전위에서는 평균 열림시간과 함께 열림확률도 증가하였다. 막전위 -40 mV에서 측정된 채널의 열림확률은 0.83이었다. 이온선택성을 측정하기 위하여 지질막의 한쪽에만 50 mM의 K^+ 또는 Na^+ 을 가하여 비대칭 이온조건을 만들었을 때, 두 경우 모두에서 전류역전전위는 동일하게 약 -10 mV 이동하였다. 이것은 450 pS 채널이 K^+ 과 Na^+ 을 구별없이 통과시킴을 나타낸다. 증금속 이온들 중, 100 μ M 농도의 La^{3+} 과 Ba^{2+} , Zn^{2+} 는 채널의 활성을 크게 저해하여 열림확률을 0.2 이하로 감소시켰다. 그러나, Al^{3+} 과 Cd^{2+} 은 활성을 약 20% 저해하였다. 흥미롭게도, 각각의 증금속 이온은 서로 다른 형태로 채널활성을 저해하였다. La^{3+} 은 500 μ M 농도에서 모든 subconductance 상태를 저해하였으나, Zn^{2+} 는 1 mM의 농도에서도 105 pS의 subconductance 상태는 저해하지 않았다. 또한 Cd^{2+} 은 음의 막전위에서도 채널의 열림을 long-opening 상태에서 전이상태 열림으로 전환시켰다. 이러한 결과는 증금속 이온들이 채널단백질에 각각의 결합부위를 가질 수 있을 가능성을 의미하여, 식물 뿌리의 생리현상에서 450 pS 채널의 기능적 역할 뿐 만아니라 구조적 특징을 탐색할 수 있는 유용한 조절자나 탐색자로 이용될 수 있음을 시사한다.

Key words: 토마토뿌리, 이온채널, 증금속, 이온선택성, subconductance

서 론

식물의 이온채널 단백질은 양분의 흡수, 신호 전달, 삼투압 조절, 염류 저항성 등의 생리 현상에 중요한 역할을 수행한다. 식물세포의 생체막에는 다양한 종류의 이온채널들이 존재하며, 식물은 이들의 활성화 조절을 통하여 세포질의 이온농도는 물론 나아가 세포의 생리활성을 조절한다. 예를 들면, 원형질막에 위치한 K^+ 채널은 다른 양이온보다 K^+ 을 선택적으로 통과시키는 채널단백질이며, 막전위 변화에 따라 외향성 및 내향성의 K^+ 이동을 유발하는 두 종류가 존재함이 알려져 있다.^{1,2)} K^+ 은 식물의 성장에 필수적인 요소로서 그간에 K^+ cotransporter에 의해 식물체에 흡수되는 것으로 알려졌으나, 최근 AKT1 채널이 K^+ 흡수에 중요한 역할을 수행함이 밝혀졌다.³⁾ K^+ 채널과 더불어 식물체에서는 여러 가지 1가 또는 2가 양이온들을 선별 없이 이동시키는 비선택성 양이온 채널(nonspecific cation channel, NSCC)들이 생리적으로 중요한 역할을 수행함이 밝혀지고 있다.^{4,5)} 현재까지 식물조직에는 많은 종류의 NSCC들이 존재함이 보고되었으며, 이들의 특성이 각각의 활성화 요인들을 통하여 밝혀지고 있다. NSCC의 일반적인 활성화 요인으로는 비편극화(depolarization)^{6,7)} 및 편극화(hyperpolarization)⁸⁾를 포함한 막전위

변화,⁹⁾ 칼슘이온,¹⁰⁾ 환상형 핵산(cyclic nucleotide),¹¹⁾ glutamate,¹²⁾ 물리적인 자극¹³⁾ 등이 있다. 그 외에 액포막에서도 slow-activating¹⁴⁾ 과 fast-activating¹⁵⁾ NSCC가 밝혀졌으며, 세포 내부의 생체막에도 NSCC들이 존재하는 것이 새로이 밝혀지고 있다.

