

토끼 대퇴근육에서 부분정제한 M₄-LDH의 특성에 관한 연구

A Study on the Properties of M₄-LDH Purified Partially from the Thigh Muscle of Rabbits

서울대학교 의과대학 생화학교실

崔 榮 · 金 昇 元

序 論

한 효소의 분자의 형태가 몇개의異型으로 나타나는 것은 母體가 되는 亞單位의 polypeptide가 polymer로 混成되는데 緣由한다. 이와같은 混成系の 形成을 管掌하는 기전이 아직 완전히 究明된 것은 아니나, LDH (L-lactate: NAD oxidoreductase, E. C. 1. 1. 1. 27)만 하더라도 電氣泳動像으로 區分될 수 있는 5種의 異型分子로써 이루어져 있다는 事實은 分明히 되어 있다¹⁾.

이 LDH도 2種의 母體가 되는 一次的인 亞單位의 polypeptide가 있어 이를 各各 A, B라 하여 B₄(LDH-1), A₁B₃(LDH-2), A₂B₂(LDH-3), (A₃B₁(LDH-4) 및 A₄(LDH-5)라고 表記하는 例도 있거니와²⁾, M과 H를 使用하여 M은 LDH-5를, H는 LDH-1을 各各 表記하기도 한다³⁾. 前者가 骨骼筋組織에, 그리고 後者가 心臟筋組織에 그 活性이 높은 事實에 비릇된 呼稱인 것이다.

上記와 같은 事實에 대해서는 充分한 實驗의 根據가 報告되어 있으며, 그 한 例로서 H₄와 M₄의 兩 tetramer를 NaCl 存在下에 phosphate 緩衝液 속에서 同量을 冷却 凍結시킨 報告를 들 수 있다^{4), 5)}. 上記 冷凍試料를 다시 녹여서 그 5種의 isoenzyme의 混成比를 보면 1: 4: 6: 4: 1로서 binomial 分布의 活性을 보이는 것이다.

이와같은 混成實驗은 그後에 高濃度の guanidine-HCl나 urea에 의해서도 일어남이 알려졌으며^{6), 7)}, 이와같은 LDH isoenzyme의 活性分布가 條件에 따라서, 例컨대 胎兒의 發育過程^{8), 9)}이라던가 妊娠^{10), 11)}, 그리

고 筋肉의 退行性 變化^{12), 13)} 및 嫌氣性環境등에서^{14), 15)} 달라지는 고로 이 M와 H의 亞單位에서 LDH가 混成되는 것을 管轄하는 요인들을 研究함으로써 LDH isoenzyme의 組織分布의 變化를 완전히 究明하게 될 것으로 期待되고 있다.

한편 이러한 LDH의 두 亞單位, 即 H와 M은 前者가 pyruvate에 의해서 屢사리 抑制되지만 後者는 이 抑制效果가 크지 못하며¹⁶⁾ 同時에 前者가 心臟筋肉組織에 많은데 反해서 後者는 骨骼筋組織에 풍부하다는 點등으로 미루어 서로 生理學的 機能에 차이가 있는 것으로 示唆되고 있으며^{17), 18)}, 그 amino 酸의 組成뿐만 아니라 fingerprint pattern도 매우 다르며^{19), 20)}, 이들은 各各 서로 다른 遺傳子에 의해서 生成된다는 遺傳學的 근거도 있는 것이다²¹⁾.

最近에 報告된 이들 兩 亞單位 polypeptide의 amino 酸 分析報告에 의하면²²⁾, 各各 約 26個의 lysine과 約 9個의 arginine, 그리고 4個의 SH-基를 가졌다는 것이 비슷할 뿐 餘他的 amino 酸에는 많은 차이가 있는 것이며, fingerprint 分析結果에도 차이가 있는 것으로 되어 있다¹⁹⁾. 뿐만 아니라 兩者 사이에는 그 C-末端 amino 酸도 서로 다르며²³⁾, 따라서 이들은 그 蛋白質로서의 第1次 構造가 判異한 것을 알 수 있게된 것이다. 實際로 acetyl 化한 H₄-LDH에 대한 抗體가 적당히 處理한 M₄-LDH와 cross reaction을 한다는 報告를 보아도²⁴⁾ 이들이 免疫學的 差異도 갖는 相異한 蛋白質임을 示唆하고 있는 것이다.

이밖에도 coenzyme analogue에 대한 態度를 비롯해서 基質이나 產物에 의한 抑制度, Km 值, 各種 抑制劑

에 대한態도와耐熱性 등에도 차이가 있으며, 어떤試料로서부분정제하였다 하더라도 M_4 -LDH는 pyruvate에 비해서 2-oxobutyrate에 대한選擇성이 낮지만 M_1 -LDH는兩者에 대한活性이 비슷하다는事實등으로 미루어 볼 때 基質 analogue에 대한選擇性에도 차이가 있다는事實등을 알 수가 있다²⁵⁾.

이와같은 차이에 着眼하여 本 教室에서는 過去 LDH isoenzyme에 대한動力學的 特性的 差異를 確立하려는 一環으로 Ehrlich 複數癌細胞에서²⁶⁾ 또는 사람 血清에서²⁷⁾, 토끼의 心臟筋과 骨筋筋組織 등에서¹⁵⁾ pyruvate의 抑制效果를 比較, 檢討해 왔었다.

그러는 동안에 低濃度の 尿素는 M_1 -LDH의 pyruvate 抑制를 弱화하여 酵素의 活性을 증가시키고 M_4 -LDH에 대해서는 抑制效果를 더욱 強化하여 結果的으로 酵素의 活性을 顯著히 減少시키는 事實을 알았으며, 酵素의 安定劑로 使用되기도 하는 cysteine이 도리어 抑制效果를 나타내었기 때문에 이는 cysteine의 SH基의 이온화에 의한 영향으로 推定하고 無機 sulfide 이온이 LDH isoenzyme에 미치는 影響을 檢討하였던바 M_1 -LDH보다 M_4 -LDH가 더욱 현저히 抑制됨을 報告한바 있다²⁸⁾. 또한 pyruvate와 cysteine에 의한 LDH 活性抑制實驗을 同時에 施行함으로써 血清 LDH isoenzyme의 鑑別의 分析을 쉽게 할 수 있을 것을 提案하기도 하였다.

이와같은 여러가지 事實들을 綜合檢討한 끝에 著者는 分明히 構造와 機能을 달리하고있는 이 兩 LDH 中 우선 그 M_4 -LDH를 擇하여 이를 부분정제하고 pyruvate 抑制를 비롯해서 基質인 lactate에 의한 影響을 觀察하고 이들 影響이 cysteine이나 sulfide 이온의 存在로써 어떻게 달라지는가를 本 論文에서 觀察하여 몇가지 M_1 -LDH의 特性을 밝히고자 한다.

