

## 흰쥐 간조직 5'-Nucleotidase와 그 Isoenzyme에 관한 연구

### On 5'-nucleotidase and its isoenzymes in liver tissue of rat

서울대학교 의과대학 이비인후과학교실\* 및 생화학교실\*\*

김대성\* · 백만기\* · 정홍근\*\* · 김승원\*\*

#### 서 론

5'-Nucleotidase(5'-ribonucleotide phosphohydrolase: EC 3, 1, 3, 5)는 각종 mononucleotide 분자의 ribose 또는 deoxyribose의 제 5번 탄소에 ester화된 磷酸鹽을 가수분해 하는 효소이며(Heppl과 Hilmoe, 1963) 각종 nucleotide중에서도 5'-adenosine monophosphate (5'-AMP)에 대한 특이성이 가장 높기 때문에(Stefanovic등, 1976) 그 활성은 주로 이를 基質로 사용하여 측정되고 있다.

또한 이 효소는 거의 대부분의 진핵세포 원형질막에 강하게 결합되어 있는 糖蛋白質로서 그 작용부위가 세포막의 외부로 향한 일종의 ectoenzyme이기 때문에(Depierre와 Karnovsky, 1974; Gurd와 Evans, 1974; Tans와 Lauter, 1974; Newby등, 1975) 세포 分劃研究에서 원형질막분획을 확인하는 追跡酵素(marker enzyme)로서 널리 이용되고 있는 터이며, 최근에는 원형질막의 당단백질과 lectin의 상호작용을 구명하는데 이용되고도 있는 것이다(Riordan과 Slavik, 1974).

이 뿐만 아니라 정상세포가 암세포로 변환될 때, 원형질막의 구조와 그 성분의 변화가 야기되어 그 결과 원형질막에 결합된 효소의 특성이 변화하게 되므로 5'-nucleotidase의 활성변화를 관찰함으로써 원형질막의 변화를 推定하는데 사용되기도 한다(Ikehara등, 1977).

한편 혈청 5'-nucleotidase의 활성은 임상적으로 림프내의 alkaline phosphatase 활성이 증가할 때 그 원인이 뼈질환에 있는지 肝질환에 있는지의 여부를 감별하는 진단적 指標가 되고 있으며(Kowlessar등, 1961; Gerlach와 Hiby, 1974; Sherlock, 1975), 轉移性 간암에 있어서도  $\gamma$ -glutamyltransferase와 함께 그 혈청내 활성이 증가함으로써 전이성 간암에 대한 그 진단적 가치도 주목되고 있다(Kim등, 1977; Beck등, 1978).

일반적으로 생체막에 결합된 대부분의 효소는 膜脂質의 존재여부에 따라 구조적, 기능적인 변화가 현저

한 것으로(Emmelot와 Bos, 1966) 효소활성 發現과 막지질은 중요한 상관관계가 있을 것으로 생각되고 있다(Coleman, 1973). 즉 세포막에 결합된 효소의 활성발현을 위하여서는 막지질이 필요하며 이에 의하여 조절된다는 것이다(Duttera등, 1968; Vessey와 Zakim, 1970). 그러므로 특히 세포막에 결합된 단백질은 막지질의 입체구조적 관계에 따라서 外在性 蛋白質(peripheral 또는 extrinsic protein)과 內在性 蛋白質(integral 또는 intrinsic protein)로 분류하고 있는 것이다. 外在性 蛋白質은 생체막의 脂質雙層(lipid bilayer)에 비교적 약하게 결합되어 막지질의 상호작용이 거의 없는 반면 內在性 蛋白質은 脂質雙層에 潛在하여 그 결합력이 강하기 때문에 막지질과 기능적인 상호작용이 있을 것으로 생각되는 것이다. 예컨대 내재성 단백질은 생체막에서 분리될 때 界面活性劑나 유기용매를 필요로 하며 따라서 정제된 내재성 단백질은 지질을 함유하게 되므로 완충용액에는 불용성인 것이다(Singer, 1974).

그러므로 세포막 지질을 phospholipase(Abouissa와 Cleland, 1971) 또는 계면활성제(Joergensen, 1974)로 처리하거나 혹은 과산화시켜서(Kamataki와 Kitagawa, 1973; Chung와 Lee, 1979) 제거하면 세포막에 결합된 대부분의 효소는 그 활성이 현저히 감소한다는 사실이 보고된 바 있다.

한편 內在性 蛋白質인 5'-nucleotidase는 세포막내에서 sphingomyelin과 결합되어 존재한다는 사실이 보고되어 있으며(Kremmer등, 1976) sphingomyelin複合體의 형태로 정제된 그 특성을 밝힌 연구도 있다(Widnell, 1975). 그러나 sphingomyelin복합체로서의 5'-nucleotidase는 phospholipase로 처리하여도 그 활성이 변화하지 않으며(Emmelot와 Bos, 1968) 따라서 磷脂質은 5'-nucleotidase의 활성에는 영향을 미치지 않는 것으로 추정된 바 있거니와(Widnell, 1974) phosphatidyl inositol에 특이성이 있는 phospholipase를 사용한 실험에서는 sphingomyelin 복합체인 5'-nucleotidase가 용해된다는 사실이 관찰되었기 때문에 이 phospholipid가

5'-nucleotidase의 세포막 結着(anchoring)에 중요한 역할을 한다는 사실이 보고된 바 있다(Low 등 1978).

또한 원형질막은 계면활성제를 사용하여 정제할 경우 脫磷脂된 5'-nucleotidase는 sphingomyelin 복합체로서의 5'-nucleotidase보다 그 비활성도 낮을 뿐더러 耐熱性도 낮아진다는 사실이 보고되었다(Evans와 Gurd, 1973; Slavik 등, 1977).

저자는 이와같이 phospholipid의 存在에 따른 효소 특성의 차이는 막의 지질성분이 효소의 기능에 영향을 미친데 기인하리라 생각되어 본 연구에서 5'-nucleotidase의 환성에 대한 phospholipid의 역할을 규명하기 위하여 새로이 n-butanol을 사용하여 막지질을 용해, 제거하려고 시도한 것이다. 그리고 이 효소를 정제하여(Morton, 1955) 그 효소동력학적 특성을 관찰하고 다른 저자들의 결과와 비교 검토하고자 하였다.

또한 5'-nucleotidase는 1934년에 발견된 이래(Reis, 1934) 주로 원형질막에 결합된 상태로써 그 특성이 검토되었기 때문에 그 isoenzyme의 확실한 존재는 규명된 바가 없었으며, 오직 그 환성의 최적 pH가 2개소이며(Bodansky와 Swartz, 1968) Concanavalin A에 대해서는 5'-nucleotidase의 환성이 雙位相(biphasic)하다는 사실등(Riordan와 Slavik, 1974)이 isoenzyme의 존재를 시사하고 있을 뿐인 것이다. 이와 같은 현황에 착안하여 저자는 脫磷脂한 5'-nucleotidase를 추출, 부분 정제하여 polyacrylamide 전기영동像에서 isoenzyme의 존재를 새로이 확인하였기 때문에 그 결과를 보고하는 바이다.

## 실험방법

### I. 실험재료

실험동물은 서울의대 동물실험실에서 사육한 순계 Sprague Dawley종(200~300g)의 흰쥐를 암수 구별없이 사용하였다.

Sephadex G-200은 Pharmacia Fine Chemicals(Upsala, Sweden)에서, DEAE-cellulose는 Merck Co. (Darmstadt, Germany)에서, 5'-adenosine monophosphate(5'-AMP)와 Bovine serum albumin은 Sigma Chem. Co.(St. Louis, Mo. U.S.A)에서 구입하였고, Tris-(hydroxy-methyl)-amino-methane(Tris), trichloroacetic acid(TCA), acrylamide, bisacrylamide, sodium dodecylsulfate, sodium deoxycholate, n-butanol 및 Triton X-100은 Merck Co.(Darmstadt, Germany)에서 각각 구입하여 사용하였다. 그리고 ammonium sulfate와 그 외의 무기시약은 Kanto Chemical Co.

