한국농화학회지 제42권 제4호(1999)
Hanguk Nongwhahak Hoechi
(J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol.)
Vol. 42, No. 4, pp.298~303 (1999)

Hg^{2+}에 의한 토마토 뿌리조직 마이크로솜 H^+-ATPase의 가역적 저해

신대섭 · 조광현 · 김영기*

충북대학교 농과대학 농화학과

초 록 : 토마토 뿌리조직의 마이크로솜 ATPase 활성에 대한 중금속의 효과를 조사하기 위하여 뿌리조직으로부터 마이크로솜을 분리하였고, enzyme-coupled assay를 이용하여 마이크로솜 이온펌프(ATPase)의 활성을 측정하였다. 여러 가지 중금속 이온들 중 Hg^{2+}은 마이크로솜 ATPase 활성을 농도 의존적으로 저해하였으며, Gd^{3+}과 Fe^{3+}, La^{3+}, Zn^{2+}, Pb^{2+} 등은 마이크로솜 ATPase의 활성을 저해하면서 동시에 assay에 사용된 효소를 저해하였다. 그러나, Cs^+과 Ba^{2+}은 마이크로솜 ATPase 활성에 영향을 미치지 않았다. Hg^{2+}은 원형질막과 액포막에 위치하는 H^+-ATPase들의 활성을 10 μM 이상의 농도에서 현저히 저해하였고, 1 mM 이상의 농도에서 완전히 저해하였으며, 두 효소들에 대한 활성저해의 Ki 값은 각각 80 μM, 58 μM로 나타났다. Hg^{2+}에 의해 저해된 ATPase의 활성은 DTT의 농도를 증가시킴에 따라 회복되어, Hg^{2+}에 의한 ATPase 활성저해는 가역적임을 확인하였다. 이러한 결과들은 Hg^{2+}이 원형질막과 액포막에 위치한 H^+-ATPase들을 비선택적이고 가역적으로 저해함을 보여준다. (1999년 9월 29일 접수, 1999년 10월 26일 수리)

서 론

중금속은 산업화가 진행됨에 따라 여러 가지 오염경로[1,2]를 통하여 농경지로 유입된다.[3] 토양에 오염된 중금속은 식물의 뿌리로 흡수되거나, 뿌리주변의 토양에 흡착되어 뿌리 조직에 의한 다른 양분의 흡수를 방해한다.[4] 식물의 뿌리를 통해 흡수된 중금속은 효소의 활성을 저해하거나, 생체막의 유동성을 변화시켜 세포의 생리활성을 억제함으로써 뿌리조직의 생육을 저해시킨다. 중금속이 뿌리를 통해 조직내로 흡수되면 세포질 또는 생체막에 위치한 효소단백질의 -SH기에 결합하여 효소의 활성을 변화시킬 수 있음이 보고[5]되어, 식물체에서 중금속의 영향을 일차적으로 받는 부분은 뿌리조직으로 예상된다.[6]

국내의 토양 및 작물에 함유된 중금속 농도는 전반적으로 높은 수준에 이르지는 않았으나, 조사 지역 및 시기에 따라 중금속의 함량이 다양하게 나타난다고 알려져 있다.[7] Kim 등[8]은 밭토양 및 밭작물에서 여러 가지 중금속의 함유량을 조사하였으며, Hg^{2+}의 경우는 각각 0.089 ppm과 0.044~0.053 ppm으로 보고하였다. 또한 Kang 등[9]은 경북지역 논토양의 평균 중금속 함량이 Cu^{2+}은 9.660, Zn^{2+}은 16.146, Pb^{2+}은 16.869, Cd^{2+}은 0.447, As^{3+}는 0.25, Hg^{2+}은 0.214 ppm으로 보고하였으며, Lee 등[3]은 여러 가지 경로를 통해 토양에 오염된 중금속이 식물체에 흡수될 가능성이 크다고 보고하였다. 식물에 의한 중금속의 흡수는 그 흡수축적량이 여러 가지 원인에 의하여 변화될 수 있어, 토양중 중금속의 농도가 낮은 경우에도 식물체의 생육에 미치는 피해는 클 수 있다.[10] 식물세포에서 중금속은 생육지연,[4] 생체막의 유동성 변화,[5] phospholipase-C 활성저해로 세포내 신호전달 경로의 저해,[11] 그리고 원형질막 H^+-ATPase의 활성을 저해한다고 알려져 있다.[5]

특히 중금속은 세포의 분화, 양분의 흡수 및 저장, 팽압의 조절, 세포내 pH 조절, 기공의 개폐 등 다양한 생리작용을 조절하는 여러 가지 이온펌프 및 이온채널의 활성에 영향을 주는 것으로 보고되고 있으나, 식물세포에서 H^+-ATPase를 포함한 이온펌프의 활성에 대한 중금속의 작용기작은 아직까지 자세히 밝혀져 있지 않다. 따라서 본 연구에서는 토마토의 뿌리조직에서 이온이동과 관련된 마이크로솜 ATPase에 대한 중금속의 영향을 측정하기 위하여 원형질막, 액포막, ER 등에서 유래된 마이크로솜을 분리하였으며, Hg^{2+}이 마이크로솜 H^+-ATPase 활성에 미치는 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