實驗方法

(1) 試料의 準備

體重 1.5kg 內外의 成熟한 토끼를 雌雄區別 없이 實驗動物로서 使用하였다. 이 實驗動物에서 大腿筋을 剝離하는 即時 寒冷한 0.25M sucrose 溶液을 使用하여 20% (W/V)의 組織 homogenate를 만들었다. 이를 위하여 미리 冷藏해 두었던 mortar에다 剝離한 大腿筋組織을 넣고 약간의 海砂를 加한 다음 前記 0.25M sucrose 溶液을 少量씩 加하면서 磨碎하여 homogenate를 얻은 후, 이를 600×g로 20分間 冷凍遠心機로써 遠心分離하여 細胞膜을 비롯한 核成分과 cell débris를 제거하고 그 上清液을 酵素 부분정제의 試料로 삼는 것이다.

(2) LDH의 活性測定

Neiland의 方法²⁹⁾에 準하여 LDH의 活性을 測定하되 UV spectrophotometer인 Calbiometer (Calbiochem. 社製)를 利用하였다.

Assay system은 pH 10.0의 glycine-NaOH 緩衝液 180μmoles, NAD^+ 2μmoles, sodium lactate 50μmoles 로써 總量 2.0ml가 되도록하여 이를 cuvette에 넣고 25°C의 恒溫槽에서 미리 約 10분간 incubate 해 두었다가 酵素試料 0.02ml를 加하여 反應을 시작하였다.

lactate가 pyruvate로 酸化되는 동안에 NAD^+ 가 還元되어 生成된 NADH의 μmole 數를 그 340nm에서의 吸光係數로써 算出함으로써 1분간의 incubation 期間에 生成된 NADH의 μmole 數를 定量하였으며, 이 期間에 NADH의 1μmole 生成하는 LDH의 活性을 1 unit로 삼았다.

한편 sulfide ion이나 SH基의 影響을 보기 위하여 sodium sulfide와 cysteine을 添加하여 觀察하였는바, 이 때는 이들의 添加로 오는 pH의 變化가 미치는 影響을 막기 위하여 미리 glycine-NaOH 緩衝液에 이들 添加物을 加하고 pH를 10.0으로 維持하도록 Beckman의 expandomatic pH meter로 檢査해가면서 分析하였다.

(3) 蛋白質 定量

蛋白質 定量은 Kjeldahlometry로서 미리 窒素의 含有量을 분석해둔 小血清 albumin(Nutritional Biochemicals 製)을 標準液으로 삼고 Lowry의 方法³⁰⁾으로 定量하되 다음과 같이 變法을 擇하였다.

即 0.1N NaOH에 Na_2CO_3 (2%)와 potassium tartrate (0.2%)를 同時에 溶解한 溶液과 0.5%의 $CuSO_4$ 水溶液을 50:1의 容量比로 混合한 working 溶液을 만들었다. 元來의 Lowry法에서는 potassium tartrate가 $CuSO_4$ 와 함께 溶解된 것이었으나 이 copper-tartrate 溶液에서 생기는 沈澱物을 막기 위해서 이와같이 溶液處方을 달리하였다³¹⁾.

한편 Folin-Ciocalteu의 phenol 試藥³²⁾은 알칼리로 滴定하여 酸의 濃도가 1.0N에 이르도록 稀釋하여 使用하였다.

分析試料 1.0ml에 前記 working 溶液 5.0ml를 加하고 잘 혼든다음 10분간 室溫에 放置하고, 이어서 稀釋된 phenol 試藥 0.5ml를 1~2秒 사이에 혼든면서 加하여 역시 室溫에 30分間 放置한 후 Spectronic 20 Spectrophotometer (Bausch and Lomb 製)를 利用해서 750nm

의 波長에서 吸光度를 測定함으로써 比色定量한 것이다.

(4) 電氣泳動

부분정제된 LDH가 M_4 형인가의 與否를 밝혀두기 위해 cellulose acetate를 利用한 酵素의 電氣泳動을 다음과 같이 施行하였다. 即 pH 8.6, 이온強度 0.04인 0.05 M의 Veronal 緩衝液을 使用하고 Separaphore III (Gelman 製)에 酵素試料을 塗抹하여 4°C에서 cellulose acetate cm 당 25V의 電壓으로 90分間 電氣泳動하였다.

泳動後에 NAD^+ 와 phenazine methosulfate 및 nitrobluetetrazolium 등을 使用하는 formazan 反應으로³³⁾ LDH를 染色하여 이것이 M_4 임을 確認한 것이다. 이 確認을 위한 control로서는 역시 토끼腎臟의 髓質組織의 20%(W/V) homogenate를 600×g로 遠心하고 그 上 清液을 그대로 cellulose acetate에 塗抹하고 泳動하였다.

(5) M_4 -LDH의 部分정제

前項에서 準備된 토끼의 大腿筋組織의 酵素試料을 가지고 水槽上에서 먼저 ammonium sulfate로 飽和시켜 鹽析하였으며, 그 35~65% 飽和劃分을 얻었다^{18) 24)}.

다음 이를 pH 8.4의 5mM Tris 緩衝液에 溶解하고 역시 같은 緩衝液으로 24時間 5°C以下에서 透析한 다음 같은 緩衝液으로써 미리 平衡에 이르게한 DEAE-cellulose의 column에 吸着시키고 역시 같은 緩衝液으로 溶出하되 DEAE-cellulose가 H_4 -LDH만을 選擇적으로 吸着시키는 特性을 利用한 것이다²⁴⁾.

DEAE-cellulose는 그 5g을 0.005M의 Tris 緩衝液(pH 6.0)에 浮遊케하여 約 45分間 放置한 다음 decant하여 殘渣를 얻는 洗滌過程을 數回 되풀이하여 洗滌液의 pH가 6.0에 이르도록 하고나서 50ml의 phosphate 緩衝液에 再浮遊케해서 column(1.0×25.0cm)에 넣어서 重力으로 가라앉게하여 column의 높이를 15.0cm로 調整하였다.

다음에 透析된 酵素試料을 上部에 添加하여 M_4 -LDH劃分을 溶出し키고 透析한 다음 다시 한번 column에 걸었다. 이 pH와 ion 強度의 緩衝液으로서는 M_4 -LDH는 DEAE-cellulose에 吸着되지 아니함으로 H_4 -LDH를 包含한 其他 LDH의 isoenzyme과는 완전히 分離할 수가 있었으며, 이를 電氣泳動에 의해서 確認하고 酵素動力學的 實驗의 材料로서 使用한 것이다.

實驗結果

(1) 토끼의 大腿근에서의 M_4 -LDH 部分정제

大腿근을 포함한 骨骼筋에는 M型 LDH의 활성이 높

으므로³⁴⁾ 수회에 걸쳐서 토끼의 大腿근을 pool하여 M_4 -LDH의 部分정제를 시도하였으며, 그중 대표적인 것을 第1表에 요약한 바와 같다.

