Saponin이 토끼 적혈구막의 Na^+-K^+-ATPase의 활성도에 미치는 영향

경희대학교 의과대학 생리학교실

강 병 남·고 일 섭

=Abstract=

Effect of Saponin on Sodium-Potassium activated ATPase in Rabbit Red Cell Membrane

Byoung Nam Kang and Il Sup Koh

Department of Physiology, School of Medicine, Kyung Hee University
Seoul, Korea

The effect of saponin on the sodium plus potassium activated ATPase activity was studied in the rabbit red cell ghosts and the experiments were also designed to determine the mechanism of action of saponin on the APTase activity. The following results were observed.

1. The ATPase activity of rabbit red cell ghosts is inhibited by low concentration of saponin but increased by high concentration. The activating effect of saponin on the Na^+-K^+-ATPase activity is inhibited by ouabain but the stimulation of the Mg^{++}-ATPase by high concentration of saponin is not inhibited by ouabain.

2. The activity ratio of Na^+-K^+-ATPase by high concentration of saponin is decreased by raising the potassium concentration, and is increased by raising the sodium concentration.

3. The ATPase activity is increased by small amounts of calcium but inhibited by larger amounts. The activity ratio of the enzyme by saponin is decreased by raising the calcium concertration

4. The action on the ATPase activity was not related to the amino group of lysine, the hydroxyl group of threonine, the imidazole group of histidine, or the carboxyl group of aspartic acid.

5. The action of saponin on the ATPase activity is due to sulfhydryl group of the enzyme of Na^+-K^+-ATPase.

서 론

사람 적혈구막에서 K이온을 세포막 내로 Na이온을 막 외로 이동하는 것은 해당작용에서 유리되는 에너지를 사용하고 있다는 사실은 널리 알려져 있다[1~3].

세포막에서 Na이온과 K이온을 능동적으로 운반하는 이온의 펌푸작용과 게의 신경에서 분리한 microsomal 분획에서 Na이온과 K이온이 동시에 있을때 활성화하는 ATPase의 활성도는 서로 밀접한 관계가 있다고 Skou[4]가 처음으로 암시한 후 적혈구막으로 한 실험에서도 세포막 외에 K이온이 있고 세포막 내에 Na이온이 있을때 활성화되는 ATPase와 세포막에서 Na이온과 K이온의 능동적 운반과는 서로 밀접한 관련을 가지고 있다는 것을 제시하고 있는 것이다[5,6]. 또한 cardiac glycosides는 세포막에서 양이온의 능동적 운반을 억제하고 Na이온과 K이온으로 활성화되는 ATPase의 활성도도 억제하므로 이온의 능동적 운반과 이 ATPase와는 서로 밀접한 연결을 가지고 있다고 주장되어 왔다[7~9]. 세포막에서 이온의 능동적 운반과 밀접한 관계를 가진 세포막 내의 Na이온과 K이온으로 활성화되는 ATPase의 활성도에 대한 청조제의 작용에 대하여 서

는 DOC[10]와 laryl sulfate[11]의 작용은 알려져있다. 즉 DOC는 낮은 농도에서 Mg^{++}-ATPase의 활성도를 억제하나 Na^+-K^+ATPase의 활성도에는 아무 작용이 없다. 그러나 높은 농도에서는 Na^+-K^+-ATPase의 활성도를 억제한다. Laryl sulfate는 0.5%의 농도에서 Na^+-K^+-ATPase의 활성도를 완전히 억제한다. 그러나 같은 청조제인 saponin이 이 ATPase의 활성도에 대한 작용은 알려져 있지 않음으로 본 실험에서는 saponin의 작용을 알고져 토끼 적혈구로 ghost 세포를 만들어 세포막 만을 분리하여 세포막 내의 Na이온과 K이온으로 활성화되는 ATPase의 활성도에 대한 saponin의 작용을 규명하고 그 작용하는 기전도 아울러 실험하였다.

실 험 방 법

1) Ghost의 제조

체중 2 kg 내외의 성숙한 토끼를 성의 구별없이 사용하였다. 심장천자로 얻은 혈액을 heparin으로 응고를 방지하여 15분간 1,000 g로 원심분리한 다음 혈장과 백혈구층을 제거하고 생리식염수로 2회 세척하고 다시 등장성 $MgCl_2$용액에 1mM EDTA를 함유한 용액으로 2회 세척하였다.

이렇게 세척된 적혈구 만을 모아 Rosenberg[12]등의 방법에 따라서 30배용량의 15 mOsM Tris-HCl buffer (pH 7.5, 8.5 mM Tris-6.5 mM HCl 혼합액)을 가하여 4°C에서 한시간동안 방치하였다.

이렇게 용혈된 적혈구를 4°C에서 10,000 g로 15분간 원심분리한 다음 상등액을 제거하여 막분획 만을 얻었다. 침전된 막분획을 다시 같은 조작으로 15 mOsM Tris-HCl buffer 용액에 1 mM EDTA를 혼합한 용액으로 2회 원심조작으로 세척한 다음 15 mOsM Tris-HCl buffer pH 7.5로 1회 세척하였다. 이렇게 해서 얻은 막분획을 혈색소의 부착이 없는 유백색의 막분획을 본 실험에 사용하였다.

2) Na^+-K^+-ATPase의 활성도

ATPase의 활성도는 Dunham[9]의 방법에 따라서 측정하였다. 10 ml의 여러 실험관 내에 막분획과 반응액을 각각 0.1 ml씩을 첨가하여 총량의 10분의 1이 되도록 증류수로 조절하고 반응액의 총량을 1 ml로 하여 44°C에서 한시간동안 water bath에 부치하였다. 막분획과 반응액에 마지막으로 ATP를 첨가하였을 때부터 반응이 시작되는 점으로 하고 한시간동안 반응이 진행된 다음 각 실험관을 15초 간격으로 얼음으로 냉각된 물속으로 옮겨서 일분간 냉각시킨 다음 다시 냉각된 10% trichloracetic acid를 1 ml씩을 가하여 반응을 정지 시켰다. 각 실험관은 다시 15분간 1,000 g로 원심분리하여 단백질을 침전시키고 그 상등액 1.5 ml를 채취하여 이 상등액 내에 유리된 inorganic phosphate를 Fiske Subbarow[13]법에 의하여 측정하여 ATPase의 활성도로 나타내었다.

