

# 토끼 적혈구막의 $(Na^+ + K^+) - ATPase$ 의 active center 에 관한 연구

경희대학교 의과대학 생리학교실

<지도 교 일 섭 교수>

임 보 상

=Abstract=

## Studies on Active Center of $(Na^+ + K^+) - ATPase$ in Rabbit Red Cell Membranes

Bo Sang Lim

*Department of Physiology, College of Medicine, Kyung Hee University  
Seoul, Korea*

(Directed by Prof. Il Sup Koh)

The present experiments were carried out to investigate the active center of sodium and potassium ion activated adenosine triphosphatase. An ATPase, activated by sodium ion plus potassium ion in the presence of magnesium ion, and inhibited by ouabain, has been obtained from rabbit red cell ghosts. The ATPase activity was measured by inorganic phosphate released from ATP. From this values of the measured inorganic phosphate, the activity of ATPase was calculated.

The following results were observed.

1. The activity of  $(Na^+ + K^+) - ATPase$  is inhibited by ouabain. This effect may not be due to an effect on sulfhydryl groups, amino groups, carboxyl groups, imidazole groups and hydroxyl groups.

2. The  $(Na^+ + K^+) - activated$  enzyme system is inhibited by p-chloromercuribenzoate and by d nitrofluorobenzene, and this effect may be due to an effect on sulfhydryl groups. These results indicate that the sulfhydryl groups is attached to sodium-potassium dependent adenosine triphosphate, an aspect of the pump.

3. The  $(Na^+ + K^+) - activated$  enzyme system is inhibited by maleic anhydride and this inhibition is reversed by lysine. This seems to indicate that the active center of this enzyme is the amino groups.

4. The  $(Na^+ + K^+) - activated$  enzyme system is inhibited by iodoacetamide and this inhibition is reversed by the simultaneous present of cysteine and aspartic acid in the suspension medium. This result indicates that this enzyme contains sulfhydryl groups and carboxyl groups.

5. The  $(Na^+ + K^+) - ATPase$  activity is accelerated by adrenaline and this effect is abolished by aspartic acid. This effect of aspartic acid indicate that carboxyl groups might be involved in the hydrolysis of ATP by the enzyme system.

On the basis of these experiments it was suggested that the active center of  $(Na^+ + K^+) - activated$  ATPase contains sulfhydryl groups, amino groups and carboxyl groups.

## I. 서 론

적혈구막에서 K 이온을 세포안으로 Na 이온을 세포밖으로 전기화학적 포텐셜 경사에 역행하여 이동하는 이온의 능동적 운반<sup>6,15,19</sup>은 세포내에서 해당작용으로 형성된 adenosinetriphosphate (ATP)의 분해작용에서 유리되는 에너지를 사용하고 있다는 것은 널리 알려져 있다.<sup>12,13,20</sup>

세포막에서 이루어지는 이온의 능동적 이동작용과 Skou<sup>25</sup>가 계의 말초신경에서 Na 이온과 K 이온이 동시에 있을 때 활성화되는 ATPase와 밀접한 관계가 있다는 것을 처음으로 보고한 후 적혈구막에서도 K 이온과 Na 이온이 있을 때 활성화되는 ATPase의 활성화도와 세포막에서 이루어지는 Na 이온과 K 이온의 능동적 운반과는 밀접한 관계가 있다는 것이 여러 연구자들에<sup>8,20,30,32</sup> 의하여 제시되었다. 한편 적은 농도의 ouabain은 여러 조직<sup>5,7,16</sup>에서 이들 이온의 능동적 운반을 억제하고 또한 같은 농도의 ouabain은 Na 이온과 K 이온으로 활성화되는 ATPase의 활성도를 억제하며 이온의 능동적 운반과 이 효소와는 서로 관련되어 있다는 증거이기도 하다. Ouabain은 여러 조직에서 분리한 Na 이온과 K 이온으로 활성화되는 ATPase는 억제하고 Mg 이온으로 활성화되는 ATPase의 활성도는 억제하지 않아 이같은 ouabain의 작용은 세포막에서 양이온의 능동적 운반과 수동적 운반을 구별하는데 사용되어 왔다.<sup>14,26</sup> 이온의 능동적 운반과 밀접한 관련을 갖고 있는 Na 이온과 K 이온으로 활성화되고 ouabain으로 억제되는 ATPase의 active center에 대한 실험은 드물다. Skou는 여러 조직의 미세분획의  $(Na^+ + K^+)$ -ATPase의 활성화도에 p-chloromercuribenzoate (PCMB)를 작용하여 억제되나 이 억제 작용은 cysteine으로 회복되어 이 효소내에는 SH기가 함유되었다는 것을 암시하였다.<sup>27</sup>

근래에 이르러 사람 적혈구에 amino기나 sulfhydryl기와 결합하는 시약등을 작용시켜서 양이온의 투과성을 추궁한 실험에서 parachloromercuriphenylsulfonic acid (PCMBS)은 적혈구막 내부에 있는 SH기와 작용하여 양이온의 능동적 운반을 억제하고<sup>23</sup> 이 억제 작용은  $(Na^+ + K^+)$ -ATPase에 대한 PCMBS의 작용에<sup>9</sup> 기인되며 amino기는 적혈구막의 내부에 있어서 양이온의 투과성에 영향을 주고 표면에 있는 것은 음이온의 투과성에 영향을 미친다는<sup>18</sup> 보고가 있다. Post<sup>22</sup> 등은 도르뫼트의 콩팥에서 유리한  $(Na^+ + K^+)$ -ATPase

를 전기 영동법을 이용하여 이 효소의 active center에 aspartyl phosphate가 있다는 것을 주장하고 있는 것이다.

본 실험에서는 토끼 적혈구로 유령세포(ghost)를 만들어 적혈구막내의 Na 이온과 K 이온으로 활성화되고 ouabain으로 억제되는 ATPase내에 함유되어 있는 active center를 탐색할 목적으로 하였다.

## II. 실험방법

실험동물은 건강한 토끼를 암 수 구별없이 사용하였으며 심장 침자로 채혈한 혈액을 heparin으로 응고를 방지하였다. 이렇게 채혈한 혈액을 1,000×g로 15분간 원심 분리한 다음 혈장과 적혈구 상층에 있는 백혈구를 제거하고 생리식염수로 2회 세척하고 다시 등장성  $MgCl_2$ 용액에 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)를 함유한 용액으로 2회 세척하였다.

세척된 적혈구만을 모아 혈액소의 부착이 없는 적혈구막(hemoglobin-free ghost)을 얻기 위하여 Rosenb.erg<sup>24</sup>등의 방법에 따라 30배 용량의 15 mM Tris HCl buffer 용액(pH 7.5)을 가하여 4°C에서 한시간 동안 방치 하였다.

이렇게 용혈된 적혈구를 4°C에서 10,000×g로 15분간 원심분리한 다음 상등액을 제거하여 막분획만을 얻었다. 침전된 막분획을 다시 15 mM Tris-HCl buffer 용액에 1 mM EDTA를 혼합한 용액으로 2회 원심조작으로 세척한 다음 15 mM Tris-HCl buffer 용액(pH 7.5)으로 1회 세척하였다. 이렇게 해서 얻은 막분획은 혈액소의 부착이 없는 유백색을 나타냈으며 이것을 본 실험에 사용하였다.

