

# Acetylcholine이 토끼 적혈구막의 NaK ATPase의 활성도에 대한 작용

경희대학교 의과대학 생리학교실

고 일 섭

=Abstract=

## Action of Acetylcholine on Sodium-Potassium Activated ATPase in Rabbit Red Cell Membrane

Il Sup Koh

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

The action of acetylcholine on the sodium plus potassium activated ATPase activity in the rabbit red cell membrane has been investigated and the experiments were also designed to determine the mechanism of action of acetylcholine on the ATPase activity. The following results were observed.

1. The activity of the NaK ATPase from red cell membrane is inhibited by acetylcholine.
2. The ratio of inhibition of NaK ATPase by acetylcholine 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 ratio of inhibition of the enzyme by acetylcholine is increased by raising the calcium concentration.
4. The inhibitory action of acetylcholine on the NaK ATPase activity was not related to the sulfhydryl group of cysteine, the hydroxyl group of threonine, or the carboxyl group of aspartic acid.
5. The inhibitory action of acetylcholine on the ATPase activity is due to amino group of the enzyme of NaK ATPase.

### 서 론

적혈구나 신경세포에서 Na 이온을 세포막 밖으로 K 이온을 세포막 안으로 전기 화학적 농도구배에 역행하여 이동하는 이온의 능동적 운반작용에 의하여 세포의 이온의 조성이 유지되고 있다는 것은 널리 알려져 있다. 세포막에서 이루어지는 이온의 능동적 운반은 적혈구<sup>1-3)</sup>에서나 신경세포<sup>4-9)</sup>에서 해당작용으로 형성된 adenosine triphosphate(ATP)의 분해 과정에서 유리되는 에너지를 사용하고 있다는 것은 여러 연구자들에 의하여 제시되고 있는 것이다.

세포막에서 이루어지는 이 이온의 능동적 운반은 사람 적혈구에서 한 분자의 ATP가 분해할 때 3개의 Na 이온을 세포막 밖으로 2개의 K 이온을 세포막 안으로 능동적 운반을 하고 있다는 것을 근래에 이르러 여러 연구자들이 주장하고 있다<sup>7-9)</sup>.

한편 Skou<sup>10)</sup>는 개의 말초신경에서 Na 이온과 K 이온을 동시에 첨가하였을 때에 활성화되는 adenosinetriphosphatase(NaK ATPase)가 있다는 것을 발견하고 이 효소가 세포막에서 이루어지는 이온의 능동적 운반과 밀접한 관계가 있다는 것을 처음으로 암시하였다. 그 후 적혈구막에서도 Na 이온과 K 이온을 동시에 첨가하였을 때 활성화되는 ATPase가 있으며 이 효소

와 세포막에서 이루어지는 Na 이온과 K 이온의 능동적 운반과 밀접한 관계가 있다는 것을 여러 연구자들에<sup>8,11-13)</sup> 의하여 주장되었다.

적은 농도의 ouabain 은 이온의 능동적 운반을 억제하고 같은 농도의 ouabain 은 여러 조직에서 Na 이온과 K 이온으로 활성화되는 ATPase 의 활성화도도 억제하고 있음으로 이같은 ouabain 의 작용은 이온의 능동적 운반과 이 효소가 서로 밀접한 관계를 가지고 있다는 것을 제시하고 있는 것이다<sup>14-17)</sup>.

Dockry<sup>18)</sup>는 골격근에서 acetylcholine 이 이온의 능동적 운반을 촉진시키는 작용이 있다고 주장하여 이온의 능동적 운반과 밀접한 관계를 가지고 있는 Na 이온과 K 이온으로 활성화되는 ATPase 의 활성화도를 acetylcholine 이 증가시키는 작용이 있다는 것을 암시하였으며 Mozsik<sup>19)</sup> 등은 사람 위점막 세포에서 Na 이온과 K 이온으로 활성화되는 ATPase 에 acetylcholine 을 작용하여 이 효소의 활성화도를 acetylcholine 이 증가시키는 작용이 있다고 주장하고 있으나 적혈구막에서 Na 이온과 K 이온으로 활성화되는 ATPase 의 활성화도에 대한 acetylcholine 의 작용에 관해서는 알려져 있지 않다.

본 실험에서는 토끼 적혈구로 ghoat 세포를 만들어 세포막만을 분리하여 세포막 내의 Na 이온과 K 이온으로 활성화되는 ATPase 의 활성화도에 대한 acetylcholine 의 작용을 구명하고 그 작용하는 기전도 아울러 실험하였다.

## 실험방법

체중 2 kg 내외의 성숙한 토끼를 성의 구별없이 사용하였다. 심장 천자로 채혈한 혈액을 heparin 으로 응고를 방지하고 15분간 1,000 x g 로 원심분리한 다음 혈장과 백혈구층을 제거하였다. 생리식염수로 2회 세척한 다음 다시 등장성 MgCl<sub>2</sub> 용액에 1 mM EDTA 를 함유한 용액으로 2회 세척하였다.

이렇게 세척된 적혈구만을 모아서 혈액소의 부착이 없는 적혈구막(hemoglobin-free ghost)을 얻기 위하여 Rosenberg<sup>20)</sup> 등의 방법에 따라서 30배 용량의 15 mOsM Tris-HCl buffer(pH 7.5, 8.5 mM Tris-6.5 mM HCl 혼합액)를 첨가하여 4°C 에서 한시간동안 방치하였다.