식물체에서 NSCC의 역할은 자세히 밝혀지지 않았으나, 다른 이온채널과 마찬가지로 양분의 흡수, 삼투압 조절, 세포 내 외부로의 염류이동, 신호전달 등의 생리현상에 관여한다고 알려졌다.^{16,17)} 본 연구는 식물의 염류조절 현상을 이해하기 위하여 수행되었으며, 주로 뿌리조직의 이온채널을 동정하고 특성을 구명하는 데 중점을 두었다. 식물의 뿌리는 토양과 직접 접촉하고 있으므로 토양중의 염류는 NSCC나 이온 transporter를 통하여 세포내로 유입된다.¹⁸⁾ 특히, 토양에 과다한 염류는 식물체의 필요와 관계없이 이온채널 단백질을 통하여 체내로 유입될 수 있으며, 체내 염류의 집적은 생육저해를 유발시킬 수 있다. 따라서 이온채널들의 기능과 특성을 밝히는 것은 작물의 염류 민감성 및 저항성 기작을 이해하는 데 크게 기여할 수 있다. 그간에 NSCC를 포함한 많은 이온채널의 특성이 연구되었음에도 불구하고 아직까지 토마토에서 NSCC에 대한 활성 특성 및 세포내에서의 역할에 대해서는 자세히 밝혀져 있지 않다.¹⁶⁾ 따라서 본 연구에서는 염류장애와 관련한 토마토의 뿌리조직 활성변화를 이온채널을 중심으로 조사하면서 5가지의 이온채널을 동정하였고, 그중 가장 빈번하게 발견되며 NSCC의 한 종류로 파악되는 450 pS 채널의 전기생리학적 특성을 증금속을 이용하여 조사하였다.

*연락처

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

E-mail: ykkim10@chungbuk.ac.kr

재료 및 방법

재료. 흥농종묘의 서광토마토(*Lycopersicon esculentum* L.; Pink Forcer) 종자를 발아용 스폰지를 이용하여 빛을 주지 않은 상태로 25°C를 유지하며 증류수에서 약 3-5일간 발아시켰고, 발아 후에는 양액이 담긴 플라스틱 용기에 이식하였다. 양액의 조성은 Cho 등¹⁹⁾의 방법에 따라 제조하였다. 이식한 토마토는 온도를 28-32°C로 유지하며 약 5주간 온실에서 재배한 후, 뿌리조직을 채취하여 마이크로솜을 분리하였다. 토마토 뿌리조직으로부터 마이크로솜 분리는 Cho 등¹⁹⁾의 방법에 따라 초고속 원심분리법으로 이루어졌다. 얻어진 마이크로솜 분획은 완충액(250 mM sucrose, 2 mM DTT, 1 mM PMSF, 0.1% BSA, 25 mM Tris-MES, pH 7.0)으로 현탁시킨 후, 액체질소에서 순간냉동시켜 사용전까지 -80°C의 초저온 냉동고에 보관하였다.

이온채널 활성화측정. 인공지질 이중막을 만들기 위한 인지질은 Avanti Polar Lipids 사로부터 구입하였으며, Cho 등²⁰⁾의 방법에 따라 phosphatidyl serine과 phosphatidyl ethanolamine을 *n*-decane에 각각 20 mg/ml의 농도가 되도록 녹인 후, 이들을 1:1의 비율로 혼합하여 제조하였다. 지질 이중막은 Derlin 컵에 만들어진 0.25 mm 직경의 구멍에 인지질을 유리막대로 문질러 형성하였다. 마이크로솜은 단백질 함량이 0.05-0.1 µg/µl가 되도록 *cis* chamber인 컵의 안쪽에 첨가하였다. 채널의 활성은 컵의 안쪽과 바깥쪽인 *cis*와 *trans* chamber에 100 mM KCl와 10 mM HEPES(pH 7.4)를 포함하는 동일한 완충액을 첨가하여 대칭조건을 만들거나, *cis* chamber에 염류를 추가로 첨가하는 비대칭 조건에서 측정하였다. Chamber의 *cis* 쪽은 Ag/AgCl 전극과 agar/KCl bridge에 의하여 AXOPATCH 1D 증폭기(Axon Instruments, Foster City, CA, USA)의 head-stage와 연결하였다. 또한, *trans* 쪽은 동일한 조건의 전극을 통하여 접지를 유지하였다. 채널단백질의 열리고 닫힘에 따른 전류신호는 low-pass Bessel filter(Dagan Corporation, Minneapolis, MN, USA)를 통과시켜 1 kHz에서 여과하여 기록하였다. 기록된 자료는 pClamp 8.01 software(Axon Instruments)를 이용하여 분석하였다.

결과 및 고찰

토마토 뿌리의 이온채널. 토마토 뿌리조직의 생체막에서 분리한 마이크로솜을 지질이중막에 유입시켜 전기전도도가 800, 500, 450, 265, 155 pS인 다섯 종류의 이온채널을 확인하였다. 이들 중 450 pS의 전기전도도를 갖는 것이 가장 빈번하게 관측되었으며, 이것은 이 채널의 밀도나 활성이 다른 종류에 비하여 높음을 의미한다. 따라서, 450 pS 채널단백질은 뿌리조직의 생리활성에 중요한 역할을 수행할 것으로 추정되며, 이를 밝히기 위하여 먼저 채널의 특성 및 중금속에 의한 활성화변화를 조사하였다. 이 채널단백질은 음이온보다는 양이온을 선택적으로 통과시키지만 양이온 종류에 대한 선택성은 낮은 것으로 판명되어, 전기전도도가 450 pS인 비선택성 양이온채널(TNSC, tomato nonselective cation channel)로 확인하였다.

