

개의 대뇌후두엽 조직의 Guanine Aminohydrolase에 관한 연구

A Study on the Guanine Aminohydrolase in the Tissue of Occipital Lobe of Dog Brain

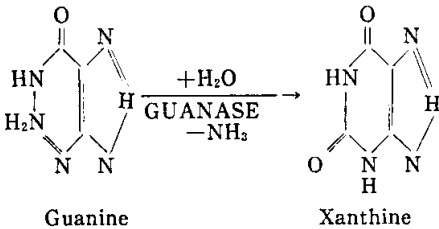
서울대학교 의과대학 생화학교실 및 안과학교실

<指導 尹 東 浩 副教授>

韓 京 淑

서 론

Guanine aminohydrolase(E. C. 3. 5. 4. 3)는 guanase 또는 guanine deaminase(GDA)라고도 하는 것으로써 purine 異化대사의 종말반응을 다음과 같이 촉매하는 효소이다.



즉 purine 대사에 있어서 그 nucleotide 인 AMP 는 가수분해되어 inosine phosphate 로 전환되면서 ammonia 를 유리해내며, 이 inosine phosphate 는 그 일부가 nucleoside phosphorylase 의 작용으로 inosine 이 되었다가 다시 hypoxanthine 으로 전환된다. 한편 guanine 도 xanthine 과 같은 수준에 있는 鹽基로서 前記한 바와 같이 GDA 에 의한 가수분해를 입음으로써 脫아미노 基반응을 통하여 xanthine 으로 전환된다. 그러므로 xanthine 은 두개의 purine 分子의 공통중간산물이라고 볼 수 있으며, 이와같이 생성된 xanthine 은 xanthine oxidase 의 基質이 되므로 산화물거쳐 尿酸이 되고 체내에서는 urate 이온으로 존재하기에 이르는 것이다.

이와같은 GDA 의 대사적기능과 그 임상적응용 등은 최근 金¹⁾의 종설에 詳論되어 있는 바와 같으며, 이의 조직에서의 활성분포가 특히 뇌조직에 매우 높다는 사실이 여러 연구자들에 의하여 밝혀진 바 있다^{2, 3, 4)}. 이

미 Schmidt⁵⁾는 1932년에 GDA 활성이 간조직에 높다고 보고한 바 있거니와 식물조직에서 이 효소의 존재를 처음 밝힌 것은 Schittenhelm⁶⁾으로써 1909年이었다.

Knight 등⁷⁾에 의하면 이 효소의 활성이 높은 조직은 뇌를 비롯하여 간 및 신조직이며, 他장기에는 없거나 있어도 미미하다고 보고하였다. 이와 흡사한 보고로서 Levine, Hall 및 Harris⁸⁾는 GDA 활성의 高低로서 장기를 三群으로 大別하고 있는 바 濕重量 100mg 당 500 μ g 이상인 간, 신, 뇌와 100~500 μ g 인 대장 및 소장, 그리고 0~100 μ g 인 나머지 조직이 그것이다.

이들은 생식기관, 순환기관의 조직을 비롯해서 내분비기관, 조혈장기의 조직, 피부조직 등에서 전혀 GDA 의 활성을 검색 못하였고, 임파조직에서도 역시 그렇다고 하였지만 Block 와 Johnson⁹⁾에 의하면 흰쥐의 피부에도 GDA 의 활성이 있다는 것이다. 사람 피부와는 달라도 흰쥐의 피부에는 역시 purine 異化대사계가 존재함을 示唆하는 사실이다. 이러한 存否의 差異를 Block 와 Johnson⁹⁾은 효소추출방법이 부적당한 경우 검색치 못하게 되리라고 했다. 또한 前者는 RBC 에도 GDA 활성은 있다고 하였지만 Hershko 등¹⁰⁾에 의하면 역시 RBC 도 외부에서 첨가한 guanine 을 hypoxanthine 으로 전환하는 고로 purine 異化대사가 있음을 확인하였으며, 다만 GDA 나 xanthine oxidase 가 缺如되어 있기 때문에 간에서와는 전혀 다른 양식으로 guanine 이 전환된다는 것이다.

이밖에도 clostridium acidurici¹¹⁾, lingcod 의 근육¹²⁾ 바퀴¹³⁾, 그리고 초파리¹⁴⁾ 등에서도 GDA 활성이 검색되고 있지만 상당한 種特異의 活性差를 보이는 것이다. 즉 개, 토끼 및 사람의 RBC 에는 전혀 GDA 활성이 없는 반면, 마우스, 흰쥐, 그리고 hamster 등의 RBC

에는 높은 활성이 있으며, 사람과 토끼의 심장 GDA 는 그 활성이 검출되지 않지만 마우스, 흰쥐, hamster, 그리고 개의 심장에는 상당한 활성이 있는 것을 본다⁸⁾.

한편 흰쥐의 뇌의 5,000~15,000×g 간의 분획, 즉 輕 mitochondria 를 Triton X-100으로 처리하고 23배로 GDA 를 부분정제한 결과에 의하면¹⁵⁾ 35%의 회수율을 보이고 있으며, -16°C에서는 장기간 안정하고 최적 pH는 8.0이며, 흥미있는 사실은 輕 mitochondria 의 GDA 는 억제제에 의하여 억제받지 아니하나 세포질의 용해성 분획의 GDA 는 억제를 받는데 상반된 특성을 보이는 점이라 하겠다.

이와같은 부분정제를 통한 특성구명의 보고예는 매우 드문 것으로서 Kumar 등¹⁶⁾이 Triton X-100 및 DEAE-cellulose 등을 사용해서 흰쥐뇌에서 부분정제한 바가 있을뿐 별로 없다.

한편 GDA 역시 LDH 에서와 같은 isoenzyme 의 특성을 가졌다는 사실이 Kumar 등¹⁶⁾과 Lee¹⁶⁾와 Kim¹⁷⁾ 등에 의해서 보고된 바도 있다. Lee¹⁶⁾는 이와같은 isoenzyme 적 특성을 Li₂SO₄와 calcium phosphate gel 을 사용하여 흰쥐의 간 및 뇌에서 GDA 를 약 30배 부분정제하고 strach gel 로 전기영동하므로써 분명히 하였던 것이다. 또한 Lee¹⁶⁾에 의하면 다만 尿素에 의한 變性이나 Ca⁺⁺ 및 Mg⁺⁺에 의한 活性化樣相만은 兩者가 흡사하다는 것이다.

