

Vanadate가 골격근 sarcoplasmic reticulum의 Ca^{++} -ATPase 및 Ca^{++} uptake에 미치는 영향

연세대학교 의과대학 생리학교실

주순재 · 한경희 · 임중우 · 강두희

= Abstract =

Effects of Vanadate on Activity of Ca^{++} Activated ATPase and Ca^{++} Uptake of Sarcoplasmic Reticulum in Rat Skeletal Muscle

Soon Jae Joo, Kyung Hee Han, Joong Woo Leem and Doo Hee Kang

Department of Physiology, College of Medicine, Yonsei Univeristy, Seoul, Korea

Since it has been reported that vanadate inhibits Ca^{++} -ATPase activity without affecting Ca^{++} uptake, this study was undertaken to investigate the effects of vanadate on Ca^{++} -ATPase activity and Ca^{++} uptake in the sarcoplasmic reticulum of rat skeletal muscle.

The following results were obtained.

1) Ca^{++} activated ATPase activity of the intact sarcoplasmic reticulum was significantly inhibited when vanadate was added to the incubation medium at concentration greater than 10^{-6} M. However Mg^{++} -ATPase activity of the intact SR was not affected by vanadate at concentrations ranging from 10^{-7} to 10^{-4} M.

Similarly, Ca^{++} -ATPase activity in sonicated sarcoplasmic reticulum was significantly reduced by vanadate at a concentration 10^{-7} M or higher.

2) The uptake of Ca^{++} by isolated sarcoplasmic reticulum was also inhibited by vanadate under the conditions where the turnover rate of Ca^{++} -ATPase was made to increase.

These results suggest that the inhibition of Ca^{++} uptake by vanadate may be correlated with that of Ca^{++} -ATPase if experimental conditions are properly set.

서 론

생체 조직내에 널리 분포되어 있는 vanadate는 근래에 와서 약리, 생리, 생화학적 측면에서 관심의 대상이 되어왔다(Nechay, 1984). 즉 vanadium의 +5 산화가인 vanadate가 말 또는 토끼 근육으로부터 추출 정제 한 adenosine triphosphate(ATP)내에 혼재되어 있어 Na^{+} - K^{+} activated adenosine triphosphatase (Na^{+} - K^{+} -ATPase)를 억제하는 작용이 있음(Charney 등, 1975; Beaugé 및 Glynn, 1977; Cantley 등, 1977 :

Hudgins 및 Bond, 1977; Cantley 등, 1978a; Cantley 및 Aisen, 1979)이 판명된 이후 이의 생리, 약리학적 기능 및 작용기전 등을 밝히기 위하여 많은 연구가 시행되어 왔다.

Cantley 등(1978b)은 손상되지 않은 적혈구막을 이용한 실험에서 cardiac glycoside가 세포막의 바깥쪽에 결합함으로써 Na^{+} pump를 억제시키는 것과는 달리, vanadate은 세포막 내면에 결합함으로써 Na^{+} - K^{+} -ATPase 활성도를 억제시키며 이는 phosphate와 구조적으로 유사한 vanadate가 phosphate가 유리된 부위 즉 phosphorylation site에 결합함으로써 효소활성도를 억제시키는 것이라 하였다(Lopez 등, 1976).

골격근의 sarcoplasmic reticulum(SR)에서 능동적

*본 연구는 1983, 1984 년도 유한 연구비의 일부보조로 이루어졌음.

인 Ca^{++} 이동을 담당하는 Ca^{++} activated adenosine triphosphatase (Ca^{++} -ATPase)는 vanadate 와의 반응 기전이 Na^{+} - K^{+} -ATPase와 매우 유사하여 SR의 Ca^{++} ATPase 활성도 또한 vanadate에 의하여 억제됨이 보고되었다(O'Neal 등, 1979; Wang 등, 1979). 다만 SR의 Ca^{++} -ATPase의 vanadate에 대한 친화력이 적혈구 막의 Ca^{++} -ATPase나 Na^{+} - K^{+} -ATPase, myosin ATPase 보다 낮다고 하였다(Wang 등, 1979; Hagemeyer 등, 1980; Pick, 1982). 또한 쥐 간으로부터 분리한 endoplasmic reticulum (ER)의 Ca^{++} -ATPase는 vanadate에 예민하게 그 활성도가 억제받으나 간세포의 원형질막 Ca^{++} -ATPase는 vanadate에 의해 그 활성도가 억제되지 않는다고 보고되었다(Famulski 및 Carafoli, 1982; Iwasa 등, 1982). 이와같이 vanadate가 여러 세포막중 적혈구막, SR, ER 등에 존재하는 Ca^{++} -ATPase 활성도를 억제시킨다는 보고가 있는 반면, 세포내 vanadate 농도인 10^{-7} M 정도의 낮은 농도에서는 SR의 Ca^{++} -ATPase 활성도에는 아무런 영향을 주지 않는다는 보고도 있다(Josephson 및 Cantley, 1977). 한편 vanadate에 의하여 Ca^{++} ATPase의 활성도가 억제되면 Ca^{++} 의 이동이 억제되어야 할 터인데 골격근의 SR에서는 Ca^{++} -ATPase의 활성도가 억제되는 데도 불구하고 Ca^{++} 이동에는 변동이 없었다는 것이 보고되었다(Pick, 1982). 따라서 본 실험에서는 vanadate에 의한 Ca^{++} -ATPase와 Ca^{++} 이동의 변화를 구명코자 하였다. 즉 쥐의 골격근에서 SR을 분리하여 vanadate 농도에 따른 SR의 Ca^{++} -ATPase 활성도의 억제현상 여부를 추구하고 아울러 SR 막을 통한 내부로의 Ca^{++} 이동을 촉진시키는 조건하에서 vanadate이 Ca^{++} 이동에 미치는 효과를 추구하고자 하였다.