이렇게 용혈된 적혈구를 4°C 에서 10,000 x g 로 15분간 원심분리한 다음 상등액을 제거하여 막분획만을 얻었다. 침전된 막분획을 다시 같은 조작으로 15 mOsM Tris-HCl buffer 용액에 1 mM EDTA 를 혼합한 용액

으로 2회 원심조작으로 세척한 다음 15 mOsM Tris-HCl buffer 용액으로 1회 세척하였다. 이렇게 해서 얻은 막분획은 혈액소의 부착이 없는 유백색의 막분획이었으며 이것을 본 실험에 사용하였다.

ATPase 의 활성화도는 Dunham<sup>21)</sup> 등의 방법에 따라서 측정하였다. 10 ml 의 여러 실험관 내에 막분획과 여러 반응액을 각각 0.1 ml 씩을 첨가하고 증류수로 조절하여 총량을 1 ml 로 하여 44°C 에서 한시간 동안 water bath 에 부치하였다. 여러 실험관에 막분획과 여러 반응액을 넣은 다음 15 mM ATP 를 첨가할 때는 15초 간격으로 첨가하고 한시간 동안 반응을 시킨 다음에는 15초 간격으로 얼음으로 냉각시킨 물속으로 실험관을 이동시켜서 1분간 냉각시켰다.

다시 냉각된 10% trichloroacetic acid 를 1 ml 씩을 같은 시간 간격으로 첨가하여서 반응을 정지시킨 다음 15분간 1,000 x g 로 원심분리하여 단백질을 침전시키고 그 상등액 1.5 ml 내에 유리된 inorganic phosphate 를 Fiske-Subbarow<sup>22)</sup> 법에 의하여 측정하여 ATPase 의 활성화도로 나타내었다.

## 실험성적

### 1. Acetylcholine 의 농도의 영향

반응액내의 acetylcholine 의 농도를 0에서 20 mM 까지 증가시켜서 NaK ATPase 의 활성화도에 미치는 영향을 제 1 도에 도시하였다.

반응액내의 acetylcholine 의 농도를 0에서 5 mM 까지 증가시키면 농도의 증가에 따라서 NaK ATPase 의 활성화도는 억제되고 그 이상의 농도인 5 mM 에서 20 mM 까지 농도를 증가시킨 데서는 NaK ATPase 의 활성화도는 낮은 농도때 보다 더 억제되지 않고 일정하게 유지되었다. 적혈구막내의 NaK ATPase 의 활성화도는 acetylcholine 의 농도의 증가에 따라서 억제되고 5 mM 에서 최대의 억제작용이 나타난다.

### 2. K 이온의 농도의 영향

반응액내의 Na 이온의 농도를 일정하게 유지하고 K 이온의 농도를 변동시키면서 측정한 ATPase 의 활성화도의 변화와 여기에 일정농도의 acetylcholine 을 첨가하였을 때 나타나는 ATPase 의 활성화도의 변화를 관찰한 실험을 제 2 도에 도시하였다.

K 이온의 농도를 0에서 32 mM 까지 증가시켜서 작용한 실험에서 ATPase 의 활성화도는 K 이온의 농도가 약 6 mM 에 이르기까지는 점차적으로 증가되나 그 이

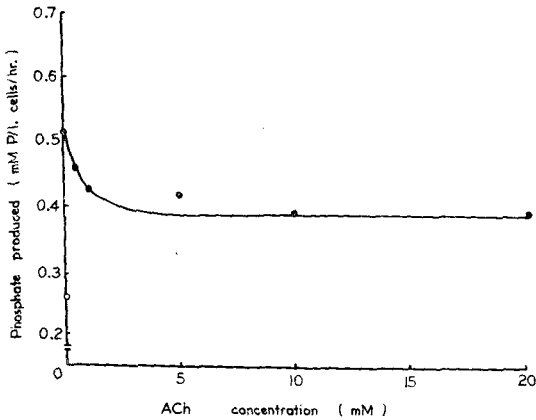


Fig. 1. The effect of ACh concentration on the NaK ATPase activity of red cell ghosts. Temp. 44°C; pH 7.6; ATP 1.5 mM; Mg 2 mM; Na 80 mM; K 17 mM; Duration 1 hr.

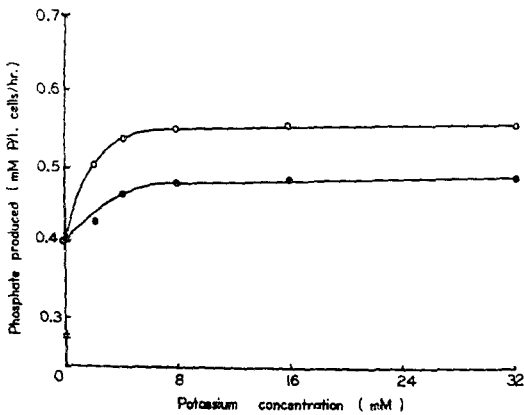


Fig. 2. The effect of potassium concentration on the ATPase activity of red cell ghosts in the presence and absence of Ach. Temp. 44°C; pH 7.6; ATP 1.5 mM; Mg 2 mM; Na 80 mM; Duration 1 hr. ○Ach absent; ●Ach 5 mM.

상의 농도에서는 농도 증가에 따라서 활성도는 증가되지 않고 일정하게 유지되었다.

일정농도의 acetylcholine 을 첨가하였을 때의 ATPase 의 활성도의 억제율은 K 이온의 농도를 증가시키는데 따라서 감소하였다(제 1 표).

### 3. Na 이온의 농도의 영향

반응액내의 K 이온의 농도를 일정하게 유지하고 Na 이온의 농도를 증가시키면서 ATPase 의 활성도의 변동과 일정농도의 acetylcholine 을 첨가하였을 때의 ATPase 의 활성도를 동시에 측정한 실험을 제 3 도에 표시하였다.

