

家兎心臟 및 骨格筋에서 分離한 Microsome 分劃內 ATPase 活性도에 對한 Mg^{++} , Ca^{++} , Na^+ 및 K^+ 의 影響

釜山大學校 醫科大學 藥理學敎室

(指導 金 尙 泰 敎授)

崔 信 貞 · 洪 起 煥 · 金 奎 泰

= Abstract =

The influence of Calcium, Magnesium, Sodium and Potassium Ion on the Adenosintriphosphatase activity of heart and skeletal microsomal fraction of rabbits.

Sin J-yong Choi, M.D., Ki Whan Hong, M.D., Gui Tae Kim, M.D.

(Directed by Prof. Sang Tae Kim, M.D.)

Department of Pharmacology, College of Medicine, Pusan National University.

The microsomal fraction is isolated from rabbit heart and skeletal muscle. The fraction is found to contain the Na^+ - and K^+ -activated ATPase. The maximal ATPase activity is obtained in Na^+ and K^+ concentration of 100 mM.

Calcium itself stimulates the Na^+ - and K^+ -activated portion of ATPase in the presence of Mg^{++} . However, calcium does not stimulate ATPase in the absence of Mg^{++} .

緒 論

1957年 Skou¹⁾가 蟹神經膜 分劃에 ATPase 酵素系가 存在함을 證明한 以來 Skou²⁾, Lee 및 Yu³⁾, 其他 學者 들에 依하여 筋肉은 勿論 各種組織의 microsome 分劃에 Na^+ - and K^+ -activated ATPase가 存在함이 報告되었다.

그後 Post et al.⁴⁾ Dunham 및 Glynn⁵⁾, Lee et al.⁶⁾ 은 이 酵素가 細胞膜의 Na^+ - K^+ 交換과 密接한 關係가 있고 나아가 筋肉收縮機轉에 參與함을 報告하였다.

著者들은 家兎心臟 및 骨格筋에서 分離한 microsome 分劃內 ATPase 活性도가 Mg^{++} , Ca^{++} , Na^+ 및 K^+ 에 依하여 어떠한 影響을 받는가를 觀察하였다. 이에 그 成績을 報告한다.

實驗材料 및 方法

實驗動物 :

體重 2 kg 以上の 健康한 白色家兎를 雌雄區別없이 使用하였다.

心臟 및 骨格筋의 microsome 分劃 :

頸動脈을 切斷하여 出血死를 이룬 家兎에서 心臟 및 骨格筋을 剔出하여 Insei et al.⁷⁾ 方法에 依하여 microsome 分劃을 分離하였다. 即 4~5 g의 心臟組織에 20 mM $NaHCO_3$ 溶液 40~50 ml 를 加하여 Waring blender 內에서 1分間 homogenize 한 後 遠心沈澱管에 分注하여 10,000×g 로 20分間 遠心沈澱하였다. 이 各沈澱管의

表面에 浮遊하는 脂肪層을 除去하고 上澄液을 分離하여 다시 22,000×g 로 20 分間 遠心沈澱하였다. 그 沈澱物에 20 mM tris-buffer (pH 6.8) 를 加하여 Taflon (No. 10505) 을 使用하여 homogenize 하였다. 이 때 20 mM tris-buffer 量은 最初에 얻은 上澄液量과 7 : 2 의 比率로 加하였다.

이와 같이 하여 얻은 homogenate 를 다시 9,000×g 로 10 分間 遠心沈澱하여 그 上澄液을 本實驗에 使用하였다.

骨格筋은 背筋을 擇하였으며 그 50 g 에 20 mM NaHCO₃ 溶液 150 ml 를 加하여 上記 心臟에 있어서와 同一한 方法으로 homogenate 를 作成하였다.

上記 모든 操作은 4~5°C 에서 實施하였다.

(Table 1)

	Distilled Water, (ml)	5% Sodium desoxycholate(ml)	Biuret reagent (ml)	Standard solution (3 mg/ml)	Sample (ml)
Blank cuvette	2.2	0.8	4.0	—	—
Standard cuvette	1.7	0.8	4.0	0.5	—
Test cuvette	2.1	0.8	4.0	—	0.1

그後 各 cuvette 를 30 分間 室温에 保存한후 Beckman DU Spectrophotometer 를 使用하여 540 mμ 에서 그 吸光度를 읽은 다음, 다음式에 依하여 蛋白質量을 算出하였다.

Protein content of unknown=

$$\frac{\text{Protein content of standard}}{\text{Reading of standard}} \times \text{Reading of unknown}$$

Phosphate standard curve 을 위한 **Inorganic Phosphate** 의 測定 (Fiske 및 Subbarow³¹ 方法) :

試藥調製는 다음과 같다.

i) **Standard phosphate** : KH₂PO₄ 0.136g 와 H₂SO₄ 2.7 ml 를 1,000 ml 蒸溜水에 溶解하였다.

ii) **4 N H₂SO₄** 에 ammonium molybdate 를 2%의 濃度로 溶解하였다.

iii) **Reducing reagent**: Na₂SO₃ 0.5 g 와 1-amino-2-naphthol-4-sulfonic acid 0.25 g 를 100 ml 蒸溜水에 溶解한 것이다.