뇌 GDA 의 활성분포를 보면 세포의 각 分割에 모두 함유되어 있으나 특히 輕 mitochondria 에 가장 그 활성이 높은 것으로되어 있으며, 重 mitochondria 에는 도리어 강력한 GDA 의 억제제가 함유되었다는 것이 알려져 있다⁸⁾.

뿐만 아니라 Kumar 등¹⁶⁾은 흰쥐의 뇌에서는 그 15,000×g 上清液의 활성을 관찰하였던 바 hyperbolic 한 동력학적 특성을 갖는 것과 sigmoidal 한 특성을 갖는 두가지의 GDA 가 있다고 보고하였으며, 한편 마우스의 뇌에서도 같은 현상을 관찰하였을 뿐 아니라 이양 GDA 가 DEAE-cellulose column chromatography 로서 분명히 구분된다고 하고 있다.

또한 최근 Kumar 등¹⁷⁾은 흰쥐의 뇌에는 그 mitochondria 성분내 GDA 의 inhibitor 가 있음을 보고하였다. 그리고 이러한 inhibitor 가 뇌조직에서의 대사조절을 하고있는 것으로 推論하였다.

Kumar¹⁸⁾에 의하면 흰쥐의 경우 出生때부터 GDA 의 활성은 뇌조직에 존재하며, 성숙한 쥐에서 발견되는 natural inhibitor 는 生後 15日頃, 즉 뇌조직의 발육이 거의 완결된 시기에 나타나기 시작한다고도 보고한 바

가 있다.

한편 Dawson¹⁹⁾에 의하면 고양이의 소뇌에는 GDA 활성이 전연 없음이 밝혀졌으며, purine 대사에 관여하는 효소의 缺乏이 지능저하를 가져오기도 한다는 보고²⁰⁾와 아울러 朴동²¹⁾이 보고한 바 있듯이 저지능아의 뇌척수액 GDA 가 매우 크게 감소되는 사실 등을 감안할 때 뇌조직의 GDA 가 갖는 의의는 다양하다고 보겠다.

그러나 이와같은 문제보다도 더욱 근본적이고 중요한 문제는 이 효소의 기본적특성을 분명히 밝히는 데 있다고 하겠거니와 특히 그 활성이 높은 뇌조직에 분포되어 있는 GDA 의 특성구명이 앞서야 될 것으로 판단한 저자는 특히 대뇌 후두엽의 GDA 에 관심을 갖고 이를 간 GDA 의 특성과 비교 검토해 오던중 후두엽의 GDA 가 갖는 효소로서의 동력학적 특성을 우선 밝혀내고 이를 시신경등이 집중적으로 포함되어있는 대뇌 후두엽에서 관찰하므로써 이미 보고된 諸 研究者들의 결과와 비교코저 하였다.

근년에 이르도록 대뇌의 각부분을 구별하여 GDA 특성을 살펴본 報告는 없으며, 더욱이 실험동물 중에서도 소동물만을 사용해온데 착안하여 저자는 대동물인 개를 택하고 저자의 임상적 관심이 안과영역에 있으므로 시신경 中樞가 포함되어 있는 대뇌후두엽 부위의 GDA 가 갖는 특성이 他뇌조직 GDA 의 그것과 어떠한 특성 差를 보일 것인가를 本 論文에서 구명하려고 한 것이다

실험 방법

1. 실험대상 및 재료

실험동물로서는 재래종 잡견인 體重 15kg 내외의 개를 雌雄을 가리지 않고 7마리 사용하였으며 목 부분을 強打하여 희생시킨 後 頭蓋의 정중선을 切開하여 腦를 손상치 않고 양쪽에서 各各 한개씩의 大脳半球를 분리해 냈다.

분리된 大脳의 후두엽 부위를 大脳의 양측에서 분리하여 즉시 혈액 기타의 체액 부착물을 寒冷 생리적 식염수로 洗滌하여 blot 하고 秤量하였으며 冷蔵하지 않고 즉시 다음과 같이 분석에 사용하였다.

2. 조직의 처리

上記와 같이 秤量한 대뇌 후두엽 조직을 역시 寒冷한 0.25M sucrose 용액으로 정확히 一定량을 취하고 homogenize 하여 25%(w/v)의 균질액을 만들었다.

이 균질액을 冷凍원심분리기에 의하여 600×g 로 10分間 원심하여 核성분 및 세포막 성분등을 제거하고 일

단 세포질의 上清液을 얻었다.

이를 다시 $15,000 \times g$ 로 10分間 원심하여 mitochondria 성분을 제거하고 그 上清液을 회수하여 이를 효소의 試料로 삼았다. 한편 mitochondria는 따로이 그 浮遊液을 만들어 두었다가 mitochondria 성분의 억제시험에 사용하였다.

3. 단백질의 定量

試料中에 함유된 효소의 比活性을 검색하기 위하여 試料에 함유된 단백질을 Lowry法²²⁾에 의하여 분석하되 다음과 같은 방법을 사용하였다.

즉 소의 혈청 albumin(Nutrition Biochemicals 제품)을 표준으로 삼고 이의 질소량을 미리 micro-Kjeldahlometry에 의하여 분석하고 표준용액으로서 사용한 것이다.

적당량의 효소試料에 Folin-Ciocalteu의 Phenol시약²³⁾을 가하고 물색반응케 하여 이를 Spectronic-20을 사용해서 750nm의 파장에서 定量분석하였다.

이때에 Lowry²²⁾의 原法에 의하지 않고 다음과 같이 약간의 변법을 사용하였다. 즉 0.1N NaOH에 2% Na_2CO_3 와 0.2% potassium tartrate를 동시에 용해한 용액과 0.5%의 CuSO_4 용액을 50:1의 容量比로 혼합한 Stock 용액을 만들어 사용하였는 바, Lowry의 原法에서는 potassium tartrate가 CuSO_4 와 함께 용해된 것으로서 이 copper-tartrate 용액에서는 철전물이 생기므로 이를 막기 위하여 이와 같이 처방을 달리한 것이다.