(Tokyo, Japan)의 제품을 사용하였다.

### II. 5'-Nuoleotidase의 부분 정제

**Homogenation:** 흰쥐를 경추 탄골하여 희생시킨 후 경동맥을 절단하여 혈액을 제거한 즉시 저출한 흰쥐 간 40g을 寒冷 0.25M sucrose용액에 옮겨 薄層의切片으로 만든다음 같은 용액으로 3회 세척하여 Potter-Elvehjem homogenizer로 homogenize하였다. 이를 다시 두점의 꺼즈로 여과하여 세포잔사를 제거하고 0.25 M sucrose용액은 첨가하여 10%(W/V) homogenate를 만들었다.

**脫脂:** 10% homogenate와 n-butanol의 3:2 혼합물을 氷槽上에서 15분간 진탕한 후 waring blender로 30초 동안 homogenize하여 이 혼합물을 다시 12,000g (MSE Centriscan 25, 8×50ml, Fixed angle Rotor)로 10분동안 원심분리하여 n-butanol층을 제거하는 방법으로 n-butanol층이 깨끗해질 때까지 이 탈지과정을 3회 반복하였다.

탈지후 n-butanol에 포화된 水溶液層을 취하여 다음 과정의 試料로 사용하였다. 이때 수용액층에서 침전된 단백질을 원심분리로 제거하여 투명한 탈지용액을 얻었다.

**Ammonium sulfate 鹽折:** 위에서 얻은 용액을 ammonium sulfate의 30% 포화용액을 만들어 10분간 진탕한 후 10,000g(MSE centriscan 25, 8×50ml, Fixed angle Rotor)로 10분간 원심침전시켜 침전물은 버리고 그 上清液을 다시 ammonium sulfate로 60%로 포화용액을 만들어 같은 방법으로 원심침전하여 ammonium sulfate의 30%~60% 포화濃度를 얻었다. 이 침전을 25ml의 0.25M sucrose용액에 녹였다.

**透折:** 위에서 얻은 용액을 2°C에서 一晝夜 pH 7.5인 0.02M Tris-HCl 완충용액 10L로써 투석하여 gel filtration과 DEAE-cellulose chromatography의 시료로 사용하였다. 이때 침전되는 단백질은 원심분리하여 제거하고 상청액을 얻었다.

**Sephadex G-200 gel filtration:** 미리 pH 7.5의 0.02M-Tris-HCl용액으로 평형에 이르게한 Sephadex G-200 column (12×600mm)위에 透折試料 1.5ml를 중첩한 다음 같은 용액으로 peristaltic pump (LKB, Sewden)를 이용하여 실온에서 溶出하였다. 이 용출액을 분획수집기(Ultrac III, LKB, Sweden)로 매 시 10분당 4ml씩 수집하였으니 이때 UV-spectrophotometer (Uvicord S. LKB, Sweden)에 의하여 파장 280nm에서 단백질 흡광도를 측정하는 한편 각 분획의 효소활성을 측정하여 환성이 높은 분획을 取捨하여 다음 실험의 시료로 사용하였다.

**DEAE-cellulose chromatography:** 역시 미리 pH 7.5의 0.02M Tris-HCl용액으로 평형에 이르도록 해 둔 DEAE-cellulose column (12×300mm)위에 투석된 시료 3ml를 중첩하고 0.1M NaCl과 pH 7.5의 0.02M Tris-HCl용액으로 전과같은 요령으로 peristaltic pump를 이용하여 실온에서 용출하였다(Nakamura, 1976).

이 용출액을 분취수집기로 다시 매 시험관당 5ml씩 수집하였으며 동시에 UV-Spectrophotometer에 의하여 파장 280nm에서 단백질 흡광도를 기록하였다. 아울러 각 분취의 효소활성을 측정하여 역시 활성이 높은 분취를 取舍하여 다음 실험의 시료로 사용하였다.

**III. Microsome부유액의 제조**

10% homogenate를 핵 및 세포잔사를 제거하기 위하여 600g로 10분간 원심분리한 후 그 상청액을 다시 10,000g (MSE Centriscan 75, 8×50ml, Fixed angle Rotor)로 10분간 원심분리하여 상청액을 취함으로써 mitochondria를 제거하였다.

이 상청액을 다시 100,000g (MSE Centriscan 75, 8×50ml, Fixed angle Rotor)로 60분간 원심분리하여 상청액을 버리고 침전만을 취함으로써 vesicle상의 원형질막이 포함된 microsome분취를 얻었다(Berman등, 1969). 이를 총용량 14ml가 되도록 0.25M sucrose 용액에 부유시켜 microsome부유액을 얻은 것이다.

**IV. 5'-Nucleotidase의 활성측정**

효소의 활성반응은 pH 7.5의 0.05M Tris-HCl 완충용액에 1mM 5'-AMP를 첨가하고 여기에 효소시료 0.1ml를 가하여 총용량이 2ml가 되도록 조성하였다 (Segal, 1960).

반응은 효소액을 가한 순간으로부터 시작하여 37°C에서 30분 또는 효소활성에 따라 1시간 incubate하였고 40%(W/V) TCA 0.5ml를 가함으로써 효소반응을 정지시켰다. 그러나, Triton X-100을 함유하는 반응계에서는 60%(W/V) TCA로 반응을 정지시켰고, sodium dodecylsulfate, sodium deoxycholate를 함유하는 반응계에서는 0.1M MgCl<sub>2</sub>의 30%(W/V) TCA로 반응을 정지시켰다. 이는 원심분리할 때 상청액을 얻기 위함이었다(Kim등, 1980).

효소의 활성은 5'-nucleotidase에 의하여 5'-AMP로부터 유리되어 나온 無機磷을 Fiske와 SubbaRow 법 (1957)으로 파장 660nm에서 흡광도를 측정함으로써 측정하였다.

효소활성의 단위는 1시간의 incubation 기간중에 AMP로부터 1μmole의 무기인을 유리할 수 있는 효소의 활성을 1 unit로 정하였고, 효소의 比活性은 효소단백질 mg당의 효소활성으로 표시하였다.

**V. 단백질 정량**

각 시료의 단백질은 Lowry (1951)법에 따라 정량하였고 표준단백질로는 미리 Kjeldahl 분석법으로 질소 함량을 분석해 둔 牛혈청안부인을 사용하였다.

**VI. Polyacrylamide gel 전기영동 및 염색**

7.5% acrylamide와 0.2% bisacrylamide를 혼합하여 만든 polyacrylamide gel판(0.5×7.5cm)에 효소시료와 표지염색제인 0.5% bromphenol blue를 함유하는 40% sucrose용액을 2:1의 容量比로 혼합하여 gel위에 중첩하고 전기영동을 시행하였다. 이때 사용한 완충액은 pH 8.4의 0.04M Tris-glycine용액이었다. 매 gel당 3.5mA의 전류로 90분동안 영동하여 (Smith, 1968) Pilcher와 Scott법 (1967)에 따라 다음과 같이 염색하였다.

같은 시료로 전기영동한 gel을 1mM AMP와 20mM CaCl<sub>2</sub> 및 pH 7.5의 50mM Tris-HCl을 함유하는 용액과 20mM CaCl<sub>2</sub>와 pH 7.5의 50mM Tris-HCl을 함유하는 용액내에서 1시간동안 37°C에서 각각 incubate하고 이미 gel에 침투해 있는 기질을 제거하기 위하여 90분간 水浸방치하였다. 여기에 30mM Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>를 함유하는 pH 7.0의 80mM Tris-maleate 용액에서 37°C로 45분간 incubate하였다.

침착되지 않은 Pb를 제거하기 위하여 증류수로 수차례 세척한 다음 2%(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S 용액에서 5분간 incubate함으로써 5'-nucleotidase가 위치하는 부위를 PbS의 흑색침전으로 각색되도록 한 것이다. 이때 對照染色으로써 효소작용에 의하지 않는 PbS의 침전에 의한 염색은 배제할 수가 있었다.

