

家兔 腎臟 Microsome 分劃內 ATPase 活性度에 關한 研究*

釜山大學校 醫科大學 生理學教室

〈指導 延世大學校 醫科大學 生理學教室 洪碣基 教授
釜山大學校 醫科大學 生理學教室 高日燮 助教授〉

李 相 鎬

=Abstract=

Studies on the Activity of Microsomal ATPase of the Rabbit Kidney

Sang Ho Lee, M.D.

Department of Physiology, Pusan National University College of Medicine

(Directed by Drs. Suk Ki Hong and Ill Sup Koh)

The present investigation was initially undertaken to see if there exists $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ activated ATPase in the microsome fraction of the kidney. Having confirmed the presence of such an enzyme, further attempts have been made to characterize its nature and the following conclusions were obtained:

(1) The ATPase activity was greatest at the Na^+ concentration of 100 mM as well as at K^+ concentration of 10 mM. Moreover, the ATPase activity was found to be depressed by Ca^{++} in the presence of Mg^{++} .

(2) While the ATPase activity was depressed by Ouabain, the magnitude of inhibition was greater in the Na medium than in the K medium.

(3) NaCN augmented the ATPase activity whereas NaF and IAA depressed it. On the other hand, DNP had little influence on the ATPase activity.

(4) Diamox, vasopressin and aldosterone had no effect while HgCl_2 markedly depressed the ATPase activity.

These findings indicate that the nature of ATPase isolated from the microsome fraction of the rabbit kidney is quite similar to that from other organs such as the heart and the muscle, although there are certain features specific to the type of organs.

緒 論

赤血球나 神經細胞膜에서 K^+ 은 안으로 또 Na^+ 은 밖으로 向한 所謂 "pump"의 作用에 依하여 細胞內 이온의 組成을 維持하고 있는데 이러한 Na^+ 과 K^+ 의 能動的 移動은 新陳代謝過程에서 形成된 adenosinetriphosphate (ATP)의 加水分解에 依하여 遊離되는 에너지의 供給을 必要로 한다고 한다.¹⁻³⁾

近來에 이르러 細胞膜은 adenosinetriphosphatase(ATP

ase)를 가지고 있으며 이것이 膜의 이온 透過도와 密接한 關連을 가지고 있다는 것이 알려져 있다.

即 1957년에 Skou⁴⁻⁵⁾가 蟹의 末梢神經膜內에 Na^+ 과 K^+ 에 依하여 活性化되는 ATPase 酵素系가 含有되어 있음을 證明한 以來, Skou,⁶⁾ Järnefelt⁷⁾ 및 Aldridge⁸⁾ 등은 腦에서, Post et al.⁹⁾ Dunham 및 Glynn¹⁰⁾은 赤血球膜에서, Emmelot 및 Bos¹¹⁾는 肝細胞膜에서, Taylor¹²⁾는 腸에서, 그리고 Whittam 및 Wheeler¹³⁾는 腎臟에서 各各 ATPase 酵素系가 存在함을 亦是 證明하였으며, 同時에 이 酵素系가 細胞膜의 Na^+ 과 K^+ 의 能動的 移動에 關連하고 있을 것이라고 暗示하였다.

* 本論文의 要旨은 1966年 10月 第18次 大韓生理學會에서 발표하였다.

이러한 見解는 赤血球膜에 대한 一連의 實驗에서 證明되었는데, 첫째로 ATPase는 K^+ 이 細胞外에 있고 Na^+ 이 細胞內에 存在할 때 活性化되어 K^+ 의 influx와 Na^+ 의 efflux를 誘發하며,¹⁴⁻¹⁵⁾ 둘째로 이 ATPase의 活性도와 이온의 能動的移動過程은 共히 cardiac glycoside에 依하여 抑制된다는 것이다.⁹⁻¹⁰⁾

그後 Audatore,¹⁶⁾ Lee 및 Yu,¹⁷⁾ Schwartz et al.¹⁸⁻¹⁹⁾은 心臟 microsome 分劃內에 Na^+ - K^+ 에 依하여 活性化되는 ATPase가 存在함을 證明하고 同時에 이 酵素系가 筋肉收縮機轉에 參與한다고 하였다.

이와같이 赤血球를 爲始하여 心臟 및 筋肉組織內의 ATPase에 關하여는 많은 研究가 報告되어 있음에도 不拘하고 相當한 量의 Na^+ 을 能動的過程에 依하여 再吸收하는 腎臟組織內의 Na^+ 및 K^+ 에 依하여 活性化되는 ATPase에 關한 研究는 매우 稀貴하다. 따라서 著者는 家兎의 腎臟 microsome 分劃內에도 ATPase 酵素系가 存在함을 追究함과 同時에 ATPase 活性도에 미치는 Mg^{++} , Ca^{++} , Na^+ , K^+ 및 Ouabain의 影響을 觀察하였다. 또 sodium cyanide($NaCN$), sodium fluoride(NaF), monoiodoacetic acid(IAA) 및 dinitrophenol(DNP)等 新陳代謝抑制物質과 腎細尿管 細胞의 透過性을 變化시키는 몇가지 藥物, Diamox, Vasopressin, d-aldosterone 및 mercuric chloride들이 ATPase 活性도에 미치는 影響도 아울러 研究하여 이에 그 成績을 報告하는 바이다.

實驗材料 및 方法

實驗 動物: 體重 2~2.5 kg의 健康한 白色家兎를 雌雄 區別없이 使用하였다.