上記 i, ii, iii) 의 試藥을 Table 2 와 같이 配合하였다.

Table 2 와 같이 配合한 各 cuvette 를 10 分間 室温에 保存하였다가 Beckman DU Spectrophotometer 의 波長 660 mμ 에서 各 吸光度를 測定하였다. 各 test cuvette 內에 包含되어 있는 inorganic phosphate 量과 各 cuvette 의 吸光度로 부터 phosphate standard curve 를 作成하

Protein 量의 測定 :

Microsome 分割에 含有되어 있는 protein 量은 Biuret 方法³² 에 依據하여 測定하였다.

試藥調製는 다음과 같다.

i) **Biuret reagent** : Cupric sulfate 1.5 g 및 sodium-potassium tartrate 6 g 를 500 ml 蒸溜水에 溶解한 後 10 % sodium hydroxide 300 ml 를 徐徐히 混合한 後 蒸溜水를 加하여 1,000 ml 로 하고 冰室에 保管하여 必要에 따라 使用하였다.

ii) **50% sodium desoxycholate.**

iii) **3 mg/ml Bovine albumine (standard solution)**

i, ii, iii) 의 試藥을 blank cuvette, standard cuvette, test cuvette 에 Table 1 과 같이 配合하였다.

(Table 2)

	Phosphate standard (ml)	Distilled water(ml)	Ammonium molybdate (ml)	Reducing reagent (ml)
Test cuvette				
1,	0.2	8.3	1.0	0.5
2,	0.5	8.0	1.0	0.5
3,	1.5	7.0	1.0	0.5
4,	2.0	6.5	1.0	0.5
Blank cuvette				
0		8.5	1.0	0.5

였다.

ATPase 活性度の 測定 (Lee method³³)

試藥調製는 다음과 같다.

- 1) 160mM Tris-maleate buffer. (pH 6.8) (以下 tris-buffer 로 略記함)
- 2) 60mM MgCl₂
- 3) 30 mM Tris-adenosinetriphosphate. (以下 ATP 로 略記함)
- 4) 1M KCl
- 5) 1M NaCl

1, 2, 3, 4, 5) 의 各試藥과 心臟 및 骨格筋의 microsome 分割을 Table 3 과 같이 混合하며 全量을 1 ml 로 한다.

(Table 3)

160mM Tris-buffer	0.2 ml
60mM $MgCl_2$	0.1 ml
Microsome fraction * (H. M., S. M.)	1 mg/ml
1M KCl, 1M NaCl and 0.1mM $CaCl_2$	Varies
30mM Tris-ATP	0.1 ml
Distilled water	Varies according to amount of KCl, NaCl and microso- mal fraction.

Total volume of 1.0 ml

* H. M. : Heart microsome.

S. M. : Skeletal microsome.

이 혼합액을 室溫에 10分間 放置한 後 20% trichloroacetic acid 1ml를 加하여 15分間 遠心沈澱하였다. 그 上澄液을 分離하여 室溫에 30分間 放置한 後 Beckman DU Spectrophotometer 波長 660 m μ 에서 그 吸光度를 測定하였다. 이와 같이 測定한 吸光度로부터 phosphate standard curve에 依據하여 遊離된 inorganic phosphate의 量을 읽고 이것을 ATPase의 活性度로 하였다.

本實驗에 使用한 試藥은 다음과 같다.

- Cupric sulfate (Merck)
- Sodium-potassium tartrate (片山)
- Sodium desoxycholate (Fisher)
- Bovine albumin (Sigma)
- Ammonium molybdate (Merck)
- Potassium phosphate monobasic (Mallinckrodt)
- Sodium sulfite, anhydrous (片山)
- 1-Amino-2-naphthol-4-sulfonic acid (KoSo)
- Maleic acid (Eastman)
- Tris-adenosine triphosphate (Sigma)
- Magnesium chloride (Merck)
- Potassium chloride (Merck)
- Calcium chloride (Merck)
- Sodium chloride (Mallinckrodt)
- Tris (hydroxymethyl) aminomethane (Fisher)

實驗成績

A) 心臟 microsome 分劃의 ATPase 活性度

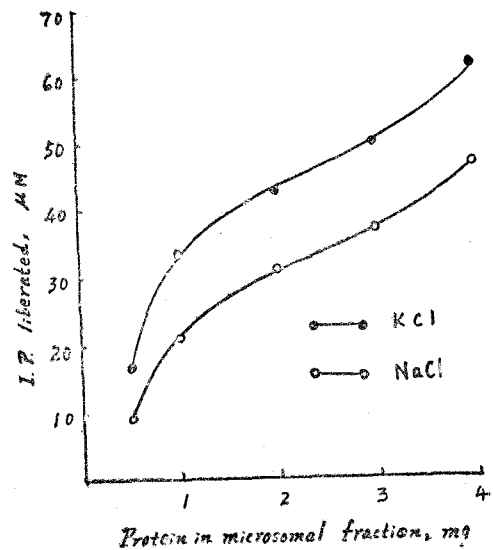
I. Protein 量이 ATPase 活性도에 미치는 影響: 이 實驗에 있어서는 K^{+} -activated ATPase 및 Na^{+} -activated ATPase가 microsome 分劃內의 protein 量 變動에 依하

여 어떠한 影響을 받는가를 觀察한 것이다.

