

흰쥐 간 원형질막 5'-Nucleotidase의 시험관내 활성증가 기전

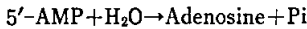
Mechanism for Increase in 5'-Nucleotidase Activity of Rat Liver Plasma Membrane upon Aging *in vitro*

서울대학교 의과대학 생화학교실

정 홍 근 · 이 기 영

서 론

5'-Nucleotidase는 nucleotide분자의 deoxyribose 또는 ribose의 C₅에 ester화된 磷酸鹽을 가수분해하는 효소이다(Heppel & Hilmo, 1963). 각종 mononucleotide가 모두 이 효소의 기질이 될 수 있으나 그 중에서도 5'-AMP에 대한 선택성이 가장 높아서(Stefanovic et al., 1976) 이를 주로 기질로 삼아 다음과 같은 반응으로 그 활성을 측정한다.



이 5'-nucleotidase는 1934년에 Reis에 의하여 발견된 이래 각종세포와 조직의 원형질막(plasma membrane)에서 발견됨으로써(Dvorak & Heppel, 1968; DePierre & Karnovsky, 1973; Polya, 1975; Paglia & Valentine, 1975; Riemer & Widnell, 1975) 세포분획에 있어서 원형질막의 추적효소(marker enzyme)로 널리 사용되고 있다(Stein et al., 1968; Berman et al., 1969; Avruch & Wallach, 1971; Johnsen et al., 1974).

혈청 5'-nucleotidase는 혈청의 alkaline phosphatase 활성증가가 뼈의 질환에 기인하는 것인지를 감별하는 임상적 지표가 되어 있는 바 간 질환에서는 5'-nucleotidase가 alkaline phosphatase와 함께 증가하지만 뼈 질환에서는 alkaline phosphatase만 증가하고 5'-nucleotidase는 증가하지 않는데 연유하는 것이다(Gerlach & Hiby, 1974). 또한 혈청의 5'-nucleotidase는 轉移性간암에서 γ -glutamyl transferase와 함께 그 활성이 증가하기 때문에 근년에는 轉移性간암에 대한 그 진단적 가치가 주목되고 있다(Kim, et al., 1977; Beck et al., 1978).

한편 5'-nucleotidase는 adenosine의 생성에 크게 기여하는 것으로 생각되고 있으며 이렇게 생성된 adenosine은 강력한 혈관확장제로 알려지고 있다(Frick & Lowenstein, 1976). 뿐만아니라 이 효소는 골격근세포, 임파구, 지방세포 또는 간세포 등의 원형질막에 결합된

ectoenzyme임이 밝혀짐에 따라(Riordan & Slavik, 1974; Woo & Manery, 1975; Stefanovic et al., 1967) 그 생물학적인 의의는 더욱 확실해지고 있다. 그러므로 이 효소에 의하여 세포의액중의 AMP로부터 생성된 adenosine은 前毛細管저항혈관(precapillary resistance vessel)을 싸고 있는 평활근세포로도 확산하여 이물이 완시킴으로써 혈류를 조절하는 것이 밝혀지고 있다.

일반적으로 생체막에 결합된 각종 효소는 그 활성의 발현을 위하여 막지질이 필요하거나 이에 의하여 그 활성이 조절되는 것이다(Duttera et al., 1968; Vessy & Zakim, 1971). 그리고 생체막은 phospholipase (Zakim, 1970), 유기용매(Slater & Sawyer, 1971) 및 일부 淸淨劑(Helenius & Simons, 1972; Makino et al., 1973) 등에 의한 처리로써 그 구조가 변형될 뿐만 아니라 막지질의 과산화(Pfeifer & McCaz, 1971)에 의해서도 그 구조가 변형된다. 그리하여 이런 경우 막에 결합된 효소의 활성은 현저히 감소되는 것으로 알려지고 있으나(Joergensen, 1974; Kamataki & Kitagawa, 1973; Chung & Lee, 1977) 원형질막을 4°C에 방치(aging)해 둠으로써 5'-nucleotidase의 경우는 그 활성이 증가된다는 사실을 저자가 보고한 바 있다(Kim & Chung, 1978).

생체막에 결합된 효소들은 그 대부분이 방치해 둠에 따라 각기 그 활성이 현저히 감소하는 사실에 비추어 보면 방치에 의한 5'-nucleotidase의 활성증가는 매우 특이한 현상이 아닐 수 없고 이의 기전해명이 없는 한 이 효소의 활성 분석술식에 따라 분석치의 再現性의 결여가 있는 것임으로 이의 기전을 밝히고자 본 실험을 행하였으며 이에 그 결과를 보고하는 바이다.

실험재료 및 방법

실험재료

서울의대 동물실에서 사육한 체중 200~300g의 Sprague-Dawley종의 흰쥐를 암수구별없이 사용하였다.

1980
9.15
4.21
C.3

AMP와 牛血清 albumin은 Sigma Chem. Co. (St. Louis, Mo., U.S.A.) Tris, trichloroacetic acid(TCA), sodium deoxycholate 및 sodium dodecyl sulfate(SDS)는 Merck Co. (Darmstadt, Germany), 그리고 蔗糖과 그외의 무기시약은 Kanto Chem. (Tokyo, Japan)를 사용하였다.

간 homogenate조제법

경동맥을 절단하여 희생시킨 흰쥐에서 즉시 간을 적출하여 냉각된 5mM Tris, 0.5mM CaCl₂를 첨가한 0.25M 蔗糖(pH 7.4)용액에 넣어 가위로 얇은 절편을 만든 후 다시 같은 용액에 옮겨가며 3회 반복 세척함으로써 가능한한 적혈구를 제거하고 잘게 절단한 간조직을 teflon pestle로된 Potter-Elvehjem homogenizer에 옮겨 상기의 용액을 가한 다음 homogenize하였다. 다음 이를 두절의 가재에 여과한 후 상기의 용액을 가하여 10%(w/v) homogenate가 되도록 하였다.

원형질막의 정제법(Berman et al., 1969)

흰쥐간의 10% homogenate를 2000×g로 10분간 원심분리하여 그 上清液을 버리고 그 침전물을 Dounce-homogenizer에 옮겨 homogenate 본래 용량의 절반에 해당하는 전기한 0.25M 蔗糖완충액을 가하여 浮游液을 만들었다. 다시 이것을 2000×g로 10분간 원심분리한 후 그 침전물을 같은 용액에 부유시키어 대략 5mg protein/ml인 부유액을 만들었다. 이 부유액 1ml를 다음과 같이 준비된 sucrose density gradient위에 주의하여 증첩시켰다.

즉 용량 5.5ml인 polyethylene tube에 45%(w/w) 蔗糖용액 1ml를 가한 다음 41.5% 蔗糖용액 1.5ml를 경사진 관벽을 통하여 주의하여 증첩하고 다시 그 위에 37% 蔗糖용액 1.5ml를 같은 요령으로 경계가 교란되지 않게 첨가하였다. 이와 같이 sucrose density gradient 위에 증첩된 부유액 1ml을 200,000×g(MSE Centriscan 75, aluminium swing-out rotor, 41,000rpm)로 90분간 4°C에서 원심분리하였다. 원심분리후 41.5%와 37% 사이의 경계면에 생성된 막층을 주사기로 뽑아내어 증류수로 5배정도로 희석하여 5000×g로 10분간 다시 원심분리하였다. 그 침전물을 0.25M 蔗糖완충액에 부유시키어 4mg protein/ml인 부유액을 만들고 이를 5'-nucleotidase의 효소시료로 사용하였다.

無膜上清液(membrane-free supernatant)의 조제법(Song et al., 1968)

위에서 준비된 부유액의 일부를 Sonifier, Model W 185(Heat Systems-Ultra Sonic Inc.)를 사용하여 최대 출력으로 水槽속에서 30초 간격으로 3분간 sonify하였다. 이것을 140,000×g(MSE Centriscan 75, 5.5ml×6

swing-out rotor)로 1시간동안 원심분리하여 그 상정액을 취하고 5'-nucleotidase의 효소시료로 사용하였다.