실험재료 및 방법

1. Sarcoplasmic Reticulum 분리

흰쥐의 골격근으로부터 Peter 및 Worsfold(1969)의 방법으로 SR을 분리하였다. 즉 흰쥐를 마취없이 두부 감타하여 희생시킨 후 족저근(m. plantaris), 비복근(m. gastrocnemius) 등의 fast muscle을 절제하여 조직 g 당 10 ml의 냉각된 0.32 M sucrose를 가하고 가위로 잘게 썰어 waring blender로 2분간 homogenize한 후 우선 gauze로 여과하였다. 여과액을 Sorvall centrifuge

(Sorvall RC 2-B, rotar SS-34)로 4°C에서 12,000×g로 20분간 원심침전시켜 mitochondria 등을 제거하고 그 상층액을 ultracentrifuge(Sorvall, OTDB 75)로 105,000×g로 1시간 동안 원심침전하여 SR을 얻었다. 이상과 같이 분리한 생체막의 단백질 농도는 Gornal 등(1949)의 biuret 비색법을 이용하여 측정하였다.

2. Ca^{++} -ATPase 활성도의 측정

골격근의 SR에서 Ca^{++} -ATPase 활성도 측정은 100 mM KCl, 0.5 mM $MgCl_2$, 5 mM NaN_3 , 10^{-4} M $CaCl_2$ 및 25 mM histidine buffer(pH 7.0)를 함유한 incubation 용액내에 단백질 농도가 0.015 mg/ml되게 SR을 넣고 37°C에서 7분간 preincubation 한후 여기에 2 mM vanadate-free ATP (Sigma 사 제품)을 가하여 20분간 incubation하였다. 20분후 냉각한 20% trichloroacetic acid를 가하여 반응을 정지시키고 centrifuge (Sorvall RC 2-B, rotor SM24)로 10,000 rpm에서 5분간 원심침전시켜 단백질을 제거하고 상층액에 유리된 inorganic phosphate의 양을 Fiske 및 Subbarow (1925)의 방법으로 측정하였다. ATPase 활성도는 μ mole Pi/mg protein/hr로 나타냈고 incubation 용액내에 5 mM EGTA를 가했을 때의 ATPase 활성도(Mg^{++} -ATPase 활성도)를 total ATPase (Ca^{++} - Mg^{++} -ATPase) 활성도에서 빼준 값을 Ca^{++} -ATPase 활성도로 하였다. 이때 incubation 용액내에 vanadate 농도가 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} 그리고 10^{-4} M 되게 가하여 Ca^{++} -ATPase 활성도에 미치는 영향을 관찰하였다. Sonifier cell disruptor로 sonify하여 파괴시킨 SR에서도 Ca^{++} -ATPase 활성도를 측정하여 intact SR과 비교하였다.

3. Ca^{++} -uptake rate 측정

분리한 SR에서의 Ca^{++} -uptake rate 측정은 Fiehn 및 Peter(1971)의 방법으로 millipore filter (pore size 0.45 μ m)를 이용하여 측정하였다. 위의 incubation 용액(단, $CaCl_2$ 는 10^{-5} M)에 $^{45}Ca Cl_2$ 를 0.45 μ Ci/ml되게 첨가한 후 단백질 농도가 0.015 mg/ml되게 SR을 넣고 37°C에서 7분간 preincubation 시킨후 10 mM ATP를 첨가하고 첨가한 시간으로부터 1, 3, 5 및 10분마다 그 일정량을 취해서 millipore filter를 통하여 여과하였다. 이 여과액과 incubation 용액내의 ^{45}Ca 방

—주순재 외 3인 : Vanadate가 골격근 sarcoplasmic reticulum의 Ca⁺⁺-ATPase 및 Ca⁺⁺uptake에 미치는 영향—

사선을 Liquid Scintillation Spectrometer (Model Tri Carb 300)로 측정하였고 ⁴⁵Ca-uptake는 다음 식에 의해 계산하였다.

$$^{45}\text{Ca-uptake \%} = \frac{\text{Incubation 용액내 } [Ca^{45}] - \text{여과액의 } [Ca^{45}]}{\text{Incubation 용액내 } [Ca^{45}]} \times 100$$