Incubation medium의 組成은 Table 4에 表示한바와 같으며 medium의 全量은 1ml이다. 먼저 microsome 分劃內에 包含되어 있는 protein 量을 測定하고 microsome 分劃 1ml에 protein 10mg을 含有하도록 20mM tris buffer를 加하여 稀釋하였다. 各 cuvette內에 分注된 稀釋液의 容量 및 protein 含量은 Table 4에 明示된 바와 같다.

Microsome 分劃에 包含되어 있는 ATPase에 依하여 ATP로부터 遊離된 inorganic phosphate(μM) 量은 各 材料를 달리한 5回 實驗의 平均値이다. (後述의 各實驗에 있어서도 이와 同一하다)

이 成績을 曲線으로 表示하면 Fig. 1과 같다.



(Fig. 1) The effect of protein on Mg^{++} , Na^{+} and K^{+} -activated ATPase of heart microsomal fraction.

Table 4 및 Fig. 1에서 보는바와 같이 ATPase의 活性度는 protein 濃度增加에 따라 增加하며 K^{+} -activated ATPase는 Na^{+} -activated ATPase보다 恒常 優位이었다.

2. K^{+} 및 Na^{+} 이 ATPase 活性도에 미치는 影響: Table 5에 表示된바와 같이 microsome 分劃의 蛋白質量과 $MgCl_2$ 量을 一定하게 하고 Na^{+} 또는 K^{+} 濃度를 달리하여 ATPase에 依하여 遊離되는 inorganic phosphate 量을 測定하였다.

이 實驗成績을 曲線으로 表示하면 Fig. 2와 같다.

Table 5 및 Fig. 2에서 보는바와 같이 ATPase 活性度

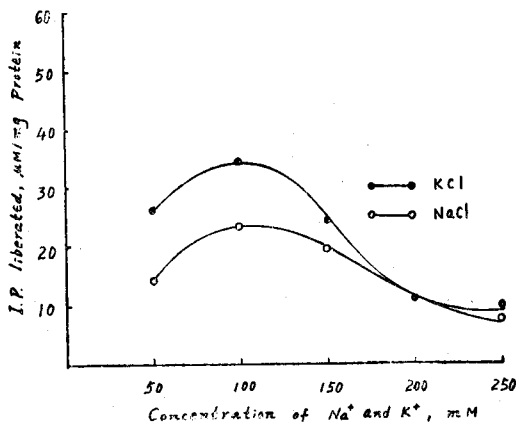
(Table 4) The effect of protein on Mg^{++} , Na^+ and K^+ -activated ATPase of heart microsomal fraction.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Final concentration (mM)
160 mM Tris-buffer (ml)	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	32.0
60 mM $MgCl_2$ (ml)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	6.0
1 M KCl (ml)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	—	—	—	—	—	100.0
1 M NaCl (ml)	—	—	—	—	—	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	100.0
30 mM ATP (ml)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	3.0
Microsomal fraction 10 mg protein/ml (ml)	0.05	0.1	0.2	0.3	0.4	0.05	0.1	0.2	0.3	0.4	—
Protein in microsomal fraction (mg)	0.5	1	2	3	4	0.5	1	2	3	4	—
Distilled water (ml)	0.45	0.4	0.3	0.2	0.1	0.45	0.4	0.3	0.2	0.1	—
© I.P. liberated (μM)	17.0	33.0	43.0	50.0	62.0	8.0	21.0	31.0	37.0	47.0	—

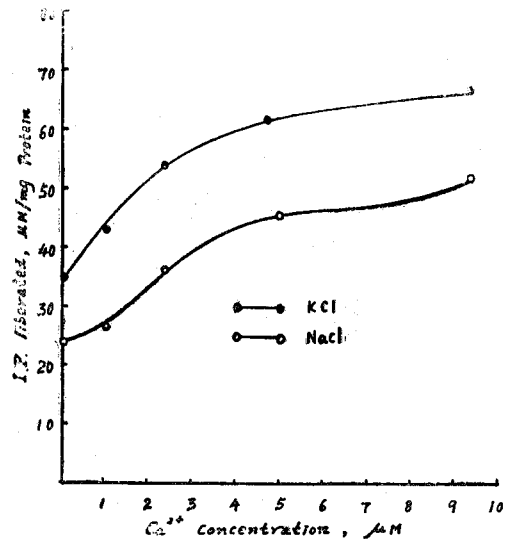
Total volume: 1.0 ml

© I.P.; Inorganic phosphate.