반응액내의 Na 이온의 농도를 0에서 160 mM 까지 증가시켜서 작용한 실험에서 ATPase 의 활성도는 Na 이온의 농도가 약 80 mM 에 도달할 때까지는 점차적으로 증가되나 그 이상의 농도에서는 농도의 증가에 따라서 활성도는 증가되지 않고 일정하게 나타난다.

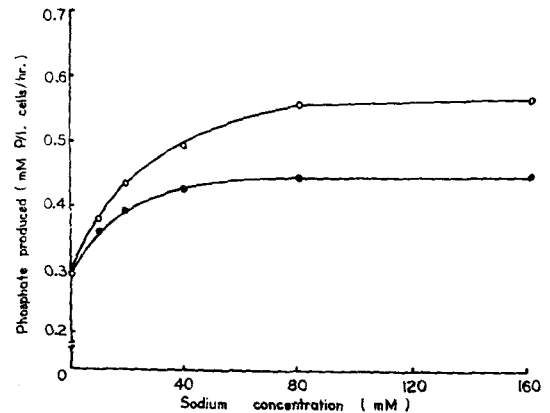


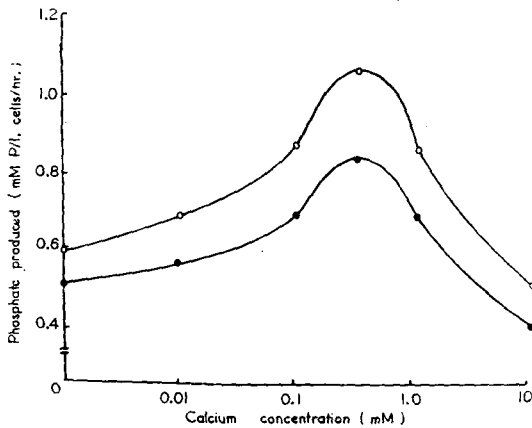
Fig. 3. The effect of sodium concentration on the ATPase activity of red cell ghosts in the presence and absence of Ach. Temp. 44°C; pH 7.6; ATP 1.5 mM; Mg 2 mM; K 17 mM; Duration 1 hr. ○Ach absent; ●Ach 5 mM.

Table 1. The effect of potassium concentration on inhibition by Ach of the ATPase activity of red cell ghosts

| K concentration (mM) | ATPase activity (mM P/l. cells/hr.) | Activity in the presence of Ach (5 mM) (mM P/l. cells/hr.) | Inhibition (%) |
|----------------------|-------------------------------------|--|----------------|
| 2                    | 0.50(0.10)                          | 0.43(0.07)   | 70.0           |
| 4                    | 0.53(0.13)                          | 0.47(0.06)   | 46.2           |
| 8                    | 0.55(0.15)                          | 0.48(0.07)   | 46.7           |
| 16                   | 0.55(0.15)                          | 0.48(0.07)   | 46.7           |
| 32                   | 0.55(0.15)                          | 0.48(0.07)   | 46.7           |

**Table 2. The effect of sodium concentration on inhibition by Ach of the ATPase activity of red cell ghosts.**

| Na concentration (mM) | ATPase activity (mM p/l. cells/hr.) | Activity in the presence of Ach (5mM) (mM p/l. cells/hr.) | Inhibition (%) |
|-----------------------|-------------------------------------|---|----------------|
| 10                    | 0.38(0.09)                          | 0.36(0.02)  | 22.2           |
| 20                    | 0.43(0.14)                          | 0.39(0.04)  | 28.6           |
| 40                    | 0.49(0.20)                          | 0.42(0.07)  | 35.0           |
| 80                    | 0.55(0.26)                          | 0.45(0.10)  | 38.5           |
| 160                   | 0.56(0.27)                          | 0.45(0.09)  | 33.3           |

**Fig. 4. The effect of calcium concentration on the NaK ATPase activity of red cell ghosts in the presence and absence of Ach. Temp. 44°C; pH 7.6; ATP 1.5 mM; Mg 2mM; Na 80 mM; K 17mM; Duration 1hr. ○Ach absent; ●Ach 5mM.**

Na 이온의 농도를 증가시키는데 따라서 일정도의 acetylcholine 의 작용으로 나타나는 ATPase 의 활성도의 억제율은 Na 이온의 농도를 증가시키는데 따라서 증가되었다(제 2 표).

#### 4. Ca 이온의 농도의 영향

Ca 이온의 농도를 변동시키면서 NaK ATPase 의 활

성도에 미치는 작용과 여기에 일정농도의 acetylcholine 을 첨가하였을 때의 활성도의 변동을 제 3 도에 표시하였다.

반응액내의 Ca 이온의 농도를 0에서 10 mM 까지 증가시켜서 NaK ATPase 의 활성도를 관찰한 실험에서 Ca 이온의 농도가 0.5 mM 에 도달할 때까지는 NaK ATPase 의 활성도는 증가되나 0.5 mM 보다 높은 농도에서는 활성도가 억제되었다.

Ca 이온의 농도의 변동에 따라서 acetylcholine 의 NaK ATPase 의 활성도의 억제율은 Ca 이온의 농도가 증가되는데 따라서 증가되었다(제 3 표).

#### 5. Cysteine 의 영향

Acetylcholine 의 작용으로 나타나는 NaK ATPase 의 활성도의 변동에 대한 cysteine 의 첨가로 인한 영향을 관찰한 실험을 제 5 도에 표시하였다.

