

흰쥐 간세포 원형질막 5'-Nucleotidase의 특성에 관한 연구

Properties of 5'-Nucleotidase from Rat Liver Cell Plasma Membrane

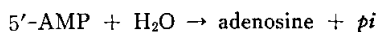
서울대학교 의과대학 이비인후과학교실* 및 생화학교실**

김광현* · 백만기* · 정흥근** · 김승원**

서 론

5'-Nucleotidase(5'-ribonucleotide phosphohydrolase, EC 3.1.3.5)는 각종 mononucleotide 分子의 deoxyribose 또는 ribose의 제 5번 炭素에 ester化 된 磷酸鹽을 加水分解하는 효소이다(Heppel & Hilmo, 1963).

이 5'-nucleotidase는 1934년 Reis에 의하여 발견된 이래 骨骼筋세포(Woo & Manery, 1975), 心筋세포(Rubio 등, 1973; Barr 등, 1974), 多形核白血球(DePierre & Karnovsky, 1974), 淋巴球(Misra 등, 1974), 赤血球(Paglia & Valentine, 1975), 脂肪세포(Newby 등, 1975), 肝세포(Song 등, 1969; Gurd & Evans, 1974; Riemer & Widnell, 1975), 腦세포(Bosmann & Pike, 1971; Frick & Lowenstein, 1976), 腸平滑筋세포(Burger & Lowenstein, 1975), HeLa cell(Trams & Lauter, 1974; Johnsen 등, 1974), 鼻咽腔癌세포(Trams & Lauter, 1974), chicken embryo 纖維芽細胞(Bingham & Burke, 1972), 大腸菌(Dvorak & Heppel, 1968) 및 植物세포(Polya, 1975) 등과 같은 각종세포의 원형질막에 결합되어 있음이 밝혀짐에 따라 세포분화 과정에서 원형질막분해를 확인하는 追跡효소(marker enzyme)로서 널리 이용되기에 이르렀다(Stein 등, 1968; Berman 등, 1969; Avruch & Widnell, 1971; DePierre & Karnovsky, 1973; Johnsen 등, 1974). 5'-Nucleotidase는 각종 mononucleotide 중 5'-adenosine monophosphate(5'-AMP)에 대한 特異性이 가장 높아서(Stefanovic 등, 1976) 효소의 활성은 주로 이를 基質로 하여 측정되고 있으며 이때 5'-AMP는 이 효소에 의하여 다음과 같이 분해된다.



한편 혈청내 5'-nucleotidase는 임상적으로 혈청의 alkaline phosphatase가 증가할 때 그 원인이 骨質환에 있는지 肝質환에 있는지를 감별하는 진단적 指標로 이

용되고 있다(Kowlessar 등, 1961; Gerlach & Hiby, 1974; Sherlock, 1975). 이는 肝質환에서는 alkaline phosphatase와 5'-nucleotidase가 함께 증가하지만 骨質환에서는 5'-nucleotidase가 증가하지 않는데 연유하는 것이다. 또한 혈청 5'-nucleotidase는 轉移性肝癌에서 γ -glutamyltransferase와 함께 그 활성이 증가함으로 근년에는 轉移性肝癌에 대한 그 진단적 가치가 주목되고 있다(Kim 등, 1977; Beck 등, 1978).

원형질막에 결합된 5'-nucleotidase는 작용부위가 세포밖으로 향한 ectoenzyme으로 밝혀짐에 따라(Riordan & Slavik, 1974; Woo & Manery, 1975; Frick & Lowenstein, 1976; Stefanovic 등, 1976) 이 효소는 細胞外液중의 adenosine濃도를 調節하는 것으로 알려졌다. 한편 adenosine은 precapillary resistance vessel을 싸고 있는 平滑筋을 弛緩시켜서 모세관의 혈류를 증가시키는 강력한 혈관확장제로 알려져 있고 산소결핍이 있을 때 혈중농도가 높아져서 冠狀動脈을 확장시키고 간이나 근육의 혈관을 확장시킨다고 보고된 바 있다(Rubio & Berne, 1969; Dobson 등, 1971).

