

황체 막에서의 Ca^{++} -ATPase의 특성

연세대학교 의과대학 생리학교실

최 규 복 · 구 본 숙 · 김 인 교

: Abstract =

Partial Characterization of Physicochemical and Kinetic Properties of Ca^{++} -ATPase System in Luteal Membranes

Gyu Bog Choi, Bon Sook Koo and Inkyo Kim

Department of Physiology, Yonsei University College of Medicine

It has been reported that the luteal function may be regulated by the intracellular calcium in luteal cells (Higuchi et al, 1976; Dorflinger et al, 1984; Gore and Behrman, 1984) which is adjusted partially by Ca^{++} -ATPase activities in luteal cell membranes (Verma and Penniston, 1981). However, the physicochemical and kinetic properties of Ca^{++} -ATPase in luteal membranes were not fully characterized.

This study was, therefore, undertaken to partially characterize the physicochemical and kinetic properties of Ca^{++} -ATPase system in luteal membranes and microsomal fractions, known as an one of the major Ca^{++} storage sites (Moore and Pastan, 1978), from the highly luteinized ovary. Highly luteinized ovaries were obtained from PMSG-hCG injected immature female rats. Light membrane and heavy membrane fractions and microsomal fractions were prepared by the differential and discontinuous sucrose density gradient centrifugation method described by Bramley and Ryan (1980).

Light membrane and heavy membrane fractions and microsomal fractions from highly luteinized ovaries are composed of the two different kinds of Ca^{++} -ATPase system. One is the high affinity Ca^{++} -ATPase which is activated in low Ca^{++} concentration (K_m , 10-30 nM), the other is low affinity Ca^{++} -ATPase activated in higher Ca^{++} concentration ($K_{1/2}$, 40 μ M). At certain Ca^{++} concentrations, activities of high and low affinity Ca^{++} -ATPase are the highest in light membrane fractions and are the lowest in microsomal fractions. It appears that high affinity Ca^{++} -ATPase system have 2 binding sites for ATP (Hill's coefficient; around 2 in all membrane fractions measured) and the positive cooperativity of ATP bindings obviously existed in each membrane fractions. The optimum pH for high affinity Ca^{++} -ATPase activation is around 8 in all membrane fractions measured. The lipid phase transition temperature measured by Arrhenius plots of high affinity Ca^{++} -ATPase activity is around 25 °C. The activation energies of high affinity Ca^{++} -ATPase below the transition temperature are similar in each membrane fractions, but at the above transition temperature, it is the highest in heavy membrane fractions and the lowest in microsomal fractions.

According to the above results, it is suggested that intracellular Ca^{++} level, which may regulate the luteal function, may be adjusted primarily by the high affinity Ca^{++} -ATPase system activated in intracellular Ca^{++} concentration range (below 0.1 μ M).

서 론

one, LH)의 분비에 secondary messenger로 작용할 것이라고 하나 (Hopkins 및 Walker, 1978) 그 작용기전은 아직 확실하지 않다. Ca^{++} 은 시상하부에서

Ca^{++} 이 뇌하수체에서 황체화홀몬 (luteinizing hor-

luteinizing hormone-releasing hormone(LHRH)의 분비 뿐만 아니라(Bigdeli 및 Synder, 1978; Ojeda 등, 1980; Ojeda 및 Negro-Vilar, 1985) 뇌하수체에서 LHRH에 의해 증가되는 황체화홀몬의 분비를 촉진시키며(Samli 및 Greschwind, 1968; Wakabayashi 등, 1969; Williams, 1976; Marian 및 Conn, 1979; Bourne 및 Baldwin, 1980), 또한 이때 뇌하수체로부터 Ca^{++} 의 유출이 일어남이 보고되었다(Williams, 1976).

특히 황체의 기능조절에 Ca^{++} 이 중요한 역할을 담당한다고 보고되었다. Higuchi 등(1976)은 황체세포에서 LH에 의해 증가되는 progesterone의 합성에 Ca^{++} 이 중요한 역할을 담당한다고 하였으며, Gore 및 Behrman(1984)은 $Na^+ \cdot K^+$ -activated adenosine triphosphatase ($Na^+ \cdot K^+$ -ATPase)의 억제제인 ouabain과 Na^+ ionophore인 monensin을 유리 황체세포에 처치한 결과 LH에 의해 증가되는 cyclic adenosine monophosphate(cAMP)의 축적과 progesterone 합성이 억제되었으나 세포외부의 Ca^{++} 을 제거함으로써 이러한 억제효과가 소멸되는 것으로 보아 이러한 억제 현상은 세포내 Na^+ 농도 증가 자체에 기인하는 것이 아니라 이차적으로 세포외부의 Ca^{++} 이 세포내로 유입되어 세포내 Ca^{++} 농도가 증가되었기 때문이라고 보고하였다. 또한 Dorflinger 등(1984)은 Ca^{++} ionophore인 A 23187로 황체세포를 처치하였을 때 LH에 의해 증가되는 cAMP 축적이 억제되며, 이는 세포외부의 Ca^{++} 농도를 증가시켰을 때 LH에 의해 증가되는 adenylate cyclase 활성도가 직접 억제받는 것으로 보아 세포내 Ca^{++} 농도의 변화(증가)가 황체 퇴화단계의 초기일 것이라고 추정할 바 있다. 이와 반대로 Veldhuis 및 Klase(1982)에 의해 황체세포를 A 23187로 처치하였을 경우 LH에 의한 progesterone 합성이 증가한다는 보고도 있어 아직 황체세포에서의 Ca^{++} 의 역할은 분명하지 않고 다만 황체기능과 세포내 Ca^{++} 농도가 연관되어 있을 것이라고 추측될 뿐이다.

세포내 Ca^{++} 농도(약 $0.1 \mu M$)가 세포외액($1 mM$ 이상)보다 매우 낮게 유지될 수 있는 것은 세포막에서 Ca^{++}/Na^+ 교환(Van Breeman 등, 1978; Miyamoto 및 Racker, 1980)이나 Ca^{++} -stimulated Mg^{++} -dependent adenosine triphosphatase(Ca^{++} -ATPase)에 의한 세포외로의 Ca^{++} 배출(Dipolo 및 Beauge, 1979; Pershadsingh 및 McDonald, 1980; Iwasa 등, 1982;

Lin 등, 1983), mitochondria나 endoplasmic reticulum(혹은 sarcoplasmic reticulum)내로의 Ca^{++} 저장에 의해 이루어진다(Carafoli 및 Crompton, 1978; Martonosi 등, 1978; Moore 및 Pastan, 1978).

황체세포막에서 세포외로 Ca^{++} 을 배출하는 Ca^{++} -ATPase가 존재함이 확인되었으나(Verma 및 Penniston, 1981) 이의 특성에 대해서는 아직 잘 알려지지 않았으며 이 ATPase가 Ca^{++} 이동 pump라는 직접적인 증거도 없다. 그러므로 우선 정상 황체에서 분리된 세포막과 microsome에서 Ca^{++} -ATPase의 활성도를 측정 비교하고 이들의 물리화학적 성질 및 반응속도론(kinetic)적인 특성을 알아보고자 본 실험을 시행하였다.

실험재료 및 방법

A. 실험동물

생후 22~24일된 미성숙 암컷 쥐(Sprague-Dawley strain)에 pregnant mare serum gonadotropin(PMSG, Sigma 회사 제품) 50 I.U.를 피하로 주사하고 66시간 후 다시 human chorionic gonadotropin(hCG, Profasi®, Serno 사제품) 25 I.U.를 주사하여 hCG를 주사 한 날(Day 0)로부터 4일째 되는 날(Day 4)에 쥐를 도살하여 대부분이 황체로 구성된 난소(황체화 난소, highly luteinized ovary)를 얻었다(Bramley 및 Ryan, 1978a).

B. 실험방법

1) Plasma membrane 분획과 microsome 분획의 조제 : PMSG와 hCG를 주사한 쥐로부터 얻은 황체화 난소를 주위의 결체조직과 분리한 다음 칼로 잘게 다지고 20배의 균질화용액($10 mM$ Tris-HCl, $1 mM$ ethylenediaminetetraacetic acid(EDTA), $0.3 M$ sucrose, pH 7.4)를 가한 뒤 Virtis homogenizer(Virtis 회사 제품)와 teflon-glass homogenizer로 균질화하였다. 균질화된 액은 $800 \times g$ 로 15분간 2번 냉동원심분리하고 이때 얻어진 침전물은 $10 mM$ Tris-HCl, pH 7.4가 포함된 20% sucrose 용액에 부유시켜 heavy membrane 분리를 위해 얼음에 채워 보관해 두었다. $800 \times g$ 상층액은 다시 $20,000 \times g$ 로 20분간 2번 냉동원심분리하였으며 이때 얻

어진 침전물 역시 10 mM Tris-HCl, pH 7.4가 포함된 20% sucrose 용액에 부유시켜 light membrane 분리에 사용하였다(제1도, Bramley 및 Ryan, 1978a, 1980).