ATPase의 활성도는 Dunham<sup>8</sup>등의 방법에 따라 측정하였다. 10 ml의 여러 실험관내에 막분획과 여러 반응액을 각각 0.1 ml씩을 첨가하고 증류수로 조절하여 총량을 1 ml로 하여 44°C에서 한시간동안 부치하였다. 여러 실험관에 막분획과 여러 반응액을 넣은 다음 15 mM ATP를 가할때는 15초 간격으로 첨가하고 한시간 동안 반응을 시킨 다음에는 다시 15초 간격으로 어둠으로 냉각시킨 물속으로 실험관을 이동시켜서 1분간 냉각시켰다. 다시 냉각된 10% trichloroacetic acid를 1 ml씩을 같은 시간 간격으로 첨가하여서 반응을 정지시킨 다음 15분간 1,000×g로 원심 분리한 다음 단백질을 침전시키고 그 상등액 1.5 ml내에 유리된 inorganic phosphate를 Fiske-Subbarow<sup>10</sup>법에 의하여 측정하여 mM P/l. cells/hr.로 표현하였으며 ATPase의

활성도는 각기 두례의 평균치로 제시 되었다.

시약 : 본 실험에, 사용된 주요한 시약은 다음과 같다.

ATP, PCMB, DNFB는 Sigma Chemical Co 제제물  
Tris (Tris-hydroxymethyl aminomethane)는 Fisher  
것을 사용하였다.

Cysteine, lysine, aspartic acid, histidine, NaCl,  
KCl, MgCl<sub>2</sub>등은 Merk 제를 ouabain은 U.S.P 제를 각  
각 사용하였다.

### III. 실험성적

#### 1. Ouabain 에 대한 cysteine 의 영향

토끼 적혈구막 분획에서 얻은 ATPase에는 Mg 이  
온으로 활성화되는 Mg<sup>++</sup>-ATPase와 Na 이온과 K  
이온을 동시에 첨가하였을 때에 활성화되는 (Na<sup>+</sup>+K<sup>+</sup>)  
-ATPase 가 있으며 (Na<sup>+</sup>+K<sup>+</sup>)-ATPase 의 활성도  
는 10<sup>-3</sup>M 의 ouabain 으로 완전히 억제되었으나 Mg<sup>++</sup>  
-ATPase 는 ouabain 으로 억제되지 않았다. (제 I 표  
및 그림 1)

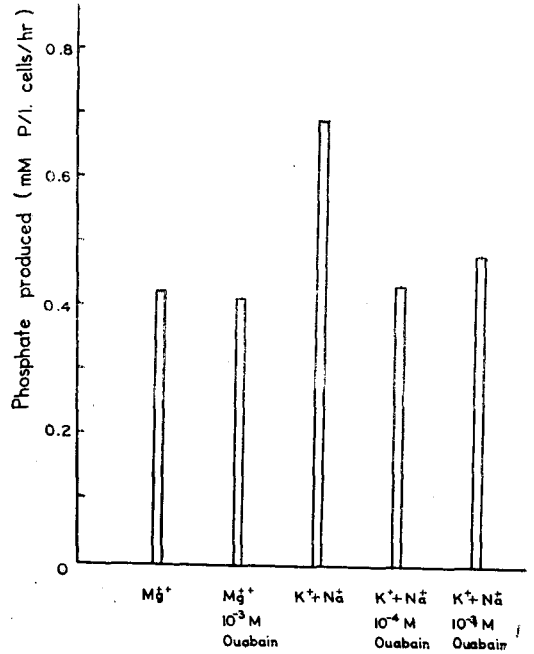
토끼 적혈구의 막분획에서 유리된 Na 이온과 K 이  
온으로 활성화되는 ATPase 의 활성도에 대한 ouabain 의  
작용에 cysteine 을 첨가하였을 때에 나타나는 영향을  
그림 2에 도시하였다.

**Table 1. The effects of ouabain in the presence of Mg<sup>++</sup>, Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> on the ATPase activity of red cell ghosts.**

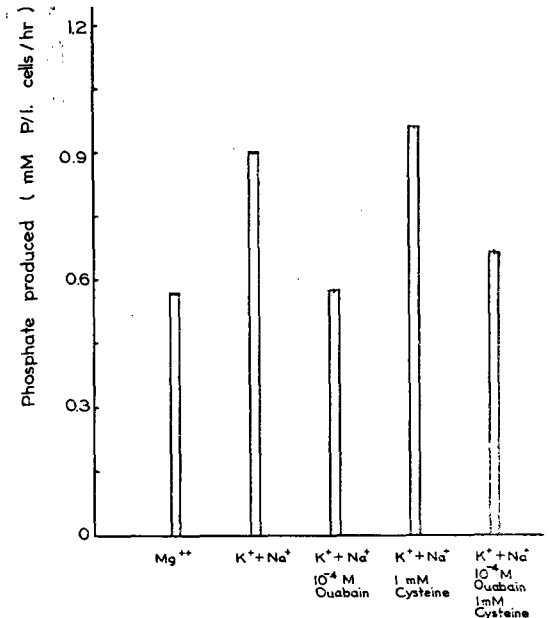
Mg <sup>++</sup> (mM)	Na <sup>+</sup> (mM)	K <sup>+</sup> (mM)	Activity (mM P/l. cells/hr.)
2	0	0	0.42
			0.42
2	80	17	0.68
			0.68
In the presence of ouabain			
10 <sup>-4</sup> M	2	80	0.44
			0.42
10 <sup>-3</sup> M	2	0	0.42
			0.40
2	80	17	0.50
			0.42

Conditions of experiment. Temp. 44°C; pH 7.4;  
ATP 2mM. Duration 1hr

막분획에 cysteine 으로 15분간 전처리 한 다음 같은  
농도의 ouabain 을 작용시키면 cysteine 의 작용과는 관  
계없이 ouabain 의 억제작용이 나타난다.



**Fig. 1.** The effect of ouabain in the presence of Mg<sup>++</sup>, Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> on the ATPase activity of red cell ghosts. Temp. 44°C; pH 7.4; ATP 1.5 mM; Mg<sup>++</sup> 2 mM; Na<sup>+</sup> 80 mM; K<sup>+</sup> 17 mM; ouabain 10<sup>-4</sup>M. Duration 1 hr.



**Fig. 2.** The effect of cysteine in the presence of ouabain on the ATPase activity of red cell ghosts. Temp. 44°C; pH 7.4; ATP 1.5 mM; Mg<sup>++</sup> 2 mM; Na<sup>+</sup> 80 mM; K<sup>+</sup> 17 mM; cysteine 1 mM; ouabain 10<sup>-4</sup>M. Duration 1 hr.

이  $(Na^+ + K^+)$ -ATPase에 cysteine 만을 작용하였을 때 SH 기로 인한 보완작용으로 활성도의 약간의 증가를 고려한다면 ouabain의 억제 작용에 cysteine은 아무 영향을 주지 못하고 있다. 이 실험은 ouabain의  $(Na^+ + K^+)$ -ATPase의 활성도를 억제하는 작용에는 cysteine이 함유하고 있는 SH기는 아무 영향을 미치지 못하고 있다는 것을 암시하고 있다.

