

생체막 구조의 변화에 따른 5'-Nucleotidase 활성의 변화

Changes in the Activities of 5'-Nucleotidase relating to the Structural Change of the Membrane

서울대학교 의과대학

*소아과학교실, **생화학교실

김철규 · 최한웅*, 정흥근 · 이기영**

서 론

생체막에 결합된 효소는 그 활성을 위하여 막지질을 필요로 하거나 이에 의하여 조절된다(Duttera et al., 1968; Vessy & Zakim, 1971; Emmelot & Bos, 1968). 생체막은 phospholipase(Zakim, 1970), 유기용매(Slater & Sawyer, 1971) 또는 detergent(Helenius & Simons, 1972; Makino et al., 1973) 처리로써 변형될 뿐만 아니라 막지질의 과산화(Pfeifer & McCay, 1971; Power et al., 1977)에 의해서도 변형된다. 이에 따라 막에 결합된 효소의 활성은 현저히 감소(Joergense, 1974; Kamataki & Kitagawa, 1973; Chung & Lee, 1977)하므로 막지질은 막에 결합된 효소의 conformation유지에 필요한 것으로 생각된다. 막지질을 구성하고 있는 고급불포화지방산(Stadler & Kleinig, 1971; Colbeau et al., 1971; Hoeven et al., 1975; Comte et al., 1976)은 그 전이온도가 매우 낮지만 여기에 cholesterol이 함유됨으로써 그막의 fluidity가 조절된다(Ladbrooke et al., 1968). 이에 따라 각종 대사물의 투과(Martonosi, 1975) 및 효소활성이 조절될 것으로 생각된다.

Plasma membrane은 homogenize하는 용액의 여러 조건 즉 pH, 2가 금속이온의 농도, shear force, 이온 강도등에 의하여 입자의 크기가 달라지고 상태도 달라진다. Plasma membrane이 파괴되어 cell ghost 또는 판막형태로 된 것은 1500×g에서 15분으로 원침되며 큰 vesicle은 10,000×g에서 25분으로 mitochondria와 함께 침전되고 작은 vesicle은 endoplasmic reticulum의 작은 vesicle과 함께 105,000×g에서 1시간 원침으로 microsomo분획에 나타난다(Maddy, 1976).

Subcellular fractionation에서 plasma membrane을 생화학적으로 확인하는 방법중의 하나는 plasma membrane에 결합된 5'-nucleotidase의 활성을 측정하는 것이다(Gerlach & Hiby, 1974). 5'-Nucleotidase는 Mg²⁺이온에 의하여 활성화된다고 보고된 바(Ahmed & Reis, 1958) 있지만 저자들은 그 활성화되는 정도가 membrane의 상태에 따라 일정하지 않음을 관찰하였다. 저자들은 그 결과가 막구조의 변화에 기인하는 것으로 가정하고 막구조의 변화에 따르는 5'-nucleotidase 활성의 변화를 좀 더 구체적으로 연구하여 그 결과를 보고하는 바이다.

실험재료 및 방법

실험재료

서울의대 동물실에서 사육한 체중 200~300g의 Sprague Dawley 종의 흰쥐를 암수 구별없이 사용하였다.

AMP와 bovine serum albumin은 Sigma Chem. Co. (St. Louis, Mo., U.S.A.)로부터 Tris, trichloroacetic acid (TCA), sucrose외의 무기시약은 Merck Co. (Darmstadt, Germany)로부터 구입하였다.

간 homogenate의 조제

경동맥을 절단하여 희생시킨 흰쥐로부터 즉시 간을 적출하여 냉각된 0.25M sucrose용액에 넣고 가위로 잘게 자른후 혈전에 맞는 teflon pestle로 된 Potter-Elvehjem homogenizer에 옮긴 후 Arthur H. Thomas Co.제 homogenizer motor의 가장 낮은 회전수로 3번 상하로 움직이며 homogenize하였다. 이에 0.25M sucrose를 더 가하여 10% (w/v) homogenate가 되도록 하였다.

Homogenate의 원심분리

Homogenate를 600×g로 10분간 원침하여 핵을 제거한 상청액을 다시 2000×g로 20분간 원침하여 침전과 상청액으로 분리하였다. 이 침전을 0.25M sucrose에 부유시키어 suspension을 만들고 이를 2000×g분획으로 삼았다.

2000×g상청액을 15,000×g(MSE Centriscan 75, angle rotor 8×50ml)로 12분간 원침하여 침전과 상청액으로 분리하였다. 여기서 얻은 침전을 0.25M sucrose에 부유시키어 mitochondria분획으로 삼았으며 그 상청액을 105,000×g(MSE Centriscan 75, angle rotor 8×50ml)로 1시간 원침하였다. 상청액을 버리고 그 침전을 0.25M sucrose에 부유시키어 microsome 분획으로 삼았다.

막분획의 sonication

막분획을 Sonifier Model W185(Heat Systems-Ultrasonic Inc.)을 사용하여 최대출력으로 일음중탕속에서 30초 간격으로 3분간 sonify하였다.

5'-Nucleotidase의 활성측정법

효소활성측정계는 최종용량이 2ml이고 0.05M Tris buffer, pH 7.5, 1mM 5'-AMP의 조성으로서 membrane suspension 0.1ml을 함유하고 있다(Segal et al., 1960). 효소반응은 효소액으로 시작되었고 30°C에서 20분간 incubate한 후에 30% TCA 0.5ml를 가함으로써 정지되었다. 응고된 단백질을 원심분리하여 제거한 후에 AMP로부터 유리된 무기인을 Fiske와 Subbarow방법에 따라 정색시킨 후 UV-visible spectrophotometer(Pye Unicam, England)를 사용하여 파장 660nm에서 그 흡광도를 측정하였다.