실 험 성 적

1. Vanadate가 SR의 Ca⁺⁺-ATPase 활성도에 미치는 영향

Vanadate이 골격근의 세포막이 손상되지 않은 SR에서 total ATPase, Mg⁺⁺-ATPase 및 Ca⁺⁺-ATPase 활성도에 미치는 영향을 Fig. 1에 도시하였다. 이 그림에서 보는 바와 같이 vanadate은 세포막이 손상되지 않은 SR에서 Mg⁺⁺-ATPase 활성도에는 별 영향을 미치지 않음을 알 수 있었다. 그러나 total ATPase 활성도는 vanadate을 첨가하지 않은 대조군에서는 133.57±3.39 μmole Pi/mg protein/hr 인데 비하여 vanadate을 10⁻⁷, 10⁻⁶, 10⁻⁵ 및 10⁻⁴ M 되게 첨가한 군에서는 각각 130.63±2.29, 113.39±1.99, 84.10±1.68 및 51.80±2.98 μmole Pi/mg protein/hr로서 대조군에 비하여 각각 2.2, 15.1, 37.0 및 61.2%의 감소현상을 보여 10⁻⁶ M 이상에서 유의있는 억제현상을 볼 수 있었다(p<0.005). 따라서 Ca⁺⁺-ATPase 활성도는 대조군에서는 112.42±4.15 μmole Pi/mg protein/hr 인데 vanadate을 각각 10⁻⁷, 10⁻⁶, 10⁻⁵ 및 10⁻⁴ M 되게 첨가했을때 그 값은 106.80±2.66, 94.11±2.10, 60.51±2.5 및 27.82±3.54 μmole Pi/mg protein/hr로서 대조군 값에 비하여 각각 5.0, 16.3, 46.2 및 75.3%의 감소현상을 보여 10⁻⁶ M 이상에서 vanadate 농도에 비례하여 Ca⁺⁺ ATPase 활성도가 유의있게 억제되었다(p<0.01).

Sonicated SR에서도 세포막이 손상되지 않은 SR의 경우와 비슷한 양상을 보여, vanadate 첨가시 Mg⁺⁺-ATPase의 활성도는 별 변화가 없었으나 Ca⁺⁺-ATPase 활성도는 vanadate 10⁻⁷ M 첨가에서 부터 유의있게 억제됨을 알 수 있었다(p<0.02).

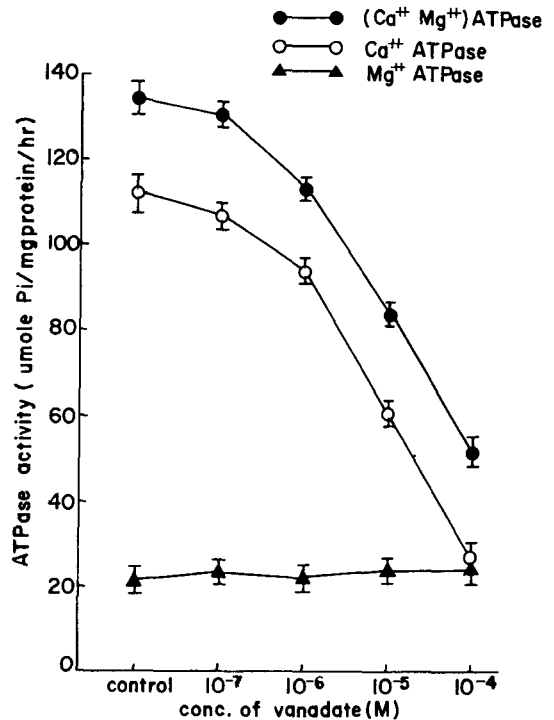


Fig. 1. Effects of vanadate on the activities of (Ca⁺⁺ + Mg⁺⁺) ATPase, Ca⁺⁺-ATPase and Mg⁺⁺ ATPase of intact SR.

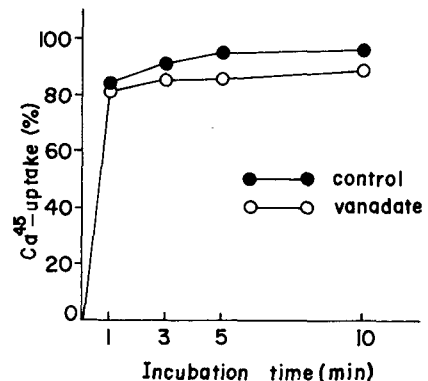


Fig. 2. Effects of vanadate on the rate of ⁴⁵Ca-uptake by SR incubated in conventional medium.