## 2. Ouabain에 대한 Lysine의 영향

$(Na^+ + K^+)$ -ATPase의 활성도에 대한 ouabain의 억제작용에 대한 lysine의 영향을 관찰한 실험을 그림 3에 표시하였다.

이 실험에서 ouabain의  $(Na^+ + K^+)$ -ATPase 활성도에 대한 억제 작용은 lysine으로 전처리 하여도 아무 관계없이 나타나고 있다. 이는 lysine이 함유한  $NH_2$ 기가 ouabain의 이효소에 대한 작용에 아무 영향을 미치지 못하고 있다는 것을 의미하고 있는 것이다.

## 3. Ouabain에 대한 threonine의 영향

Threonine이  $(Na^+ + K^+)$ -ATPase의 활성도를 억제하는 ouabain의 작용에 미치는 영향을 그림 4에 표

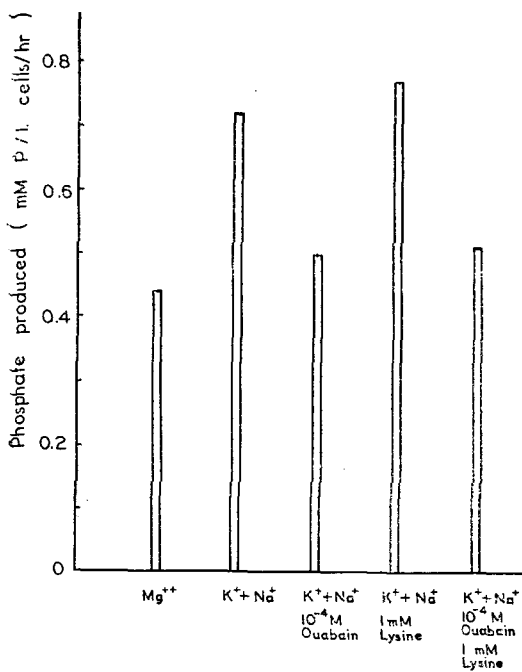


Fig. 3. The effect of lysine in the presence of ouabain on the ATPase activity of red cell ghosts. Temp.  $44^\circ C$ ; pH 7.4; ATP 1.5 mM;  $Mg^{++}$  2 mM; ouabain  $10^{-4}M$ ; lysine 1 mM. Duration 1 hr.

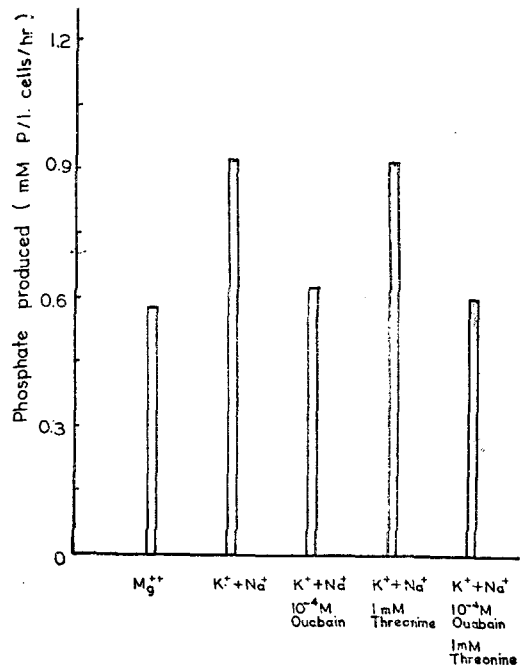


Fig. 4. The effect of threonine in the presence of ouabain on the ATPase activity of red cell ghosts. Temp.  $44^\circ C$ ; pH 7.4; ATP 1.5 mM;  $Mg^{++}$  2 mM;  $Na^+$  80 mM;  $K^+$  17 mM, threonine 1 mM; ouabain  $10^{-4}M$ . Duration 1 hr.

시하였다.

적혈구막 분획을 threonine으로 전처리하고 ouabain의 작용을 관찰한 이 실험에서 ouabain의 억제 작용은 threonine으로 아무런 영향을 받지 않았다. 이 효소에 대한 ouabain의 억제 작용이 threonine이 함유하고 있는 OH기와는 아무 관련이 없이 이루어지고 있다는 것을 암시하고 있는 것이다.

## 4. Ouabain의 작용에 대한 aspartic acid의 영향

Aspartic acid가  $(Na^+ + K^+)$ -ATPase 활성도에 대한 ouabain의 억제 작용에 미치는 영향을 그림 5에 도시하였다.

이 실험에서 aspartic acid로 막분획을 전처리한 다음 ouabain을 작용시켜도 aspartic acid와는 상관없이 ouabain의 억제 작용이 나타난다.

ouabain이 이 효소의 활성도를 억제하는 작용에는 aspartic acid가 함유하고 있는  $\omega$ -COOH기는 아무 관계가 없다는 것을 암시하고 있다.

## 5. Ouabain의 작용에 대한 histidine의 영향

$(Na^+ + K^+)$ -ATPase의 활성도에 대한 ouabain의

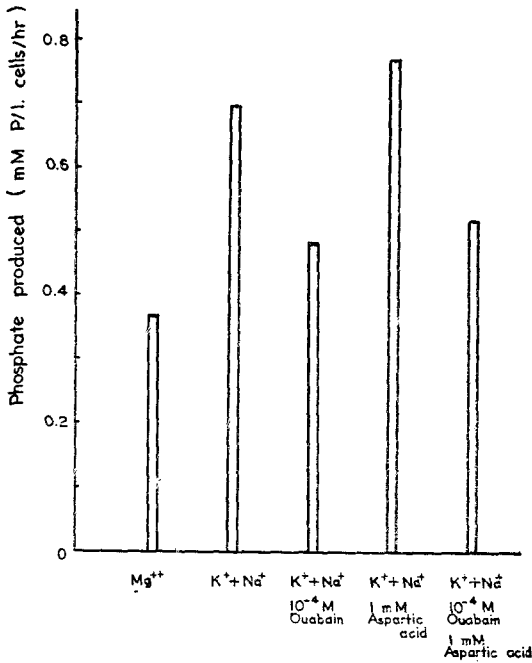


Fig. 5. The effect of aspartic acid in the presence of ouabain on the ATPase activity of red cell ghosts. Temp. 44°C; pH 7.4; ATP 1.5 mM; Mg<sup>++</sup> 2 mM; Na<sup>+</sup> 80 mM; K<sup>+</sup> 17 mM, aspartic acid 1mM; ouabain 10<sup>-4</sup>M. Duration 1 hr.

억제 작용에 histidine 이 미치는 영향을 관찰한 실험을 그림 6에 표시하였다.

Ouabain의 이효소에 대한 억제 작용은 막분해를 histidine으로 전처치하여도 아무 영향없이 나타난다. 이것은 histidine이 함유하고 있는 imidazole기가 ouabain의 억제 작용과는 아무 관계가 없다는 것을 암시하고 있다.