지질이중막에 채널단백질을 유입시킨 후, 막전위를 -40 mV

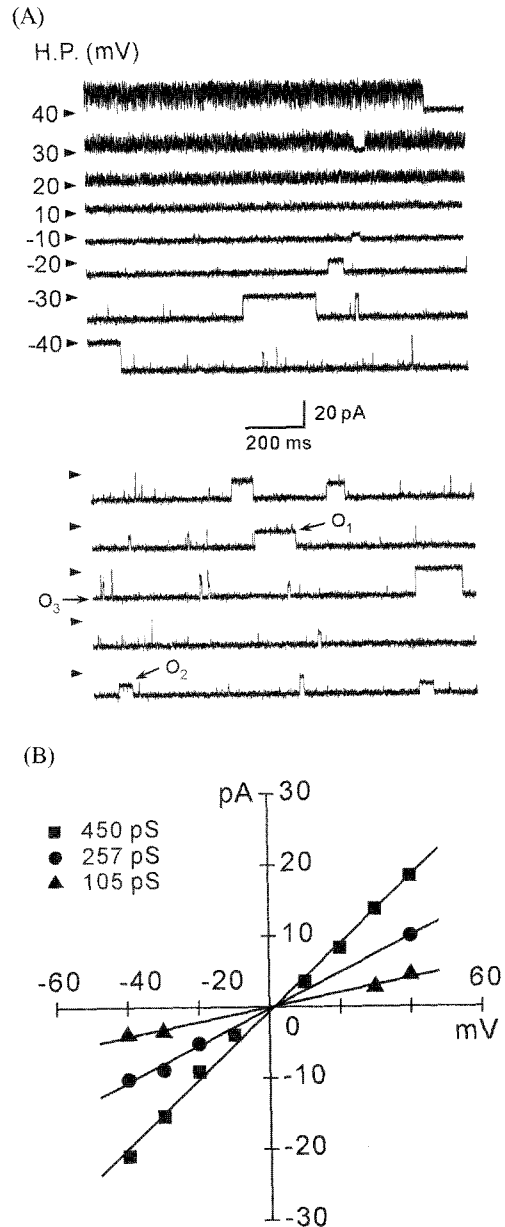


Fig. 1. Channel recordings and subconductance states of the 450 pS TNSC. Single channel currents were measured at a symmetric condition of 100/100 mM KCl by changing the holding potentials from -40 to 40 mV. (A) Single channel currents obtained at various holding potential (upper) and subconductance states at -40 mV (lower). Arrow at the left of each current trace represents the current level of closed channel. Symbols, O₁, O₂, and O₃, indicate the open states of 105, 257, and 450 pS subconductance states, respectively. (B) Current vs. voltage relationships of the subconductance states.

에서 +40 mV까지 변화시키며 450 pS TNSC의 채널전류를 측정하였을 때, 양과 음의 막전위에서 채널단백질의 활성은 각각 서로 다른 형태를 보였다. 양의 막전위에서 TNSC는 채널의 여단힘이 매우 빈번하게 나타나는 flickering 형태를 보였으며, 음의 막전위에서는 여단힘의 빈도가 낮으며 대부분 열려있는 상태로 관측되었다(Fig. 1A, upper). 또한 중요한 특성의 하나로 TNSC는 세 가지의 전기전도도를 보였다(Fig. 1A, below). 이것은 채널단백질이 구조 변화에 따라 여러 가지 열린 상태인

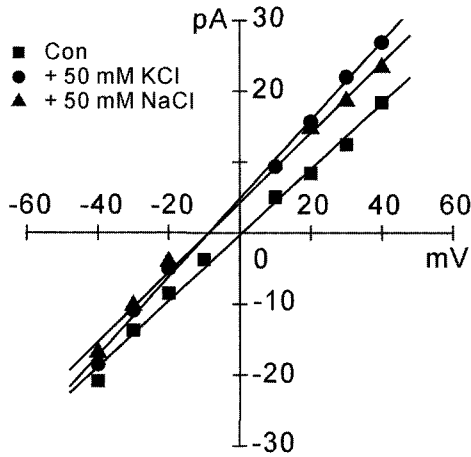


Fig. 2. Ion selectivity of TNSC measured by KCl and NaCl. Ion selectivity of TNSC was measured at the asymmetric conditions. Additional 50 mM KCl (●) or NaCl (▲) was added to the *cis* side of lipid bilayer. Single channel currents were measured at various holding potentials and current vs. voltage relationships were drawn at corresponding conditions. These data present three trials of the experiments.

