

무흡광색소 식물의 감광수용체 개발 연구(I)
- 표고버섯 중의 광감응성 mitochondrial ATPase -

민태진[§]·조석우·박상신
동국대학교 화학과

Studies on the Development of Photoreceptor in the
Nonchromatophore Organisms(I)
- Light-Induced Mitochondrial ATPase in the *L. edodes*(Berk) Sing -

Tae-Jin Min,[§] Suck-Woo Cho, Sang-Shin Park
Department of Chemistry, College of Sciences, Dongguk University, Seoul 100, Korea

ABSTRACT: Mitochondria in the *L. edodes* was purified by linear sucrose density gradient centrifugation. The mitochondrial ATPase activity was investigated by various wavelength illumination for 30 min at dark state. The mitochondrial ATPase activity was stimulated 1.6 fold by 680 nm illumination compared with dark control group. The mitochondrial ATPase activity of different light illumination time at 680 nm was stimulated 2.3 fold at 5 minutes compared with dark control group. Its optimum pH and temperature were found to be 7.5 and 59°C after illumination for 5 minutes at 680 nm. The mitochondrial ATPase activity was activated by 5 mmol Fe³⁺, 0.1 mmol Fe²⁺, 0.1 mmol Mg²⁺, 0.5 mmol K⁺, and 0.1 mmol Ca²⁺ ion. But, the enzyme was inhibited by 5 mmol Na⁺ ion.

KEYWORDS: Light-Induced ATPase, *Lentinus edodes*(Berk) Sing.

일반적인 ATPase, 즉 가용성 F₁-ATPase는 소수성 인지질인 F₀-group에 연결(Racker, 1976)되어 미토콘드리아의 내막(Kielly 등, 1953), 엽록체의 thylakoid 및 plasma membrane에 존재(Leonard 등 1976)하고 전자전달계에 관여하며, ATP를 ADP와 P_i로 분해시키는 효소(Kielly, 1955)이다.

F₁·F₀-ATPase의 가설모델(Racker, 1976)에서 가용성인 F₁-ATPase는 서로 다른 5개의 subunit로 구성된 복합체(Housteck 등, 1977)로서, ATP를 ADP와 P_i로 분해시키는 ATPase 기능을 하며, F₁-group은 Oligomycin Sensitivity Conferring Protein(OSCP)에 의하여 F₀-group에 결합되어 ADP와 P_i로부터 ATP를 생성시키는 ATP synthetase(Okamoto 등, 1977)의 역할을 한다.

ATPase에 관한 연구로는 쥐의 간(Kielly 등,

1953)과 곤충의 근육(Gilmour 등, 1952) 및 귀리 뿌리(Leonard 등, 1973)중의 Mg²⁺-ATPase, 적혈구막(Monk 등, 1976) 및 원생 단세포 동물인 나팔벌레의 Ca²⁺-ATPase(Song, 1981; 1983, Min 등; 1984; Chen 등, 1985), K⁺·Na⁺-ATPase(Peters 등, 1981), 그리고 광증감제에 의한 상처 엽록체중의 광감응성 및 광의존성 ATPase, *R. rubrum* 박테리아의 발색단 중의 광감응성 ATPase의 효소적 특성 등이 보고(Carmeli 등, 1972; Horio 등, 1972)되어 있다. 그러나 버섯중의 ATPase에 관한 연구는 보고된 바 없으며, 버섯은 고등균류에 속하는 음지생물로서 엽록체나 박테리아성 엽록소와 같은 흡광색소가 없다.

본 연구실에서는 버섯이 몇 파장의 빛에 의하여 체내 대사가 영위되는지를 알기 위한 기초연구로서, 표고버섯중의 ATPase를 분리 정제하여 그 효소적

§ 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로.

이 논문은 1986년도 문교부 대학부설연구소 지원 학술연구조성비에 의하여 연구되었음.

특성을 보고 (Min 등, 1986) 한 바 있다.

본 연구에서는 표고버섯 중의 미토콘드리아를 분리 정제하여 암실에서 파장별 빛을 각각 조사한 후 파장 변화에 따른 미토콘드리아성 ATPase의 활성도 변화를 측정하여, 몇 파장의 빛에 의하여 ATP 분해가 촉진되는지를 실험하고, 최적 파장에서 빛 조사 시간 변화에 따른 활성도를 측정하여 최적 빛의 조사 시간, 최적 파장 및 최적 빛 조사 시간에서의 최적 pH, 최적 온도 및 금속이온 효과를 측정하여, 효소적 특성과 파장과의 관계를 관찰하였다.

