

미토콘드리아膜의 溶質透過성에 미치는 陽이온의 영향

李 永 祿 · 李 鍾 三

(高大 理工大 生物學科)

Effect of Cation on solute Permeability of Mitochondrial Membrane

LEE, Yung-Nok and Chong-Sam LEE

(Dept. of Biology, College of Science and Technology, Korea University)

ABSTRACT

Mitochondria were isolated from *Chlorella* cells and effects of cation on solute permeability of mitochondrial membrane were investigated using P^{32} as a tracer.

It was strikingly increased uptake of phosphate for NaCl, KCl, while evidently decreased phosphate uptake of mitochondrial membrane for $MgCl_2$, $CaCl_2$.

This consider that uptake of monovalent cation were increased, but uptake of divalent-cation were decreased for permeability of mitochondrial membrane as if the permeability of protoplasmic membrane.

緒 論

原形質膜의 微細構造(Danielli & Davson, 1943 Solomon, 1960)나 溶質透過성에 關해서는 종래 매거키 어려울 정도의 많은 研究가 있었고 原形質膜의 溶質透過성에 미치는 염류의 길항작용(Osterhout, 1922)도 널리 알려져 있는 사실이다. 세포기관을 構成하고 있는 모든 生體膜의 微細構造가 原形質膜의 그것과 비슷하다고는 하나(Robertson, 1960), 세포의 機能은 이를 構成하고 있는 細胞기관에 분담되어 있고 모든 生體膜의 化學的 조성은 서로 다를 것이기 때문에 細胞기관의 溶質透過성에도 세포기관에 따라 特異한 點이 있을지도 모른다.

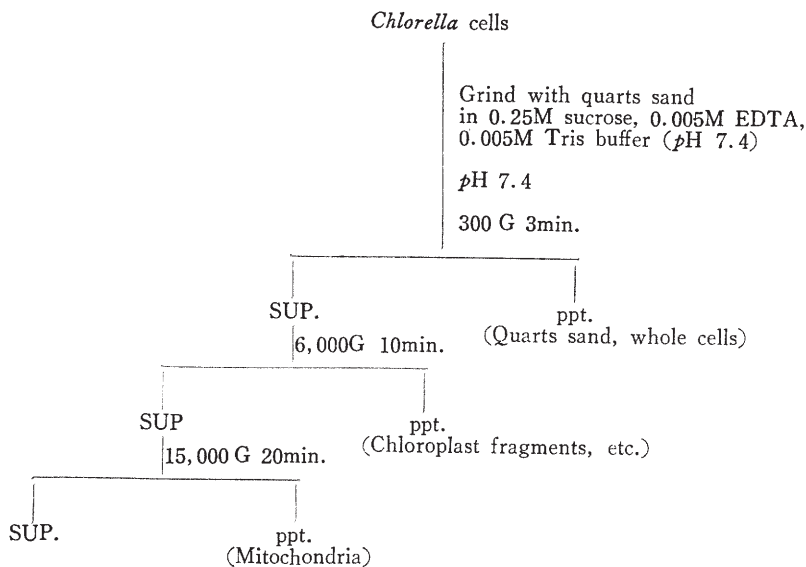
本 연구에서는 미토콘드리아膜의 溶質透過성을 原形質膜의 그것과 비교하여 유사점이 나 다른 점을 확인하고자 *Chlorella* 세포에서 미토콘드리아를 分離하여 그 膜에 對한 무기인산의 투과성에 미치는 무기염류의 영향을 P^{32} 를 追跡者로 하여 調査하였다.

材料 및 方法

Mitochondria의 分離 및 精製

*Chlorella ellipsoidea*를 培養하여 mitochondria를 分離하였다. *Chlorella*의 培養은 無機培地(Lee, 1969)에서 光度 7,500 lux, 溫度 $25^{\circ}C$ 를 유지시키며 약 5% CO_2 를 포함하는 공기를 流入시켜 3日間 bubbling culture 하였다.