5'-Nucleotidase의 활성측정법

이 효소의 활성측정계는 Segal등(1960)의 방법에 준하여 Tris 100μ mole(pH 7.5), 5'-AMP 2μ mole 및 효소액 0.1ml의 造成으로서 終末總容量이 2.0ml가 되도록 하였다. 이 측정계에 MgCl₂, MnCl₂, sodium dodecyl sulfate 및 sodium deoxycholate 등을 가할 때는 총용량에 변동이 없도록 하였으며 특별히 다른 언급이 없는 한 반응은 효소액을 가함으로써 시작하고 30°C에서 20분간 incubate한 후에 30% TCA 0.5ml를 가함으로써 그 반응을 정지시켰다. 효소반응을 기질인 AMP로 시작할 때는 먼저 효소액을 효소활성측정계의 완충액에 가하고 일정기간 30°C恒溫槽에서 incubate한 후 AMP를 가하여 반응을 시작하였고 20분후에 TCA를 가함으로써 반응을 정지시켰다. 그러나 SDS 0.6mg 이상을 함유한 측정계에는 30% TCA에 0.1M MgCl₂를 함유시킨 혼합용액 0.5ml를 가한 후 적어도 4시간 이상 방치한 후에 원심분리하였다.

상정액중의 AMP로부터 유리된 無機磷은 Fiske와 SubbaRow방법에 의거하여 UV-Visible spectrophotometer(Pye Unicam, England)를 사용하여 파장 660nm에서 정량하였다. 효소활성의 단위는 1시간 동안 AMP로부터 1μ mole의 무기인을 유리시키는데 필요한 효소의 활성을 1 unit로 정하고 비활성은 그 효소액의 단백질 단위 mg에 대한 효소활성으로 표시하였다.

Liposome의 조제법(Roelofsen & Schatzmann, 1977)

Phosphatidyl choline을 증류수에서 sonify하여 10mg/ml인 liposome 부유액을 만들었다.

단백질 정량

각 시료의 단백질은 Lowry방법(1951)에 의하여 정량하였으며 표준단백질로는 미리 Kjeldahlometry로 질소함량을 분석한 結晶牛血清 albumin을 사용하였다.

실험 결과

원형질막의 정제

Sucrose density gradient를 이용한 원심분리으로써 정제한 원형질막은 5'-nucleotidase의 비활성 증가를 토대로 하여 볼 때 10배 정도로 정제되었다. 5'-Nucleotidase는 방치해 둠에 따라 그 활성이 달라지므로 매번 실험할 때마다 새로이 원형질막을 정제하였고 그 정제 결과를 각 도 및 표에 비활성으로써 표시하였다.

5'-Nucleotidase활성에 대한 sodium dodecyl

sulfate의 영향

제 1 도에서 보는 바와 같이 5'-nucleotidase의 활성은 대조계(Tris 100 μ mole(pH 7.5), 5'-AMP 2 μ mole 및 효소액 0.1ml의 조성으로 종말 총용량이 2ml인 효소활성 측정계를 말함)에 첨가한 SDS의 농도가 증가함에 따라 증가하고 SDS가 고농도일 때는 그 활성은 약간 감소하는 경향을 보였다. 한편 그 대조계에 10mM Mg²⁺를 첨가한 후 SDS의 농도를 증가시키면 따라 5'-

nucleotidase의 활성은 상가적으로 증가하였으며 SDS가 고농도일 때는 5'-nucleotidase 활성은 약간 감소하는 경향을 보였다. 즉 대조계에 SDS를 첨가해감으로써 5'-nucleotidase 활성은 점점 증가하였으며 SDS 1mg을 함유하는 효소 측정계에서는 그 활성이 대조계에서보다 대략 25%의 증가를 보였으며 1mg 이상의 SDS 존재하에서는 효소 활성이 약간 감소하였다. 한편 10mM의 Mg²⁺을 SDS와 함께 효소 측정계에 가하면 5'-nucleotidase의 활성은 相加的으로 증가하여 1mg의 SDS 존재하에서 대략 55%의 증가를 보였다.

Sodium dodecyl sulfate micelle의 침전

0.6mg 이상의 SDS를 함유하고 있는 효소 측정계에 30% TCA 0.5ml를 가하고 원심분리하였을 때 그 상층액이 투명하지 않아 실험상의 문제가 제기되었다. 이러한 문제를 해결하기 위하여 phosphatidyl choline을 sonify하여 liposome을 만든 다음 SDS와 liposome의 농도를 변화시키어 이들의 혼합물을 만들고 여기에 TCA 또는 MgCl₂를 첨가함으로써 제 1 표에 요약한 바와 같은 결과를 얻었다.

제 1 표에서 보는 바와 같이 10mg/ml인 liposome은 5% TCA에 의하여 쉽게 침전되었으며 liposome의 양에 비하여 SDS농도가 상대적으로 낮은 혼합물 즉 10mg의 liposome과 1mg의 SDS를 포함하는 혼합물도 역시 5% TCA에 의하여 침전되었다.

그러나 liposome의 양에 비하여 SDS 농도가 상대적으로 높은 혼합물 즉 10mg의 liposome과 2mg의 SDS를 포함하는 혼합물은 5% TCA에 의하여서는 침전되지 않았고 0.1mM MgCl₂를 가함으로써만이 침전되었다. 이와 같이 Mg²⁺은 SDS micelle을 침전시킬 수 있으나 SDS micelle의 농도가 낮을 때는 적어도 4시간 이상 방치한 후에 원심분리하여야만 그 상층액이 투명하여졌다. 이러한 결과를 토대로 5% TCA에 0.1M MgCl₂를 함유시키으로써 liposome과 SDS의 어떤 비율의 혼합물도 침전시킬 수 있었을 뿐만 아니라 실험상의 문제도 해결하였다.

Sodium dodecyl sulfate에 의한 5'-nucleotidase의 변성

SDS가 5'-nucleotidase에 미치는 영향을 검토하기 위하여 SDS와 Mg²⁺이 함유되어 있는 측정계의 완충액에 미리 효소액을 가하고 30°C에서 일정기간 incubate한 후에 기질인 AMP를 가함으로써 5'-nucleotidase의 활성을 측정하였던 바 제 2 도에서 보는 바와 같이 pre-incubation 시간에 따라 그 효소 활성이 감소하였으며 같은 방법으로 대조계에서 5'-nucleotidase의 활성을 측정하였던 바 대조계의 低腸性(hypotonicity)에 의한

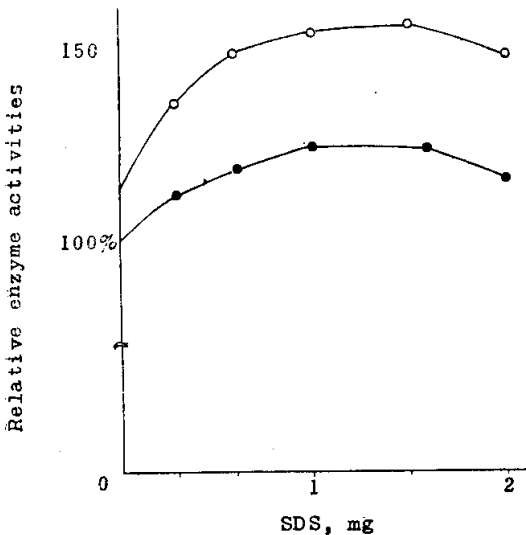


Fig. 1. Activation of 5'-nucleotidase of plasma membrane suspension by sodium dodecyl sulfate with or without Mg²⁺.

