

표고버섯의 Mitochondrial F₁-ATPase 활성도에 미치는 금속이온의 역할에 관한 연구

박상신¹ · 민태진*

¹동국대학교 자연과학대학 생화학과
동국대학교 이과대학 화학과

Study on the Role of Metal ions for the Activity of the Mitochondrial F₁-ATPase in *Lentinus edodes*

Sang Shin Park¹ and Tae Jin Min*

¹Department of Biochemistry, Dongguk University, Kyungju 780-714, Korea
Department of Chemistry, Dongguk University, Seoul 100-715, Korea

ABSTRACT: The role of metal ions for the activity of the mitochondrial F₁-ATPase was studied. Removal of non-heme iron ion from the mitochondria by dialysis against chelating agents, 10 mM ethylenediaminetetraacetic acid(EDTA) and 10 mM o-phenanthroline(o-Phe), led to 56% and 49% inactivation of the enzyme, respectively. The enzyme dialyzed against EDTA was reactivated 81% by the addition of 0.5 mM Fe³⁺ and 70% by 0.5 mM Mg²⁺. But, Fe²⁺ did not reactivate the enzyme. Coexistence of 0.5 mM Fe²⁺ and 0.5 mM Mg²⁺ resulted in 95% reactivation of the enzyme, while Fe³⁺ with 0.5 mM Mg²⁺ did not reactivate the enzyme like the effect of Fe²⁺ alone. The enzyme dialyzed against o-Phe showed the similar results. These data showed that Fe³⁺ is predominantly required for the activity of the mitochondrial F₁-ATPase in *Lentinus edodes* and stimulated the activity of it by Mg²⁺. Fe³⁺ and Mg²⁺ increased enzyme's affinity for substrate, decreasing the Km value 1.67 mM to 0.65 mM.

KEYWORDS: Mitochondrial F₁-ATPase, non-heme iron ion, *Lentinus edodes*

서 론

ATPase(EC 3.6.1.3)는 F₀F₁-ATPase와 F₁-ATPase의 총칭으로서 F₀F₁-ATPase(ATP synthase)는 ATP를 합성하는 활성을 가지며, F₁-ATPase(ATPase)는 ATP를 분해하는 활성을 나타낸다. ATPase는 bacteria의 세포막, 엽록체의 thylakoid 막, 또는 고등세포의 세포막 및 mitochondria의 내막에 존재한다. 이 효소는 F₁과 F₀의 두 부분으로 구성되어 있으며, 이들은 oligomycin sensitive conferring protein(OSCP)에 의하여 연결되어 있다(Rac-

ker, 1976). F₁ 부분은 수용성 촉매부위로서 ATP를 ADP와 인산이온(Pi)으로 가수분해시키며(Greaser *et al.*, 1982), 소수성 인지단백질인 F₀ 부분은 F₁ 부분과 함께 mitochondria의 내막을 통한 H⁺의 유입을 매개하면서(Wang, 1983) 이 때 방출되는 자유 energy를 이용하여 ADP와 Pi로부터 ATP의 합성을 촉매하는 ATP synthase의 역할을 한다(Cross, 1981). F₀F₁-ATPase complex의 subunits 조성, 구조 및 기능 등은 그 동안 여러 종류의 생명체로부터 연구되어 왔다(Amzel and Pederson, 1983; Walker *et al.*, 1984).

본 연구실에서는 고등 담자균에 속하는 표고버섯의 ATPase를 순수히 분리정제하여 효소적 특성을

*Corresponding author

연구 보고하였다(Min and Park, 1991^a; 1991^b; Min *et al.*, 1992). 또한, Min 등은 음지생물인 표고버섯 중의 mitochondrial ATP synthase(Min *et al.*, 1989^a; 1989^b) 및 ATPase(Min *et al.*, 1987^a; 1987^b)가 각각 470 nm의 청색광 및 680 nm의 적색광에 의하여 활성이 증가하며, ATP synthase의 활성화를 유발하는 470 nm의 광수용체는 mitochondria 내에 존재하는 flavin계 화합물임을 보고하였다(Park and Min, 1991). 버섯의 종류에 따른 빛 조사 효과를 관찰하기 위하여 느타리 버섯의 mitochondrial ATP synthase(Lee and Min, 1989^a; Min and Lee, 1991) 및 ATPase(Lee and Min, 1989^b)에 대한 파장별 광조사 실험을 한 결과, 480 nm 및 580 nm의 빛을 15초 및 10초 동안 각각 조사할 때 두 효소의 활성이 각각 증가됨으로써 표고버섯의 mitochondrial ATP synthase 및 ATPase의 활성화 파장과 서로 다른 빛에 의해 활성화됨을 알 수 있었다.