第1表에서 알 수 있듯이 酵素試料의 總蛋白質이 Ammonium sulfate 염석의 35~65% 劃分에서 거의 1/3로 떨어져자 비활성은 약 3배로 增加하였으며, 다시 DEAE-cellulose에 의한 處理로써 이 염석劃分の 總蛋白質은 약 1/20로 減少하였으며, 그대신 비활성은 크게 增加하여 5.20에서 25.1 units/mg protein으로 되었다 따라서 DEAE-cellulose가 H_4 -LDH를 비롯한 各種의 H- 및 M-LDH의 混成分子를 吸着시키고 나머지 M_4 -LDH만을 溶출해 내었기 때문에 總蛋白質의 量은 激減하였는데 비활성은 매우 높아진 것으로 생각된다.

전체의 結果로 보건대 이 정도의 部分정제 方法으로는 18~23%의 回收率과 10~15배의 精製率 밖에는 期待하기 어려웠으며, 그중 대표적인 第1表에서는 회수율이 21.2%이었으며, 精製率は 13.8배가 되었었다. 그러나 이만한 部分정제 成績으로서는 능히 本論文의 所期の 目的을 達成할 수가 있었으며, 本精製法에 의거해서 얻어진 마지막 酵素精製物을 電氣泳動하여본 結果는 第1圖에서 볼 수 있듯이 對照用으로 同時에 泳動한 토끼 신장의 LDH isoenzyme에 比較하여 보건대 本酵素부분精製物에는 M_4 -LDH만이 檢索되었으며, 對照에서 보는 바와 같은 H_4 -LDH나 LDH-2, LDH-3 및 LDH-4등과 같은 混成型은 전혀 檢索할 수 없었던 것으로 보아 本精製物은 비록 回收率이나 精製率は 낮다고 할지라도 純粹한 M_4 -LDH의 動力學的 特性을 研究하는데는 아무런 支障이 없는 것임을 確認하였다.

(2) Pyruvate 抑制

Pyruvate에 의해서 H_4 -LDH 보다는 M_4 -LDH가 抑制를 덜 받는다는 사실은 오래전부터 알려져 있는 터이나 M_4 -LDH라 하여 抑制를 전혀 받지 아니하는 것은 아니며, 第2表에 要約한바와 같이 당초의 2.4units/ml가 $0.5 \times 10^{-3}M$ 와 같은 極少量의 pyruvate가 存在하여서도 約 10%의 抑制를 받고 있으며, $20 \times 10^{-3}M$ 에 이르도록 pyruvate의 濃度를 증가시키면 그와 反比例해서 활성이 억제되어 0.53unit/ml에 이르렀다. 물론 이것이 H_4 -LDH가 받는 抑制에는 미치지 못한다 할지라도^{26) 28)} 第2圖에서 쉽게 알 수 있듯이 그 정도가 H_4 -LDH보다 작다는 것일 뿐 상당한 抑制를 받는 것은 分明하다.

이로써 骨骼筋 역시 心臟筋組織에서와 같이 어느정도 pyruvate에 의한 LDH 활성의 調節을 생각할 수가 있

Table 1. Summary of crude preparation of M_4 -LDH from rabbit muscle.

| Preparation steps | Total activity (μ mole/min.) | Total protein (mg) | Specific activity (Unit/mg. prot.) | Yield (%) | Purification (fold) |
|----------------------------------|-----------------------------------|--------------------|------------------------------------|-----------|---------------------|
| Supernatant of 20% homogenate | 186 | 102.0 | 1.82 | 100.0 | 1.00 |
| 35~65% $(NH_4)_2SO_4$ Saturation | 173 | 33.3 | 5.20 | 93.0 | 2.86 |
| Dialyzate | 170 | 33.1 | 5.14 | 91.4 | 2.82 |
| DEAE-cellulose column filtrate | 39.4 | 1.57 | 25.1 | 21.2 | 13.8 |

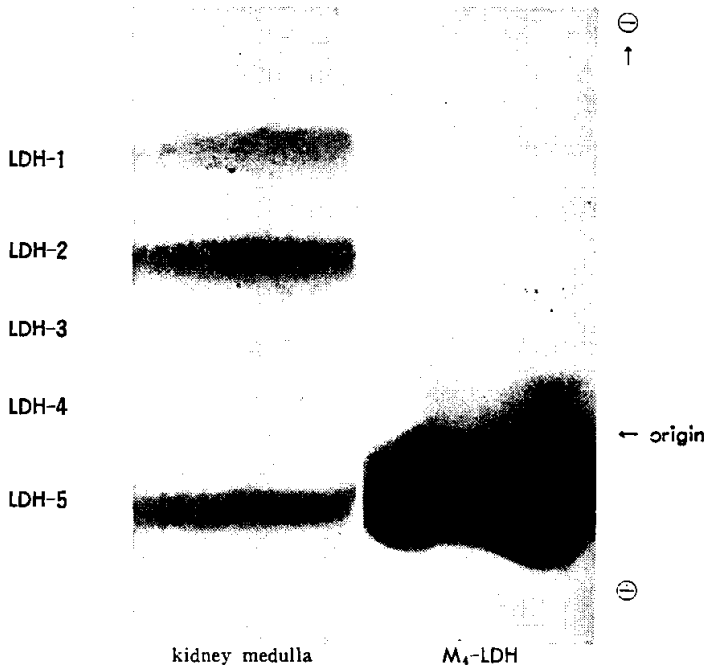


Fig. 1. A typical isogram of LDH showing the pure M_4 -LDH activity of the present preparation as compared to the pattern of LDH isoenzymes obtained from the medulla of rabbit kidney.

했다.

(3) Pyruvate 抑制에 대한 Sulfide 이온의 影響

sodium sulfide 를 使用하여 sulfide 이온이 pyruvate 抑制에 미치는 影響을 檢索해본 結果는 第Ⅲ表에 表示한 바와 같았다.

즉, 前項에서 살핀바 있듯이 pyruvate 는 0.50×10^{-3}

M로서도 約 10%의 抑制를 가져오나 이 反應系에 sulfide 이온을 加하면 pyruvate 가 없더라도 抑制의 效果를 보였다. $5.0 \times 10^{-3}M$ 의 sulfide 이온과 $5.0 \times 10^{-2}M$ 의 sulfide 이온이 存在하면 pyruvate 가 없어도 各各 約 30%, 55%에 達하는 抑制를 보여서 2.40units/ml 인 M_4 -LDH 활성이 1.66, 1.08 units/ml 로 떨어진 것이다.