5'-Nucleotidase activity of this enzyme preparation was 6.50 units/mg protein. Various amounts of sodium dodecyl sulfate (SDS) were added to the control assay mixture consisting of 100 μ moles of Tris, pH 7.5 and 2 μ moles of 5'-AMP in a final volume of 2ml. Effects of Mg²⁺ on 5'-nucleotidase activity were observed by adding 20 μ moles of Mg²⁺(—○—○—○—) to these assay mixtures or excluding it (—●—●—●—) from them. Unless otherwise stated, 5'-nucleotidase activities were measured by starting the enzyme reactions with enzyme preparations. Relative specific enzyme activities in percentages were plotted against increases in SDS concentrations.

The supernatants of enzyme assay systems containing more than 0.6mg SDS were not cleared by trichloroacetic acid, while they were cleared by the addition of mixture of 30% TCA and 0.1M MgCl₂. Clearing effects of TCA and Mg²⁺ are tabulated in Table 1.

Table 1. Precipitation of phospholipid by trichloroacetic acid and of sodium dodecyl sulfate micelle by MgCl₂

Compositions of liposome suspension		Reagents added to the suspension			
Phosphatidyl choline (mg/ml)	SDS(mg/ml)	TCA (5%)	MgCl ₂ (0.1M)	MgCl ₂ (0.01M)	TCA (5%) +MgCl ₂ (0.1M)
10	0	Clear	Turbid	Turbid	Clear
10	1	Clear	Turbid	Turbid	Clear
10	2	Turbid	Clear	Turbid	Clear
1	1	Turbid	Clear*	Clear*	Clear*

* The mixtures were centrifuged after standing for 4 hours at the minimum.

Phosphatidyl choline was converted to liposome in distilled water by sonication. The suspension were composed of various ratios of liposome to SDS. Either one of TCA, MgCl₂ or the mixture of the two was added to liposome suspensions, which, then, were centrifuged to precipitate phosphatidyl choline. "Clear" indicates that the phospholipid was precipitated and "Turbid" that the phospholipid not precipitated.

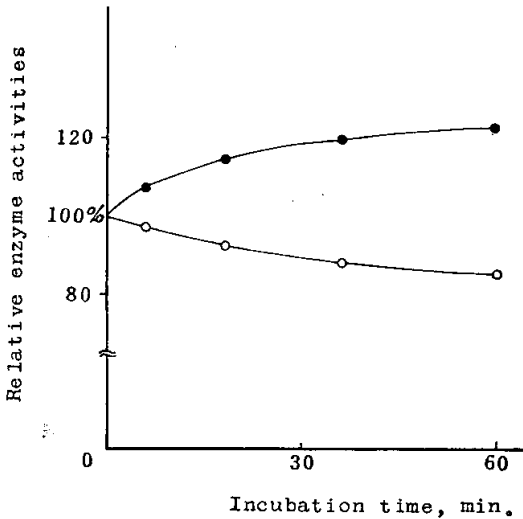


Fig. 2. Denaturation of 5'-nucleotidase of plasma membrane suspension by sodium dodecyl sulfate.

5'-Nucleotidase activity of this enzyme preparation was 6.50 units per mg protein. 5'-Nucleotidase activities were measured by starting the enzyme reaction with substrate. Before addition of the substrate the enzyme preparation was incubated in the following assay media at 30°C.

- : Control medium (100μ moles of Tris, pH7.5)
- : Control medium + 1mg SDS + 10mM MgCl₂.

영향으로 5'-nucleotidase의 활성은 preincubation시간에 따라 증가하였다. 즉 대조제에서 5'-nucleotidase의 활성은 preincubation시간에 따라 점차 증가하여 60분

후에는 그 활성이 23% 증가였으며 SDS와 Mg[#]를 함유하는 측정계에서는 5'-nucleotidase의 활성은 preincubation 시간에 따라 점차 감소하여 60분후에는 그 활성이 16%의 감소를 보였다.

Deoxycholate에 의한 5'-nucleotidase의 활성증가

제 2도에서 보는 바와 같이 5'-nucleotidase는 SDS에 의하여 변성되므로 실제로 SDS를 함유하는 효소측정계에서 측정되는 5'-nucleotidase의 활성은 청정제 작용에 의한 활성증가와 변성에 의한 활성감소의 차가 된다. 청정제 작용에 의한 효과를 극대화하기 위하여 SDS보다 변성작용이 약한 청정제인 deoxycholate를 사용해서 5'-nucleotidase의 활성을 측정할 결과는 제 3도와 같다.

5'-Nucleotidase활성은 deoxycholate의 농도에 따라 증가하였다. 즉 5'-nucleotidase의 활성은 sodium deoxycholate의 농도에 따라 증가하여 그 농도가 20mg/ml 때는 그 활성이 대략 30%의 증가를 보였다.

한편 deoxycholate제에 첨가된 Mg[#]는 SDS계에서와 같이 5'-nucleotidase활성증가에 대한相加효과를 유발하였다. 그러나 sodium deoxycholate가 1mg 이상일 때는 10mM Mg[#]은 deoxycholate를 서서히 침전시켜서 deoxycholate를 더 높은 농도로서는 사용할 수가 없었다. 제 4도에서 보는 바와 같이 Mg[#]의 효과적인 농도인 10mM보다 더 낮은 농도로서 5'-nucleotidase의 활성을 증가시키는 다른 금속이온은 찾은 결과, Mn[#]임을 알 수 있었다.

즉 5'-nucleotidase의 활성은 대조제에 10mM Mg[#]를 첨가함에 따라 12%의 활성증가를 보였고 대조제에 0.1mM Mn[#]를 첨가하여도 같은 크기의 활성증가를 보였다. 여기에 deoxycholate가 첨가됨에 따라 5'-nu-

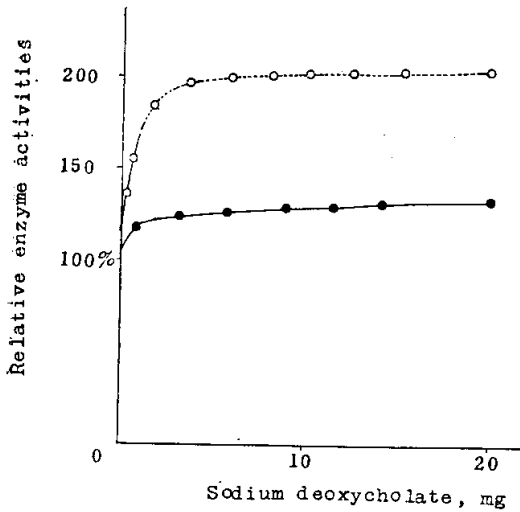


Fig. 3. Activation of 5'-nucleotidase of plasma membrane suspension by deoxycholate with or without Mn²⁺ or Mg²⁺.

5'-Nucleotidase activity of this enzyme preparation was 7.18 units per mg protein. 5'-Nucleotidase activities were measured in the enzyme assay systems containing various amounts of sodium deoxycholate (—●—●—●—●—) to which either 10mM MgCl₂ (—○—○—○—○—) or 0.1mM MnCl₂ (···○···○···○···○···) was added. At the concentrations within 1mg sodium deoxycholate in the enzyme assay systems, 10mM Mg²⁺ and 0.1mM Mn²⁺ exerted the same magnitude of effect on 5'-nucleotidase. At the concentrations of more than 1mg sodium deoxycholate, 10mM MgCl₂ precipitated deoxycholate, but 0.1mM MnCl₂ did not.

cleotidase활성은 deoxycholate의 농도에 따라 증가하여 sodium deoxycholate의 농도가 1mg일 때 10mM Mg²⁺ 존재하에서는 그 활성이 대조계에서보다 대략 70% 증가를 보였고 0.1mM Mn²⁺ 존재하에서도 그 활성이 역시 70% 증가를 보였다. 이로써 Mn²⁺은 0.1mM로서 Mg²⁺의 10mM과 거의 같은 정도의 5'-nucleotidase의 활성을 증가시켰고 0.1mM Mn²⁺은 1mg이상 농도의 deoxycholate를 침전시키지 않았다. 따라서 sodium deoxycholate의 농도가 20mg이고 Mn²⁺이 0.1mM일 때의 측정계에서 5'-nucleotidase의 활성은 대조계에서보다 대략 100% 이상 증가를 보였다.