Mitochondria의 分離는 sucrose media를 써서 常法(Lee, 1964)에 의하였다. 培地로부터 分離하기 爲해서 원심침전하여 얻은 *Chlorella*를 M/500 K_2SO_4 용액으로 두 번 씻은 다음 증류수로 두 번 洗滌하였다. Mitochondria의 分離 順序를 Table I에 表示하였다. 即 約 6g의 *Chlorella* (wet wt.)를 三倍量의 石英砂와 함께 0.25M sucrose, 0.005M trisbuffer 및 0.005M EDTA를 포함하는 마쇄액(pH 7.4)으로 $0^{\circ}C$ 下에서 Ten-Broeck homogenizer에서 마쇄하였다. 以上 모든 標品 抽出은 $0^{\circ}C$ 下에서 行하였다.

Table 1. Isolation of Mitochondria within *Chlorella* cells.

Chlorella 1g 당 약 2ml의 마쇄액을 가하여 마쇄한 후 homogenate의 pH는 10%의 NaOH 용액을 써서 pH 7.4로 다시 조정하였다. 세포 및石英砂의 마쇄물들을除去하기爲해서 300G에서 3分間 遠心 分離하였다. 그 상등액은 다시 6,000G에서 10分間 원심 분리하여 chloroplast를 除去한 다음 상등액을 15,000G에서 20分間 원심 분리하여 침전된 粒子를 얻었다.

이 mitochondria를 다시 0.25M sucrose 용액으로 두 번 洗滌한 다음 0.25M sucrose 용액 0.6ml 당 mitochondria 2 μ l(pv. 15,000 G에서 20分間)가 포함되게 all glass homogenizer를 써서 suspension을 마련하였다.

Mitochondria의 檢定은 Janus green B 염색법과 osmic acid 固定에 의한 염색處理에 의한 一般的인 常法을 使用하여 檢경하였다.

反 應

P³²를 추적자로 하여 30°C에서 30分間 反應하였다.

0.25M sucrose, 100mM Pi, P³², 여러가지 濃度の 1價의 陽이온인 KCl과 NaCl, 2價의 陽이온이 MgCl₂와 CaCl₂를 각각 포함한

반응액에 mitochondria를 포함하여 30°C에서 30分間 반응시킨 후, 15,000G에서 20分間 遠心分離하여 침전된 mitochondria를 분리하여 M/500 K₂SO₄ 용액으로 두 번 씻었다. Mitochondria 표품의 방사능을 GM-counter로 測定하고 반응액의 비방사능으로부터 mitochondria에 흡수된 인산의 양을 산출하였다.

結果 및 考察

1價의 陽이온과 2價의 陽이온을 여러가지 濃度로 각각 處理하였을 때 얻어진 미토콘드리아膜의 인산흡수 實驗 結果를 Table 2 및 Fig. 1에 表示하였다.

NaCl 첨가구는 대조구의 그것에 비해 濃度가 높을수록 磷酸의 吸收가 현저히 增大되었고 KCl 첨가구는 徐徐히 增加를 보여주었다. 反面 MgCl₂와 CaCl₂의 첨가구는 대조구의 그것과 比較하여 현저한 減少를 보여주었다.

또 各 鹽類의 뚜렷한 인산흡수의 差異를 보기 爲해 염류농도 10mM 첨가구만을 Fig. 2에 表示하였다.

역시 대조구의 그것에 비해 1價의 陽이

Table 2. Effects of each Ions on Permeability of Mitochondrial membrane.