材料 및 方法

재 료

시료는 경기도 광릉에서 채취한 야생 표고버섯, *Lentinus edodes* (Berk.) Sing을 사용하였고, 실험에 사용한 adenosine 5'-triphosphate(ATP), bovine albumin(BA) 등은 Sigma Co. 제품을, tris (hydroxymethyl) aminoethane(Tris), sucrose, 1-amino-2-naphthol-4-sulfonic acid(ANSA)는 Wako Co. 제품을, ammonium molybdate (AM) 및 Coomassie brilliant blue G-250(CBB G 250)은 Merck Co. 제품을, 그 외의 시약은 분석용 특급시약을 사용하였으며, 본 실험에 사용한 물은 탈이온수(전도도: $10^{-7} \Omega \text{cm}^{-1}$)를 사용하였다.

미토콘드리아의 분리 정제

Blair(1967) 및 Cooper(1969)의 방법을 인용하여, 버섯 400g에 0.25 M sucrose가 포함된 10 mM Tris-HCl 완충용액(pH 7.5) 900 ml를 가하여 균질화 한 다음 2,000 rpm으로 10분간 원심분리(Dupont sorvall OTD-75 B)하여 침전물을 제거하고, 이를 3,000 rpm으로 10분 동안 분리하여 세포핵을 제거하였다. 상층액을 50,000 rpm으로 7분간 원심분리하여 미토콘드리아를 얻은 후, 이를 다시 설탕 밀도선형 기울기법으로 23,000 rpm에서 5시간 원심분리하여 정제하였다. 이를 전자현미경(Zeiss EM-109) 사진으로 정제 확인하였다.

파장별 광조사

분리정제된 미토콘드리아 1 ml를 시험관에 각각 취하고 암실에서 10분 동안 정치한 다음, 이를 각 파장의 간섭필터(Koshin Kogaku Co. 400 nm ~ 700 nm)를 부착시킨 projector(원진전자 Co. 광원: 300W)로부터 5 cm 거리에서 정확히 30분 동안 빛을 조사(광량: 2.0×10^{14} 광자/cm²)하여, 즉시 액체 질소중에서 반응을 정지시킨 다음, 상온에서 녹

여 미토콘드리아를 파괴한 후 효소용액으로 사용하였다.

파장 변화에 따른 ATPase의 활성도 측정

ATPase의 활성도는 40 mM ATP 수용액 0.25 ml에 10 mM Tris-HCl 완충용액(pH 7.5) 0.65 ml를 가하여 37°C에서 열평형시킨 다음, 이에 각 파장별 빛을 조사하여 얻은 미토콘드리아성 효소용액 0.1 ml를 가하고, 37°C에서 정확히 10분 동안 반응시킨 후, 10% TCA 수용액 2 ml를 가하고 syringe (Millipore Co. 0.45 μm) 여과하여 효소성단백질을 제거하였다. Rorive 등(1972)의 방법을 이용하여, 여액 2.6 ml에 2.5% AM 수용액 2 ml와 0.25% ANSA 수용액 0.4 ml 등을 가하여 유리된 Pi를 30분 동안 발색시켜, 660 nm에서 흡광도(UV-Vis Spectrophotometer, Shimadzu M-240)를 측정하였다.

이 때, 복합파장의 빛을 조사하였을 때와 빛을 조사하지 않고 어두운 상태에서 측정된 활성도를 대조구로 하였다. 단백질 정량은 Sedmak법(1977)을 인용, BA 표준 검량선에 의하여 시료 0.1 ml당 단백질의 양을 산출하였다.

효소의 비활성도 단위는 37°C에서 매 분당 효소단백질 1 mg이 ATP로부터 1 μmole 의 Pi를 유리시키는 양을 1단위로 하였다.

빛 조사 시간 변화에 따른 ATPase의 활성도

같은 방법으로 최적 파장(680 nm)하에서 1초에서 30분까지 각각 변화시켜 빛을 조사한 다음 미토콘드리아성 ATPase의 비활성도를 측정하여 최적 빛 조사 시간을 측정하였다. 또한 복합파장의 빛을 조사하였을 때와 빛을 조사하지 않고 어두운 상태에서 측정된 비활성도를 대조구로 하였다.