Mn²⁺영향

제 4도의 결과에서 알 수 있듯이 5'-nucleotidase의 활성을 증가시키는 Mn²⁺의 최적농도는 0.01mM에서 0.5mM에 이르기까지의 광범한 농도였으나 이보다도

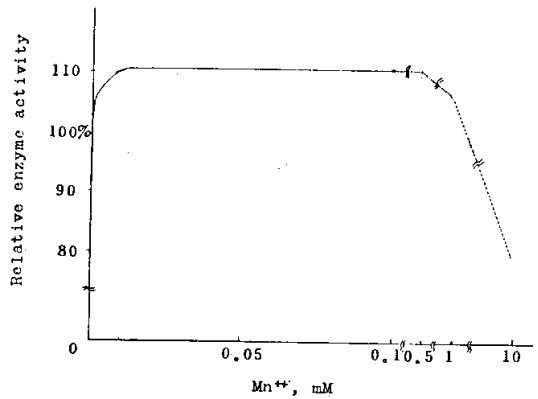


Fig. 4. Activation of 5'-nucleotidase of the plasma membrane suspension by Mn²⁺.

5'-Nucleotidase activity of this enzyme preparation was 6.28 units per mg protein.

높은 농도의 Mn²⁺은 5'-nucleotidase활성을 오히려 억제하여 10mM에서의 5'-nucleotidase의 활성은 대조치의 80%에 이르렀으며 원형질막이 응결되어 침전되는 것이 관찰되었다.

대조계의 완충액에 효소시료를 가하고 일정기간 preincubation한 후에 AMP를 가하여 5'-nucleotidase의 활성을 측정하였던 바 제 5도에서 보는 바와 같이 preincubation시간에 따라 그 활성이 서서히 증가하여 60분 후에는 그 활성이 대략 20% 증가하였다.

Sodium deoxycholate 20mg을 대조계의 완충액에 첨가한 후 위와 같은 방법으로 측정한 5'-nucleotidase의 활성도 역시 preincubation시간이 경과함에 따라 증가하여 60분후에는 preincubation전의 대조계에서의 활성치보다 대략 70% 증가하였다. 그러나 0.1mM Mn²⁺와 sodium deoxycholate 20mg을 함께 첨가하여 같은 방법으로 측정한 5'-nucleotidase활성은 preincubate하기 전에 이미 대조계에서의 활성치보다 대략 110%정도 증가하여 preincubation시간에 따라 거의 변화가 없었다. 한편 0.1mM Mn²⁺만이 첨가되었을 때는 5'-nucleotidase활성은 대조계에서의 활성치보다 10%정도 증가하여 preincubation시간에 따라 거의 일정하였다. 이로써 deoxycholate에 의한 5'-nucleotidase의 활성증가는 매우 서서히 진행되는 반응으로 보이며 여기에 Mn²⁺을 첨가함에 따라 그 반응은 즉시 최대점에 도달하여 preincubation시간에 따라 변화 없음을 보여주었다.

5'-Nucleotidase활성에 대한 방치(aging)의 영향

원형질막 부유액을 4°C냉장고에 방치하면서 그 부유액의 5'-nucleotidase의 활성을 대조계, deoxycholate

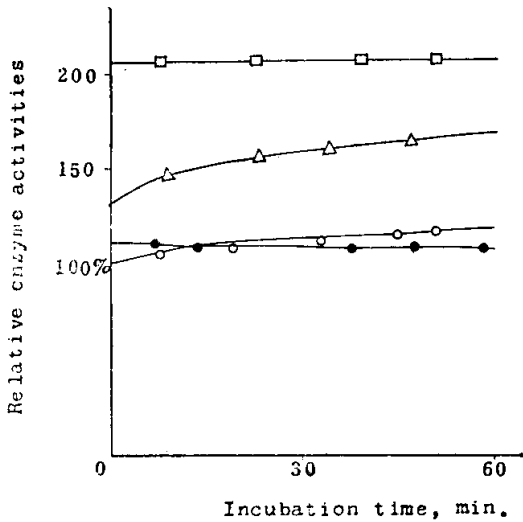


Fig. 5. Catalytic effect of Mn^{2+} on the increase in 5'-nucleotidase activity caused by deoxycholate.

5'-Nucleotidase activity of this enzyme preparation was 7.14 units per mg protein. 5'-Nucleotidase activities were measured by starting the enzyme reaction with substrate. Before addition of the substrate, the enzyme preparation was incubated in the following assay media at 30°C:

- : Control medium (100 μ moles of Tris, pH 7.5).
- : Control medium+0.1mM $MnCl_2$
- △—△—△— : Control medium+20mg deoxycholate
- : Control medium+20mg deoxycholate+0.1mM $MnCl_2$

0.2mg+0.1mM Mn^{2+} 계, deoxycholate 2mg+0.1mM Mn^{2+} 계 및 deoxycholate 20mg+0.1mM Mn^{2+} 계 (활성제)에서 측정된 바 제 6도에서 보는 바와 같이 방치기간에 따르는 5'-nucleotidase의 활성증가율은 deoxycholate의 농도가 증가함에 따라 점차 감소하여 deoxycholate의 농도가 20mg일 때는 그 증가율은 거의 0이었다.

즉 활성제에서 5'-nucleotidase의 활성을 방치전에 이미 대조계의 활성치보다 대략 100% 높음으로써 방치기간에 따라 거의 변화가 없었다. 한편 deoxycholate 2mg+0.1mM Mn^{2+} 계에서는 5'-nucleotidase의 활성은 방치전에 대조계의 활성치보다 대략 80% 높으며 100시간 후에 그 활성은 대조계의 활성치보다 대략 90% 높아서 100시간 방치기간의 증가율은 대략 10%였다. Deoxycholate 0.2mg+0.1mM Mn^{2+} 계에서는 5'-nucleo-

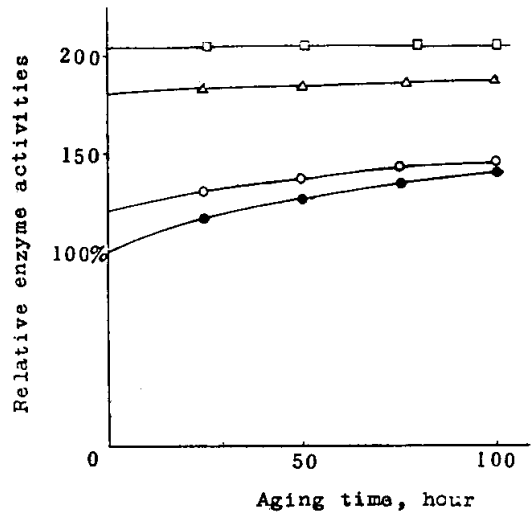


Fig. 6. Measurement for the 5'-nucleotidase activity of plasma membrane suspension in the various enzyme assay system, upon aging at 4°C.

5'-Nucleotidase activity of this enzyme preparation was 7.60 units per mg protein. The enzyme activities were measured in the following assay systems:

- : Control system (100 μ moles of Tris, pH 7.5+2 μ moles of 5'-AMP in 2ml)
- : Control system+0.2mg of sodium deoxycholate+0.1mM $MnCl_2$.
- △—△—△— : Control system+2mg of sodium deoxycholate+0.1mM $MnCl_2$.
- : Control system+20mg of sodium deoxycholate+0.1mM $MnCl_2$.

tidase의 활성은 방치전에 대조계의 활성치보다 대략 20% 높으며 100시간 후에는 그 활성이 대조계의 활성치보다 45% 높아서 100시간 방치기간의 증가율은 대략 25%였다. 또한 대조계에서는 5'-nucleotidase의 활성은 방치에 따라 100시간 후에는 대략 40%의 증가를 보였다.