3) 시 약

본 실험에 사용된 주요 시약은 다음과 같다. ATP는 Sigma chemical Co. 제제를 Tris(Tris-hydroxymethylaminomethane)는 Fisher 제를 사용하였다. NaCl, KCl, $MgCl_2$, saponin은 Merck 제를 ouabain은 U.S.P. 제를 각각 사용하였다.

실 험 성 적

1. Saponin 농도의 영향

반응액 내의 saponin의 농도를 0에서 150 mg%까지 증가시켜서 Na^+-K^+-ATPase의 활성도에 미치는 영향을 제 1 도에 표시하였다.

Saponin은 낮은 농도에서 Na^+-K^+-ATPase의 활성도를 억제하나 높은 농도에서는 활성도를 촉진시키는 양상성효과를 나타냈다. Saponin의 억제작용의 최적농도는 10 mg%이고 촉진작용의 최적농도는 50 mg%이다.

2. Ouabain의 영향

Na이온과 K이온으로 활성화되는 ATPase의 활성도에 촉진작용을 나타내는 saponin의 작용에 대한 ouabain의 영향과 Mg이온으로 활성화되는 ATPase에 대한 saponin의 효과도 아울러 제 2 도에 표시하였다.

Saponin 50 mg%를 Mg^{++}-ATPase에 작용하여 그 활성도를 촉진시키는 작용이 있다. Saponin으로 촉진된 Mg^{++}-ATPase의 활성도는 ouabain으로 억제되지 않는다. 그러나 saponin으로 촉진된 Na^+-K^+-ATPase의 활성도는 ouabain으로 억제되었다. Saponin으로 촉진된 Na^+-K^+-ATPase의 활성도는 세포막에서 이온의 능동적 운반을 특이하게 억제하는 ouabain에[7,14~16] 억제되므로 saponin은 세포막의 이온의 능동적 운반을 촉진시키는 작용을 가지고 있다는 것을 암시하고있다.

3. K이온 농도의 영향

반응액 내의 K이온의 농도를 0에서 32 mM까지 변동을 시켜서 Na^+-K^+-ATPase의 활성도의 변동과 50 mg%의 saponin을 첨가하였을 때의 영향을 비교하여

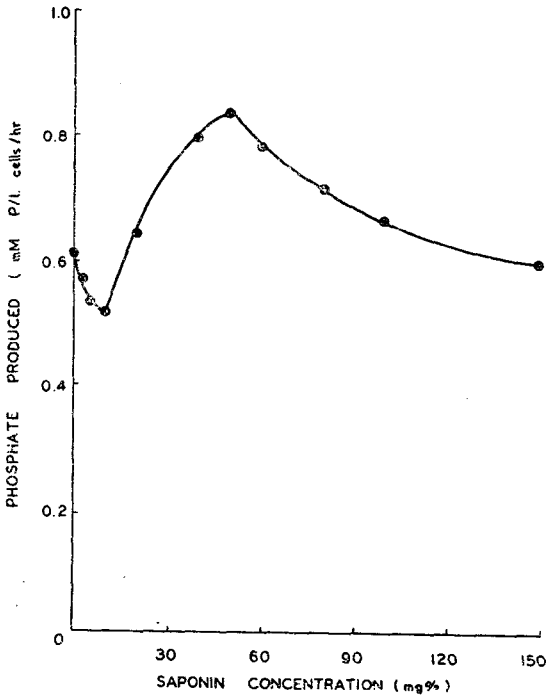

Fig. 1. The effect of saponin concentration on the ATPase activity of red cell ghosts. Temp. 44°C; pH 7.4; ATP 1.5 mM; Mg 2 mM; Na 80 mM; K 17mM; Tris-HCl 200 mM. Duration 1 hr.

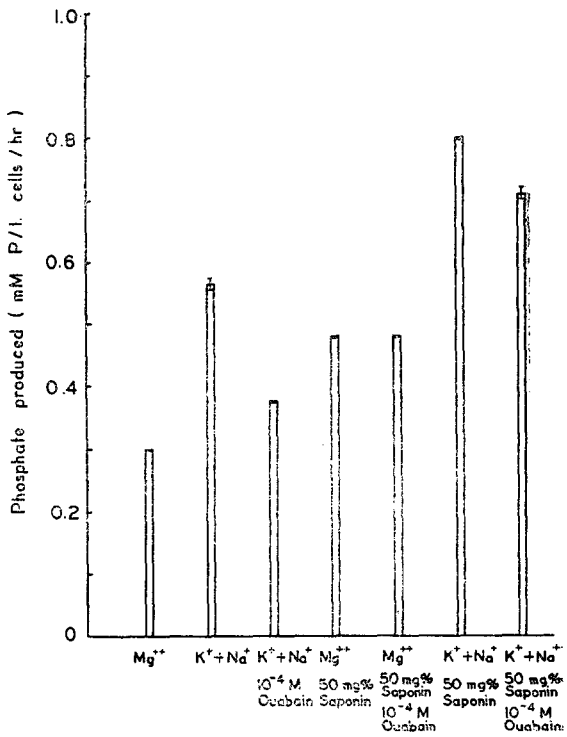

Fig. 2. The effect of ouabain in the presence of saponin on the ATPase activity of red cell ghosts. Temp. 44°C; pH 7.4; ATP 1.5mM; Mg 2 mM; Na 80 mM; K 17 mM; Tris-HCl 200 mM; saponin 50 mg%; ouabain 10^{-4}M. Duration 1 hr.