Table 2. Inhibition of M_4 -LDH activity in the presence of pyruvate.

| Concentration of pyruvate | 0 | $0.50 \times 10^{-3}M$ | $1.25 \times 10^{-3}M$ | $2.5 \times 10^{-3}M$ | $5.0 \times 10^{-3}M$ | $10.0 \times 10^{-3}M$ | $20.0 \times 10^{-3}M$ |
|---------------------------|--------------|------------------------|------------------------|-----------------------|-----------------------|------------------------|------------------------|
| Activity (units/ml) | 2.40* (100%) | 2.14 (89.2%) | 1.87 (77.9%) | 1.61 (67.1%) | 1.08 (45.0%) | 0.67 (27.9%) | 0.53 (22.1%) |

* Figures represent mean values obtained from triple determination.

Table 3. Effect of sulfide ions on the pyruvate inhibition of M_4 -LDH activities.

| Concentration of sulfide ions | Concentration of pyruvate | | | | | | | |
|-------------------------------|---------------------------|-------------------------|-------------------------|------------------------|------------------------|-----------------------|-----------------------|--|
| | 0 | $0.50 \times 10^{-3} M$ | $1.25 \times 10^{-3} M$ | $2.5 \times 10^{-3} M$ | $5.0 \times 10^{-3} M$ | $10 \times 10^{-3} M$ | $20 \times 10^{-3} M$ | |
| 0 | 2.40* | 2.14 | 1.87 | 1.61 | 1.08 | 0.670 | 0.530 | |
| $5.0 \times 10^{-3} M$ | 1.66 | 1.63 | 1.59 | 1.44 | 1.02 | 0.686 | 0.502 | |
| $5.0 \times 10^{-2} M$ | 1.08 | 1.01 | 0.943 | 0.867 | 0.745 | 0.674 | 0.460 | |

* units/ml

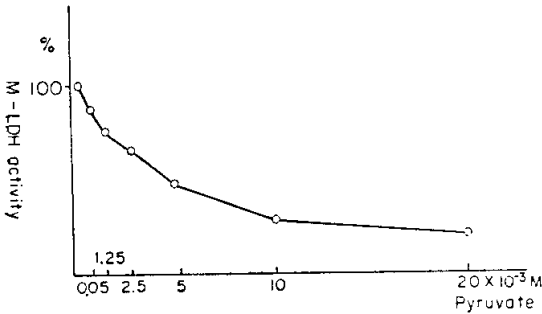


Fig. 2. Percentage inhibition of M_4 -LDH by pyruvate.

그러나 이러한 sulfide 이온의 抑制效果는 pyruvate 와 共存함으로써 반드시 兩 抑制效果가 相乘的으로 比例해서 나타나는는 아니하고 도리혀 高濃度의 pyruvate 를 使用하였을때, 즉 $20 \times 10^{-3} M$ 의 濃度에 이르르면 三者間의 抑制效果에 커다란 差異를 發見할 수 없게 된다. 三者 다같이 20% 内外의 활성을 남기는 抑制를 가져올 수 있었다.

이와같은 抑制現象을 圖示하면 第3圖과 같다.

(4) Pyruvate 抑制에 대한 cysteine 의 影響

cysteine 역시 pH 10.0인 本 反應系에서는 쉽게 sulfide 로 이온화하기 때문에 前項의 sulfide 이온과 흡사하게 나타났으며, 역시 $2 \times 10^{-2} M$ cysteine 으로 보다는 $2 \times 10^{-1} M$ 의 cysteine 으로 더큰 抑制現象을 보였다.

그러나 sulfide 이온의 濃度($5 \times 10^{-2} M$ 와 $5 \times 10^{-3} M$) 보다 더 높은 濃度($2 \times 10^{-1} M$ 와 $2 \times 10^{-2} M$)임에도 不拘하고 低濃度의 pyruvate 와 共存하던 抑制가 더욱 컸으나 도리혀 pyruvate 의 濃度가 높아지면 pyruvate 에 의한 抑制를 減少시켜주는 듯한 傾向이었다.

즉 pyruvate 가 0.5, 1.25, 2.5, 5, 10.0 및 $20.0 \times 10^{-3} M$ 로 變化되었을때 各各 89.2, 77.9, 67.1, 45.0, 27.9 및 22.1%의 抑制를 보였으나 여기에 $2 \times 10^{-2} M$ 의 cysteine 이 共存하면 各各 93.3, 91.7, 85.0, 76.3, 62.9 및 34.2%의 抑制를 보임으로써 도리혀 cysteine

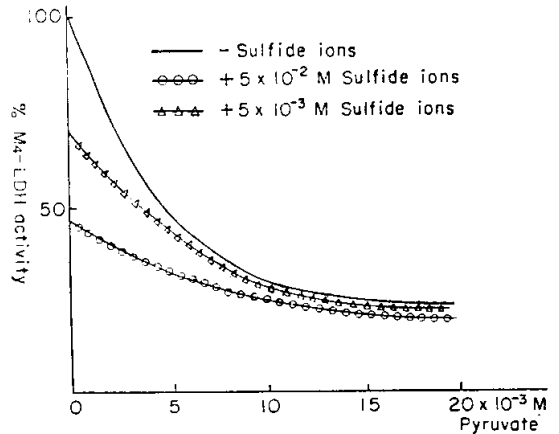


Fig. 3. Effect of sulfide ions on the pyruvate inhibition of the M_4 -LDH activities.

이 pyruvate 抑制를 減少케하였지만 같은 濃度의 變化에 따르는 pyruvate 와 $2 \times 10^{-1} M$ cysteine 이 共存하면 그 抑制의 정도가 거의 一定하여 28.0~33.0%이었다. 즉 이 경우는 pyruvate 抑制效果 보다는 거의 全的으로 cysteine 의 抑制效果만이 나타나는 것 같았다.

이와 같은 結果를 要約하면 第IV表 및 第4圖과 같았다

(5) Cysteine 및 sulfide 이온의 基質誘導에 대한 影響

前記와 같은 cysteine 과 sulfide 이온의 M_4 -LDH 활성抑制結果를 보건대 lactate 를 基質로 삼고 pyruvate 가 산물이 되는 system 인 경우이었으므로 이러한 效果가 基質(lactate) 誘導에도 基因하리라 생각하고 lactate 의 濃度를 變化시키면서 sulfide 와 cysteine 의 一定濃度가 어떤 影響을 미치는가를 觀察한 結果는 第V 및 VI表에 要約한 바와 같다.