무막상청액을 4°C 냉장고에 방치하면서 그 상청액의 5'-nucleotidase의 활성을 대조계, 0.1mM Mn^{2+} 계 및 활성제에서 측정된 바 제 7도에서 보는 바와 같이 방치에 의한 활성증가는 대조계에서 가장 현저하였고 활성제에서는 거의 0이었다. 즉 5'-nucleotidase의 활성은 방치전에 이미 대조계의 활성치보다 대략 70% 높

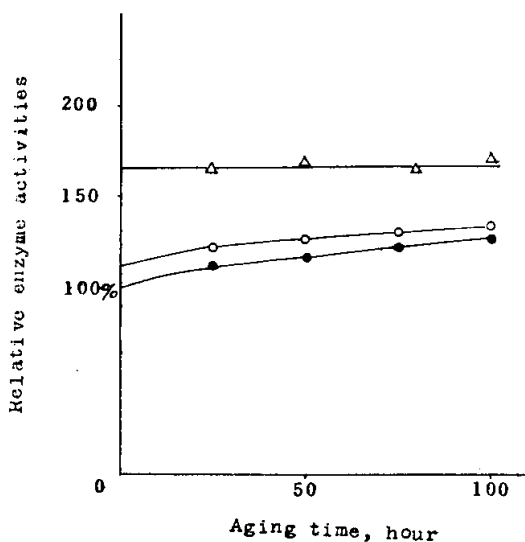


Fig. 7. Measurement for the 5'-nucleotidase activity of membrane-free supernatant in the various enzyme assay systems, upon aging at 4°C.

The membrane-free supernatant was obtained by centrifuging the sonified plasma membrane suspension at 140,000xg for 1 hour. In the supernatant, about 70% of the 5'-nucleotidase activity was recovered. 5'-Nucleotidase activity of this enzyme preparation was 10.4 units per mg protein.

The enzyme activities were measured in the following assay systems:

- : Control system (100 μ moles of Tris, pH 7.5+2 μ moles of 5'-AMP in 2ml)
- : Control system+0.1mM MnCl₂
- △—△—△—: Control system+20mg of sodium deoxycholate+0.1mM MnCl₂

으며 방치기간에 따라 거의 변화가 없었다. 한편 0.1 mM Mn²⁺계에서는 5'-nucleotidase의 활성은 방치전에 대조계의 활성치보다 대략 10% 높으며 100시간 후에는 그 활성이 대조계의 활성치보다 대략 35% 높아서 100시간 방치기간의 증가율은 대략 25%였다. 또한 대조계에서는 5'-nucleotidase의 활성은 방치전에 따라 100시간 후에는 대략 30%의 증가를 보였다.

5'-Nucleotidase의 apparent Km치 측정

원형질막 부유액의 같은 용량을 사용하여 대조계 및 활성계에서 기질의 농도를 변화시키면서 5'-nucleotidase의 활성을 측정한 결과를 제 8도와 같이 Lineweaver-Burk plot 한 바 apparent Km치는 두계에서 같아서

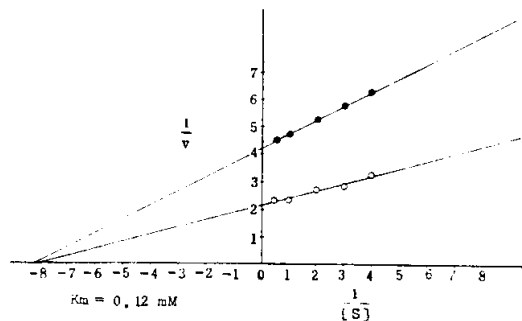


Fig. 8. Lineweaver-Burk plot of 5'-nucleotidase activity measured in the control system (—●—●—●—) and in the activation system (—○—○—○—).

5'-Nucleotidase activity of this enzyme preparation was 7.90 units per mg protein. The same amount of enzyme preparation was used to measure apparent Km value for 5'-nucleotidase in each enzyme system. Substrate was expressed as the reciprocal of concentration of 5'-AMP in millimole and velocity was expressed as half the reciprocal of absorbance measured by Fiske and Subbarow method.

0.2mM이었고 Vmax는 대조계에서보다 활성계에서 대략 2배가 높았다.

5'-Nucleotidase의 열안정도

제 2 표에서 보는 바와 같이 원형질막 부유액을 45°C와 50°C에서 1시간 동안 가열한 후에 5'-nucleotidase

Table 2. Heat stability of 5'-nucleotidase of plasma membrane suspension

Enzyme assay system	Control system (100 μ moles of Tris, pH 7.5+2 μ moles of 5'-AMP in 2ml)	Activation system (Control system+20mg of sodium deoxycholate +0.1mM Mn ²⁺)
Treatment of the enzyme preparation		
Stored in the ice bath	100%	207%
Heated at 45°C for 1 hour	116%	209%
Heated at 50°C for 1 hour	85%	128%

5'-Nucleotidase activity of this enzyme preparation was 6.13 units per mg protein. The enzyme preparation was divided into 3 fractions. One was stored in the ice bath and the second being heated at 45°C for 1 hour and the third heated at 50°C for 1 hour. The enzyme activities of each enzyme preparation were expressed as the relative specific activities (%) to that of the enzyme preparation stored in the ice bath, measured in the control system.

의 활성을 대조제에서 측정된 결과, 0°C에 보전한 시료의 5'-nucleotidase의 활성을 100%로 본다면 45°C 시료의 활성은 16%가 증가하였고 50°C 시료의 활성은 오히려 15%가 감소하였다.

한편 위에서와 같이 처리한 시료의 활성을 활성제에서도 측정된 결과 0°C 시료의 5'-nucleotidase의 활성은 대조제에서의 활성치보다 107% 높으며 45°C 시료의 활성은 0°C 시료의 대조제에서의 활성치보다 109% 높아서 45°C에서는 가열에 의한 효소의 변성이 없음을 보였고 50°C 시료의 활성은 0°C 시료의 대조제에서의 활성치보다 28% 밖에 높지 않아서 45°C 시료의 활성제에서의 활성치에 비하면 81% 감소하여 50°C에서는 효소가 변성됨을 보여주었다.

고 찰

원형질막의 정제방법은 본래 Neville에 의하여 개발되고 이어 수정(Neville, 1968)되었지만 조직을 homogenize하는 용액은 역시 1mM의 NaHCO₃를 사용하는 것으로서 변화가 없었다. 그후 Ray(1970)는 1mM NaHCO₃에 0.5mM CaCl₂를 함유시켜서 원형질막의 精製度 및 回收率을 높였다. 그러나 이러한 방법에서는 homogenize하는 용액의 低張性(hypotonicity)에 의하여 원형질막의 구조가 변형될 가능성이 있기 때문에 이를 배제하기 위하여 Brown등(1976)은 等張 KCl을 사용하였고 Berman(1969)등은 等張 蔗糖에 0.5mM CaCl₂를 함유시킨 용액을 사용한 바 있었고 본 실험에서도 저장성이 원형질막의 구조에 미칠 수 있는 영향을 배제하기 위하여 Berman의 방법에 따라 원형질막을 정제한 것이다.

생체막에 결합된 효소들은 대부분이 그 활성의 발현을 위하여서는 膜脂質을 필요로 하며 또 이에 의하여 그 활성이 조절되는 것으로 알려져 있다 (Duttera et al., 1960; Zakim, 1970; Vessey & Zakim, 1971). 放置(aging)에 의한 5'-nucleotidase의 활성증가원인이 막지질의 過酸化에 의한 변화인지를 구명하려고 본 연구에서 막지질을 용해하는데 가장 강력한 청정제로 알려진 SDS를 효소활성측정계에 가하고 그 활성을 측정하였던 바 5'-nucleotidase활성이 증가하였다. 효소활성의 발현을 위하여 막지질을 필요로 하는 효소들은 SDS를 그 효소활성측정계에 첨가함으로써 그 활성이 급격히 감소(Joergensen, 1974)하는 사실에 비추어 보면 5'-nucleotidase는 생체막에 결합되어 있더라도 그 활성의 발현을 위하여 막지질을 필요로 하지 않음을 알 수 있었다.