腎臟의 microsome 分劃의 分離: 頸動脈을 切斷하여 出血死를 일으킨 後 腎臟을 剔出하여 Inesi et al. 方法²⁰⁾에 依하여 microsome 分劃을 分離하였다. 即 10~11 g의 腎臟組織에 0.32 M sucrose 溶液 100 ml를 加하여 Waring blender로 1分間 homogenize한 다음 遠心沈澱管에 分注하여 10,000×g로 20分間 遠心沈澱하였다. 그後 各 沈澱管의 上層에 浮遊하는 脂肪層을 除去하고, 上澄液단을 모아서 22,000×g로 20分間 다시 遠心沈澱하여 얻은 沈澱物에 20 mM tris-maleate buffer(pH 6.8)를 加하여 Teflon을 使用하여 homogenize하였다. 이와 같이 하여 얻은 homogenate를 다시 9,000×g로 10分間 遠心沈澱하여 그 上澄液을 本實驗에 使用하였다. 이들 모든 操作은 2~4°C에서 實施하였다.

蛋白質量의 測定: 腎臟의 microsome 分劃에 含有되어 있는 蛋白質量은 Biuret 方法^{17,21)}에 依하여 測定하였다.

無機磷酸의 測定: Incubation medium內에 加한 ATP로부터 遊離되는 無機磷酸測定은 Fiske 및 Subbarow 方

法²²⁾에 依하였는데 이때 Coleman Junior Spectrophotometer를 使用하여 波長 660 m μ 에서의 吸光度를 測定하였다.

ATPase 活性度の 測定: 腎臟 microsome 分劃內의 ATPase 活性도는 Lee 및 Yu 方法¹⁷⁾에 依據하여 測定하였다.

實驗過程에 있어 incubation은 37°C에서 施行하였고 蒸溜水는 demineralized distilled water를 使用하였다.

試藥:

本實驗에 使用한 重要試藥은 다음과 같다.

Potassium phosphate monobasic (Mallinckrodt)
Sodium sulfite, anhydrous (片山)
Magnesium chloride (Mallinckrodt)
Potassium chloride (Merck)
Calcium chloride (Merck)
Sodium chloride (Mallinckrodt)
Bovine albumin (Sigma)
Ammonium molybdate (Merck)
1-amino-2-naphthol-4-sulfonic acid (Koso)
Tris (hydroxy methyl) amino methane (Fisher)
Adenosine triphosphate (Sigma)
Maleic acid (Eastman)
Ethylene diaminetetraacetic acid (Fisher)
Ouabain (Sigma)
Sodium cyanide (Mallinckrodt)
Sodium fluoride (J.T. Baker)
Monoiodoacetic acid (和光)
Dinitrophenol (Merck)
Diamox (Lederle laboratories division)
Vasopressin (Parke, Davis)
D-aldosterone (Caibiochem)
Mercuric chloride (Mallinckrodt)

實驗成績

A. Mg^{++} , Ca^{++} , Na^+ , K^+ 및 Ouabain 0.1 microsomal ATPase 活性도에 미치는 影響:

1. Microsome 分劃內 蛋白質量과 ATPase 活性도와 의 關係: 이 實驗에 있어서는 K^+ -activated ATPase 및 Na^+ -activated ATPase가 microsome 分劃內의 蛋白質量變動에 依하여 어떠한 影響을 받는가를 觀察하였다 (제1표 및 제1도).

Incubation medium의 組成은 제1표에 表示된 바와 같으며 medium의 全量은 1 ml이었다. 먼저 microsome 分劃內에 包含되어 있는 蛋白質量을 測定하고 microsome 分劃 1 ml에 蛋白質 10 mg을 含有하도록 20

Table 1. The effect of protein on the ATPase activity of kidney microsomal fraction in the presence of Mg⁺⁺, Na⁺ and K⁺

Composition	Tube No.	Tube No.										F.C. (mM)	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
160 mM T-M buffer (ml)		0.2	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	0.1	6.0
100 mM KCl (ml)		0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	—	—	—	—	—	—	10.0
1 M NaCl (ml)		—	—	—	—	—	0.1	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	0.1	3.0
1 mM EDTA (ml)		0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Microsomal fraction													
10 mg protein/ml (ml)		0.025	0.05	0.1	0.15	0.2	0.025	0.05	0.1	0.15	0.2	—	—
Protein in microsomal fraction (mg)		0.25	0.5	1	1.5	2	0.25	0.5	1	1.5	2	—	—
Distilled water (ml)		0.375	0.35	0.3	0.25	0.2	0.375	0.35	0.3	0.25	0.2	—	—
Pi (μM)		17.1	21.4	29.3	37.7	46.3	10.9	14.5	21.2	29.6	36.8	—	—

T-M buffer: Tris-maleate buffer
EDTA: Ethylene diaminetetraacetic acid

Pi: Inorganic phosphate
F.C.: Final concentration

Table 2. The effect of K⁺ and Na⁺ on the ATPase activity of kidney microsomal fraction in the presence of Mg⁺⁺

Composition	Tube No.	Tube No.										F.C. (mM)	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
160 mM T-M buffer (ml)		0.2	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	0.1	6.0
100 mM KCl (ml)		0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	—	—	—	—	—	—	—
1 M NaCl (ml)		—	—	—	—	—	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	—	—
30 mM ATP (ml)		0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	3.0
1 mM EDTA (ml)		0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
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	0.1	1(mg)
Distilled water (ml)		0.35	0.3	0.25	0.2	0.15	0.35	0.3	0.25	0.2	0.15	—	—
Pi (μM)		26.2	29.3	29.1	25.8	23.8	19.4	21.2	16.3	14.2	11.9	—	—

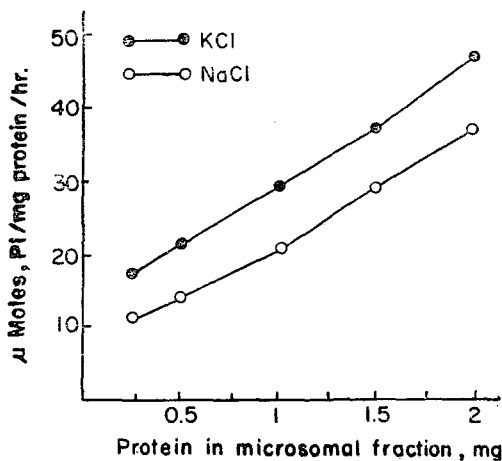


Fig. 1. The effect of protein on the ATPase activity of kidney microsomal fraction in the presence of Mg⁺⁺, Na⁺ and K⁺.