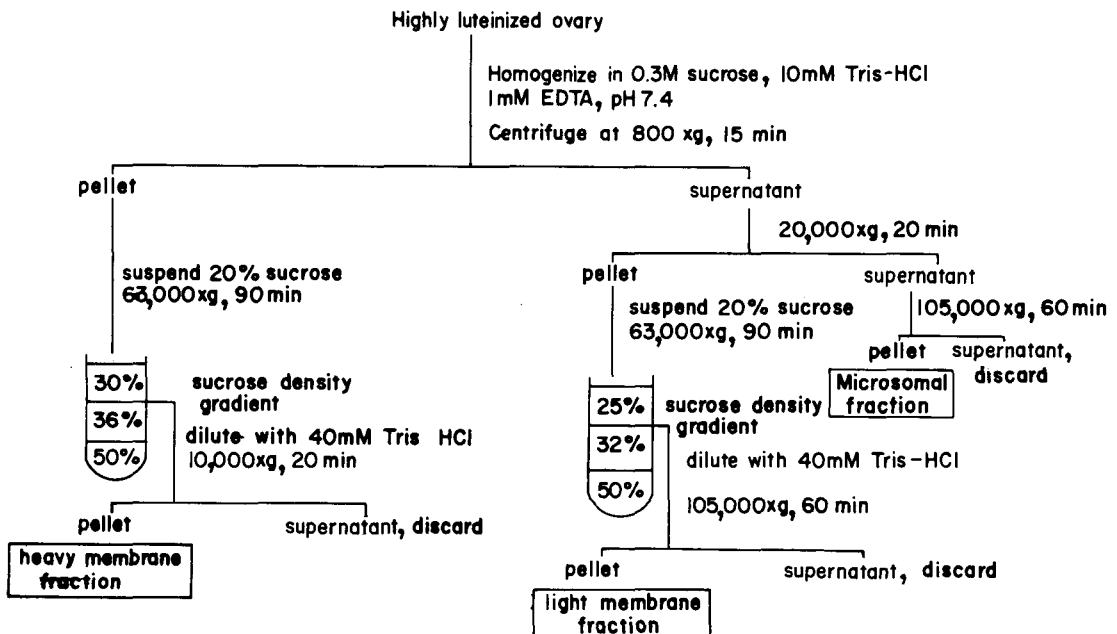
Microsome분획은 20,000×g상층액을 다시 105,000×g로 1시간동안 냉동원심분리하여 그 침전물을 10 mM Tris-HCl, pH 7.4에 부유시켜 얻었다(제1도). 이 모든 과정은 0~4°C에서 수행되었다.

2) Light membrane과 heavy membrane의 분리 : Light membrane과 heavy membrane은 Bramley 및 Ryan(1978a, 1980)의 방법으로 얻었으며(제1도) 이때 사용된 모든 sucrose 용액에는 10 mM Tris-HCl, pH 7.4가 포함되어 있다. 20% sucrose 용액에 부유시킨 800×g 침전물을 30% sucrose, 36% sucrose와 50% sucrose로 이루어진 discontinuous sucrose gradient위에 얹고, 또한 20% sucrose 용액에 부유된 20,000×g 침전물도 25% sucrose, 32% sucrose와 50% sucrose로 된 discontinuous sucrose gradient에 얹은 다음 Beckman SW 40Ti rotor로 63,000×g에서 90분간 냉동원심분리하였다. Heavy membrane 분획은 800×g 침전물로부터 30~36% sucrose 사이에 축적된 것을 모

아 40 mM Tris-HCl, pH 7.4로 희석하고, 10,000×g로 20분간 원심분리한 후 그 침전물을 다시 10 mM Tris-HCl, pH 7.4이 포함된 0.3 M sucrose 용액에 부유시켜 얻었다. Light membrane 분획은 20,000×g 침전물로부터 25~32% sucrose 사이에 축적된 것을 모아 역시 40 mM Tris-HCl, pH 7.4로 희석하고 105,000×g로 60분간 냉동원심분리한 후 얻어진 침전물을 10 mM Tris-HCl, pH 7.4에 부유시켜 얻었다. 얻어진 각 membrane 분획은 사용할때 까지 -70°C에 나누어 보관하였다.

황체막과 microsome 분획의 단백질량은 Lowry 등 (1951)의 방법으로 측정하였으며 표준단백질로 bovine serum albumin(Sigma 회사 제품)을 사용하였다.

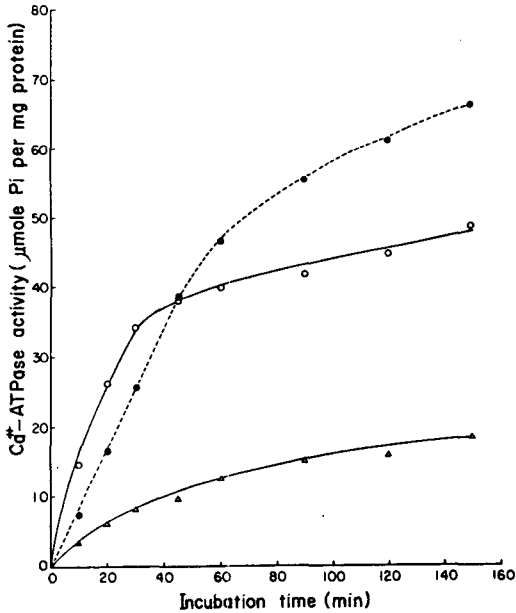
3) Ca^{++} -ATPase 활성도의 측정 : Ca^{++} -ATPase의 활성도는 adenosine triphosphate(ATP)로부터 유리된 inorganic phosphate(Pi)를 Fiske 및 Subbarow (1925) 방법으로 측정하여 단위 단백질과 단위시간당 유리되는 Pi로 나타내었으며(nmole Pi/mg protein per min) 그 값은 Ca^{++} 이 있는 조건하에서의 활성도에서 Ca^{++} 이 없는 조건하에서 측정된 활성도를 뺀 값



제1도. 황체의 light 및 heavy membrane 분획과 microsome 분획 분리방법.

으로 계산하였다.

반응액은 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.2 mM ethyleneglycol-bis-(β-aminoethyl ether)N, N'-tetraacetic acid(EGTA), 0.1 mM ouabain, 여러가지 농도의 CaCl₂, 10~30 μg의 membrane 분획 그리고 여러가지 농도의 ATP로 구성되어 있다. 황체세포막의 Ca⁺⁺-ATPase 활성도는 낮은 Mg⁺⁺ 농도에서 활성화되며 특히 막에 있는 Mg⁺⁺만으로도 충분히 활성화되기 때문에 (Verma 및 Penniston, 1981) 반응액에 MgCl₂를 첨가하지 않은 조건에서 활성도를 측정하였다. 이와같은 현상은 지방세포막(Pershad Singh 및 McDonld, 1980), 간(Iwasa 등, 1982; Lin 등, 1983) 세포막의 Ca⁺⁺-ATPase의 경우에서도 보고된 바 있다. Ca⁺⁺-ATPase의 초기반응속도는 반응액내에 10~30 μ



제 2 도. 반응시간에 따른 각 membrane 분획에서의 Ca⁺⁺-ATPase 활성도. 반응액은 50 mM Tris-HCl, 0.2 mM EGTA, pH 7.4, 1 μM 유리 Ca⁺⁺ 및 10~30 μg의 light membrane(○), heavy membrane(●) 및 microsome(△)으로 이루어져 있으며 0.3 mM ATP를 첨가한 시간으로부터 일정시간이 경과된 후 20% TCA를 첨가하여 반응을 정지시켰다. 각 값은 triplicate로 1~2회 실험한 성적을 평균한 것이다.

g의 membrane 분획이 포함되어 있을 때 효소의 활성도가 반응시간이 경과함에 따라 직선적으로 증가하다가 45분 이후에 서서히 증가하는 것을 관찰(제2도)하고 이후의 모든 실험은 반응시간을 30분으로 고정시켰으며, 반응은 20% trichloroacetic acid(TCA)를 첨가하여 정지시켰다.