는 100 mM KCl, 100 mM NaCl에서 가장 높고 K^+ -activated ATPase가 Na^+ -activated ATPase보다 優位이었다.



(Fig. 2) The effect of Na^+ and K^+ on the heart microsomal ATPase.



(Fig. 3) The effect of concentration of Ca^{++} on the heart microsomal ATPase.

(Table 5) The effect of Na^+ and K^+ on the heart microsomal fraction.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Final concentration (mM)
160 mM Tris-buffer (ml)	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	32.0
60 mM $MgCl_2$ (ml)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	6.0
1 M KCl (ml)	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	—	—	—	—	—	Varies
1 M NaCl (ml)	—	—	—	—	—	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	Varies
30 mM ATP (ml)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	3.0
Microsomal fraction 10 mg protein/ml (ml)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	—
Distilled water (ml)	0.45	0.4	0.35	0.3	0.25	0.45	0.4	0.35	0.3	0.25	—
I.P. liberated (ml)	27.0	35.0	25.0	12.0	10.0	14.0	23.0	20.0	12.0	8.0	—

3. Ca^{++} 이 ATPase 活性度에 미치는 影響: 이 實驗에 있어서는 microsome 分割內의 K^{+} -activated ATPase 및 Na^{+} -activated ATPase 가 Ca^{++} 濃度變化에 依하여 어떠한 影響을 받는가를 觀察한 것이다.

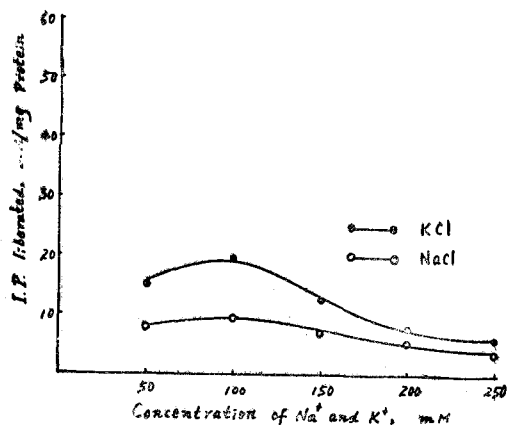
Incubation medium 的 組成은 Table 6에 表示한바와

같으며 medium 全量이 1ml 임은 勿論이다.

Table 6 및 Fig. 3에서 보는바와 같이 Ca^{++} 濃度의 增加에 따라 ATPase 活性度도 增加되었다. 그리고 K^{+} -activated ATPase 가 Na^{+} -activated ATPase 보다 優位이었다.

(Table 6) The effect of Ca^{++} on Mg^{++} , Na^{+} and K^{+} -activated ATPase of heart microsomal fraction.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Final concentration, mM
160 mM, Tris buffer, (ml)	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	32.0
60 mM MgCl_2 , (ml)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	6.0
1 M KCl, (ml)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	—	—	—	—	—	100.0
1 M NaCl (ml)	—	—	—	—	—	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	100.0
0.1 mM CaCl_2 (ml)	—	0.01	0.025	0.05	0.1	—	0.01	0.025	0.05	0.1	Varies
30 mM ATP (ml)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	3.0
Microsomal fraction 10 mg protein/ml (ml)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	—
Distilled water, (ml)	0.4	0.39	0.375	0.35	0.3	0.4	0.39	0.375	0.35	0.3	—
I. P. liberated (μM)	35.0	43.0	54.0	62.0	66.0	24.0	27.0	36.0	45.0	52.0	—



(Fig. 4) The effect of Na^{+} and K^{+} on the heart microsomal ATPase in the absence of Mg^{++} .

4. Mg^{++} 이 缺如되었을 때 K^{+} 및 Na^{+} 이 ATPase 에 미치는 影響: 이 實驗에 있어서는 incubation medium內의 Mg^{++} 을 除去하고 그때에 ATPase 가 Na^{+} 및 K^{+} 濃度의 變動에 依하여 어떤 影響을 받는가를 觀察한 것이다.

Incubation medium 的 組成은 Table 7에 表示한 바와 같다.

Table 7 및 Fig. 4에서 보는바와 같이 ATPase 活性度는 Mg^{++} 缺如에 依하여 顯著히 低下된다. 이때에도 K^{+} -activated ATPase는 Na^{+} -activated ATPase 보다 優位이었다.

5. Mg^{++} 이 缺如되었을 때 Ca^{++} 이 ATPase 에 미치는 影響: 이 實驗에 있어서는 incubation medium內의 Mg^{++} 을 除去하고 그때에 Na^{+} -activated ATPase 및 K^{+} -activated ATPase 가 Ca^{++} 의 濃度의 變動에 依하여

(Table 7) The effect of Na^{+} and K^{+} on heart microsomal fraction in the absence of Mg^{++} .