제 3 도에 표시하였다. 반응액 내의 Na 이온의 농도를 80 mM 로 일정하게 유지하고 K 이온의 농도를 증가시키면 농도의 증가에 따라서 Na^+-K^+-ATPase 의 활성도도 증가되나 K 이온의 농도가 4 mM 에 도달하면 그 이상 이효소의 활성도는 증가되지 않았다. Saponin 의 작용으로 이 효소의 활성도의 증가율은 낮은 농도에는 높아지고 K 이온의 농도가 증가되는데 따라서 증가율은 감소되었다(제 1 표).

4. Na 이온의 농도의 영향

반응액 내의 Na 이온의 농도를 0에서 320 mM 까지 증가시켜서 농도증가에 따라 Na^+-K^+-ATPase 의 활성도의 변동과 saponin 의 작용의 변도를 관찰한 실험을 제 4 도에 표시하였다. 이 실험에서 반응액내의 K 이온의 농도를 17 mM 로 일정하게 유지하고 Na 이온의 농도만을 증가시키면 Na^+-K^+-ATPase 의 활성도는 Na 이온의 농도를 증가하는데 따라서 증가되나 Na 이온의 농도가 80 mM 에 도달하면 활성도는 더 증가하지 못하

Table 1. The effect of potassium conentration on stimulation by saponin of the ATPase activity of red cell ghosts.

K conc. (mM)	Total ATPase activity (mM P/l. cells/hr)	Activity in the presence of saponin(50mg%)	Activation (%)
0.5	0.585	0.819	40.0
2	0.634	0.887	40.0
4	0.682	0.906	32.9
8	0.702	0.926	31.9
16	0.722	0.946	31.1
32	0.722	0.946	31.1

Temp. 44°C; pH 7.4; ATP 1.5 mM; Mg 2mM; Na 80 mM; Tris-HCl 200 mM. Duration 1 hr.

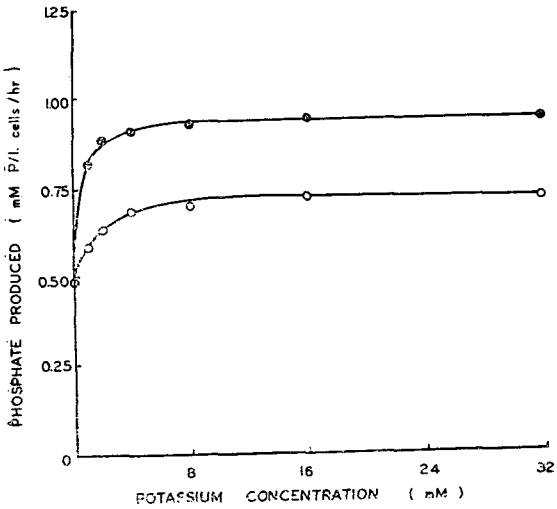

Fig. 3. The effect of potassium concentration on the ATPase activity of red cell ghosts in the presence and absence of saponin. Na 80 mM; ○ saponin absent; ● saponin 50mg%

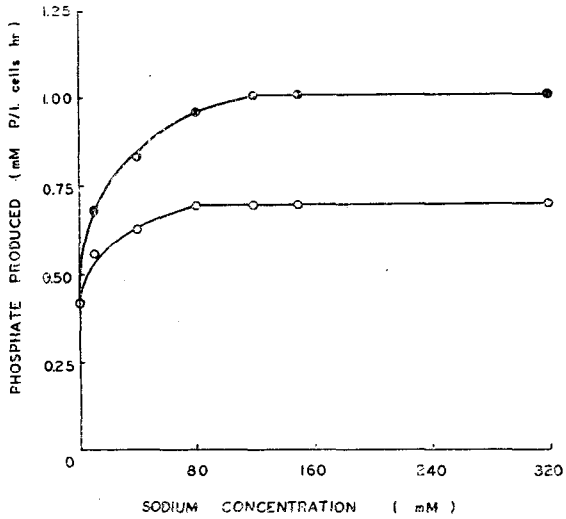

Fig. 4. The effect of sodium concentration on the ATPase activity of red cell ghosts in the presence and absence of saponin. Na 17 mM; ○ saponin absent; ● saponin 50 mg%.

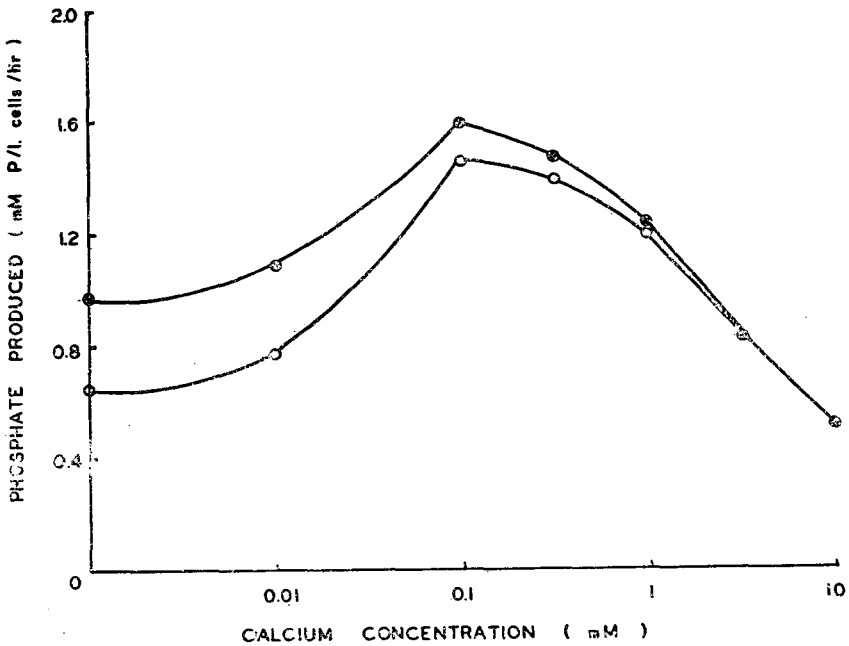

Fig. 5. The effect of calcium concentration on the ATPase activity of red cell ghosts in the presence and absence of saponin. Temp. 44°C; pH 7.4; ATP 1.5 mM; Mg 2 mM; K 17 mM; Na 80 mM. Duration 1 hr. ○ saponin absent; ● saponin 50 mg%.