ATPase는 metalloenzyme에 속하는 효소로서, 대부분의 ATPase는 Mg^{2+} 이나 Na^+ , K^+ , Ca^{2+} 등의 금속이온에 의하여 활성화되는 것으로 보고되어 왔다(Nakamura, 1988; Caubergs *et al.*, 1986). 그러나, 본 연구실에서는 표고버섯 중의 광감응성 mitochondrial F_0F_1 -ATPase 및 F_1 -ATPase가 각각 Fe^{2+} 및 Fe^{3+} 에 의하여 그 활성이 가장 크게 활성화됨을 처음으로 보고하였으며(Min *et al.*, 1989^b; 1987^b), 두 효소의 활성에 미치는 Fe^{2+} , Fe^{3+} , 및 Mg^{2+} 의 연관성을 관찰하였다(Min *et al.*, 1993^a; 1993^b). Park 등은 표고버섯의 mitochondria를 금속 chelating agent인 ethylenediaminetetraacetic acid(EDTA) 또는 o-phenanthroline(o-Phe)으로 투석처리하여 금속 이온을 제거하였을 때 mitochondrial F_0F_1 -ATPase (metal-free enzyme)의 활성도가 상실되며, 활성을 상실한 효소용액에 Fe^{2+} 를 가했을 때 효소의 활성이 회복됨을 관찰함으로써 mitochondrial F_0F_1 -ATPase 활성도의 철 이온 요구성을 구명하였다(Park *et al.*, 1993).

본 연구에서는 표고버섯의 mitochondria를 EDTA 또는 o-Phe로 투석처리하여 얻은 metal-free mitochondrial F_1 -ATPase의 활성도를 측정하여 투석처리를 하지 않은 효소의 활성도와 비교하였으며, metal-free enzyme에 이 효소의 활성화 이온으로 보고된 Fe^{3+} 및 Mg^{2+} 를 가하였을 때의 활성회복 효

과를 관찰하였다. 또한, Fe^{3+} 및 Mg^{2+} 이 효소와 기질간의 친화성에 미치는 효과를 조사함으로써, 표고버섯의 mitochondrial F_1 -ATPase의 활성도에 관한 철 이온의 요구성을 실험하였다.

재료 및 방법

재료

본 실험의 시료는 경기도 여주에서 재배한 표고버섯(*Lentinus edodes*)을 사용하였다. Bovine albumin(BA), tris(hydroxymethyl)aminomethane(Tris), adenosine-5'-triphosphate(ATP), ethylenediaminetetraacetic acid(EDTA), o-phenanthroline(o-Phe), ferrous chloride($FeCl_2$), ferric chloride($FeCl_3$), magnesium chloride($MgCl_2$), sodium acetate, batho-phenanthroline, sodium dithionite 및 dialyzing tubing은 Sigma 제품을, Ammonium molybdate(AM), 1-amino-2-naphthol-4-sulfonic acid(ANSA)는 Merck 제품을 사용하였으며, 그외의 모든 시약은 Wako 제품의 특급시약을 사용하였다.

Mitochondria의 분리정제

표고버섯의 mitochondria의 분리정제는 Douce 등(1972)의 방법을 인용 변형하여 본 연구실의 방법(Min, 1987^a)으로 단계별 실타겔도 기울기 원심분리법에 의하여 실행하였다.

Mitochondria의 확인

Mitochondria의 정제도는 Singer(1973) 및 Rubin 등(1978)의 방법을 인용한 Park 등(Park and Min, 1991)의 방법으로 mitochondria의 marker enzyme인 succinate dehydrogenase(EC 1.3.99.1)와 cytochrome oxidase(EC 1.9.3.1)의 활성도를 측정하여 확인하였다.

Mitochondria의 투석

Vallee 등(1960)의 방법에 따라 mitochondria 내의 금속이온을 제거하기 위하여 mitochondria를 dialyzing tubing에 취하고, 금속 chelating agent인 10 mM EDTA 및 10 mM o-Phe가 포함된 10 mM Tris-HCl 완충용액(pH 7.5) 중에서 일정시간(0-48시간) 간격으로 투석처리 하였다. 이를 10 mM Tris-

HCl 완충용액(pH 7.5) 중에서 재투석하여 시료 중의 chelating agent를 완전히 제거한 후, freeze drying으로 농축하여 효소의 활성도를 측정하였다. 이때 일정시간 동안 투석처리한 metal-free enzyme 중 활성도가 가장 감소된 시료를 본 실험의 효소용액으로 사용하였다.