이와같은 사실은 5'-nucleotidase가 원형질막에 결합된 ectoenzyme으로서 가지는 중요한 생물학적 意義를 더욱 확실하게 하고 있다.

일반적으로 生體膜에 결합된 대부분의 효소는 그 활성의 發現을 위하여 膜脂質이 필요하거나 이에 의하여 調節된다(Duttera 등, 1968; Vessey & Zakim, 1970). 따라서 生體膜脂質을 phospholipase(Abou-Issa & Cleland, 1971) 또는 淸淨劑(Joergensen, 1974)로 처리하거나 혹은 過酸化시켜서(Kamatagi & Kitagawa, 1973; Chung & Lee, 1977) 제거하면 生體膜에 결합된 대부분의 효소는 그 활성이 현저히 감소하는 것으로 알려졌다. 그러나 5'-nucleotidase는 phospholipase나(Emmelot & Bos, 1968) 淸淨劑로(Evans & Gurd, 1972; Chung & Lee, 1980) 처리하여도 그 활성이 감소하지 않는다고 보고된 바 있다.

한편 5'-nucleotidase는 원형질막을 4°C에 放置함에

따라 서서히 그 활성이 증가한다고 보고되었고(Kim 등, 1979), 이에 관한 機轉으로서 5'-nucleotidase에 대한 調節물질의 존재가 제안된 바 있다(Chung & Lee, 1980). 즉 調節물질이 결합된 5'-nucleotidase는 불활성이며 放置해둠에 따라 調節물질이 유리됨으로써 불활성형이 활성형으로 변하여 5'-nucleotidase의 활성이 증가하는 것이라고 示唆된 바 있었다.

最近에 이르기까지 5'-nucleotidase의 특성은 주로 원형질막에 결합된 상태로 검토되었으며 membrane-free 5'-nucleotidase의 특성에 관해서는 별로 연구된 바가 없었다. 또한 isoenzyme의 존재에 관해서도 그 확실한 증거를 제시한 경우는 매우 드물었고 다만 Pilcher와 Scott(1967)가 bovine seminal-plasma 5'-nucleotidase에 3개의 isoenzyme이 존재한다고 보고한 바 있었다.

이러한 점을 勘案하여 저자는 원형질막을 淸淨劑로 처리하거나(Helenius & Simons, 1972; Makino 등, 1973; Kirkpatrick 등, 1974) sonify하여 (Song 등, 1968) membrane-free 5'-nucleotidase를 얻었으며 이를 이용하여 isoenzyme의 특성 및 효소동력학적 특성을 구명하였고 또한 최근에 제안된 바 있는 이 효소의 調節물질의 존재를 검토하여 그 결과를 보고하는 바이다.

실험재료 및 방법

실험재료

실험동물로는 서울의대 동물실험실에서 사육한 순계 흰쥐 Sprague-Dawley종을 암수 구별없이 사용하였다. 흰쥐의 체중은 보통 200~300g이었고 쥐 한마리에서 얻은 간의 重量은 대략 8~10g으로서 한번에 네마리의 흰쥐에서 간을 직출하여 32g을 취하였고 필요할 때마다 네마리씩 잡아서 사용하였다.

Sephadex G-200은 Pharmacia Fine Chemicals(Upsala, Sweden)製를 사용하였고 5'-adenosine monophosphate (5'-AMP), adenosine diphosphate(ADP), adenosine triphosphate(ATP), cyclic AMP, guanosine diphosphate(GDP), guanosine triphosphate(GTP), adenosine, guanosine, inosine 및 牛血清알부민은 Sigma Chem. Co.(St. Louis, Mo., U.S.A.)製를 사용하였으며 tris-hydroxymethyl aminoethane(Tris), trichloroacetic acid(TCA), acrylamide, bisacrylamide, sodium deoxycholate(SDC), sodium dodecyl sulfate(SDS) 및 Triton X-100은 Merck Co.(Darmstadt, Germany)製, 그리고 sucrose와 그외의 無機試藥은 Kanto Chem. Co.(Tokyo, Japan)製를 각각 사용하였다.