효소활성측정계의 hypotonicity가 5'-nucleotidase의 활성에 미치는 영향을 검토할 때는 효소활성측정계에 AMP대신에 효소액을 가한 후 일정기간 동안 30°C에서 incubate한 후 AMP를 가함으로써 반응을 시작시켰고 20분후에 30% TCA를 가함으로써 반응을 정지시켰다. Mg²⁺이온 및 Ca²⁺이온 존재하에서 5'-nucleotidase의 활성을 측정할 때는 활성측정계의 총용량에는 변화없도록 MgCl₂ 또는 CaCl₂용액을 가하였고 각 이온의 농도는 활성측정계에서 희석된 최종농도로 표시하였다.

효소활성의 단위는 1시간동안 AMP로부터 1 μmole의 무기 인을 유리시키는 데 필요한 효소의 양을 1 unit로 정하고 비활성은 그 효소용액의 단백질 단위 mg에 대한 효소활성으로 표시하였다.

Tyndall효과측정

5'-Nucleotidase활성측정계에 membrane suspension

을 가하였을 때 membrane입자의 크기변화를 Tyndall 효과로서 측정하였다. 임의로 정해진 파장 500nm에서 그 활성측정계의 흡광도를 30°C와 16°C에서 각각 시간에 따라 측정하였다.

전자현미경사진

Mg²⁺이온 또는 Ca²⁺이온이 첨가된 활성측정계에 microsome분획을 각각 가하고 16°C에서 2시간동안 incubate한 후에 105,000×g(MSE Centriscan 75, swing-out rotor 5.5ml×6)로 1시간동안 원침하였다. 대조로서 microsome분획도 함께 원침하였다.

각 침전을 4°C의 2.5% glutaraldehyde 용액(0.1M phosphate buffer, pH 7.3)에 3시간동안 고정한 다음 1% osmium tetroxide에 재고정하였다. 이것을 ethanol과 propylene oxide로 탈수하여 Epon 812에 포매하였고 600~900Å의 초박편을 만들어 uranyl acetate와 lead citrate의 이중염색을 시행한 다음 AEI Corinth 500 전자현미경으로 관찰하였다(Brown et al., 1976).

지질과산화물의 측정

Microsome suspension 1ml에 10%(w/v) TCA 1ml를 가한 후 원심분리하여 침전을 제거하고 그 상청액 0.5ml를 취하여 0.67% thiobarbituric acid 3.5ml에 가하고 끓는 수조에서 10분간 가열하였다. Blank로서는 시료대신에 5% TCA 0.5ml를 사용하였다. 이것을 냉각시킨 후에 532nm에서 흡광도를 측정하였다(Kamataki & Kitagawa, 1973).

단백질정량

각 시료의 단백질은 Lowry방법(1951)에 따라 정량하였으며 표준단백질로는 결정 bovine serum albumin을 사용하였다.

실험 결과

Mg²⁺이온의 5'-nucleotidase활성에 대한 활성화효과

원위 간 plasma membrane을 입자크기별로 원심분리하여 얻은 2000×g분획, mitochondria분획 및 microsome분획의 5'-nucleotidase활성이 Mg²⁺이온의 농도에 따르는 변화를 관찰한 결과, 막의 입자크기에 관계없이 Mg²⁺이온의 활성과 효과는 10mM에서 가장 높고 그 이상의 농도에서는 점차 낮아졌다(표 1, 2, 3 및 그림 1, 2, 3).

그러나 같은 10mM Mg²⁺이온에 의하여 2000×g분획 및 mitochondria분획의 5'-nucleotidase활성은 대략 10%정도 증가하였지만 microsome분획의 5'-nucleotidase활성은 20%이상 증가하여 Mg²⁺이온의 효과는 plasma membrane의 입자크기에 관련이 있음을 보여

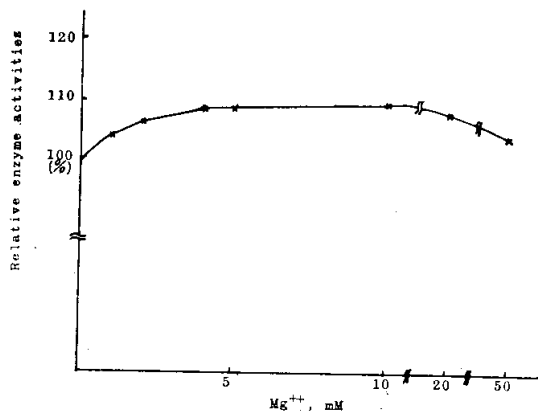


Fig. 1. Activation of 5'-nucleotidase of the 2000xg fraction by Mg²⁺ ions.

The activity of enzyme preparation was 0.62 μ moles of Pi released per hour per mg protein. Relative enzyme activities in the presence of Mg²⁺ were expressed as the percentage of the enzyme activity in the absence of Mg²⁺.

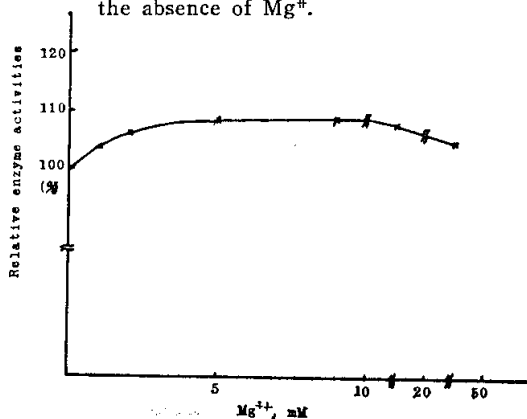


Fig. 2. Activation of 5'-nucleotidase of the mitochondrial fraction by Mg²⁺ ions.

The activity of enzyme preparation was 0.87 μ moles of Pi released per hour per mg protein.

주었다.