2. Vanadate가 SR의 Ca⁺⁺-uptake에 미치는 영향

골격근 SR에서 ⁴⁵Ca-uptake는 김 등(1977)의 방법으로 incubation medium 용액의 조성을 40 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 5 mM Na-oxalate, 20 mM histidine

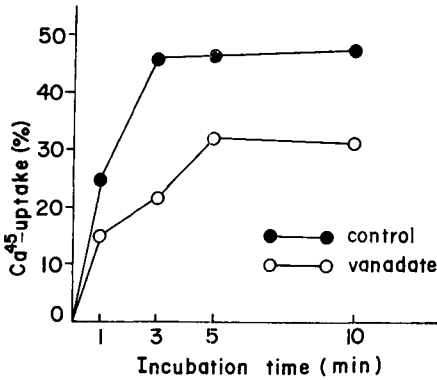


Fig. 3. Effects of vanadate on the rate of ⁴⁵Ca-uptake by SR incubated in medium with low Mg⁺⁺ and high ATP.

buffer(pH 7.0) 용액에 2 mM ATP를 첨가하여 Ca⁺⁺-uptake를 측정하였을 때는 vanadate의 Ca⁺⁺-uptake 억제 효과를 볼 수 없었다(Fig. 2). 그러나 medium의 조성을 Wang 등(1979)의 조성 과 유사한 100 mM KCl, 5 mM Na-oxalate, 5 mM NaN₃, 10⁻⁵ M CaCl₂ 및 20 mM histidine buffer(pH 7.0) 용액에 MgCl₂와 ATP 농도를 각각 0.5 mM, 10 mM되게 첨가한 후 ⁴⁵Ca-uptake를 측정한 결과 vanadate이 SR의 Ca⁺⁺ uptake를 의의있게 감소시키는 것으로 나타났다(p<0.001).

Fig. 3은 vanadate이 Ca⁺⁺ uptake를 억제시키는 전형적인 억제 양상을 나타낸 실험으로서 여기에서 보는 바와 같이 vanadate은 incubation 초기 뿐 아니라 5분 이후의 평형상태에서의 ⁴⁵Ca uptake도 거의 같은 정도로 억제시켰다.

고 찰

근육에서 추출한 ATP내에 불순물로서 존재하는 vanadate가 Na⁺-K⁺-ATPase 억제제임이 밝혀진 이후, vanadate가 phosphotransferase나 phosphohydrolase 활성도를 억제시키며 특히 여러가지 생체막에서 Na⁺-K⁺-ATPase 및 Ca⁺⁺-ATPase 활성도를 억제시킨다는 연구 결과들이 보고된 바 있다 (Beaugé 및 Glynn, 1977; Cantley 등, 1977; Hudgins 및 Bond, 1977; O'Neal 등, 1979; Wang 등, 1979).

Fig. 4는 Carvalho 등(1976)이 제시한 Ca⁺⁺.

ATPase가 Ca⁺⁺을 이동시키는 일련의 반응 회로를 나타낸 그림으로, Ca⁺⁺ uptake의 경우 세포 외부에서 Ca⁺⁺과 친화력이 큰 E₁ 상태의 효소분자에 Ca⁺⁺이 결합하여 세포내로 이동된 후 친화력이 낮은 E₂ 상태로 conformational change를 일으켜 Ca⁺⁺이 떨어져 나오게 한 후 다시 E₂에서 E₁으로 전환되어 반응을 진행 시킴으로써 Ca⁺⁺을 세포내로 이동시킨다.

이제까지 알려진 vanadate가 적혈구막 및 SR의 Ca⁺⁺-ATPase 활성도를 억제시키는 기전을 살펴보면 다음과 같다. 골격근과 심장근의 SR Ca⁺⁺-ATPase의 경우 vanadate가 세포내부로 들어가 안정된 E₂-Mg⁺⁺-V 복합체를 형성함으로써 E₂에서 E₁으로의 전환을 느리게 하여 Ca⁺⁺-ATPase 활성도를 억제시킨다고 하였다(Pick, 1982). 이때 Ca⁺⁺은 E₂-Mg⁺⁺-V 복합체 형성을 방해할 뿐 아니라 E₂에서 E₁으로의 전환을 촉진시키고 E₁ 상태를 안정화시키는 반면 vanadate는 E₂ 상태를 안정화시켜 Ca⁺⁺에 의해 초래되는 구조적 변화를 억제시킨다고 하였다. 적혈구막의 Ca⁺⁺-ATPase 경우에는 vanadate가 ATP-dependent한 Ca⁺⁺ 유출을 억제시키는데 그 작용 부위 역시 세포 안쪽으로, 세포내 Mg⁺⁺과 K⁺에 의해 vanadate에 의한 Ca⁺⁺ 유출의 억제 효과가 증가되며, 세포의 Ca⁺⁺에 의해서는 유출 억제효과가 감소된다고 보고하였다(Rossi, 1981).