Table 2. The effect of sodium concentration on stimulation by saponin of the ATPase activity of red cell ghosts.

Na conc. (mM)	Total ATPase activity (mM P/1.cells/hr)	Activity in the presence of saponin(50mg%)	Ativation (%)
10	0.558	0.681	21.9
40	0.628	0.838	33.3
80	0.698	0.960	37.5
120	0.698	1.047	50.0
150	0.698	1.047	50.0
300	0.698	1.065	52.5

Temp. 44°C; pH 7.4; ATP 1.5 mM; Mg 2 mM; K 17 mM. Duration 1 hr.

였다. saponin을 작용시킨데서는 Na이온의 농도가 120 mM에 도달하면 활성도는 더 증가하지 못하고 일정한 값을 유지하였다.

Saponin의 작용으로 이 효소의 활성도의 증가율은 Na이온의 농도가 낮은데서는 감소되고 농도의 증가에 따라서 증가율은 증가되었다(제 2 표).

5. Ca 이온의 농도의 영향

반응액 내의 Ca이온의 농도를 0에서 10 mM 까지 증가 시키면서 Na^+-K^+-ATPase의 활성도의 변동과 saponin의 작용의 변동을 제 5 도에 표시하였다.

반응액 내의 Ca이온의 농도를 변동하는데 따라서 Na^+-K^+-ATPase의 활성도는 영향을 받으며 Ca이온의 농도가 낮은데서는 이 효소의 활성도는 증가되고 농도가 높으면 활성도는 억제되었다. Na^+-K^+-ATPase의 활성도를 증가시키는 Ca이온의 최적농도는 0.1 mM이다.

Ca이온의 농도를 증가시키는데 따라서 saponin의 작용으로 나타나는 이 효소의 활성도의 증가율은 감소하였다. 높은 농도의 Ca이온은 Na^+-K^+-ATPase의 활

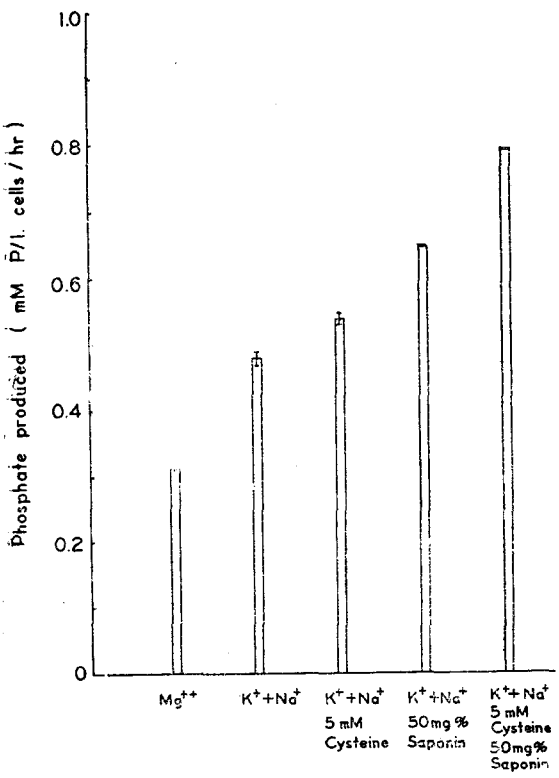

Fig. 6. The effect of cysteine in the presence of saponin on the ATPase activity of red cell ghosts. Temp. 44°C; pH 7.4; ATP 1.5 mM; Mg 2 mM; Na 80 mM; K 17 mM; cysteine 5 mM; saponin 50 mg%. Duration 1 hr.

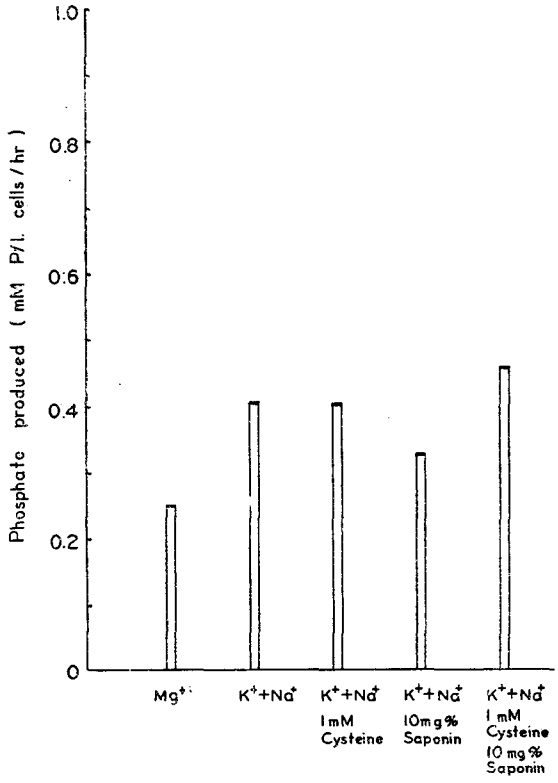

Fig. 7. The effect of cysteine in the presence of seponin on the ATPase activity of red cell ghosts. Temp. 44°C; pH 7.4; ATP 1.5 mM; Mg 2 mM; Na 80 mM; K 17 mM; cysteine /mM; saponin 10 mg%. Duration 1 hr.