재료

토마토 종자는 흥농종묘의 서광토마토(*Lycopersicon esculentum* L. ; Pink Forcer)를 사용하였다. 종자는 증류수로 적신 발아용 스폰지에서 빛을 주지 않은 상태로 25°C를 유지하여 약 3일간 발아시켰으며, 발아 후 Cho 등[12]의 방법에 따라 양액이 담긴 플라스틱 용기에 이식하였다. 이식된 토마토는 생장조절기 내부의 온도를 28~32°C로 유지하며 약 4주간 재배한 후, 뿌리조직을 채취하여 본 실험의 재료로 사용하였다.

양액의 제조에는 모두 1급 이상의 국산 및 일본산 시약을 사용하였고, 완충액용 자당은 Fluka Biochemical(Switzerland)의 제품을 사용하였으며, pyruvate kinase(PK)를 포함한 효소 및 생리활성 측정에 사용한 시약은 모두 Sigma Chemical Co.(St. Louis, USA)에서 구입하였다.

찾는말 : 중금속, 수은, vanadate, nitrate, H^+-ATPase, 토마토뿌리
약어 : PK, pyruvate kinase; LDH, lactate dehydrogenase; DTT, 1,4-dithiothreitol; GSH, reduced glutathione; HEPES, N-(2-hydroxyethyl)piperazine-N'-(2-ethanesulfonic acid); NADH, nicotinamide adenine dinucleotide
*연락저자

토마토 뿌리조직에서의 마이크로솜 분리

Cho 등[12]의 방법에 따라 초고속 원심분리법을 이용하여 토마토의 뿌리조직으로부터 마이크로솜을 분리하였다. 마이크로솜 분획은 액체질소를 사용하여 순간냉동시켜 초저온 냉동고(-70°C)에 보관하면서, 3개월 이내에 사용하였다. 모든 과정은 4°C에서 수행하였으며, 마이크로솜 분획의 단백질 농도는 Lowry 방법[13]으로 결정하였다.

마이크로솜 ATPase 활성측정

뿌리조직으로부터 분리한 마이크로솜 ATPase의 평균활성은 Niggli 등[14]의 enzyme-coupled assay 법을 변형한 Cho 등[12]의 방법으로 측정하였다. 즉, 이 방법에서는 마이크로솜 ATPase의 활성을 혐기적 해당과정의 일부와 연계하여 NADH의 산화정도를 측정하여 평가한다. NADH는 340 nm에서 최대 흡광도를 보이나, 산화된 NAD^+는 340 nm에서 광을 흡수하지 않으므로, ATPase 활성은 340 nm에서의 흡광도 감소로 나타나며, 이때 시간에 따른 평균 흡광도 감소율을 이용하여 활성을 측정하였다. 흡광도 감소는 spectrophotometer(Hitachi U-2000, Japan)를 이용하여 측정하였으며, assay buffer(120 mM KCl, 50 μM $CaCl_2$, 1 mM $MgCl_2$, 0.4 mM NADH, 2 mM phosphoenol-pyruvate, 10 mM KCN, 30 mM HEPES, pH 7.4) 500 μl에 약 25 μg의 단백질을 포함하는 양의 마이크로솜을 가한 후, PK(1 IU)와 LDH(1 IU)를 혼합하고, 0.5 mM ATP를 가하여 효소반응을 관측하였다. ATPase 활성측정시에 나타나는 오염된 미토콘드리아의 ATPase 활성은 assay buffer에 KCN을 10 mM 농도로 첨가하여 저해하였다.

결과 및 고찰

중금속에 의한 마이크로솜 ATPase 활성변화

마이크로솜 ATPase의 활성에 미치는 중금속의 영향을 측정하기 위하여 토마토의 뿌리조직에서 원형질막, 액포막 및 ER 유래의 마이크로솜을 분리하였으며, 100 μM과 1 mM의 농도로 여러 가지 중금속을 반응용액에 첨가한 후 마이크로솜 ATPase의 활성변화를 측정하였다. 각 중금속들의 농도를 100 μM로 처리하였을 때, Hg^{2+}과 Gd^{3+}, Fe^{3+}, La^{3+}, Zn^{2+}, Pb^{2+}들은 마이크로솜 ATPase의 활성을 저해한 반면, Cu^{2+}와 Cs^+, Ba^{2+}, Cd^{2+}, Ni^{2+} 등의 중금속들은 대조활성에 대하여 저해 효과가 약하거나 보이지 않았다. 각 이온들의 농도를 1 mM로 증가시켰을 때, Hg^{2+}과 Gd^{3+}, Fe^{3+}, La^{3+}, Zn^{2+} 등은 마이크로솜 ATPase의 활성을 거의 완전히 저해하였으며, Cd^{2+}도 상당한 저해 효과를 나타냈다. 그러나 Cu^{2+}와 Cs^+, Ba^{2+}, Ni^{2+} 등의 이온들은 저해효과를 크게 보이지 않았다(Fig. 1A).