Mg²⁺이 5'-nucleotidase의 활성을 증가시키는 원인이 막지질과 관련이 있는지의 여부의 구명을 위해서 SDS와 함께 10mM Mg²⁺을 효소활성측정계에 첨가하였던 바 5'-nucleotidase의 활성은 相加적으로 증가하였다(제 1도). 이러한 결과는 막지질로부터 유리된 5'-nucleotidase는 Mg²⁺에 의하여 크게 활성화되는 것 같은 인상을 주었다. 그러나 제 2도에서 보는 바와 같이 SDS는 5'-nucleotidase를 변성시키므로 좀더 그 변성작용이 약한 청정제인 sodium deoxycholate를 사용하였던 것이다. Deoxycholate는 SDS보다 훨씬 높은 농도로써 5'-nucleotidase의 활성을 증가시켰으며 그 효과는 SDS보다 약간 더 우월하였다(제 3도).

10mM Mg²⁺과 같은 효과를 나타내는 0.1mM Mn²⁺(제 4도)과 deoxycholate를 함께 효소활성측정계에 가하고 5'-nucleotidase의 활성을 측정된 결과 그 상가효과가 SDS보다 더 커서 deoxycholate가 20mg일 때 활성증가는 대략 100%에 이르렀다.

이러한 증가는 막지질로부터 유리된 5'-nucleotidase가 Mn²⁺에 의하여 활성화되었다고 하기에는 너무나 높은 증가였다.

이와 같은 증가는 어떤 잠재적인 효소활성이 활성제에 의하여 발현된 것이라고 가정하고 5'-nucleotidase의 활성이 放置해 둠으로써 증가하는 것도 역시 잠재적인 활성이 서서히 발현되는 것으로 가정한다면 5'-nucleotidase의 효소시료를 방치해 두면서 대조제와 활성제에서 그 활성을 측정할 때는 5'-nucleotidase의 활성은 대조제에서는 계속하여 증가할 것이고 활성제에서는 일정한 것이 예상된다. 실험결과와는 기대했던 바와 같이 효소시료가 원형질막 浮游液이든 無膜上清液이든간에 방치해 둠으로써 5'-nucleotidase의 활성이 대조제에서는 증가하였고 활성제에서는 거의 일정하였다(제 6도 및 7도).

효소시료가 무막상청액인 경우에 5'-nucleotidase의 활성이 방치해 둠으로써 대조제에서 증가하였다는 사실은 방치에 의한 효소활성증가는 막지질과 관련이 없음을 입증하는 사실이고 대조제에서 보다 활성제에서의 5'-nucleotidase활성증가(deoxycholate와 Mn²⁺의 상가효과) 또한 막지질과 관련이 없음을 입증하는 것이다.

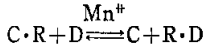
이러한 사실들로 미루어 방치에 의한 효소활성증가는 5'-nucleotidase의 분자자체문제로 압축할 수가 있음으로 다음과 같은 가정으로써 방치에 의한 효소활성증가를 합리적으로 설명할 수가 있을 것이다.

일종의 조절물질 R이 5'-nucleotidase의 촉매분자 C에 결합되어 있는 것으로 본다면, C는 그 효소의 활성

형이고 C·R은 불활성형이 된다. 그리고 C는 열에 안정한 단백질이고 R은 열에 불안정한 물질이다. 방치에 따라 R은 천천히 변성되어 C·R로부터 유리됨으로써 활성형의 증가를 초래한다고 본다면 본 연구의 결과와 합치되는 바가 크다.

즉 이상과 같은 가정은 다음의 실험결과로써 뒷받침 되는 것으로 볼 수 있겠다.

가) Mn²⁺의 농도를 0.1mM로 고정하고 sodium deoxycholate의 농도를 변화시키어 만든 효소활성측정계에서 측정된 5'-nucleotidase활성은 deoxycholate농도에 따라 증가하고 방치에 의한 5'-nucleotidase의 활성증가율은 sodium deoxycholate의 농도가 증가함에 따라 감소하여 sodium deoxycholate가 20mg일 때는 거의 0에 가까웠다(제 6 도). 이러한 결과는 다음 평형식에 의하여 설명된다.



여기서 D는 deoxycholate분자를 표시한다. 따라서

$$\frac{[C][R \cdot D]}{[C \cdot R][D]} = K$$

$$\frac{[C \cdot R]}{[C]} = \frac{1}{K[D]} [R \cdot D]$$

$\frac{[C \cdot R]}{[C]}$ 은 불활성형과 활성형의 비율이므로 이 값이 적게 되는 효소활성측정계에서는 5'-nucleotidase의 활성은 높게 측정된다.

$\frac{[C \cdot R]}{[C]}$ 는 R·D에 비례하고 D에 역비례한다. 그러므로 D가 크면 클수록 5'-nucleotidase의 활성은 높게 측정된다. 방치에 의해서 R의 변성으로 R·D의 농도는 감소한다. 그런데 R·D의 감소는 D로 나누어지므로 R·D의 감소가 같더라도 D가 적으면 $\frac{[C \cdot R]}{[C]}$ 의 감소가 커서 방치에 의한 효소활성증가율이 크지만 D가 상당히 크면 $\frac{[C \cdot R]}{[C]}$ 의 감소는 거의 무시할 수 있고 따라서 방치에 의한 활성증가가 거의 없게 된다.

나) 같은 양의 효소를 사용하여 대조계와 활성계에서 5'-nucleotidase의 apparent Km값을 측정하였으나 그 값이 두계에서 같았고 Vmax는 대조계에서보다 활성계에서 대략 2배로 증가하였다(제 8 도). 두계에서 Km값이 같다는 사실은 효소분자가 deoxycholate에 의하여 그 분자의立體構造에 영향을 받지 않음을 의미하고 Vmax가 2배라 함은 대조계보다 활성계의 활성효소분자수가 두배라는 사실을 의미한다. 즉 이러한 결과는 불활성분자가 deoxycholate에 의하여 활성분자로 전환되어야만 가능해진다.

다) 제 2 표에서 보는 바와 같이 45°C에서 1시간 동안 가열한 효소시료의 5'-nucleotidase활성은 0°C에 보존한 효소시료의 5'-nucleotidase활성보다 대조계에서는 16% 증가하였고 활성계에서는 별 차이가 없었다. 따라서 대조계에서의 증가는 R의 변성에 의한 결과로 해석할 수 있고 활성계에서 별 차이가 없는 것으로 보아 C는 열에 안정하므로 전체 C 즉 C+C·R에는 양적인 변화가 없다는 뜻이 된다. 그러므로 45°C에서는 R만이 선택적으로 변성된다고 말할 수 있다.

50°C에서 1시간 동안 가열한 효소시료의 5'-nucleotidase활성은 0°C에서 보존한 효소시료의 그것보다 대조계에서는 15%가 그리고 활성계에서는 80%가 감소하였다. 이로 인해 50°C에서의 효소시료의 5'-nucleotidase활성은 대조계에서보다 활성계에서 대략 50%밖에 증가하지 않았다. 이러한 증가는 0°C 효소시료의 5'-nucleotidase활성이 대조계에서보다 활성계에서 대략 100% 증가하였다는 사실과 비교해보면 매우 낮은 결과이다. 즉 100% 증가는 그 효소시료중에 C와 C·R의 비가 1:1임을 의미하고 50% 증가라 함은 C와 C·R의 비가 2:1임을 의미한다. 그러므로 50°C에서는 C와 R이 공히 변성되지만 C보다는 R이 훨씬 더 큰 비율로 변성되는 것이 아닌가 생각된다.