반응액내의 유리 Ca⁺⁺ 농도는 Ca⁺⁺/EGTA 완충용액계를 이용하여 결정하였으며 이때 사용된 true association constant(K)는 Sillen 및 Martell(1971)이 얻은 값을 사용하였다. 주어진 pH에서 apparent association constant(K')은 다음과 같이 정의하였으며

$$K'_{MeL} = \frac{[MeL^{2-}]}{[Me^{2-}][L]}$$

(여기서 [L]은 총 유리 ligand(EGTA)의 농도, [MeL²⁻]는 ligand에 결합한 Me²⁻의 농도, [Me²⁻]는 유리 2가 금속이온(Ca⁺⁺)의 농도이다.)

아래와 같은 방정식에 의해 계산되었다.

$$\frac{K_{MeL}}{K'_{MeL}} = \frac{[L]}{[L^{3-}]} = 1 + [H^-]K_1 + [H^-]^2K_1K_2 + [H^-]^3K_1K_2K_3 + [H^-]^4K_1K_2K_3K_4 \dots \dots \dots (1)$$

$$\text{여기서 } K_1 = \frac{[HL^{3-}]}{[H^+][L^{4-}]} \quad K_2 = \frac{[H_2L^{2-}]}{[H^+][HL^{3-}]} \\ K_3 = \frac{[H_3L^-]}{[H^+][H_2L^{2-}]} \quad K_4 = \frac{[H_4L]}{[H^+][H_3L^-]}$$

며 L⁴⁻는 ligand에 양이온이 결합되지 않은 상태를, HL³⁻, H₂L²⁻, H₃L⁻는 H⁺이 각기 1, 2, 3개가 결합된 것을, H₄L은 ligand에 4개의 H⁺이 결합되어 있는 것을 의미하고, K₁, K₂, K₃, K₄는 각 경우의 ligand에 대한 H⁺의 association constant를 나타내는 것으로 역시 Sillen 및 Martell(1971)이 실험적으로 얻은 값을 이용하였으며 위 방정식(1)에서 마지막 두 항은 그 값이 매우 작으므로 무시하였다. 이렇게 얻어진 K는 제1표에 수록하였다. 반응액내의 유리 Ca⁺⁺ 농도는

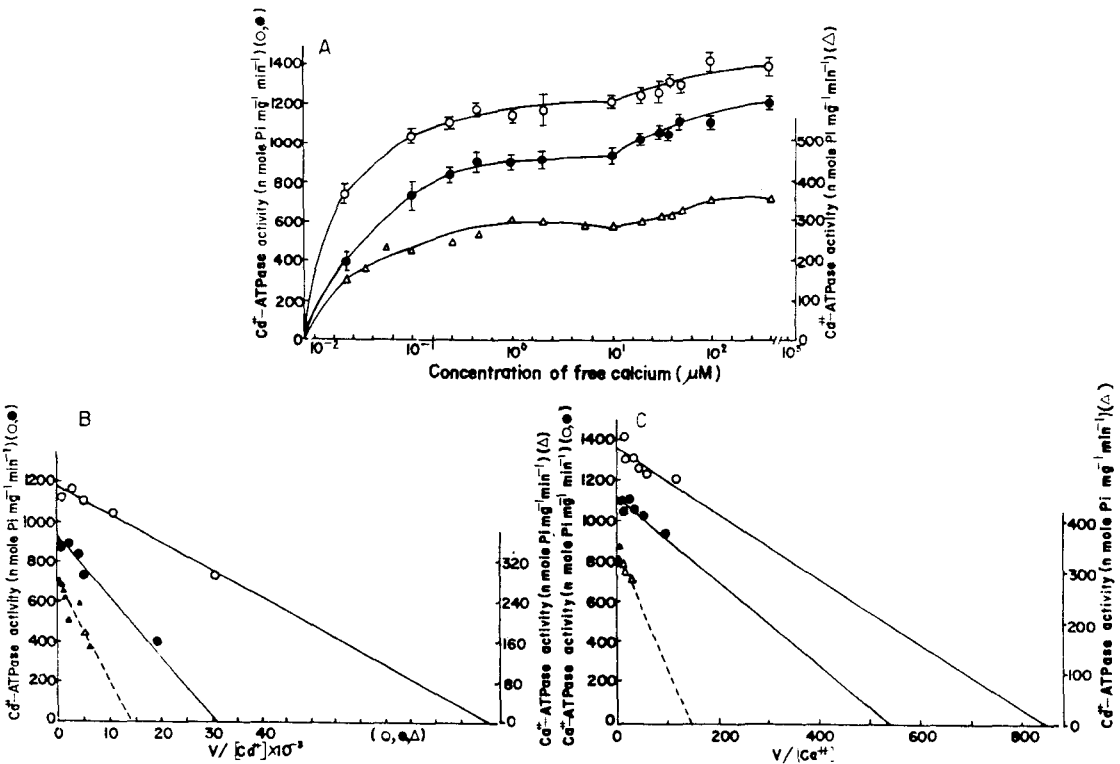
$$K'_{CaEGTA} = \frac{[CaEGTA^{2-}]}{[Ca^{++}][EGTA]} \text{ 및}$$

[Ca⁺⁺] + [CaEGTA²⁻] = [Ca_T] (여기서 [Ca_T]는 총 Ca⁺⁺ 농도이다)의 식으로 부터 계산하였으며 Ca⁺⁺ selective electrode를 이용하여 재확인하였다. Ca⁺⁺ electrode로 10⁻⁷M 이하의 Ca⁺⁺ 농도를 측정하는것은 어려우므로 10⁻⁷M 이하의 Ca⁺⁺ 농도는 재 확인하지 않

제 1 표. 본 실험에서 사용된 Ca^{++} /EGTA 완충용액의 true(K)와 apparent(K') association constant.

양이온	ligand	log K (M^{-1})		pH
		EGTA	EGTA	
H^+	L^{4-}	9.38		
H^+	HL^{3-}	8.77		
Ca^{++}	L^{4-}		4.84	6.0
			5.85	6.5
			6.84	7.0
			7.63	7.4
			8.78	8.0
		9.64	8.5	
		10.32	9.0	

^a : K'은 K로부터 각 pH 조건하에서 (1)식을 이용하여 계산된 값이다.



제 3 도. 반응액내의 유리 Ca^{++} 농도변화에 따른 Ca^{++} -ATPase 활성도의 변화.

Light membrane 분획(\circ), heavy membrane 분획(\bullet) 및 microsome 분획(\triangle)에서 얻은 10~30 μg 정도의 단 백질을 0.3mM ATP 존재하에 30분간 반응시킨 것으로 5회 실시하여 얻은 결과를 평균±표준오차로 나타내었다. Microsome 분획의 Ca^{++} -ATPase 활성도는 매우 낮아 각 그림에서 오른쪽에 따로 눈금을 표시하였다.

A : 반응액내의 Ca^{++} 농도를 증가시킬때 측정된 Ca^{++} -ATPase 활성도의 변화로써 x 축의 유리 Ca^{++} 농도를 대수 척도로 나타낸 것이다.

B, C : A의 결과를 Hofstee(1959) 방법으로 도시한 것으로써 B는 heavy membrane Ca^{++} -ATPase(유리 Ca^{++} 농도를 0~5 μM 까지)의 그림이고 C는 low affinity Ca^{++} -ATPase(유리 Ca^{++} 농도 10 μM 에서부터 100 μM 까지)를 나타낸 것이다.

았다. Ca^{++} selective electrode는 50 mM의 Tris가 포함된 Ca^{++} /EGTA 완충용액과 CaCl_2 로 표준화하였다. 반응액의 pH를 변화시켰을 때 Ca^{++} -ATPase의 활성도는 각 pH 조건하에서 K'_{CaEGTA} (apparent association constant)를 계산함으로써 (제 1 표) 유리 Ca^{++} 농도를 일정하게 유지한 ($1 \mu\text{M}$) 조건에서 측정하였으며, 반응온도를 변화시켰을 때는 OH/H비 (OH/H ratio; 16)를 일정하게 유지함으로써 유리 Ca^{++} 농도를 고정시킨 조건 ($1 \mu\text{M}$)에서 활성도를 측정하였다.

실험 성적

A. 반응액내 Ca^{++} 농도에 따른 Ca^{++} -ATPase 활성도의 변화

반응액내의 유리 Ca^{++} 농도를 변화시키며 효소의 활성도를 측정한 결과(제 3 도 A) light membrane, heavy membrane 및 microsome 분획 모두에 두 종류의 Ca^{++} -ATPase가 존재함을 확인할 수 있었다. 하나는 낮은 유리 Ca^{++} 농도 (10^{-8}M)에서 활성화 되는 high affinity Ca^{++} -ATPase로 Hofstee(1959) 방법으로 도시한 결과(제3도 B) Km 값이 대개 20 nM 정도이나 light membrane 분획에서 그값이 가장 작았으며, Vmax는 light membrane에서 가장 컸고

microsome 분획에서 가장 낮았다(제2표). 또한 Hill의 방법으로 도시한 결과(그림생략) Hill's coefficient가 거의 1에 가까운 것으로 보아(제 2 표) high affinity Ca^{++} -ATPase의 Ca^{++} 에 대한 결합부위는 하나인 것으로 추측된다.