최적 pH

680 nm의 빛을 5분 동안 조사하여(최적 광조건) 얻은 미토콘드리아성 ATPase의 최적 pH는 10 mM Tris-HCl 완충용액으로 pH 7.0에서 9.0까지 각각 pH를 변화시켜 비활성도를 측정함으로써 구하였다.

최적 온도

최적 광조건하에서 빛을 조사하여 얻은 미토콘드리아성 ATPase의 최적 온도는 최적 pH 7.5 하에서 20°C에서 70°C까지 각각 온도를 변화시켜 비활성도를 측정하여 얻었다.

금속이온 효과

최적 조건하에서 빛을 조사하여 얻은 ATPase의 금속이온 효과는 최적 pH 7.5 최적 온도 59°C에서 각 금속이온의 농도를 각각 변화시켜 10분 동안 처

리하여 활성도를 측정하였다.

結果 및 考察

미토콘드리아의 분리 정제

설탕 밀도 선형기울기법으로 원심분리하여 분리 정제한 미토콘드리아는 Fig. 1에서 보는 바와 같이 44~50% 사이에서 분리되었으며, 33~37% 사이에서는 glyoxysome이, 40~43% 사이에서는 proplastids가 분리되었다. 정제한 미토콘드리아를 전자현미경 사진으로 확인한 결과는 Fig. 2와 같다.

파장 변화에 따른 ATPase의 활성도

각 파장의 빛을 30분 동안 조사하여 얻은 미토콘드리아성 ATPase의 비활성도는 Fig. 3에 나타내었다.

대조구로, 빛을 조사하지 않고 어두운 상태에서 측정된 비활성도는 18.0이었으며 복합파장의 빛을 조사하였을 때는 21.1로 거의 일정함을 보여주고 있다.

Fig. 3에서 보는 바와 같이 400 nm, 650 nm 및 680 nm에서는 그 비활성도가 주기적으로 증가함을 보였고, 특히 680 nm에서는 그 비활성도가 대조구 각각에 비하여 16단위 및 13단위가 증가함을 보였다. 이로써, 표고버섯중의 미토콘드리아성 ATPase는 680 nm 빛에 의하여 가장 활성화됨을 알 수 있었다.

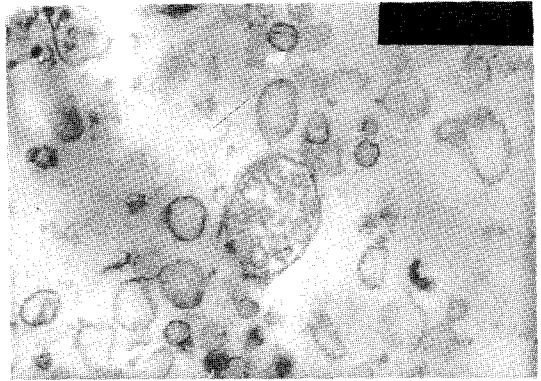


Fig. 2. Electron micrograph of mitochondria from *L. edodes*(magnification; 40,000X).

빛 조사 시간 변화에 따른 ATPase의 활성도 변화 미토콘드리아성 ATPase가 가장 활성화되는 680 nm에서 빛의 조사 시간 변화에 따른 미토콘드리아성 ATPase의 비활성도 변화는 Fig. 4와 같다.

Fig. 4에서 보는 바와 같이 1초, 10초 및 5분간의 빛 조사에서 비활성도가 주기적으로 증가함을 보이나, 특히 680 nm의 빛을 5분간 조사하였을 때는 비활성도가 48.3으로 대조구 각각에 비하여 30.3 및 27.2단위가 증가하였다. 이로써 표고버섯 중의 미토콘드리아성 ATPase는 680 nm의 빛을 5분 동안 조사(최적 광조건)하였을 때 가장 활성화됨을 알 수 있었다.