兩表에서 분명하듯이 $2.5 \times 10^{-3} M$ 의 sulfide 나 $1.0 \times 10^{-2} M$ 의 cysteine 은 다같이 lactate 에 의한 M_4 -LDH 活性의 基質誘導을 抑制하고 있다. 이 경우 $1.0 \times 10^{-2} M$ 의 cysteine 보다 $2.5 \times 10^{-3} M$ sulfide 가 더욱 크게 抑制

Table 4. Effect of cysteine on the pyruvate inhibition of M_1 -LDH activities.

| Concentration of cysteine | Concentration of pyruvate | | | | | | |
|---------------------------|---------------------------|-------------------------|-------------------------|------------------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|
| | 0 | $0.50 \times 10^{-3} M$ | $1.25 \times 10^{-3} M$ | $2.5 \times 10^{-3} M$ | $5.0 \times 10^{-3} M$ | $10.0 \times 10^{-3} M$ | $20.0 \times 10^{-3} M$ |
| 0 | 2.40* (100%) | 2.14 (89.2%) | 1.87 (77.9%) | 1.61 (67.1%) | 1.08 (45.0%) | 0.670 (27.9%) | 0.530 (22.1%) |
| $2.0 \times 10^{-2} M$ | 2.26 (94.2%) | 2.24 (93.3%) | 2.20 (91.7%) | 2.04 (85.0%) | 1.83 (76.3%) | 1.51 (62.9%) | 0.82 (34.2%) |
| $2.0 \times 10^{-1} M$ | 0.744 (31.0%) | 0.789 (32.9%) | 0.681 (28.4%) | 0.849 (35.4%) | 0.716 (29.8%) | 0.678 (28.3%) | 0.783 (32.6%) |

Table 5. Comparison of the M_1 -LDH activities as induced by the substrate, lactate, with and without sulfide ions.

| Concentration of sulfide ions | Concentration of lactate | | | | | | |
|-------------------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|------------------------|------------------------|-------------------------|-----------------------|
| | $0.25 \times 10^{-3} M$ | $0.50 \times 10^{-3} M$ | $1.25 \times 10^{-3} M$ | $2.5 \times 10^{-3} M$ | $5.0 \times 10^{-3} M$ | $12.5 \times 10^{-3} M$ | $25 \times 10^{-3} M$ |
| 0 | 0.072 (3.00%) | 0.143 (5.96%) | 0.266 (11.1%) | 0.468 (19.5%) | 0.941 (39.2%) | 1.66 (69.2%) | 2.40 (100%) |
| $2.5 \times 10^{-3} M$ | 0.039 (1.63%) | 0.075 (3.13%) | 0.144 (6.00%) | 0.253 (10.5%) | 0.467 (19.5%) | 0.943 (39.3%) | 1.27 (52.9%) |

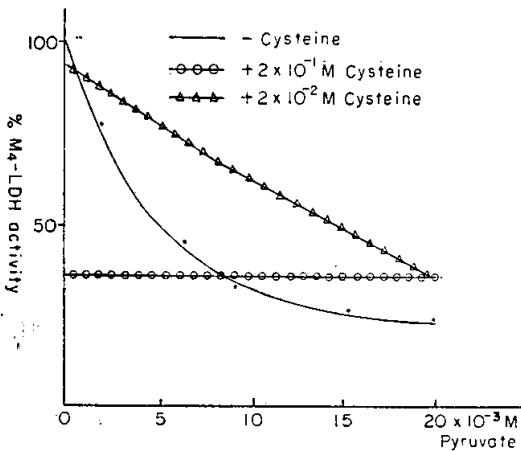


Fig. 4. Effect of the cysteine on the pyruvate inhibited M_1 -LDH activities.

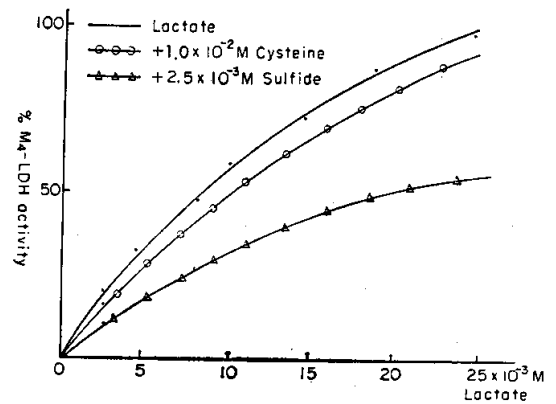


Fig. 5. Comparison of lactate inductions of the M_1 -LDH activities as affected by cysteine and sulfide.

하고 있음을 알 수 있다. 즉 cysteine은 이온화되어 pH 10.0에서는 그 25%의 sulfhydryl 만이 이온화함으로²⁹⁾ 이 정도의 농도라 할지라도 $2.5 \times 10^{-3} M$ 의 sulfide의 억제에 미치지 못하는 것으로 보인다. 이를 다시 그 lactate 기질誘導에 대한 억제를 百分率로 圖示하면 第5圖과 같다. 즉 $25 \times 10^{-3} M$ lactate에 의한 M_1 -LDH의 賦活을 100%로 볼때 $1.0 \times 10^{-2} M$ cysteine이 存在함으로써 92.1%가, 그리고 $2.5 \times 10^{-3} M$ 의 sulfide의 共存으로서는 52.9%가 各各 賦活되어 이 兩者가 各各 lactate의 基質誘導을 抑制할 뿐만 아니라 本 實驗의 濃度로서

는 前者보다도 後者가 더욱 크게 抑制함을 알 수 있었다.

이 關係를 Linweaver-Burk plot로 나타내어 보면 第6圖과 같이 됨으로서 이 抑制는 非相競性 抑制임을 알 수 있었다.

이와같이 lactate 基質誘導에 있어서 非相競的 抑制와 같은 典型的인 抑制가 pyruvate를 基質로 삼았을 때도 있을 것인가의 與否를 밝히기 위하여 低濃度의 pyruvate를 基質로 사용하여 逆反應系에서의 M_1 -LDH

Table 6. Comparison of the M_4 -LDM activities as induced by the substrate, lactate, with and without cysteine.

| Concentration of Cysteine | Concentration of lactate | | | | | | |
|---------------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|------------------------|------------------------|-------------------------|-----------------------|
| | $0.25 \times 10^{-3} M$ | $0.50 \times 10^{-3} M$ | $1.25 \times 10^{-3} M$ | $2.5 \times 10^{-3} M$ | $5.0 \times 10^{-3} M$ | $12.5 \times 10^{-3} M$ | $25 \times 10^{-3} M$ |
| 0 | 0.072 (3.00%) | 0.143 (5.96%) | 0.266 (11.1%) | 0.468 (19.5%) | 0.941 (39.2%) | 1.66 (69.2%) | 2.40 (100%) |
| $1.0 \times 10^{-2} M$ | 0.0481 (2.00%) | 0.960 (4.00%) | 0.196 (8.17%) | 0.414 (17.3%) | 0.832 (34.7%) | 1.46 (60.8%) | 2.21 (92.1%) |

Table 7. Effect of cysteine upon the pyruvate induction of M_4 -LDH activities.