이에 반해 다른 하나는 좀 더 높은 유리 Ca^{++} 농도 ($10 \mu\text{M}$ 이상)에서 활성화 되므로 low affinity Ca^{++} -ATPase라 명명하였으며 Hofstee(1959) 방법으로 도시한 결과(제 3 도 C) Km이 거의 $1\sim 2 \mu\text{M}$ 이었는데(제 2 표) 이 값은 Ca^{++} 농도가 10^{-10} (활성도 역시 0)을 포함하여 $10 \mu\text{M}$ 에서부터 $100 \mu\text{M}$ 사이의 성적을 토대로 Hofstee 방법으로 도시하여 구하였다. 그러나 Ca^{++} 농도가 $1 \mu\text{M}$ 이하인 경우 high affinity Ca^{++} -ATPase가 활성화되기 때문에 이 Km 값은 별의미가 없다. 그러므로 high affinity Ca^{++} -ATPase가 거의 최대로 활성화된 Ca^{++} 농도(이 경우는 $10 \mu\text{M}$, 제 2 도 A 참조) 이상에서만 low affinity Ca^{++} -ATPase가 활성화된다고 가정하였을 때 이 효소가 갖는 Vmax의 1/2의 활성도를 나타내는 Ca^{++} 농도를 $K_{1/2}$ 로 정의하고 이 $K_{1/2}$ 값을 측정한 결과 각 membrane 분획에서 모두 거의 $40 \mu\text{M}$ 정도이었다(제 2 표).

Vmax는 high affinity Ca^{++} -ATPase에서와 마찬가지로 light membrane에서 가장 높았고 mic-

제 2 표. 각 membrane 분획에서 Ca^{++} 농도에 따른 Ca^{++} ATPase의 속도론적 변수(kinetic parameters).

Membrane 분획	High affinity Ca^{++} -ATPase ^a		
	Km(nM) ^c	Vmax (nmole Pi mg ⁻¹ min ⁻¹) ^c	Hill's coefficient ^d
Light membrane	13.66	1175.3	0.899
Heavy membrane	29.82	945.1	1.066
Microsome	20.04	289.7	0.743
Membrane 분획	Low affinity Ca^{++} -ATPase ^b		
	Km(μM) ^c	$K_{1/2}$ (μM) ^e	Vmax(nmole Pi mg ⁻¹ min ⁻¹) ^c
Light membrane	1.58	39.8	1360.3
Heavy membrane	2.06	31.6	1118.3
Microsome	2.32	39.8	339.5

a : 낮은 유리 Ca^{++} 농도에서 ($0\sim 5 \mu\text{M}$) 활성화되는 Ca^{++} -ATPase.

b : 높은 유리 Ca^{++} 농도에서 ($10 \mu\text{M}\sim 100 \mu\text{M}$) 활성화되는 Ca^{++} -ATPase.

c : Km과 Vmax는 제2도 B 및 C로부터 계산되었다.

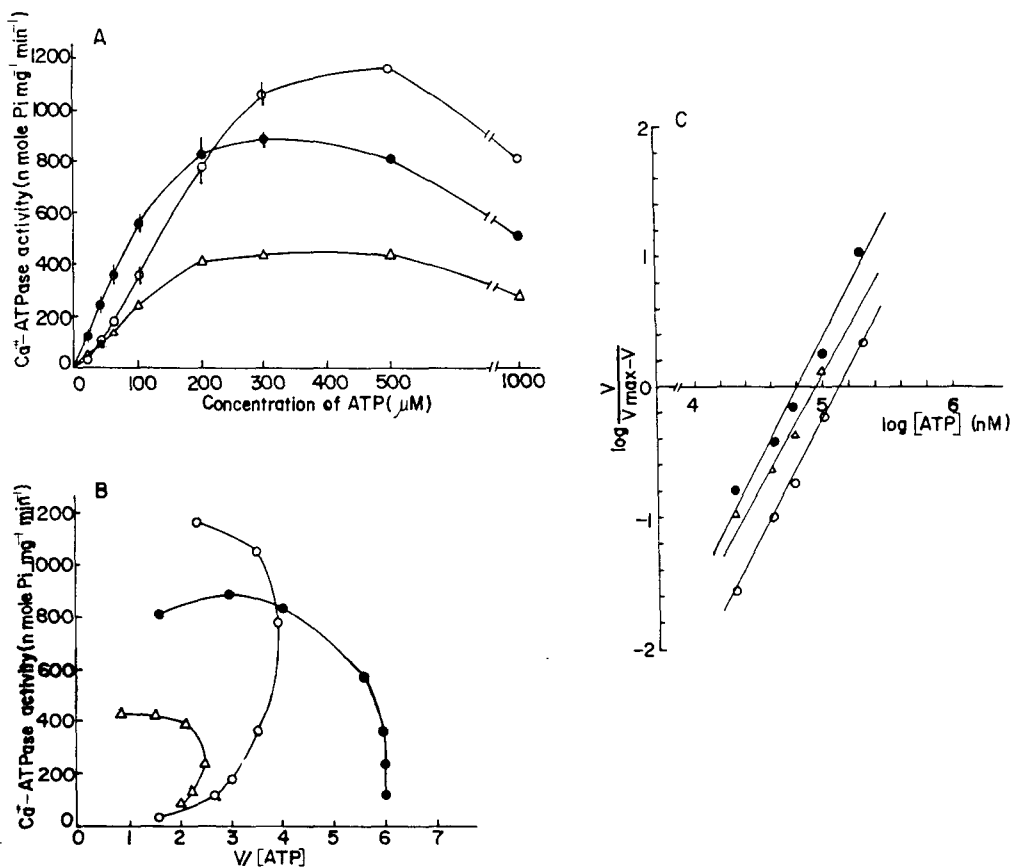
d : Hill의 방법으로 도시하여 그 기울기로부터 구한 값이다(그림생략).

e : High affinity Ca^{++} -ATPase가 거의 최대로 활성화된 Ca^{++} 농도 이상에서만 ($10 \mu\text{M}$, 제2도 A 참조) low affinity Ca^{++} -ATPase가 활성화된다고 가정하였을 때 이 효소가 갖는 Vmax의 1/2값을 나타내는 반응액내의 유리 Ca^{++} 농도.

rosome 분획에서 가장 낮았다(제2표). 같은 유리 Ca⁺⁺ 농도에서 Ca⁺⁺-ATPase의 활성도가 light membrane에서 가장 큰 것은 과다하게 황체화된(highly luteinized) 쥐의 황체에서 Ca⁺⁺-ATPase가 주로 light membrane에 존재함을 보여주는 결과이다(제3도 A).

B. 반응액내 ATP 농도 변화에 따른 high affinity Ca⁺⁺-ATPase 활성도의 변화

황체막에 있는 high affinity 및 low affinity Ca⁺⁺-ATPase중 high affinity Ca⁺⁺-ATPase가 주로 Ca⁺⁺ 이동에 관여할 것이라고 하며(Verma 및



제 4 도. ATP 농도변화에 따른 high affinity Ca⁺⁺-ATPase 활성도의 변화.

- A : ATP 농도변화시 측정된 Ca⁺⁺-ATPase 활성도로 반응액내의 Ca⁺⁺ 농도를 1 μM로 고정하여 high affinity Ca⁺⁺-ATPase가 거의 최대로 활성화되게 한 다음 ATP의 농도를 20 μM에서 1 mM까지 증가시키면서 10~30 μg 단백질의 light membrane(○), heavy membrane(●) 및 microsome 분획(△)의 Ca⁺⁺-ATPase 활성도를 측정하였다. ATP의 농도가 500 μM까지는 효소의 활성도가 증가하나 그 이상에서는 오히려 감소하여 기질억제(substrate inhibition)현상을 보였다. 기질억제현상이 있는 경우 Vmax를 정의할 수 없으므로 여기서는 곡선상의 최고점을 apparent Vmax로 정의하였다. 각 점은 5회의 성적을 종합하여 평균±표준오차로 나타낸 것이다.
- B : A의 결과를 Hofstee(1959) 방법으로 도식한 것으로서 전형적인 positivite cooperativity를 보인다. 이런 상태에서는 역시 Km을 정의할 수 없다.
- C : A의 결과를 Hill의 방법으로 도식한 것으로서 각선의 기울기는 결합부위의 수를 나타내고, x축 절편은 Vmax의 1/2 활성도를 나타내는 ATP의 농도(K_{1/2})이다.