분석術式은 試料 1.0ml에 前記한 Stock 용액 5.0ml를 가하고 잘 혼든 다음 10분간 실온에 방치하고, 곧 이어서 희석한 phenol시약 0.5ml를 빨리 역시 혼들면서 가하여 실온에 30분간 방치한 다음 앞에서 언급하였듯이 비색분석한 것이다.

4. GDA 活性의 測定

GDA 활성은 guanine이 가지는 245nm의 파장에서의 최고흡광도(O.D.) 저하로써²⁴⁾ 또는 xanthine oxidase 반응과 couple하여 생성되는 尿酸에 기인하여 증가하는 290nm의 파장에서의 O.D.로써 정량이 가능하다.²⁵⁾

이뿐만 아니라 Berthelot의 phenate-hypochlorite 반응을 이용하여 GDA의 활성을 물색반응으로써 분석하는 Caraway²⁶⁾의 방법등이 있으나 그 예민도가 가장 높은 UV 분광분석법을 다음과 같이 시행하였다.

즉 基質로서 guanine을 사용하고 효소試料와 함께 30分間 incubate한 다음 10% HClO_4 를 가하여 반응을

중지케 하고 침전한 단백질을 원심분리하여 제거하였다 다음 그 上清液의 O.D.를 245nm에서 측정하고 incubation을 거치지 않고 바로 HClO_4 를 가한 對照用의 試料에서 얻은 O.D.와 비교하여 GDA의 측대로 감소한 guanine의 量을 guanine의 extinction coefficient ($0.06\text{M}^{-1}\text{cm}$)로써 산출하였다.²⁴⁾

이때 사용한 반응系の 처방은 다음과 같다.

1. Guanine 基質용액: 1.2μ moles
2. 0.1M. Tris buffer: 100μ moles
3. 효소試料: 0.2ml

上記 효소試料는 GDA의 활성이 過多하였기에 이를 25倍로 희석한 後 사용하였으며 이 반응系の 總量은 4ml가 되도록 조정하였다.

O.D.측정은 Parkins-Elmer Spectrophotometer를 사용하였으며 extinction coefficient로 算出한 결과를 30分間의 incubation으로써 轉換된 guanine의 μ mole數로 간주하고 이를 1 unit로 삼았다.

실험 결과

1. 基質特異性

GDA의 基質인 guanine에 대한 本實驗의 GDA가 갖는 特異性을 관찰한 결과는 第1表 및 第1圖와 같으며, 基質과 initial velocity와의 相關關係를 double reciprocal로 표현한 Lineweaver-Burk plot에 의하면 그 K_M 值가 0.26mM이었다.

2. 安定性

단백질의 第3次 구조를 형성하는 수소결합의 와해를

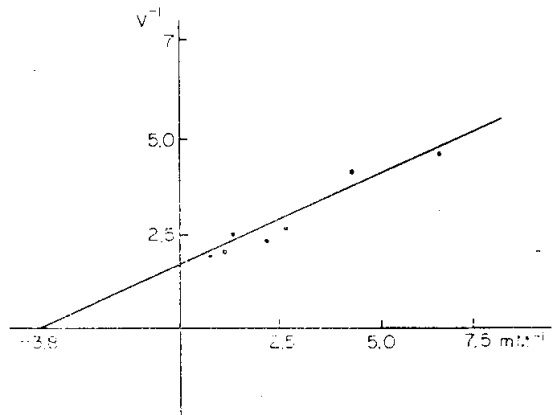


Fig. 1. A typical Lineweaver-Burk plot of the GDA obtained from occipital lobe of dog brain.

Table I. Initial velocity of the crude GDA preparation obtained from the occipital lobe of dog brain, with various concentrations of guanine.

substrate concentrations(mM)	0.150	0.225	0.375	0.450	0.750	0.900	1.350
activities(unit/ml)	0.218	0.247	0.377	0.435	0.483	0.479	0.500

Table II. Urea denaturation of the activity of present GDA.

urea conc. (M)	0	0.7	1.4	2.8	4.2	5.6	7.0
activity (unit/ml)	0.305 (100%)	0.268 (87.9)	0.254 (83.3)	0.225 (73.8)	0.160 (52.5)	0.094 (30.8)	0.036 (11.8)

Table III. Heat stability of GDA at 50°C

Incubation period (min)	0	30	70	120
Enz ¹⁾	0.573 (100%)	0.551 (96.2)	0.471 (82.2)	0.413 (72.1)
Enz ²⁾ + albumin	0.529 (100%)	0.522 (98.7)	0.450 (85.1)	0.435 (82.2)

1) Enz. solution: Buffer(0.02M Tris buffer pH 8.0)=1:1

2) Enz. solution: Albumin(7g/100ml)=1:1

3. pH의 영향

GDA 활성이 pH에 대하여 어떠한 의존성이 있는가를 살펴본 결과는 第IV表에 요약한 바와 같으며, 이를 第3圖에 圖示한바로써 분명하듯이 單一한 peak를 보였을 뿐만 아니라 pH 7에서 9에 이르는 폭넓은 pH optima를 보였었다.

4. 효소농도의 영향

第V表에 요약한 바와 같이 基質농도를 충분하게 유

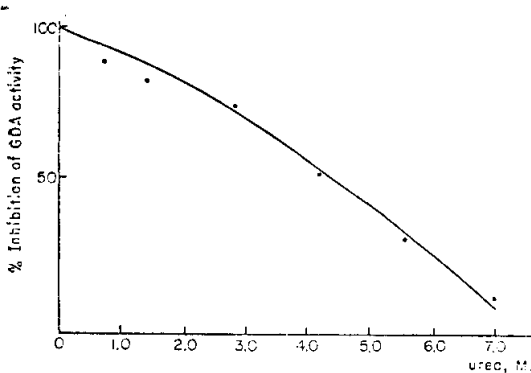


Fig. 2. Urea denaturation of the present GDA as expressed on the basis of inhibited percentage.