**실험결과**

**I. 5'-Nucleotidase의 부분정제**

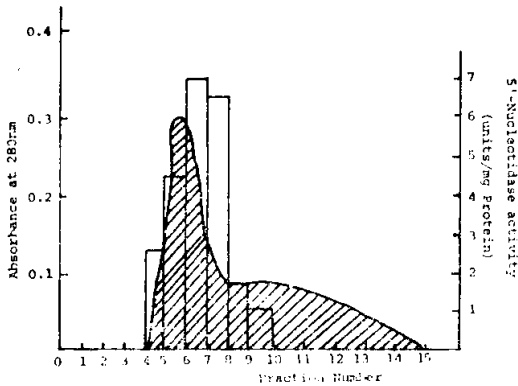
5'-Nucleotidase의 정제과정을 통하여 얻은 각 시료에서의 효소활성과 회수율은 제 1표에 요약한 바와 같다. 즉 흰쥐 간조직의 10% homogenate에 n-butanol을 첨가하여 40%(V/V) n-butanol-homogenate 혼합물을 만들어 탈지한 homogenate에서는 효소활성이 85% 회수되었고 단백질은 80%가 감소하였으므로 효소의 비활성은 4배 증가하였다. 한편, 변성된 단백질은 원심분리하여 제거하고 얻은 상청액에서는 효소활성이 탈지 homogenate의 95%가 회수되었고 단백질은 55%가 감소되어 그 比活性은 脫脂 homogenate에 비하여 2배가 증가되었다.

위에서 얻은 n-butanol에 포화된 水溶液層을 30~60%의 ammonium sulfate 포화염식 劃分은 효소활성

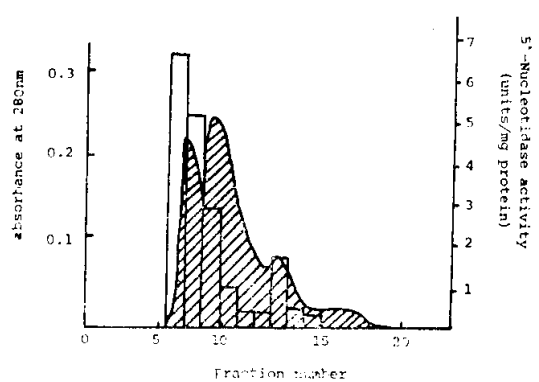
**Table 1.** Partial purification of 5'-nucleotidase from rat liver

Purification Step	Total activity <sup>1</sup> (units)	Total protein (mg)	Specific activity (units/mg)	Yield (%)	Purification fold
10% homogenate	4,103	9,544	0.43	100	1.00
Delipidated homogenate <sup>2</sup>	3,528	2,016	1.75	85	4.06
Clarified homogenate <sup>3</sup> 30%~60% (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	3,304	924	3.58	80	8.33
Salting out fraction	2,750	410	6.70	67	15.60
Dialysate	2,481	348	7.12	60	16.60
Clarified dialysate	2,041	174	11.70	49	27.20
Sephadex G-200	1,733	88	19.56	42	45.50
DEAE-cellulose chromatography	210	43	4.87	5	11.30

1. 5'-Nucleotidase activity was measured in the enzyme assay systems, containing 5'-AMP(1mM), Tris-HCl buffer (50mM, pH7.5) at 37°C and the liberated inorganic phosphate was determined by the method of Fiske and SubbaRow. One unit of activity was defined as that amount of enzyme which hydrolyzes 1μmole of AMP per hour.
2. Delipidated homogenate refers to the n-butanol saturated aqueous phase obtained by centrifugation of 40% (v/v) butanol-10% homogenate mixture at 12,000g for 10min.
3. Clarified homogenate and dialysate denote the supernatants obtained by centrifugation of delipidated homogenate and dialysate at 12,000g for 10min.



**Fig. 1.** Gel filtration profile of protein (shaded area) and 5'-nucleotidase activity (bars) in the clarified dialysate by Sephadex G-200 gel filtration, equilibrated with Tris-HCl buffer (20mM, pH 7.5).



**Fig. 2.** Elution profile of 5'-nucleotidase (bars) and protein (shaded area) by DEAE-cellulose column chromatography, equilibrated with Tris-HCl buffer solution (20mM, pH 7.5) and eluted with 0.1M NaCl in the same buffer solution.

이 전체 시료의 83%가 회수되었고 단백질의 감소와 효소비활성의 증가는 각각 55%, 1.9배로 되었다.

이를 염석하고 원심침전하여 상청액을 얻었는데, 투석과정에서의 효소활성은 염석하여 얻은 시료의 90%가 회수되었고 단백질은 16%가 감소되었으며 원심침전한 상청액은 前과정의 시료보다 단백질이 50% 감소하고 효소활성은 80% 회수되었기 때문에 효소 비활성은 前과정의 시료보다 각각 1.06배, 1.64배의 증가를 보였다.

透析試料 1.5ml를 pH 7.5인 0.02M Tris-HCl용액으로 평행을 이룬 Sephadex G-200 column에 증침한 다음 같은 용액으로 용출하여 관찰한 단백질흡광도와 효소활성은 제 1도와 같다.

단백질농도는 單一한 peak로 나타났으며 효소활성은 단백질용출분획과 대략 일치하고 있음을 알수 있었다. Sephadex G-200 column을 통하여 얻은 시료에서는 효소활성이 투석시료의 85%가 회수되었고 단백질은 50%가 감소하여 따라서 효소비활성은 투석시료에 비해

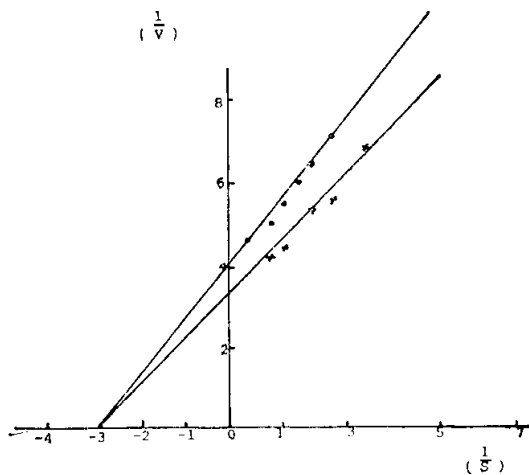


Fig. 3. Lineweaver-Burk plots of 5'-nucleotidase activities purified by Sephadex G-200 gel filtration in the presence(x) or absence(•) of sodium deoxycholate, showing  $K_M = 0.33\text{mM}$ .

1.67배 증가되었다. 그러므로 homogenate에 비할 때 효소의 비활성이 45배 증가되었으며 회수율은 42%에 이르렀다.

다음 0.5M HCl과 0.5M NaOH로 처리한 DEAE-cellulose를 충전한 column에 pH 7.5의 0.02M Tris-HCl용액으로 평형을 이룬 후 투석시료 3.0ml를 중첩하여 0.1M NaCl과 pH 7.5의 0.02M Tris-HCl용액으로 용출한 분획에서는 제 2도에 요약한 바와 같은 결과를 얻었다.

즉 단백질은 3개의 peak를 보였으며 효소의 비활성은 단백질의 첫번째 및 세번째 peak에서 높은 활성을

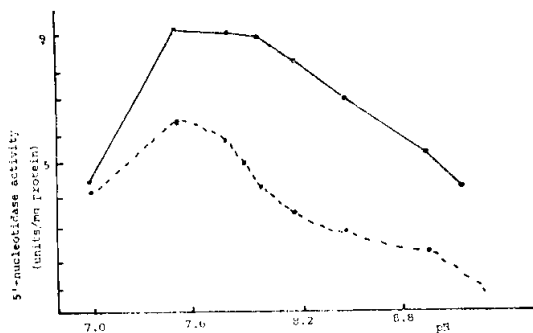


Fig. 5. pH profile of the enzyme activities from 5'-nucleotidase purified by Sephadex G-200 gel filtration (•-•) and DEAE-cellulose chromatography (••••).