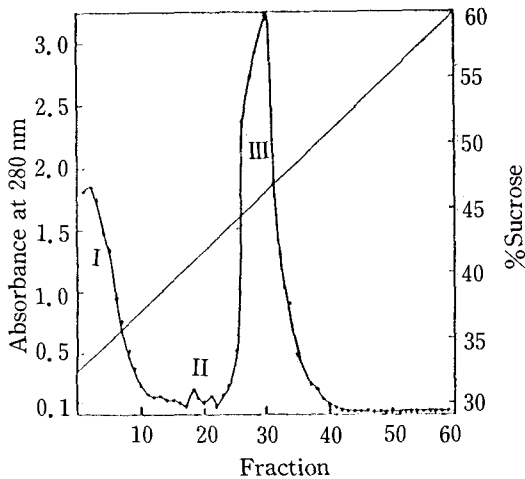


Fig. 1. Fractionation of mitochondria from *L. edodes* by linear sucrose density gradient centrifugation for 5hrs. at 23,000 rpm. I; Glyoxysomes, II; Proplastids, III; Mitochondria.

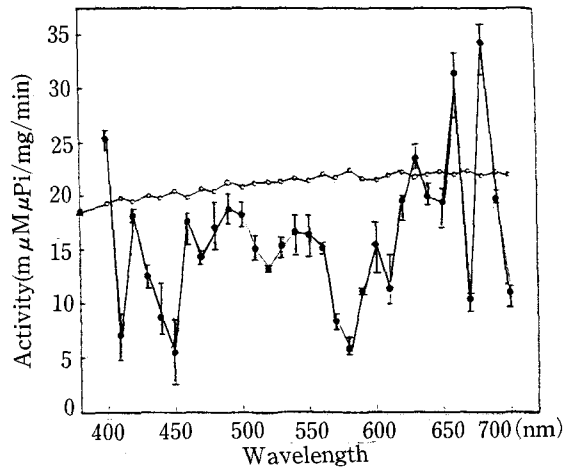


Fig. 3. Compared with mitochondrial ATPase activity after each wavelength light illumination for 30 min and its control group (○; complex wavelength, ●; illumination ▲; dark state.).

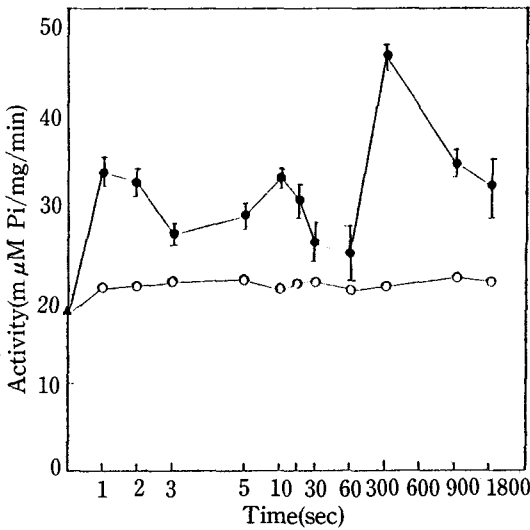


Fig. 4. Time dependence of mitochondrial ATPase activity at 680 nm (○; complex wavelength, ●; illumination, ▲; dark state.).

빛 조사에 따른 ATPase의 최적 pH

최적 광조건으로 빛을 조사하여 얻은 미토콘드리아성 ATPase의 pH 변화에 따른 활성도 변화는 Fig. 5와 같다.

Fig. 5에서와 같이 이 효소의 빛 조사에 따른 최적 pH는 7.5였다.

Syrian hamster의 지방조직중의 미토콘드리아성 ATPase(Houstek 등, 1977)의 최적 pH 8.5와

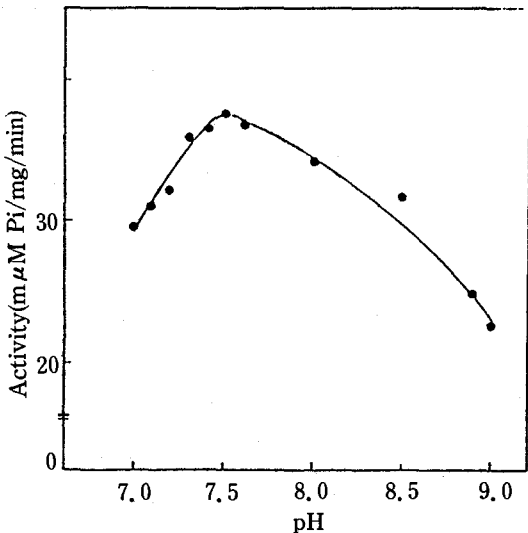


Fig. 5. pH effect of mitochondrial ATPase activity after illumination for 5 min at 680 nm.