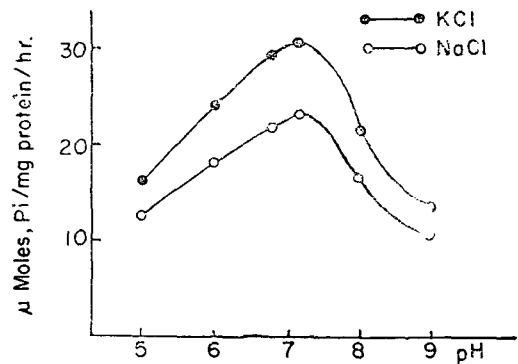


Fig. 2. The effect of pH on the ATPase activity of kidney microsomal fraction in the presence of Mg⁺⁺, K⁺ and Na⁺.

(T-M buffer; varies, Mg⁺⁺; 6 mM, K⁺; 10 mM Na⁺; 100mM, ATP; 3 mM, EDTA; 0.1 mM Microsomal fraction; 1 mg)

Table 3. The effect of K⁺ and Na⁺ on the ATPase activity of kidney microsomal fraction in the absence of Mg⁺⁺

Composition	Tube No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	F.C. (mM)
160 mM T-M 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)		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
100 mM KCl (ml)		0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	—	—	—	—	—	—
1 M NaCl (ml)		—	—	—	—	—	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	—
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
1 mM EDTA (ml)		0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Microsomal fraction 10mg protein/ml (ml)		0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	1(mg)
Distilled water (ml)		0.45	0.4	0.35	0.3	0.25	0.45	0.4	0.35	0.3	0.25	—
Pi (μM)		6.5	6.3	6.4	6.3	6.2	7.5	7.4	7.3	7.3	7.2	—

Table 4. The effect of Ca⁺⁺ on the ATPase activity of kidney microsomal fraction in the presence of Mg⁺⁺, K⁺ and Na⁺

Composition	Tube No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	F.C. (mM)
160 mM T-M 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
100 mM KCl (ml)		0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	—	—	—	—	—	10.0
1 M NaCl (ml)		—	—	—	—	—	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	100.0
100 mM CaCl ₂ (ml)		0.01	0.03	0.05	0.07	0.1	0.01	0.03	0.05	0.07	0.1	—
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
1 mM EDTA (ml)		0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
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	1 (mg)
Distilled water (ml)		0.29	0.27	0.25	0.23	0.2	0.29	0.27	0.25	0.23	0.2	—
Pi (μM)		24.5	22.2	21.3	19.4	19.0	18.4	15.7	14.3	12.7	12.2	—

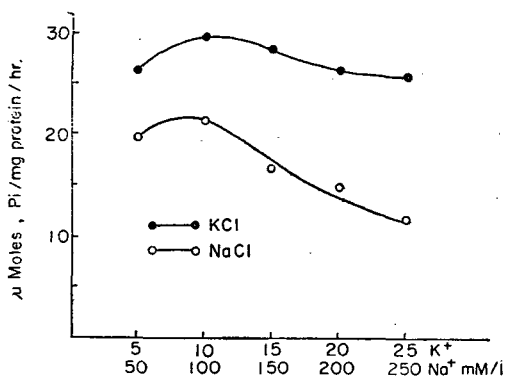


Fig. 3. The effect of K⁺ and Na⁺ on the ATPase activity of kidney microsomal fraction in the presence of Mg⁺⁺.

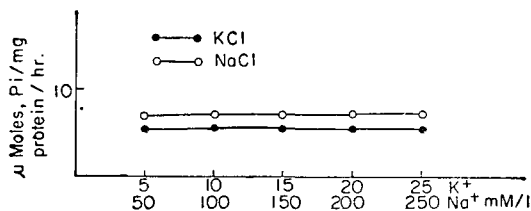


Fig. 4. The effect of Na⁺ and K⁺ on the ATPase activity of kidney microsomal fraction in the absence of Mg⁺⁺.

mM tris-maleate buffer 를 加하여 稀釋하였다. 各 cuvette 內에 分注된 各種 稀釋液의 容量 및 蛋白質含量은 제 1 표에 提示한 바와 같다.

Microsome 分割에 包含되어 있는 ATPase 에 의하여

ATP 로 부터 遊離된 無機磷酸(μM)量은 各各 材料를 달리한 6回 實驗成績의 平均值이다.

제 1 표 및 제 1 도에 提示된 바와 같이 ATPase 의 活性度는 蛋白質濃度 增加에 따라 增加하며 K⁺-activated ATPase 는 Na⁺-activated ATPase 보다 恒常 優位이었다.

2. pH 의 影響 : Incubation medium 의 T-M buffer 의

pH를 5.0~9.0으로變動시킴으로써 pH가 ATPase 活性化에 미치는影響을觀察하였다.

제 2 도에서 보는 바와 같이 ATPase 活性化는 pH의變動에影響을 받으며 pH가 7.2에서 活性化가 가장 높았다.

3. K⁺ 및 Na⁺의 影響: Microsome 分割의 蛋白質量과 Mg⁺⁺量을 一定하게 하고 Na⁺ 또는 K⁺의 濃度を變動하여 ATPase 에 依하여 遊離되는 無機磷酸量을 測定하여 제 2 표 및 제 3 도에 그 成績을 提示하였다.