라) 無膜上清液의 5'-nucleotidase비활성(specific activity)은 부유액의 그것에 비하여 약간 증가하였다. 부유액의 5'-nucleotidase활성은 대조계에서보다 활성계에서 대략 100% 증가한 반면에 무막상청액의 그것은 대조계에서 보다 활성계에서 70%밖에 증가하지 않았다(제 6 도 및 7 도). 이러한 결과로 보아 무막상청액을 조제하기 위하여 부유액을 sonify하는 과정에서 R이 이미 변성되어 C가 증가한 것으로 생각할 수 있고 이로 인해 부유액중의 C와 C·R의 비율이 1:1.1이던 것이 무막상청액중의 C와 C·R의 비는 1:0.7로 되었다고 생각할 수가 있다.

이상의 고찰로 보아 5'-nucleotidase에 조절물질이 결합되어 있는 示唆를 얻었으며 그 존재를 가정한다면 방치에 의한 이 효소의 활성증가를 합리적으로 설명할 수가 있다고 생각된다.

5'-nucleotidase分子의 이와 같은 조절물질의 존재와 유사한 예는 cyclic AMP에 의하여 활성화되는 protein kinase에서 찾아볼 수 있다 (Chen & Walsh, 1971; Brostrom et al., 1971).

즉 protein kinase는 조절 subunit(R)와 촉매 subunit(C)와의 複合體(C·R)이며 cyclic AMP에 의하여 解離되어 활성화된다.



이러한 예로써 유추하건대 5'-nucleotidase에도 그 조절물질을 해리시킬 수 있는 deoxycholate 아닌 보다 더 강력한(낮은 농도로서 효과적임을 뜻함) 자연분자가 있을 것으로 추측된다.

한편 본 실험의 결과는 5'-nucleotidase의 조절물질의 분리가능성을 암시하고 있다. 즉 생체막에 결합된 단백질을 막으로부터 분리하여 정제할 때는 청정제를 사용하여 막을 용해시킨 후 gel filtration으로 脫脂단백질(lipid-free protein)을 기도하고(Makino et al., 1973; Helenius & Simons, 1972) 5'-nucleotidase도 청정제를 사용하여 23배까지 정제하였다고 보고한 예도 있다(Evans & Gurd, 1972). 그러나 본 실험의 결과에 의하면 청정제는 조절물질과 결합하여 촉매분자로부터 조절물질을 유리시키기 때문에 청정제를 사용하면 C·R 복합체를 분리할 수 없을 것으로 생각되나 sonication으로 얻어진 상침액은 청정제를 사용하지 않고 얻은 脫脂단백질용액이므로 이 용액을 gel filtration이나 DEAE-cellulose chromatography법으로 처리하면 C와 C·R을 각각 분리할 수도 있을 것으로 예측된다. 이러한 가능성을 더욱 뒷받침하는 것으로서는 gel filtration이나 chromatography에서 나오는 각 분획중의 5'-nucleotidase활성을 활성제와 대조제에 나누어 따로 측정하는 것이다. 그렇게 되면 C·R을 검출할 수 있을 뿐만 아니라 C와 C·R을 구별할 수도 있지 않을까 생각된다.

요 약

原形質膜에 결합되어 있는 5'-nucleotidase는 세포분획에서 원형질막을 확인하는 추적효소(marker enzyme) 중의 하나이다. 근년에는 전이성 간암에 대한 임상 진단적 가치를 비롯하여 혈관확장작용을 갖는 adenosine을 AMP로부터 생성케함으로써 혈류조절을 하는 것으로 이 효소의 중요성이 밝혀지고 있을 뿐더러 원형질막을 방치해 둠으로써 그 활성이 증가함을 본다.

생체막에 결합된 효소들은 그 대부분이 생체막을 방치해 둠에 따라 그 활성이 현저히 감소하는 사실에 비추어 보면 방치에 의한 이 효소의 활성증가는 매우 특이한 현상이므로 이의 기전을 밝히고자 원추간에서 sucrose density gradient 원심분리로 원형질막을 정제하여 원형질막의 浮游液을 만들고 이중 일부를 초음파로 파괴한 후 초원심분리하여 無膜上清液(membrane-free supernatant)을 얻어 각각을 효소시료로 삼았고 5'-nucleotidase활성은 기질 및 완충액으로만 이루어진

대조제와 이에 sodium deoxycholate와 $MnCl_2$ 를 함유시켜서 만든 활성제에서 각각 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

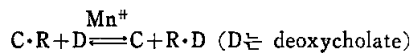
1. 부유액과 무막상침액은 다같이 방치함으로써 5'-nucleotidase의 활성이 증가하였음에 비추어 방치에 의한 이 활성증가는 생체막에 의함이 아니요 효소자체의 특성임을 알았으며 부유액 및 무막상침액의 5'-nucleotidase의 활성은 대조제에서보다 활성제에서 각각 100%와 70% 높았으며 45°C에서 1시간 동안 가열한 부유액의 5'-nucleotidase활성은 대조제에서는 증가하였고 활성제에서는 변화가 없었다.

2. Deoxycholate에 의한 5'-nucleotidase의 활성증가는 매우 느린 반응이었으나 $MnCl_2$ 를 첨가함으로써 이 반응은 촉진되어 즉시 최대점에 도달하였다.

3. 같은 양의 부유액을 사용하여 대조제와 활성제에서 측정된 5'-nucleotidase의 apparent K_m (0.12mM)치는 같았고 V_{max} 는 대조제에서보다 활성제에서 약 2배가 높았다.

4. 부유액 및 무막상침액의 5'-nucleotidase활성은 첨가한 deoxycholate의 농도에 비례해서 증가하였으나 시료의 방치에 의한 증가율은 대조제에서는 검증하지만 활성제에서는 deoxycholate 농도에 비례하였다.

5. 위 결과에 대한 합리적 기전 설명을 위하여 저자는 일종의 조절물질 R이 5'-nucleotidase의 촉매분자 C에 결합되어 있음을 가정하는 考察을 시도하였다. 즉 C가 효소의 활성형이라면 C·R은 불활성형이며 C는 비교적 열에 안정한 단백질인 반면 R은 열에 불안정한 물질임을 상정할 수 있었다. 따라서 5'-nucleotidase를 방치해 둠으로써 이 효소의 R성분이 서서히 변성되어 C·R로부터 유리됨으로써 활성형의 증가를 초래하며 R은 활성제에서 deoxycholate에 결합되어 C·R로부터 유리되는 것으로 보고 다음과 같은 평형식이 성립됨을 고찰하였다.



-ABSTRACT-

Mechanism for Increase in 5'-Nucleotidase Activity of Rat Liver Plasma Membrane upon Aging *in vitro*

Hong Keun Chung and Ki Yung Lee

Department of Biochemistry, College of Medicine, Seoul National University

5'-Nucleotidase is one of the marker enzymes for

plasma membrane in subcellular fractionation. In recent years it is shown that the enzyme is not only important in its diagnostic value for hepatic metastatic carcinoma, but also responsible for its regulation of blood flow through hydrolysis of AMP to adenosine, a powerful vasodilator.

It was reported as well that its activity of plasma membrane is increased upon aging the membrane. While most enzymes bound to membranes decrease in their activities upon aging the membranes in vitro, 5'-nucleotidase activity is increased to the contrary under the same condition. The present investigation was carried out to elucidate the possible mechanism involved in the phenomenon.

Plasma membrane was purified from rat liver homogenate by sucrose density gradient and was suspended in isotonic sucrose solution, part of which was sonified and ultracentrifuged to obtain membrane-free supernatant, and both samples were used as enzyme sources. The behaviors of 5'-nucleotidase were observed in the control system consisting of substrate and buffer, and in the activation system consisting of substrate, buffer, sodium deoxycholate, and $MnCl_2$.

The results obtained are summarized as follows.