subconductance를 갖는 것으로, 각각의 상태는 통과하는 이온의 양이나 선택성이 다른 특성을 보일 수 있다.²¹⁾ 이들 subconductance 상태의 채널 열림은 모두 음의 막전위에서 빈번하게 관측되었다. 한편, 막전위를 단계별로 변화시키며, 각 단계에서 단일채널 전류를 측정하여 막전위 변화에 따른 전류-전

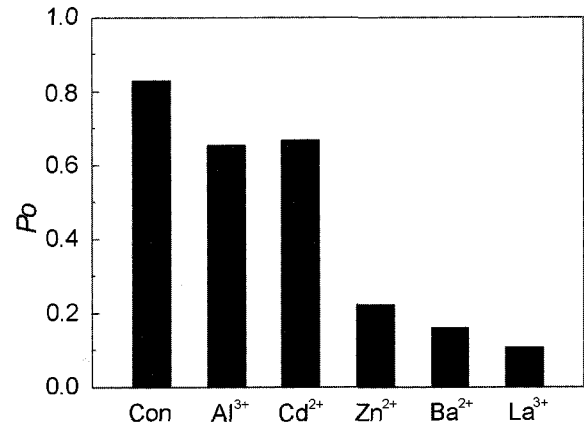


Fig. 3. Effects of various metal ions on the open probability of TNSC. The effects of bivalent and trivalent metal ions were measured at symmetric ionic conditions. Indicated metal ion at 100 μM was added to the *cis* side of a PE/PS membrane and open probability (*P*_o) of TNSC was measured at -40 mV by pClamp software (n=2-5).

위 변화그래프(I-V curve)로 나타냈을 때, 세 가지 subconductance 상태는 모두 직선의 관계를 보였으며, 각 상태의 전기전도도는 105, 257, 450 pS으로 측정되었다(Fig. 1B).

TNSC의 이온 선택성은 지질막을 경계로 이온의 농도를 달리한 비대칭 이온조건에서 측정하였다. 먼저 지질막 양쪽의 이온농도가 같은 대칭 조건하에서 채널의 활성을 확인한 후, 마이크로솜을 가한 쪽인 *cis* chamber에만 50mM의 KCl 또는

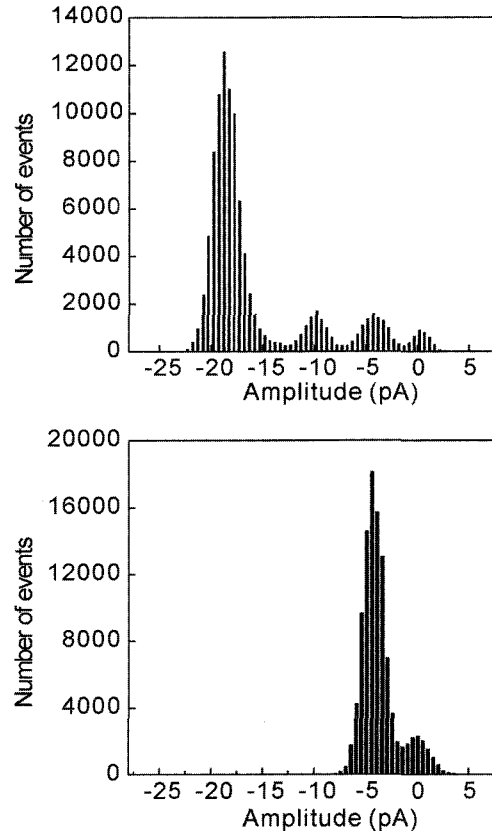
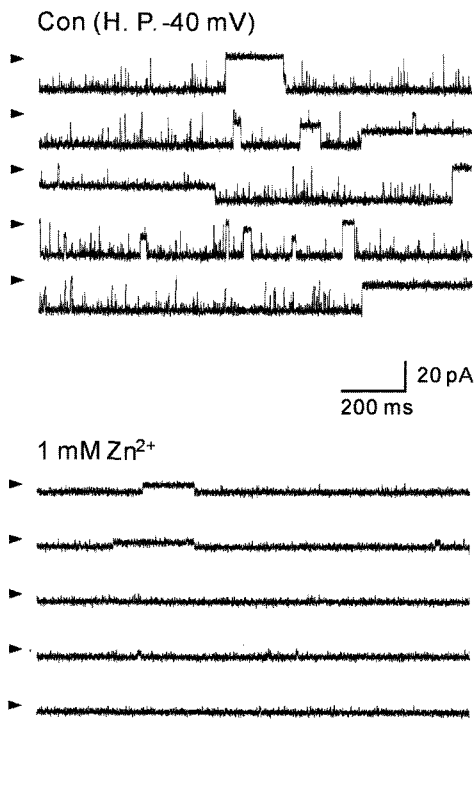


Fig. 4. Zn²⁺-induced inhibitions of subconductance states of TNSC. Single channel currents were recorded in the absence (Con) or in the presence of 1 mM Zn²⁺ in symmetric solution at -40 mV (left). Amplitude distribution histograms shown right are corresponding to the current traces shown left.