Penniston, 1981) 또 본 실험에서도 high affinity Ca^{++} -ATPase가 세포내 Ca^{++} 농도($0.1 \mu\text{M}$)에서 활성화되므로(제 3도 A) 여기서는 high affinity Ca^{++} -ATPase만 분석하였다. 즉 high affinity Ca^{++} -ATPase의 활성도가 포화상태를 나타내는 Ca^{++} 농도($1 \mu\text{M}$, 제 3도 A)에서 ATP 농도를 변화시키며 각 황체막 분획의 Ca^{++} -ATPase 활성도를 측정 한 결과(제4도 A) ATP 농도를 $500 \mu\text{M}$ 까지 증가시켰을 때에는 Ca^{++} -ATPase

활성도가 증가되나 1mM 이상에서는 오히려 Ca^{++} -ATPase의 활성도가 억제되며 이러한 억제양상은 ATP 농도를 6mM 까지 증가시켰을 때도 나타나(성적생략) 전형적인 기질억제(substrate inhibition) 현상을 나타냈다(Dixon 및 Webb, 1979). 또한 ATP 농도를 $500 \mu\text{M}$ 까지 증가시킬 경우 Ca^{++} -ATPase 활성도의 증가곡선은 모두 sigmoid 형을 나타내어 Hofstee (1959) 방법으로 도시한 결과(제4도 B) 이 효소에

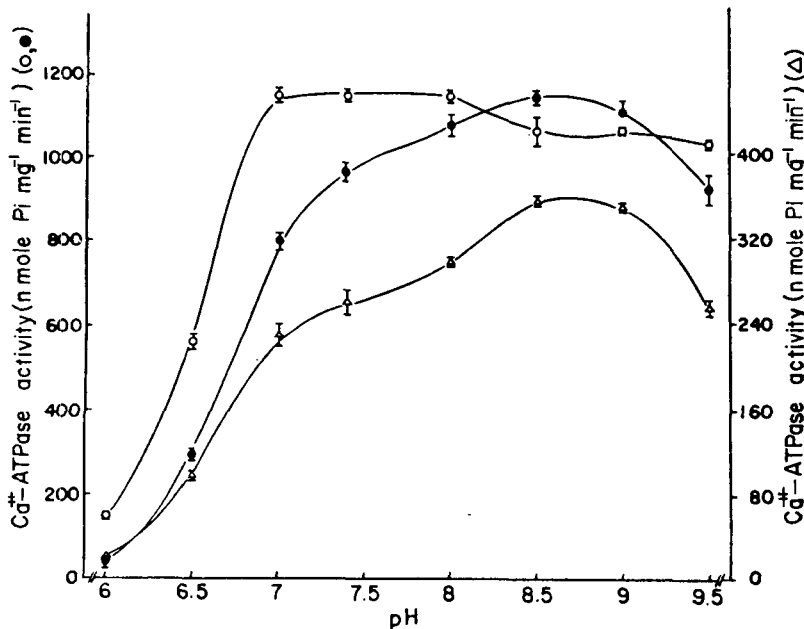
제 3 표. 각 membrane 분획에 있는 high affinity Ca^{++} -ATPase의 ATP에 대한 속도론적 변수

Membrane 분획	$K_{1/2}(\mu\text{M})^a$	Apparent $V_{\text{max}}(\text{n mole Pi mg}^{-1} \text{ min}^{-1})^b$	Hill's coefficient ^c
Light membrane	142.9	1160.4	1.829
Heavy membrane	62.4	883.0	1.929
Microsome	90.2	436.8	1.867

a : Apparent V_{max} 의 1/2 활성도를 나타내는 ATP의 농도로써 제3도 C의 x 축 절편으로부터 구한 값이다.

b : Ca^{++} -ATPase 활성도가 반응액내의 ATP에 대하여 기질억제(substrate inhibition)현상과 positive cooperativity 현상을 나타내므로 V_{max} 가 정의되지 않기 때문에 제3도 A의 곡선에서 가장 높은 활성도의 값을 apparent V_{max} 로 정의 하였다.

c : 제3도 C에 있는 직선의 기울기로부터 계산되었고 각 값이 2정도이므로 high affinity Ca^{++} -ATPase에는 ATP에 대한 결합부위가 2개인 것을 알 수 있다.



제 5 도. pH 변화에 따른 high affinity Ca^{++} -ATPase 활성도의 변화.

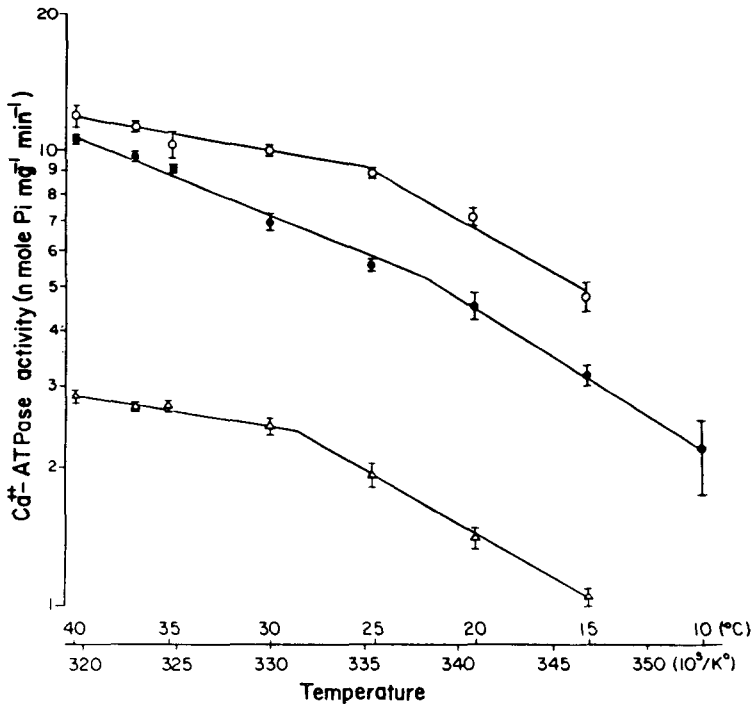
각 활성도는 $10 \sim 30 \mu\text{g}$ 단백질의 light membrane(○), heavy membrane(●) 및 microsome 분획(△)을 $1 \mu\text{M}$ 의 Ca^{++} , $300 \mu\text{M}$ 의 ATP가 있는 반응액내에서 반응시켜 얻었다. 각 점은 5회 시행한 성적을 평균±표준오차로 나타낸 것이다.

ATP가 결합하는 부위 사이에 positive cooperative effect가 있는 것을 알아내고 적어도 high affinity Ca^{++} -ATPase에는 ATP에 대한 결합부위가 두개 이상 일 것으로 생각하였다. 제4도 C는 같은 결과를 Hill의 방법으로 도기한 것으로 각 황체막 분획의 Hill's coefficient가 거의 2인 것으로 보아(제3표) high affinity Ca^{++} -ATPase에는 ATP의 결합부위가 두개 존재하는 것으로 나타났다. 이 효소의 apparent V_{\max} 는 역시 light membrane에서 가장 크고 microsome 분획에서 가장 작았으며, V_{\max} 의 1/2 활성도를 나타내는 ATP의 농도($K_{1/2}$)는 제4도 C의 x축 절편에서 구한 결과 그 값이 60~150 μM 정도이었다(제3표).

C. 반응액내 pH 변화에 따른 high affinity Ca^{++} -ATPase 활성도의 변화

황체세포막(light membrane과 heavy membrane)

의 high affinity Ca^{++} -ATPase의 적정 pH 조건을 찾고자 pH 변화에 따른 Ca^{++} -ATPase의 활성도를 측정하였다. 반응액내의 유리 Ca^{++} 농도를 결정짓는 apparent association constnat(K'_{CaEGTA})는 pH 변화에 민감하므로 우선 pH 변화에 따른 K' 를 계산하고 그로부터 첨가하여야 할 총 CaCl_2 양을 계산하므로써 pH 변화시 유리 Ca^{++} 농도를 일정하게 (1 μM) 유지하였으며, 이러한 조건하에서 Ca^{++} -ATPase 활성도를 측정하여 적정 pH를 찾았다. 여러 pH에서 계산된 K'_{CaEGTA} 는 제1표에 수록되었다. 제5도는 pH 변화에 따른 light와 heavy membrane, microsome 분획에서 high affinity Ca^{++} -ATPase의 활성도를 나타낸 것으로 적정 pH는 light membrane에서는 pH 7~8이었으며 heavy membrane에서는 pH 8.5근처, microsome 분획에서도 pH 8.5근처인 것으로 나타났다.