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Final concentration, mM
160 mM Tris-buffer (ml)	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	32.0
60 mM MgCl_2 (ml)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1 M KCl, (ml)	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	—	—	—	—	—	Varies
1 M NaCl, (ml)	—	—	—	—	—	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	Varies
30 mM ATP, (ml)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	3.0
Microsomal fraction 10 mg protein/ml (ml)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	—
Distilled water, (ml)	0.55	0.5	0.45	0.4	0.35	0.55	0.5	0.45	0.4	0.35	—
I. P. liberated, (μM)	15.0	20.0	12.50	7.50	6.0	7.30	10.0	7.0	5.0	4.0	—

(Table 8) The effect of Ca⁺⁺ on heart microsomal fraction in the absence of Mg⁺⁺.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Final concentration, mM
160 mM Tris-buffer, (ml)	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	32.0
60 mM MgCl ₂ , (ml)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1 M KCl, (ml)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	—	—	—	—	—	100.0
1 M NaCl, (ml)	—	—	—	—	—	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	100.0
0.1 mM CaCl ₂ , (ml)	—	0.01	0.025	0.05	0.1	—	0.01	0.025	0.05	0.1	Varies
30 mM ATP, (ml)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	3.0
Microsomal fraction 10 mg protein/ml, (ml)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	—
Distilled water, (ml)	0.5	0.49	0.475	0.45	0.4	0.5	0.49	0.475	0.45	0.4	—
I. P. liberated, (μM)	35.0	36.0	37.0	36.0	36.0	23.50	24.0	24.0	23.0	22.50	—

어떠한 영향을 받는가를 관찰한 것이다.

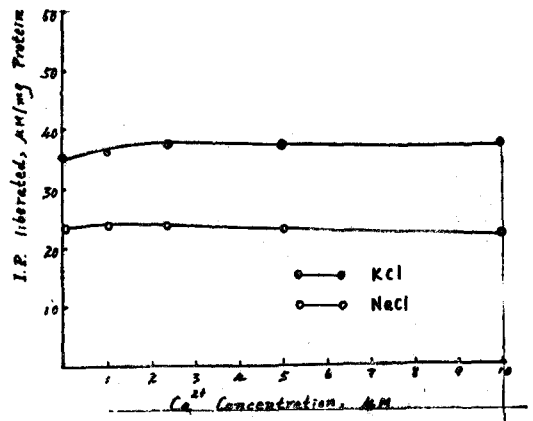
Table 8 및 Fig. 5에서 보는바와 같이 Mg⁺⁺이 缺如되었을 때는 K⁺ 또는 Na⁺이 存在하여도 Ca⁺⁺은 ATPase를 活性化할 수 없다는 것을 說明하는 것이다.

第3節에 陳述한바와 같이 incubation medium 內에 Mg⁺⁺이 存在하고, K⁺ 或은 Na⁺이 包含되었을 때에는 Ca⁺⁺은 ATPase를 顯著히 活性化하였다.

B) 骨格筋 microsome 分割의 ATPase 活性度

1. Protein 量이 ATPase 活性도에 미치는 影響 : 心臟 microsome 分割의 ATPase와 같은 方法으로 K⁺-activated ATPase 및 Na⁺-activated ATPase가 microsome 分割內의 protein 量 變動에 依하여 어떤 影響을 받는가를 觀察하였다.

Incubation medium의 組成은 Table 9에 表示한바와 같으며 medium의 全量은 1 ml이다. 먼저 microsome 분



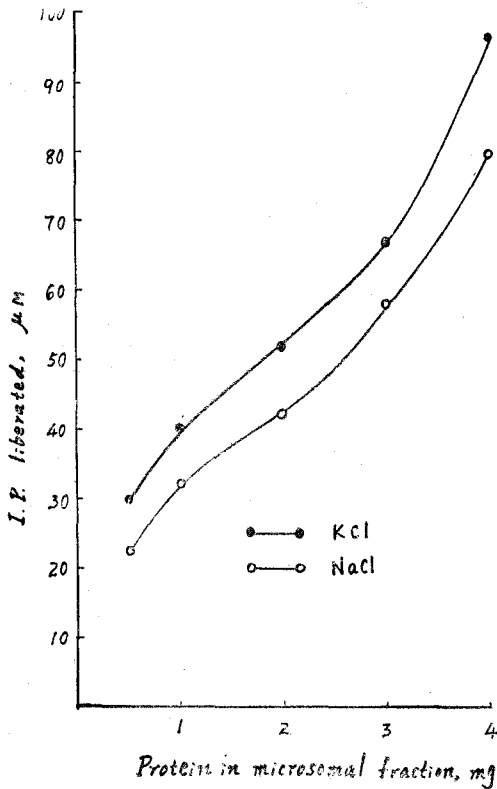
(Fig. 5) The effect of concentration of Ca⁺⁺ on the heart microsomal ATPase in the absence of Mg⁺⁺.