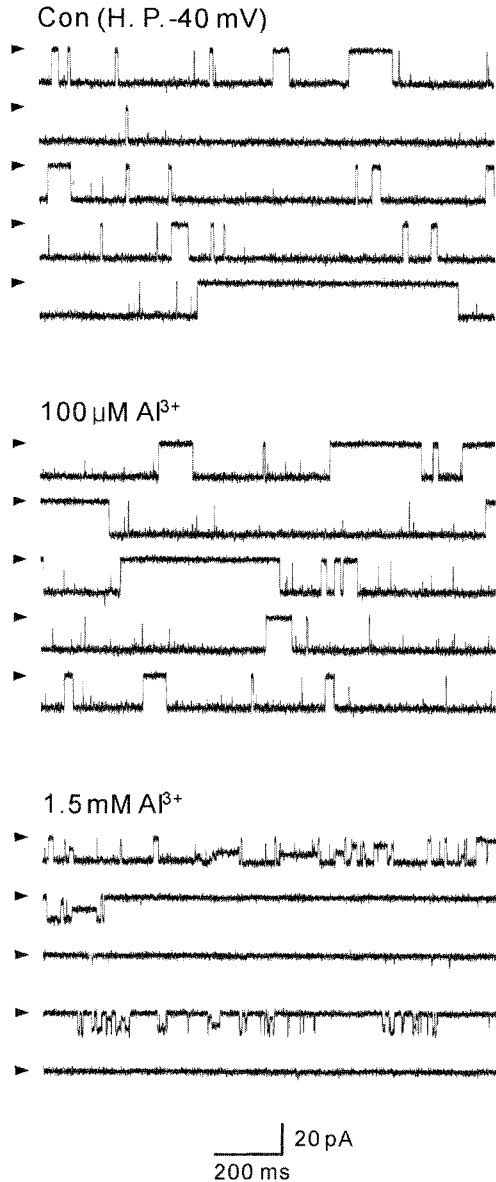


Fig. 5. Concentration-dependent inhibitory effects of Al³⁺ on TNSC. Single channel currents were recorded at -40 mV in the absence (Con) and presence of Al³⁺ at 100 μM and 1.5 mM.

NaCl를 추가로 첨가하였다. 막전위를 -40 mV에서 +40 mV까지 변화시키며 채널전류를 측정하였을 때, 대칭조건에서와 비교하여 전류-전위 그래프는 음의 방향으로 이동하였다. 이때 채널을 통한 이온의 이동방향이 역전되는, 즉 전류의 방향이 바뀌는 전압인 전류역전전위(reversal potential)는 50 mM KCl 또는 NaCl을 첨가하였을 경우 모두 동일하게 -10 mV로 일어졌다 (Fig. 2). 전류역전전위가 음의 방향으로 이동한 것은 TNSC가 음이온보다는 양이온을 선택적으로 통과시키며, K⁺이나 Na⁺ 모두 동일한 정도의 역전전위 이동을 보인 것은 TNSC가 양이온들 간에 선택성이 없거나 또는 매우 작은 비선택성 양이온 채널임을 나타낸다.

중금속에 의한 TNSC의 활성저해. 중금속 이온이 비선택성 양이온채널의 활성을 저해한다고 알려진 것¹⁶과 같이 2가, 3가의 중금속 이온들은 450 pS TNSC의 활성을 저해하였다. 중금