### 6. PCMB의 작용에 대한 cysteine의 영향

Na 이온과 K 이온으로 활성화되는 ATPase의 활성도는 PCMB로 억제되고 이 억제 작용은 cysteine으로 세포막 분해를 전처치하면 회복된다(Fig. 7).

이 실험 결과에서 (Na<sup>+</sup>+K<sup>+</sup>)-ATPase에 대한 PCMB의 억제 작용이 cysteine이 함유하고 있는 SH기의 작용으로 회복된다는 것은 이 효소의 SH기와 PCMB가 결합하여 억제 작용을 하고 있다는 것을 의미하는 것이다. 이는 양이온의 능동적 운반의 본질적 작용을 하는 (Na<sup>+</sup>+K<sup>+</sup>)-ATPase<sup>18)</sup>내에는 SH기를 함유하고 있다는 것을 암시하고 있는 것으로 Skou<sup>27)</sup>나 Rega<sup>28)</sup> 등의 실험 결과와 부합된다.

### 7. Dinitrofluorobenzene (DNFB)의 작용에 미치는 cysteine의 영향

DNFB가 (Na<sup>+</sup>+K<sup>+</sup>)-ATPase의 활성도를 억제하는 작용에 대한 cysteine의 영향을 관찰한 실험은 그림 8에 표시하였다.

이 실험에서 세포막 분해를 cysteine으로 전처치하면 DNFB의 억제 작용은 완전히 회복된다. 이는 첨가된 DNFB가 cysteine이 함유하고 있는 SH기의 작용으로 억제 작용이 나타나지 않는 것으로 사료되며 DNFB의 억제 작용은 이 효소의 SH기와 반응하여 나타나는 현상으로 생각된다.

### 8. DNFB의 작용에 대한 Lysine의 영향

(Na<sup>+</sup>+K<sup>+</sup>)-ATPase의 활성도에 대한 DNFB의 억제작용에 미치는 lysine의 영향을 관찰한 실험(Fig. 9)에서 DNFB의 억제작용은 lysine으로 막분해를 전처치하여도 아무 영향을 미치지 못하였다.

이것은 lysine이 함유하고 있는 ε-NH<sub>2</sub>기는 DNFB의 이 효소에 대한 억제 작용과는 아무 관련이 없다는 것을 의미한다.

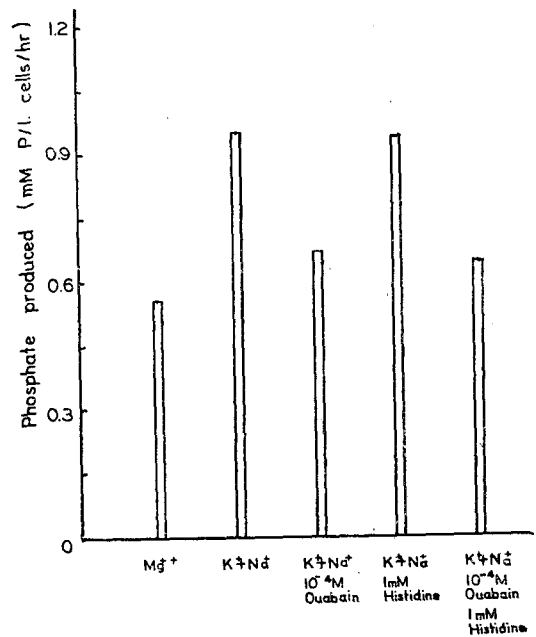


Fig. 6. The effect of histidine in the presence of ouabain on the ATPase activity of red cell ghosts. Temp. 44°C; Mg<sup>++</sup> 2 mM; Na<sup>+</sup> 80 mM; K<sup>+</sup> 17 mM; histidine 1 mM; ouabain 10<sup>-4</sup>M. Duration 1 hr.

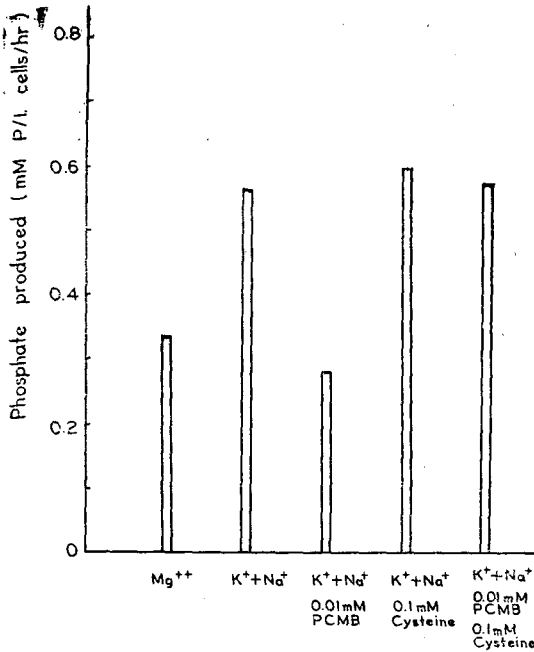


Fig. 7. The effect of cysteine in the presence of PCMB on the ATPase activity of red cell ghosts. Temp. 44°C; pH 7.4; ATP 1.5 mM; Mg<sup>++</sup> 2 mM; Na<sup>+</sup> 80 mM; K<sup>+</sup> 17 mM; cysteine 0.1 mM; PCMB 0.01 mM. Duration 1 hr.

### 9. DNFB의 작용에 대한 threonine의 영향

$(Na^+ + K^+) - ATPase$ 의 활성도에 대한 DNFB의 억제 작용에 threonine으로 전처리하여 그 영향을 관찰한 실험(Fig. 10)에서 DNFB의 억제 작용은 threonine의 첨가로 아무 영향을 받지 않았다. 이는 threonine이 함유하고 있는 OH기가 DNFB의 억제 작용과는 아무 관련이 없다는 것을 의미하는 것이다.

### 10. DNFB의 작용에 미치는 aspartic acid의 영향

DNFB의  $(Na^+ + K^+) - ATPase$ 의 활성도에 대한 억제 작용에 aspartic acid를 첨가하여 그 영향을 관찰한 실험(Fig. 11)에서 DNFB의 억제 작용은 aspartic acid로 막분획을 전처리하여도 아무 영향을 미치지 못하고 이것은 aspartic acid가 함유하는  $\omega - COOH$ 기가 DNFB의 이효소에 대한 억제 작용에 아무 영향을 미치지 못하고 있다는 것을 암시하고 있다.

### 11. DNFB의 작용에 대한 histidine의 영향

DNFB의  $(Na^+ + K^+) - ATPase$ 의 활성도에 대한 억제 작용에 histidine의 영향을 관찰한 실험(Fig. 12)에서 DNFB의 이 효소에 대한 억제 작용은 histidine

으로 전처리 하여도 아무 영향이 없이 나타난다. 이것은 histidine이 가지고 있는 imidazole기가 DNFB의 이 효소에 대한 작용과는 아무 관련이 없다는 것을 암시하고 있다.

### 12. Maleic anhydride의 작용에 대한 Lysine의 영향

Maleic anhydride의 억제 작용에 대한 lysine의 영향을 관찰한 실험(Fig. 13)에서 lysine으로 막분획을 전처리하면 maleic anhydride의 억제 작용은 lysine으로 회복된다.