가져옴으로서 효소의 변성을 일으키는 것으로 알려진 urea나 guanidine-HCl에 의한 영향을 검토한 결과 guanidine HCl은 2.0M의 농도로서 완전히 本 실험의 GDA를 不活性化 하였으며, urea에 대해서는 第II表에 요약한 바와 같이 前者보다는 약간 저항하는듯 하였다. 즉 7.0M. urea로서는 약 12%에 달한 活性이 그대로 남아 있음을 본다. 이와같은 變性の 정도를 百分率로 圖示하면 第2圖과 같다.

한편 本 實驗에 사용한 GDA의 耐熱性を 50°C에서 시간별로 incubate 처리하므로써 관찰하였던 바 第III表에 요약한 바와 같은 결과를 얻었다.

즉 효소만을 50°C에서 incubate 하면 30분만에 약 4%, 70분에는 약 18%, 그리고 120분에는 약 28%의 不活性化를 보았으며, 이러한 熱처리에 의한 活性손실은 소혈청 albumin을 加하므로써 효소를 安定케 하여 같은 方法으로 관찰한 결과 이와같은 albumin 첨가는 아무런 보호의 효과가 없음을 보았다.

이르써 분명한 것은 本 GDA가 매우 耐熱성이 높음을 알 수 있었다.

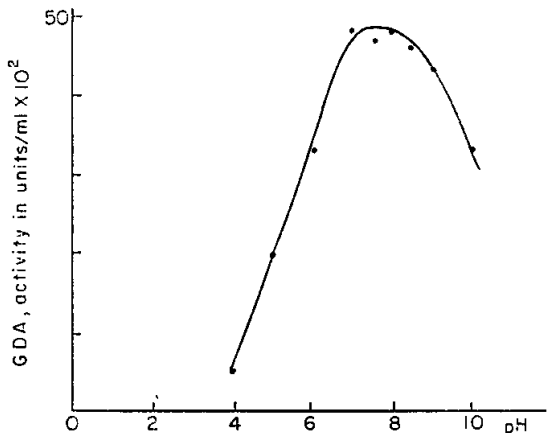


Fig. 3. pH-activity profile of the present GDA.

Table IV. Activity of GDA as a function of pH.

pH	4.0	5.0	6.0	7.0	7.6	8.0	8.4	9.0	10.0
activity (unit/ml)	0.051	0.203	0.334	0.479	0.471	0.479	0.464	0.428	0.363

Table V. Effect of enzyme concentration on initial velocity of GDA.

Enz. concentration	1*	2	4	8
Δ O. D.	0.025	0.048	0.900	0.127

* Folds of enzyme concentrations

지한 반응계에 있어서는 효소의 농도를 증가함에 따라서 그 initial velocity 가 어느 범위內에서 kinetic study 를 할 수 있을 것인가를 관찰한 결과 Δ O.D. 가 0.100 이하인 경우에서만이 가능하고 그 이상은 효소농도에 비례하는 initial velocity 를 보이고 있지 아니하였다. 이를 第4圖에서 분명히 알 수 있다.

5. 무기이온의 영향

무기이온이 GDA 에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 1mM 의 $MgCl_2$ 와 0.1mM 의 $CaCl_2$, $CuSO_4$, $MnCl_2$, $FeCl_2$, $FeCl_3$, pb-acetate, $HgCl_2$, $COCl_2$ 및 KCN 등을 incubation mixture 에 加하고 GDA 반응속도에 미치는 영향을 관찰하였다.

이중 CN^- 을 비롯하여 대부분의 이온이 아무런 영향을 미치지 아니하였으며, 다만 Mg^{++} 이 약 10%의 活性 감소를 가져왔으며 Hg^{++} 은 거의 100%의 活性 감소를 초래하였다.

이와같은 결과는 Kumar 등⁴⁾의 관찰과 흡사하나,

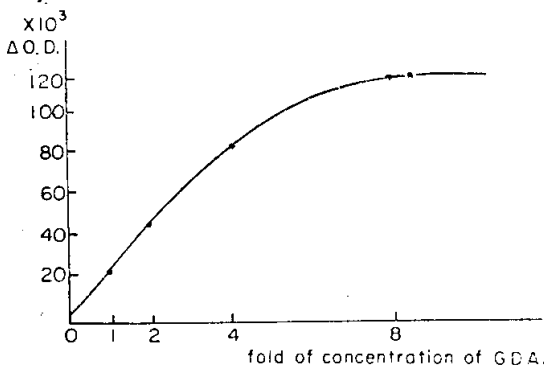


Fig. 4. Effect of enzyme concentration on the Δ O.D., showing no kinetic study can be possible beyond 0.100 of Δ O.D.

GDA 의의 他 효소에 대한 무기이온의 영향과는 크게 다름을 알 수 있었다.

6. Mitochondria 分割의 영향

Kumar 등²⁹⁾이 흰쥐의 뇌 및 간조직에서 보고하였듯이 세포질의 5,000~15,000 \times g 에서 分割되는 輕 mitochondria 에는 없으나 700~5,000 \times g 사이에 分割되는 重 mitochondria 는 natural inhibitor 를 갖는 것으로 보고하였다.

本 實驗에서도 이와같은 重 mitochondria 성분에 만일 그러한 natural inhibitor 가 존재한다면 GDA 活性 의 감소를 초래할 것이므로 개의 대뇌 후두엽조직에서 이러한 inhibitor 의 존재를 증명하기 위하여 이미 얻고 있는 粗 GDA 製品에다 미리 分割해둔 重 mitochondria 성분을 반응계에 첨가하고 그 活性變化를 관찰하였던 바 의의 있는 活性 감소를 전혀 관찰할 수 없었다.

따라서 개의 대뇌 후두엽조직에서 얻은 重 mitochondria 성분에는 흰쥐의 그것과 달리 natural inhibitor 가 없는 것으로 推定되었다.