Tyndall효과

표 4 및 그림 4는 microsomal vesicle이 5'-nucleotidase활성 측정계 (30°C)에서 그 구조가 변화됨을 보여 주고 있다. Ca²⁺이온 및 Mg²⁺이온이 첨가되지 않은 효소 활성 측정계 (대조계로 약함)에서 microsome막의 Tyndall효과는 처음 10분 정도는 약간 감소하다가 그 후 서서히 증가하여 그 계의 hypotonicity에 의하여 입자 크기가 증가함을 보여주고 있다. Microsome막을 초음파로 파괴하여 그 입자를 작게 하고 Tyndall효과를

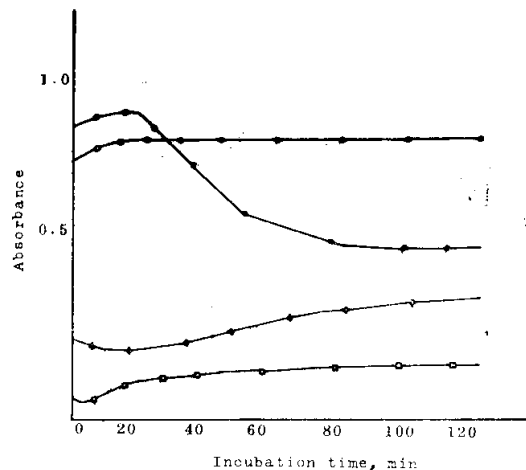


Fig. 3. Activation of 5'-nucleotidase of the microsomal fraction by Mg²⁺ ions.

The activity of enzyme preparation was 2.06 μ moles of Pi released per hour per mg protein.

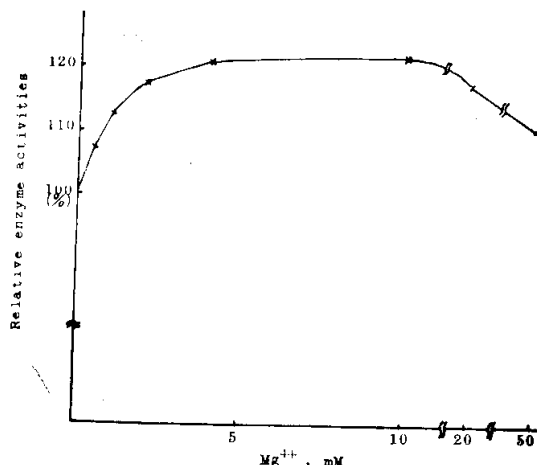


Fig. 4. Changes in Tyndall effect of the microsomal membrane in 5'-nucleotidase assay medium, with the incubation periods at 30°C.

The concentration of microsomal membrane was 0.067 mg protein/ml of the enzyme assay medium. The absorbances of the following suspensions were measured at the nonspecific wave length, 500nm.

- : Intact microsomal membrane in 5'-nucleotidase assay system +10mM CaCl₂.
- : Intact microsomal membrane in 5'-nucleotidase assay system +10mM MgCl₂
- △-△: Intact microsomal membrane in 5'-nucleotidase assay system
- : Sonified microsomal membrane in 5'-nucleotidase assay system.

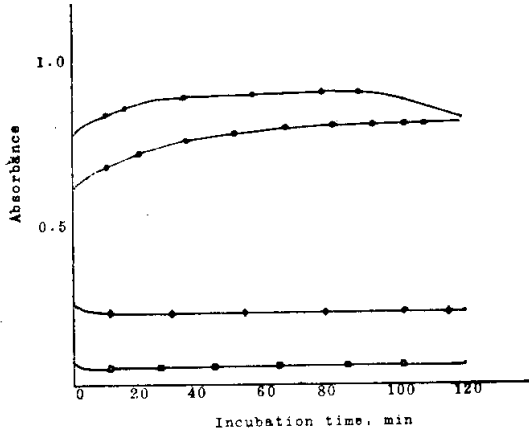


Fig. 5. Changes in Tyndall effect of the microsomal membrane in 5'-nucleotidase assay medium, with the incubation periods at 16°C.

The concentration of microsomal membrane was 0.067 mg protein/ml of the enzyme assay medium. The absorbances of the following suspensions were measured at the nonspecific wavelength, 500nm.

- : Intact microsomal membrane in 5'-nucleotidase assay system + 10mM CaCl₂
- : Intact microsomal membrane in 5'-nucleotidase assay system + 10mM MgCl₂
- ◆—◆: Intact microsomal membrane in 5'-nucleotidase assay system
- : Sonified microsomal membrane in 5'-nucleotidase assay system

측정한 결과, intact microsome막의 그것보다도 1/4정도로 감소하였다. 그러나 그 효과도 처음 5분 이내에는 약간 감소하다가 역시 서서히 증가하였다. 10mM Mg[#]이온이 첨가된 효소활성 측정계 (10mM Mg[#]이온계로 약함)에서 microsome막의 Tyndall효과는 대조계에서의 그것보다도 대략 3배 높고 10분 이내에 최대점에 이르고 2시간동안 일정히 유지되었다. 그러나 10mM Ca[#]이온계에서의 Tyndall효과는 10mM Mg[#]이온계에서의 그것보다 좀 더 증가하였지만 20분 후부터는 급격히 감소를 보여 주었으며 이때는 육안으로 응결된 입자들의 침전을 관찰할 수 있었다.