Treatment Salts conc. (mM)	CPM/Total	CPM/ml	CPM/ μ g Mitochondria	Phosphate uptake		%
				mM/ μ g	mito./30'	
Control	1259.5	393.59	756.90	2.00		100
NaCl	0.01	1314.5	410.78	789.96	2.09	104.5
	0.1	1522.0	475.93	915.25	2.42	121.0
	1.0	1687.0	527.18	1013.81	2.68	134.0
	10	2077.0	649.06	1228.96	3.25	162.5
KCl	0.01	1479.5	462.34	889.11	2.35	117.5
	0.1	1562.0	488.12	938.69	2.48	124.0
	1.0	1622.0	506.87	974.75	2.58	129.0
	10	1627.0	508.43	977.75	2.59	129.5
MgCl ₂	0.01	979.5	306.09	588.63	1.55	77.5
	0.1	922.0	287.50	552.88	1.46	73.0
	1	932.0	291.25	560.09	1.48	74.0
	10	882.0	275.62	530.03	1.40	70.0
CaCl ₂	0.01	972.0	303.75	584.13	1.54	77.0
	0.1	1002.0	313.12	602.15	1.59	79.5
	1	884.5	276.41	531.55	1.41	70.5
	10	877.0	274.06	527.03	1.39	69.5

온의 첨가구는 인산의 흡수가 뚜렷한 증대를 보여 주었지만 2가의 양이온의 첨가구는 현저한 감소를 나타내었다.

一般的으로 外部環境으로부터 細胞속으로의 양이온과 음이온의 투과는 세포内の 같은 電荷의 이온과 교체되는 것으로 생각된다.

물질 대사로 생기는 수소이온은 언제나 다른 양이온과의 교환에 쓰일 것이고 음이온 교환을 위해서는 역시 물질대사로 생기는 중탄산염이 이용될 수 있다.

즉 원형질막의 음의 하전을 가지는 부분에서 양이온이 막의 polypeptide의 $-COO^-$ 에 접근하여 $-COOH$ 의 전리에 의하여 생긴 H^+ 은 투과하려는 양이온과 치환하고, 이 치환된 양이온은 세포내의 양이온과 교환되어 외액의 양이온이 세포내로 들어간다.

음이온도 이와 비슷한 기작으로 투과된다. 즉 양전하를 가지는 부분에서 polypeptide의

$-NH_3^+$ 에 외액의 음이온이 결합되고 결합된 음이온은 세포내 음이온과 치환이 되어서 세포내로 들어간다. 이 때 Na^+ , K^+ 등 1가의 양이온은 막의 표층을 이완하여 膜內로의 투과가 증대되어 상호작용과 物質代謝의 活性으로 외부 medium에 있던 인산의 투과가 증가되었고 反面 Ca^{++} , Mg^{++} 등 2가의 양이온은 막의 표층을 축화하여 음이온의 흡수가 감소된다. 또 Robert(1969)에 의하면 미토콘드리아에서 2가의 양이온은 음이온의 축적을 수반하고 2가의 양이온에 비해 1가의 양이온은 음이온의 축적이 더 많다고 하였는데, 이는 본 研究의 結果와 일치됨을 보인다.

이것은 본 연구에서 1가의 양이온에 비해 2가의 양이온의 투과가 저해되어 인산의 흡수가 감소된 것을 보면 mitochondria의 투과성도 원형질막의 투과성과 같이 外部 medium의 조건에 따라 막의 表層이완이나 축

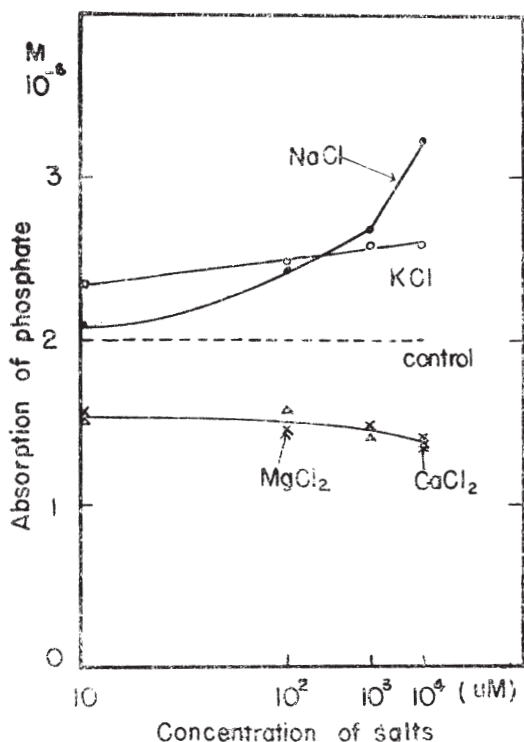


Fig. 1. Absorption of Phosphate on Permeability of Mitochondrial membrane at various concentration of salts.