K⁺ 및 Na⁺이 ATPase 活性化에 주는 影響은 10mM KCl, 100mM NaCl에서 가장 높았고, K⁺-activated ATPase 가 Na⁺-activated ATPase 보다 優位이었다.

4. Mg⁺⁺缺如시의 ATPase 活性化: Incubation medium 内の Mg⁺⁺을 除去하고 그때에 ATPase 가 K⁺ 및 Na⁺濃度の變動에 依하여 어떤 影響을 받는가를 觀察하였던바(제 3 표 및 제 4 도) Mg⁺⁺缺如시에는 K⁺ 및 Na⁺의 濃度 增加에 따라 ATPase 는 活性化되지 않

았을 뿐 아니라 이때에는 Na⁺-activated ATPase 가 K⁺-activated ATPase 보다 多少 優位이었다.

5. Ca⁺⁺의 影響: 이 實驗에 있어서는 microsome 分割 内の K⁺-activated ATPase 및 Na⁺-activated ATPase 가 Ca⁺⁺濃度 變化에 依하여 어떠한 影響을 받는가를 觀察하였는데 Ca⁺⁺濃度の 增加에 따라 ATPase 活性化는 減少되었다(제 4 표 및 제 5 도).

6. Ouabain의 影響: Microsome 分割 内の K⁺ 및 Na⁺-activated ATPase 가 Ouabain 에 依하여 어떠한 影響을 받는가를 觀察하였는데 이때 incubation medium 은 제 2 표에 提示된 組成과 同一하였으며 다만 Ouabain 을 添加하였을 뿐이다.

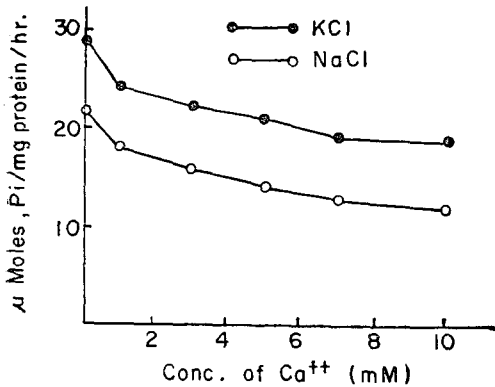


Fig. 5. The effect of Ca⁺⁺ on the ATPase activity of kidney microsomal fraction in the presence of Mg⁺⁺, Na⁺ and K⁺.

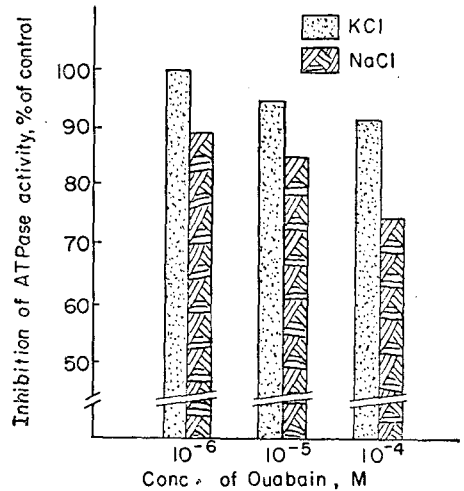


Fig. 6. The effect of Ouabain on the ATPase activity of kidney microsomal fraction in the presence of Mg⁺⁺, K⁺ and Na⁺.

(T-M buffer 32mM; Mg⁺⁺ 6mM; K⁺ 10 mM; Na⁺ 100 mM; ATP 3 mM; EDTA 0.1mM; microsomal fraction 1 mg)

Table 5. The effect of NaCN on the ATPase activity of kidney microsomal fraction in the presence of Mg⁺⁺, K⁺ and Na⁺

Composition	Tube No.											F.C. (mM)
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
160 mM T-M 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
100 mM KCl (ml)		0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	—	—	—	—	—	10.0
1 M NaCl (ml)		—	—	—	—	—	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	100.0
Various Conc. of NaCN (ml)		0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	5~50
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
1 mM EDTA (ml)		0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
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	1(mg)
Distilled water (ml)		0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	—
Pi (μM)		31.3	34.2	37.4	38.5	39.0	22.3	24.8	27.7	28.2	27.3	—

Table 6. The effect of NaF on the ATPase activity of kidney microsomal fraction in the presence of Mg^{++} , K^+ and Na^+

Composition	Tube No.	1	2	3	4	5	6	7	8	F.C. (mM)
160 mM T-M buffer(ml)		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	6.0
100 mM KCl (ml)		0.1	0.1	0.1	0.1	—	—	—	—	10.0
1 M NaCl (ml)		—	—	—	—	0.1	0.1	0.1	0.1	100.0
Various conc. of NaF (ml)		0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	2~8
30 mM ATP (ml)		0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	3.0
1 mM EDTA (ml)		0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Microsomal fraction 10 mg protein/ml(ml)		0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	1(mg)
Distilled water (ml)		0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	—
P_i (μM)		23.6	16.1	13.2	11.1	17.3	12.6	9.6	6.8	—

Ouabain에 의한 抑制現象을 對照群과 比較하여 보면 제 6도에서 보는 바와 같이 K^+ 및 Na^+ -activated ATPase 活性度는 共に Ouabain에 의하여 抑制되었는데 특히 Na^+ -activated ATPase 活性度가 더욱 顯著히 抑制되었다.

B. 新陳代謝 抑制物質이 microsomal ATPase 活性度에 미치는 影響:

1. NaCN의 影響: 이 實驗에 있어서는 microsome 分劃內의 K^+ 및 Na^+ -activated ATPase가 NaCN에 의하여 어떠한 影響을 받는가를 觀察하였는데 NaCN 濃度を 5 mM에서 50 mM까지 增加시키면 따라 ATPase 活性度가 漸次 增加하는 傾向이 있었다(제 5표 및 제 7도).