Mitochondria 내의 non-heme 철 이온 정량

Doeg 등(1962)의 방법을 인용하여 mitochondria 내에 존재하는 non-heme의 철 이온의 함량을 측정하였다. 0.1 ml의 시료에 0.2% sodium dithionite 용액 0.1 ml와 95% ethanol 0.7 ml를 가하여 교반한 후, 이 혼합용액에 0.2% bathophenanthroline 용액 0.05 ml 및 1 M sodium acetate 완충용액(pH 4.6) 0.05 ml를 가하여 38°C에서 5분 동안 방치하였다. 이를 원심분리한 후 535 nm에서 흡광도를 측정하였다.

효소 활성도 측정

Mitochondrial F_1 -ATPase의 활성도는 Rorive 등(1972)의 방법을 변형한 Min 등(1987^a)의 방법에 따라 측정하였다. 10 mM Tris-HCl 완충용액(pH 7.5) 0.65 ml에 효소용액 0.1 ml를 가하여 37°C에서 3분 동안 열평형시킨 후 기질 용액인 15 mM ATP 수용액 0.25 ml를 가하여 37°C에서 10분 동안 반응시킨 후 10% TCA 수용액 2 ml를 가하여 반응을 정지시켰다. 이를 syringe 여과(pore size 0.45 μ m, Millipore Co.)하여 침전물을 제거한 여액에 10 mM Tris-HCl 완충용액(pH 7.5) 5 ml, 2.5% AM 수용액 2 ml 및 0.25% ANSA 수용액 0.4 ml를 가하여 30분 동안 발색시킨 후 660 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소의 활성도 단위는 37°C에서 매 분당 효소 단백질 1 mg이 ATP로부터 1 μ mol의 인산이온(Pi)을 유리시키는 효소의 양을 1단위로 하였다. 단백질 정량은 Lowry 등(1951)의 방법을 이용하여 측정하였으며, BA를 이용한 표준 검량곡선에 의하여 단백질 양을 산출하였다.

금속이온에 의한 enzyme의 재활성화

48시간 동안 투석처리하여 얻은 metal-free mitochondria에 mitochondrial F_1 -ATPase의 활성화 이온으로 보고된 Fe^{2+} , Fe^{3+} 및 Mg^{2+} 를 각각 농도별로

가한 후 효소의 활성도 변화를 측정하였으며, 활성화 이온과의 연관성을 관찰하기 위하여 일정농도의 Mg^{2+} 이온의 공존하에서 Fe^{2+} 및 Fe^{3+} 을 농도별로 가한 후 효소의 활성도 변화를 측정하였다.

Enzyme kinetics

본 효소의 기질인 ATP의 농도를 1 mM에서 20 mM까지 변화시켜서 효소의 활성도를 측정한 후 Lineweaver-Burk double plot 방법으로 K_m 값을 산출하였다. 또한 이 효소의 활성화 이온인 0.5 mM Fe^{3+} 및 0.05 mM Mg^{2+} 의 공존하에서 각각의 기질 농도에 대하여 활성도를 측정한 후 같은 방법으로 K_m 값을 측정하여 금속이온이 효소의 기질 친화성에 미치는 영향을 관찰하였다.

결과 및 고찰

Mitochondria의 분리정제 및 확인

단계별 설탕밀도 기울기 원심분리법에 의하여 분리한 mitochondria의 정제도를 확인하기 위하여 mitochondria 분획에 대한 단백질 흡광도와 marker enzyme인 succinate dehydrogenase 및 cytochrome oxidase의 활성도를 관찰하여 그 결과를 보고하였다 (Park and Min, 1991).

Chelating agent의 투석처리에 의한 mitochondria 내의 non-heme 철 이온 제거

Mitochondria를 10 mM EDTA 및 10 mM o-Phe 용액이 포함된 10 mM Tris-HCl 완충용액(pH 7.5) 중에서 48시간 동안 투석처리 하였을 때 mitochondria 내의 철 이온을 정량한 결과는 Table 1에 나타내었다. 투석처리를 하지 않은 mitochondria의 철

Table 1. The amount of non-heme iron ion in the mitochondria before and after dialysis against chelating agents for 48 hours

Conditions	Iron ion Amounts (nmol/mg protein)
before dialysis	4.00
after dialysis against 10 mM EDTA	1.04
after dialysis against 10 mM o-Phe	1.28

이온 함량은 단백질 mg당 4.00 nmol이었으나 10 mM EDTA 및 10 mM o-Phe 용액으로 각각 투석한 mitochondria의 철 이온 함량은 각각 1.04 nmol 및 1.28 nmol로서 투석처리를 하지 않은 mitochondria에 비하여 74% 및 68%의 철 이온이 제거되었음을 확인하였다. 이는 두 금속 chelating agent가 mitochondria 내의 non-heme 철 이온을 제거시킨 것으로 생각된다.