7. Xanthine 및 hypoxanthine 의 영향

GDA 반응의 산물인 xanthine 과 아울러 그 유도체인 hypoxanthine 등이 산물抑制現象을 餘他的 효소, 이를테면 LDH 가 pyruvate 에 의해서 억제되듯이 보이는가를 관찰하였던 바 아무런 억제효과를 보지 못하였다.

이러한 산물억제가 없다는 사실로서 미루어 GDA 반응계는 산물억제가 LDH 에 있어서 처럼 動力學的 調節 機轉이 아님을 알 수 있었다.

8. GDA 의 協同現象

Krishnan 과 그 공동연구자들이²⁹⁻³⁴⁾ 최근에 흰쥐 뇌 및 간조직에 있어서는 可溶性 GDA 가 DEAE-cellulose column 에서 분명히 서로 다른 A, B 兩 isoenzyme 으로 나누어짐을 보고하고 그중 A-GDA 가 allosteric 인 데 반하여 B-GDA 는 non-allosteric 이라 하였거니와 本 實驗에서도 이와같은 allosterism 有無를 관찰하기 위하여 低농도의 guanine 에서는 억제하고, 高농도에 있어서는 活性化하는 sigmoid 性이 있을 것인가를 관찰하였다.

第5圖에서 보듯이 대부분의 경우, 전형적인 hyper-

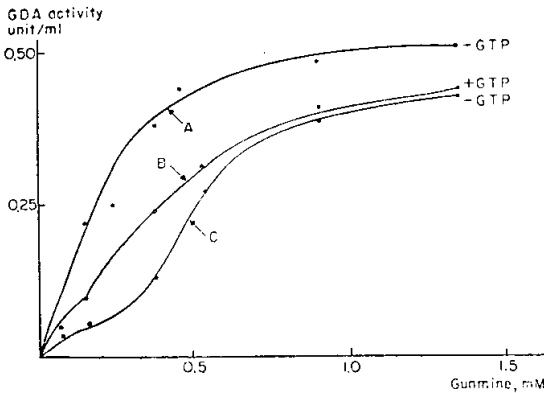


Fig. 5. Initial velocity and V_{max} of GDA with the substrate, showing a typical hyperbolic relation (A), an allosteric cooperativity (C) without GTP, and abolishment of it with GTP. (B)

볼릭한 활성을 보였으나(第5圖, A) 한 실험예에 있어서는 약간의 sigmoid 性을 보였고(第5圖, C) 이러한 協同現象은 GTP 를 첨가함으로써 消失되는 것을 보았다.(第5圖, B)

그러나 전형적인 A의 경우는 GTP가 하등의 영향을 미치지 아니하였다. 그러므로 이것만으로써 개의 대뇌 후두엽조직 GDA가 allosteric 하다고 할 수는 없으나, 적어도 allosteric 한 효소분자와 non-allosteric 한 효소분자가 공존하는 試料일 수도 있겠다고 생각되었다.

고 찰

Kumar 등¹⁷⁾이 지적한 바 있거니와 흰쥐의 뇌조직 GDA는 그 용해성 분획에 활성이 높은 것이며, 세포의 固型成分에 없는 것은 아니나 이성분의 GDA는 Triton으로 처리함으로써¹⁸⁾ 용해성 분획으로移行케 할 수가 있다. 말하자면 세포내의 활성분포는 이와같이 분명한 2個의 분획에 있는 것이다.

그러나 GDA의 作用機轉에 대해서는 Schmidt⁵⁾에 의해서 처음 이 효소가 記錄된지 40년이 가까이된 오늘날에 있어서도 자세히 알려져 있지 않다.

근년에 이르러 Biswas와 Abrams²⁷⁾의 보고에 의하면 순수한 효소系를 비롯하여 NADH와 ribose-1-phosphate의 공급源을 사용한 反應系로써 관찰한 결과 guanine에서 hypoxanthine으로 이르는 환원반응은 xanthine이 NADH와 xanthine oxidase에 의해서 hypoxanthine이 되고난 다음 nucleoside phosphorylase의 존재하에 inosine으로 전환되는 산화경로에 의해서 stabilize 되는 경로가 있다는 것이 밝혀졌다.

이에 반해서 Hershko 등¹⁰⁾에 의하면 사람이나 토끼의 적혈구 또한 체외에서 투여한 guanine이 hypoxanthine으로 전환되는 증거를 제시하고 전기 Biswas가 Abrams²⁷⁾의 機轉과는 약간 달리 guanine이 inosine-5'-phosphate로 脫아미노基 반응이 환원적으로 일어나기에 앞서서 guanine이 guanosine-5'-phosphate로 되는 것임을 밝히고 있다.

이와같이 guanine이 IMP를 거쳐 adenyate로 되는 경로가 관심의 대상이 되고 있는 한편 guanine이 xanthine을 거쳐 uric acid로 轉換되는 代謝經路를 攪하는 guanase 自體에 대한 연구는 Kumar 등^{3, 4, 16, 17, 18)}이 활발한 연구를 진행중이나 비교적 알려진 바가 적은 편임은 앞에서 말한대로이다.

Hodge와 Glassman¹⁴⁾이 초파리에 의해서 연구한 결과를 보면 purine 대사에 관여하는 adenosine deaminase를 비롯하여 inosine phosphorylase, xanthine dehydrogenase 및 deaminase 등은 4者 사이에 coordinate expression을 하고있는 이 효소들의 mutant gene이 缺如되어 있다고 하며, 따라서 이 4효소중 어느것에 의해서도 purine에서 uric acid로 轉換되는 代謝回路調節은 없는듯 하다는 示唆을 한 바 있다.

그러나 저자가 本論文에서 의도한 근본적 특성구명의 하나는 유전적 水準에서의 代謝回路調節은 없다 할지라도 purine 體에서 GDA作用만 있으면 purine 體를 떠나 uric acid로 되는 GDA과정만은 반드시 효소의 動力學的 調節機轉이라도 있어야 마땅할것 같기에 이를 구명하려한데 목적이 있었다.