thermophilic aerobic bacterium(PS 3)에서 분리한 ATPase(Sone 등, 1975)의 최적 pH 8.6, 신관의 적혈구막 Ca²⁺-ATPase(Rorive 등, 1972)의 최적 pH 7.8, 곤충의 근육 미토콘드리아성 Mg²⁺-ATPase(Caubergs 등, 1986)의 최적 pH 7.8 및 꽃양배추 중의 microsomal Mg²⁺-ATPase(Caubergs 등, 1986)의 최적 pH 7.0과는 상이하였으나, 소심장의 미토콘드리아성 ATPase(Penefsky 등, 1965)의 최적 pH 7.5와, 표고버섯중에서 순수히 정제한 ATPase(Min 등, 1986)의 최적 pH 7.6과는 유사하였다.

빛 조사에 따른 ATPase의 최적 온도

최적 광조건으로 빛을 조사하여 얻은 미토콘드리아성 ATPase의 최적 pH 7.5하에서의 온도변화에 따른 활성도변화는 Fig. 6과 같고, 이 효소의 최적 온도는 59°C였다.

이 결과는 thermophilic aerobic bacterium(PS 3)에서 분리한 ATPase(Sone 등, 1975)의 최적 온도 70°C, 곤충근육의 미토콘드리아성 Mg²⁺-ATPase(Gilmour 등, 1952)의 최적 온도 42°C, 꽃양배추 중의 microsomal Mg²⁺-ATPase(Caubergs 등, 1986)의 최적 온도 40°C와는 크게 상이하였으나 표고버섯중에서 정제한 ATPase(Min 등, 1986)의 최적 온도 58°C와는 유사하였다.

금속이온 효과

최적 광조건으로 빛을 조사하여 얻은 미토콘드리아

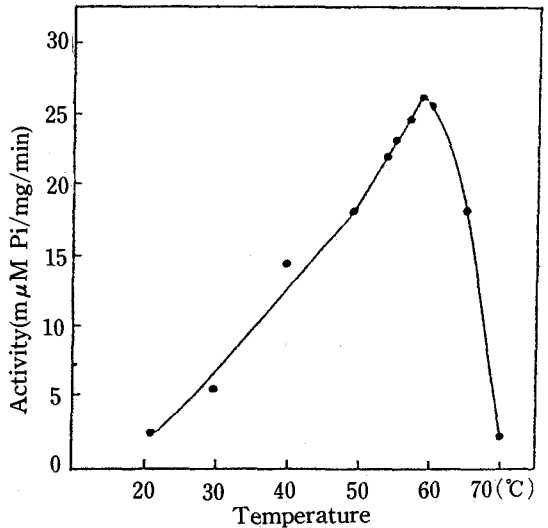


Fig. 6. Temperature effect of mitochondrial ATPase after illumination for 5 min at 680 nm.

아성 ATPase의 최적 pH(7.5) 및 최적 온도(59°C) 하에서 측정된 금속이온 효과는 Table I과 같고 이를 그림으로 표시한 결과는 Fig. 7 및 Fig. 8과 같다. Fig. 7에서 보는 바와 같이, Fe³⁺ 이온 효과는 농도 증가에 따라 그 활성이 증가하였고, 5 mmol에서는 금속이온이 없을 때에 비하여 78% 증가하였다. Fe²⁺ 이온은 0.1 mmol에서 40%의 활성을 증가시켰으나 그 이상의 농도에서는 별 변화가 없었다.

Ca²⁺ 이온은 0.1 mmol에서 10% 활성 증가를 보였고, 농도 증가에 따라 그 활성이 감소하였다.

Fig. 8에서 보는 바와 같이, Mg²⁺ 이온 효과는, 0.1 mmol에서 43%의 활성 증가를 보였으나 그 이

Table I. Cation effects of mitochondrial ATPase activity after illumination for 5 min. at 680 nm

Cation	Concentration (mmole)	Relative activity (%)
none		100
Fe ³⁺	0.1	98
	0.5	135
	1.0	170
	5.0	178
Fe ²⁺	0.1	140
	0.5	138
	1.0	135
	5.0	145
Ca ²⁺	0.1	110
	0.5	103
	1.0	101
	5.0	97
	5.0	97
Na ⁺	0.1	98
	0.5	92
	1.0	90
	5.0	86
	5.0	86
K ⁺	0.1	110
	0.5	125
	1.0	115
	5.0	123
Mg ²⁺	0.1	143
	0.5	140
	1.0	130
	5.0	103