표 5 및 그림 5는 16°C에서 Tyndall효과의 변화를 보여주고 있다. 10mM Mg[#]이온계에서 microsome막의 Tyndall효과는 30°C에서 보다 매우 서서히 증가하였고 10mM Ca[#]이온계에서도 역시 서서히 증가하여 최고점에 이르고 한참 후에 감소하기 시작하였다. 그러나 대조계에서 intact microsome막이나 sonified microsome막의 Tyndall효과는 처음에만 약간 감소하고 그 후에

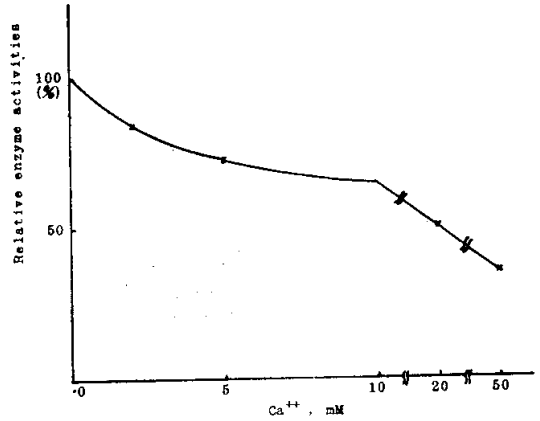


Fig. 6. Inhibition of 5'-nucleotidase of the microsomal fraction by Ca[#] ions.

The activity of enzyme preparation was 1.87 μmoles of Pi released per hour per mg protein.

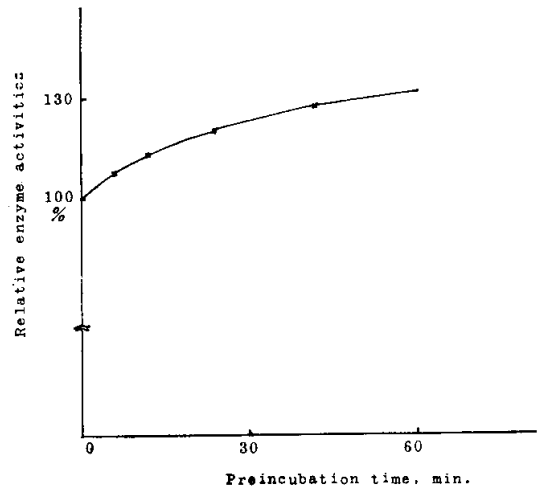


Fig. 7. Increase in 5'-nucleotidase activity of the microsomal membrane with the preincubation periods at 30°C.

The enzyme reaction was started with the substrate after incubation of the enzyme preparation in the enzyme assay buffer at 30°C. The activity of enzyme preparation was 1.94 μmoles of Pi released per hour per mg protein.

는 더 이상 변화없이 일정히 유지되었다.

Ca[#]이온의 5'-nucleotidase활성에 대한 억제효과

Ca[#]이온은 Mg[#]이온과는 달리 microsome막의 입자들을 응결시키는 효과를 가지고 있으므로 5'-nucleotidase활성에 미치는 영향을 검토한 결과 Ca[#]이온의 농도가 증가함에 따라 5'-nucleotidase활성은 억제되었으

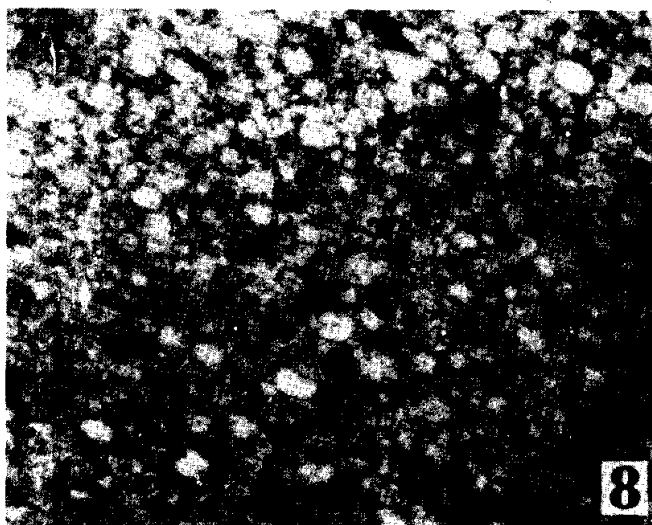


Fig. 8. Electron micrograph of the microsomal membrane in 0.25M sucrose, $\times 40,000$.

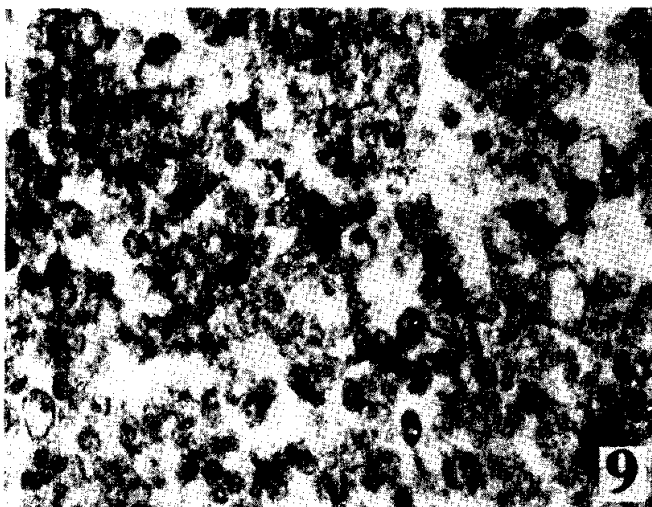


Fig. 9. Electron micrograph of the microsomal membrane incubated in the 5'-nucleotidase assay medium containing 10mM CaCl_2 at 16°C for 2 hour, $\times 40,000$.

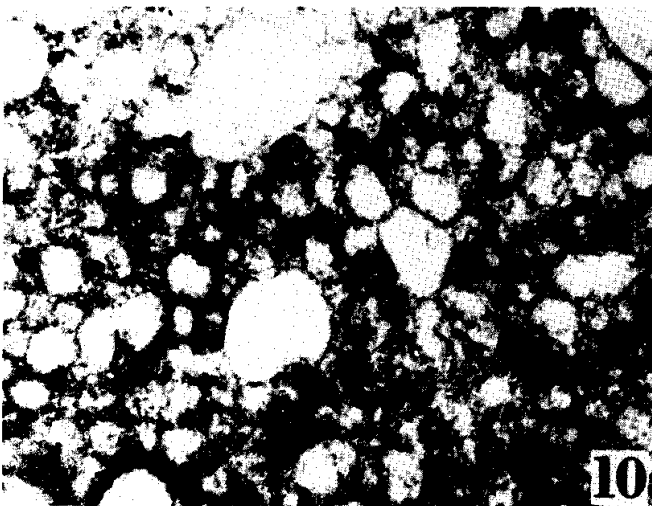


Fig. 10. Electron micrograph of the microsomal membrane incubated in the 5'-nucleotidase assay medium containing 10mM MgCl_2 at 16°C for 2 hour, $\times 40,000$.