Chelating agent의 투석처리에 의한 metal-free enzyme의 활성도 변화

Mitochondria를 10 mM EDTA 및 10 mM o-Phe 용액이 포함된 10 mM Tris-HCl 완충용액(pH 7.5) 중에서 일정시간 간격으로 투석처리한 후 활성도를 측정한 결과는 Table 2와 Fig. 1에 나타내었다. 10 mM EDTA 및 10 mM o-Phe 용액으로 투석한 me-

Table 2. The activity of the mitochondrial F₁-ATPase by dialysis against 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5) containing 10 mM EDTA or o-phe for various times

Time(hr)	EDTA		o-phe	
	SA ^a	RA ^b	SA	RA
0	28.3	100	28.3	100
12	19.8	70	20.7	73
24	14.7	52	16.1	57
48	12.5	44	14.4	51

^aSA(Specific activity): Unit × 10⁻²

^bRA(Relative activity): %

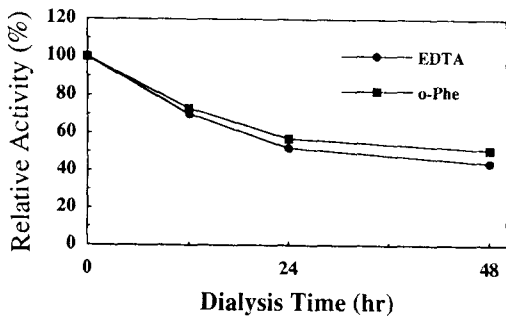


Fig. 1. The loss of the activity of mitochondrial F₁-ATPase by dialysis against 10 mM Tris-HCl buffer(pH 7.5) containing 10 mM EDTA or 10 mM o-Phe for 48 hours.

tal-free mitochondrial F₁-ATPase의 활성도는 투석의 시간 증가에 따라 활성도가 점차로 감소하였으며, 48시간 동안 투석하였을 때의 활성도는 각각 44% 및 51%로서 효소의 활성이 크게 상실됨을 알 수 있었다. 이들 결과로부터, mitochondria 내의 Fe²⁺ 및 Fe³⁺ 등의 철 이온이 EDTA 및 o-Phe의 두 금속 chelating agent에 의하여 제거됨으로 인하여 mitochondrial F₁-ATPase 활성도가 크게 상실되는 것

Table 3. Activity change of the metal-free mitochondrial F₁-ATPase by addition of each metal ions after dialysis against 10 mM Tris-HCl buffer(pH 7.5) containing 10 mM EDTA for 48 hours

Concentration (mM)	Relative Activity (%)		
	Fe ²⁺	Fe ³⁺	Mg ²⁺
Control ^a	100.0	100.0	100.0
Control ^b	44.0	44.0	44.0
0.05	47.5	63.6	55.8
0.10	48.5	72.6	66.4
0.50	54.8	80.7	70.2
1.00	44.7	64.7	58.3
5.00	44.7	55.8	58.3

^aControl: native enzyme

^bControl: metal-free enzyme

Table 4. Activity change of the metal-free mitochondrial F₁-ATPase by addition of each metal ions after dialysis against 10 mM Tris-HCl buffer(pH 7.5) containing 10 mM o-Phe for 48 hours

Concentration (mM)	Relative Activity (%)		
	Fe ²⁺	Fe ³⁺	Mg ²⁺
Control ^a	100.0	100.0	100.0
Control ^b	51.0	51.0	51.0
0.05	51.0	53.3	81.2
0.10	51.0	59.0	72.6
0.50	51.5	85.8	70.2
1.00	43.3	72.2	68.7
5.00	35.0	52.0	59.0

^aControl: native enzyme

^bControl: metal-free enzyme

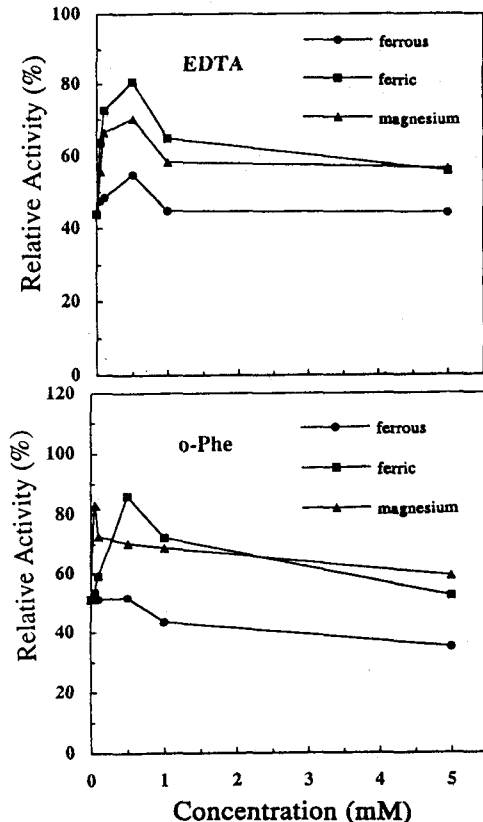


Fig. 2. Reactivation of the metal-free mitochondrial F_1 -ATPase with various concentrations of ferrous, ferric and magnesium ions after dialysis against 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5) containing 10 mM EDTA and 10 mM o-Phe for 48 hours.