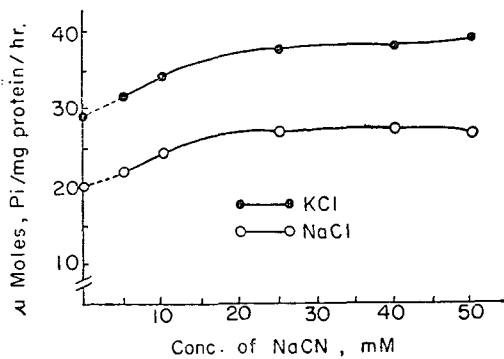


Fig. 7. The effect of NaCN on the ATPase activity of kidney microsomal fraction in the presence of Mg^{++} , K^+ and Na^+ .

2. NaF의 影響: Microsome 分劃內의 K^+ 및 Na^+ -activated ATPase 活性度에 미치는 NaF의 影響을 보면 제 6표 및 제 8도에서 보는 바와 같이 NaF 濃度を 2 mM에서 8 mM로 增加함에 따라 ATPase 活性度는

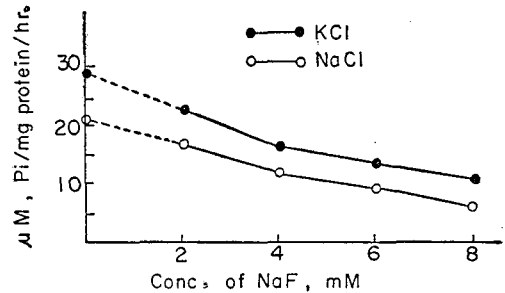


Fig. 8. The effect of NaF on the ATPase activity of kidney microsomal fraction in the presence of Mg^{++} , K^+ and Na^+ .

顯著히 減少되었다.

3. IAA의 影響: Microsome 分劃內의 K^+ 및 Na^+ -activated ATPase 活性度에 미치는 IAA의 影響을 觀察하였는데 incubation medium은 제 5표에 提示된 組成中 NaCN을 IAA로 代置한 것이다. IAA에 의한 抑制現象을 對照群과 比較하여 보면

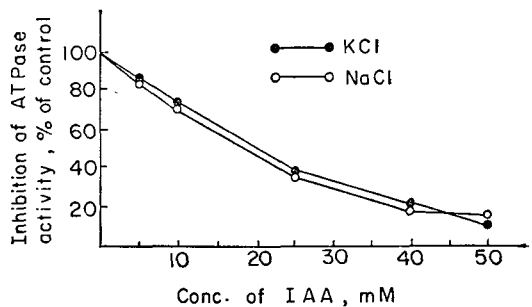


Fig. 9. The effect of IAA on the ATPase activity of kidney microsomal fraction in the presence of Mg^{++} , K^+ and Na^+ .

제 9도에서 보는 바와 같이 K^+ 및 Na^+ -activated ATPase 活性度는 共히 IAA 에 依하여 顯著히 抑制되였으며 50 mM 의 IAA 濃度에서 K^+ 및 Na^+ -activated ATPase 活性度는 對照群值의 10% 内外에 不過하였다.

4. DNP 의 影響: Microsome 分劃內의 K^+ - Na^+ -activated ATPase 의 活性度에 미치는 DNP 의 影響을 보면

DNP 濃度 $5 \times 10^{-6}M$ 에서 $10^{-3}M$ 範圍內에서는 microsomal ATPase 活性度에 아무런 影響을 주지 않았다. (제 10도).

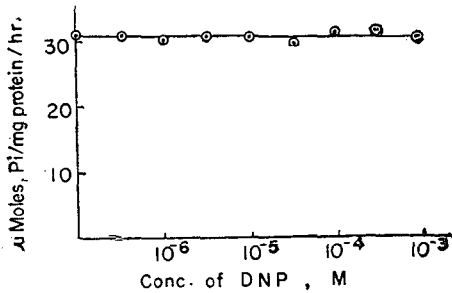


Fig. 10. The effect of DNP on the ATPase activity of kidney microsomal fraction in the presence of Mg^{++} , K^+ and Na^+ .

(T-M buffer 32 mM; Mg^{++} 6 mM; K^+ 10 mM; Na^+ 100 mM; ATP 3 mM; EDTA 0.1 mM; M-F; 1mg)

C. 腎細尿管細胞의 透過性을 變化시키는 몇가지 藥物 OI microsomal ATPase 活性度에 미치는 影響:

Diamox, vasopressin, d-aldosterone 및 $HgCl_2$ 등이 ATPase 活性度에 미치는 影響을 實驗하였는데 K^+ - Na^+

Table 7. Effect of various compounds on the ATPase activity of kidney microsomal fraction in the presence of Mg^{++} , K^+ and Na^+

Compound	Relative ATPase activity (%)
Control	100
Diamox 1.5mM	97±4.5
Diamox 15mM	101±4.2
Vasopressin 0.1u/l	99±3.5
Vasopressin 0.5u/l	98±2.9
d-aldosterone $5 \times 10^{-6}M$	104±3.2
d-aldosterone $5 \times 10^{-7}M$	96±3.7
$HgCl_2$ $10^{-3}M$	40.4±2.9
$HgCl_2$ $10^{-4}M$	61.2±3.6

Activity in the control preparation is taken as 100%. Results are expressed as mean ± standard error.

T-M buffer 32 mM; Mg^{++} 6 mM; K^+ 10 mM; Na^+ 100 mM; ATP 3 mM; EDTA 0.1 mM; microsomal fraction 1 mg

activated ATPase 의 活性度는 Diamox, vasopressin 및 d-aldosterone 등에 依해서는 影響을 받지 않았으나 $HgCl_2$ 에 依하여는 顯著히 抑制되였다(제 7표).