며 10mM에서는 대조제에서의 활성의 65%에 이르렀다 (표 6 및 그림 6).

Hypotonicity의 5'-nucleotidase활성에 대한 활성화 효과

표 4 및 그림 4로부터 0.25M sucrose에 보존된 microsome막은 5'-nucleotidase 활성 측정계의 hypotonicity에 의하여 30°C에서는 그 구조가 서서히 변화됨을 알 수 있다. 이러한 구조의 변화가 5'-nucleotidase의 활성에 미치는 영향을 검토한 결과가 표 7 및 그림 7에 표시되어 있다. 효소액은 효소활성 측정계의 완충액(30°C)에 가하고 일정기간 incubate한 후에 기질인 5'-AMP를 가하여 효소반응을 시작시킴으로써 5'-nucleotidase의 활성을 측정 한 결과, incubate한 시간에 따라 효소의 활성이 증가하여 1시간 후에는 대략 30% 증가하였다.

전자현미경에 의한 microsome막의 관찰

표 4 및 5와 그림 4 및 5로부터 온도가 낮아지면 (16°C) microsome막은 5'-nucleotidase활성 측정계의 hypotonicity에 의하여 그 입자크기가 변하지 않으나 여기에 첨가된 Ca²⁺이온 및 Mg²⁺이온에 의하여는 서서히 그 입자가 커짐을 알 수 있다. 효소활성 측정계의 hypotonicity에 의한 microsome막의 구조변화의 가능성을 배제하고 여기에 첨가된 Ca²⁺이온 또는 Mg²⁺이온에 의한 microsome막의 구조변화를 확인하기 위하여 10mM Ca²⁺이온계 또는 10mM Mg²⁺이온계에 microsome막의 suspension을 가하고 16°C에서 2시간동안 방치한 후에 105,000×g로 1시간동안 원심하였다. 여기서 얻어진 침전을 전자현미경으로 관찰한 결과가 그림 9 및 10에 표시되어 있다. 대조로서 0.25 sucrose 용액에 보존된 microsome막의 침전도 전자현미경으로 관찰되어 그림 8에 표시되어 있다. 그림 8(0.25M sucrose)과 9(10mM Ca²⁺)사이에서 microsome막 입자의 차이는 인식할 수 없었으며 그림 8에는 입자가 field에 고루 분포되어 있으나 그림 9에는 입자들이 포도송이처럼 응결되어 있고 부분적으로 흰배경은 응결된 큰 입자사이의 공간으로 보인다. 그림 10(10mM Mg²⁺)에는 그림 8 및 9와는 달리 그 입자들이 매우 확대되었고 또한 field에 고루 분포되어 있다.

Aging이 5'-nucleotidase활성에 대한 효과

Microsome분획을 4°C냉장고에서 aging함에 따라 지질의 과산화물은 매우 급격히 증가하여 4일 후에는 microsome막의 단백질 단위 mg에 대하여 malondialdehyde로서 대략 8 nmole이 되었다. 이에 따라 효소의 활성도 매우 증가하여 4일 후에는 대략 40%이상 증

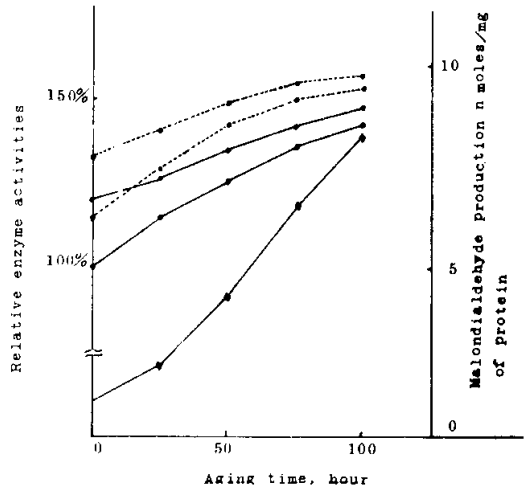


Fig. 11. Increases in the activities of 5'-nucleotidase of the microsomal fraction, with aging at 4°C.

The activity of the enzyme preparation was 1.90 μmoles of Pi released per hour per mg protein. Relative activities were expressed as the percentage of the activity of the freshly prepared, intact microsomal membrane. 5'-Nucleotidase activities of the microsomal membrane, intact or sonified were measured in the presence or absence of 10mM MgCl₂.

- — ○ : Intact
- — ● : Intact, 10mM Mg²⁺
- ... ○ : Sonified
- ... ● : Sonified, 10mM Mg²⁺

Lipid peroxide produced during aging period was measured by thiobarbituric acid test, which was expressed as n moles of malondialdehyde per mg protein

가 하였다. 그러나 aging기간에 따라 10mM Mg²⁺이온에 의하여 5'-nucleotidase의 활성증가는 점점 감소하는 경향을 보여주었다. Aging하기 전에 초음파로 파괴한 microsome막의 5'-nucleotidase활성은 intact microsome막의 그것보다 대략 15%정도 증가하였고 aging에 따라 intact microsome막이 보이는 경향과 비슷함을 보여주었다(표 11 및 그림 11).