중금속은 효소의 여러 가지 작용기들, 즉 -OH, -SH, $-NH_2$ 그리고 -COOH 등과 작용하여 효소-중금속 복합체를 형성함으로써 효소의 활성에 변화를 유발할 수 있다고 알려져 있다.[15] 위에서 큰 저해효과를 보인 Hg^{2+}과 Gd^{3+}, Fe^{3+}, La^{3+}, Zn^{2+} 등의 중금속들은 마이크로솜 ATPase의 활성을 직접적으로 저해하거나, 혹은 마이크로솜 ATPase의 활성을 측정하는 방법으로 사용되는 enzyme-coupled assay의 효소들을 저해함으로써 마이크로솜 ATPase의 활성 저해여부와 관계없이 ATPase 활성 측정치를 감소시킬 수 있다. 따라서 이들 중금속이 활성측정시 쓰인 PK와 lactate dehydrogenase(LDH)를 저해하였는지 여부를 확인하였다. 이를 위하여, 반응용액에 마이크로솜과 ATP를 첨가하지 않고, 대신 ADP와 무기인산을 각각 0.5 mM 첨가한 후, NADH의 산화속도를 측정하여 중금속에 의한 PK와 LDH의 활성변화 여부를 관측하였다(Fig. 1B). 반응용액에 Gd^{3+}과 Fe^{3+}, La^{3+}, Zn^{2+}를 각각 100 μM에서 1 mM로 증가시킴에 따라 효소(PK와 LDH)의 활성이 감소하였으며, 1 mM 수준에서는 효소활성은 거의 완전히 저해된 반면, Hg^{2+}은 농도에 관계없이 두 효소의 활성에는 영향을 미치지 않았다. 따라서 Hg^{2+}만이 위의 중금속들 가운데 assay 방법을 저해시키지 않으며, 마이크로솜 ATPase의 활성을 현저히 감소시키는 저해제로 확인되었다.

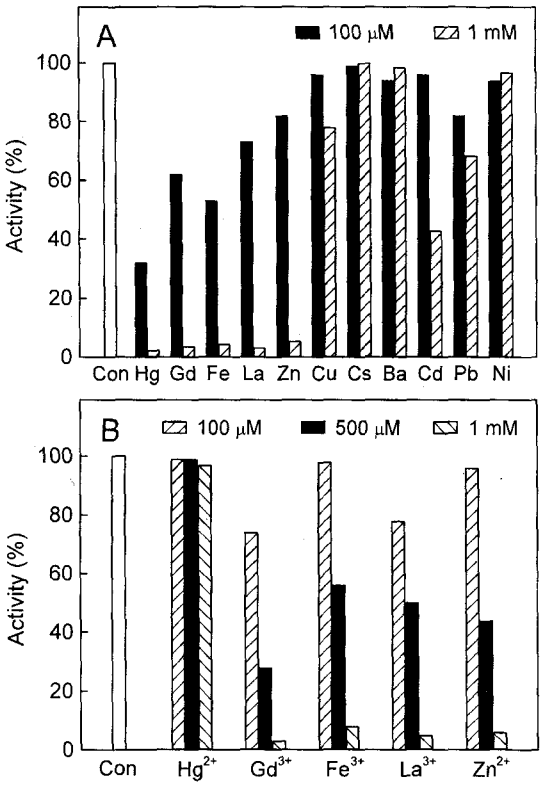

Fig. 1. Effects of metal ions on the microsomal ATPase activity. (A) The effects of various metal ions were measured on the microsomal ATPase activity. The concentrations of metal ions were 100 μM (■) and 1 mM (▨). All metal ions were chloride salts. (B) Inhibition of the enzyme-coupled assay by metal ions. Activity was measured in an assay medium containing 0.5 mM ADP and 0.5 mM K_2HPO_4 without microsomes. Thus, the activities represent those of pyruvate kinase and lactate dehydrogenase used for an enzyme-coupled assay. The concentrations of metal ions were 100 μM (▨), 500 μM (■), and 1 mM (▧). The control activity was measured in the absence of metal ion (□).