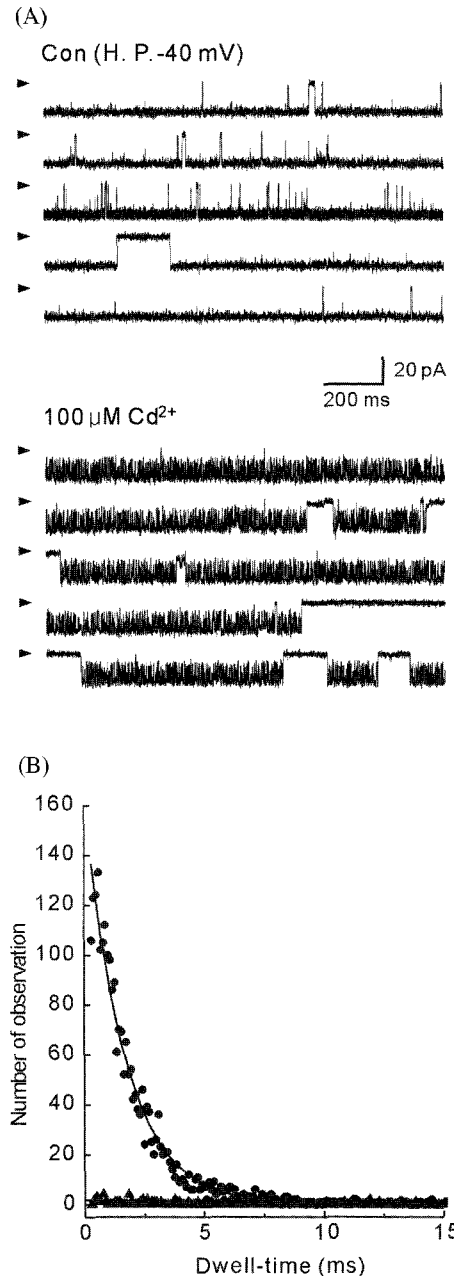


Fig. 6. Transition of TNSC gating by Cd²⁺. (A) Single channel currents were obtained at -40 mV in the absence (Con) and presence of 100 μM Cd²⁺. (B) The transition of gating from a long-opening state (▲) to a transient-opening state (●) by Cd²⁺. Dwell time distribution was calculated by pClamp program from the continuous recordings of each condition. These data present three trials of the experiments.

속에 의한 저해효과는 각각의 중금속을 100 μM이 되도록 *cis* chamber에 첨가하였을 때 나타나는 열림확률(open probability, *P_o*)의 감소정도로서 측정하였다. TNSC의 정상적인 *P_o*는 음의 막전위에서 0.83±0.35로 측정되었으며, Al³⁺과 Cd²⁺은 *P_o*를 각각 0.65±0.41과 0.67±0.37로 감소시켰으므로 TNSC 활성을 약 20%정도 저해하였다. 이에 비하여, La³⁺과 Ba²⁺, Zn²⁺는 강한 저해제로서 TNSC의 활성을 70% 이상 저해하였다(Fig. 3). 이것은 La³⁺ 및 Ba²⁺, Zn²⁺, Gd³⁺ 등의 중금속 이온이

*Arabidopsis*의 뿌리조직에 존재하는 비선택성 양이온채널의 활성을 크게 저해한다는 이전의 연구보고와 유사하며,²²⁾ 중금속에 의한 저해효과는 토마토의 비선택성 양이온채널에서도 일반적으로 잘 나타나는 특징으로 보인다.

Zn²⁺와 La³⁺의 저해효과. 중금속에 의한 이온채널의 저해특성은 중금속 및 채널의 종류에 따라 다르게 나타나는 것이 알려져 있다. TNSC의 저해특성도 중금속 이온종에 따라 특징적으로 나타났다. 먼저, 100 μM 농도의 Zn²⁺는 TNSC의 subconductance중 450 pS의 열림에 대한 Po를 0.83±0.35에서 0.22±0.19로 크게 감소시켰다(Fig. 3). 그럼에도 불구하고 여전히 257 pS과 105 pS의 subconductance는 저해되지 않고 관측되었으나, 500 μM 이상의 농도에서는 450 pS과 함께 257 pS의 subconductance 상태도 저해되었고, 긴 열림시간(long-open)을 갖는 105 pS의 subconductance 상태만이 관측되었다(Fig. 4, left). 이것은 채널전류의 amplitude histogram 분석을 통하여도 이루어졌으며(Fig. 4, right), 정상조건에서 각 subconductance 상태의 histogram은 -18, -10, -4 pA 근처에서 잘 나타나고 있으나, 1 mM 농도의 Zn²⁺를 처리한 후에 다른 상태는 완전히 저해되었고, -4 pA의 105 pS 열림만이 오히려 증가하였다.

La³⁺의 효과는 Zn²⁺에 의한 저해와는 다른 형태로 나타났다. La³⁺을 500 μM 농도로 첨가하였을 때, 시간이 경과함에 따라 모든 subconductance의 활성이 완전히 저해되었다(자료미제시). La³⁺에 의한 TNSC의 저해는 다른 중금속들에 의한 채널활성의 부분적인 저해에 비교하여 매우 확실하게 나타났다. 식물체에서 La³⁺에 의한 이온채널의 저해효과는 이전의 보고들을 통하여 알려져 있으며, Lewis 등²³⁾은 *Arabidopsis*에 존재하는 Ca²⁺ 채널과 청색광에 의해 활성화되는 음이온 채널, K⁺ 채널 등의 활성이 10 mM La³⁺에 의하여 비선택적으로 저해됨을 보여, La³⁺이 다양한 이온채널들의 비선택적 저해제임을 확인하였다.