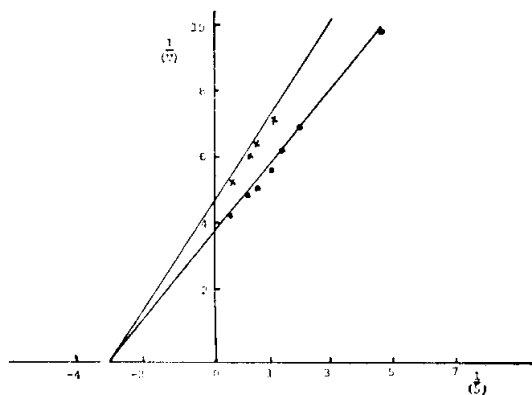


Fig. 4. Lineweaver-Burk plot of 5'-nucleotidase activity purified by DEAE-cellulose chromatography in the presence(x) or absence(•) of sodium deoxycholate, showing  $K_M = 0.33\text{mM}$ .

보여 주었으며 DEAE-cellulose column을 통한 용출액에서의 효소활성은 투석시료효소활성의 10%에 불과하였었다.

## II. 부분정제 한 5'-nucleotidase의 특성

Sephadex G-200 gel filtration 또는 DEAE-cellulose chromatography로써 부분정제 한 5'-nucleotidase의  $K_M$ 치를 같은 양의 효소를 사용하여 pH 7.5의 50mM Tris-HCl에서와 같은 pH의 50mM Tris-HCl 완충용액에서 2.5mg/ml의 sodium deoxycholate를 첨가한 반응계에서 기질 5'-AMP의 농도에 따라 효소활성을 측정하여 얻은 Lineweaver-Burk plot 및 이에 의한  $K_M$ 值

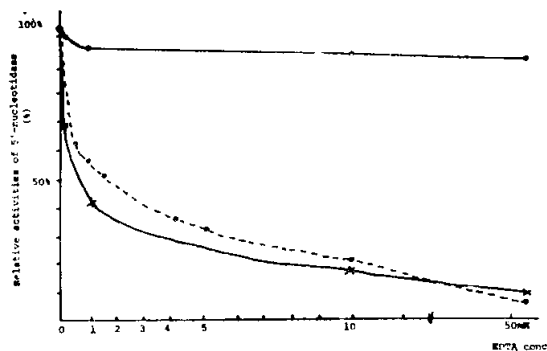
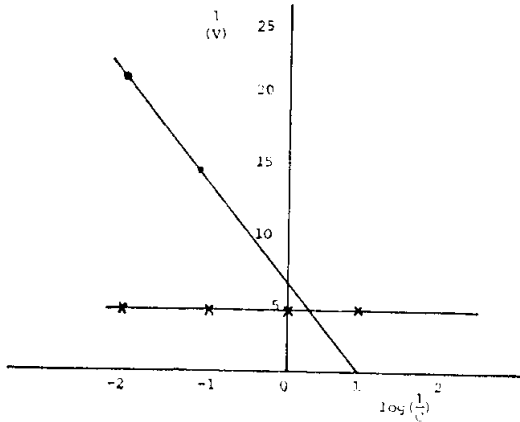


Fig. 6. Effect of EDTA concentration on the activities of 5'-nucleotidase purified by Sephadex G-200 gel filtration (x-x) DEAE-cellulose chromatography (•-•) and microsomal 5'-nucleotidase (••••).

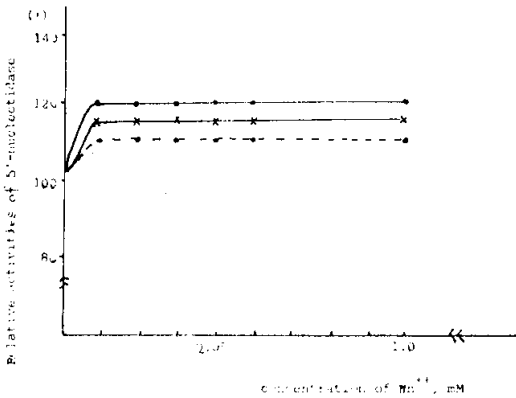


**Fig. 7.** Double reciprocal plot of 5'-nucleotidase activity *versus* EDTA concentration: 5'-nucleotidase purified by Sephadex G-200 gel filtration (o-o) and DEAE-cellulose chromatography (x-x).  $K_i$  EDTA(o)=0.1 mM,  $K_i$  EDTA(x)=0.

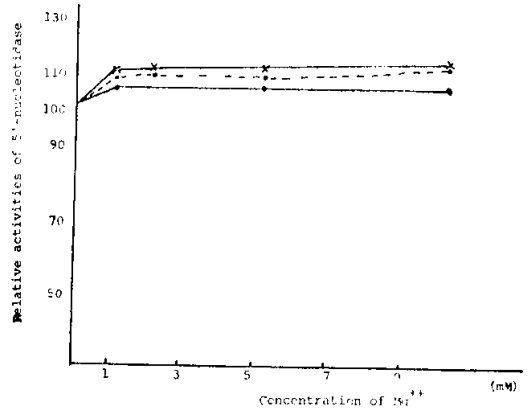
와  $V_{max}$ 를 구하였던바 제3,4도에서 보는 바와 같았다.

즉, Sephadex G-200 gel filtration 또는 DEAE-cellulose chromatography로써 얻은 5'-nucleotidase의  $K_M$ 치는 0.33mM로서 서로 일치하였다. 그러나 sodium deoxycholate를 첨가한 반응系에서는  $K_M$ 치는 일치하였으나  $V_{max}$ 만은 Sephadex G-200 gel filtration으로 정제한 5'-nucleotidase가 약 25% 증가한 반면, DEAE-cellulose chromatography로 정제한 5'-nucleotidase는 오히려 20%가 감소되었었다.

한편 완충액의 pH는 50mM imidazol 완충액으로 7.0



**Fig. 9.** Effect of  $Mn^{2+}$  on the activities of microsomal 5'-nucleotidase (o-o-o), 5'-nucleotidase purified by Sephadex G-200 gel filtration (o-o) and DEAE-cellulose chromatography (x-x).

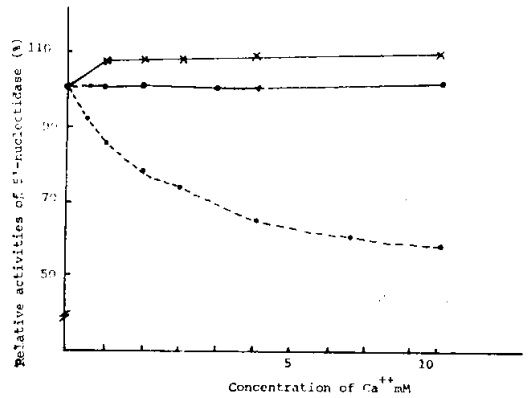


**Fig. 8.** Effects of  $Mg^{2+}$  on the activities of microsomal 5'-nucleotidase (o-o-o), 5'-nucleotidase purified by Sephadex G-200 gel filtration (o-o) and DEAE-cellulose chromatography (x-x).

그리고 50mM Tris-HCl 완충액으로는 7.0~8.5, 50mM glycine으로는 9.0 이상을 조정하여 사용하였으며 Sephadex G-200 gel filtration 및 DEAE-cellulose chromatography로 얻은 5'-nucleotidase의 활성을 이들 pH의 영역에서 측정 한 결과는 제5도에 비교한 바와 같다. 최적 pH는 7.5로서 두개의 시료가 거의 같은 pH profile을 보였다.