마이크로솜 ATPase 활성에 대한 Hg^{2+}의 효과

원형질막과 액포막 H^+-ATPase의 선택적 저해제인 vanadate와 NO_3를 각각 처리하면서 Hg^{2+}의 마이크로솜 ATPase 활성저해 효과를 정량적으로 평가하였다. 토마토 뿌리조직에서 분리한 마

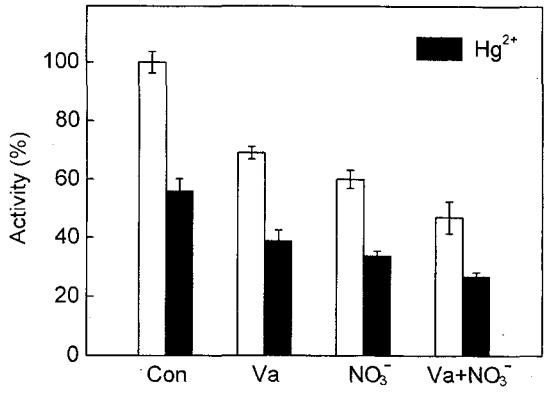

Fig. 2. Effect of Hg^{2+} on the microsomal ATPase activity in the presence of vanadate and nitrate. The activity was measured in the absence (□) or in the presence (■) of 50 μM Hg^{2+} under the indicated conditions, the presence of vanadate (Va), NO_3^-, and both (Va+NO_3^-). The concentrations of vanadate and NO_3^- were 1 mM and 50 mM, respectively. Values are means±SD(n = 9).

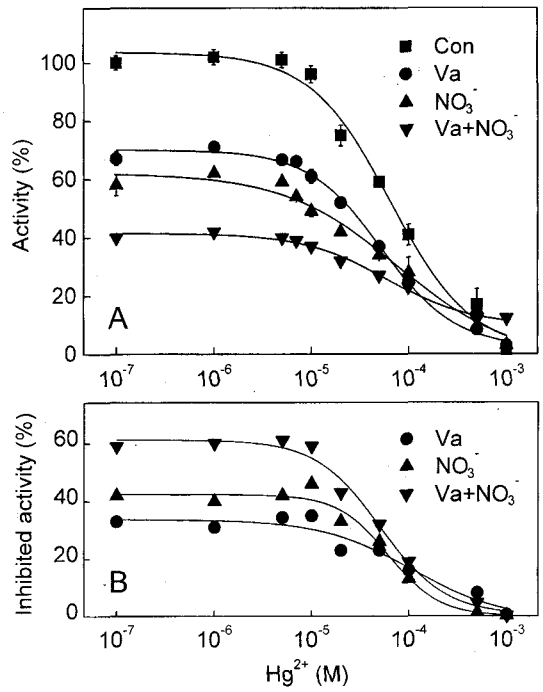

Fig. 3. Dose response to Hg^{2+} of vanadate- and nitrate-sensitive H^+-ATPases. (A) Dose response of H^+-ATPases to Hg^{2+} in the presence of vanadate and NO_3^-. The activity was measured in the absence (■) of any inhibitors or in the presence of vanadate (Va, ●), NO_3^- (▲), and both (Va+NO_3^-, ▼) under the various concentrations of Hg^{2+}. The concentrations of vanadate and NO_3^- were 1 mM and 50 mM, respectively. The data were fitted to a sigmoidal function, represented by the solid line. Values are means±SD(n = 5). (B) The inhibited activities by vanadate (●), NO_3^- (▲), and both (▼) at the various concentrations of Hg^{2+} were calculated by subtracting the activity obtained in the presence of inhibitor from the corresponding control activity shown in Fig. 3A.

이크로솜 ATPase의 총활성은 839±30 nmol/min/mg protein이었으며, 총활성을 구성하는 주된 성분인 원형질막의 H^+-ATPase와 액포막의 H^+-ATPase 활성은 각각의 선택적 저해제인 1 mM vanadate[16]와 50 mM NO_3^-의[17] 처리에 의하여 저해되는 활성으로 측정하였다. 이러한 정량적 평가에서 원형질막의 H^+-ATPase 활성은 전체 활성의 약 30%, 액포막의 H^+-ATPase 활성은 약 38%로 나타났다.[12] 한편, 대조실험에 50 μM Hg^{2+}을 첨가하면 활성은 약 40% 감소하였다(Fig. 2, Con). Hg^{2+}에 의한 원형질막과 액포막의 H^+-ATPase 활성저해 여부를 확인하기 위하여 vanadate와 NO_3^-를 처리한 후, 50 μM Hg^{2+}을 처리하였을 때, 활성은 각각 30%와 26%가 추가로 감소하였다(Fig. 2). 위의 결과는 Hg^{2+}이 주로 H^+-ATPase의 활성을 저해하며, 원형질막과 액포막의 H^+-ATPase를 모두 저해함을 시사한다.