이 실험에서 Mg 이온만을 첨가했을 때 활성화되는 Mg ATPase 의 활성도보다 Mg 이온에 Na 이온과 K 이온을 동시에 첨가하여 활성화되는 NaK ATPase 의 활성도는 현저한 촉진작용이 나타난다.

Na 이온과 K 이온을 첨가하고 여기에 acetylcholine 을 작용시키면 NaK ATPase 의 활성도는 억제되었다.

NaK ATPase 에 cysteine 만을 작용시키면 이 효소의 활성도는 증가되나 이는 이 효소에 대한 cysteine 의 보완작용에 기인되는 것으로 사료된다.

**Table 3. The effect of calcium concentration on inhibition by Ach of the NaK ATPase activity of red cell ghosts**

| Ca concentration (mM) | ATPase activity (mM p/l. cells/hr.) | Activity in the presence of Ach (5mM) (mM p/l. cells/hr.) | Inhibition (%) |
|-----------------------|-------------------------------------|---|----------------|
| 0.01                  | 0.68                                | 0.57  | 16.0           |
| 0.1                   | 0.86                                | 0.68  | 20.9           |
| 0.5                   | 1.04                                | 0.82  | 21.2           |
| 1.0                   | 0.84                                | 0.68  | 19.1           |
| 10.0                  | 0.51                                | 0.38  | 25.5           |

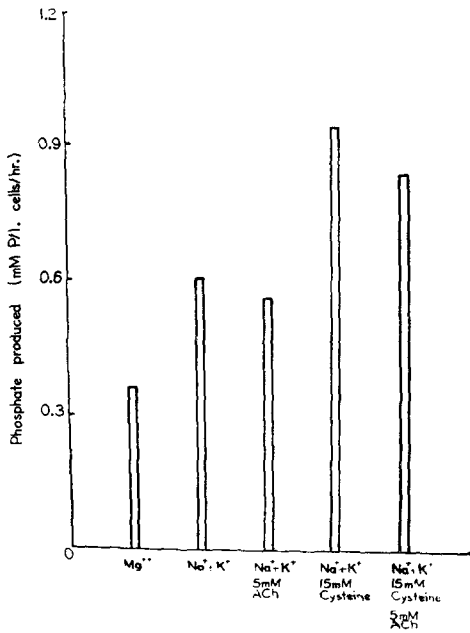


Fig. 5. The effect of cysteine in the presence of Ach on the NaK ATPase activity of red cell ghosts. Temp. 44°C; pH 7.6; ATP 1.5 mM; Mg 2 mM; Na 80 mM; K 17 mM; cysteine 15mM; Ach 5mM. Duration 1hr.

NaK ATPase 에 cysteine 으로 전처리한 다음 acetylcholine 을 작용시키면 cysteine 만을 NaK ATPase 에 작용했을 때보다 억제작용이 나타나는데 이 억제작용과 NaK ATPase 에 acetylcholine 만을 작용했을 때 나타나는 억제작용과는 아무 차이가 없다.

NaK ATPase 의 활성도에 대한 acetylcholine 의 억제작용은 cysteine 의 첨가로 아무 영향이 나타나지 않는 것으로 미루어 보아 cysteine 이 함유하고 있는 SH 기는 NaK ATPase 에 대한 acetylcholine 의 억제작용과는 아무 관계가 없는 것으로 사료된다.

### 6. Lysine 의 영향

NaK ATPase 의 활성도에 대한 acetylcholine 의 억제작용에 lysine 을 작용하여 나타나는 영향을 관찰한 실험을 제 6 도에 도시하였다.

이 실험에 Na 이온과 K 이온으로 활성화된 NaK ATPase 의 활성도는 acetylcholine 의 첨가로 억제작용이 나타난다.

NaK ATPase 에 lysine 만을 첨가하면 거의 아무 영향이 나타나지 않으며 NaK ATPase 에 lysine 으로 전처리한 다음 acetylcholine 을 작용시키면 acetylcholine

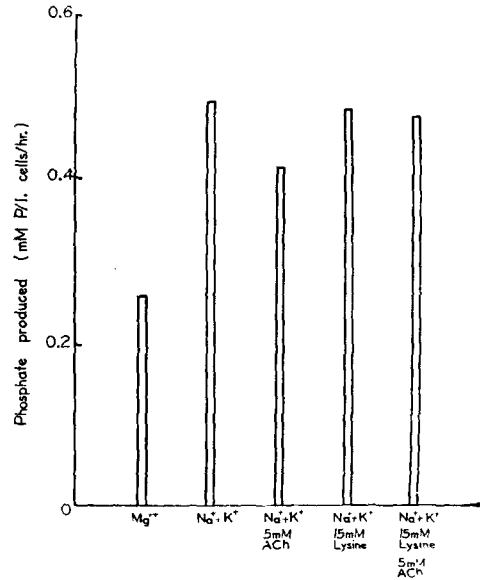


Fig. 6. The effect of lysine in the presence of Ach on the NaK ATPase activity of red cell ghosts. Temp. 44°C; pH 7.6; ATP 1.5 mM; Mg 2 mM; Na 80 mM; K 17 mM; lysine 15mM; Ach 5 mM. Duration 1hr.

으로 인한 억제작용이 나타나지 않는다.

NaK ATPase 의 활성도에 대한 acetylcholine 의 억제작용이 lysine 의 첨가로 나타나지 않는 것은 lysine 이 함유하고 있는 NH<sub>2</sub> 기가 NaK ATPase 에 대한 acetylcholine 의 억제작용과 관련을 가지고 있는 것으로 생각된다.