-●- Fe^{2+} , -■- Fe^{3+} , -▲- Mg^{2+}

으로 사려된다.

금속이온에 의한 metal-free enzyme의 활성 회복

10 mM EDTA 및 10 mM o-Phe 용액으로 투석한 metal-free enzyme에 Fe^{2+} , Fe^{3+} 및 Mg^{2+} 을 농도 별로 가한 후 효소의 활성도 변화를 측정된 결과는 Table 3, 4와 Fig. 2에 나타내었다. Table 3과 Fig. 2에서 보는 바와 같이 EDTA의 투석에 의한 효소의 활성도는 투석처리를 하지 않은 대조구에 비하여 44%이었으나, 0.5 mM Fe^{3+} 을 가했을 때 대조구에 비하여 81%의 활성을 나타내며, 0.5 mM Mg^{2+} 을 가했을 때는 대조구에 비하여 70%의 활성을 나타낼 수 있었다. 또한, Table 4와 Fig. 2에서 10

mM o-Phe 용액으로 투석한 효소의 활성도는 대조구에 비하여 51%이었으나 0.5 mM Fe^{3+} 및 0.05 mM Mg^{2+} 에 의하여 각각 대조구에 비하여 86% 및 81%의 활성을 나타냄으로써 EDTA 투석에 의한 효소와 유사한 활성 회복을 보였다. 그러나, Fe^{2+} 는 효소의 활성을 회복시키지 못하였다. 이 결과로부터, 표고버섯의 mitochondria 내의 Fe^{3+} 와 Mg^{2+} 이 mitochondrial F_1 -ATPase을 활성화 하는데 기여하였으며, Mg^{2+} 보다는 Fe^{3+} 의 요구성이 더욱 큰 것으로 사려된다. Park 등은 표고버섯 내의 mitochondrial F_0F_1 -ATPase가 그 활성을 나타내는데는 Fe^{2+} 요구성이 큰 것으로 보고하였다(Park *et al.*, 1993). 이들 결과와 비교할 때 표고버섯의 mitochondrial ATPase complex는 mitochondria 내에 존재하는 철 이온에 의하여 그 활성이 유지되며, 철 이온은 그 산화상태에 따라 mitochondrial ATPase complex가 나타내는 두 활성에 서로 상보적으로 작용하는 것으로 추정된다.

효소의 재활성화에 미치는 활성화 이온의 연관성

Mg^{2+} 이 Fe^{2+} 또는 Fe^{3+} 과 각각 공존할 때 mitochondrial F_1 -ATPase의 활성에 미치는 두 이온의 효과를 관찰하기 위하여 metal-free enzyme에 Mg^{2+} 의 재활성화 효과 중 활성을 가장 크게 유발하는 0.5 mM Mg^{2+} 존재하에서 Fe^{2+} 또는 Fe^{3+} 을 농도 별로 가한 후 효소의 활성도 변화를 관찰한 결과는 Table 5, 6과 Fig. 3에 나타내었다. EDTA로 투석한 효소의 활성도는 0.5 mM Mg^{2+} 존재하에서 0.5 mM Fe^{3+} 에 의하여 대조구의 활성도의 95%를 재활성화시키는 반면, Fe^{2+} 는 Mg^{2+} 이 존재하지 않을 때와 같이 효소의 재활성화에 기여하지 않았다. Table 6과 Fig. 3에서 10 mM o-Phe 용액으로 투석한 효소의 활성도는 0.05 mM Mg^{2+} 공존하에서 0.5 mM Fe^{3+} 에 의하여 native enzyme 활성도의 108%를 재활성화시켰으나, Fe^{2+} 는 Mg^{2+} 이 존재하지 않을 때와 유사한 결과를 보였다. 이로써 이 효소의 활성화에 있어서 Fe^{3+} 은 Mg^{2+} 의 상승작용을 받는 것으로 보이나, Fe^{2+} 는 Mg^{2+} 과 무관함으로써 이는 mitochondrial F_1 -ATPase의 활성에 Fe^{3+} 이 우선적으로 작용하는 것으로 사려된다. 그러나, Park 등(1993)의 보고에 의하면, 표고버섯 내의 mitochondrial F_0F_1 -ATPase가 Fe^{2+} 에 의하여 활성을 나타낼 때 Mg^{2+} 는