Hg^{2+}에 의한 원형질막과 액포막의 H^+-ATPase 저해특성을 조사하기 위하여 Hg^{2+}의 농도증가에 따른 NO_3^-와 vanadate의 추가적인 저해여부를 관측하였다. 먼저 Hg^{2+}의 농도를 100 nM에서 1 mM로 단계적으로 증가시킴에 따라 마이크로솜 ATPase의 활성은 10 μM 이상의 농도에서 농도의존적으로 급격히 저해되었다(Fig. 3A, Con). Hg^{2+}의 각 농도에 1 mM vanadate와 50 mM NO_3^-를 각각 첨가하였을 때, vanadate와 NO_3^-에 의하여 저해되는 H^+-ATPase들의 활성은 Hg^{2+}의 농도를 증가시킴에 따라 점차 감소하였다(Fig. 3B). Hg^{2+}을 10 μM 이하로 첨가하였을 때 vanadate와 NO_3^-에 의한 추가저해가 각각 30, 40%로 나타나지만, 20 μM 이상으로 증가시킴에 따라 vanadate와 NO_3^-에 의한 추가적인 저해는 점차 감소하여 1 mM 이상에서는 더 이상 vanadate와 NO_3^-에 의한 추가저해가 나타나지 않았다. 위의 결과로부터 원형질막 및 액포막에 위치한 H^+-ATPase들을 저해하는 Hg^{2+}의 Ki 값은 각각 80 μM, 58 μM이었다. 이것은 옥수수 뿌리조직 액포막 H^+-ATPase의 활성과 H^+-pumping 활성을 50% 저해하는 Hg^{2+}의 농도가 각각 100 μM, 60 μM이었다는 보고[18]와도 유사한 결과이다.

원형질막 및 액포막의 H^+-ATPase들을 각각 저해하는 vanadate와 NO_3^-의 효과가 Hg^{2+}에 의해 감소한다는 사실은 Hg^{2+}이 이들 두 효소들중 어느 한가지만 저해하는 것이 아니라 두 효소 모두를 비선택적으로 저해함을 보여준다. 한편, 1 mM 이상의 Hg^{2+}은 위의 두 가지 H^+-ATPase 활성뿐 만 아니라, 특성이 밝혀지지 않은 잔류활성마저도 저해하였다. 이상의 결과는 Passow 등[15]이 보고한 바와 같이 중금속의 농도가 10^{-6} M 이하로 낮을 때, 중금속이 효소의 특이적 또는 민감성 부위에 결합하는 반면, 높은 농도에서는 비선택적으로 효소에 결합하여 활성의 변화를 유발한다는 보고와 같은 결과로 생각된다.

Hg^{2+}에 의한 H^+-ATPase 활성저해

Hg^{2+}이 뿌리조직 H^+-ATPase 활성을 저해시킨다는 사실은 vanadate와 NO_3^-의 농도를 조절하면서 Hg^{2+}에 의한 추가적인 저해효과를 평가함으로서도 확인하였다. 먼저 vanadate의 농도를 100 nM에서 2 mM까지 단계적으로 증가시켰을 때, 100 μM 이상의 농도에서 총활성은 급격히 감소하는 경향을 보였다(Fig. 4A, ■). 위의 각 vanadate 농도에 Hg^{2+}을 첨가하였을 때, Hg^{2+}에 의한 추가적인 저해효과는 vanadate의 농도 100 μM 이하에서 현저히 나타난 반면, 그 이상의 농도에서는 점차 감소하는 경향을 보였다(Fig. 4A, ●). 마찬가지로 NO_3^-의 농도를 100 μM에서 100 mM까지 단계적으로 증가시켰을 때, 10 mM 이상의 농도에서 ATPase 활성은 농도의존적으로 감소하였다(Fig.

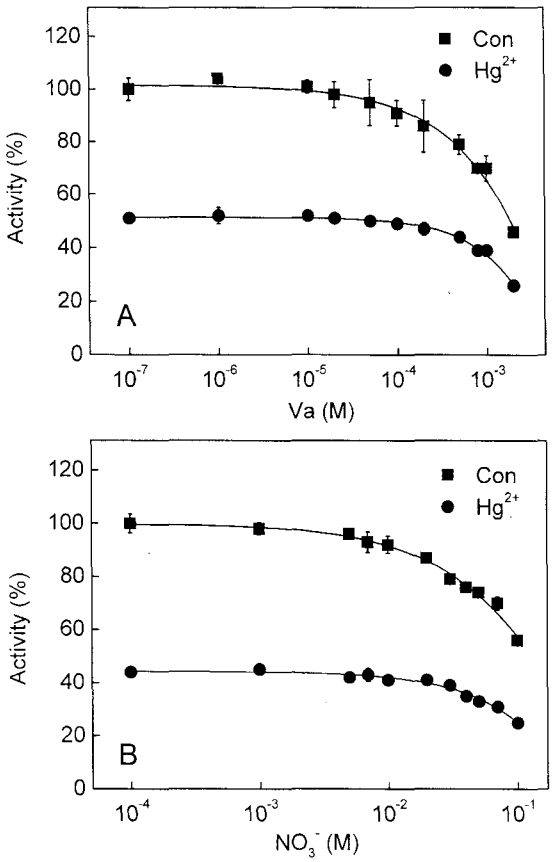

Fig. 4. Vanadate- and nitrate-dependences of Hg^{2+}-sensitive ATPase activity. (A) Dose response of H^+-ATPase to vanadate in the presence of 50 μM Hg^{2+}. The activity was measured in the absence (■) or in the presence (●) of 50 μM Hg^{2+} under various concentrations of vanadate (Va). The data were fitted to a sigmoidal function, represented by the solid line. Values are means±SD(n = 5). (B) Dose response of H^+-ATPases to NO_3^- in the presence of 50 μM Hg^{2+}. The activity was measured in the absence (■) or in the presence (●) of 50 μM Hg^{2+} under various concentrations of NO_3^-. Values are means±SD(n = 5).