| Concentration of cysteine | Concentration of pyruvate | | | | | | |
|---------------------------|---------------------------|-------------------------|------------------------|------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| | $0.50 \times 10^{-3} M$ | $1.25 \times 10^{-3} M$ | $2.5 \times 10^{-3} M$ | $5.0 \times 10^{-3} M$ | $10 \times 10^{-3} M$ | $20 \times 10^{-3} M$ | $40 \times 10^{-3} M$ |
| 0 | 0.143 (4.58%) | 0.269 (8.62%) | 0.462 (14.8%) | 0.832 (26.7%) | 1.66 (53.2%) | 2.47 (79.2%) | 3.12 (100%) |
| $1.0 \times 10^{-2} M$ | 0 | 0.20 (0.64%) | 0.073 (2.34%) | 0.462 (14.8%) | 0.967 (31.0%) | 2.26 (72.4%) | 3.12 (100%) |

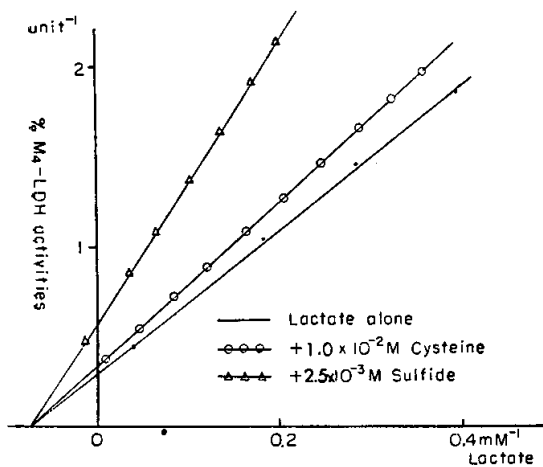


Fig. 6. The Lineweaver-Burk plots of the M_4 -LDH, under the presence of cysteine and sulfide.

活性誘導 및 이에 대한 cysteine 과 sulfide 이온의 影響을 살펴 보았다.

이 反應系에서의 抑制로서 lactate 를 基質로한 正反應때의 pyruvate 抑制實驗의 結果를 설명해 보려는 計劃이었다. 그 結果는 第Ⅶ表에 要約한 것과 같이 cysteine 만이 흥미있는 抑制를 보였고 sulfide 는 아무런 抑制效果를 거두지 아니하였다.

즉 cysteine 의 경우를 보던 第7圖에서 분명히 比較되었듯이 低濃度の pyruvate 에 의한 M_4 -LDH 의 活性誘

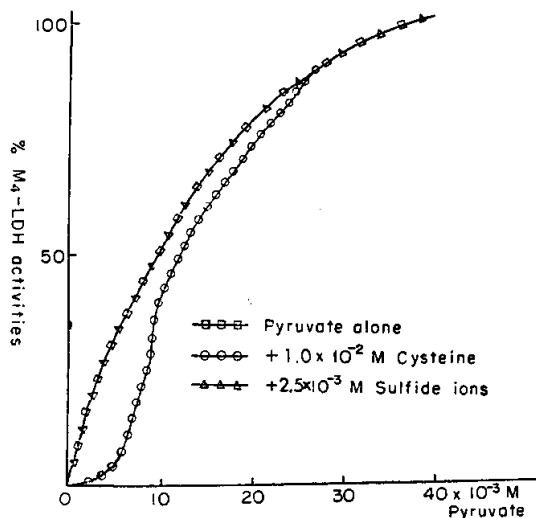


Fig. 7. Comparison of the M_4 -LDH activities as induced by the substrate alone, with cysteine and with sulfide ions.

導는 크게 抑制하지만(약 $5 \times 10^{-3} M$), 高濃度($10 \times 10^{-3} M$)의 pyruvate 에 의한 基質誘導는 크게 抑制하지 못하였고 $30 \times 10^{-3} M$ 以上の pyruvate 濃도에 있어서는 전혀 抑制치 못하였음을 確認하였다.

考 察

LDH 의 部分精製는 金等²³⁾이 이미 報告한 바 있듯이

DEAE-cellulose column chromatography를 이용한 結果 本 研究成績에 의하면 25.1units/mg 蛋白質의 非 活性을 갖는 M_4 -LDH를 얻게 되었다. 이는 回收率(21.2%) 및 部分精製倍數(13.8倍)는 비록 낮은 편이나(第 1 表), DEAE-cellulose가 매우 選擇적으로 H-LDH를 흡착한 까닭에³⁴⁾ M_4 -LDH 以外の LDH isoenzyme은 除去할 수가 있었다(第 1 圖).

따라서 本 實驗에 사용한 M_4 -LDH 部分精製品은 各種 動力學的 實驗을 시행하는데 아무런 支障이 없었으며, Boyd³⁵⁾는 이와 비슷한 정도의 部分精製品을 實驗 動物의 靜脈內에 注射까지 하고 있는 形편임으로 本 實驗에는 아무런 支障이 없음을 確認한 것이다.

한편 pyruvate에 의한 LDH의 抑制는 鄭과 金¹⁶⁾이 報告한 바 있듯이 H-LDH에 대한 抑制가 M-LDH에 대한 억제보다 큰 것이 알려져 있으며, Cahn 등³³⁾, Wilson 등³⁵⁾, Dawson 등¹⁷⁾이 報告한 바와 같이 LDH에 대한 pyruvate 抑制정도는 그 組織의 대사活性和 密接한 關係가 있는 것이다.

즉 H 및 M-LDH isoenzyme에 대한 pyruvate 抑制가 크게 相異한 것은 대사活性和에 差異가 있음을 말하는 것으로서 지금까지 알려진 바에 의하면^{31, 17, 35)} 心臟과 같은 好氣性組織에는 H-LDH가, 그리고 骨格筋과 같은 혐기성組織에는 M-LDH가 各各 많이 分布되어 있어 前者의 경우에는 pyruvate의 蓄積으로 말미암은 lactate의 生成이 일어나지 아니하도록 하고 그대신 解糖過程에서 생긴 pyruvate가 즉각 酸化的으로 處理되어야 하는 心臟같은 組織에서는 合目的的으로 pyruvate에 대해서 LDH가 매우 예민할 필요가 있는 것이다.

그러나 비교적 嫌氣的인 骨格筋과 같은 組織에서는 어느 정도의 pyruvate 蓄積이 불가피함으로 그 臟器에는 pyruvate 抑制에 抵抗이 강한 M-LDH가 H-LDH보다 더 많이 分布되어 있어야만 하는 것으로 解釋된다 그러므로 本 實驗에서 사용한 M_4 -LDH는 분명히 pyruvate의 抑制를 받기는 하되 그 정도가 前報^{16, 26, 28)}에서 알 수 있는 바와 같이 H-LDH에 比해서 매우 낮은 것을 알 수 있었다(第 II 表, 第 2 圖).