### III. 부분정제한 5'-nucleotidase활성에 대한 EDTA의 영향

Sephadex G-200 gel filtration과 DEAE-cellulose chromatography로써 정제한 5'-nucleotidase의 활성을



**Fig. 10.** Effect of  $Ca^{2+}$  on the activities of microsomal 5'-nucleotidase (o-o-o), 5'-nucleotidase purified by Sephadex G-200 gel filtration (o-o) and by DEAE-cellulose chromatography (x-x).

EDTA의 농도를 변화시켜 측정함으로써 EDTA에 의한 영향을 관찰한 결과는 제 6도와 같다.

DEAE-cellulose chromatography로 정제한 5'-nucleotidase는 50mM의 EDTA에서도 그 활성이 저해되지 않는 반면(Ki=0, 제 7도) Sephadex G-200 gel filtration으로 얻은 5'-nucleotidase는 1mM EDTA에 50%, 50mM EDTA에서 82%의 활성이 저해되었다(Ki=0.1mM, 제 7도). 또한, microsome의 5'-nucleotidase는 Sephadex G-200 gel filtration으로써 정제한 5'-nucleotidase와 비슷하게 그 활성이 저해되었었다.

**IV. 부분정제한 5'-nucleotidase활성에 금속이온이 미치는 영향**

제 8, 9, 10도에서 보는 바와같이 microsome의 5'-nucleotidase의 활성은 5mM Mg<sup>2+</sup>에 의하여 10%의 활성증가를 보이며 Mg<sup>2+</sup>의 농도를 증가시켜도 그 이상의 활성증가는 없었다. 그러나 Ca<sup>2+</sup>은 10mM의 농도에서 40%의 효소활성저해를 초래하였고 Mn<sup>2+</sup>은 0.01mM에서 10%의 활성증가를 나타냈으며 농도를 증가시켜도 그 이상의 활성증가는 없었다.

Sephadex G-200 gel filtration의 5'-nucleotidase 역시 제 8, 9, 10도에서 보는 바와같이 5mM의 Mg<sup>2+</sup>에 의해 4%, 0.1mM의 Mn<sup>2+</sup>에 의해서는 21%의 활성증가가 있었으나 0.1mM의 Ca<sup>2+</sup>에 의해서는 영향이 없는 것으로 관찰되었다.

또한 DEAE-cellulose chromatography의 5'-nucleotidase는 5mM의 Mg<sup>2+</sup>으로써 9%, 0.1mM의 Mn<sup>2+</sup>으로써는 15%, 그리고 1.0mM의 Ca<sup>2+</sup>에서는 7%의 활성증가를 나타내었었다.

**V. 계면활성제(detergent)가 5'-nucleotidase활성에 미치는 영향**

제 2표에서 보는 바와같이 계면활성제의 5'-nucleotidase활성에 대한 영향을 관찰하기 위하여 이미 보고된 바 있는 microsome 5'-nucleotidase에 강력한 영향을 보이는 것으로 알려진 계면활성제의 농도(Kim 등 1980)를 취하여 본연구에서 부분정제한 5'-nucleotidase에 대한 영향을 관찰하였다.

Sephadex G-200 gel filtration으로써 얻은 효소는 0.1% Triton X-100에 의해서는 10%, sodium dode-



- A. Clarified dialysate
- B. The pooled fraction from elution volume 24ml to 32ml as shown in Fig. 1.
- C. The pooled fraction from elution volume 35ml to 45ml as shown in Fig. 2.
- D. The pooled fraction from elution volume 60ml to 70ml as shown in Fig. 2.

On each fraction the left column is the photograph of specific 5'-nucleotidase staining and the right one, that of nonspecific staining as control.

**Fig. 11.** Polyacrylamide gel electropherograms of rat liver enzyme fractions from different stages of 5'-nucleotidase purification. The polyacrylamide gel electrophoresis was performed on the gel containing 7.5% acrylamide and 0.2% bisacrylamide by the procedure of Smith. After electrophoresis, the gels were incubated in the solution containing 1mM AMP, 0.05M Tris, pH 7.5 and 20mM CaCl<sub>2</sub> for enzyme staining and in the solution containing 0.05M Tris, pH 7.5 and 20mM CaCl<sub>2</sub> for contrast staining respectively. The gels were then immersed in 3mM Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> and in 2% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S consecutively to convert calcium phosphate formed during the incubation to visible lead sulfide,

**Table 2.** Relative changes in the 5'-nucleotidase activities by detergents

Additions	Concentration*	5'-nucleotidase activity purified by Sephadex G-200 gel filtration	5'-nucleotidase activity purified by DEAE-cellulose chromatography
None		100%	100%
Triton X-100	0.1%	108%	103%
Sodium dodecylsulfate	0.8mg/ml	109%	85%
Sodium deoxycholate	2.5mg/ml	132%	76%

\*The concentrations of the detergents were chosen from the previous report (Kim *et al.*, 1980), at which the effects of them on 5'-nucleotidase activities were maximum.

cylsulfate (0.8mg/ml)로써는 10%, 그리고 sodium dexoychlate (2.5mg/ml)에 의해서는 35%의 효소활성 증가를 보였다.

한편 DEAE-cellulose chromatography로 얻은 시료는 0.1% Triton X-100에 의해서는 5%의 효소활성증가가 있었으나 sodium dodecylsulfate (0.8mg/ml), sodium deoxycholate (2.5mg/ml)에 의해서는 오히려 각각 15%, 25%의 활성이 저해되는 것으로 관찰되었다.

#### VI. 5'-Nucleotidase의 Isoenzyme적 특성

5'-Nucleotidase를 부분정제한 각 과정의 시료를 polyacrylamide gel로써 전기영동하여 염색한 결과는 제11도와 같다. 제11도에서 A는 투석시료, B는 제1도에서 보는 바와 같은 24ml에서 32ml까지의 분획을 취합한 분획, C와 D는 각각 역시 제2도에서 얻은 35ml에서 45ml와 60ml에서 70ml까지의 용출분획을 취합한 분획의 전기영동염색像이었다.

gel취상부의 제조연색에서는 다같이 염색된 하나의 band가 있었으며 그밖에 두개의 isoenzyme band가 분명히 염색되어 나타나고 있음을 관찰할 수 있었다.

#### 고 찰

5'-Nucleotidase는 원형질막에 있는 内在性 단백질의 일종이며 ectoenzyme으로 알려져 있다(Depierre와 Karnovsky, 1974). 이러한 사실에 기초를 두고 Evans와 Gurd(1973)가 원형질막을 계면활성제인 N-dodecylsarcosinate를 사용하여 부분정제한 5'-nucleotidase는 그 정제배수가 17배이었으며 그들의 효소는 脂質을 함유하지 않았다고 주장하는 반면에 Lelievre등(1977)은 French presser에 의한 방법과 sucrose density gradient 방법으로써 그 比活性이 40~90배에 이르는 부분정제 결과를 보고한 바 있으며 그 구성성분으로서 sphingomyelin을 함유한다고 전자와는 달리 보고하였다. 5'-

nucleotidase의 특성에 관한 상반된 이들의 보고는 지질성분의 기능적 역할에 대한 견해차이에서 유래된다고 생각되었다(Nakamura 등, 1976).

그러나 저자는 5'-nucleotidase의 기질인 5'-AMP가 親水性(hydrophilicity)을 갖는 분자이므로 본 효소가 脂質과 결합되어 있다면 오히려 지질의 효소에 대한 친화도가 저하되며 따라서 효소활성에 지장을 주리라는 이론적 추정하에 우선 조직을 n-butanol로 처리하여, 막지질을 제거한 脫脂試料로부터 5'-nucleotidase를 부분정제하였으며, 그 특성의 몇가지를 관찰하여 본 논문에서 보고하는 것이다.

n-butanol은 그 好脂質性(lipophilicity)이 매우 현저함과 동시에 親水性(hydrophilicity)특성을 갖기 때문에, 특히 磷脂質복합체에 잘 투과하여 계면활성제와 유사한 역할을 함으로써 단백질을 변성케하지 않고 脂質과 분리하는데 사용되어 왔다(Morton, 1955).