肝 homogenate 제조법

흰쥐의 頸動脈을 절단하여 혈액을 제거한 후 즉시 간을 적출하여 32g을 냉각된 0.25M sucrose 용액에 옮겨 가위로 잘게 절단하였다. 적혈구를 제거하기 위하여 같은 용액으로 3회 반복하여 세척하고 Potter-Elvehjem homogenizer로 homogenize하였다.

이를 두겹의 거즈를 이용, 세포殘渣를 제거하고 여기에 0.25M sucrose 용액을 첨가하여 10%(W/V) homogenate를 만들었다.

Microsome浮游液의 제조법

위에서 준비된 10% homogenate를 核 및 세포殘渣를 제거하기 위하여 600×g로 10분간 遠沈分離한 후 그 上清液을 다시 10,000×g(MSE Centriscan 75, 8×50 ml, fixed angle rotor)로 10분간 遠沈分離하여 上清液을 취함으로써 mitochondria를 제거하였다. 이 上清液을 다시 100,000×g(MSE Centriscan 75, 8×50ml, fixed angle rotor)로 60분 동안 遠沈分離하여 上清液을 버리고 沈澱만을 취함으로써 vesicle狀의 원형질막이 포함된 microsome분획을 얻었다. 이를 총용량 14ml가 되도록 0.25M sucrose용액에 浮游시켜 microsome浮游液을 만들었다.

Sonification방법

위에서 얻어진 microsome浮游液을 Song 등(1968)의 방법에 따라 Sonifier, Model W185(Heat Systems-Ultra Sonic Inc.)를 사용하여 水槽속에서 30초 간격으로 3분간 sonify하였다. 이를 140,000×g(MSE Centriscan 75, 5.5ml×6, swing out rotor)로 60분 동안 遠沈分離하여 그 上清液을 취하였다.

Membrane-free 5'-nucleotidase의 제조법

Membrane-free 5'-nucleotidase를 얻기 위하여는 앞서 얻어진 microsome浮游液을 종래의 術式(Helenius & Simons, 1972; Makino 등, 1973; Kirkpatrick 등, 1974)을 따르되 다음과 같이 본 실험에 합당토록 약간의 變法으로 시행하였다.

즉, 이에 SDC를 40mM이 되도록 가하여 膜脂質을 용해시킨 시료 1.5ml를 20mM SDC-20mM Tris, pH 9.2로 평형을 이룬 Sephadex G-200 column (12×600 mm)에 重疊하고 같은 용액으로 溶出하였다.

溶出液을 분획수집기(Ultrac Ⅱ, LKB, Sweden)로 매 시험관당 4ml씩 수집하였으며 이때 UV-spectrophotometer(Uvicord S, LKB, Sweden)에 의하여 파장 280 nm에서 단백질의 吸光度를 측정하였다.

각 시험관의 효소활성을 측정하여 활성이 높은 분획만을 모아 半透膜囊 속에 넣어 sucrose결정으로 하루밤 동안 농축시켰다.

이름' 다시 20mM Tris, pH 7.5용액으로 평형을 이룬 같은 column을 통하여 溶出함으로써 SDC를 제거한 membrane-free 5'-nucleotidase를 얻었다.

5'-Nucleotidase의 활성측정법

효소의 活性測定系는 0.05M Tris, pH 7.5용액에 1mM 5'-AMP를 첨가하고 여기에 효소시료 0.1ml를 가하여 총용량이 2ml가 되도록 조성하였다(Segal, 1960). 여기에 다른 물질이 첨가되어도 총용량에는 변동이 없도록 하였다. 반응은 효소액을 가한 시간으로부터 시작하여 30°C에서 30분간 incubation하였고 30% TCA 0.5ml를 가함으로써 정지시켰다. 그러나 Triton X-100을 포함하는 測定系에서는 60% TCA로 반응을 정지시켰고 SDS를 포함하는 測定系에서는 0.1M MgCl₂를 포함하는 30% TCA로 반응을 정지시켰다. 이는 遠沈分離할 때 투명한 上清液을 얻기 위함이었다.