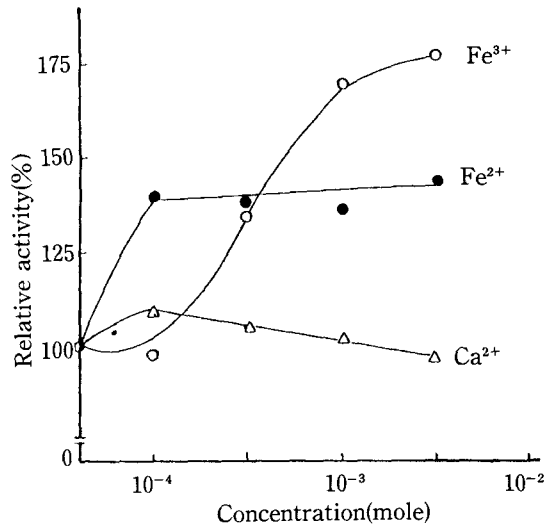


Fig. 7. Effects of Fe³⁺, Fe²⁺ and Ca²⁺ on the mitochondrial ATPase activity after illumination for 5 min at 680 nm (○; Fe³⁺, ●; Fe²⁺, △; Ca²⁺).

상의 농도에서는 농도증가에 따라 감소하였다.

K⁺ 이온 효과는 0.5 mmol에서 25%의 활성 증가를 보였으며, Na⁺ 이온은 효소의 활성을 억제하였다.

K⁺ 및 Na⁺ 이온에 의하여 활성화되는 K⁺·Na⁺-ATPase (Peters 등, 1981), Ca²⁺ 이온에 의하여 활성화되는 Ca²⁺-ATPase (Song, 1981, 1983, Min 등, 1984, Chen 등, 1985) 등에 대하여는 보고되어 있으며, 표고버섯 중의 미토콘드리아성 ATPase의

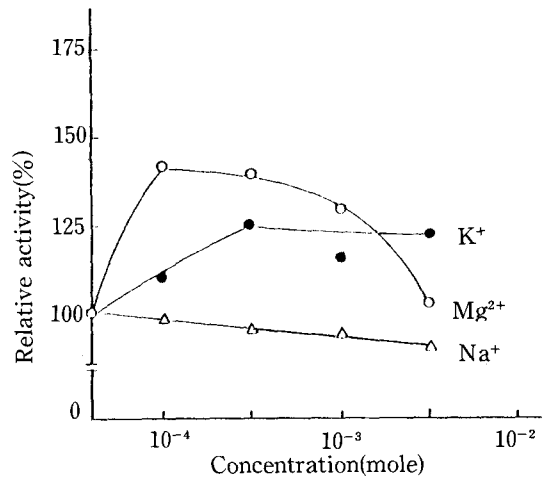


Fig. 8. Effects of K⁺, Mg²⁺ and Na⁺ on the mitochondrial ATPase activity after illumination for 5 min at 680 nm (●; K⁺, ○; Mg²⁺, △; Na⁺)

경우는 Fe^{3+} 이온에 의하여 크게 활성화되었다. 이는 버섯이 자라는 지표층의 산화제 2철에 기인되는 것이 아닌가 추정된다.

摘 要

1. 표고버섯의 미토콘드리아는 설탕 농도 44~50% 사이에서 분리정제 되었다.
2. 파장 변화에 따른 미토콘드리아성 ATPase의 비활성도는 680 nm 파장에서 가장 증가하였다.
3. 680 nm에서 빛 조사 시간 변화에 따른 활성도는 5분 동안 조사하였을 때 가장 증가하였다.
4. 최적 광조건(680 nm, 5분)에서 조사한 이 효소의 최적 pH 및 최적 온도는 7.5와 59°C였다.
5. 최적 광조건에서 얻은 이 효소는 Fe^{3+} , Fe^{2+} , Mg^{2+} , K^+ 및 Ca^{2+} 이온에 의하여 활성화되었고, Na^+ 이온에 의하여 억제되었다.