(Table 9) The effect of protein on Mg⁺⁺, Na⁺ and K⁺-activated ATPase of skeletal microsomal fraction.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Final concentration, mM
160 mM Tris buffer, (ml)	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	32.0
60 mM MgCl ₂ , (ml)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	6.0
1 M KCl, (ml)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	—	—	—	—	—	100.0
1 M NaCl, (ml)	—	—	—	—	—	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	100.0
30 mM ATP, (ml)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	3.0
Microsomal fraction 10 mg protein/ml (ml)	0.05	0.1	0.2	0.3	0.4	0.05	0.1	0.2	0.3	0.4	—
Protein in microsomal fraction, (mg)	0.5	1	2	3	4	0.5	1	2	3	4	—
Distilled water, (ml)	0.45	0.4	0.3	0.2	0.1	0.45	0.4	0.3	0.2	0.1	—
I. P. liberated, (μM)	30.0	40.0	52.50	67.50	97.0	22.50	32.50	42.50	58.0	80.0	—

割內에 包含되어 있는 protein 量을 測定하고 microsome 分割 1 ml에 protein 10 mg을 含有하도록 20 mM tris

buffer를 加하여 稀釋하였다. 各 cuvette內에 分注된 稀釋液의 容量 및 protein 含量은 Table 9와 같다.



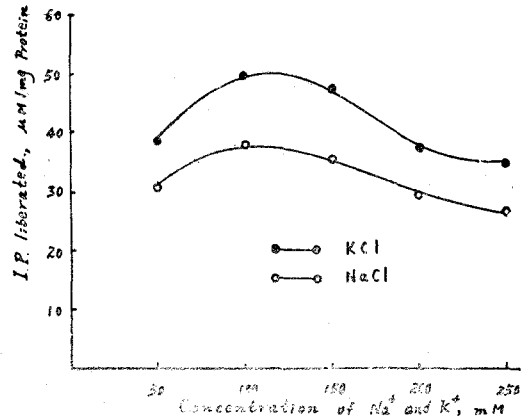
(Fig. 6) The effect of protein on Mg^{++} , Na^+ and K^+ -activated ATPase in skeletal microsome fraction.

2) K^+ 및 Na^+ 이 ATPase 活性度에 미치는 影響: Table 10에 表示된바와 같이 microsome 分割의 蛋白質과 $MgCl_2$ 量을 一定하게 하고 Na^+ 및 K^+ 濃度를 달리 하여 ATPase 에 依하여 遊離되는 inorganic phosphate 量을 測定하였다.

이 實驗成績을 曲線으로 表示하면 Fig. 7 과 같다.

Microsome 分割에 包含되어 있는 ATPase 에 依하여 ATP 로부터 遊離된 inorganic phosphate 量은 Table 9 과 Fig 6에 表示된바와 같이 ATPase 活性度는 protein 濃度增加에 따라 增加하며, K^+ -activated ATPase 는 Na^+ -activated ATPase 보다 恒常 優位이었다.

그리고 骨格筋 microsome 分割內에 ATPase 活性度和 心臟 microsome 分割內의 ATPase 活性度를 比較하면 Fig. 1 과 Fig. 6에서 보는바와 같이 同量의 protein 일지라도 骨格筋의 ATPase 活性도가 心臟 ATPase 活性도보다 恒常 優位이었다.



(Fig. 7) The effect of Na^+ and K^+ on the skeletal microsome ATPase.

Table 10 및 Fig. 7에서 보는바와 같이 ATPase 活性度는 100 mM KCl, 100 mM NaCl 에서 가장 높고 K^+ -activated ATPase 가 Na^+ -activated ATPase 보다 優位이었다.

3) Ca^{++} 이 ATPase 活性度에 미치는 影響: 이 實驗은 microsome 分割內의 K^+ -activated ATPase 및 Na^+ -

(Table 10) The effect of Na^+ and K^+ on the skeletal microsome fraction.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Final concentration, mM
160 mM tris-buffer, (ml)	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	32.0
60 mM $MgCl_2$ (ml)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	6.0
1 M KCl, (ml)	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	—	—	—	—	—	Varies
1 M NaCl, (ml)	—	—	—	—	—	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	Varies
30 mM ATP, (ml)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	3.0
Microsome fraction 10 mg protein/ml (ml)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	—
Distilled water (ml)	0.45	0.4	0.35	0.3	0.25	0.45	0.4	0.35	0.3	0.25	—
I.P. liberated, (μM)	38.0	50.0	47.50	37.50	35.0	30.0	37.50	35.50	30.0	27.0	—

(Table 11) The effect of Ca^{++} on Mg^{++} , K^+ and Na^+ -activated ATPase of skeletal microsomal fraction.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Final concentration, mM
160 mM Tris-buffer, (ml)	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	32.0
160 mM $MgCl_2$ (ml)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	6.0
1 M KCl, (ml)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	—	—	—	—	—	100.0
1 M NaCl, (ml)	—	—	—	—	—	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	010.0
0.1 mM $CaCl_2$, (ml)	—	0.01	0.025	0.05	0.1	—	0.01	0.025	0.05	0.1	Varies
30 mM ATP, (ml)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	3.0
Microsomal fraction 10 mg protein/ml (ml)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	—
Distilled water, (ml)	0.4	0.39	0.375	0.35	0.3	0.4	0.39	0.375	0.35	0.3	—
I.P. liberated, (μ M)	49.0	51.0	57.50	66.0	85.0	38.50	42.0	46.0	52.50	73.0	—