Al³⁺과 Cd²⁺의 저해효과. Al³⁺은 TNSC의 활성을 농도의존적으로 저해하였다. 채널 활성은 100 μM Al³⁺에 의하여 닫힌 상태가 증가하였고, 1.5 mM에서는 Po뿐만 아니라 전기전도도가 감소하였다(Fig. 5). 즉, 높은 농도에서 subconductance 상태의 열림이 자주 관측되었고, 이들의 전기전도도 크기는 257 pS과 450 pS의 중간 정도에서 나타났다. 이러한 전기전도도의 감소가 Al³⁺의 결합에 의한 채널단백질 내부의 이온통로 크기 감소 및 이에 따른 새로운 subconductance 상태로의 변화인지는 알 수 없으나, 전기전도도 및 열림빈도의 저하로 채널을 통과하는 이온의 양이 감소함을 알 수 있다.

한편, Cd²⁺은 음의 막전위에서 TNSC의 열림 형태를 변화시켰다(Fig. 6). Cd²⁺의 첨가는 음의 막전위에서 채널의 열림형태를 긴 열림상태에서 열리고 닫힘이 반복되는 전이상태의 열림으로 전환시켰다(Fig. 6A). 즉, 채널단백질은 Cd²⁺에 의하여 최대 전기전도도와 subconductance 사이를 오가는 매우 활발한 flickering 상태를 보였다. 이러한 사실은 채널의 열림시간 분석인 dwell-time distribution에서도 확인되어, 열림의 빈도가 모든 dwell-time 구간에서 일정하였으나, Cd²⁺ 첨가시 3 msec 이내의 짧은 열림의 빈도수가 증가함을 확인할 수 있었다(Fig. 6B).

이상의 결과를 요약하면, 토마토 뿌리조직에서 다양한 종류의 이온채널과 함께 450 pS의 비선택성 양이온채널을 확인하였

다. 이 이온채널은 세 가지 subconductance 상태를 보임으로써 뿌리의 생리활성에 따라 이온의 이동량을 조절할 수 있는 가능성을 갖고 있다. 대부분의 중금속은 450 pS TNSC의 활성을 저해하였으나, 중금속에 따라 저해의 형태가 특이적으로 달랐다. 이러한 결과는 각각의 중금속이 TNSC에 대하여 특이적인 결합부위를 가질 수 있음을 의미하며, 따라서 TNSC의 특성조사에 이들 중금속 이온들이 효율적인 활성조절제 또는 추적자로써 사용될 수 있음을 시사한다. 나아가 중금속들이 TNSC 뿐만 아니라 다양한 이온채널들의 활성변화에 미치는 효과를 전기생리학적 방법으로 측정한다면 토마토 뿌리 세포의 생리활성 변화를 이해하는데 기여할 수 있을 것이다.

감사의 글

본 논문은 한국과학재단지정 충북대학교 첨단원예기술개발연구센터의 지원에 의한 것입니다.

참고문헌

- Hedrich, R. and Dietrich, P. (1996) Plant K⁺ channels: similarity and diversity. *Bot. Acta* **109**, 94-101.
- Schachtman, D. P. (2000) Molecular insights into the structure and function of plant K⁺ transport mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta* **1465**, 127-139.
- Hirsch, R. E., Lewis, B. D., Spalding, E. P. and Sussman, M. R. (1998) A role for the AKT1 potassium channel in plant nutrition. *Science* **280**, 918-921.
- Roberts, S. and Tester, M. (1997) A patch clamp study of Na⁺ transport in maize roots. *J. Exp. Bot.* **48**, 431-440.
- Tyerman, S., Skerrett, M., Garrill, A., Findaly, G. P. and Leith, R. A. (1997) Pathways for the permeation of Na⁺ and Cl⁻ into protoplasts derived from the cortex of wheat roots. *J. Exp. Bot.* **48**, 459-480.
- White, P. J. (1994) Characterization of a voltage-dependent cation-channel from the plasma membrane of rye (*Secale cereale* L.) roots in planar lipid bilayers. *Planta* **193**, 186-193.
- White, P. J. (1999) An energy barrier model for the permeation of monovalent and divalent cations through the maxi cation channel in the plasma membrane of rye roots. *J. Membr. Biol.* **168**, 63-75.
- Schroeder, J. I. and Hagiwara, S. (1990) Repetitive increases in cytosolic Ca²⁺ of guard cells by abscisic acid activation of nonselective Ca²⁺ permeable channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 9305-9309.
- Buschmann, P. H., Vaidyanathan, R., Gassmann, W. and Schroeder, J. I. (2000) Enhancement of Na⁺ uptake currents, time dependent inward-rectifying K⁺ channel currents, and K⁺ channel transcripts by K⁺ starvation in wheat root cells. *Plant Physiol.* **122**, 1387-1397.
- Schroeder, J. I. and Hagiwara, S. (1989) Cytosolic calcium regulates ion channels in the plasma membrane of *Vicia faba* guard cell. *Nature* **338**, 427-430.
- Kurosaki, F., Kaburaki, H. and Nishi, A. (1994) Involvement of plasma membrane-located calmodulin in the response decay of