### 7. Threonine 의 영향

NaK ATPase 의 활성도에 대한 acetylcholine 의 억제작용에 threonine 을 작용하여 나타나는 영향을 본 실험을 제 7 도에 도시하였다.

Na 이온과 K 이온으로 활성화되는 ATPase 에 acetylcholine 만을 첨가하면 NaK ATPase 의 활성도보다 억제작용이 나타난다.

NaK ATPase 에 threonine 만을 작용시키면 이 효소의 활성도는 작용시키지 않았을 때의 NaK ATPase 의 활성도와 아무 차이가 나타나지 않는다.

NaK ATPase 에 threonine 으로 전처리한 다음 acetylcholine 을 작용하면 이 효소의 활성도는 threonine 만으로 작용하였을 때보다 억제작용이 나타난다.

NaK ATPase 에 acetylcholine 만을 작용하여 나타나는 효소의 억제작용과 threonine 으로 전처리한 다음에 나타나는 억제작용은 아무 차이를 나타내지 않는다.

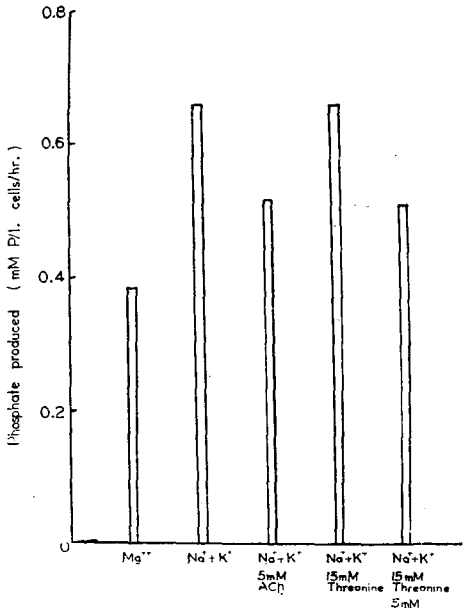


Fig. 7. The effect of threonine in the presence of Ach on the NaK ATPase activity of red cell ghosts. Temp. 44°C; pH 7.6; ATP 1.5 mM; Mg 2mM; Na 80 mM; K 17 mM; threonine 15mM; Ach 5mM. Duration 1hr.

이는 NaK ATPase의 활성도에 대한 acetylcholine의 억제작용에 threonine은 아무 영향을 미치지 않는다는 것을 뜻하며 acetylcholine의 NaK ATPase의 활성도를 억제하는 작용에는 threonine이 함유하는 OH기가 아무 관련을 가지고 있지 않는 것으로 사료된다.

8. Aspartic acid의 영향

Acetylcholine이 NaK ATPase의 활성도에 대한 억제작용에 aspartic acid의 첨가로 나타나는 영향을 본 실험을 제 8도에 도시하였다.

NaK ATPase에 acetylcholine을 작용하면 이 효소의 활성도는 작용하지 않았을 때의 NaK ATPase의 활성도보다 억제된다.

Aspartic acid만을 NaK ATPase에 작용하였을 때 이 효소의 활성도는 aspartic acid을 첨가하지 않았을 때의 활성도 보다 약간 증가되는데 이는 이 효소에 대한 aspartic acid의 보완작용에 기인되어 나타나는 것으로 사료된다.

NaK ATPase에 aspartic acid으로 전처리한 다음 acetylcholine을 작용하면 aspartic acid만을 NaK ATPase에 작용하였을 때의 나타나는 활성도보다 억제된다.

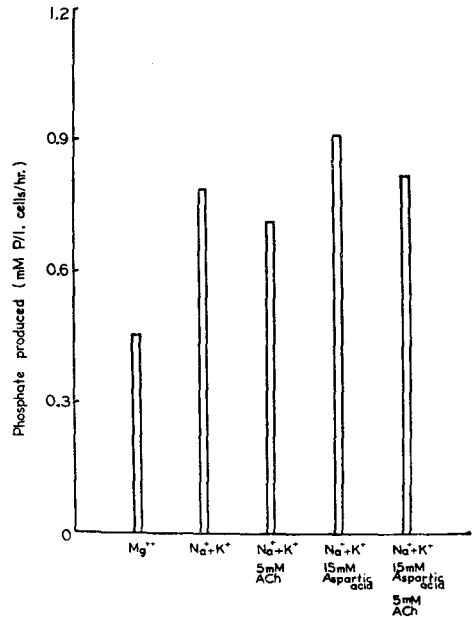


Fig. 8. The effect of aspartic acid in presence of Ach on the NaK ATPase activity of red cell ghosts. Temp. 44°C; pH 7.6; ATP 1.5 mM; Mg 2 mM; Na 80 mM; K 17 mM; aspartic acid 15 mM; Ach 5 mM. Duration 1 hr.

Aspartic acid로 전처리한 다음 acetylcholine의 작용으로 나타나는 억제작용과 NaK ATPase에 acetylcholine만을 작용하여 나타나는 억제작용과는 아무 차이를 나타내지 않는다.

이는 NaK ATPase의 활성도에 대한 acetylcholine의 억제작용은 aspartic acid의 작용으로 아무 영향을 받지 않는다는 것을 뜻하며 aspartic acid가 함유하고 있는 COOH기가 NaK ATPase에 대한 acetylcholine의 억제작용과 아무 관련을 가지고 있지 않는 것으로 사료된다.