고 찰

Plasma membrane에 결합된 5'-nucleotidase는 Mg²⁺이온에 의하여 활성화된다고 보고된 바 있지만(Ahmed & Reis, 1957), 저자들은 Mg²⁺이온에 의하여 활성화되는

cytoplasm내의 다른 효소들과는 달리 5'-nucleotidase는 그 활성화되는 정도가 매번 실험할 때마다 일정하지 않음을 관찰하였다. 저자는 그 이유가 plasma membrane의 구조상태에 관련이 있을 것이라고 가정하고 막구조의 변화에 따르는 효소활성의 변화를 검토하였다.

Plasma membrane의 입자크기에 따라 Mg²⁺이온이 5'-nucleotidase활성에 미치는 영향을 검토한 결과 그 효과는 작은 vesicle로 이루어진 microsomal분획에서 5'-nucleotidase의 활성증가가 가장 현저히 나타났다(표 3 및 그림 3).

이러한 결과는 microsomal vesicle의 구조변화에 기인하는 것으로 생각되어 Tyndall효과를 이용하여 그 vesicle의 크기변화를 검토하였다.

Microsomal막을 5'-nucleotidase활성측정계에 가하고 30°C에서 입자크기에 따르는 빛의 산란효과(Tyndall 효과)를 파장 500nm에서 측정할 결과, Tyndall효과는 10mM Mg²⁺이온제에서는 대조제에서보다 대략 3배 정도 증가하였고 2시간까지 그 효과는 일정하게 유지되었다. 한편 10mM Ca²⁺이온제에서의 Tyndall효과는 Mg²⁺이온제에서 보다 더 크게 증가하였지만 20분후부터는 급격히 감소하였고 응결된 입자들이 침전됨을 관찰할 수 있었다. 이로써 Mg²⁺이온과 Ca²⁺이온은 다같이 큰 Tyndall효과를 유발하였지만 그 기전이 다를 수 있었다. 즉 Mg²⁺이온은 각 입자들의 크기를 확대함으로써 Tyndall효과를 증가시켰고 Ca²⁺이온은 각 입자들을 응결시킴으로써 Tyndall효과를 증가시킨 것으로서 이러한 결과는 전자현미경 소견으로 확인되었다(그림 8, 9, 10).

이와 같이 Mg²⁺이온에 의하여 microsomal vesicle의 크기가 확대된다는 사실은 subcellular fractionation에서 이용될 수 있을 것으로 생각된다. microsomal vesicle이 확대되면 침전되는 centrifugal force가 달라지며 밀도가 달라지기 때문이다.

표 4 및 그림 4에서 보는 바와 같이 30°C의 대조제에서 microsomal vesicle의 Tyndall효과는 처음으로 약간 감소하다가 시간이 경과함에 따라 서서히 증가하였다. 이러한 현상은 다음과 같이 설명할 수 있다. 즉 0.25M sucrose용액에 부유되어 있는 microsomal vesicle은 효소 활성측정계에 가해질 때 20배로 희석되므로 이때 응결되었던 입자들이 각각의 입자로 해리됨으로써 Tyndall효과는 감소되고 그 후에는 그계의 hypotonicity에 의하여 입자가 점차 확대됨으로써 Tyndall효과가 서서히 증가하는 것으로 해석된다. 그러나 16°C

의 대조제에서 microsomal vesicle의 Tyndall효과는 처음에만 약간 감소하고 그 후에는 일정하게 유지되었다. 이러한 결과는 microsomal vesicle은 16°C에서 hypotonicity에 의하여 그 구조가 변화되지 않음을 보여 주었다. 이와 같이 온도에 따라 hypotonicity에 의한 microsomal막구조의 변화차이는 다음과 같이 설명할 수 있다. 즉 생체막의 주성분인 인지질은 불포화도가 높은 지방산(Stadler & Kleinig, 1971; Colbeau et al., 1971; Hoeven et al., 1975; Comte et al., 1976)을 포함하고 있고 여기에 cholesterol이 함유됨에 따라 그 fluidity(Ladbrooke et al., 1968)가 온도에 따라 달라지기 때문에 낮은 온도에서는 microsomal막은 hypotonicity에 의하여 그 구조가 변형되지 않는 것으로 생각된다.

Plasma membrane의 정제방법은 본래 Neville에 의하여 개발되고 그 후 수정(Neville, 1968; Ray, 1970)되었지만 조직을 homogenize하는데 사용하는 용액은 역시 1mM의 NaHCO₃로서 변화가 없었다. 그러나 homogenize하는 용액의 hypotonicity가 plasma membrane의 구조에 미칠 영향을 우려하여 Brown 등(1976)은 isotonic KCl을 사용하였고 Berman 등(1969)은 isotonic sucrose를 사용하였다. 그러나 본 실험의 결과는 낮은 온도에서는 hypotonicity에 의한 영향은 무시될 수 있음을 보여주고 있다.

표 4 및 그림 4의 결과에 의하면 microsomal vesicle은 30°C에서 hypotonicity에 의하여 그 구조가 서서히 변화되고 이에 따라 5'-nucleotidase활성은 표 7 및 그림 7에서 보는 바와 같이 증가하였다. 이러한 결과는 microsomal vesicle의 확대만으로는 설명할 수 없는 다른 원인이 있을 것으로 생각된다. 왜냐하면 hypotonicity에 의한 microsomal vesicle의 확대는 Mg²⁺이온을 가하였을 때보다 훨씬 미달하는데도 더 큰 효과를 유발하였다는 사실은 microsomal vesicle의 구조변화에 어떤 다른 원인이 있을 것으로 생각된다. 그러나 이러한 결과는 5'-nucleotidase측정방법에 매우 중요한 의의를 가진다. 대부분의 효소반응은 연구자의 편의에 따라 기질을, 또는 효소액을 가함으로써 효소반응을 시작시킬 수 있다. 그러나 5'-nucleotidase는 기질을 가하여 효소반응을 시작시키기 전에 이미 그 효소액의 preincubation 시간에 따라 활성이 증가하므로 5'-nucleotidase는 기질 대신에 효소액으로 효소반응을 시작시켜서 그 활성을 측정하는게 타당하다고 생각된다.