이는 maleic anhydride의 억제 작용이  $(Na^+ + K^+) - ATPase$ 에 함유되어 있는  $NH_2$ 기와 결합하여 나타나던 것이 lysine으로 전처리하여 lysine의  $\epsilon - NH_2$ 기의 작용으로 억제 작용이 나타나지 않는 것으로 Na이온과 K이온으로 활성화되는 ATPase 내에는  $NH_2$ 기를 함유하고 있다는 것을 암시하는 것이다.

### 13. Iodoacetamide (IAA)의 작용에 대한 aspartic acid와 cysteine의 영향

IAA가  $(Na^+ + K^+) - ATPase$ 의 활성도에 대한 작용에 미치는 cysteine과 aspartic acid의 영향을 관찰한 실험을 그림 14에 표시했다. 이 실험에서 IAA는

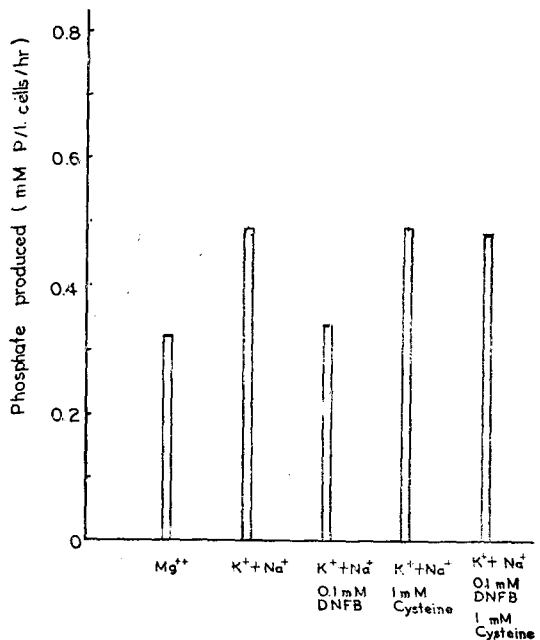


Fig. 8. The effect of cysteine in the presence of DNFB on the ATPase activity of red cell ghosts. Temp. 44°C; pH 7.4; ATP 1.5 mM; Mg<sup>++</sup> 2 mM; Na<sup>+</sup> 80 mM; K<sup>+</sup> 17 mM; cysteine 1 mM; DNFB 0.1 mM. Duration 1 hr.

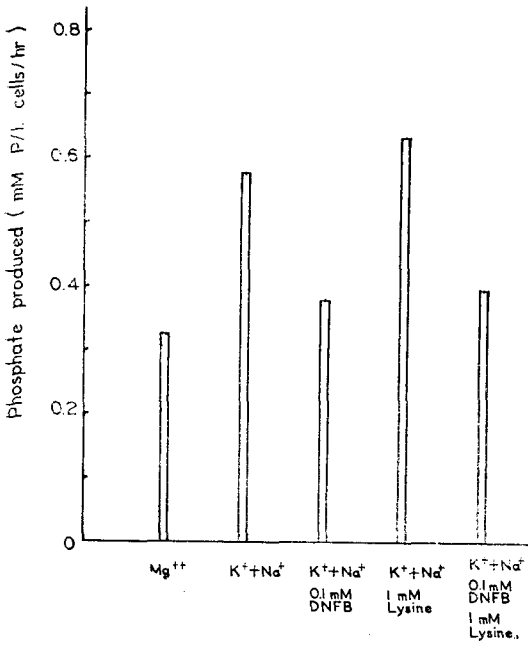


Fig. 9. The effect of lysine in the presence of DNFB on the ATPase activity of red cell ghosts. Temp. 44°C; pH 7.4; ATP 1.5 mM; Mg<sup>++</sup> 2 mM; Na<sup>+</sup> 80 mM; K<sup>+</sup> 17 mM; lysine 1 mM; DNFB 0.1 mM. Duration 1 hr.

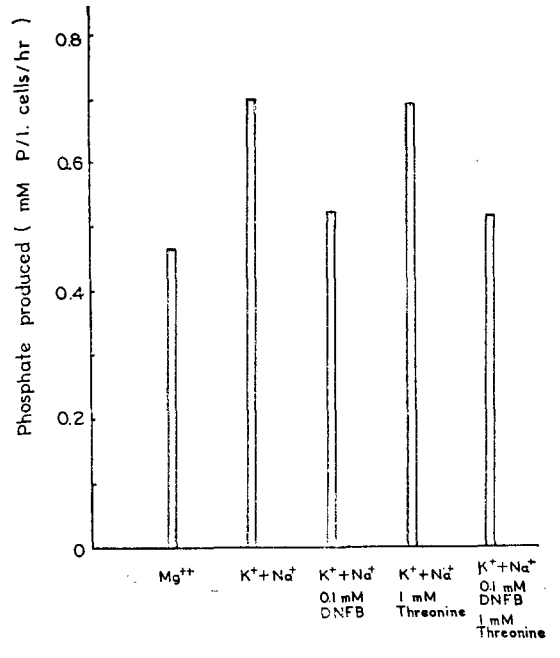


Fig. 10. The effect of threonine in the presence of DNFB on the ATPase activity of red cell ghosts. Temp. 44°C; pH 7.4; ATP 1.5 mM; Mg<sup>++</sup> 2 mM; Na<sup>+</sup> 80 mM; K<sup>+</sup> 17 mM; threonine 1 mM; DNFB 0.1 mM. Duration 1 hr.

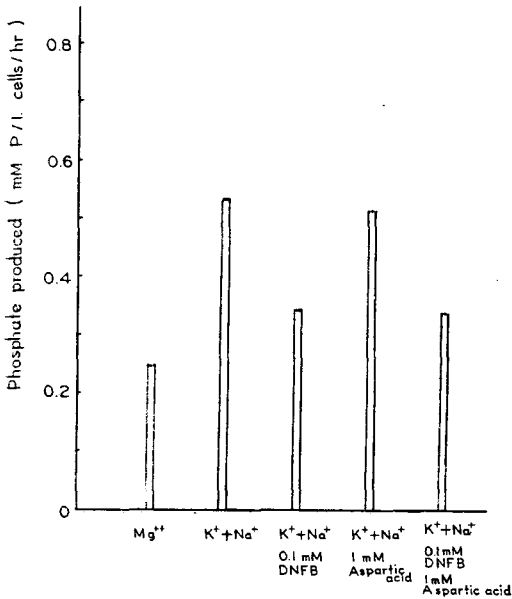


Fig. 11. The effect of aspartic acid in the presence of DNFB on the ATPase activity of red cell ghosts. Temp. 44°C; pH 7.4; ATP 1.5 mM; Mg<sup>++</sup> 2 mM; Na<sup>+</sup> 80 mM; K<sup>+</sup> 17 mM; aspartic acid 1 mM; DNFB 0.1 mM. Duration 1 hr.