제 6 도. 온도변화에 따른 high affinity Ca^{++} -ATPase 활성도의 변화.

반응액내의 OH/H비(=16)을 일정하게 유지시켜 유리 Ca^{++} 농도를 일정하게 (1 μM)를 유지하고 300 μM 의 ATP가 있는 조건하에서 활성도를 측정하여 Arrhenius 방법으로 도시하였다. 각선의 기울기는 효소의 활성화에너지를 나타내며 각선이 휘어지는 점(breaking point)은 lipid phase의 전이온도를 나타낸다. 각점은 light membrane(○), heavy membrane(●) 및 microsome 분획(△)으로부터 5회 실시하여 얻은 결과를 평균±표준오차로 나타내었다.

제 4 표. 각 황체막분획의 전이온도 및 Ca⁺⁺-ATPase의 활성화 에너지

Membrane 분획	온도(°C) ^a	Ea(kcal/mole) ^b
Light membrane	25.2 ↑	3.74
	25.2 ↓	10.58
Heavy membrane	22.4 ↑	8.44
	22.4 ↓	10.61
Microsome	28.6 ↑	1.97
	28.6 ↓	9.34

- a : 제6도의 그림에서 각 직선이 휘어지는 점(breaking point)으로부터 계산된 황체막의 lipid phase의 전이온도.
 b : 제6도에 나타난 직선의 기울기에서부터 계산된 Ca⁺⁺-ATPase의 활성화 에너지.

D. 온도변화에 따른 high affinity Ca⁺⁺-ATPase 활성도의 변화

온도를 변화시키에 따라 물의 전리상수(ionization constant)가 변하며 이는 OH/H의 비가 변화함을 나타낸다. 즉 온도변화에 따라 pH가 변하고 pH에 민감하게 유리 Ca⁺⁺ 농도가 변화하므로 일정한 유리 Ca⁺⁺ 농도에서 단지 온도변화에 의한 Ca⁺⁺-ATPase 활성도의 변화를 보기 위하여 온도와는 무관하게 OH/H의 비를 일정하게(OH/H=16) 유지시켜 주었다. 이러한 조건하에서 각 황체막 분획의 high affinity Ca⁺⁺-ATPase 활성도를 온도변화에 따라 측정하여 Arrhenius 방법으로 도시하였다(제 6 도).

각 membrane 분획에서 lipid phase의 전이가 관찰되었고 그 전이온도는 light membrane에서 25.2 °C, heavy membrane에서 22.4 °C, 그리고 microsome 분획에서는 28.6 °C로 microsome 분획에서 가장 높고 heavy membrane에서 가장 낮았다(제 4 표). 각 황체막에 있는 Ca⁺⁺-ATPase의 활성화 에너지는 전이온도 이하에서는 별 차이가 없었으나, 전이온도 이상에서는 서로 의의있는 차이를 나타내었다(제 4 표).

고 찰

Bramley 및 Ryan(1978a, 1978b, 1980)은 PMSG만을 준 후 난소를 분리하여(이 경우는 난소에 거의 대부분 여포만이 존재한다) 난소세포막을 continuous

sucrose density gradient 법으로 분리할 때 과립세포막은 1.16~1.18의 밀도에서 분리되며 여기에는 Mg⁺⁺-ATPase, 5'-nucleotidase, adenylate cyclase의 활성이 큰 것으로 나타났다. PMSG를 주고 66시간후에 hCG를 주사하면 여포는 배란을 하고 황체가 되어 난소는 거의 황체로 이루어져 있게되며 이를 sucrose density gradient 법으로 membrane을 분리할 때 밀도가 서로 다른 곳에서 분리되는 두 membrane 분획을 얻을 수 있었다. 즉 황체세포막은 1.16~1.18의 밀도에서 분리되고 adenylate cyclase 활성도가 큰 heavy membrane과 전자보다 낮은 1.12~1.13의 밀도에서 분리되며 Mg⁺⁺-ATPase, 5'-nucleotidase, Na⁺-K⁺ ATPase 활성도와 hCG binding이 많은 light membrane으로 나누어 지는데 heavy membrane은 대개 basolateral surface로부터, light membrane은 microvillous surface로부터 유래된다고 한다. PMSG와 hCG 주사에 의해 생기는 light membrane은 hCG 주사 후 4일째 가장 많이 나타나고 12일후에는 황체의 퇴화와 더불어 다시 light membrane이 소실(Bramley 및 Ryan, 1980)되므로 본 실험에서는 hCG 주사 후 4일째에 난소를 적출하여 실험에 사용하였다.

황체의 기능은 세포내 Ca⁺⁺ 농도에 의해 조절될 것이라고 하며(Dorflinger 등, 1984; Gore 및 Behrman, 1984), 세포내 Ca⁺⁺ 농도는 세포막에 있는 Ca⁺⁺ 배출 pump(Verma 및 Penniston, 1981) 혹은/그리고 mitochondria와 endoplasmic reticulum(microsome 분획)내로의 Ca⁺⁺ 저장(Carafoli 및 Crompton, 1978; Martonosi 등, 1978; Moore 및 Pastan, 1978)에 의해 유지되고 있다. 세포내 Ca⁺⁺ 농도는 대개 1 μM 이하인데 20 nM의 Ca⁺⁺ 농도에서 반이 활성화되는 high affinity Ca⁺⁺-ATPase가 존재하는 것으로 미루어 볼 때 이 효소는 세포내 Ca⁺⁺ 농도 증가시 Ca⁺⁺을 세포외부로 배출하는 pump로 작용하여 세포내 Ca⁺⁺ 농도를 생리적 range로 유지하는데 기여하는 것으로 추측된다. 그러나 본 실험에서 얻은 Ca⁺⁺에 대한 속도론적 변수는(kinetic parameter 들, Km 및 Vmax) Verma 및 Penniston(1981)이 보고한 값과 차이가 있는데 이는 그 값들을 얻는 방법상의 차이(본 실험에서는 Hofstee 방법으로 Km 값을 계산하였는데 그들은 half-maximal activity를 갖는 Ca⁺⁺ 농도를 K_{1/2}로 나타내었다)와 실험조건의 차이 때문에 생긴 것으로 생

각된다. 즉 본 실험에서는 반응액내 ATP 농도를 300 μM 로 사용하였고 Verma 및 Penniston(1981)은 6 mM ATP를 사용하였는데 본 실험결과 ATP 농도가 500 μM 이상에서는 Ca^{++} -ATPase가 기질인 ATP에 의해 그 활성이 억제받는 현상 (substrate inhibition)이 나타나므로 6 mM ATP의 사용시에는 Ca^{++} -ATPase의 활성도가 매우 억제되어 서로 다른 결과를 나타낸 것으로 생각된다. 이러한 사실은 2 mM ATP를 사용할 경우 microsome 분획의 Ca^{++} 에 대한 K_m 이 약 10배정도 증가되는 결과에 의해 뒷받침될 수 있다(결과생략).

각 membrane 분획의 high affinity Ca^{++} -ATPase는 Hill's coefficient가 1에 가까운 것으로 보아 Ca^{++} 에 대한 결합부위는 하나인 것으로 생각되며 이는 지방세포 (Pershad Singh 및 McDonald, 1980)나 적혈구 (Schatzmann 및 Bürgin, 1978)막에 있는 Ca^{++} -ATPase의 Ca^{++} 에 대한 결합부위가 둘인 것과는 다른 결과이다. 이 이외에도 10 μM 이상에서 활성화되는 low affinity Ca^{++} -ATPase가 존재함이 확인되었으며 이는 40 μM 정도의 Ca^{++} 농도에서 half-miximal activity를 갖는 것으로 나타났다. 그러나 이 실험 만으로는 low affinity Ca^{++} -ATPase가 high affinity Ca^{++} -ATPase와는 무관하게 어느 Ca^{++} 농도(10 μM) 이상에서만 활성화되는 것인지 혹은 10 μM 이하의 Ca^{++} 농도에서도 활성화되지만 high affinity Ca^{++} -ATPase의 활성도에 비해 그 활성이 상대적으로 작아 은폐(masking)되는 것인지는 알 수 없고 단지 그러한 가능성을 추측할 뿐이다.