제1표에서 보는 바와같이 n-butanol脫脂에 의하여 n-butanol에 포화된 水溶性 成分에서 5'-nucleotidase 활성의 85%가 본 연구에서는 회수되었는데, 이는 인체 赤血球세포막을 n-butanol처리로써 그 90~95%의 지질을 제거하고 85~90%의 막단백질이 회수된 보고(Zwaal와 Deenen, 1968)와 거의 일치되고, 또한 응집되는 단백질침전을 제거한 n-butanol포화수용성 층에서 95%의 활성이 유지된 반면 50%의 단백질이 제거된 것을 보면, 이때 침전된 단백질은 지질과 함께 응집침전되었다고 생각할 수 있다.

따라서 이때의 5'-nucleotidase의 부분정제물은 지질이 포함되지 않았던 것으로 생각할 수 있었다.

이 사실은 다른 내재성 단백질인 효소, 예를들면 uridine diphosphate glucuronyltransferase는 phospholipase의 처리로 불활성화 되며 이에 다시 인지질을 첨가하면 그 활성이 회복되나(Attwood 등, 1971), 5'-nucleotidase는 원형질막을 phospholipase C로 처리하거나 또는 butanol-ether용매로 막지질을 제거하여도



그 활성에는 변화가 없었다는 보고(Emmelot와 Bos, 1968)등을 감안해 볼때 5'-nucleotidase는 효소활성 발현을 위하여는 막지질이 필요하지 않은 것으로 간주할 수 있다.

정제과정중에서 Sephadex G-200 gel filtration과 DEAE-cellulose chromatography법을 비교해 볼때 제 1표에서 보는 바와 같이 gel filtration으로는 透析物中에는 활성의 90%가 유지된 반면, ion exchange chromatography법에 의해서는 10%의 활성만이 회수된 사실은, DEAE-cellulose가 anion exchanger이고, 또 E. coli의 5'-nucleotidase가 Zn<sup>2+</sup>을 함유하는 metalloenzyme임이 보고된 것을(Dvorak와 Heppel, 1968) 아울러 생각해 볼때, 흰쥐 간조직의 5'-nucleotidase도와 유사한 금속이온을 함유하는 metalloenzyme인 것으로 사료됨으로 이 금속이온은 5'-nucleotidase의 안정성에 기여할 것으로 추측할 수 있을 것이다.

또한 microsome의 5'-nucleotidase와 gel filtration에 의한 5'-nucleotidase는 chelating agent인 EDTA에 의해서 강력히 그 활성이 저해되는데 반하여 DEAE-cellulose chromatography에 의해 부분정제된 5'-nucleotidase는 EDTA에 의한 영향이 없다는 사실은 5'-nucleotidase가 metalloenzyme임을 더욱 뒷받침한다고 생각된다(제 6 도).

그리고 최적 pH는 양부분정제물에서 일치하지만 DEAE-cellulose chromatography법에 의한 5'-nucleotidase가 pH의 변화에 더 예민한 것은 이 금속이온이 효소의 conformation을 유지하는 역할을 하여 안정성에 기여할 수도 있는 것으로 생각된다.

원형질막에 결합된 5'-nucleotidase는 분리한 원형질막 particulate의 크기에 따라 활성화되는 정도가 다르며(Kim등, 1980), 小 vesicle인 microsome분획의 5'-nucleotidase활성은 10mM Mg<sup>2+</sup>에 의하여 10%정도 상승하고 脫脂 5'-nucleotidase는 Mg<sup>2+</sup>에 의하여 5%내외의 활성증가를 볼 수 있다는 사실이 이미 보고된 바 있다(Kim등, 1980). 이와같은 사실을 감안하여 제 8, 9, 10도를 분석해 보면 5'-nucleotidase와 결합된 막지질, 膜構造 및 금속이온의 存否에 따라서 Mg<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>등에 의하여 이 효소의 활성화되는 정도가 달라진다고 추론할 수 있다. 특히 Ca<sup>2+</sup>에 대한 영향이 相異なる 것은 microsome의 5'-nucleotidase는 원형질막에 결합된 상태이므로 脫安定劑인 Ca<sup>2+</sup>에 의하여 活性部位가 차폐되어 그 활성이 저해되고, 원형질막에서 분리하여 부분정제된 효소는 그러한 영향이 없는 것에 연유하리라는 추론이 가능한 것이다.

계면활성제 즉, sodium dodecylsulfate는 단백질의

陽性疏水群(positive hydrophobic group) 또는 特異的疏水受容體(specific hydrophobic receptor)와 먼저 결합한 후 特異성이 작은 疏水群(hydrophobic group)과 결합하여 인종의 복합체를 이루어 용해도가 높은 group으로부터 용해시키는 것이다.

Sodium deoxycholate는 주로 mixed micelle에 混入되어 磷脂質을 용합하게 되며 Triton X-100은 점진적으로 단백질과 결합함으로써 단백질로부터 지질을 분리케하여 그 작용을 나타낼 것으로 생각된다(Kirkpatrick등, 1974). Microsome의 5'-nucleotidase와 磷脂質을 함유하는 5'-nucleotidase의 활성이 계면활성제에 의하여 증가되는 이유는 계면활성제가 직접효소의 觸媒部位를 활성화시키기 보다는 지질성분에 의하여 응집되는 효소를 분산시켜 活性部位를 노출시키기 때문이라고 해석할 수 있다(Nakamura, 1976). 그러나, 脫脂된 5'-nucleotidase에 대한 계면활성제의 영향은 5'-nucleotidase가 疏水の입으로 세포막내에 존재하는 부분과 노출된 親水的인 부분을 가진 內在的 단백질이기 때문에 계면활성제가 5'-nucleotidase의 3차원적구조, 즉 그 分子의 立體構造에 영향을 주어 활성이 증가된다고 설명할 수 있겠다.

한편, 금속이온을 제거한 5'-nucleotidase가 계면활성제에 의하여 오히려 그 활성이 저해되고 특히 본 논문에서 microsome의 5'-nucleotidase를 현저히 활성화시키는 sodium deoxycholate에 의하여 크게 저해된 사실은 제 2 표 금속이온이 磷脂質과 더불어 5'-nucleotidase의 효소活性部位의 立體構造를 유지하는데 必要한 것이라고 추측할 수 있겠다.

금속이온의 역할에 대한 이러한 고찰은 gel filtration법에 의한 5'-nucleotidase의 계면활성제가 없는 반응계와 계면활성제를 포함하는 반응계에서  $K_M$ 値는 일치하지만,  $V_{max}$ 가 계면활성제를 포함하는 반응계에서 증가하는 반면, DEAE-cellulose chromatography에 의한 5'-nucleotidase의 두 반응계에서의  $K_M$ 値는 일치하고,  $V_{max}$ 는 계면활성제를 포함하는 반응계에서 감소하는 실험결과와 부합된다.

5'-Nucleotidase가 각종 mononucleotide를 가수분해할 수 있는 광범한 基質親和質을 가지고 있는 점을 고려하여 이 효소를 isoenzyme으로 분리하려는 많은 노력이 있었으나(Pilcher와 Scott, 1967) 대부분의 경우 그 存否를 증명할 수 없었다. 그러나 Pilcher와 Scott는 5'-nucleotidase를 polyacrylamide gel에서 전기영동을 한 후에 이를 염색하는 방법을 개발하여 bovine seminal plasma 5'-nucleotidase에는 3개의 isoenzyme이 있음을 보고 하였다. 본 실험에서도 이와같은 방법

을 이용하여 흰쥐 간 5'-nucleotidase isoenzyme을 확인하려고 시도하였던 바, 제11도와 같이 두개의 isoenzyme band를 관찰하였다.

5'-Nucleotidase 전기영동像에는 5'-nucleotidase band 외에 gel상부에 하나의 濃染色帶가 관찰되었는데, 이 band는 isoenzyme band라기 보다는 대조영동像에도 나타나는 것으로 보아, 효소 작용에 의하지 않은 비특이적인 것으로 염색법 자체에 따라 나타난 band라고 생각된다. 그러므로 저자는 Pilcher와 Scott (1967)가 gel상부의 이 band를 isoenzyme으로 그릇간주하여 보고하였다고 생각한다.