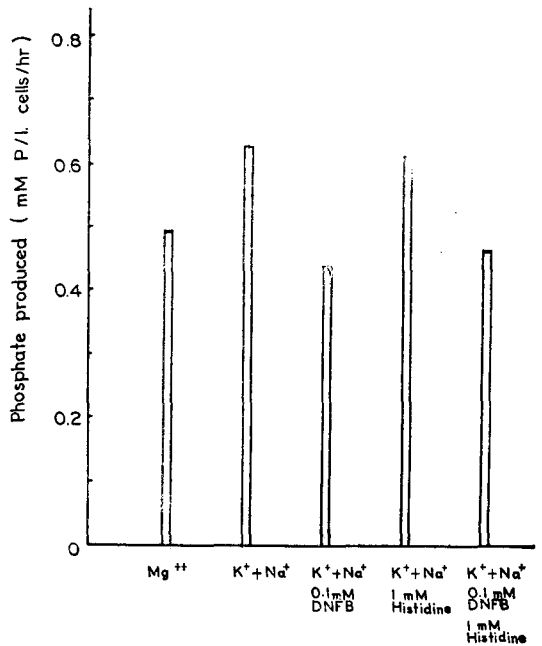


Fig. 12. The effect of histidine in the presence of DNFB on the ATPase activity of red cell ghosts. Temp. 44°C; pH 7.4; ATP 1.5 mM; Mg<sup>++</sup> 2 mM; Na<sup>+</sup> 80 mM; K<sup>+</sup> 17 mM; histidine 1 mM; DNFB 0.1 mM. Duration 1 hr.

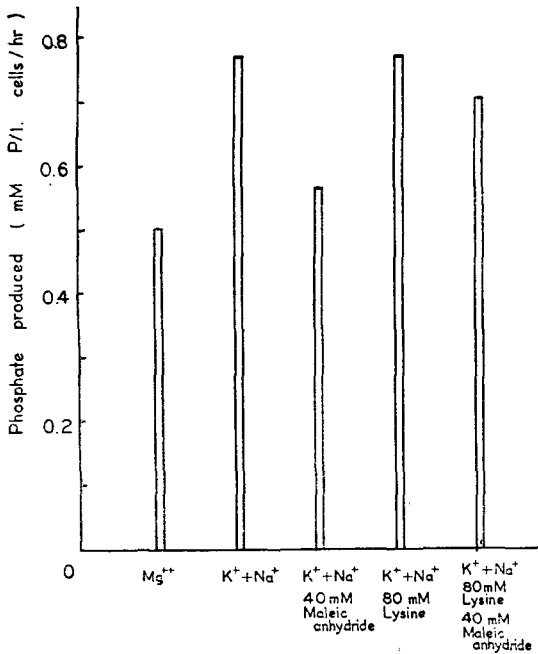


Fig 1 The effect of lysine in the presence of maleic anhydride on the ATPase activity of red cell ghosts. Temp. 44°C; pH 7.4; ATP 1.5 mM;  $Mg^{++}$  2 mM;  $Na^+$  80 mM;  $K^+$  17 mM; lysine 80 mM; maleic anhydride 40 mM. Duration 1 hr.

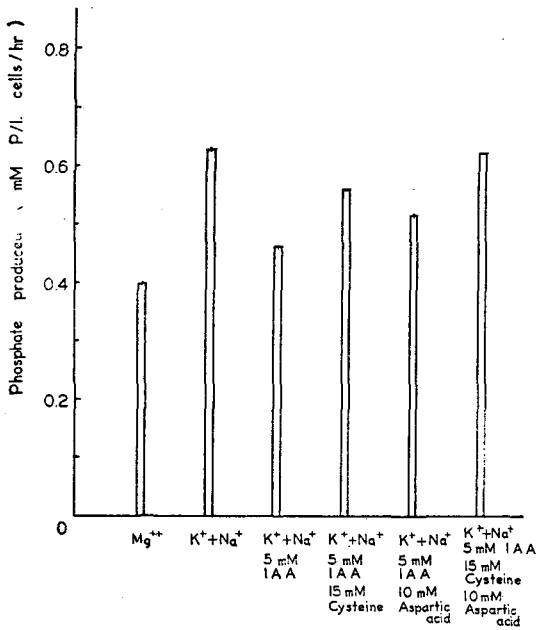


Fig. 14. The effect of cysteine and aspartic acid in the presence of IAA on the ATPase activity of red cell ghosts. Temp. 44°C; pH 7.4; ATP 1.5 mM;  $Mg^{++}$  2 mM;  $Na^+$  80 mM;  $K^+$  17 mM; cysteine 15 mM; aspartic acid 10 mM; IAA 5 mM. Duration 1 hr.

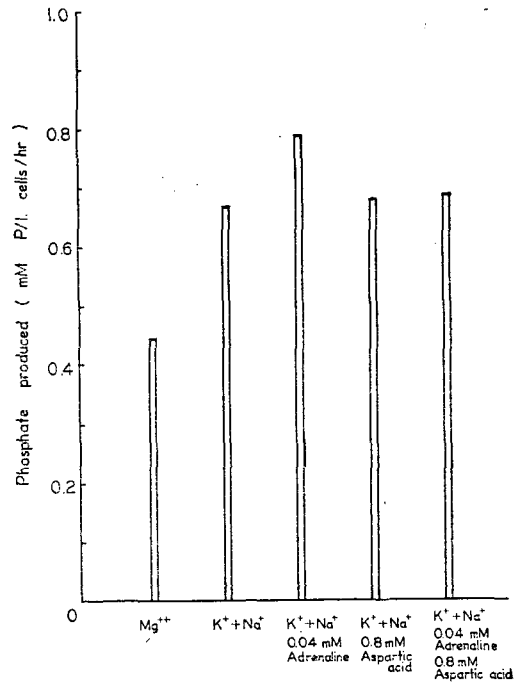


Fig. 15. The effect of aspartic acid in the presence of adrenaline on the ATPase activity of red cell ghosts. Temp. 44°C; pH 7.4; ATP 1.5 mM;  $Mg^{++}$  2 mM;  $Na^+$  80 mM;  $K^+$  17 mM; aspartic acid 0.8 mM; adrenaline 0.04 mM. Duration 1 hr.

$(Na^+ + K^+) - ATPase$ 의 활성도를 억제하는데 이 억제 작용은 cysteine이나 aspartic acid로 각각 전처치하여도 억제 작용이 회복되지 않았으나 cysteine과 aspartic acid를 동시에 첨가하여 전처치한 실험에서 완전히 회복하였다. 이같은 실험 결과는 IAA가 세포막에서 SH기와 COOH기와 동시에 결합하여 세포막내의  $(Na^+ + K^+) - ATPase$ 의 활성도를 억제하는 것으로 생각되며 이 효소내에는 SH기 및 COOH기를 함유하고 있다는 것을 암시하고 있다.

#### 14. Adrenaline의 작용에 대한 aspartic acid의 영향

Adrenaline이  $(Na^+ + K^+) - ATPase$ 의 활성도에 대한 작용에 미치는 aspartic acid의 영향을 관찰한 실험을 그림 15에 도시 하였다.