이와같이 pyruvate에 대한 抑制制度에 差異가 나는 것은 Plagemann 등³⁶⁾과 Nisselbaum³⁷⁾ 등이 報告한 바와 같이 兩 isoenzyme의 Michaelis 恒數가 서로 다르기 때문이요, 또한 이 억제는 溫度에 의해서도 차이가 나는 것으로서^{36, 37)} 溫度가 낮을수록 最適 pyruvate 濃度도 낮아지는 것으로 알려져 있다³⁷⁾.

그러나 李와 金²⁸⁾에 의하면 25°C~37°C 사이의 온도 에 있어서는 前記한 바와 같은 溫度依存性이 없다고 하

며, Ehrlich 複數癌細胞에 있어서는 H-LDH가 M-LDH보다 그 活性이 높다고 報告한 바 있다.

이와같은 特性外에도 Fritz³⁸⁾에 의하면 M_4 -LDH는 allostery를 가지며, Vessell⁴⁰⁾이 報告한 바 있듯이 細胞質內의 各 劃分과 서로 다른 比率로 結合하고 있으며 또한 Papaconstantin⁴¹⁾가 報告하였듯이 급속히 分裂하는 細胞에 그 活性이 높으며, 崔 및 鄭⁴²⁾에 의하면 가토의 子宮組織도 幼年期的 가토에 있어서 보다 老年期的 가토에 있어서 M-LDH가 높다는 등에 特性이 있다.

한편 本 論文에서 보는 바와 같은 pyruvate의 抑制는 Wuntch 등⁴³⁾이 觀察한 바 있듯이 LDH가 pyruvate와 NAD와의 사이에 abortive ternary complex를 形成하는데 그 까닭이 있는 것으로 보인다. 말하자면 低濃度의 LDH 존재하에서는 이 complex의 形成이 빠르나 生理的 濃度의 LDH 존재하에서는 이 complex 生成이 느린것으로 推測되는 것이다⁴⁴⁾.

그런데 本 實驗結果 第 III 表, 第 3 圖에서 보듯이 sulfide ion이 이와같은 pyruvate 抑制를 低濃度의 pyruvate 존재하에서는 더욱 크게하고 있음을 觀察하였는데 이와 비슷한 現象은 第 IV 表 및 第 4 圖에서 보듯이 Cysteine에 있어서도 그러하다. Lactate를 基質로하여 觀察한 이와같은 現象은 金 등²⁸⁾이 暗示한 바 있듯이 enzyme, NAD, pyruvate 三者間의 abortive ternary complex⁴⁵⁾의 形成에 影響을 미치는 것으로 생각한다.

Cysteine은 흔히 酵素의 安定劑로서 쓰이는 것이지만 本 實驗에서와 같이 그 反應系의 pH가 10임으로 Cysteine의 sulfhydryl group의 ion化로 말미암아 sulfide ion으로 轉換된 것이기 때문에 sulfide ion을 添加했을 때와 같은 효과가 나타날 것이 기대되었고, 또한 사실 이 그러하였다.

실상 Cystine/cysteine의 Standard oxidation potential은 -0.340V이며, NAD⁺/NADH의 그것은 -0.320V이며, pyruvate/lactate의 그것은 -0.185V인 것으로 되어있다⁴⁶⁾. 그러므로 Cystine/Cysteine의 oxidation potential은 NAD/NADH의 그것과 거의 비슷한 까닭에 cysteine이 NAD⁺를 還元시킬 수 있는 可能性은 稀薄하다. 그러나 NAD가 酵素와 結合하여 enzyme-NAD complex를 形成하면 酵素가 賦活되어서 cysteine에 의하여 還元되고 다시 lactate와 結合하여 enzyme-lactate-NADH라는 abortive ternary complex의 形成을 생각할 수도 있으나 이와같은 complex 生成의 確證은 아직도 없다.

金 등²⁸⁾이 算出하였듯이 cysteine 分子가 갖는 sulfhy-

dryl group의 pka는 10.46이고 amino group의 pka는 8.35이며, carboxyl group의 pka는 1.92이다. 따라서 ion화한 sulfhydryl group의 mole fraction은 0.25인즉 Cysteine이 pH 10에서는 그 25%를 ion화하고 있다고 보겠다. 따라서 Cysteine의 抑制効果는 이 25%의 ion화한 sulfide ion의 影響으로 볼 수 있다. 이것을 뒷받침하는 것이 本實驗의 sulfide ion의 효과라고 볼 수 있는 것이다.

그러나 第6圖에서 분명히 알 수 있듯이 lactate를 基質로 하였을 때는 sulfide ion 및 Cysteine을 添加하면 典型的인 非相競的 抑制를 Lineweaver-Burk plot 상에서 볼 수가 있었음으로 이를 添加物은 M_4 -LDH에 대한 非相競的 抑制劑임은 밝힐 수 있었다.

이와같은 抑制가 pyruvate를 基質로 하는 LDH의 逆反應에서도 典型的으로 나타날 것인가를 보기 위한 實驗에 있어서는(第VII表, 第7圖)豫期한 바와는 달리 sulfide ion의 경우는 아무런 影響이 없는 한편 Cysteine($1.0 \times 10^{-2}M$) 低濃度에 pyruvate, 즉 $10 \times 10^{-3}M$ 의 濃度로서는 현격한 抑制를 보였으나 그 以上の 濃度下에서는 거의 pyruvate만을 사용하였을 때와 비슷해졌으므로 이 경우, 즉 pyruvate를 基質로 하는 反應系에 있어서는 lactate를 基質로 하였을 때와는 달리 cysteine만이, 그것도 低濃度의 pyruvate存在下에서 抑制하였을 뿐, 하등의 非相競的 抑制의 根據를 얻을 수 없었다.

그러나 cysteine의 M_4 -LDH 抑制 profile을 第7圖에서 보건대 이 條件下에서는 마치 cysteine이 allosteric inhibitor인듯한 印象을 주고 있으며, M_4 -LDH가 allosteric한 特性을 가졌다는 것은 이미 Fritz³⁹⁾가 報告한 바 있지만 本論文의 結果만으로서서는 速斷키 어려운 것이다.

結 論

1. 토끼 대퇴筋肉에서 M_4 -LDH를 DEAE-cellulose로 처리하여 대략 14배정도로 部分精製하였다.
2. M_4 -LDH 活性은 산물인 pyruvate에 의하여 抑制되어 그 0.02M로써 22% 정도로 活性이 減少된다.
3. Sulfide 이온은 그 자체가 갖는 抑制效果때문에 pyruvate 抑制效果를 약간 강하게 한다.
4. Cysteine은 M_4 -LDH 活性에 대한 pyruvate 抑制效果를 低濃度에서는 減少시키지만 高濃度에서는 이 抑制效果를 거의 無視하고 cysteine 그 자체의 억제효과만을 나타낸다.
5. Lactate를 基質로 하는 反應系에서는 sulfide 이온

및 cysteine은 자기 非相競的 抑制를 보인다.