4B, ■). 위의 각 NO_3^- 농도에 Hg^{2+}을 첨가하면, NO_3^-의 농도가 증가함에 따라 Hg^{2+}에 의한 추가저해는 점차 감소하였다 (Fig. 4B, ●). 이상의 결과들은 Hg^{2+}이 vanadate에 의하여 저해되는 원형질막 H^+-ATPase 활성과 NO_3^-에 의하여 저해되는 액포막 H^+-ATPase 활성을 모두 저해함을 보여준다.

마이크로솜 막에 위치한 이온펌프는 활성증가에 따라 막을 경계로 한 이온의 농도기울기를 증가시키며, 농도기울기가 증가함에 따라 이온펌프의 활성은 점차 감소한다. 이때 막에 위치한 이온채널의 활성에 따른 이온의 확산이 일어나면 농도기울기가 감소되고, 이온펌프의 활성은 다시 증가한다. 이러한 현상은 이온펌프와 이온채널 사이의 coupling 효과로서 알려져 있다.[19] Hg^{2+}을 포함한 중금속들은 이온펌프 뿐만 아니라 이온채널의 활성도 저해할 수 있는 것으로 알려져 있다. 따라서, 본 연구에서 나타난 Hg^{2+}의 ATPase 활성저해가 직접적인 ATPase의 활성저해에 의한 것인지 혹은, 뿌리 세포막에 존재할 수 있는 채널단백질들의 활성저해에 의하여 발생하는 간접적인 효과인지를 확인하기 위하여 비이온성 계면 활성제인 Triton X-100를 사용하여 leaky 마이크로솜을 만들고 Hg^{2+}의 저해효과를 확인하였다. 계면활성제를 처리한 leaky 마이크로솜에서도 Hg^{2+}에 의한 ATPase 활성저해 효과는 여전히 유사하게 나타나, Hg^{2+}에 의한 ATPase 활성저해 효과는 이온채널의 저해에 따른 간접적인 것이 아니라, Hg^{2+}이 ATPase를 직접적으로 저해함을 확인하였다(미제시 자료).

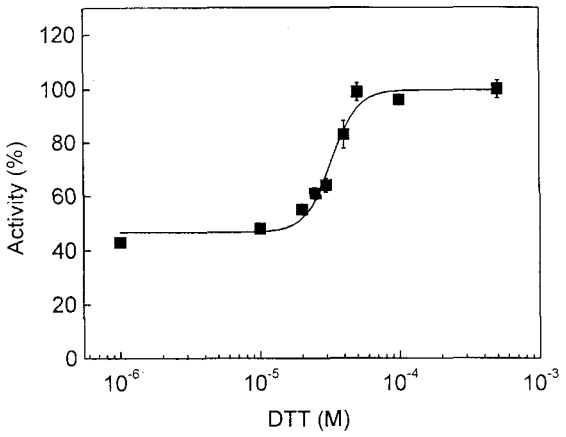

Fig. 5. Effect of DTT on the Hg^{2+}-induced inhibition. The activity of microsomal ATPase was measured in the presence of 50 μM Hg^{2+} and at various concentrations of DTT. Values are means±SD(n = 3).

Hg^{2+}에 의한 마이크로솜 H^+-ATPase 활성의 가역적 저해

Hg^{2+}은 단백질을 구성하는 cysteine 잔기의 -SH기에 결합하며, 이때 -SH기가 효소의 주요 활성부위일 경우, Hg^{2+}의 결합에 의하여 효소의 활성은 저해되는 것으로 알려져 있다.[20] Hg^{2+}에 의한 ATPase 활성 저해효과가 -SH기에 결합에 의한 것인지를 확인하기 위하여, -SH기를 두 개 함유하고있는 dithiothreitol(DTT)을 Hg^{2+}과 동시에 처리함으로써, Hg^{2+}의 마이크로솜 ATPase 활성 저해효과에 대한 DTT의 영향을 조사하였다. 먼저, 50 μM Hg^{2+}을 포함하는 반응용액에 DTT를 동시에 처리하면서 DTT의 농도를 1 μM에서 1 mM까지 증가시켰을 때, Hg^{2+}에 의한 ATPase 활성 저해효과는 DTT의 농도 증가에 따라 점차 감소함을 확인하였다(Fig. 5). DTT를 30~40 μM 처리하였을 때, Hg^{2+}의 저해효과는 약 50% 감소하였으며, DTT의 농도를 50 μM 이상으로 증가시키면 저해효과는 완전히 제