막지질의 고급 불포화지방산이 공기중의 산소에 의하여 과산화되어 2중결합이 끊어지면 생체막은 손상을

반으며 이에 따라 막구조의 변화가 있을 것으로 생각된다. 과연 표 11과 그림 11에서 보는 바와 같이 이러한 막구조의 변화에 따라 5'-nucleotidase활성은 급격히 증가하여 4일 후에는 대략 40%이상 증가하였다. 그러나 이러한 효소활성의 큰 증가는 막구조의 변화만으로는 설명할 수 없는 것 같다. 또한 sonified microsome은 이미 온전한 microsome에 비하여 매우 심한 막구조의 변화를 받았음에도 불구하고 aging에 따라 비슷하게 증가하였다는 사실은 막구조 변화외에 또 다른 원인이 있을 것으로 생각된다. 특히 막에 결합된 대부분의 효소들은 aging에 따라 효소분자 자체의 변성외에 효소를 결합하고 있는 지질의 과산화에 따라 그 활성이 급격히 저하(Chung & Lee, 1977; Kamataki & Kitagawa, 1973)되는 현상과 비교하여 볼 때 aging에 따른 5'-nucleotidase활성증가 기전을 밝히는 일은 매우 의미있을 것으로 생각된다.

요 약

Subcellular fractionation에서 plasma membrane을 생화학적으로 확인하는 방법의 하나로 그 막에 결합된 5'-nucleotidase의 활성을 측정하는 것이다. 5'-nucleotidase는 Mg²⁺이온에 의하여 활성화된다고 보고된 바 있지만 저자들은 그 활성화되는 정도가 plasma membrane상태에 따라 일정하지 않음을 관찰한 바 있어 이에 관하여 좀 더 구체적으로 연구하였다. 그 결과를 요약하면 다음과 같다.

1. 흰쥐간을 0.25M sucrose용액에 homogenize한 후 그 homogenate를 plasma membrane의 입자크기에 따라 2000×g분획, mitochondria분획 및 microsome 분획으로 나누고 각 분획에 대하여 Mg²⁺이온효과를 검토하였다. 그 결과는 microsome분획에서 가장 현저하였고(대략 20%증가) 가장 효과적인 Mg²⁺이온의 농도는 10mM이었다.
2. 10mM의 Mg²⁺이온이 존재하는 5'-nucleotidase 활성 측정계에서 microsome vesicle들은 그 크기가 확대되었으며 이러한 현상은 Tyndall효과 및 전자현미경으로 확인되었다.
3. 5'-Nucleotidase활성 측정계에서 10mM Ca²⁺이온은 microsome vesicle들을 응결시켰으며 이러한 현상은 Tyndall효과 및 전자현미경으로 확인되었고 5'-nucleotidase의 활성을 대략 30%정도 억제하였다.
4. 30°C의 5'-nucleotidase활성 측정계에서 microsomal vesicle은 그 계의 hypotonicity에 의하여 그 크

기가 확대되었지만 16°C에서는 그 크기에 변함없이 일정하였다. 이러한 결과는 Tyndall효과로서 관찰되었다.

5. 기질로서 효소반응을 일으키어 측정할 5'-nucleotidase의 효소활성은 30°C에서는 그 효소액의 pre-incubation시간에 따라 증가하였다. 그러나 효소첨가로 시작된 효소반응에는 이러한 현상을 보지 못하였다. 따라서 5'-nucleotidase는 효소로서 반응을 일으키어 그 활성이 측정되어야 한다고 생각된다.

6. Microsome분획을 4°C냉장고에서 aging함에 따라 지질의 과산화물은 급격히 증가하였으며 또 5'-nucleotidase의 활성도 증가하여 4일후에는 대략 40%증가하였다. Sonified microsome분획에서도 5'-nucleotidase활성은 aging에 따라 위와 비슷하게 증가하였다. 5'-Nucleotidase에 대한 Mg²⁺이온의 활성화효과는 aging에 따라 점차 감소하였다.

—ABSTRACT—

Changes in the Activities of 5'-Nucleotidase relating to the Structural Change of the Membrane

Chul Kyu Kim and Han Woong Choi

Department of Pediatrics

Hong Keun Chung and Ki Yung Lee

Department of Biochemistry

College of Medicine, Seoul National University

Assay of 5'-nucleotidase is a biochemical tool to identify the plasma membrane in subcellular fractionation. 5'-Nucleotidase was reported to be activated by Mg²⁺ ion but the authors observed that the degree of activation depended on the structural state of the plasma membrane. This experiment was performed to study further in detail the change in 5'-nucleotidase activity relating to the change of the structural state of the plasma membrane.

The results obtained are summarized as follows:

1. Rat livers were homogenized in 0.25M sucrose and the homogenate was fractionated into 2000×g fraction, mitochondrial fraction and microsomal fraction according to the particle size of the plasma membrane. The activation effect of Mg²⁺ ions on 5'-nucleotidase was tested on each fraction. The

effect was most pronounced in the microsomal fraction and the most effective concentration of Mg^{2+} ions was 10mM.

2. Microsomal vesicles increased in size in the presence of 10mM Mg^{2+} ions in the assay system of 5'-nucleotidase, which was confirmed by Tyndall effect and electron microscopy.

3. Microsomal vesicles were coagulated in the presence of 10mM Ca^{2+} ions in the assay system of 5'-nucleotidase, which was confirmed by Tyndall effect and electron microscopy and Ca^{2+} ions inhibited 5'-nucleotidase about 30% at the concentration of 10mM.

4. From Tyndall effect of the microsomal vesicles it was shown that the vesicles were slowly enlarged in the hypotonic assay system at 30°C, but the vesicles did not increase in size at 16°C.