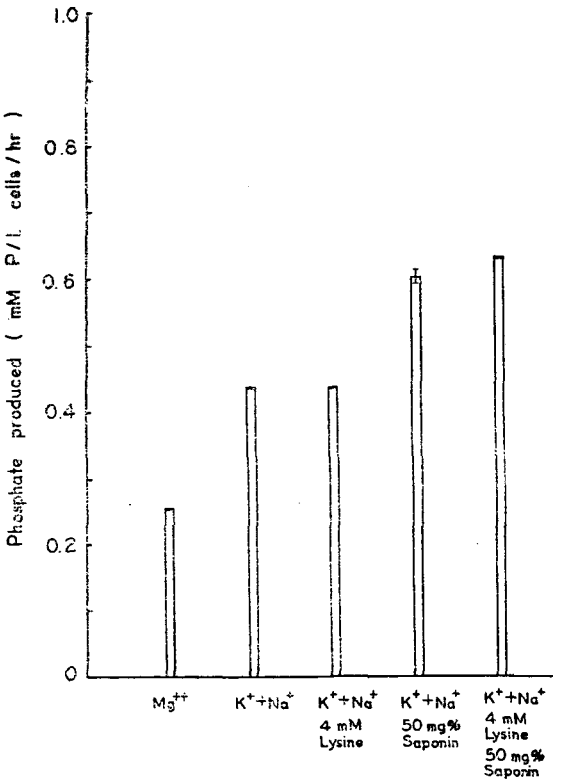

Fig. 8. The effect of lysine in the presence of saponin on the ATPase activity of red cell ghosts. Temp. 44°C; pH 7.4; ATP 1.5 mM; Mg 2 mM; Na 80 mM; K 17 mM; lysine 4 mM; saponin 50 mg%. Duration 1 hr.

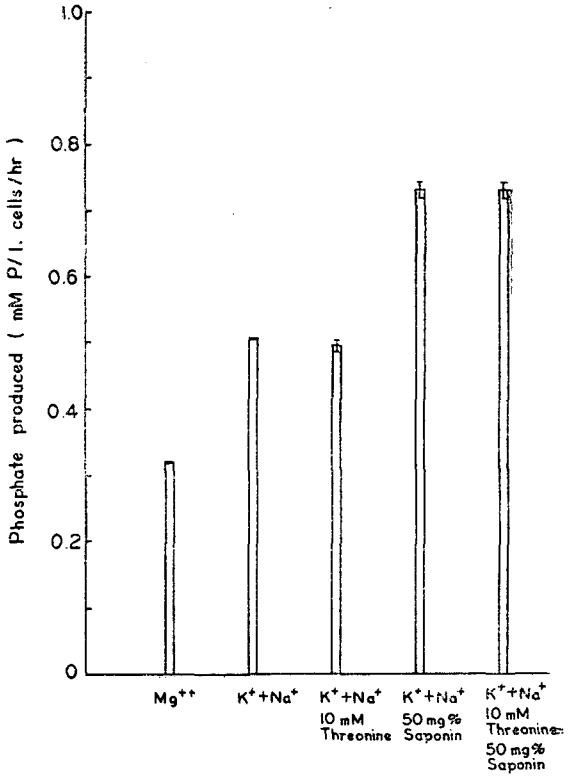

Fig. 9. The effect of threonine in the presence of saponin on the ATPase activity of red cell ghosts. Temp. 44°C; pH 7.4; ATP 1.5 mM; Mg 2 mM; Na 80 mM; K 17 mM; threonine 10 mM; saponin 50 mg%. Duration 1 hr.

성도를 촉진시키는 saponin의 작용을 억제시킨다.

6. Cysteine의 영향

Saponin의 Na^+-K^+-ATPase의 활성도를 촉진시키는 작용에 대한 cysteine의 영향을 제6도에 표시하였다.

이 실험에서 Na^+-K^+-ATPase에 5 mM cysteine만을 작용하였을 때의 이 효소의 활성도가 cysteine을 가하지 않았을 때보다 약간의 증가되는 현상이 나타나는데 이것은 이 효소의 작용기에 첨가된 cysteine의 SH기로 보수작용이 일어나서 나타나는 것으로 생각된다. 반응액내의 saponin과 cysteine을 동시에 첨가하면 saponin만으로 효소의 활성도를 증가시킨 것보다 더욱 증가되어 나타난다. 이것은 saponin이 Na^+-K^+-ATPase의 활성도를 증가시키는 작용이 이 효소가 가지고 있는 SH기와 결합하여 활성도를 촉진시키고 있다는 것을 나타내고 있는 것으로 생각된다.

제7도에는 Na^+-K^+-ATPase의 활성도를 억제하는 saponin의 농도를 작용하였을 때에 cysteine의 영향을 관찰한 것을 표시하였다.

Saponin 10mg%는 이 효소의 활성도를 억제하나 이 억제작용을 나타내는 농도의 saponin과 1 mM의 cysteine을 동시에 작용시키면 억제작용은 나타나지 않고 활성도의 증가가 약간 나타난다.

Saponin이 Na^+-K^+-ATPase의 활성도를 억제하는 농도에서나 촉진하는 농도에서 이 효소의 SH기와 결합하여 활성도를 억제하거나 촉진하고 있다는 것을 암시하고 있다.

7. Lysine의 영향

Saponin의 Na^+-K^+-ATPase의 활성도를 촉진시키는 작용에 lysine의 영향을 관찰한 실험을 제8도에 표시하였다.