효소의 활성은 5'-nucleotidase에 의하여 5'-AMP로부터 유리되어 나온 無機磷을 Fiske와 SubbaRow방법(1957)으로 파장 660nm에서의 吸光度를 측정함으로써 측정하였다.

효소활성의 단위는 1시간동안에 AMP로부터 1μmole의 無機磷을 유리하는데 필요한 효소의 활성을 1 unit로 정하였고 比活性(specific activity)은 효소액내의 단백질 단위 mg에 대한 효소활성으로 표시하였으며 효소활성의 상대적 변동은 위의 活性測定系를 對照系로 하여 百分率로 나타내었다.

단백질정량법

각 시료의 단백질은 Lowry(1951)방법에 따라 정량하였고 표준단백질로는 미리 Kjeldahlometry로 질소함량을 분석해둔 牛血清안부인을 사용하였다.

Polyacrylamide gel전기영동 및 염색법

7.5% acrylamide와 0.2% bisacrylamide를 혼합하여 만든 polyacrylamide gel(0.5×7.5cm)에 효소시료와 표시염색제인 0.5% bromphenol blue를 함유하는 40% sucrose용액을 2:1의 容量比로 혼합하여 gel위에 重疊하고 전극에 걸었다. 每管當 3.5mA의 전류를 90분동안 흐르게 하여 전기영동한 후(Smith, 1968) gel을管에서 빼내어 Pilcher와 Scott(1967)의 방법으로 염색하였다.

먼저 1mM AMP와 20mM CaCl₂ 및 50mM Tris, pH 7.5를 포함하는 용액에서 30°C로 1시간 incubation한 후 3mM Pb(NO₃)₂를 포함하는 80mM Tris-maleate, pH 7.0용액에서 37°C로 45분간 incubation하였다.

沈着되지 않은 남을 제거하기 위하여 증류수로 수차례 세척한 다음 2%(NH₄)₂S용액에서 5분간 incubation함으로써 5'-nucleotidase가 위치하는 부위를 PbS의 黑

色沈澱으로 着色되도록 하였다.

실험 결과

Microsome浮游液에 40mM이 되도록 SDC를 가하여 膜脂質을 용해한 후에 20mM SDC-20mM Tris, pH 9.2용액으로 평형을 이룬 Sephadex G-200 column을 통하여 이 용해된 시료를 같은 용액으로 溶出하면서 파장 280nm에서 단백질의 吸光度를 측정하고 각분획에 대하여 5'-nucleotidase의 활성 및 磷脂質의 磷을 측정할 결과는 제 1도와 같다.

5'-Nucleotidase활성은 void volume에서 나타나기 시작하는 단백질의 첫번째 peak에서 나타났고 대부분의 磷脂質은 두번째 단백질 peak와 함께 溶出되었으나 소량의 磷脂質은 5'-nucleotidase활성과 일치하는 분획에 포함되어 있어 5'-nucleotidase는 磷脂質을 포함하는 단백질임을 알 수 있었다. 5'-nucleotidase의 比活性은 溶出容量이 증가함에 따라 감소하여 대략 단백질 mg당 3~6unit의 분포를 보여 주었고 5'-nucleotidase를 포함하는 분획중에 磷脂質의 磷은 단백질 mg당 대략 0.2μmole이었다.

5'-Nucleotidase의 정제

위에서 얻은 membrane-free 5'-nucleotidase분획은 SDC를 포함하고 있으므로 이를 0.02M Tris, pH 7.5 용액으로 평형을 이룬 Sephadex G-200 column을 통하여 溶出함으로써 membrane-free, SDC-free 5'-nucleotidase의 試劑를 얻었다. 제 1도에서 보는 바와 같이, 10% homogenate에서 5'nucleotidase는 단백질 단위 mg당 0.423unit이었고 microsome분획에서는 1.02로써 2.4배 증가되었고 gel濾過溶出液에서는 5.10으로 12배 증가되었다.