Na⁺-K⁺-ATPase, 적혈구막의 Ca⁺⁺-ATPase, myosin ATPase는 10⁻⁶ M 이하의 vanadate 농도에서도 효소활성도가 억제되는 것으로 보고되었으나(Cantley 등, 1978b, Goodno, 1979; Bond 및 Hudgins, 1980) 이와는 달리 SR의 Ca⁺⁺-ATPase는 vanadate에 대한 감수성이 낮아 Ca⁺⁺-ATPase 활성도를 50% 정도 억제시키기 위해서 적혈구막 Ca⁺⁺-ATPase에서 보다 적어도 10배 더 높은 농도인 10⁻⁵ M vanadate가 필요하다고 하였다(Wang 등, 1979; Hagenmeyer 등, 1980; Pick, 1982). 한편 개의 심장 sarcolemma의 Ca⁺⁺-ATPase는 Na⁺-K⁺-ATPase 만큼 vanadate에 예민하므로 SR Ca⁺⁺-ATPase와 sarcolemma Ca⁺⁺-ATPase를 구별하는데 vanadate가 이용되기도 한다(Caroni 및 Carafoli, 1981).

본 실험에서 골격근 SR Ca⁺⁺-ATPase 활성도에 미치는 vanadate의 효과를 살펴본 결과 세포막이 손상되지 않은 SR의 경우 10⁻⁷ M vanadate에서는 대조군

의 값과 유의한 차이가 없었으나 10^{-6} M 이상의 vanadate는 Ca^{++} -ATPase 활성도를 의의있게 억제시켰으며 (Fig. 1) 이는 O'Neal 등(1979)의 결과와 유사하다. Sonicate 시킨 SR에서는 10^{-7} M에서 부터 유의한 억제 현상을 볼 수 있었고, 동일한 vanadate 농도 일지라도 sonication 시켰을때 Ca^{++} -ATPase 활성도의 억제 정도가 더 컸다. 이는 세포막을 파괴하므로 SR 막내의 활동중심 (active center) 자체가 vanadate에 더 많이 노출되었기 때문이라고 생각된다.

골격근의 경우 Ca^{++} 저장소인 SR이 잘 발달되어 있고 SR 막을 이루고 있는 단백질의 대부분이 Ca^{++} -ATPase이므로 vanadate에 의하여 Ca^{++} -ATPase 활성도가 억제되었으므로 SR 막을 통한 내부로의 Ca^{++} 이동 또한 저하될 것으로 생각되어 본 실험에서 Ca^{++} uptake를 측정하였다.

김 등(1977)의 방법에 따라 incubation medium의 조성을 40 mM KCl, 5 mM MgCl_2 , 5 mM Na-oxalate, 20 mM histidine buffer (pH 7.0)에 2 mM ATP를 첨가하여 Ca^{++} 이동도를 측정 한 결과 기대와는 달리 vanadate에 의한 유의적인 억제현상을 볼 수 없었다 (Fig. 2). 이러한 결과는 vanadate가 Ca^{++} -ATPase 활성도를 억제시켜 Ca^{++} 유입을 감소시켰다 하더라도 또한 Ca^{++} 유출을 동시에 억제시킨다면 Ca^{++} 유입과 유출의 차이, 즉 net flux인 Ca^{++} uptake는 vanadate에 의해 영향받지 않을 것이므로 이를 알아보기 위하여 SR의 Ca^{++} washout curve에 미치는 vanadate의 효과를 보았으나 의의있는 차이를 얻지 못하였다. 따라서 본 실험조건에서는 vanadate가 SR내로의 Ca^{++} 유입에 영향을 주지 않는 것으로 생각된다.

De Meis 및 Vianna(1979)는 ATP-dependent

Ca^{++} -ATPase에 의하여 Ca^{++} 을 이동시키는 일련의 반응 회로 (Fig. 4)에서 효소의 E_2 형태에서 E_1 형태로의 전환이 이 반응 회로의 rate limiting step으로써 고농도의 ATP와 Mg^{2+} 이 이러한 전환을 촉진시킨다고 하였다. 그러므로 보다 효율적으로 Ca^{++} 을 SR내로 이동시키기 위하여 ATP가 이용되어야 하는데, ATP 농도가 낮을 경우는 E_2 -Pi에서 유리된 inorganic phosphate이 ADP와 phosphorylation되어 ATP를 합성하여 에너지 공급원으로 이용될 가능성도 있다. 본 실험에서와 같은 실험계획에서는 E_2 -Pi에서 유리되는 inorganic phosphate를 측정하여 Ca^{++} -ATPase 활성도를 계산하였으므로 본 실험에서 사용한 2 mM ATP의 농도에서 E_2 -Pi에서 인산화 과정을 효과적으로 억제시키지 못한다면 Pi이 재차 이용되는 phosphorylation 때문에 즉, Pi의 생성율이 저하되므로 대조군의 Ca^{++} -ATPase 활성도 자체가 감소되는 것으로 나타나는 반면 vanadate은 Ca^{++} uptake에 아무런 영향을 미치지 않는 것으로 나타날 수도 있다. 따라서 본 연구에서는 Ca^{++} -ATPase의 turnover rate를 촉진시키는 조건들을 다음과 같이 찾아보았다. 즉 Rubin 및 Katz(1967)는 골격근 SR에서 일가 양이온들이 Ca^{++} uptake와 ATP 가수분해를 촉진시켰다고 하였으며 Shigekawa 및 Pearl(1976)은 일가 양이온들이 $\text{K}^+ > \text{Na}^+ > \text{NH}_4^+ > \text{Rb}^+ > \text{Cs}^+$ 순으로 Ca^{++} -ATPase 활성도와 Ca^{++} uptake를 증가시켰다고 보고하였다. 또한 Duggan(1977)은 골격근 SR의 Ca^{++} uptake에 영향을 미치는 요인에 관한 연구에서 medium 내 free Ca^{++} 농도가 100 μM , K^+ 이 100 mM 일때 Ca^{++} uptake가 최대였음을 보고하였다.