- cyclic nucleotide-gated cation channel of cultured carrot cells. *FEBS Lett.* **340**, 193-196.
12. Dennison, K. L. and Spalding, E. P. (2000) Glutamate-gated calcium fluxes in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **124**, 1511-1514.
 13. Kiegle, E., Moore, C., Haseloff, J., Tester, M. and Knight, M. (2000) Cell-type specific calcium responses to drought, NaCl, and cold in *Arabidopsis* root: a role for endodermis and pericycle in stress signal transduction. *Plant J.* **23**, 267-278.
 14. Pottosin, I. I., Dobrovinskaya, O. R. and Múniz, J. (2001) Conduction of monovalent and divalent cations in the slow vacuolar channel. *J. Membr. Biol.* **181**, 55-65.
 15. Tikhonova, L. I., Pottosin, I. I., Dietz, K. J. and Schönknecht, G. (1997) Fast-activation cation channels in barley mesophyll vacuoles. Inhibition by calcium. *Plant J.* **11**, 1059-1070.
 16. Demidchik, V., Davenport, R. J. and Tester, M. (2002) Nonselective cation channels in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* **53**, 67-107.
 17. Pei, Z. M., Schroeder, J. I. and Schwarz, M. (1998) Background ion channel activities in *Arabidopsis* guard cells and review of ion channel regulation by protein phosphorylation events. *J. Exp. Bot.* **49**, 319-328.
 18. Davenport, R. J. and Tester, M. (2000) A weakly voltage-dependent, nonselective cation channel mediates toxic sodium influx in wheat. *Plant Physiol.* **122**, 823-834.
 19. Chó, K. H., Sakong, J. and Kim, Y. K. (1998) Characterization of microsomal ATPases prepared from tomato roots. *Agric. Chem. Biotechnol.* **41**, 130-136.
 20. Cho, K. H. and Kim, Y. K. (2003) Two types of ion channel formation of tolaasin, a *Pseudomonas* peptide toxin. *FEMS Microbiol. Lett.* **221**, 221-226.
 21. Valinus, V., Bukauskas, F. F. and Weingart, R. (1997) Conductances and selective permeability of connexin43 gap junction channels examined in neonatal rat heart cells. *Circ. Res.* **80**, 708-719.
 22. Demidchik, V. and Tester, M. (2002) Sodium fluxes through nonselective cation channels in the plasma membrane of protoplasts from *Arabidopsis* roots. *Plant Physiol.* **128**, 379-387.
 23. Lewis, B. D. and Spalding, E. P. (1998) Nonselective block by La^{3+} of *Arabidopsis* ion channels involved in signal transduction. *J. Membr. Biol.* **162**, 81-90.

Characterization of an Ion Channel Prepared from Tomato Roots and Inhibitory Effects by Heavy Metal Ions

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

Abstract: In order to characterize ion channels present in tomato roots, microsomes were incorporated into an artificial lipid bilayer arranged for electrophysiological analysis. Of the five different ion channels that could be found, a channel of 450 pS conductance was found most frequently. This channel displayed subconductance states of 450, 257 and 105 pS. All subconductance states showed linear current-voltage relationships. At positive holding potentials, high frequency of transient channel openings was observed; however, at negative potentials, the open times were long and open probability high. P_o was 0.83 at -40 mV. When an additional 50 mM K^+ or Na^+ was added to the *cis* side of bilayer, the reversal potentials shifted in the negative direction to near -10 mV. Thus, the 450 pS cation channel selects poorly between K^+ and Na^+ . In the presence of 100 μM metal ions, the channel activity was severely inhibited by La^{3+} , Ba^{2+} , and Zn^{2+} , and P_o was decreased to 0.2 or even less. However, Al^{3+} and Cd^{2+} decreased the activity by only 20%. Interestingly, each metal ion showed different kinetics of channel inhibition. While 500 μM La^{3+} inhibited the activities of all subconductance state, 1 mM Zn^{2+} inhibited all except the 105 pS state. Cd^{2+} changed the gating of the channel from a long-opening state to brief transient openings even at negative holding potentials. These data represent that the metal ions may have different binding sites on the channel protein and could be useful modulators and probes to investigate structural characteristics as well as the functional roles of the 450 pS channel on the root physiology.

Key words: tomato roots, ion channel, heavy metal, ion selectivity, subconductance

*Corresponding author