또한 제11도 D에서 5'-nucleotidase가 분명히 분리되는 것으로 보아 금속이온의 존재가 isoenzyme과 유관하리라는 사실을 시사하고 있다.

### 요 약

5'-Nucleotidase는 각종 세포의 원형질막에 결합되어 있는 內在性 糖蛋白質이며 ectoenzyme으로 밝혀짐에 따라 세포분획 과정에서 원형질막분획을 확인하는 추적효소로 널리 이용되며 최근에 암세포에서 원형질막의 변화를 추적하는 효소로도 사용되기에 이르렀으며 isoenzyme적 특성도 있을 것으로 기대되어 왔던 바이다. 저자는 이러한 중요성을 감안코 본 연구에서 흰쥐 간 5'-nucleotidase를 분리 부분정제하였으며 脫脂 5'-nucleotidase를 분리 부분정제하였으며 脫膜 5'-nucleotidase의 동력학적 특성을 관찰하는 한편 그 isoenzyme적 특성을 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 膜脂質을 제거하고 gel filtration 또는 DEAE-cellulose chromatography로써 얻은 각각의 5'-nucleotidase에서 polyacrylamide gel을 이용한 disk전기영동으로 2개의 isoenzyme band를 관찰하였다.

2. 흰쥐 간 homogenate를 n-butanol로써 처리하여 염색한 후 pH 7.5의 20mM Tris-HCl, pH 7.5로 평형을 이룬 Sephadex G-200 column으로 gel filtration하여 얻은 5'-nucleotidase시료는 간 homogenate에 비해 그 활성이 45배 높았으며 회수율은 42%였으며 DEAE-cellulose column으로 chromatography하여 얻은 5'-nucleotidase시료는 간 homogenate에 비해 그 활성이 11배 높았으며 회수율은 5%이었다.

3. Sephadex G-200 gel filtration 또는 DEAE-cellulose chromatography에 의하여 얻은 효소시료의  $K_M$  値는 0.33mM이었으며 최적 pH는 7.5로서 양 부분정제효소에서 같은 값이었다.

4. EDTA는 Sephadex G-200 gel filtration으로 얻

은 효소시료의 활성을 크게 저해하였으나, DEAE-cellulose chromatography로 얻은 효소 시료의 활성에는 거의 영향이 없었다.

5. 금속이온의 효소활성에 대한 영향은 microsome 분획의 5'-nucleotidase의 활성에 대한 영향과 흡사하였다.

6. Gel filtration으로 정제된 효소시료는 계면활성제에 의하여 그 활성이 증가되었으나, DEAE-cellulose chromatography로 얻은 효소시료는 오히려 감소하였으며 계면활성제가 함유된 반응제와 함유되지 않은 반응제에서 두 효소시료의  $K_M$  値는 일치하였으나,  $V_{max}$ 는 相異하였다.

### —ABSTRACT—

#### On 5'-nucleotidase and its isoenzymes in liver tissue of rat

Dae Sung Kim, Man Kee Paik, Hong Keun Chung and Seung Won Kimm

Departments of Otolaryngology and Biochemistry  
College of Medicine, Seoul National University

5'-Nucleotidase is an intrinsic membrane glycoprotein which has been shown in a variety of cell types to be an ectoenzyme. It is widely used as a plasma membrane marker in subcellular fractionation studies and used in monitoring cell membrane changes during neoplastic transformation.

It has been reported as that 5'-nucleotidase has broad specificities for nucleoside 5'-monophosphate. Attempts have been made for such a reason to resolve this enzyme into isoenzymes, but in most cases evidence for isoenzymes were not obtained.

The present investigation was carried out to prepare lipid free 5'-nucleotidase from rat liver and to study its properties and isoenzymes with the following results.

1. Lipid-free 5'-nucleotidase obtained by Sephadex G-200 gel filtration or DEAE-cellulose chromatography from rat liver was resolved into two isoenzyme bands by polyacrylamide gel disk electrophoresis.

2. 5'-Nucleotidase was purified about 45 folds from rat liver homogenate with 42% yield by n-butanol extraction and gel filtration, but the enzyme

purified by the treatment of n-butanol extraction and DFAE-cellulose chromatography showed the 11 folds of purification with 5% yield.

3. The pH optimum and  $K_M$  values of the two differently purified enzymes were identical; pH 7.5, 0.33mM, respectively.

4. The enzymes showed different pattern in the effect of EDTA; 5'-nucleotidase purified by gel filtration method revealed strongly inhibited activity, in contrast with that by DEAE-cellulose chromatography.

5. Effects of metal ions( $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  &  $Mn^{2+}$ ) on the activity of 5'-nucleotidase by two procedures used were similar to that by microsomal 5'-nucleotidase.

6. The effects of detergents (Triton X-100, sodium deoxycholate and sodium dodecylsulfate) on the activity of the enzymes were prominently different; the enzyme by gel filtration showed increased activity, while that by DEAE-cellulose chromatography, decreased activity.

The  $K_M$  value, however was not altered, while  $V_{max}$ , changed.

## REFERENCES

- Abou-Issa, H.M. and Cleland, W.W.: *Studies on the microsomal acylation of L-glycerol-3-phosphate. II. The specificity and properties of the rat liver enzyme. Biochim. Biophys. Acta*, 176:692, 1969.
- Attwood, D., Graham, A.B. and Wood, G.C.: *The phospholipid dependence of uridine diphosphate glucuronyltransferase. Bioch. J.*, 123:875, 1971.
- Beck, P.R., Belfield, A., Spooner, R.J., Blumgart, L.H. and Wood, C.B.: *Serum enzymes in the diagnosis of hepatic carcinoma. Clin. Chem.*, 24: 839, 1978.
- Berman, H.M., Gram, W. and Spirtes, M.A.: *An improved, reproducible method of preparing rat liver plasma membranes in buffered isotonic sucrose. Biochim. Biophys. Acta*, 183:10, 1969.
- Bodansky, O. and Swartz, M.K.: *5'-nucleotidase. Adv. Clin. Chem.*, 11:277, 1968.
- Bosmann, H.B. and Pike, G.Z.: *Membrane marker enzymes; Isolation, purification and properties of 5'-nucleotidase from rat cerebellum. Biochim. Biophys. Acta*, 227:402, 1971.
- Brotherus, J. and Renkonen, O.: *Phospholipids of subcellular organelles isolated from cultured BHK cells. Biochim. Biophys. Acta*, 186:243, 1977.
- Chung, H.K. and Lee, K.Y.: *A study on the lipid peroxidation in mitochondrial fraction from rat liver. The New Med. J.*, 20:101, 1977.
- Coleman, R.: *Membrane-bound enzyme and membrane ultrastructure. Biochim. Biophys. Acta*, 300:1, 1973.
- Depierre, J.W. and Karnovsky, M.L.: *Ecto-enzymes of the guinea pig polymorphonuclear leukocyte. I. Evidence for an ectoadenosine monophosphates, adenosine triphosphatase and p-nitrophenyl phosphatase. Science*, 183:1096, 1974.
- Depierre, J.W. and Karnovsky, M.L.: *Plasma membranes of mammalian cells. J. Cell Biol.*, 56:276, 1973.
- Duttera, J.W., Bryne, W.L. and Ganosa, M.C.: *Studies on the phospholipid requirement of glucose-6-phosphatase. J. Biol. Chem.*, 243:2216, 1968.
- Dvorak, H.F. and Heppel, L.A.: *Metallo-enzymes released from Escherichia coli by osmotic shock. J. Biol. Chem.*, 243:2647, 1968.
- Emmelot, P. and Bos, C.J.: *Studies on plasma membranes. III.  $Mg^{2+}$ -ATPase, ( $Na^+$ - $K^+$ - $Mg^{2+}$ )-ATPase and 5'-nucleotidase activity of plasma membranes isolated from rat liver. Biochim. Biophys. Acta*, 120:369, 1966.
- Emmelot, P. and Bos, C.J.: *Studies on plasma membranes. V. On the lipid dependence of some phosphohydrolases of isolates rat liver plasma membranes. Biochim. Biophys. Acta*, 150:341, 1968.
- Evans, W.H. and Gurd, J.W.: *Properties of a 5'-nucleotidase purified from mouse liver plasma membranes. Biochem. J.*, 133:189, 1973.
- Fiske, G.H. and SubbaRow, Y.J.: *Method for the Estimation of Phosphate. In Methods in Enzymology, Vol. III, Academic Press, p.843, 1957.*
- Gerlach, U. and Hiby, W.: *Methods of enzymatic analysis, Vol. II, Academic Press, p.871, 1974.*
- Gurd, J.W. and Evans, W.H.: *Distribution of liver plasma membrane 5'-nucleotidase as indicated by its reaction with antiplasma membrane serum. Arch. Biochem. Biophys.*, 146:305, 1974.