Na^+-K^+-ATPase에 4 mM의 lysine만을 작용시키면 이 효소의 활성도에 아무 영향을 미치지 못한다. Saponin

과lysine을 동시에 작용시키면 saponin만을 작용하였을 때와 아무 차이를 나타내지 않았다.

Saponin의 Na^+-K^+-ATPase의 활성도를 촉진시키는 작용은 lysine이 가지고 있는 NH_2기와는 아무 관련이 없다는 것을 암시하고 있다.

8. Threonine의 영향

Saponin의 Na^+-K^+-ATPase의 활성도에 대한 촉진 작용에 threonine을 첨가하여 그 영향을 관찰한 실험을 제 9도에 표시하였다. 이 효소에 10 mM의 threonine만을 작용하면 아무 영향이 나타나지 않는다. 50 mg%의 saponin과 10 mM threonin을 동시에 첨가하였을 때와 같은 농도의 saponine만을 첨가하였을 때는 이 효소의 활성도에는 아무 차이가 나타나지 않는다. 이것은 saponin의 Na^+-K^+-ATPase의 활성도를 촉진시키는 작용에 OH기는 아무 작용을 하지 않는다는 것을 암시한다.

9. Histidine의 영향

반응액 내에 histidine을 첨가하여 saponin이 Na^+-K^+-ATPase의 활성도를 촉진시키는 작용에 대한 histidine의 영향을 본 실험을 제10도에 표시하였다.

10 mM histidine만을 Na^+-K^+-ATPase에 작용하였을 때 이 효소의 활성도는 histidine이 가지고 있는 imidazole기로 인하여 보수작용으로 약간의 증가가 나타난다. 같은 농도의 histidine과 50 mg%의 saponin을 동시에 첨가하였을 때는 같은 농도의 saponin만을 첨가했을 때보다 Na^+-K^+-ATPase의 활성도가 약간 증가하는데 이것은 histidine만을 첨가하였을 때에 이 효소에 대한 imidazole기의 보수작용으로 나타나는 활성도의 경미한 증가를 고려한다면 saponin의 이 효소에 대한 작용에는 imidazole기가 아무 영향을 주지 않고 있다.

10. Aspartic acid의 영향

Saponin의 Na^+-K^+-ATPase의 활성도를 촉진시키는

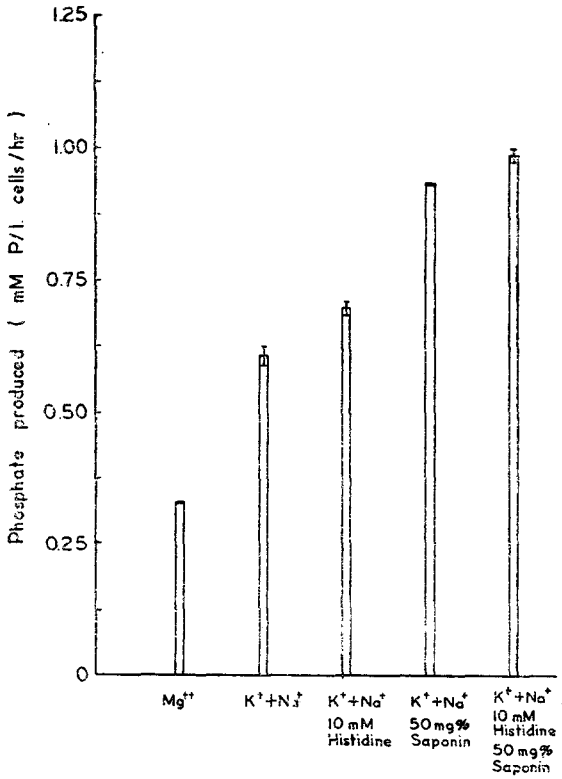

Fig. 10. The effect of histidine in the presence of saponin on the ATPase activity of red cell ghosts. Temp. 44°C; pH 7.4; ATP 1.5 mM; Mg 2 mM; Na 80 mM; K 17 mM; histidine 10 mM; saponin 50 mg%. Duration 1 hr.

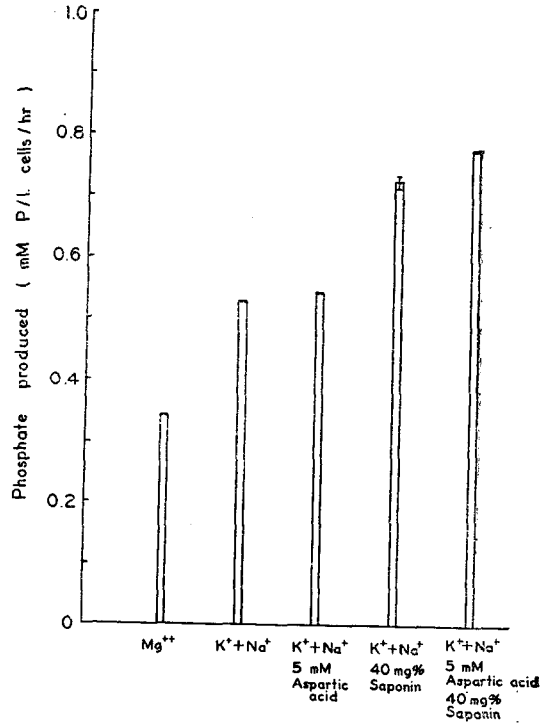

Fig. 11. The effect of aspartic acid in the presence of saponin on the ATPase activity of red cell ghosts. Temp. 44°C; pH 7.4; ATP 1.5 mM; Mg 2 mM; Na 80 mM; K 17 mM; aspartic acid 5 mM; saponin 40 mg%. Duration 1 hr.

작용에 aspartic acid를 가하여 그 영향을 본 실험을 제11도에 표시 하였다. 반응액 내에 5 mM의 aspartic acid만을 첨가하였을 때 Na^+-K^+-ATPase의 활성도는 아무 영향을 나타내지 않는다. Aspartic acid와 saponin을 동시에 작용하였을 때의 이 효소의 활성도는 saponin만을 작용하였을 때와 아무차이가 나타 나지 않는다.