Table 5. Activity change of the metal-free mitochondrial F₁-ATPase by addition of ferrous and ferric ion with 0.5 mM magnesium ion after dialysis against 10 mM Tris-HCl buffer(pH 7.5) containing 10 mM EDTA for 48 hours

Concentration (mM)	Relative Activity (%)	
	Fe ²⁺ + 0.50 mM Mg ²⁺	Fe ³⁺ + 0.50 mM Mg ²⁺
Control ^a	100.0	100.0
Control ^b	44.0	44.0
0.05	46.5	60.1
0.10	53.0	68.9
0.50	53.9	94.7
1.00	41.0	65.4
5.00	43.5	61.1

^aControl: native enzyme

^bControl: metal-free enzyme

Table 6. Activity change of the metal-free mitochondrial F₁-ATPase by addition of ferrous and ferric ion with 0.05 mM magnesium ion after dialysis against 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5) containing 10 mM o-Phe for 48 hours

Concentration (mM)	Relative Activity (%)	
	Fe ²⁺ + 0.05 mM Mg ²⁺	Fe ³⁺ + 0.05 mM Mg ²⁺
Control ^a	100.0	100.0
Control ^b	51.0	51.0
0.05	75.8	57.5
0.10	60.4	65.1
0.50	53.4	108.3
1.00	52.0	80.6
5.00	50.4	65.1

^aControl: native enzyme

^bControl: metal-free enzyme

별 영향을 미치지 못하였다. 이를 본 연구 결과와 비교할 때, 표고버섯의 mitochondrial ATPase complex 중 ATP의 분해활성 만이 다른 organism의 ATPase와 같이 Mg²⁺의 영향을 받는 것으로 사료 된다.

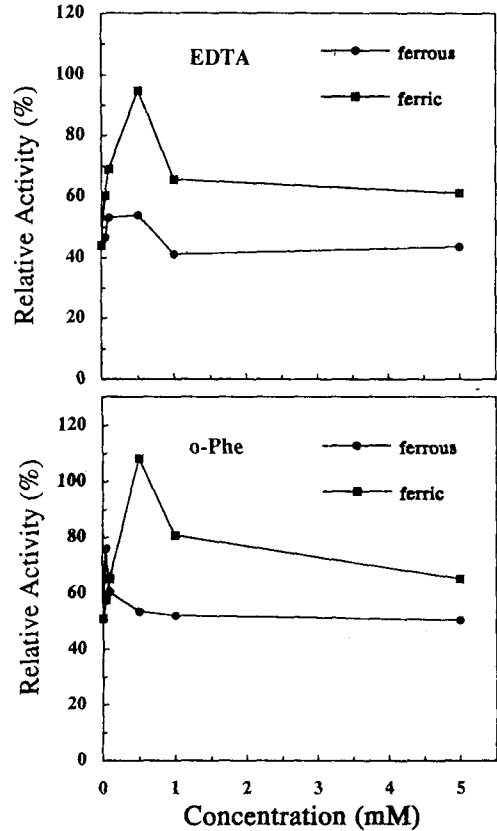


Fig. 3. Reactivation of the metal-free mitochondrial F₁-ATPase with various concentrations of ferrous and ferric ion in the presence of 0.5 mM or 0.05 mM magnesium ion after dialysis against 10 mM Tris-HCl buffer(pH 7.5) containing 10 mM EDTA and 10 mM o-Phe for 48 hours.

●- Fe²⁺, ■- Fe³⁺

Enzyme kinetics

기질의 농도 변화에 따른 효소의 활성도 변화를 측정하여 기질에 대한 Km 값을 측정한 결과는 Fig. 4에 나타내었다. 기질 ATP에 대하여 mitochondrial F₁-ATPase의 Km 값은 1.67 mM이었으며, 효소를 가장 크게 활성화시키는 0.5 mM Fe³⁺ 및 0.05 mM Mg²⁺이 존재할 때 기질에 대한 이 효소의 Km 값은 0.65 mM로서, 효소의 활성화 이온이 존재할 때 효소의 기질친화성이 증가함을 관찰할 수 있었다.