Roy와 Roy²⁸⁾는 최근 lingcod 근육의 GDA의 基質特異性을 연구한 결과 이효소의 기질로서는 lactam tautomeric form이 要求된다는 것을 밝혔고 Kumar 등²⁹⁾은 重 mitochondria 분획에 natural inhibitor가 있음을 흰쥐의 小腦에서 보고하였다. 그러나 本研究의 결과는 개의 대뇌 후두엽조직의 重 mitochondria 분획에는 이러한 inhibitor가 없는 것을 보여주었다.

그러므로 그들이 예상하고 있듯이 GDA가 이 natural inhibitor와 결합한 GDA의 latent form이 重 mitochondria 분획에 있으리라는 것은 그들이 흰쥐의 대뇌만을 관찰한 결과이므로 모든 동물의 조직에 공통된 것으로 판단되는 어려운 것이라 하겠다. 이들은 이 inhibitor를 Triton X-100같은 detergent를 사용하여 분리하여 부분정제까지 하였고^{17, 29)} 이 inhibitor가 존재하는 particulate GDA를 제거한 soluble GDA라 하더라도 이것이 DEAE-cellulose column chromatography에 의하면 A와 B GDA로 命名되는 2個의 電氣泳動像

의 移動率이 다른 isoenzyme 이 있다고 보고한 바가 있다⁴⁾.

그러나 개의 대뇌 후두엽에는 분명히 GDA 의 natural inhibitor 가 mitochondria 分割에 없는 것 같으며, 동물에 따르는 存否의 차이는 무엇에 기인하며, 그것이 어떤 의의를 갖는것인가는 本論文의 결과로는 알 수 없으며, 다만 本實驗에서는 GDA 의 활성이 매우 높아서 粗製品인 GDA 임에도 불구하고 활성측정시에 약 30배로 희석치않고는 측정이 불가능할 정도이었다. 이와같이 고양이 小腦에는 없는¹⁰⁾ GDA 가 후두엽에 이와같이 高活性인 사실은 근육조직에는 總 nucleotide 의 2~3%에 불과한 guanine nucleotide 가 뇌조직에는 18~20%에 달한다는 사실²⁾과 相關되기는 하나 아직도 뇌 GDA 의 명확한 代謝上의 役割은 규정짓기가 어렵다.

本 실험에서의 pH profile 은 Roy¹²⁾의 결과와 흡사히 7.0~9.0까지 폭넓은 optima 를 보이거나 그가 보고한 바와 같이 두개의 peak 가 있지는 않고(pH 5.6과 8.5) 단일한 peak 만이 있는 점은 도리어 Schmidt⁵⁾나 Rokosky¹¹⁾ 및 Mansoor 등³⁰⁾과 Rough 와 Norris²⁴⁾와 Kumar 등²⁹⁾의 보고와 흡사하였다.

한편 熱처리에 의한 活性消失의 程度를 보면 50°C 에서 2時間을 incubate 하여도 하등의 活性變化를 볼 수 없었던 點으로 보아 이 GDA 의 耐熱性은 대단히 높은 것을 알 수 있었다. Roy¹²⁾는 35°C 로 5時間만 처리하여도 67%의 活性消失이 있다고 보고한 바가 있으며, Kumar 등²⁹⁾도 50°C 로 5분만 incubate 하여도 거의 전부의 活性이 없어진다고 보고한 결과와 비교하면 耐熱性에 큰 차이가 있으며, 이 역시 前記한 重 mitochondria 의 inhibitor 役割과 함께 동물 조직에 따라 다른 것을 알 수 있었다.

安定성과 관련하여 urea 나 guanidine-HCl 같은 H-bond 의 disruptor 인 變性劑에 대한 태도를 보면 guanidine-HCl 은 2M 로써 완전히 變性시키나 urea 의 경우는 7M 에서 완전히 活性이 없어지는 것을 보면 GDA 는 前者에 비해서 後者に 약간 저항하는 것임을 알 수가 있다.

이와같은 차이는 무기 ion 의 영향에서도 볼 수 있었다. 즉 本 研究의 결과에 의하면 Ca⁺⁺, Cu⁺⁺, Mn⁺⁺, Fe⁺⁺, Fe⁺⁺⁺, Pb⁺⁺, Co⁺⁺, CN⁻ 등은 모두가 아무런 영향을 미치지 못하여 Kumar 등²⁹⁾의 보고와 상반되고 있음을 본다. 다만 Hg[#]은 100%의, 그리고 Mg[#]은 10%의 억제 효과를 미치고 있었을 뿐이다. 따라서 무기이온의 영향에서도 동물조직에 따르는 GDA 특성의 차를 알 수가 있다. 本 論文처럼 Cu[#]가 영향을 미치지 못하는 사실

은 Roy¹²⁾가 Iingcod 의 근육에서 報告한 예가 있는 하다.

基質에 대한 親和力을 보면 本 研究결과는 guanine 에 대한 K_M 値가 0.26mM 로서 Kumar 등²⁹⁾이 얻은 環취 뇌조직의 K_M 値(1.2~1.66mM)와 약간 차이가 있으나 本 실험결과 밝혀진 바로는 initial velocity 의 관찰은 ΔO. D. 가 0.100이하야만 가능하지 그 이상이 되는 GDA 농도나 基質농도에서는 不可能하다는 사실이다

本 實驗에서 크게 주목할 점은 개 대뇌의 후두엽조직 GDA 는 xanthine 이나 hypoxanthine 이나 uric acid 에 의한 產物억제는 전혀 볼 수 없고 따라서 이러한 產物에 의한 GDA 과정의 반응속도의 조절기전은 없는 것으로 보인다. 그러나 이러한 산물억제 역시 동물에 따라서 GDA 가 특성을 달리하므로 Kumar 등³¹⁾은 allantoin 같은 產物로 環취나 mouse 의 뇌 및 간조직의 GDA 를 非相競的으로 억제할 수가 있었다고 보고하였다. 뿐만 아니라 더욱 흥미있는 사실은 이 GDA 가 本 실험에서 示陵되고 있듯이 경우에 따라서는 guanine 基質에 대하여 allosteric 한 것 같다는 점이다. 그리고 이 allosterism 으로 해서 생긴 sigmoid 性的의 協同現象이 GTP 로써 없어진다는 점이다. 즉 GTP 가 이 allosterism 에 대한 positive modifier 가 될 수 있다는 사실이 밝혀진 셈이며 GMP 나 GDP 등 guanine 의 nucleotide 및 nucleoside 인 guanosine 은 이러한 modifier 가 되지 않는 것도 밝혀진 것이다.