考 察

家兎腎臟의 microsome 分劃에 依하여 ATP 로 부터 無機磷酸을 遊離시켰으므로 미루어 보아(제 1도), 이 分劃內에 ATPase 가 存在함을 알수 있다. 本研究 成績에 依하면 이 ATPase 는 Mg^{++} 存在下에서 Na^+ 또는 K^+ 에 依하여 共히 活性化되나 Na^+ 보다는 K^+ 에 依해서 더욱 強力하게 活性化됨을 알수 있었다. 이와 같이 Mg^{++} 存在下에서만 K^+ 및 Na^+ 에 依하여 ATPase 가 活性化됨은 ATP- Mg^{++} -ATPase 複合體를 于先 形成한 後 ATP 加水分解反應이 일어나는 것으로 생각된다.¹³⁾

K^+ 및 Na^+ 에 依해서 活性化되는 腎臟組織內 ATPase 는 KCl 10 mM, NaCl 100 mM 에서 各各 가장 높은 값을 나타내고 있었는데(제 3도), 心臟이나 骨格筋內 ATPase 는 KCl 100 mM 및 NaCl 100 mM 에서 가장 높다고 하므로²¹⁾ ATPase 를 活性化하는 K^+ 의 最適濃度는 組織에 따라 差異가 있다고 생각된다.

한편 心臟 microsome 分劃에서 分離된 ATPase 는 Mg^{++} 存在下에서 Ca^{++} 에 依하여 그 活性도가 低下되나 Mg^{++} 缺如時에는 Ca^{++} 에 依하여 ATPase 의 活性도가 더욱 커진다고 하는데¹⁷⁾ 腎臟 microsome 分劃을 사용한 本實驗에서도 Mg^{++} 存在下에 Na^+ 및 K^+ -activated ATPase 의 活性도는 Ca^{++} 에 依해서 低下되였다(제 5도). 이와 같은 Ca^{++} 의 抑制作用은 아마도 Mg^{++} 과 Ca^{++} 이 相競的으로 作用함에 그 原因이 있지 않나 생각되나 앞으로 더욱 研究할 課題라고 생각된다.

Cardiac glycoside 의 하나인 Ouabain 은 Na^+ - K^+ activated ATPase 를 抑制한다고 알려져 있는바 腎臟 microsome 分劃에 含有된 ATPase 에 對하여도 $10^{-4}M$ 의 濃度에서 顯著한 抑制作用을 보였으며, 이와 같은 抑制作用은 KCl medium 에서 보다 NaCl medium 에서 特히 顯著하였다(제 6도). 이와 같은 現象은 개(犬) 心臟의 sarcoplasmic reticulum fragments(SRF)에 依한 Ca^{++} 攝取過程이 KCl medium 에서 보다는 NaCl medium 에서 더욱 Ouabain 에 依하여 抑制된다는 Lee & Choi²³⁾ 의 報告와 一致한다.

代謝抑制物質인 NaCN 은 ATPase 活性度を 增加시켰는데, 이때 5 mM 에서 40 mM 로 NaCN 濃도가 增加함에 따라 ATPase 活性도는 漸次 增加되었으나 그 以上の 濃度에서는 ATPase 活性도는 더욱 增加하지 않았다(제 7도). NaCN 은 cytochrome system 의 酵素의 機能을 抑制하여 Na^+ 의 能動的移動을 抑制하고 있으나^{24, 25)}

microsome 分劃에서는 도리어 Na^+ 및 K^+ -activated ATPase의 活性도를 亢進시켰는바 이는 매우 解釋하기 困難하며 앞으로 研究할 興味있는 課題라고 생각된다.

한편 NaF는 赤血球에 作用하여 解糖作用을 抑制함으로써 ATP 生成을 防止하여 Na^+ 및 K^+ 의 能動的移動을 抑制한다고 한다.²⁶⁾ 本實驗에서도 2mM의 NaF는 Na^+ 및 K^+ -activated ATPase를 强하게 抑制하였으며, 이와 같은 抑制作用은 NaF의 濃도에 比例하였다(제8도) NaF와 마찬가지로 解糖作用을 抑制한다고 알려진 物質의 하나인 IAA도 亦是 ATPase 活性도를 顯著하게 抑制하였는데(제9도) 이와같은 事實은 Na^+ 과 K^+ 에 依한 ATPase의 活性도는 解糖過程과 一連의 關係가 있음을 暗示한다고 解釋된다.

Mitochondria에서 DNP가 ATPase의 活性도를 刺戟한다는 事實은 이미 알려진 바이나²⁷⁾ Electrophorus electricus의 電氣器官의 microsome 分劃에서는 Na^+ - K^+ activated ATPase나 Na^+ -activated ATPase의 活性도에 DNP는 아무런 影響도 주지 않는다고 한다.²⁸⁾ 本研究에서 얻은 成績을 보면, 腎臟에서 分離한 microsome 分劃에서는 DNP($5 \times 10^{-6}\text{M}$ 에서 10^{-3}M)는 亦是 Na^+ - K^+ activated ATPase의 活性도에 아무 影響도 주지 않았다(제10도).

Diamox는 炭酸脫水酵素의 作用을 抑制하여 炭酸의 合成을 抑制함으로써 그 結果 H^+ 의 生成을 減少시켜 間接적으로 腎細尿管에서의 Na^+ 再吸收을 低下시킴으로써 利尿를 일으키는 物質인데²⁹⁾ 개구리 피부표본에서는 Na^+ 의 能動的移動을 抑制한다고 한다.³⁰⁾ 따라서 腎細尿管에서도 或是 Diamox가 Na^+ 의 能動的再吸收過程에 直接 關與할 수 있는 可能性도 있으나 本研究 成績을 보면 Diamox(1.5~15mM)는 腎臟의 Na^+ - K^+ activated ATPase 活性도에는 아무런 影響도 주지 않았다(제7표). 이와같은 事實은 Diamox가 腎細尿管에서의 Na^+ 의 能動的再吸收過程(특히 Na^+ - K^+ activated ATPase가 參與하는 過程)에 直接 關與하여 利尿를 招來하는 것이 아님을 다시 立證한다고 생각된다.