진핵세포는 mitochondria에 전자전달계를 가지며 이를 통하여 ATP를 생성하는 현상은 잘 알려진 사실이다. 전자전달계에는 non-heme 철 이온을 co-

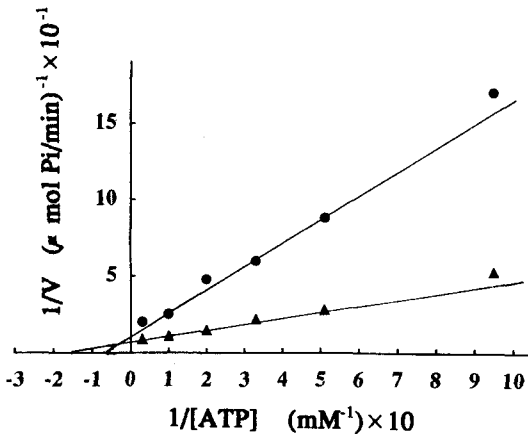


Fig. 4. Lineweaver-Burk double reciprocal plot of the mitochondrial F_1 -ATPase with(▲) and without(●) of 0.5 mM ferric ion and 0.05 mM magnesium ion.

factor로 포함하는 metalloflavoprotein들이 존재한다. Mitochondria 내에서 이들 non-heme 철 이온은 산화환원 반응에 관여하는 것으로 보고되어 있다 (Miura *et al.*, 1988). 이에 본 연구를 통하여, 담자균류에 속하는 표고버섯의 mitochondrial F_0F_1 -ATPase는 전자전달계에서 산화환원 반응에 관여하는 산화형의 철이온에 의하여 그 활성이 촉진되는 것으로 추정되며, 철 이온에 대한 metalloenzyme으로서의 가능성이 제시된다. 따라서, 향후 좀 더 많은 연구를 통하여 다른 버섯류의 mitochondrial ATPase complex도 표고버섯과 같은 성질을 갖는지를 연구하여 담자균류의 mitochondrial ATPase complex의 효소적 특성을 구명하고, 이에 대한 구체적인 mechanism을 확립해야 할 것으로 믿는다.

적 요

표고버섯의 mitochondria에 금속 chelating agent인 10 mM EDTA 및 10 mM o-Phe를 포함하는 10 mM Tris-HCl 완충용액(pH 7.5)으로 48시간 동안 각각 투석처리 하였을 때 mitochondria 내의 철 이온 함량이 투석처리를 하지 않은 대조구에 비하여 각각 74% 및 68% 감소되며, mitochondrial F_1 -ATPase의 활성도는 대조구에 비하여 각각 56% 및 49%의 활성을 상실하였다. EDTA 투석에 의하여 활성을 상

실한 metal-free mitochondrial F_1 -ATPase는 0.5 mM Fe^{3+} 과 0.5 mM Mg^{2+} 에 의하여 각각 81% 및 70%의 활성이 회복되었으며, Fe^{2+} 에 의해서는 활성이 회복되지 않았다. 또한 이 효소는 0.5 mM Fe^{3+} 와 0.05 mM Mg^{2+} 이 공존할 때 95%의 재활성화를 나타내었으며, Fe^{2+} 와 Mg^{2+} 의 공존 효과는 없었다. o-Phe으로 투석한 효소도 각 이온에 대하여 EDTA로 투석한 효소와 유사한 결과를 나타내었다. 그러므로, 표고버섯 내의 mitochondrial F_1 -ATPase는 그 활성을 나타내는 데 있어서 Fe^{3+} 및 Mg^{2+} 을 필요로 함을 알았다. 기질 ATP에 대한 효소의 K_m 값은 1.67 mM이나, 효소를 가장 크게 활성화시키는 0.5 mM Fe^{3+} 와 0.05 mM Mg^{2+} 이 존재할 때의 K_m 값은 0.65 mM로서 기질 친화성이 증가되었다.

감사의 말씀

본 연구는 1991년도 교육부 대학부설연구소 지원 연구비로 수행되었습니다.

參考文獻

- Amzel, L. M. and Pederson, P. L. 1983. Proton ATPase: Structure and function. *Ann. Rev. Biochem.* **52**: 801-824.
- Caubergs, R. J., Asard, H. H., De Greef, 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 Inluorescences. *Photochem. Photobiol.* **44**: 641-649.
- Cross, R. L. 1981. The Mechanism and Regulation of ATP synthesis by F_1 -ATPase. *Annu. Rev. Biochem.* **50**: 681-714.
- Doeg, K. A. and Ziegler, D. M. 1962. Simplified Methods for the Estimation of Iron in Mitochondria and Submitochondrial Fractions *Arch. Biochem. Biophys.* **97**: 37-40.
- Douce, R., Christensen, E. L. and Bonnen, Jr. W. D. 1972. Preparation of Intact Mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* **275**: 148-160.
- Gresser, M. J., Myer, J. A. and Boyer, P. D. 1982. Catalytic Site Cooperativity of Beef Heart Mitochondria. *J. Biol. Chem.* **257**: 12030-12038.
- Lee, K. D. and Min, T. J. 1989. Studies on the Light-