5. When the activities of 5'-nucleotidase were measured by starting the enzyme reaction with the substrate, the activities of the enzyme were increased with increasing incubation period of the enzyme preparation in the enzyme assay buffer at 30°C before addition of the substrate. From this result it is concluded that the activities of 5'-nucleotidase should be measured by starting the enzyme reaction with the enzyme preparation.

6. The activity of 5'-nucleotidase in the microsomal fraction was increased with aging the microsomal fraction in the refrigerator at 4°C, which was accompanied by the increase in lipid peroxide. Thus the increase in the enzyme activity of the microsomal fraction was about 40% after 4 days' aging. The activation effect of Mg^{2+} ions on 5'-nucleotidase was decreased with aging.

REFERENCES

- Ahmed, Z. and Reis, J.L.: *The activation and inhibition of 5'-nucleotidase. Biochem. J.*, **69**:386, 1958.
- Berman, H.M., Gram, W. and Spirtes, M.A.: *An improved, reproducible method of preparing rat liver plasma cell membranes in buffered isotonic sucrose. Biochim. Biophys. Acta*, **183**:10, 1969.
- Brown, A.E., Lok, M.P. and Elovson, J.: *Improved method for the isolation of rat liver plasma membrane. Biochim. Biophys. Acta*, **426**:418, 1976.
- Chung, H.K. and Lee, K.Y.: *A study on the lipid peroxidation in mitochondrial fraction from rat liver. New Med. J.*, **20**:101, 1977.
- Colbeau, A., Nachbaur, J. and Vignais, P.M.: *Enzymic characterization and lipid composition of rat liver subcellular membranes. Biochim. Biophys. Acta*, **249**:462, 1971.
- Comte, J., Maisterrena, B. and Gautheron, D.C.: *Lipid composition and protein profiles of outer and inner membranes from pig heart mitochondria. Comparison with microsomes. Biochim. Biophys. Acta*, **419**:271, 1976.
- Duttera, S.M., Byrne, W.L. and Ganoza, M.C.: *Studies on the phospholipid requirement of glucose-6-phosphatase. J. Biol. Chem.*, **243**:2216, 1968.
- Emmelot, P. and Bos, C.J.: *Studies on plasma membranes. V. On the lipid dependence of some phosphohydrolases of isolated rat liver plasma membranes. Biochim. Biophys. Acta*, **150**:341, 1968.
- Fiske, C.H. and SubbaRow, Y.: *J. Biol. Chem.*, **66**:375, 1925.
- Gerlach, U. and Hiby, W.: *5'-Nucleotidase in Methods of Enzymatic Analysis. Vol. 2, Academic Press*, 1974, p. 871.
- Helenius, A. and Simons, K.: *The binding of detergents to lipophilic and hydrophilic proteins. J. Biol. Chem.*, **247**:3656, 1972.
- Hoeven, R.P. Van, Emmelot, P., Krol, J.H. and Oomen-meulemans: *Studies on plasma membranes. XXII. Fatty acid profiles of lipid classes in plasma membranes of rat and mouse livers and hepatomas. Biochim. Biophys. Acta*, **380**:1, 1975.
- Joergensen, P.L.: *Purification and characterization of (Na⁺+K⁺)-ATPase. III. Purification from the outer medulla of mammalian kidney after selective removal of membrane components by sodium dodecylsulfate. Biochim. Biophys. Acta*, **356**:36, 1974.
- Kamataki, T. and Kitagawa, H.: *Effects of lipid peroxidation on activities of drug-metabolizing enzymes in liver microsomes of rats. Biochem. Pharmacol.*, **22**:3199, 1973.
- Ladbrooke, B.D., Williams, R.M. and Chapman, D.:

- Studies on lecithin-cholesterol-water interactions of differential scanning calorimetry and X-ray diffraction. Biochim. Biophys. Acta, 150:333, 1968.*
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.: *Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193:265, 1951.*
- Maddy, A.H.: *Biochemical Analysis of Membrane, Chapman and Hall press, 1976. p.33.*
- Makino, S., Reynolds, J.A. and Tanford, C.: *The binding of deoxycholate and Triton X-100 to proteins, J. Biol. Chem., 248:4926, 1973.*
- Martonosi, A.: *Membrane transport during development in animals. Biochim. Biophys. Acta, 415:311, 1975.*
- Neville, D.M. Jr.: *Isolation of an organ specific protein from cell-surface membrane of rat liver. Biochim. Biophys. Acta, 154:540, 1968.*
- Pfeifer, P.M. and McCay, P.B.: *Reduced triphosphopyridine nucleotide oxidase-catalyzed alterations of membrane phospholipids. J. Biol. Chem., 246:6401, 1971.*
- Ray, T.K.: *A modified method for the isolation of the plasma membrane from rat liver. Biochim. Biophys. Acta, 196:1, 1970.*
- Segal, H.L., Brenner, B.M.: *5'-Nucleotidase of rat liver microsomes. J. Biol. Chem., 235:471, 1960.*
- Slater, T.F. and Sawyer, B.C.: *The stimulatory effects of carbon tetrachloride and other halogenoalkanes on peroxidative reactions in rat liver fractions in vitro. Biochem. J., 123:805, 1971.*
- Stadler, J. and Kleinig, H.: *Nuclear membranes from mammalian liver. III. Fatty acids. Biochim. Biophys. Acta, 223:315, 1971.*
- Vessey, D. and Zakim, D.: *Regulation of microsomal enzymes by phospholipids. II. Activation of hepatic uridine diphosphate-glucuronyltransferase. J. Biol. Chem., 246:4649, 1971.*
- Zakim, D.: *Regulation of microsomal enzymes by phospholipids. I. The effect of phospholipases and phospholipids on glucose-6-phosphatase. J. Biol. Chem., 245:4953, 1970.*