Frazier et al.³¹⁾은 vasopressin이 두꺼비 膀胱에서 Na^+ 에 對한 透過性을 增加시킨다고 하였으며, 또 Sharp et al.³²⁾ 및 Grabbe³³⁾ 등은 aldosterone도 vasopressin처럼 두꺼비 膀胱에서 Na^+ 의 透過性을 增加시키는 作用이 있다고 暗示하였다. 그런데 本實驗에서 보면 vasopressin이나 aldosterone은 家兔腎臟의 microsomeal ATPase에 아무런 影響이 없었는데(제7표), 이런 事實로 미루어 보아 적어도 家兔에서는 vasopressin과 aldosterone의 作用은 Na^+ - K^+ ATPase에 依存하고 있지 않는 것으로 생각된다.

Electrophorus electricus의 電氣器官의 microsome 分劃에서 SH reacting compound인 iodoacetamide 등은 ATPase의 作用을 顯著하게 抑制하고 있다.²⁸⁾ 한편 Taylor³⁴⁾는 腎臟의 cell debris 分劃에서 IAA가 ATPase에 아무런 影響을 미치지 않는다고 하였으나 前述한 바와 같이 著者は Taylor가 使用한 10^{-3}M 의 IAA로서는 microsomeal ATPase에 對한 抑制作用을 보지 못하였으나 그 以上の 濃도에서는 顯著한 抑制作用이 나타나는 것을 觀察하였다(제9도). 이와같은 IAA의 ATPase 抑制作用은 前述한 바와 같이 ATPase의 活性化와 解糖過程間에 一連의 關係가 있다고도 解釋되나, 한편으로는 IAA가 microsome 分劃內的 ATPase의 SH基와 結合하여 그 作用을 抑制한다고도 생각할 수 있다. 그 證據로서 近位細尿管에서 Na^+ 再吸收에 關與하는 酵素의 SH基와 結合하므로써 該酵素의 機能을 抑制하여 利尿를 일으키는 水銀利尿劑^{35,36)}가 10^{-3}M 濃度에서 Na^+ - K^+ activated ATPase에 對하여 顯著한 抑制作用을 나타냈음을 들 수 있다(제7표). 이와 같은 一連의 事實은 IAA나 HgCl_2 같은 SH-reacting compound는 SH-ATPase의 SH基와 結合함으로써 ATP의 分解를 抑制하고 있는 것을 暗示한다고 하겠다.

結 論

家兔腎臟 microsome 分劃內 ATPase 活性도에 미치는 Mg^{++} , Ca^{++} , Na^+ , K^+ , Ouabain 및 新陳代謝抑制物質과 腎細尿管細胞의 透過性을 變化시키는 몇 가지 藥物의 影響을 觀察하여 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. 腎臟 microsome 分劃內에 包含되어 있는 蛋白質質量을 增加함에 따라 ATPase의 活性도는 이에 比例하여 增加되었다.

2. 腎臟 microsome 分劃內的 ATPase 活性도는 10mM KCl 및 100mM NaCl에서 가장 높았으며, 이 ATPase 活性도는 Mg^{++} 存在時에 Ca^{++} 에 依하여 抑制되었다.

3. Ouabain은 microsomeal ATPase 活性도를 抑制하였으며 이와 같은 抑制效果는 특히 NaCl medium에서 顯著하였다.

4. 腎臟 microsomeal ATPase 活性도는 NaCN에 依하여 오히려 亢進되었으나 NaF와 IAA에 依하여는 顯著히 抑制되었고 DNP에 依하여는 아무런 影響도 받지 않았다.

5. 腎臟 microsomeal ATPase 活性도는 Diamox, vasopressin 및 aldosterone 등에 依하여 影響받지 않았으나 HgCl_2 에 의하여 顯著히 抑制되었다.

以上の 事實로 보아 腎臟 microsomeal ATPase는 心

臟과 筋肉 等 臟器의 ATPase 와 類似한 點이 있으나 臟器의 種類에 따르는 特異性도 있는 것으로 생각된다.

(本 研究을 始終 指導하고 鞭撻하여 주신 洪錫基 教授와 高日燮 助教授께 感謝한다. 또한 本 研究에 物心兩面으로 協助하여준 畏友 崔信貞 助教授께 深甚한 謝意를 表한다.)