Adrenaline은  $(Na^+ + K^+) - ATPase$ 에 작용하여 이 효소의 활성도를 촉진시키는 작용이 있으나 adrenaline으로 촉진된 이 효소의 활성도는 aspartic acid로 전처치하면 억제 되었다. 이 실험 결과는 adrenaline이



( $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ )-ATPase의 활성도를 촉진시키는 작용은 COOH기와 결합하여 나타나는 것으로 이 효소내에는 COOH기를 함유하고 있다는 것을 암시하는 것으로 생각된다.

#### IV. 고 활

토끼 적혈구막에서 Mg 이온만 있을 때 활성화되는  $\text{Mg}^{++}$ -ATPase와 Mg 이온을 첨가하고 Na 이온과 K 이온을 동시에 첨가하였을 때에 활성화되는 ( $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ )-ATPase가 분리된다. 이 Na 이온과 K 이온을 동시에 첨가하여 활성화되는 ATPase의 활성도는 적은 농도의 ouabain으로 억제되는데 이 ouabain으로 억제되는 부위가 세포막에서 Na 이온을 세포막밖으로 K 이온을 세포막안으로 능동적 운반을 하는 이온의 펌프작용과 밀접한 관계가 있다는 것은 여러 연구자들에 의하여 주장되어 왔다<sup>8, 20, 30, 32</sup>.

세포막에서 이루어지는 이온의 펌프 작용과 밀접한 관계가 있는 ( $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ )-ATPase는 적혈구막<sup>8, 21, 29, 31</sup>을 비롯하여 오징어의 거대신경<sup>3</sup>, 심장근<sup>1, 22</sup>등에서 분리되며 이들 여러 조직에서 분리된 이 효소들은 서로 양적인 차이는 있으나 본질적으로는 같은 특징을 지니고 있는 것이다<sup>17</sup>.

세포막에서 이온의 능동적 운반과 밀접한 관련을 가지고 있는 ( $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ )-ATPase를 토끼 적혈구막에서 분리하여 이 효소에 함유하고 있는 active center을 추궁한 본 실험에서 ouabain의 이 효소에 대한 억제 작용은 cysteine이나 lysine, threonine, aspartic acid, histidine 등으로 각각 전처치하여도 아무 상관없이 나타났다.

이는 ouabain으로 ( $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ )-ATPase의 활성도를 억제하는 작용은 cysteine의 SH기나, lysine의  $\text{NH}_2$ 기, threonine의 OH기, aspartic acid의 COOH기, histidine의 imidazole기와는 아무 관계가 없이 나타나는 것을 암시하고 있는 것이다. ouabain의 ( $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ )-ATPase의 활성도에 대한 억제 작용은 반응액 내의 K 이온의 농도를 증가시키면 방지되는 점으로 미루어 보아 이 효소의 K 이온의 반응기와 ouabain이 대치되며 나타난다<sup>17, 28</sup>든지 또는 K 이온으로 이 효소의 양이온 반응기가 점유되면 ouabain이 결합기와의 친화성이 감소되어 억제 작용이 방지된다<sup>13</sup>는 주장들은 ouabain의 이 효소에 대한 작용이 K 이온의 결합기와 관계가 있는 것을 암시하고 있는 것이다.

PCMB는 ( $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ )-ATPase의 활성도를 억제하

는 작용이 있으나 이 억제 작용은 cysteine으로 전처치하면 회복된다. 이 효소에 대한 PCMB의 억제 작용이 cysteine으로 회복되는 것은 PCMB가 이 효소내의 SH기와 결합하여 억제 작용을 나타내었다는 것을 암시하는 것으로 사유된다.

DNFB는 ( $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ )-ATPase의 활성도를 억제하나 이 억제 작용은 cysteine으로 전처치하면 회복되거나 lysine이나, threonine, aspartic acid, histidine 등으로 각각 전처치하면 회복되지 않았다. DNFB의 ( $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ )-ATPase에 대한 억제 작용은 이 효소가 함유하는 SH기와 결합하여 나타나는 것으로  $\text{NH}_2$ 기, OH기, COOH기나 또는 imidazole기등은 아무 관계가 없다는 것을 의미한다. 세포막에서 이온의 능동적 운반과 밀접한 관련을 가지고 있는 ( $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ )-ATPase의 활성도에 대한 PCMB나 DNFB의 작용으로 미루어 보아 이 효소에는 SH기를 함유하고 있다는 것을 알 수 있다.

Maleic anhydride는 특이하게  $\text{NH}_2$ 기와 결합하는 물질<sup>19</sup>로 알려져 있는바 세포막에서 분리한 ( $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ )-ATPase의 활성도를 억제하는 작용이 있다. 이 효소에 대한 maleic anhydride의 억제 작용은 lysine으로 전처치하면 회복된다. 이 실험 결과는 maleic anhydride는 ( $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ )-ATPase내의  $\text{NH}_2$ 와 작용하여 억제 작용을 나타내고 lysine으로 전처치하면 억제 작용이 회복되는 것을 암시하고 있으며 이 효소내에는  $\text{NH}_2$ 기가 함유되어 있다는 것을 암시하는 것이다.

IAA의 ( $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ )-ATPase의 활성도에 대한 억제 작용은 cysteine이나 aspartic acid로 각각 전처치하면 완전히 회복되지 못하나 cysteine과 aspartic acid를 동시에 첨가하여 전처치하면 억제 작용이 완전히 회복되었다. IAA의 이 효소에 대한 억제 작용은 ( $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ )-ATPase내의 SH기와 COOH기에 동시에 작용하여 나타났던 것이 cysteine의 SH기와 aspartic acid의 COOH기를 공급하므로써 억제작용이 나타나지 않는 것을 암시하고 있는 것이다. 이 실험 결과는 ( $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ )-ATPase내에는 SH기와 COOH기를 함유하고 있다는 것을 제시하는 것이다.

Adrenaline은 ( $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ )-ATPase에 작용하여 이 효소의 활성도를 촉진시키는 작용이 있다. 이 adrenaline으로 촉진된 작용은 aspartic acid로 전처치하면 소실되었다. 이 효소에 대한 adrenaline의 촉진 작용은 COOH기와 밀접한 관계가 있다는 것을 암시하고 있다. IAA나 adrenaline의 ( $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ )-ATPase의 활성도에 대한 작용으로 미루어 보아 이 효소내에는

SH 기 이외에도 COOH 기를 함유하고 있다는 것을 제시하고 있는 것이다.

세포막에서 이온의 펌프 작용과 밀접한 관련을 가지고 있는  $(Na^+ + K^+) - ATPase$  내에는 SH 기,  $NH_2$  기와 COOH 기등을 함유하고 있어서 이 효소의 활성기로 작용하고 있으나 이 이외에도 다른 활성기를 가지고 있는지는 앞으로 실험에 기대 된다.

## V. 결 론

세포막에서 이온의 능동적 운반과 밀접한 관계가 있는  $(Na^+ + K^+) - ATPase$ 의 활성기를 찾아내기 위하여 토끼 적혈구로 유령세포를 만들어 실험하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1) Ouabain 은  $(Na^+ + K^+) - ATPase$ 의 활성도를 억제하나 SH 기,  $NH_2$  기, OH 기, COOH 기, imidazole 기 등과는 아무 관계가 없이 나타난다.