각 membrane 분획의 ATP에 대한 kinetic 성질을 조사한 결과 낮은 Ca^{++} 농도에서 활성화되는 high affinity Ca^{++} -ATPase는 ATP에 대한 결합부위가 두 개이며(제 3 표), 이들 결합부위간에 positive cooperative effect가 있는(제 3 도 B) 것으로 보아 ATP가 하나의 부위에 결합함으로써 다른 부위에 ATP의 결합을 용이하게 해준다고 설명할 수 있다. 이와 비슷한 결과는 지방세포(Pershad Singh 및 McDonald, 1980)와 적혈구막에 있는(Richards 등, 1978) Ca^{++} -ATPase에서도 보고된 바 있다.

황체막의 light membrane과 heavy membrane 및 microsome 분획의 적정 pH는 다른 조직, 예를 들면 근육세포내의 sarcoplasmic reticulum(MacLennan,

1970) 혹은 지방세포막(Pershad Singh 및 McDonald, 1980)에 있는 Ca^{++} -ATPase가 생리적 pH 범위에서 최대의 활성도를 갖는 것과는 달리 약간 알칼리쪽으로 이동되어 있는 것을 볼 수 있다. 이와 비슷하게 알칼리에서 최대 활성도를 나타내는 효소들로는 태반에서 분리된 high affinity Ca^{++} -ATPase(Shami 및 Radde, 1971)나 뇌의 microsome 분획에서 분리된 Ca^{++} -ATPase(Nakamura 등, 1967), 황체막에 존재하는 Na^+ - K^+ -ATPase(Kim 및 Yeoun, 1983) 등이 보고되었다. 그러나 왜 이런 효소들이 알칼리에서 최대 활성도를 가져야 하는지는 현재로서는 알 수 없으며 이의 생리학적의 의의도 불명이다.

세포막에 결합되어 있는 많은 효소의 활성도는 세포막의 유동성, 즉 세포막을 구성하고 있는 지질의 liquid-crystalline 상태에 따라 변화한다고 알려져 있다(Inesi 등, 1973; Kimelberg, 1975). 본 실험에서 반응액의 온도 변화시 효소활성도의 변화로부터 얻은 lipid phase의 전이온도는 대개 25 $^{\circ}\text{C}$ 전후로써 X-ray diffraction이나 fluorescence polarization 등을 사용하여 취의 황체에서 얻은 결과(42 $^{\circ}\text{C}$ 전후; Buhr 등, 1979; Carlson 등, 1984)보다 매우 낮았는데 이는 전이온도 결정방법의 차이에서 온 결과라고 추측된다. 이는 본 실험과 유사한 방법으로 분리 측정된 microsome 분획의 Na^+ - K^+ -ATPase의 전이온도(Kim 및 Yeoun, 1983)가 본 실험에서 얻은 값과 유사한 것으로 미루어 볼 때 타당하리라고 생각된다. 그러나 본 실험에 사용된 방법으로는 온도변화에 의해 특정 단백질(본 실험에서는 Ca^{++} -ATPase) 근처에 있는 지질 혹은 Ca^{++} -ATPase와 상호작용을 하고 있는 지질의 전이온도만이 측정되었을 가능성이 있다. 즉 Ca^{++} -ATPase와 상호작용을 하는 지질이 세포막을 구성하고 있는 다른 지질들보다 낮은 전이온도를 갖는 지질이라면 이런 전이온도의 차(Buhr 등(1979)의 결과는 42 $^{\circ}\text{C}$ 전후, 본 실험에서는 25 $^{\circ}\text{C}$ 전후)가 나타날 수 있으며, 이러한 지질들의 상태가 바뀌면서 인접한 Ca^{++} -ATPase의 구조적 변화를 일으켜 그 활성이 변화된 것이라고 생각할 수 있다. 또한 각 membrane 사이에도 전이온도에 약간의 차이가 관찰되었는데 이는 각 membrane이 유래된 부위가 다르므로 그를 구성하고 있는 지질의 조성이 다른데에 기인할 것이라고 추측할 수 있으나 각 membrane의 지질조성이 얼마나 다

른지는 아직 보고된 바가 없다. 또한 Ca^{++} 에 대한 Km 값이 20 nM 정도로 거의 비슷함에도 불구하고(제2표) heavy membrane이 light membrane보다 낮은 Ca^{++} -ATPase 활성도를 갖는 이유는 반응온도인 37°C에서 heavy membrane이 light membrane보다 유동성이 떨어지고 활성화 에너지가 크기때문이라고(제4표) 생각된다. 그러나 microsome 분획의 경우에는 전이온도가 높고 활성화 에너지가 작으므로 Ca^{++} -ATPase의 활성도가 낮은 이유를 이러한 것만으로는 설명할 수 없다. 지방세포에서 보고된 바와 같이 microsome에 있는 Ca^{++} -ATPase가 최대로 활성화되기 위해서는 세포막에 있는 Ca^{++} -ATPase가 활성화되기 위해 필요한 양보다 많은 양의 Mg^{++} 이나 K^{+} 이 필요하다고 하므로(Black 등, 1980) 본 실험에서도 이와같은 이유 때문에 microsome에 있는 Ca^{++} -ATPase가 전부 활성화되지 않았을 가능성이 있는데 이러한 가능성은 확인하지 않았다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때 light membrane 분획에 존재하는 high affinity Ca^{++} -ATPase system이 heavy membrane 분획에서보다 Ca^{++} 에 대한 affinity 및 V_{max} 가 크고(제2표) 또 활성화 에너지도 작다(제4표). 그러므로 황체세포내 Ca^{++} 농도가 증가하였을 때 생리적 범위내로 Ca^{++} 농도를 낮추는 데에는 light membrane 분획에 있는 high affinity Ca^{++} -ATPase system이 heavy membrane 분획에 있는 Ca^{++} -ATPase system보다 더 효과적일 것이라고 생각된다.

결 론

황체화란소에서 분리한 light membrane과 heavy membrane 그리고 세포내 Ca^{++} 저장소인 microsome 분획의 Ca^{++} -ATPase의 물리화학적성질 및 kinetic 성질을 조사하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1) 각 membrane 분획의 Ca^{++} -ATPase 활성도는 반응시간이 경과함에 따라 직선적으로 증가하다가 45분 이후에 서서히 증가하였다.

2) 각 membrane 분획에는 Ca^{++} 에 대해 낮은 Ca^{++} 농도에서 활성화되는 high affinity Ca^{++} -ATPase(Km 값은 대개 $2 \times 10^{-8}M$ 정도)와 높은 농도의 Ca^{++} 에 의해 활성화되는 low affinity Ca^{++} -ATPase($K_{1/2}$ 은 40 μM 정도)가 존재하며, 두 종류의 Ca^{++} -ATPase 모두에

서 V_{max} 는 light membrane에서 가장 컸으며 microsome 분획에서 가장 낮았다.

3) 각 membrane 분획의 high affinity Ca^{++} -ATPase의 Hill's coefficient는 거의 1인 것으로 보아 이 효소의 Ca^{++} 결합부위는 하나인 것으로 생각된다.

4) 각 membrane 분획의 high affinity Ca^{++} -ATPase의 ATP에 대한 결합부위는 두개이며 결합부위 간에는 positive cooperativity가 있다.

5) 각 membrane 분획에 있는 high affinity Ca^{++} -ATPase의 적정 pH는 light membrane의 경우 pH 7~8이며 heavy membrane과 microsome 분획에서는 pH 8.5이었다.

6) 각 membrane 분획에 있는 high affinity Ca^{++} -ATPase의 전이온도는 대개 25°C 전후였고, 활성화에너지는 전이온도이하에서는 거의 같으나 그 이상의 온도에서는 heavy membrane이 가장 크고 microsome 분획이 가장 낮았다.

이상의 결과로부터 황체가 발달되면서 생긴 light membrane에 있는 Ca^{++} -ATPase는 다른 membrane 즉 heavy membrane이나 microsome 분획에 있는 Ca^{++} -ATPase와 비교할 때 활성도(V_{max})는 크나 kinetic 성질은 유사하며, 적정 pH와 전이온도는 거의 비슷하였다. 세포내 Ca^{++} 이 황체기능에 중요한 역할을 담당하고 있는 것이 사실이라면 이러한 세포내 Ca^{++} 농도는 세포막과 microsome 분획의 Ca^{++} -ATPase에 의해, 특히 light membrane 분획에 있는 high affinity Ca^{++} -ATPase에 의해 조절받을 것으로 생각된다.