화와 상호작용에 기인하지 않나 생각된다.
이와같이 본 실험의 결과로 보아 원형질막에 있어서도 1價의 양이온은 용질의 투과성

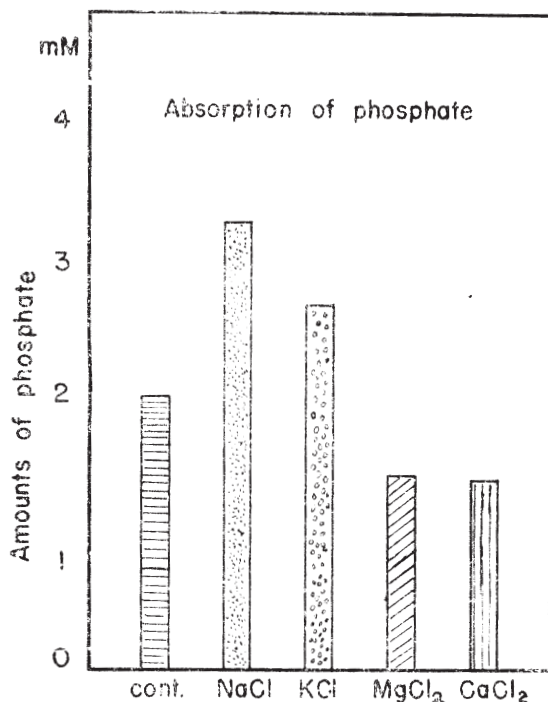


Fig. 2. Absorption of Phosphate on Permeability of Mitochondrial membrane at 10mM concentration of salts.

을 증대시키나 2價의 양이온은 용질의 투과성을 감소시키는 것으로 해석되었다.

摘 要

1. *Chlorella* 細胞에서 mitochondria를 분리하여 cell-free system에 있어서의 mitochondria膜의 溶質透過性에 미치는 陽이온의 효과를 P^{32} 를 추적자로 하여 비교하였다.
2. NaCl, KCl의 첨가구는 인산의 투과가 증대하였지만 $MgCl_2$, $CaCl_2$ 의 첨가구는 감소를 나타내었다.
3. 이는 陽이온의 효과에 기인하는 것으로 1價의 양이온은 용질의 투과가 증가되나 2價의 양이온은 감소된다는 원형질막의 투과성과 일치된다고 생각된다.

引 用 文 獻

- Danielli, J.F. and Davson, H. 1943. The permeability of natural membranes. Cambridge Univ. Press.
- Lee, Y.N. and Chin, P., 1964. Action of ascorbic acid and indolacetic acid on the oxidation of succinate and coupled phosphorylation in *Chlorella ellipsoidea*. *Kor. Jour. Microbiol.*, Vol. 2, No. 1, p.12-16.
- Lee, Y.N. and C.S. Lee, 1969. Physiological studies on cell division by the technique of sync-

- hronous culture of *Chorella*(I). On the changes in Phosphorylation of the cells during the life cycle. *Kor. Jour. Microbiol.*, Vol. 7, p.1-9.
- Osterhout, W.J.V., and Dorcas, M.J., 1926. *J. Gen. Physiol.*, 9, 255-267.
- Robert, M.D., 1969. General Physiology. Edited by A. Harper International Edition, p. 404.
- Robertson, R.N. 1960. *Prog. Biophys.*, 10, 343-418.
- Solomon, A.K., 1960. *Sci. Am.*, 203, 146-156.