고찰

세포막내에 Na이온과 K이온을 동시에 첨가하였을 때에 활성화되는 ATPase는 사람 적혈구나<sup>11,13)</sup> squid의 축삭돌기 접질<sup>22)</sup> 또는 봉팔의 세노관<sup>23)</sup>과 간세포막<sup>24)</sup>에서도 분리되며 이런 여러 조직의 세포막 내에 있는 ATPase는 양적으로는 차이가 있으나 근본적으로는 같은 특징을 가지고 있어 세포막에서 이루어지는 이온의 능동적 운반과 밀접한 관련을 가지고 있다는 사실은 여러 연구자들<sup>7,11-13)</sup>이 주장하고 있다.

토끼 적혈구막에서도 Na 이온과 K 이온으로 활성화 되는 ATPase 가 있으며 이 ATPase 의 활성화도는 acetylcholine 의 작용으로 억제되었다.

세포막에서 Na 이온을 세포막 밖으로 K 이온을 세포막 안으로 능동적 운반하는 작용과 밀접한 관계가 있는 이 효소의 활성화도를 acetylcholine 이 억제하고 있다는 것은 acetylcholine 이 세포막에 작용하면 세포막에서 이온의 능동적 운반을 억제하고 있다는 것을 암시하는 것이다. 세포막에서 이온의 능동적 운반이 억제되면 세포막 안으로 능동적으로 운반되는 K 이온의 양이 감소되어서 세포안의 음이온을 중화시키는 것이 감소됨으로 세포막 안에 음이온의 증가가 일어나게 된다. 이에 대응하여 세포막 밖에 양이온의 증가가 일어나게 되어서 막전위는 증가하게 되어서 과분극상태가 되므로 세포의 흥분성이 감소되는 것으로 생각된다.

한편 Mozsik<sup>19)</sup> 등은 사람 위점막 세포에서 분리한 Na 이온과 K 이온으로 활성화 되는 ATPase 의 활성화도를 acetylcholine 이 촉진시키는 작용이 있다고 한 바 있다. 이는 위점막 세포에서 이온의 능동적 운반과 밀접한 관계가 있는 NaK ATPase 의 활성화도를 촉진시킨다는 것은 이온의 능동적 운반을 촉진시키고 있다는 것을 암시하는 것이다. 위점막 세포에서 이온의 능동적 운반이 촉진되면 세포막 안으로 K 이온의 능동적 운반이 촉진되고 K 이온의 농도가 세포막 안에 증가되면 세포막 안의 음이온을 중화시키는 작용이 증가됨으로 세포막 안의 음이온의 감소가 일어나게 된다. 이에 대응하여 세포막 밖의 양이온의 감소가 일어나게 되므로 세포막은 저분극 상태가 되어서 막전위의 감소가 일어나서 위점막 세포는 흥분성이 증가되는 것으로 생각된다.

또한 Dockry<sup>18)</sup> 는 골격근에서 acetylcholine 이 이온의 능동적 운반을 촉진시킨다고 주장하고 있는데 이는 acetylcholine 이 골격근에서 이온의 능동적 운반을 촉진시키면 골격근 세포막 안으로 K 이온의 능동적 운반이 촉진됨으로 세포막 안의 K 이온의 농도가 증가되어 음이온을 중화시키는 작용이 증가되어서 세포막 안의 음이온의 감소가 일어나게 되며 이에 대응하여 세포막 밖의 양이온의 감소가 일어나서 세포막은 저분극상태로 된다. 이런 상태에 이르면 막전위는 감소됨으로 acetylcholine 은 골격근 세포에서 흥분성을 증가시키는 작용이 있는 것으로 생각된다.

이같이 조직의 종류에 따라서 세포막에서 이루어지는 이온의 능동적 운반 작용에 acetylcholine 은 서로 다른 작용을 나타내는데 이것이 조직의 종류에 따라서

acetylcholine 의 작용이 서로 다른 양상으로 나타나는 원인을 암시하고 있는 것으로 생각된다.

Whittam<sup>20)</sup>, Glynn<sup>27)</sup> 과 Baker<sup>28)</sup> 등은 세포막의 효소계에는 Na 이온과 친화성을 가지고 활성화되는 반응부위와 K 이온과 친화성을 가진 부위가 있어 Na 이온의 반응부위는 세포막 내부측에 K 이온의 외부측에 놓여 있다고 주장한 바 있다. 한편 ghost 세포막은 Na 이온과 K 이온에 대한 투과성이 높으므로 이들 이온이 반응액내에 가해지면 친화성을 가진 부위와 작용하게 될 것이다.

반응액내의 K 이온의 농도를 증가시키면서 NaK ATPase 의 활성화도의 변동을 본 실험에서 Na 이온의 농도를 일정하게 유지하고 K 이온의 농도만을 증가시키면 농도의 증가에 따라서 이 효소의 활성화도는 증가되고 일정한 농도에 도달하면 활성화도의 증가는 나타나지 않는다.

이 현상은 K 이온의 농도가 낮은 부위에서는 K 이온과 Na 이온의 농도비율은 낮아져 있어 Na 이온이 K 이온의 반응부위와 치환이 일어나서 일부의 K 이온의 반응부위는 Na 이온으로 치환이 일어나서 K 이온의 반응부위가 Na 이온으로 점유될 것이나 K 이온의 농도가 낮으므로 활성화되는 K 이온의 반응부위는 일부분에 그치게 되어 이 효소의 활성화도는 감소된다. K 이온의 농도가 높은 부위에서는 K 이온과 Na 이온의 농도비율이 높아지게 되어 Na 이온이 K 이온의 반응부위와 치환이 일어날 것이나 적은 양밖에 이루어지지 못하고 K 이온의 농도증가로 인한 K 이온의 반응부위가 활성화되므로 이 효소의 활성화도는 증가되는 것으로 생각된다.