6. Pyruvate를 基質로 하는 反應系에서는 cysteine은 allosteric인듯한 抑制效果를 보이지만 sulfide 이온은 아무런 效果를 미치지 않는다.

ABSTRACT

A Study on the Properties of M_4 -LDH Purified Partially from the Thigh Muscle of Rabbits

Yung Choi and Seung won Kim

College of Medicine, Seoul National University

1. The M_4 -LDH was partially purified approximately 14 fold of its activity from the thigh muscle of rabbits by means of salting-out with ammonium sulfate and of DEAE-cellulose column chromatography.

2. The activity of the M_4 -LDH was inhibited by 0.02M pyruvate to 22% of the original activity.

3. Sulfide ions, when added to the reaction system using lactate as the substrate, accentuated the inhibition already brought by pyruvate alone.

4. Cysteine, on the other hand, when treated similarly as sulfide ions, decreased the magnitude of pyruvate inhibition in its lower range of concentration, but showed its own inhibitory effect without regard to the pyruvate inhibition in its higher range of concentration.

5. When lactate was used as substrate, both sulfide ions and cysteine played as a non-competitive inhibitors.

6. When pyruvate was used as substrate, cysteine showed an apparently allosteric effect, while sulfide ions showed no particular effect different from pyruvate induction itself.

REFERENCES

1. Wiland, T. and Pfeleiderer, G.: *Biochem. Z.*, 329, 112 (1957).
2. Markert, C.L.: *In Hereditary, developmental and immunological aspects of kidney disease, Vol. III, p. 54 (Metcoff, J., ed.) Northwestern University Press (1962).*

3. Cahn, R.D., Kaplan, N.O., Levine, L. and Zwilling, E.: *Science*, 136, 962 (1962).
4. Markert, C.L. and Apella, E.: *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 103, 915(1953).
5. 禹榮男, 金昇元: 大韓泌尿器科學會雜. 13, 9(1972) *Korean J. Urol.*
6. Chilson, O.P., Costello, L.A. and Kaplan, N.O.: *J. Mol. Biol.*, 10, 349 (1964).
7. Epstein, C.J., Carter, M.M. and Goldberger, R.F.: *Biochim. Biophys. Acta*, 92, 391 (1964).
8. Clausen, J. and Hustrulid, R.: *Biochim. Biophys. Acta*, 167, 221 (1968).
9. Clausen, J. and Hustrulid, R.: *Biochem. J.*, 111, 219 (1969).
10. Goldman, R.D., Kaplan, N.O., and Hall, T.C.: *Cancer Res.*, 24, 389 (1964).
11. Pfleiderer, G. and Wachsmuth, E.D.: *Biochem. Z.*, 334, 185 (1961).
12. Brody, J.A., *Neurology*, 14, 1091 (1964).
13. Garcia-Bunuel, L., Garcia-Bunuel, V. Green, L. and Sulvin, D.K., *Neurology*, 16, 491 (1956).
14. Güttler, F. and Clausen, J.: *Enzymol. biol. Clin*, 8, 456 (1967).
15. Güttler, F. and Clausen, J., *Biochem. J.*, 114, 839 (1969).
16. 鄭德載, 金昇元: 서울醫大雜誌. *Seoul J. Med.*, 12, 209 (1971).
17. Dawson, D.M., Goodfriend, T.L. and Kaplan, N.O.: *Science*, 143, 929 (1964).
18. Wilson, A.C., and Kaplan, N.O.: *Nature*, 197, 331 (1963).
19. Fondy, T.P. Pesce, A., Stolzenbach, F., Freedberg, I. and Kaplan, N.O.: *Biochemistry*, 3, 522 (1964).
20. Pesce, A., McKay, R.H., Stolzenbach, F., Cahn R.D. and Kaplan, N.O.: *JBC*, 239, 1753 (1964).
21. Shaw, C.R. & Barto, E.: *Proc. Natl. Acad. Science*, 50, 211 (1963).
22. Kaplan, N.O.: *JBC*, 242, 2151 (1967).
23. Pfleiderer G. and Mella. K.: *In Enzymes and Isoenzymes. (Shugar, D., ed.) Academic Press*, p. 154 (1970).
24. Rajewsky, K.: *Biochem. Biophys Acta*, 121, 51 (1966).
25. Rosalki, S.B. & Wilkinson, J.H.: *Nature*, 188, 1110 (1960).
26. 李麒相, 金昇元: *Korean Med. J. (綜合)*, 15, 17 (1970).
27. 장청순, 이진순: 中央醫學. *Korean Central J. Med.*, 20, 17(1971).
28. 金昇元, 鄭弘根, 朴壽勳, 崔榮, 安賢瑄, 朴源益: 中央醫學. *Korean Central J. Med.*, 24, 547(1973)
29. Neiland, J.B.: *Methods in Enzymology (Boyer et al., ed.) Academic Press, Vol. 1, New York*, p. 449, (1955).
30. Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J.: *JBC*, 193, 265 (1951).
31. Oyama, V.I. & Eagle, H.: *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.*, 91, 305 (1956).
32. Folin, O. & Ciocalteu, V.: *JBC*, 73, 627 (1927).
33. Vesell, E.S. & Bearn, A.G.: *J. Gen. Phys. ol.*, 45, 553 (1962).
33. Boyd, J.W.: *Biochem. Biophys Acta*, 132, 221 (1967).
34. Bergmeyer, H.U., Berst. E. & Hess, B.: *In Enzymatic Analysis (Bergmeyer, ed.) Academic Press*, p. 736 (1963).
35. Wilson, A.C., Cahn R.D. and Kaplan, N.O.: *Nature*, 197, 331 (1963).
36. Plagemann, P.G.W., Gregory, K.F., and Wroblewsky, F.: *Biochem. Z.*, 234, 37 (1961).
37. Nisselbaum, J.S. and Bodansky, O.: *J. Biol. chem.*, 236, 969 (1961).
38. Hakala, M.T., Glaid, A.J., and Achwert, G. W.: *J. Biol. chem.*, 221, 191 (1956).
39. Fritz, P.J.: *Science*, 156, 82 (1967).
40. Vesell, E.S.: *Science*, 150, 1735 (1965).
41. Papaconstantion, J.: *Science*, 156, 338 (1967).
42. 최창홍, 정기홍: 中央醫學. *The Korean Central J. of Medicine*, 15, 273 (1968).
43. Wuntch, T., Vesell, E.S., and Chen, R.F.: *J. Biol. Chem.*, 244, 6100 (1970).
44. 신용찬: 서울醫大雜誌. *The Seoul Journal of Medicine*, 13, 71 (1972).
45. Gutfreund, H., Cantwell, R. and McMurray, C.H.: *Biochem. J.*, 106, 683 (1968).
46. Herbert A. Sober ed.: *Handbook of biochemistry, The Chemical Rubber Co.*