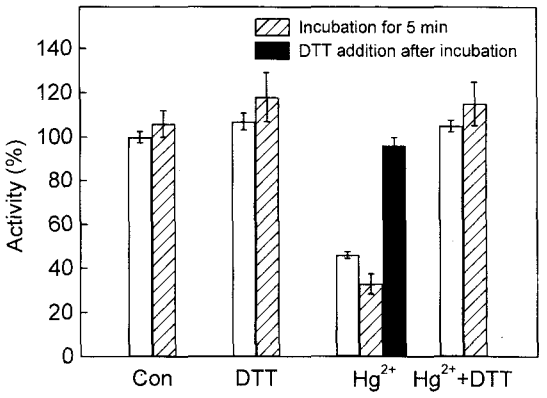

Fig. 6. Recovery of Hg^{2+}-induced inhibition by DTT. ATPase activity was measured with (▨) or without (□) incubation for 5 min under the indicated condition. The concentrations of DTT and Hg^{2+} were 100 μM and 50 μM, respectively. Values are means±SD(n = 5).

거되었다. 한편, -SH기를 갖은 또 다른 화합물인 β-mercaptoethanol 역시 Hg^{2+}에 의한 ATPase 활성저해 효과를 감소시켰다(미제시 자료). 이러한 결과는 Hg^{2+}에 의한 ATPase 활성저해가 효소의 -SH기에 Hg^{2+}이 결합하여 이루어짐을 보인다.

DTT와 GSH,[21] cysteine,[22] β-mercaptoethanol[23] 등은 -SH기를 갖고있어 중금속과 단백질간의 결합에 따른 중금속-단백질 복합체 형성을 억제하며, 또한 중금속과 결합한 효소의 활성을 가역적으로 회복시켜 중금속으로부터 효소를 보호할 수 있다고 알려져 있다.[22] DTT에 의한 가역적 활성회복 여부를 확인하기 위해서 Hg^{2+}의 사전 처리로 마이크로솜 ATPase의 활성을 저해한 후, 추가적으로 DTT를 처리하였을 때, 점차적인 활성의 회복이 확인되었다(Fig. 6). 마이크로솜의 ATPase를 Hg^{2+}으로 저해한 후, 5분간 배양하고 DTT를 첨가하면, ATPase의 활성은 Hg^{2+}을 첨가하지 않은 대조실험의 수준으로 거의 회복되었다(Fig. 6, Hg^{2+}). 한편 대조실험에서 DTT의 처리에 의한 활성의 증가는 20% 이내로 관측되어, DTT에 의한 완전한 활성회복 효과가 단순히 효소 내부에 내재하는 disulfide 결합의 환원에 의하지 않음을 확인하였다(Fig. 6, DTT). 이러한 결과는 Hg^{2+}에 의한 ATPase 활성저해가 가역적임을 보여주는 것으로 ATPase에 결합한 Hg^{2+}을 DTT가 제거시킬 수 있음을 의미한다.

감사의 글

본 논문은 한국과학재단지정 충북대학교 첨단원예기술개발연구센터의 지원에 의한 것입니다.