K 이온의 농도를 증가시키는데 따라서 acetylcholine 의 작용으로 NaK ATPase 의 활성화도의 억제율은 감소되었다. K 이온의 농도가 낮은 부위에서는 K 이온과 Na 이온은 농도비율은 낮아져 있어 Na 이온이 K 이온의 반응부위와 치환이 일어나서 일부의 K 이온의 반응부위는 Na 이온으로 점유될 것이나 K 이온의 농도가 낮음으로 K 이온의 반응부위는 일부 밖에 활성화 되지 못하므로 이 반응부위에 대한 acetylcholine 의 친화성이 높아져서 효소의 활성화도를 감소시키고 K 이온의 농도가 높은 부위에서는 K 이온과 Na 이온의 농도비율은 낮아지나 Na 이온이 K 이온의 반응부위와 일부 치환이 일어나서 점유되거나 K 이온의 농도가 증가되어 가므로 K 이온의 반응부위는 포화되므로 이 반응 부위에 대한 acetylcholine 의 친화성이 감소되어 이 효소의 활성화도의 억제율은 K 이온의 농도를 증가시키는데 따라서 감

소되는 것으로 사료된다.

반응액내의 K이온의 농도를 일정하게 유지하고 Na 이온의 농도를 증가시키는데 따라서 NaK ATPase 의 활성도의 변동을 본 실험에서 Na 이온의 농도를 증가시키는데 따라서 이 효소의 활성도는 증가되나 일정농도에 도달하면 그 이상 Na 이온의 농도를 증가시켜도 활성도는 증가되지 않았다. 이 현상은 Na 이온의 농도가 낮은 부위에서는 K이온과 Na 이온의 농도비율은 높아져서 K이온이 Na 이온의 반응부위와 치환이 일어날 것이나 Na 이온의 농도가 낮으므로 Na 이온의 반응부위가 일부 밖에 활성화시키지 못하므로 효소의 활성도는 감소되고 Na 이온의 농도가 높은 부위에서는 K 이온과 Na 이온의 농도비율은 낮아져 있어서 Na 이온이 K이온의 반응부위와 치환이 일어나겠으나 Na 이온의 농도가 높으므로 Na 이온의 반응부위가 포화되어서 이 반응부위가 활성화되므로 효소의 활성도는 증가되는 것으로 생각된다.

Na 이온의 농도를 증가시키는데 따라서 acetylcholine 의 작용으로 NaK ATPase 의 활성도의 억제율은 증가되었다. Na 이온의 농도가 낮은 부위에서는 K이온과 Na 이온의 농도비율은 높아져 있어 K이온은 Na 이온의 반응부위와 일부치환이 될 것이나 Na 이온의 농도가 낮으므로 Na 이온의 반응부위는 일부 밖에 점유되지 못하게 되어 이 반응부위에 대한 acetylcholine 의 친화성이 감소되어 효소의 활성도의 억제율은 감소되나 Na 이온의 농도가 높은 부위에서는 K이온과 Na 이온의 농도비율은 낮아져 있어 Na 이온이 K이온의 반응부위와 치환이 일어날 것이나 Na 이온의 농도가 K 이온의 농도에 비하여 비교적 높은 상태에서는 acetylcholine 의 친화성이 높아져서 Na 이온의 농도의 증가에 따라서 효소의 억제율은 증가되는 것으로 사료된다.

반응액내의 cysteine, threonine 및 aspartic acid 를 각각 첨가하여 ghosts 를 전처리한 다음 acetylcholine 를 작용시켜서 NaK ATPase 의 활성도에 대한 작용을 관찰한 실험에서 acetylcholine 으로 인한 억제작용에는 아무 영향을 주지 못하였다. 이는 cysteine 의 SH기나 threonine 의 OH기 및 aspartic acid 의 COOH 기가 이 효소에 대한 acetylcholine 의 억제작용과 아무 관련을 가지고 있지 않다는 것을 뜻하는 것이다.

반응액내에 lysine 으로 ghosts 를 전처리한 다음 acetylcholine 을 첨가하여 NaK ATPase 의 활성도에 대한 작용을 본 실험에서 lysine 의 전처리로 acetylcholine 의 이 효소에 대한 억제작용은 나타나지 않았다. 이는 lysine 이 함유하고 있는 NH<sub>2</sub>기가 acetylch-

oline 의 NaK ATPase 의 활성도를 억제시키는 작용과 관계가 있다는 것을 암시하는 것이다. 이 실험 결과는 acetylcholine 의 NaK ATPase 의 활성도를 억제하는 작용은 이 효소내에 있는 NH<sub>2</sub>기와 결합하여 나타나는 현상이라는 것을 암시하는 것이다.

Acetylcholine 은 세포막 내에 있는 NaK ATPase 의 활성도를 억제시키는 것으로 미루어 보아 이 효소와 밀접한 관계가 있는 Na 이온을 세포막 밖으로 K이온을 세포막 안으로 능동적 운반을 하는 작용을 억제시켜서 세포막의 흥분성을 감소시키는 작용이 있다는 것을 암시하고 있으며 이같은 작용은 이 효소내의 NH<sub>2</sub>기가 관여되는 것으로 사료된다.