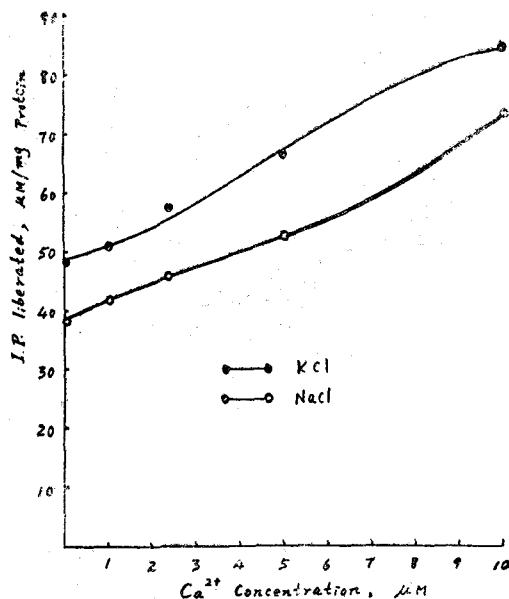
activated ATPase가 Ca^{++} 濃度變化에 의하여 어떠한 影響을 받는가를 觀察한 것이다.

Incubation medium의 組成은 Table 11에 表示된바와 같다.

Table 11 및 Fig. 8에서 보는바와 같이 Ca^{++} 濃度增加에 따라 ATPase 活性度도 增加되었다. 그리고 K^+ -activated ATPase가 Na^+ -activated ATPase 보다 優位이었다.

4) Mg^{++} 이 缺如되었을 때 K^+ 및 Na^+ 이 ATPase 에 미치는 影響: 이 實驗은 incubation medium 內의 Mg^{++} 이 缺如되었을 때에 ATPase가 Na^+ 및 K^+ 에 의하여 어떤 影響을 받는가를 觀察한 것이다. incubation medium의 組成은 Table 12와 같다.

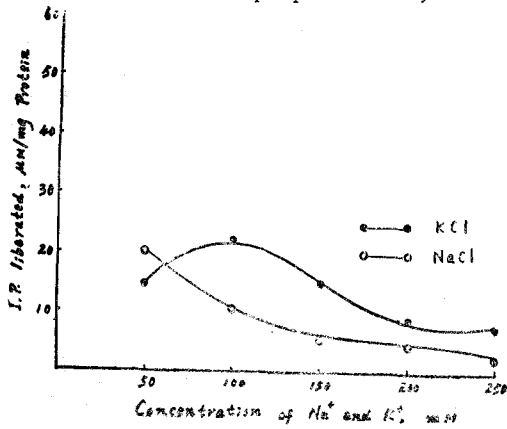
Table 12와 Fig. 9에서 보는바와 같이 ATPase 活性度는 Mg^{++} 缺如에 의하여 顯著히 低下되었다. 이때에도 K^+ -activated ATPase는 Na^+ -activated ATPase 보다 優位였다.



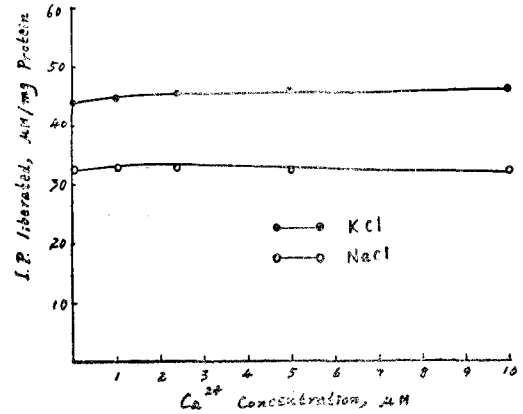
(Fig. 8) The effect of Ca^{++} on the skeletal microsomal ATPase.

(Table 12) The effect of K^+ and Na^+ on skeletal microsomal fraction in the absence of Mg^{++} .

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Final concentration, mM
160 mM Tris-buffer, (ml)	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	32.0
60 mM $MgCl_2$, (ml)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1 M KCl, (ml)	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	—	—	—	—	—	Varies
1 M NaCl, (ml)	—	—	—	—	—	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	Varies
30 mM ATP, (ml)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	3.0
Microsomal fraction 10 mg protein/ml (ml)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	—
Distilled water, (ml)	0.55	0.5	0.45	0.4	0.35	0.55	0.5	0.45	0.4	0.35	—
I.P. liberated, (μ M)	15.0	22.50	15.0	8.0	7.50	20.0	10.0	6.0	5.0	3.0	—



(Fig. 9) The effect of Na^+ and K^+ on the skeletal microsomal ATPase in the absence of Mg^{++} .



(Fig. 10) The effect of Ca^{++} on the skeletal microsomal ATPase in the absence of Mg^{++} .