이와같은 allosterism 에 대해서는 Krishnan 과 그 共同研究者들^{4), 32), 33), 34)}이 1968年 이래 環취의 간과 뇌조직에서 밝힌바 있는 사실로서, Kumar 등²⁹⁾은 環취 뇌 및 간에서 분리한 그들의 soluble GDA 중의 A 및 B 兩 GDA isoenzyme 중에서도 다만 A-GDA 만이 guanine 에 대해서 協同現象을 보이는 allosterism 을 나타내는데 반해서 B-GDA 는 이러한 allosterism 이 없는 것이라고 지적하였다. 그리고 역시 本 研究에서처럼 GTP 존재하에서는 그 A-GDA 의 sigmoid 性이 없어지고 Hills plot 에 의하면 GTP 로써 GDA 의 K_M 値가 5.3×10⁻⁶M 에서 4×10⁻⁶M으로 감소한다는 것이다.

이들에 의하면 이 GDA 에 대한 GTP 의 activation 은 濃度依存性이며 GTP 로써 pH profile 에 하등의 변동도 없으며 Hg[#]억제가 없어지는 것도 아니라고 한다.

그리고 環취 간에서는 allosteric 한 효소가 allantoin 에 의해서 억제되지만 뇌에서는 non-allosteric 한 효소가 allantoin 으로 억제된다는 등 동력학적 특성의 차이를 보고한 바 있다.

本 실험의 경우 효소試料를 그 A, B 兩 isoenzyme

으로 구별하여 관찰한 것이 아닌 까닭에 분명치는 않으나 대개의 경우 guanine 에 대해서 hyperbolic 한 initial velocity 를 나타내었으나 한 실험 예에서 많은 數次 되풀이한 관찰에서도 sigmoid 性이 관찰되었다.

그리고 이 sigmoid 性은 GTP 의 첨가로 없어졌던 것이고 hyperbolic 한 경우 GTP 가 아무런 효과를 나타내지 못하였었다.

이와같은 사실은 개의 대뇌 후두엽에도 allosterism 을 갖는것과 갖지 않는 두 isoenzyme 이 있음을 暗示하는 점으로서 앞으로의 研究가 더욱 기대되는 것이다.

결 론

개의 후두엽조직에서 ammonium sulfate 에 의한 鹽析으로써 粗 GDA 製品을 얻고 그 효소적 특성을 本論文에서 구명하고 다음과 같은 결론을 얻었다.

1) 개의 대뇌 후두엽조직 GDA 의 guanine 基質에 대한 K_M 値는 0.26mM 이다.

2) 이 GDA 는 높은 耐熱性을 가지는 효소이며, urea 나 guanidine-HCl 에 의해서 變性되나 後者가 더욱 强하게 不活性化시킨다.

3) 이 GDA 의 pH profile 은 그폭이 매우 넓어서 pH 7.0~9.0이며 單一 peak 를 갖는다.

4) Ca^{++} 을 비롯해서 Cu^{++} , Mn^{++} , Fe^{++} , Fe^{+++} , Pb^{++} , Co^{++} 및 CN^- 등 무기이온들은 GDA 에 아무런 영향을 미치지 아니하나 Hg^{++} 은 100%의, Mg^{++} 은 약 10%의 억제효과를 보인다.

5) 개의 대뇌 후두엽조직의 mitochondria 分割에는 natural inhibitor 가 존재하지 않으며 xanthine 및 hypoxanthine 등에 의한 產物억제는 없다.

6) 이 GDA 가 allosteric 일 수도 있다는 증거와 함께 이때의 協同現象에 대해서 GTP 가 positive modifier 일 수도 있다는 증거를 얻었다.

ABSTRACT

A Study on the Guanine Aminohydrolase in the Tissue of Occipital Lobe of Dog Brain

Kyung Sook Han, M.D.

Department of Ophthalmology Medical College
Seoul National University

(Directed by Assoc. prof. Dong Ho Yoon)
Seung Won Kim)

Crude preparation of the guanine aminohydrolase was obtained from the occipital lobe tissue of dog

brain by means of salting-out with ammonium sulfate, and the enzymatic properties were observed with the following conclusions.

(1) The K_M value of the crude GDA toward the substrate, guanine, was 0.26mM.

(2) The GDA was highly heat-stable, and inactivated by urea and guanidine-HCl, the magnitude of the inhibition by the latter being more prominent than the former.

(3) The GDA had a single and broad spectrum of its pH-versus activity profile, ranging from pH 7.0 to 9.0.

(4) Among the inorganic ions examined, Ca^{++} , Cu^{++} , Mn^{++} , Fe^{++} , Fe^{+++} , Pb^{++} , Co^{++} , CN^- displayed no effect on the GDA activity, whereas Hg^{++} showed 100% and Mg^{++} about 10% inactivation of the enzyme.

(5) There was no evidence of the presence of the natural inhibitor of the present GDA in the mitochondrial fraction of the tissue of the occipital lobe of dog brain, and of product inhibition by xanthine and hypoxanthine as well.

(6) There was an indication of possible allosteric property in the present preparation of GDA with GTP as its positive modifier against the alleged cooperative phenomenon.