## 결 론

세포막 내에 있는 Na 이온과 K이온으로 활성화되는 ATPase 에 대한 acetylcholine 의 작용을 알고져 토끼 적혈구로 ghost 세포를 만들어 NaK ATPase 의 활성도에 대한 acetylcholine 의 작용과 작용기전도 아울러 실험하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

- 1) Acetylcholine 은 NaK ATPase 에 작용하여 활성도를 억제시킨다.
- 2) K이온의 농도증가로 NaK ATPase 의 활성도에 대한 acetylcholine 의 억제율은 감소되었다.
- 3) Na 이온의 농도증가로 NaK ATPase 의 활성도에 대한 acetylcholine 의 억제율은 증가되었다.
- 4) Ca 이온으로 NaK ATPase 의 활성도에 대한 acetylcholine 의 작용은 억제되었으며 Ca 이온의 농도 증가에 따라서 억제율은 증가되었다.
- 5) Acetylcholine 의 NaK ATPase 의 활성도를 억제시키는 작용에는 SH, OH 및 COOH 기 등은 아무 영향을 주지 않는다.
- 6) Acetylcholine 의 NaK ATPase 의 활성도를 억제하는 작용은 이 효소내의 NH<sub>2</sub>기와 관계된다.

## 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.T.: *The influence of the metabolism of human erythrocytes on potassium content. J. Biol. Chem.* 145:579, 1941.
- 3) Maizels, M.: *Cation control in human eryth-*



- rocytes. *J. Physiol.* 108:247, 1949.
- 4) Caldwell, P.C., and Keynes, R.D. *The utilization of phosphate bond energy for sodium extrusion from giant axons.* *J. Physiol.* 137:12, 1957.
  - 5) Caldwell, P.C., Hodgkin, A.L. and Shaw, T.J.: *Injection of compound containing energy rich phosphate bond into giant fibers.* *J. Physiol.* 147:18, 1959.
  - 6) Caldwell, P.C.: *The phosphorous metabolism of squid axons and its relationship to the active transport of ions in the giant axons of loligo.* *J. Physiol.* 152:545, 1960.
  - 7) Sen, A.K., and Post, R.L.: *Stoichiometry and localization of adenosine triphosphate-dependent sodium and potassium transport in the erythrocytes.* *J. Biol. Chem.* 239:845, 1964.
  - 8) Whittam, R., and Ager, M.E.: *Connexion between active cation transport and metabolism in erythrocytes.* *Biochem. J.* 97:2141, 1965.
  - 9) Garrahan, P.J., and Glynn, I.M. *The stoichiometry of the sodium pump.* *J. Physiol.* 192:217, 1967.
  - 10) Skou, J.C.: *Influence of some cations on the adenosine triphosphatase from peripheral nerves.* *Biochem. et biophys. acta.* 23:394, 1957.
  - 11) Post, R.L., and Jolly, P.C. *Linkage of sodium, potassium and ammonium active transport across human erythrocyte membrane.* *Biochem. et Biophysics. Acta.* 25:118, 1957.
  - 12) 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.* 44:442, 1962.
  - 13) Dunham, E.T., and Glynn, I.M. *Adenosinetriphosphatase activity and active movements of alkali metal ions.* *J. Physiol.* 156:274, 1961.
  - 14) Glynn, I.M. *Action of cardiac glycosides on ion movements.* *Pharmacol. Rev.* 16:381, 1964.
  - 15) 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.
  - 16) Caldrcvell, P.C., and Keynes, R.D.: *Effect of ouabain on efflux of sodium from squid giant axon.* *J. Physiol.* 148:8, 1959.
  - 17) Judah, J.D., and Ahmed, K. *Inhibitors of transport and cation activated ATP-ase.* *J. cell. & comp. Physiol.* 64:355, 1964.
  - 18) Dockry, M. *Active transport of sodium and potassium in mammalian skeletal muscle and its modification by nerve and cholinergic and adrenergic agents.* *J. Physiol.* 186:187, 1966.
  - 19) Mozsik, G., Nay, L., Kutas, J. and Tarnok, F. *Interaction of cholinergic function with magnesium ion-sodium-ion potassium-ion dependent ATPase system of cells in the human fundic gastric mucosa.* *Scand. J. gastroenterol.* 9(8):741, 1974.
  - 20) Rosenberg, S.A., and Guidotti, G. *The protein of human erythrocyte membranes. I. Preparation, solubilization, and partial characterization.* *J. Biol. Chem.* 243:1985, 1968.
  - 21) Fiske, C.H., and Subbarow, Y. *The colorimetric determination of phosphorous.* *J. Biol Chem.* 65:875, 1925.
  - 22) Bonting, S.L., and Caravaggio, L.L. *Sodium-potassium-activated adenosine triphosphatase in squid giant axon.* *Nature (London)* 194:1180, 1964.
  - 23) Spater, H.W., Nouikoff, A.B., and Masek, B. *Adenosinetriphosphatase activity in cell membranes of kidney tubule cells.* *J. Biophys & Biochem. Cytol.* 4:765, 1958.
  - 24) Essner, E., Nevikoff, A.B., and Masek, B. *Adenosinetriphosphatase and 5-nucleotidase activities in plasma membrane of liver cells revealed by electron microscopy.* *J. Biophys. & Biochem. Cytol.* 4:711, 1958.
  - 25) Katz, A.I., and Epstein, F.H. *Physiological role of sodium-potassium-activated adenosine triphosphatase in the transport of cations across biologic membranes.* *New Engl. J.*

- Med.* 278:253, 1968.
- 26) Whimtm, R. *Asymmetrical stimulation of membrane adenosinetriphosphatase in relation to active cation transport.* *Biochem. J.* 84: 110, 1962.
- 27) Glynn, I.M. *Activation of adenosinetriphosphatase activity in a cell membrane by external potassium and internal sodium.* *J. Physiol.* 160:18, 1962.
- 28) Baker, P.F. *The relationship between phosphorus metabolism and the sodium pump in intact nerve.* *Biochim. Biophys. Acta.* 75: 287, 1963.