REFERENCES

- 1) Maizels, M.: *Cation control in human erythrocytes. J. physiol.* 108:247~263, 1949.
- 2) Glynn, I.M.: *The ionic permeability of the red cell membrane. Progress in Biophysics* 8:241~307, 1957.
- 3) Hoffmann, J.F.: *The link between metabolism and the active transport of Na in human red cell ghosts. Fed. Proc.* 19:127, 1960.
- 4) Skou, J.C.: *The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves. Biochim. biophys. Acta* 23:394~401, 1957.
- 5) Skou, J.C.: *Preparation from brain and kidney of the enzyme involved in active transport of Na⁺ and K⁺. Biochim. biophys. Acta* 58:314~325, 1962.
- 6) Skou, J.C.: *Further investigations on Mg⁺⁺, Na⁺-activated ATPase, possibly related to the active, linked transport of Na⁺ and K⁺ across the nerve membrane. Biochim. biophys. Acta* 42:6~23, 1960.
- 7) Järnefelt, J.: *Sodium-stimulated adenosine-triphosphatase in microsome from rat brain. Biochim. biophys. Acta* 48:104~112, 1961.
- 8) Aldridge, W.N.: *Adenosine triphosphatase in the microsomal fraction from rat brain. Biochem. J.* 83:527~533, 1962.
- 9) Post, R.L., Merritt, C.R., Kinsolving, C.R., and Albright, D.D.: *Membrane adenosine triphosphatase as a participant in the active transport of sodium and potassium in the human erythrocytes. J. Biol. Chem.* 235:1796~1802, 1960.
- 10) Dunham, E.T.C., and Glynn, I.M.: *Adenosine triphosphatase activity and the active movement of alkali metal ions. J. Physiol.* 156:274~293, 1961.
- 11) Emmelot, P., and Bos, C.J.: *Adenosine triphosphatase in the cell-membrane fraction from rat liver. Biochim. biophys. Acta* 58:374~375, 1962.
- 12) Taylor, C.B.: *Cation stimulation of an ATPase system from the intestinal mucosa of the guinea pig. Biochim. biophys. Acta* 60:437~440, 1962.
- 13) Wheeler, K.P., and Whittam, R.: *Some properties of a kidney adenosine triphosphatase relevant to active cation transport. Biochem. J.* 85:495~507, 1962.
- 14) Glynn, I.M.: *Activation of adenosine triphosphatase activity in a cell membrane by external potassium. and internal sodium. J. Physiol.* 160:18~19, 1962.
- 15) Whittam, R.: *The asymmetrical stimulation of a membrane adenosine triphosphatase in relation to active cation transport. Biochem. J.* 84:110~118, 1962.
- 16) Auditore, J.V.: *Sodium-potassium activated g-strophanthin sensitive ATPase in cardiac muscle. Proc. Soc. Exper. Biol. Med.* 110:595~597, 1962.
- 17) Lee, K.S., and Yu, D.H.: *A study of the sodium and potassium-activated ATPase activity of heart microsomal fraction. Biochem. Pharmac.* 12:1253~1264, 1964.
- 18) Schwartz, A., and Laseter, A.: *A sodium and potassium stimulated adenosine triphosphatase from cardiac tissue. II. Biochim. Pharmac.* 13:337~348, 1964.
- 19) Schwartz, A., and Laseter, A.: *A sodium and potassium stimulated adenosine triphosphatase from cardiac tissues. III. Biochim. Pharmac.* 13:921~934, 1964.
- 20) Inesi, G., Ebashi, S., and Watanabe, S.: *Preparation of vesicular relaxing factor from bovine heart tissue. Am. J. Physiol.* 207:1339~1344, 1964.
- 21) 崔信貞, 洪起煥, 金奎泰: 家兔心臟 및 骨格筋에서 分離한 microsome 分割內 ATPase 活性化에 對한 Mg⁺⁺, Ca⁺⁺, Na⁺ 및 K⁺의 영향. 大韓藥理學雜誌 2:31~40, 1966.
- 22) Fiske, C.H., and Subbarow, Y.: *The colorimetric determination of phosphorus. J. Biol. Chem.* 66:375~400, 1925.

- 23) Lee, K.S., and Choi, S.J.: *Effects of the cardiac glycosides on the Ca^{++} uptake of cardiac sarcoplasmic reticulum.* *J. Pharmac. & exp. Therapeutics.* 153:114~120, 1966.
- 24) Conway, E.J.: *Nature and significance of concentration relations of potassium and sodium ions in skeletal muscle.* *Physiol. Revs.* 37:84~132, 1957.
- 25) Carey, M.J., Conway, E.J., and Kernan, R.P.: *Secretion of sodium ions by the frog's sartorius.* *J. Physiol.(London).* 148:51~82, 1959.
- 26) Wilbrandt, W.: *Pflügers Arch. ges. Physiol.* 243:519, 1940.
Cited from H. Passow und S. Lepke(Hamburg): *Die Rolle des Magnesiums beim Kaliumverlust fluoridvergifteter Menschenerthrocyten.* *Pflügers Archiv, Band 270, Heft 1(1959), S. 63~64.*
- 27) Hogeboom, C.H., Colowick, S.P., and Kaplan, N.O.: *Methods in Enzymology.* Academic Press, New York, 1:16~51, 1955.
- 28) Glynn, I.M.: *Transport adenosine triphosphatase in electric organ. The relation between ion transport and oxidative phosphorylation.* *J. Physiol.* 169:452~465, 1963.
- 29) Goodman, L.S., and Gilman, A.: *The pharmacological basis of therapeutics.* 3rd ed. 839~840, Macmillan, New York. 1965.
- 30) 洪碭基, 鄭令愛, 朴春植: *Diamox가 개구리 皮膚의 Na 移動에 미치는 영향.* 大韓生理學會 學術大會 抄錄集 18:3, 1966.
- 31) Frazier, H., Dempsey, E.F., and Leaf, A.: *Movement of sodium across the mucosal surface of the isolated toad bladder and its modification by vasopressin.* *J. Gen. Physiol.* 45:529~543, 1962.
- 32) Sharp, G.W.G., and Leaf, A.: *Studies on the biological action of aldosterone in vitro.* *J. Clin. Invest.* 42:978, 1963.
- 33) Grabbe, J.: *Second symposium on water and electrolyte metabolism.* Amsterdam.: Elsevier, 1964.
- 34) Taylor, C.B.: *The effect of mercurial diuretics on adenosine triphosphatase of rabbit kidney in vitro.* *Biochem. Pharmac.* 12:539~550. 1963.
- 35) Wedeen, R.P., and Goldstein, M.H.: *Renal tubular localization of chlormerodin labeled with mercury 203 by autoradiography.* *Science,* 141:438~440, 1963.
- 36) Farah, A., and Kruse, R.: *The relation of mercurial diuresis to cellular protein bound sulfhydryl changes in renal cells.* *J. Pharmac. exp. Ther.,* 130:13~19, 1960.