참고문헌

1. Lee, J. H., Han, K. W. and Cho, J. Y. (1997) Content of heavy metals in paddy soils and brown rice Kunsan industrial complex area. *Agric. Chem. Biotechnol.* **40**, 342-346.
2. Kim, S. J., Back, S. H., Kim, J. Y. and Yoo, H. C. (1990) Effect of municipal sludge on contents of cadmium and zinc in crop plants. *Kor. J. Environ. Agric.* **9**, 121-131.
3. Lee, J. P., Park, N. K., Park, S. D., Choi, B. S. and Kim, B. J. (1996) Effects of heavy metal contents in soils near old zinc-mining sides on the growth of and their uptake by soybean. *Kor. J. Environ. Agric.* **15**, 275-281.
4. Trivedi, S. and Erdei, L. (1992) Effects of cadmium and lead on the accumulation of Ca^{2+} and K^+ and on the influx and translocation of K^+ in wheat of low and high K^+ status. *Physiol. Plant.* **84**, 94-100.
5. Fodor, E., Szabó-Nagy, A. and Erdei, L. (1995) The effects of cadmium on the fluidity and H^+-ATPase activity of plasma membrane from sunflower and wheat roots. *J. Plant Physiol.* **147**, 87-92.
6. Steffens, J. C. (1990) The heavy metal-binding peptides of plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **41**, 553-575.
7. Jung, K. B., Kim, K. S. and Kim, W. I. (1999) Studies of agricultural and environmental changes. NIAST report, No. 1999-52. RDA, Suwon, Korea.
8. Kim, B. Y. and So, K. H. (1989) Investigation of heavy metal contamination on agricultural products. NIAST report, No. 1989-48. RDA, Suwon, Korea.
9. Kang, J. H. and Kim, D. -H. (1992) Heavy metals in the paddy soils by the sources of pollution of Kyungpook province of Korea. *J. Environ. Sci.* **6**, 1-14.
10. Holmgren, G. G. S., Meyer, M. W., Haney, R. L. and Daniels, R. B. (1993) Cadmium, lead, zinc, copper, and nickel in agricultural soils of the United States of America. *J. Environ. Qual.* **22**, 335-348.
11. Jones, D. L. and Kochian, L. (1995) Aluminum inhibition of the inositol 1,4,5-trisphosphate signal transduction pathway in wheat roots: a role in aluminum toxicity? *Plant Cell* **7**, 1913-1922.
12. Cho, K. H., Sakong, J. and Kim, Y. K. (1998) Characterization of microsomal ATPases prepared from tomato roots. *Agric. Chem. Biotechnol.* **41**, 130-136.
13. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
14. Niggli, V., Penniston, J. T. and Carafoli, E. (1979) Purification of the (Ca^{2+}-Mg^{2+})-ATPase from human erythrocyte membranes using a calmodulin affinity column. *J. Biol. Chem.* **254**, 9955-9958.
15. Passow, H., Rothstein, A. and Clarkson, T. W. (1961) The general pharmacology of the heavy metals. *Pharmacol. Rev.* **13**, 185-224.
16. Palmgren, M. G., Askerlund, P., Fredrikson, K., Widell, S., Sommarin, M. and Larsson, C. (1990) Sealed inside-out and right-side-out plasma membrane vesicles. *Plant Physiol.* **92**, 871-880.
17. Bennett, A. B., O'Neill, S. D. and Spanswick, R. M. (1984) H^+-ATPase activity from storage tissue of *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.* **74**, 538-544.
18. Tu, S. I., Brouillette, J. N., Nagahashi, G., Brauer, D. and Nungesser, E. (1988) Temperature dependence and mercury inhibition of tonoplast-type H^+-ATPases. *Arch. Biochem. Biophys.* **266**, 289-297.
19. Cho, K. H. (1997) Characterization of microsomal ATPases prepared from soybean roots and tomato roots. M. S. Thesis. Chungbuk National University.
20. Clarkson, T. W. (1972) The pharmacology of mercury compounds. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **12**, 375-406.
21. Freitas, A. J., Rocha, J. B. T., Wolosker, H. and Souza, D. O. G. (1996) Effects of the Hg^{2+} and CH_3Hg^+ on Ca^{2+} fluxes in rat brain microsomes. *Brain Res.* **738**, 257-264.
22. Vassallo, D. V., Moreira, C. M., Oliveira, E. M., Bertollo, D. M. and Veloso, T. C. (1999) Effects of mercury on the isolated heart muscle are prevented by DTT and cysteine. *Toxicol. Applied Pharmacol.* **156**, 113-118.
23. Monk, B. C., Mason, A. B., Abramochkim, G., Haber, J. E., Seto-Young, D. and Perlin, D. S. (1995) The yeast plasma membrane proton pumping ATPase is a viable antifungal target. I. effects of the cysteine-modifying reagent omeprazole. *Biochim. Biophys. Acta* **1239**, 81-90.

Hg^{2+}-induced Reversible Inhibitions of Microsomal H^+-ATPases Prepared from Tomato Roots

Dae-Seop Shin, Kwang-Hyun Cho and Young-Kee Kim*(*Department of Agricultural Chemistry, Chungbuk National University, Cheongju, Chungbuk, 361-763, Korea*)

Abstract : In order to characterize the effects of heavy metal ions on the microsomal ATPase activities, microsomes were prepared from the roots of tomato plant and the activity of microsomal ATPase was measured by an enzyme-coupled assay. Hg^{2+} inhibited the activity of microsomal ATPase in a dose-dependent manner, while Gd^{3+}, Fe^{3+}, La^{3+}, Zn^{2+}, and Pb^{2+} inhibited not only the ATPase activity but also the activities of enzymes used in the assay. However, Cs^+ and Ba^{2+} showed no significant effect. Hg^{2+} inhibited the activities of both plasma membrane and vacuolar membrane H^+-ATPases. In the dose-response to Hg^{2+}, the activities of both microsomal H^+-ATPases were severely inhibited at the concentration of Hg^{2+} above 10 μM and were completely inhibited at 1 mM Hg^{2+}. Apparent Ki values of Hg^{2+} on the inhibitions of plasma membrane and vacuolar membrane H^+-ATPases were 80 μM and 58 μM, respectively. The Hg^{2+}-induced inhibitions were reversible since the addition of dithiothreitol completely reversed the inhibitory effects of Hg^{2+}. These results suggest that the inhibitory effects of Hg^{2+} on both plasma membrane and vacuolar membrane H^+-ATPases are nonselective and reversible.

Key words : heavy metals, mercury, vanadate, nitrate, H^+-ATPase, tomato roots

*Corresponding author