따라서 본 실험에서는 이러한 보고들을 토대로

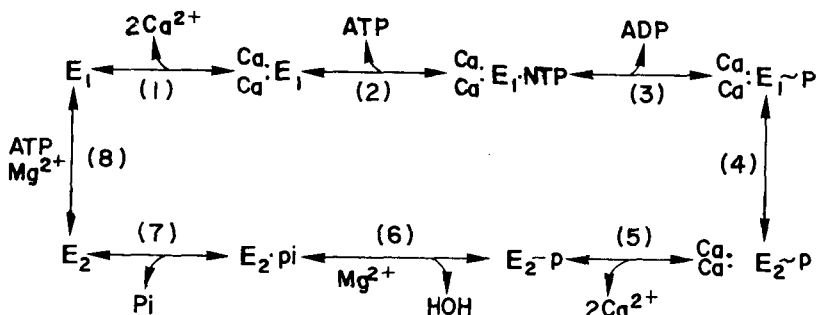


Fig. 4. Reaction steps involved in the process of substrate hydrolysis and Ca^{++} transport.

Ca⁺⁺-ATPase의 turnover rate를 빨리하고 E₂-Pi에서의 ADP의 인산화를 막기 위하여 Mg⁺⁺ 및 ATP 농도를 높히는 등 incubation 용액의 조성을 변화시켰다. 따라서 전형적인 incubation medium의 조성인 100 mM KCl, 0.5 mM(또는 10 mM) MgCl₂(후술 참조), 5 mM NaN₃, 10⁻⁵ M CaCl₂, 5 mM Na-oxalate 및 25 mM histidine buffer(pH 7.0) 용액에 Ca⁴⁵Cl₂를 0.45 μCi/ml되게 넣고 10 mM ATP를 첨가한 후 Ca⁺⁺ uptake를 측정된 결과 vanadate에 의하여 Ca⁺⁺ uptake가 의외있게 감소함을 알 수 있었다(Fig. 3). Vanadate에 의한 Ca⁺⁺ uptake의 억제에는 Mg⁺⁺에 의해서도 영향을 받는데, Mg⁺⁺은 E₂-Mg⁺⁺-V 복합체 형성을 방해하고 E₂에서 E₁으로의 전환에 필요하며 dephosphorylation을 용이하게 해준다. 그러므로 Mg⁺⁺ 농도를 ATP 농도와 같게 10 mM로 높였다. 그러나 일반적으로 medium 내 K⁺ 및 Mg⁺⁺농도가 적당할때 Ca⁺⁺의 최대 이동율이 변화하며(Duncan, 1983), Riviero 및 Vienna(1978)는 0 mM K⁺, 0.2 mM Mg⁺⁺ 일 때는 Ca⁺⁺ 이동율이 낮았고 본 실험에 사용한 농도인 100 mM K⁺에서는 0.1 또는 3 mM Mg⁺⁺에서 최대 이동율을 보였다고 하였다. 그러므로 몇 예에서 Mg⁺⁺ 농도를 0.5 mM로 하여 같은 실험을 반복하였으나 보통 Mg⁺⁺과 ATP 농도를 모두 10 mM로 높인 incubation 용액으로 Ca⁺⁺ uptake를 측정했을 때와 같은 결과를 얻었다. 즉 vanadate에 의한 Ca⁺⁺ uptake의 억제효과를 관찰할 수 있었다.

한편 Ca⁺⁺-ATPase 활성도 저하와 이에 따른 Ca⁺⁺ uptake의 감소간에 상관관계가 있는지를 보기 위하여 동일한 incubation 용액에서 Ca⁺⁺-ATPase 활성도와 Ca⁺⁺ uptake를 동시에 측정하였는 바 의의있는 상관관계는 볼 수 없었지만 이와 유사한 양상은 볼 수 있었다(Fig. 5). 이와같은 결과는 Martonosi 및 Feretis(1964)에 의하여 보고되었다. 즉 이들은 쥐의 골격근 SR에서 vanadate를 첨가하지 않은 경우에 Ca⁺⁺-ATPase 활성도와 Ca⁺⁺ uptake간의 상관관계를 측정하였는바 Ca⁺⁺-ATPase 활성도와 Ca⁺⁺ 이동량간의 상관관계가 incubation 용액내에 가해준 Ca⁺⁺ 농도에 영향을 받는다고 보고하였다. 즉 Ca⁺⁺ 농도가 비교적 높은 10⁻⁴ 내지 4×10⁻⁴ M 일때가 이들간의 상관관계가 보다 더 정확하다고 하였고 본 실험에 사용한 농도인 10⁻⁵ M인 경우에는 역시 통계적으로 의의있는 상관관계