REFERENCES

- Bigdeli, H. and Synder, P.: *Gonadotropin-releasing hormone release from the rat hypothalamus: Dependence on membrane depolarization and calcium influx. Endocrinology, 103:281-286, 1978.*
- Black, B.L., McDonald, J.M. and Janett, L.: *Characterization of Mg^{++} -and (Ca^{++} - Mg^{++}) ATPase activity in adipocyte endoplasmic reticulum. Arch. Biochem. Biophys., 199:92-102, 1980.*
- Bourne, G. and Baldwin, D.H.: *Extracellular Ca^{++} -independent and dependent components of the biphasic release of LH in response to luteinizing hormone-releasing hormone in vitro. Endocrinology, 107:780-788, 1980.*

- Bramley, T.A. and Ryan, R.J.: *Interactions of gonadotropins with corpus luteum membranes. I. Properties and distributions of some marker enzyme activities after subcellular fractions of the superovulated rat ovary.* *Endocrinology*, 103:778-795, 1978a.
- Bramley, T.A. and Ryan, R.J.: *Interactions of gonadotropins with corpus luteum membranes. II. The identification of two distinct surface membrane fractions from superovulated rat ovaries.* *Endocrinology*, 103:796-804, 1978b.
- Bramley, T.A. and Ryan, R.J.: *Interactions of gonadotropins with corpus luteum membranes. IX. Changes in the specific activities of some plasma membrane marker enzymes in rat ovarian homogenates and purified membrane fractions at various times after priming with PMSG and hCG.* *Mol. Cell Endocrinol*, 19:33-41, 1980.
- Buhr, M.M., Carlson, J.C. and Thompson, J. E.: *A new perspective on the mechanism of corpus luteum regression.* *Endocrinology*, 105:1330-1335, 1979.
- Carafoli, E. and Crompton, M.: *The regulation of intracellular calcium by mitochondria.* *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 270:269-284, 1978.
- Carlson, J. C., Buhr, M.M. and Riley J.C.M.: *Alterations in the cellular membranes of regressing rat corpora lutea.* *Endocrinology*, 114:521-526, 1984.
- Dipolo, R. and Beauge, L.: *Physiological role of ATP-driven calcium pump in squid axon.* *Nature*, 278:271-273, 1979.
- Dixon, M. and Webb, E.C.: *Enzymes. 3rd edition, Longman group Ltd, London, p. 126, 1979.*
- Dorflinger, L.J., Albert, P.J., Williams, A.T. and Behrman, H.R.: *Calcium is an inhibitor of luteinizing hormone-sensitive adenylate cyclase in the luteal cell.* *Endocrinology*, 114:1208-1215, 1984.
- Fiske, C.H. and Subbarow, Y.: *The colorimetric determination of phosphorus.* *J. Biol. Chem.*, 66:375-400, 1925.
- Gore, S.D. and Behrman, H.R.: *Alteration of transmembrane sodium and potassium gradients inhibits the action of luteinizing hormone in the luteal cell.* *Endocrinology*, 114:2020-2031, 1984.
- Higuchi, T., Kaneko, A., Abel, J.H. Jr. and Niswender, G.D.: *Relationship between membrane potential and progesterone release in ovine corpora lutea.* *Endocrinology*, 99:1023-1032, 1976.
- Hofstee, B.H.J.: *Non-inverted versus inverted plots in enzyme kinetics.* *Nature (London)*, 184:1296-1298, 1959.
- Hopkins, C.R. and Walker, A.M.: *Calcium as a second messenger in the stimulation of luteinizing hormone secretion.* *Mol. Cell Endocrinol.*, 12:189-208, 1978.
- Inesi, G., Millman, M. and Eletv, S.: *Temperature induced transition of function and structure in sarcoplasmic reticulum membranes.* *J. Mol. Biol.*, 81:438-503, 1973.
- Iwasa, Y., Iwasa, T., Higuchi, K., Matsui, K. and Miyamoto, E.: *Demonstration of a high affinity Ca^{++} -ATPase in rat liver plasma membrane.* *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 105:488-494, 1982.
- Kim, I. and Yeoun, D.S.: *Effect of prostaglandin $F_{2\alpha}$ on Na^+ - K^+ -ATPase activity in luteal membranes.* *Biol. Reprod.*, 29:48-55, 1983.
- Kimelberg, H.K.: *Alterations in phospholipid-dependent (Na^+ - K^+) ATPase activity due to lipid fluidity.* *Biochim. Biophys. Acta.*, 413:143-156, 1975.
- Lin, S.H., Wallace, M.A. and Fain, J.N.: *Regulation of Ca^{++} - Mg^{++} -ATPase activity in hepatocyte plasma membranes by vasopressin and phenylephrine.* *Endocrinology*, 113:2268-2275, 1983.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.D., Farr, A.L. and Randall, R.J.: *Protein measurement with the folin phenol reagent.* *J. Biol. Chem.*, 193:265-275, 1951.
- Maclennan, D.H.: *Purification and properties of an adenosine triphosphatase from sarcoplasmic reticulum.* *J. Biol. Chem.*, 245:4508-4518, 1970.
- Marian, J. and Conn, P.M.: *Gonadotropin releasing hormone stimulation of cultured pituitary cells requires calcium.* *Mol. Pharmacol*, 16:196-201, 1979.
- Martonosi, A.N., Chyn, T.L. and Schibeci, A.: *The calcium transport of sarcoplasmic reticulum.* *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 270:148-159, 1978.
- Miyamoto, H. and Racker, E.: *Solubilization and partial purification of the Ca^{++}/Na^+ antiport from the plasma membrane of bovine heart.* *J. Biol. Chem.*, 255:2656-2658, 1980.
- Moore, L. and Pastan, I.: *Energy-dependent calcium uptake by fibroblast microsomes.* *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 270:177-194, 1978.
- Nakamura, Y., Kosakai, M. and Konishi, K.: *Some properties of brain microsome adenosine triphosphatase activated by magnesium and calcium.* *Arch. Biochem. Biophys.*, 120:15-21, 1967.
- Ojeda, S.R., Negro-Vilar, A. and McCann, S.M.: *On the role of Ca^{++} in prostaglandin E_2 (PGE_2)-induced*

- LHRH release by rat median eminence (ME). Fed. Proc.*, 40:2866 (Abstract), 1980.
- Ojeda, S.R. and Negro-Vilar, A.: *Prostaglandin E₂-induced luteinizing hormone-releasing hormone release involves mobilization of intracellular Ca⁺⁺* *Endocrinology*, 116:1763-1770, 1985.
- Pershad Singh, H.A. and McDonald, J.M.: *A high affinity calcium stimulated magnesium-dependent adenosine triphosphatase in rat adipocyte plasma membranes. J. Biol. Chem.*, 255:4087-4093, 1980.
- Richards, D.E., Rega, A.F. and Garrahan, P.J.: *Two classes of site for ATP in the Ca⁺⁺-ATPase from human red cell membranes. Biochim. Biophys. Acta.*, 511:194-201, 1978.
- Samli, M.H. and Greschwind, I.: *Some effects of energy-transfer inhibitors and of Ca²⁺ free or K⁺-enhanced media on the release of luteinizing hormone from the rat pituitary gland in vitro. Endocrinology*, 82: 225-231, 1968.
- Schatzmann, H.J. and Bürgin, H.: *Calcium in human red blood cells. Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 307:125-147, 1978.
- Shami, Y. and Radde, I.C.: *Calcium stimulated ATPase of guinea pig placenta. Biochim. Biophys. Acta.*, 249: 345-352, 1971.
- Sillen, L.G. and Martell, A.E.: *Stability constants of metal-ion complexes. Special publications Nos 17 and 25. The Chemical Society, Burlington House, London, 1971.*
- Van Breeman, C., Aaronson, P. and Loutzenhizer, R.: *Sodium-calcium interaction in mammalian smooth muscle. Pharmacol. Rev.*, 30:167-208, 1978.
- Veldhuis, J.D. and Klase, P.A.: *Calcium ions modulate hormonally stimulated progesterone production in isolated ovarian cells. Biochem. J.*, 202:81-89, 1982.
- Verma, A.K. and Penniston, J.T.: *A high affinity Ca⁺⁺-stimulated and Mg⁺⁺-dependent ATPase in rat corpus luteum plasma membrane fractions. J. Biol. Chem.*, 256:1269-1275, 1981.
- Wakabayashi, K., Kamberi, I.A. and McCann, S.M.: *In vitro response of rat pituitary to gonadotropin-releasing factor and to ions. Endocrinology*, 85:1046-1056, 1969.
- Williams, J.A.: *Stimulation of ⁴⁵Ca efflux from rat pituitary by luteinizing hormone-releasing hormone and other pituitary stimulants. J. Physiol.*, 260:105-115, 1976.