1. From the results showing the increased activities of 5'-nucleotidase of both the plasma membrane suspension and the membrane-free supernatant upon aging the samples, it is concluded that it is independent of the membrane structure but is due to the property of enzyme molecule itself. The 5'-nucleotidase activities of both the suspension and the supernatant, measured in the activation system were approximately 100% and 70% respectively higher than those measured in the control system.

After incubation of the suspension at 45°C for 1 hour, the 5'-nucleotidase activity was increased by 16% in the control system, while it showed no variation in the activation system.

2. The increase in 5'-nucleotidase activity caused with deoxycholate in the absence of Mn^{2+} in the assay system was a very slow reaction but the reaction reached immediately to a maximum in the presence of Mn^{2+} .

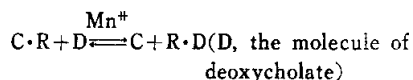
3. Apparent K_m values for 5'-nucleotidase mea-

sured with the same amount of suspension in the control system and in the activation system were the same, 0.12mM but V_{max} for the reaction was about 2-fold greater in the activation system than that measured in the control system.

4. The increase in 5'-nucleotidase activities of the suspension and the supernatant was directly dependent on the concentration of deoxycholate in the presence of Mn^{2+} in the assay system, while their rates of increase upon aging the enzyme preparation were inversely dependent on the concentration of deoxycholate.

5. The above results may well be explained reasonably by assuming the presence of a regulatory substance, R being associated with the catalytic enzyme molecule, C of 5'-nucleotidase; C, an active form of the enzyme, whereas C.R, a latent form of the enzyme.

From the foregoing results it can be inferred that C could be a thermally stable protein, whereas R may be a thermally unstable substance; the latter being slowly denatured upon aging and released from C.R, which leads eventually to the increase in active form. It can also be inferred that R is released from C.R by deoxycholate in the activation system for which the following equation could be suggested.



REFERENCES

- Ahmed, Z. and Reis, T.L.: *The activation and inhibition of 5'-nucleotidase. Biochem. J.*, **69**:386, 1958.
- Avruch, J. and Wallach, D.F.H.: *Preparation and properties of plasma membrane and endoplasmic reticulum fragments from isolated rat fat cells. Biochim. Biophys. Acta*, **233**:334, 1971.
- Beck, P.R., Belfield, A., Spooner, R.J., Blumgart, L.H and Wood, C.B.: *Serum enzymes in the diagnosis of hepatic metastatic 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.

- Brostrom, C.O., Corbin, J.D., King, C.A. and Krebs, E.G.: *Interaction of the subunits of adenosine 3':5'-cyclic monophosphate-dependent protein kinase of muscle. Proc. Nat. Acad. Sci.*, 68:2444, 1971.
- 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.
- Chen, L.J. and Walsh, D.A.: *Multiple forms of hepatic adenosine 3':5'-monophosphate dependent protein kinase. Biochemistry*, 10:3614, 1971.
- 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.
- DePierre, J.W. and Karnovsky, M.L.: *Plasma membranes of mammalian cells. J. Cell Biol.*, 56:276, 1973.
- Duttera, S.M., 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.
- Evans, W.H. and Gurd, J.W.: *Preparation and properties of nexuses and lipid-enriched vesicles from mouse liver plasma membranes. Biochem. J.*, 128:691, 1972.
- Fiske, G.H. and SubbaRow, Y.J.: *In Methods in Enzymology, Vol. III, Academic Press, 1957, p.843.*
- Frick, G.P. and Lowenstein, J.M.: *Studies of 5'-nucleotidase in the perfused rat heart. J. Biol. Chem.*, 251:6372, 1976.
- Gerlach, U. and Hiby, W.: *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.
- Heppel, L.A. and Hilmo, R.J.: *5'-Nucleotidase, Methods in Enzymology Vol. II, Academic Press, 1963, p.546.*
- 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 dodecyl sulfate. 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.
- Kamataki, T. and Kitagawa, H.: *Effects of Lipid peroxidation on activities of drug-metabolizing enzymes in liver microsomes of rats. Biochem. Pharmacol.*, 22:31, 1973.
- Kim, C.G. and Chung, H.K.: *Changes in the activities of 5'-nucleotidase relating to the changes in the structure of the membrane. Seoul J. Med.*, 20:279, 1979.
- Kim, N.K., Yasmineh, W.G., Freier, E.F., Goldman, A.I. and Thelogides, A.: *Value of alkaline phosphatase, 5'-nucleotidase, γ -glutamyltransferase, and glutamate dehydrogenase activity measurements(single and combined) in serum in diagnosis of metastasis to the liver. Clin. Chem.*, 23:2034, 1977.
- 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.: *in Biochemical Analysis of Membranes, Chapman and Hall Ltd, 1976, p.186.*
- Makino, S., Reynolds, J.A. and Tanford, C.: *The binding of deoxycholate and Triton X-100 to proteins. J. Biol. Chem.*, 248:4926, 1973.
- Neville, D.M. JR.: *Isolation of an organ specific protein antigen from cell surface membrane of rat liver. Biochim. Biophys. Acta*, 196:1, 1970.
- Paglia, O.E. and Valentine, W.N.: *Characteristics of a pyrimidine-specific 5'-nucleotidase in human erythrocytes. J. Biol. Chem.*, 250:7973, 1975.
- Pfeifer, P.M. and McCay, P.B.: *Reduced triphosphopyridine nucleotide oxidase-catalyzed alterations of membrane phospholipids. J. Biol. Chem.*, 246:6401, 1971.
- Polya, G.M.: *Purification and characterization of a cyclic nucleotide-regulated 5'-nucleotidase from potato. Biochim. Biophys. Acta*, 384:443, 1975.
- Ray, T.K.: *A modified method for the isolation of the plasma membrane from rat liver. Biochim. Biophys. Acta*, 196:1, 1970.
- Reis, J.: *La nucléotidase et sa relation avec la désamination des nucléotides dans le coeur et dans le muscle. Bull. Soc. Chim. Biol.*, 16:385, 1934.
- Riemer, B.L. and Widnell, C.C.: *The demonstration*

- of specific 5'-nucleotidase activity in rat tissues. *Arch. Biochem. Biophys.*, **171**:343, 1975.
- Riordan, J.R. and Slavik, M.: Interactions of lectins with membrane glycoproteins, effects of concanavalin A on 5'-nucleotidase. *Biochim. Biophys. Acta*, **373**:356, 1974.
- Roelofsen, B. and Schatzmann, H.J.: The lipid requirement of the $(Ca^{++} + Mg^{++})$ -APPase in the human erythrocyte membrane, as studied by various highly purified phospholipases. *Biochim. Biophys. Acta*, **464**:17, 1977.
- Segal, H.L. and 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.
- Song, C.S., Nisselbaum, J.S., Tandler, B. and Bodansky, O.: Partial solubilization of protein and 5'-nucleotidase from microsomal membranes of the rat liver by ultrasonic irradiation. *Biochim. Biophys. Acta*, **150**:300, 1968.
- Stefanovic, V., Mandel, P. and Rosenberg, A.: Ecto-5'-nucleotidase of intact cultured C6 rat glioma cells. *J. Biol. Chem.*, **251**:3900, 1976.
- Stein, Y., Widnell, C. and Stein, O.: Acylation of lysophosphatides by plasma membrane fractions of rat liver. *J. Cell Biol.*, **39**:185, 1968.
- Vessey, D.A. and Zakim, D.: Regulation of microsomal enzymes by phospholipid. *J. Biol. Chem.*, **246**:4649, 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.
- Woo, Y.T. and Manery, J.F.: 5'-Nucleotidase: An ecto-enzyme of frog skeletal muscle. *Biochim. Biophys. Acta*, **397**:144, 1975.
- Zakim, D.: Regulation of microsomal enzymes by phospholipids. *J. Biol. Chem.*, **245**:4953, 1970.