- Helenius A. and Simons, K.: *The binding of detergents to lipophilic and hydrophilic proteins*. *J. Biol. Chem.*, **247**:3656, 1972.
- Heppel, L.A. and Hilmoe, R.J.: *5'-nucleotidase, Methods in Enzymology Vol. II.*, Academic Press, p. 546, 1963.
- Ikehara, Y., Takahashi, K., Mansho, K., Eto, S. and Kato, K.: *Contrast manifestation of alkaline phosphatase and 5'-nucleotidase in plasma membranes isolated from rat liver and ascites hepatoma*. *Biochim. Biophys. Acta*, **470**:202, 1977.
- Joergensen, P.L.: *Purification and characterization of (Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>)-ATPase. III. Purification from the outer medulla of mammalian kidney after selective removal of membrane components by sodium dedecylsulfate*. *Biochim. Biophys. Acta*, **356**:36, 1974.
- Johnsen, S., Stokke, T. and Prydz, H.: *HeLa cell plasma membranes, I. 5'-nucleotidase and ouabain-sensitive ATPase as markers for plasma membranes*. *J. Cell. Biol.*, **63**:357, 1974.
- Kamatani, T. and Kitakawa, H.: *Effects of Lipid peroxidation on activities of drug metabolizing enzymes in liver microsomes of rats*. *Biochem. Pharmacol.*, **22**:31, 1973.
- Kim, C.K., Choi, H.W., Chung, H.K. and Lee, K.Y.: *Changes in the activities of 5'-nucleotidase relating to the structural change of the membrane*. *Seoul J. Med.*, **20**:279, 1979.
- Kim, K.H.: *Properties of 5'-nucleotidase from rat plasma membrane*(Ph.D. thesis, 1980).
- Kim, N.K., Yasmineh, W.G., Frier, E.F., Goldman, A.I. and Thelgides, A.: *Value of alkaline phosphatase, 5'-nucleotidase, r-glutamyltransferase and glutamate dehydrogenase activity measurements (single and combined) in serum in diagnosis of metastasis to the liver*. *Clin. Chem.*, **23**:2034, 1977.
- Kirkpatrick, F.H., Gordesky, S.E. and Marinetti, G.V.: *Differential solubilization of proteins, phospholipids and cholesterol of erythrocyte membranes by detergents*. *Biochim. Biophys. Acta*, **345**:154, 1974.
- Kowlessar, O.D., Haefner, L.J., Riley, E. M. and Slesinger, M.M.: *Comparative study of serum leucine aminopeptidase, 5'-nucleotidase and non-specific alkaline phosphatase in diseases affecting the pancreas, hepatobiliary tree and bone*. *Amer. J. Med.*, **31**:231, 1961.
- Kremmer, T., Wisher, M.H. and Evans, W.H.: *The lipid composition of plasma membrane subfractions originating from the three major functional domains of the rat hepatocyte cell surface*. *Biochim. Biophys. Acta*, **455**:655, 1976.
- Leliever, L., Zachowski, A., Maget-Dana, R., Aubry, J. and Bark, G.J.: *Differences in the modulations of the soluble or plasma membrane bound 5'-nucleotidase*. *Eur. J. Biochem.*, **80**:185, 1971.
- Low, M.G. and Finean, J.B.: *Specific release of plasma membrane enzymes by a phosphatidylinositol specific phosphatase C*. *Biochim. Biophys. Acta*, **508**:565, 1978.
- 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.
- Makino, S., Reynolds, J.A. and Tanford, C.: *The binding of deoxycholate and Triton X-100 to proteins*. *J. Biol. Chem.*, **248**:4926, 1973.
- Morton, R.K.: *Methods of extraction of enzymes from animal tissues*. *Methods in Frzymology*, Vol. I, p.25, 1955.
- Nakamura, S.: *Effect of sodium deoxycholate on 5'-nucleotidase*. *Biochim. Biophys. Acta*, **426**:339, 1976.
- Newby, A.C., Luzio, J.P. and Hales, C.N.: *The properties and extracellular location of 5'-nucleotidase of the rat fat cell plasma membrane*. *Biochem. J.*, **146**:625, 1975.
- Pilcher, C.W.T. and Scott, T.G.: *Electrophoretic heterogeneity of bovine seminal plasma 5'-nucleotidase*. *Biochem. J.*, **104**:104, 41c, 1967.
- Riemer, B.L. and Widnell, C.C.: *The demonstration of specific 5'-nucleotidase activity in rat tissues*. *Arch. Biochem. Biophys.*, **171**:343, 1975.
- Reis, J.: *La nucleotidase et sa relation avec la désamination des nucléotides dans le coeur et dans le muscle*. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **16**:385, 1934.
- Riordan, J.R. and Slavik, M.: *Interactions of lectins with membrane glycoproteins, effects of concanavalin A on 5'-nucleotidase*. *Biochim. Biophys. Acta*, **373**:365, 1974.

- Segal, H.L. and Brenner, B.M.: *5'-nucleotidase of rat liver microsomes. J. Biol. Chem.*, 235:471, 1960.
- Sherlock, S.: *Disease of the liver and biliary system. 5th ed. Philadelphia, Davis, 1975.*
- Singer, S.J.: *The molecular organization of membranes. Ann. Rev. Biochem.*, 43:805, 1974.
- Slavik, M., Kartner, N. and Riordan, J.R.: *Lectin induced inhibition of plasma membrane 5'-nucleotidase: sensitivity of purified enzyme. Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 75:342, 1977.
- Smith, I.: *Acrylamide gel disc electrophoresis, in Chromatographic and Electrophoretic Technique, Ed. by Smith, I., William Heinemann Med. Books Ltd., Vol. II, p. 365, 1968.*
- Stefanovic, V., Mandel, P. and Rosenberg, A.: *Ecto-5'-nucleotidase of intact cultured C6 rat glioma cells., J. Biol. Chem.*, 251:3900, 1976.
- Trams, E.G. and Lauter, C.G.: *On the sidedness of plasma membrane enzymes. Biochim. Biophys. Acta*, 375:180, 1974.
- Vessey, D.A. and Zakim, D.: *Regulation of microsomal enzymes by phospholipid. J. Biol. Chem.*, 246:4649, 1971.
- Widnell, C.C.: *Specific association of 5'-nucleotidase with sphingomyelin. Fed. Proc.*, 33:1254, 1974.
- Widnell, C.C.: *Purification of Rat Liver 5'-nucleotidase as a complex with Sphingomyelin. Methods Enzymol.*, 32:368, 1975.
- Zakim, D.: *Regulation of microsomal enzymes by phospholipids. J. Biol. Chem.*, 245:4953, 1970.
- Zwaal, R.F.A. and Van Deenen, L.L.M.: *Protein patterns of red cell membranes from different mammalian species. Biochim. Biophys. Acta*, 163:44, 1968.