- Induced Mitochondrial ATPase in *Pleurotus ostreatus*. *Kor. J. Mycol.* **17**: 169-176.
- Lee, K. D. and Min, T. J. 1989^b. Studies on the Light-Induced Mitochondrial ATP synthase in *Pleurotus ostreatus*. *Kor. J. Mycol.* **17**: 177-183.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol Reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
- Min, T. J., Cho, S. W. and Park, S. S. 1987^a. Light-Induced Mitochondrial ATPase in *Lentinus edodes*. *Kor. J. Mycol.* **15**: 217-223.
- Min, T. J., Cho, S. W., Kim, Y. S., Kim, J. W. and Mheen, T. I. 1987^b. Effects of Organic Compounds and Metal Ion Influx of Light-Induced Mitochondrial ATPase in *Lentinus edodes*. *Kor. J. Mycol.* **15**: 224-230.
- Min, T. J., Lee, W. G. and Park, S. S. 1989^a. Light-Induced Mitochondrial ATP synthase in *Lentinus edodes*. *Kor. J. Mycol.* **17**: 91-98.
- Min, T. J., Lee, W. G. and Kim, J. W. and Mheen, T. I. 1989^b. Effects of Organic Compound and metal ion Influx of Light-Induced Mitochondrial ATP synthase in *Lentinus edodes*. *Kor. J. Mycol.* **17**: 99-104.
- Min, T. J. and Lee, K. D. 1991. Study on the Characterization of Light-Induced Mitochondrial ATP synthase in *Pleurotus ostreatus*. *Kor. J. Mycol.* **19**: 32-40.
- Min, T. J. and Park, H. L. 1991^a. Studies on the ATPase in the mushroom(I). *Kor. J. Mycol.* **19**: 214-219.
- Min, T. J. and Park, H. L. 1991^b. Studies on the ATPase in the mushroom(II). *Kor. J. Mycol.* **19**: 220-225.
- Min, T. J., Park, H. L. and Bae, K. G. 1992. Studies on the Adenosine-5'-triphosphatase(ATPase) in the mushroom(III)-Effects of organic compounds of purified ATPase in *Lentinus edodes*. *Kor. Biochem. J.* **25**: 317-324.
- Min, T. J., Lee, M. A. and Park, S. S. 1993^a. Study on the Light-Induced Mitochondrial ATPase(F_1 -ATPase) Activated by Iron ion in Mushroom. *Kor. J. Mycol.* **21**: 157-164.
- Min, T. J., Lee, M. A. and Bae, K. G. 1993^b. The Study on the Enzyme of Basidiomycetes(I)-The Effects of Iron Ions on the Light-Induced Mitochondrial F_0F_1 -ATPase of *Lentinus edodes*. *Kor. J. Mycol.* **21**: 165-171.
- Miura, R., Miyake, Y., Tojo, H. and Yamano, T. 1988. Flavins and Metal Ion-Electron Transfer. In *Metalloproteins*(Harris E. L. V. and Angal, S., Ed.) pp. 443-455.
- Nakamura, H. 1988. Magnesium. In *Metalloproteins* (Otsuka, S. and Yamanaka, T., Ed.) pp. 17-27.
- Park, S. S. and Min, T. J. 1991. Studies on the Photoreceptor of the Light-Induced Mitochondrial ATPase in *Lentinus edodes*. *Korean. Biochem. J.* **24**: 26-34.
- Park, S. S., Uhm H. R., Min, T. J. 1993. The Study on the Enzyme of Basidiomycetes(II)-The Role of Metal Ions for the Mitochondrial F_0F_1 -ATPase of *Lentinus edodes*. *Korean. Biochem. J.* **26**: 620-624.
- Racker, E. 1976. The possible organization of the polypeptides of F_0F_1 -ATPase. *Trends. Biochem. Sci.* **1**: 244-255.
- Rorive, G. and Kleinzeller, A. 1972. The effect of ATP and Ca^{2+} on the Cell Volume in Isolated Kidney Tubules. *Biochem. Biophys. Acta* **274**: 226-239.
- Rubin, M. and Tzagoloff, A. 1978. Cytochrome Oxidase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Enzymol.* **53**: 73-79.
- Singer, T. P. 1973. Determination of the Activity of Succinate, NADH, Choline and α -Glycerophosphate Dehydrogenases. *Methods Biochem. Analysis* **22**: 123-175.
- Walker, J. E., Saraste, M. and Gay, N. J. 1984. Nucleotide Sequence, Regulation and Structure of ATP synthase. *Biochim. Biophys. Acta* **768**: 164-200.
- Wang, J. H. 1983. Coupling of Proton flux to the Hydrolysis and Synthesis of ATP. *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* **12**: 21-34.
- Vallee, B. L., Rupley, J. A., Coombs, T. L. and Neurath, H. 1960. The Role of Zinc in Carboxypeptidase. *J. Biol. Chem.* **235**: 64-69.