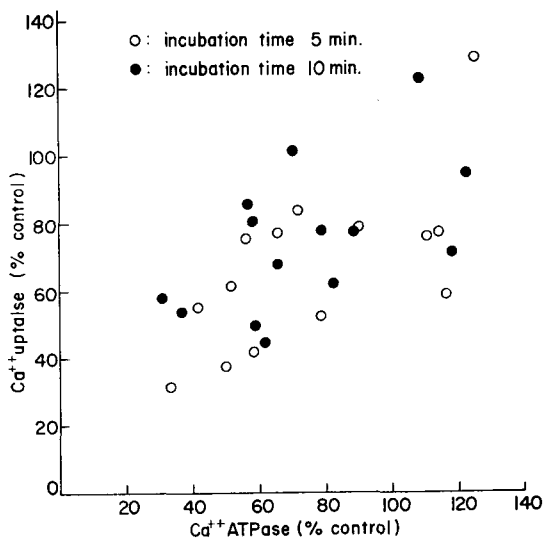


Fig. 5. Correlation between Ca⁺⁺-ATPase and Ca⁺⁺ uptake in SR isolated from rat skeletal muscle.

가 없다고 하였다. 그러나 본 실험에서 vanadate에 의한 Ca⁺⁺-ATPase 와 Ca⁺⁺ transport의 억제효과간에 상관성이 없더라도 이것만으론 다른 실험조건하에서도 유의성이 없을 것이라고 결론내리기는 힘들다.

결 론

골격근 SR에서 vanadate에 의하여 Ca⁺⁺-ATPase 활성도는 억제되는데 반하여 Ca⁺⁺ transport에는 영향을 주지 않는다는 보고가 있으므로 이를 재차 규명하기 위하여 쥐의 골격근 SR에서의 Ca⁺⁺-ATPase 활성도와 Ca⁺⁺ uptake에 미치는 vanadate의 영향을 추궁하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1) 세포막이 손상되지 않은 SR의 Ca⁺⁺-ATPase 활성도는 대조군의 값이 112.42±4.15 μmole Pi/mg protein/hr 인데 비하여 10⁻⁷ M vanadate 첨가군은 106.80±2.66 μmole Pi/mg protein/hr로서 별 차이가 없었으나 10⁻⁶ M 이상의 vanadate는 SR의 Ca⁺⁺-ATPase 활성도를 의의있게 억제시켰다(p<0.01).

그러나 sonication하여 세포막을 파괴시킨 SR의 경우 vanadate 농도 10⁻⁷ M에서 부터 Ca⁺⁺-ATPase 활성도가 의의있게 감소되었다(p<0.02).

2) SR에서의 Ca⁺⁺ uptake 또한 Ca⁺⁺-ATPase의

turnover rate를 촉진시키는 조건하에서 vanadate에 의하여 의의있게 억제되었다($p < 0.001$).

이상의 실험결과를 통하여 실험조건을 변화시키면 쥐의 골격근에서 분리한 SR에서 vanadate에 의한 Ca^{++} -ATPase 활성도 억제와 Ca^{++} 이동을 억제 사이에는 상호 연관성이 있을 것으로 생각된다.