*Aspartic acid*가 가지고 있는 COOH기는 saponin의 Na^+-K^+-ATPase의 활성도에 대한 촉진작용에 아무 영향을 주지 않는 것으로 생각된다.

고 찰

세포막에서 Na이온을 세포막 외로 K이온을 세포막 내로 능동적으로 운반하는 이온의 펌푸작용과 밀접한 관련을 가지고 있는 세포막 내의 Na이온과 K이온이 동시에 있을 때 활성화되는 ATPase의 활성도는 saponin에 의하여 두가지 양상의 작용을 나타낸다. 이 효소의 활성도는 낮은 농도의 saponin으로는 억제작용이, 높은 농도의 sapnoin으로는 촉진작용이 나타난다.

Lauryl sulfate[11]같은 청조제는 0.5%의 농도에서 Na^+-K^+-ATPase의 활성도를 억제하여 ouabain에 작용하는 부위를 완전히 억제한다. 한편 DOC[10]는 0.001%의 농도부터는 Na^+-K^+-ATPase의 촉진작용이 아주 적게 나타나고 0.01%보다 높은 농도에서 억제작용을 나타내어 양성효과가 나타난다. Mg^{++}-ATPase에대해서 0.025%까지는 활성도에 아무 영향이 없으나 더 높은 농도에서는 억제작용이 나타난다.

Na^+-K^+-ATPase의 활성도에 DOC는 낮은농도에서 아주 적은 촉진작용이 나타나고 높은 농도에서 억제작용이 나타나서 양상성 효과를 나타내나 *saponin*의 경우에는 농도 차이에 인한 이효소에 미치는 작용에 차이를 나타낸다. 낮은 농도에서 saponin은 억제작용이 나타나고 높은 농도에서는 촉진작용이 나타나는데 낮은 농도에서는 saponin이 세포막의 지방질에 작용하여 견고하게 결합되어 있던 효소의 반응기를 풀기 시작하면 반응기가 매몰되어 효소의 활성도를 감소시키나 농도가 증가하는데 따라서 반응기의 노출이 증가되어 saponin과의 결합이 증가되어 활성도의 촉진작용이 나타나는 것으로 사료된다. Saponin의 농도가 50 mg%보다 더욱 증가되어 지방질과의 결합이 증가되면 효소의 반응기는 다시 매몰되어 활성도는 감소되는 것으로 생각된다.

높은 농도의 *saponin*은 Mg^{++}-ATPase의 활성도를 증가시키는데 이 saponin으로 활성화된 Mg^{++}-ATPase의 활성도는 ouabain으로 억제되지 않았으나 saponin으로 활성화된 Na^+-K^+-ATPase의 활성도는 ouabain으로 억제된다. 세포막에서 이온의 능동적 운반을 특이하게 억제하는 ouabain에 의하여 saponin의 Na^+-K^+-ATPase의 활성가가 억제되는 것은 *saponin*의 세포막의 이온의 능동적 운반을 촉진시키는 작용을 가지고 있다는 것을 암시하고 있는 것이다.

반응액 내의 Na이온의 농도를 일정하게 유지하고 K이온의 농도를 증가시키면 saponin의 작용으로 Na^+-K^+-ATPase의 활성도의 증가율은 K이온의 낮은데서는 증가되나 K이온의 농도가 증가하는데 따라서 낮아진다. K이온과 Na이온의 비율이 낮은 곳에서는 saponin의 친화성이 높아지고 높은 곳에서는 친화성이 낮아져서 나타나는 형상으로 생각된다. 적혈구막 내의 Na^+-K^+-ATPase는 막 외측에 K이온과 친화성이 높은 반응 부위가 막 내측에는 Na이온과 친화성이 높은 부위가[6,7]있다고 하는 바 K이온 반응부위는 saponin과의 결합이 가능하며 그 정도는 낮은 것으로 생각된다. Ouabain은 반응액 내의 K이온의 농도를 30 mM까지 증가하는데 따라 적혈구막과의 결합이 방해된다고[18]하나 K이온의 농도를 32 mM까지 증가하는데 따라서 이 효소와 saponin의 결합은 일정도를 유지하고 있다.

반응액 내의 K이온의 농도를 일정하게 유지하고 K이온의 농도를 증가시키면 saponin의 Na^+-K^+-ATPase의 활성도에 대한 작용으로 활성도의 증가율은 Na이온의 농도가 낮은 곳에서 감소되고 농도가 높은 곳에서는 증가된다. 이것은 K이온과 Na이온의 농도비율이 높은데서는 saponin의 친화성이 낮아지고 K이온과 Na이온의 농도비율이 낮은 곳에서 saponin의 친화성이 높아져서 일어나는 현상으로 생각된다. Saponin은 Na이온의 반응부위보다 K이온의 반응부위와 친화성을 가지고 있다는 것을 암시하고 있는 것이다.

Ca이온의 농도를 증가함에 따라 낮은 농도에서는 Na^+-K^+-ATPase의 활성도가 증가되고 높은 농도에서는 억제작용이 나타난다.

*Ca*이온의 농도가 증가하는데 따라서 saponin에 의한 이 효소의 활성도의 촉진작용은 억제되는데 Ca이온의 높은 농도에서 saponin의 촉진작용은 완전히 억제되고 만다.

Saponin이 Na^+-K^+-ATPase의 활성도를 증가시키는 작용에는 *lysine*의 NH_2기나 *threonine*의 OH기, *histidine*의 imidazole기나, aspartic acid의 COOH기 등은 아무 영향을 주지 않는다.