REFERENCES

- 1) 金昇元; *Guanine Deaminase* 의 基礎와 臨床; 首都分院醫學誌, 1, 5-25(1974)
- 2) Talwar, G. P., Goel, B. K., Mansoor, M., & Panda, N. C.; *Guanase activity in brain; J. Neurochem.*, 8, 310-311 (1961)
- 3) Kumar, K. S., Tewari, K. K., & Krishnan, P. S.; *Guanine-deaminase activity in rat brain and liver; Biochem., J.*, 95, 797-802 (1965)
- 4) Kumar, K. S., Sitaramayya, A. & Krishnan, P. S.; *Guanine deaminase in rat liver and mouse liver and brain; Biochem., J.*, 128, 1079-1088 (1972)
- 5) Schmidt, G.; *Z. Physiol. Chem.*, 208, 185, (1932) In S. W. Kimm; *Guanine deaminase* 의 基礎와 臨床; 首都分院醫學誌, 1, 5-25 (1974)
- 6) Schittenhelm, A.; *Z. Ph. iol. Chem.*, 63, 289, (1909) In S. W. Kimm; *Guanine deaminase* 의 基礎와 臨床; 首都分院醫學誌, 1, 5-25 (1974)
- 7) Knights, E. M., Jr., Whitehouse, J. L., Hue, A. C. & Santos, C. L.; *Serum guanase determi-*

- nation: A liver-function test; *J. Lab. Clin. Med.*, 65, 355-360 (1965)
- 8) Levine, R., Hall, T.C., and Harris, C.A.; *Guanase activity in normal and neoplastic human tissue; Cancer*, 16, 269-272(1963)
 - 9) Block, W.D. & Johnson, D.V.; *Studies of the enzymes of purine metabolism in skin, I. Guanase activity of rat skin; J. Biol. Chem.*, 43, 43-48 (1955)
 - 10) Hershko, A., Wind, E., Razin, A. & Mager, B.; *Conversion on guanine to hypoxanthine in mammalian red blood cells; Biochem. et Biophys. Acta*, 71, 609-260(1963)
 - 11) Rokosky, J., Jr. & Beck, J.V.; *Guanase degradation by Clostridium acidivirici, I. Evidence for the presence of guanase; J. Bact.*, 69, 563-565(1955)
 - 12) Roy, J.E.; *Lingcod muscle guanine deaminase; Canad. J. Biochem.*, 44, 1093-1098(1966)
 - 13) Pierre, L.; *Guanase activity of the symbionts and fat bodies of the cockroach, Leucophaea maderae.; Nature*, 208, 666(1965)
 - 14) Hodge, L.D. & Glassman, E.; *Purine catabolism in Drosophila Melanogaster, II Guanine deaminase, inosine phosphorylase and adenosine deaminase activities in mutants with altered xanthine dehydrogenase activities; Genetics* 57, 571-577 (1967)
 - 15) Kumar, S., Tewari, K.K. & Krishnan, P.S.; *Solubilization and partial purification of particulate guanine deaminase from rat brain; J. Neurochem.*, 13, 1550-1552(1966)
 - 16) 李相傑: *Partial purtial purification and molecular heterogeneity of guanine aminohydrolase from mouse liver and brain; Korean Cent. J. Med.*, 17, 421-438(1969)
 - 17) Kumar, S., Tewari, K.K. & Krishnan, P.S.; *Partial purification of guanine deaminase inhibitor from rat brain; J. Neurochem.*, 12, 1003-1004(1965)
 - 18) Kumar, S.; *Guanine deaminase in developing rat brain; Arch. Biochem. Biophys.*, 130, 692-694(1969)
 - 19) Dawson, D.M.; *Absence of guanine deaminase from cerebellum; Neurology*, 21, 621-626(1971)
 - 20) Seegmiller, J.E., Rosenblum, F.M., Kelley, W.N.; *Enzyme defect associated with a sex-linked human neurological disorder and excessive purine synthesis; Science*, 155, 1682-1684(1967)
 - 21) 朴貞愛, 金慈煥, 趙玉子, 金昇元; 低知能兒 뇌척수액의 *Guanine Deaminase* 활성 및 그 Isozyme 에 관한 연구. *소아과*, 10, 23-29(1967)
 - 22) Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J.; *Protein measurement with the Folin phenol reagent; J. Biol. Chem.*, 193, 265-275(1951)
 - 23) Folin, O. & Ciocalteau, V.; *J. Biol. Chem.*, 73, 627(1927) from *Data for Biochemical Research*, ed. by Dawson, R.M.C. et al., Oxford(1968) p 618.
 - 24) Roush, A. & Norris, E.R.; *Deamination of 8-azaguanine by guanase; Arch. Biochem.*, 29, 124-129(1950)
 - 25) Al-Khalich; U.A.S., Aftimos, S., Susharrafiéh, S. & Khuri; N.N.; *A method for the determination of plasma guanase on finger-tip blood; Clin. Chem. Acta*, 29, 381-384(1970)
 - 26) Caraway, W.T.; *Colorimetric determination of serum guanase activity; Clin. Chem.*, 12, 187-189(1966)
 - 27) Biswas, B.B. & Abrasm, R.; *Formation of hypoxanthine from guanine in rat liver extracts; Arch. Biochem. & Biophys.* 92, 507-511(1961)
 - 28) Roy, J.E. & Roy, K.L.; *The mechanism and specificity of guanine deaminase; Canad. J. Biochem.*, 45, 1263-1269(1967)
 - 29) Kumar, S., Josan, V., Sanger, K.C.S., Tewari, K.K. & Krishnan, P.S.; *Studies on guanine deaminase and its inhibitors in rat tissue; Biochem. J.*, 102, 691-704(1967)
 - 30) Mansoor, M., Kalyankar, G.D. & Talwar, G.P.; *Biochem. Biophys. Acta*, 77, 307(1963), In Roy, J.E.; *Lingcod muscle guanine deaminase; Canad. J. Biochem.*, 44, 1093-1098(1966)
 - 31) Kumar, K.S., Sitaramayya, A. & Krishnan, P.S.; *Modulation of Guanine Deaminase; Biochem. J.*, 131, 683-687(1973)
 - 32) Josan, V. & Krishnan, P.S.; *Regulation of rat liver guanine aminohydrolase by GTP; Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 31, 299-302(1968)
 - 33) Kumar, K.S. & Krishnan; *An allosteric and a non-allostric guanine deaminase isozyme in rat liver supernatant; Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 39, 1087-1093(1970)
 - 34) Sitaramayya, A. & Krishnan, P.S.; *Allotestism in rat brain supernatant guanine deamiase; Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 40, 565-569 (1970)