REFERENCES

- 1) Beaugé, L.A. and Glynn, I.M.: A modifier of ($Na^{+} + K^{+}$) ATPase in commercial ATP. *Nature*, 268:355, 1977.
- 2) Cantley, L.C. Jr. and Aisen, P.: The fate of cytoplasmic vanadium Implications on (Na - K)-ATPase inhibition. *J. Biol. Chem.*, 254:1781, 1979.
- 3) Cantley, L.C. Jr., Cantley, L.G., and Josephson, L.: A characterization of vanadate interactions with the (Na - K) ATPase. Mechanistic and regulatory implications. *J. Biol. Chem.*, 253:7361, 1978a.
- 4) Cantley, L.C. Jr., Josephson, L., Warner, R., Yanagisawa, M., Lechene, C., and Guidotti, G.: Vanadate is a potent (Na - K)-ATPase inhibitor found in ATP derived from muscle. *J. Biol. Chem.*, 252:7421, 1977.
- 5) Cantley, L.C., Resh, M., and Guidotti, G.: Vanadate inhibits the red cell (Na^{+} , K^{+}) ATPase from the cytoplasmic side. *Nature*, 272:552, 1978b.
- 6) Caroni, P. and Carafoli, E.: The Ca^{++} -pumping ATPase of heart sarcolemma, characterization, calmodulin dependence, and partial purification. *J. Biol. Chem.* 256:3263, 1981.
- 7) Carvalho, M.G.C., Souza, D.G., and de Meis, L.: On a possible mechanism of energy conservation in sarcoplasmic reticulum membrane. *J. Biol. Chem.*, 251:3629, 1976.
- 8) Charney, A.N., Silva, P., and Epstein, F.H.: An *in vitro* inhibitor of Na - K -ATPase present in an adenosine triphosphate preparation. *J. Appl. Physiol.*, 39:156, 1975.
- 9) De Meis, L. and Vianna, A.L.: Energy interconversion by the Ca^{++} -dependent ATPase of the sarcoplasmic reticulum. *Ann. Rev. Biochem.*, 48:275, 1979.
- 10) Duggan, P.F.: Calcium uptake and associated adenosine triphosphatase activity in fragmented sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.*, 252:1620, 1977.
- 11) Duncan, H.H.: Mechanism of Ca^{++} transport by Ca^{++} - Mg^{++} -ATPase pump: analysis of major states and pathways. *Am. J. Physiol.*, 244:G3, 1983.
- 12) Famulski, K. and Carafoli, E.: Ca^{++} transporting activity of membrane fractions isolated from the mitochondrial supernatant of rat liver. *Cell Calcium*, 3:263, 1982.
- 13) Fiehn, W. and Peter, J.B.: Properties of the fragmented sarcoplasmic reticulum from fast twitch and slow twitch muscles. *J. Clin. Inves.*, 50:570, 1971.
- 14) Fiske, C.H. and Subbarow, Y.: The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.*, 66:375, 1925.
- 15) Goodno, C.C.: Inhibition of myosin ATPase by vanadate ion. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 76:2620, 1979.
- 16) Gornall, A.G., Bardawill, C.J., and David, M.M.: Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J. Biol. Chem.*, 177:751, 1949.
- 17) Hagenmeyer, A., Wierichs, R., and Bader, H.: Vanadate inhibition of the Ca^{++} -ATPase of sarcoplasmic reticulum from pig heart. *Basic Res. Cardiol.*, 75:452, 1980.
- 18) Hudgins, P.M. and Bond, G.H.: ($Mg^{++} + K^{+}$)-dependent inhibition of Na , K -ATPase due to contaminant in equine muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 77:1024, 1977.
- 19) Iwasa, Y., Iwasa, T., Higashi, K., Matsui, K., and Miyamoto, E.: Demonstration of a high affinity Ca^{++} -ATPase in rat liver plasma membranes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 105:488, 1982.
- 20) Josephson, L. and Cantley, L.C. Jr.: Isolation of potent (Na - K) ATPase inhibitor from striated muscle. *Biochemistry*, 16:4572, 1977.
- 21) 김희중, 이중우, 강두희 : 한국산 인삼알콜 추출물이 몇가지 생체막에서의 Na^{+} - K^{+} activated ATPase 및 Ca^{++} -activated ATPase 활성도에 미치는 영향. 연세의대논문집, 20:116, 1977.
- 22) Lopez, V., Stevens, T., and Lindquist, R.N.: Vanadium ion inhibition of alkaline phosphatase-catalyzed phosphate ester hydrolysis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 175:31, 1976.
- 23) Martonosi, A. and Feretos, R.: Sarcoplasmic reticulum. II. Correlation between adenosine triphosphatase activity and Ca^{++} uptake. *J. Biol. Chem.*, 239:659, 1964.
- 24) Nechay, B.R.: Mechanisms of action of vanadium. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 24:501, 1984.
- 25) O'Neal, S.G., Rhoads, D.B., and Racker, E.: Vanadate inhibition of sarcoplasmic reticulum Ca^{++} -

- ATPase and other ATPase. Biochem. Biophys. Research Commun.*, 89:845, 1979.
- 26) Perter, J.B. and Worsford, M.: *Muscular dystrophy and other myopathies: Sarcotubular vesicles in early disease. Biochem. Med.*, 2:364, 1969.
- 27) Pick, U.: *The interaction of vanadate ions with the Ca^{++} -ATPase from sarcoplasmic reticulum. J. Biol. Chem.*, 257:6111, 1982.
- 28) Riviero, J.M.C. and Vienna, A.L.: *Allosteric modification by K^{+} of the $(Ca^{++} + Mg^{++})$ -dependent ATPase of sarcoplasmic reticulum: interaction with Mg^{++} . J. Biol. Chem.*, 253:3133, 1978.
- 29) Rossi, J.P.F.C., Garrahan, P.J., and Rega, A.F.: *Vanadate inhibition of active Ca^{2+} transport across human red cell membranes. Biochim. Biophys. Acta*, 648:145, 1981.
- 30) Rubin, B.B. and Katz, A.M.: *Sodium and potassium effects on skeletal muscle microsomal adenosine triphosphatase and calcium uptake. Science*, 158:1189, 1967.
- 31) Shigekawa, M. and Pearl, L.J.: *Activation of calcium transport in skeletal muscle sarcoplasmic reticulum by monovalent cations. J. Biol. Chem.*, 251:6947, 1976.
- 32) Wang, J., Tsai, L.I., Solaro, R.J., and Grassi de Gende, A.O., Schwartz, A.: *Effects of potassium on vanadate inhibition of S.R. Ca^{++} -ATPase from dog cardiac and rabbit skeletal muscle. Biochem. Biophys. Research Commun.*, 89:845, 1979.