2) PCMB 나 DNFB 는  $(Na^+ + K^+) - ATPase$ 의 활성도를 억제한다. 이 억제 작용은 SH 기와 관련되어 나타나며 이 효소내에는 SH 기가 함유되어 있다.

3) Maleic anhydride 은  $NH_2$  기와 결합하여  $(Na^+ + K^+) - ATPase$ 의 활성도를 억제하고 있으며 이 효소내에는  $NH_2$  기를 함유하고 있다.

4) IAA 은 SH 기와 COOH 기와 결합하여  $(Na^+ + K^+) - ATPase$ 의 활성도를 억제한다. 이 효소내에는 SH 기 이외에도 COOH 기를 함유하고 있다.

5) Adrenaline 은 COOH 기와 관련되어 이 효소의 활성도를 촉진한다. 이 효소내에는 COOH 기를 함유하고 있다.

이상의 실험으로 이온의 능동적 운반과 밀접한 관계가 있는 Na 이온과 K 이온으로 활성화되는 ATPase 는 SH 기,  $NH_2$  기와 COOH 기를 함유하고 있는 것으로 사료된다.

## 참 고 문 헌

- 1) Auditore, J.V. and Murray, L.: *Cardiac (microsomal) Na+K adenosinetriphosphatase and its possible relationship to active Na+K transport system. Arch. Biochem., 99:372, 1962.*
- 2) Auditore, J.V.: *Sodium-potassium activated G-strophanthin sensitive ATPase in cardiac muscle. Proc. Soc. Exper. Biol. & Med., 110: 575, 1962.*

- 3) Bonting, S.L. and Caravaggio, L.L.: *Sodium-potassium-activated adenosine triphosphatase in squid giant axon. Nature (London), 194: 1180, 1962.*
- 4) Butler, P.J.G., Harris, J.I., Hartley, N.S. and Leberman, R.: *Reversible blocking of peptide-amino groups by maleic anhydride. Biochem. J., 103:78, 1967.*
- 5) Caldwell, P.C. and Keynes, R.D.: *Effect of ouabain on efflux of sodium from squid giant axon. J. Physiol., 148:8, 1959.*
- 6) Danowski, T.S.: *The transfer of potassium across the human blood cell membrane. J. Biol. Chem., 139:693, 1941.*
- 7) Duggan, D.E. and Noll, R.M.: *Effects of ethacrynic acid and cardiac glycosides upon membrane adenosinetriphosphatase of renal cortex. Arch. Biochem. 109:388, 1965.*
- 8) Dunham, E.T. and Glynn, I.M.: *Adenosinetriphosphatase activity and active movements of alkali metal ions. J. Physiol., 156:274, 1961.*
- 9) Fahn, S., Hurley, M.R., Koval, G.J. and Alber, R.W.: *Sodium-potassium-activated adenosine triphosphatase of electrophorus electric organ. II. Effects of N-ethylmaleimide and other sulfhydryl reagents. J. Biol. Chem., 241:1890, 1966.*
- 10) Fiske, C.H. and Subbarow, Y.: *The colorimetric determination of phosphorous. J. Biol. Chem., 65:375, 1925.*
- 11) Gardner, J.D. and Conlon, T.P.: *The effects of sodium and potassium on ouabain binding by human erythrocytes. J. Gen. Physiol., 60:609, 1972.*
- 12) Garrahan, P.J. and Glynn, I.M.: *Uncoupling sodium pump. Nature (London), 207:1098, 1965.*
- 13) Glynn, I.M.: *Sodium and potassium movements in human red cells. J. Physiol., 134:278, 1956.*
- 14) Glynn, I.M.: *The action of cardiac glycosides on sodium and potassium movements in human red cells. J. Physiol., 136:148, 1957.*
- 15) Harris, E.J.: *The influence of the metabolism*

- of human erythrocytes on potassium content. *J. Biol. Chem.*, 145:579, 1941.
- 16) Judah, J.D. and Ahmed, K.: Inhibitors of transport and cation activated ATPase. *J. Cell. & Comp. Physiol.*, 64:355, 1964.
- 17) Katz, A.I. and Epstein, F.H.: Physiologic role of sodium-potassium-activated adenosine triphosphatase in the transport of cations across biological membranes. *New Eng. J. of Med.*, 278:253, 1968.
- 18) Knauf, P.A. and Rothstein, A.: Chemical modification of membranes. II. Permeation paths for sulfhydryl agents. *J. Gen. Physiol.*, 58: 211, 1971.
- 19) Maizels, M.: Cation control in human erythrocytes. *J. Physiol.*, 108:247, 1949.
- 20) Post, R.L. and Jolly, P.C.: Linkage of sodium, potassium, and ammonium active transport across human erythrocyte membrane. *Biochem. et Biophys. Acta.*, 25:118, 1957.
- 21) Post, R.L., Merritt, C.R., Kinsolving, C.R. and Albright, C.D.: Membrane adenosine triphosphatase as participant in active transport of sodium and potassium in human erythrocyte. *J. Biol. Chem.*, 235:1796, 1960.
- 22) Post, R.L. and Kume, S.J.: Evidence for an aspartyl phosphate residue at the active site of sodium and potassium ion transport adenosine triphosphatase. *J. Biol. Chem.*, 248:6993, 1973.
- 23) Rega, A.F., Rothstein, A. and Weed, R.I.: Erythrocyte membrane sulfhydryl groups and the active transport of cations. *J. Cell. Physiol.*, 70:45, 1967.
- 24) Rosenberg, S.A. and Guidotti, G.: The protein of human erythrocyte membranes. I. Preparation, solubilization, and partial characterization. *J. Biol. Chem.*, 243:1985, 1968.
- 25) Skou, J.C.: Influence of some cations on adenosine triphosphatase from peripheral nerves. *Biochem. et Biophys. Acta.*, 23:394, 1957.
- 26) Skou, J.C.: Preparation from mammalian brain and kidney of the enzyme system involved in active transport of  $\text{Na}^+$  and  $\text{K}^+$ . *Biochem. Biophys. Acta.*, 58:314, 1962.
- 27) Skou, J.C.: Studies on the  $\text{Na}^+\text{K}^+$  activated ATP hydrolyzing enzyme system. The role of SH groups. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 10:79, 1963.
- 28) Skou, J.C.: Enzymatic aspects of active linked transport of  $\text{Na}^+$  and  $\text{K}^+$  through the cell membrane. *Prog. Biol.*, 14:134, 1964.
- 29) Tosteson, D.C., Moulton, R.H. and Blaustein, M.: Enzymatic basis for difference in active cation transport in two genetic types of sheep red cells. *Federation Proc.*, 19:128, 1960.
- 30) Tosteson, D.C. and Hoffman, J.F.: Regulation of cell volume by active cation transport in high and low potassium sheep red cells. *J. Gen. Physiol.*, 44:169, 1960.
- 31) Wheeler, K.P. and Whittam, R.: Structural and enzymic aspects of hydrolysis of adenosine triphosphate by membranes of kidney cortex and erythrocytes. *Biochem. J.*, 93:349, 1964.
- 32) Whittam, R. and Ager, M.E.: Connection between active cation transport and metabolism in erythrocytes. *Biochem. J.*, 97:214, 1965.