5) Mg^{++} 이 缺如되었을 때 Ca^{++} 이 ATPase 에 미치는 影響: 이 實驗은 incubation medium 內의 Mg^{++} 이 缺如되었을 때 Na^+ -activated ATPase 및 K^+ -activated ATPase 가 Ca^{++} 濃度變動에 依하여 어떠한 影響을 받는가를 觀察한 것이다.

Table 13 및 Fig. 10 에서 보는바와 같이 Mg^{++} 이 缺

如되었을 때는 K^+ 또는 Na^+ 이 存在하여도 Ca^{++} 은 ATPase 를 活性化할 수 없다는 것을 說明하는 것이다.

그러나 incubation medium 內의 Mg^{++} 이 存在하고 K^+ 혹은 Na^+ 이 包含되었을 때는 Ca^{++} 은 ATPase 를 顯著히 活性化하였다(Fig. 8 參照).

(Table 13) The effect of Ca^{++} on skeletal microsomal fraction in the absence of Mg^{++} .

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Final concentration, mM
160 mM Tris-buffer, (ml)	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	32.0
60 mM MgCl_2 , (ml)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1 M KCl, (ml)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	—	—	—	—	—	100.0
1 M NaCl, (ml)	—	—	—	—	—	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	100.0
0.1 mM CaCl_2 (ml)	—	0.01	0.025	0.05	0.1	—	0.01	0.025	0.05	0.1	Varies
30 mM ATP, (ml)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	3.0
Microsomal fraction 10 mg protein/ml (ml)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	—
Distilled water, (ml)	0.5	0.49	0.475	0.45	0.4	0.5	0.49	0.475	0.45	0.4	—
I. P. liberated, (μM)	44.0	45.0	45.0	45.0	46.0	32.50	32.50	32.50	32.0	32.0	—

總 括

著者들이 本研究을 通하여 觀察한 家兔心臟 및 骨格筋의 microsome 分割內 ATPase 活性度에 미치는 Mg^{++} , Ca^{++} , K^+ 및 Na^+ 의 影響을 總括하면 다음과 같다. (Ebashi¹⁰, Ebashi 및 Lipman¹¹, muscatello et al.⁹) 및 Nagai et al.¹² 은 心臟 및 骨格筋의 microsome 分割은 筋의 sarcoplasmic reticulum 에서 由來하는 것이라 하였다.)

1. 心臟 및 骨格筋 microsome 分割內에 包含되어 있는 protein 量을 增加함에 따라 ATPase 의 活性度도 增加되었다.

2. 心臟 및 骨格筋 microsome 分割內의 蛋白質과 MgCl_2 量이 一定할 때에는 ATPase 活性度는 100 mM KCl 및 100 mM NaCl 에서 가장 높았다.

3. 心臟 및 骨格筋 microsome ATPase 活性度는 Ca^{++} 濃度增加에 따라 增加하였다.

4. 骨格筋 microsome ATPase 의 活性度는 心臟 mi-

croosome ATPase 活性度보다 恒常 優位이었고 兩 microsome 分割의 K^+ -activated ATPase 는 Na^+ -activated ATPase 보다 恒常 優位이었다.

5. 心臟 및 骨格筋 microsome ATPase 는 Na^+ 및 K^+ 이 存在하고 Mg^{++} 缺如時에는 Ca^{++} 에 依하여 活性化 되지 아니하였다.

6. 心臟 및 骨格筋 microsome ATPase 는 Na^+ 및 K^+ 이 存在하여도 Mg^{++} 이 缺如되면 그 活性度는 顯著히 低下되었다.

(本研究에 있어서 始終 指導해 주시고 또 本稿를 校閲해 주신 金尙泰 教授님께 滿腔의 謝意를 表하는 바이다)

References

- 1) J. C. Skou : Biochim. Biophys. Acta, **23** : 294(1957).
- 2) J. C. Skou : Biochim. Biophys. Acta, **58** : 314(1962).
- 3) K. S. Lee and D. H. Yu : Biochem. Pharmacol., **12** : 1253(1963).
- 4) R. L. Post, C. R. Merritt, C. R. Kinsolving and C. D. Albright: J. Biol. Chem., **235** : 1796(1960).
- 5) E. T. C. Dunham and I. M. Glynn: J. Physiol., **156** : 274(1961).
- 6) K. S. Lee, K. Tanaka and D. H. Yu: J. Physiol., **170** : 111(1965).
- 7) G. Inesi, S. Ebashi and S. Watanabe: J. Physiol., **207** : 1339(1964).
- 8) C. F. Fiske and Y. Subbarow: J. Biol. Chem., **66** : 375(1925).
- 9) U. Muscatello, E. Andersson-Cedergren and G. F. Azzone: Biochim. Biophys. Acta, **63** : 55(1962).
- 10) S. Ebashi: J. Biochem.(Tokyo), **48** : 1501 (1960).
- 11) S. Ebashi and F. Lippman: J. Cellular. Biol., **14** : 389 (1962).
- 12) T. Nagai, M. Makinode and W. Hasselbach: Biochim. Biophys. Acta, **43** : 223 (1960).