参考文献

- Blair, P.V.(1967); The large scale preparation and properties of hart mitochondrial from slaughterhouse material. *Methods Enzymol.* **10**: 78-81.
- Chen, B.H., Min, T.J. and Song, P.S.(1985); Light-Induced synthesis of ATP in the unicellular ciliate stentor coeruleus. *Photochem. Photobiol.* **41**: 120-130.
- Carmeli, C. and Avron, M.(1972); Light-Triggered and Light-Dependent ATPase activities in chloroplasts. *Methods Enzymol.* **24**: 92-96.
- Cooper, T.G. and Beevers, H.(1969); Mitochondria and glyoxysome from castor bean endosperm. *J. Biol. Chem.* **244**: 3507-3512.
- Caubergs, R.J., Asard, H.H., DeGreef, J.A., Leeuwerik, F.J. and oltmann, F.L.(1986); Light-Inducible Absorbance changes and Vanadate-Sensitive ATPase activity associated with the presumptive plasma membrane fraction from cauliflower inflorescences. *Photochem. Photobiol.* **44**: 641-649.
- Gilmour, D. and Calaby, J.H.(1952); Purification of ATPase from insect muscle. *Arch. Biochem. Biophys.* **41**: 83-91.
- Housteck, J. and Drahota, Z.(1977); Purification and properties of mitochondrial ATPase of hamster brown adipose tissue. *Biochem. Biophys. Acta.* **484**: 127-139.
- Horio, T., Horiuti, Y., Yamamoto, N., and Nishikawa, K.(1972); Light-Induced ATPase activity; Bacterial. *Methods Enzymol.* **24**: 96-103.
- Kielly, W.W. and Kielley, R.K.(1953); A specific ATPase of liver mitochondria. *J. Biol. Chem.* **200**: 213-219.
- Kielly, W.W.(1955); Mitochondrial ATPase. *Methods Enzymol.* **2**: 593-598.
- Leonard and Woude(1976); Isolation of plasma membranes from corn roots by sucrose density gradient centrifugation. *Plant Physiology* **57**: 105-112.
- Leonard, R.T., Hansen, D. and Hodges, T.K.(1973); The purification of specific membrane bound ATPase. *Plant. Physiol.* **51**: 749-752.
- Monk, B.C. and Kellerman, G.M.(1976); A rapid method for the assay of mitochondrial ATPase activity. *Anal. Biochem.* **73**: 187-195.
- Min, T.J. and Song, P.S.(1984); Chemical actinometric determination of ATP in stentor coeruleus. *Photochem. Photobiol.* **39**: 76-83.
- Min, T.J. and Park, H.R.(1986); Studies on the ATPase in the mushroom(L. edodes(Berk.) Sing). *J. Nat. Sci. Res. Ins.* **6**: 89-96.
- Okamoto, H., Sone, N., Hirata, H. and Kagawa, Y. (1977); Purified proton conductor in proton translocating ATPase. *J. Biol. Chem.* **252**: 6125-6131.
- Penefsky, M.S. and Warner, R.C.(1965); Partial resolution of the enzyme catalyzing oxidative phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **240**: 4694-4699.
- Peters, W.H.M., Depont, H.J.H.H.M., Koppers, A. and Bonting, S.L.(1981); Studies on $Na^+ \cdot K^+$ -Activated ATPase. *Biochemica et Biophysica Acta* **641**: 55-63.
- Racker, E.(1976); The possible organization of the polypeptides of $F_1 \cdot F_0$ -ATPase. *Trends Biochem. Sci.* **1**: 244-255.
- Rorive, G. and Kleinzeller, A.(1972); The effect of ATP and Ca^{2+} on the cellvolume in isolated Kidney Tubules. *Biochem. Biophys. Acta.* **274**: 226-239.
- Song, P.S.(1981); photosensory transduction in stentor coeruleus and related organisms. *Biochem. Biophys. Acta.* **639**: 1-7.
- Song, P.S.(1983); Protozoan and related photoreceptors; Molecular Aspects. *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* **12**: 35-42.
- Sedmak, J.J. and Grossberg, S.E.(1977); A rapid

sensitive and versatile assay for protein using
Coomassie brilliant blue G250. *Anal. Biochem.*
79: 544-552.

Sone, N., Yoshida, M., Hirata, H. and Kogawa, Y.
(1975); Purification and properties of a Dicyclo-

hexylcarbodiimide-Sensitive Triphosphatase
from a thermophilic bacterium. *J. Biol. Chem.*
250: 7917-7923.

Accepted for Publication 28 December 1987