Saponin의 Na^+-K^+-ATPase의 활성도를 증가시키는

농도에서 cysteine을 첨가시키면 saponin의 촉진작용이 더 증가되는데 이것은 cysteine의 첨가로 cysteine이 가지고 있는 SH기가 Na^+-K^+-ATPase에 더욱 첨가되어서 saponin이 이 효소의 SH기에 결합하여 활성도를 증가시키는 작용을 더 보강하여 나타나는 현상으로 사료된다.

이 효소의 활성도를 억제시키는 낮은 농도의 saponin을 작용했을 때 cysteine을 첨가하면 억제작용이 소실되고 활성도의 증가가 나타난다. 이것은 첨가된 cysteine의 SH기가 saponin과 결합하여 나타나는 것으로 낮은 농도의 saponin이 작용했을 때 saponin의 지방질에 대한 작용으로 이 효소의 매몰된 활성기와는 결합하지 못하나 첨가된 SH기와 결합하여 억제작용이 나타나지 않는 것으로 생각된다. 이상의 실험들은 saponin의 Na^+-K^+-ATPase에 대한 농도 차이에 의한 억제작용이나 촉진작용이 이 효소가 가지고 있는 SH기와의 결합으로 나타나는 현상이라는 것을 암시하고 있는 것이다.

결 론

적혈구막 내에 있는 Na이온과 K이온으로 활성화되는 ATPase의 활성도에 대한 saponin의 작용을 알고자 토끼 적혈구로 ghost 세포를 만들어 실험하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. Saponin은 낮은 농도에서 Na^+-K^+-ATPase의 활성도를 억제하고 높은 농도에서는 활성도를 촉진시킨다. 촉진된 이 효소의 활성도는 ouabain으로 억제되나 Mg^{++}-ATPase에 대한 촉진작용은 ouabain으로 억제되지 않는다.

2. K이온의 농도증가에 따라 saponin의 Na^+-K^+-ATPase에 대한 활성도의 증가율은 감소되고 Na이온의 농도증가에 따라서 활성도의 증가율은 증가된다.

3. 낮은 농도의 Ca이온은 Na^+-K^+-ATPase의 활성도를 촉진시키고 높은 농도의 Ca이온은 억제시킨다. Ca이온으로 saponin의 이 효소에 대한 활성도의 증가율은 농도증가에 따라 억제되었다.

4. Saponin의 Na^+-K^+-ATPase의 활성도를 촉진하는 작용에 lysine의 NH_2기나 threonine의 OH기나 histidine의 imidazole기, aspartic acid의 COOH기등은 아무 영향을 미치지 못하였다.

5. Saponin의 Na^+-K^+-ATPase의 활성도를 억제하는 작용이나 촉진하는 작용은 이 효소의 SH기의 작용으로 나타나는 현상이다.

참 고 문 헌

1) Danowski, T.S.: *The transfer of potassium across the human blood cell membrane. J. Biol. Chem. 139:693, 1941.*

2) Harris, E.J.: *The influence of the metabolism of human erythrocytes on potassium content. J. Biol. Chem. 141:579, 1941.*

3) Maizels, M.: *Cation control in human erythrocytes. J. Physiol. 108:247, 1949.*

4) Skou, J.C.: *The influence of some cations on an adenosinetriphosphatase from peripheral nerves. Biochem. Biophys. Acta. 23:394, 1957.*

5) Glynn, I.M.: *Activation of adenosinetriphosphatase activity in a cell membrane by external potassium and internal sodium. J. Physiol. 160:18, 1962a.*

6) Whittam, R.: *The asymmetrical stimulation of a menbrane adenosinetriphosphatase in relation to active cation transport. Biochem. J. 84:110, 1962.*

7) Schatzmann, J.H.: *Herzglykoside als Hemmstoffe für den aktiven Kalium-und Natrium transport durch die Erythrocytenmembran. Helv. Physiol. Acta. 11:346, 1953.*

8) Post, R.L., Merritt, C.R., Kinsolving, C.R. and C.D. Albright: *Membrane adenosinetriphosphatase as participant in active transport of sodium and potassium in human erythrocyte. J. Biol. Chem. 235:1796, 1960.*

9) Dunham, E.T. and I.M. Glynn: *Adenosinetriphosphatase activity and active movements of alkali metal ions. J. Physiol. 156:274, 1961.*

10) Skou, J.C.: *Preparation from mammalian brain and kidney of the enzyme system involved in active tranpport of Na^+ and $K.^+$ Biochem. Biophys. Acta. 58:314, 1962.*

11) Glynn, I.M.: *An adenosine triphosphatase from electric organ activated by sodium and potassium and inhibited by ouabain or oligomycin. Biochem. J. 84:75, 1962a.*

12) Rosenberg, S.A. and G. Guidotti: *The protein of human erythrocyte membranes. 1. Preparation, solubilization, and partial characterization. J.*

Biol. Chem. 243:1985, 1968.

13) Fiske, C.H. and Y. Subbarow: *The colorimetric determination of phosphorus. J. Biol. Chem. 66:375, 1925.*

14) Glynn, I.M.: *The action of cardiac glycosides on sodium and potassium movements in human red cells. J. Physiol. 136:148, 1957.*

15) Kofoed-Johnsen, V.: *The effect of g-strophanthin (ouabain) on the active transport of sodium througth the isolated frog skin. Acta Physiol. Scand. 42, suppl. 145:87, 1958.*

16) Whittam, R.: *Potassium movements and ATP in human red cells. J. Physiol. 140:479, 1958.*

17) Glynn, I.M.: *Activation of adenosinetriphosphatase activity in a cell membrane by external potassium and internal sodium. J. Physiol. 160:18, 1962b.*

18) Hoffman, J.E. and C.J. Ingram: *Cation transport and the binding of T-ouabain to intact human red blood cells. Proceedings of the First International Symposium on Metabolism and Membrane Permeability of Erythrocytes and Thrombocytes. Vienna 420, 1968.*