Isoenzyme의 특성

Sonification에 의하여 원형질막으로부터 유리된 5'-nucleotidase시료를 polyacrylamide gel상에서 전기영동하여 염색한 결과는 제 2도 A에서 보는 바와 같다. 시료를 負荷한 gel 최상부가 가장 짙게 나타났고 그 下部에 두개의 isoenzyme band가 나타났다. 한편 A에서와 같은 양의 시료를 SDC로 용해시킨 후 얻은 전기영동상(제 2도 B)에서는 제 1band(전기영동 속도가 느린 것)가 A에 비하여 매우 짙게 염색되었고 제 2band(전기영동 속도가 빠른 것)는 A와 거의 비슷한 정도로 염색되었다. 그러나 gel 최상부는 A에 비하여 매우 얇게 염색되었다.

또한 제 1도에서의 溶出容量 4ml에서 12ml까지를 합하고 12ml에서 24ml까지를 합한 각 분획을 전기영동

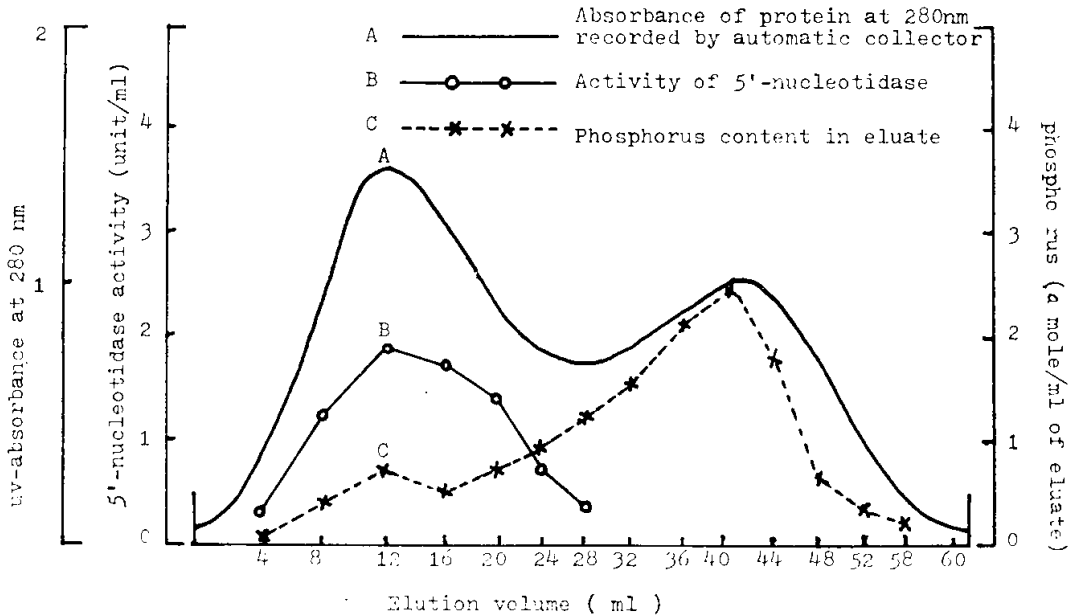


Fig. 1. Gel filtration of rat liver microsomal suspension on Sephadex G-200 equilibrated with 20mM sodium deoxycholate-20mM Tris, pH 9.2 buffer solution. Phospholipid was expressed as inorganic phosphorus determined after digestion of the eluate in 5N H₂SO₄ with aid of H₂O₂.

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

	Specific activity ^a (unit ^b /mg of protein)	Purification fold
10% Homogenate ^c	0.423	1.0
Microsomal fraction ^d	1.02	2.4
Gel filtration eluate ^e	5.10	12.0

- 5'-Nucleotidase activity was measured at 30°C with 1mM of AMP in 0.05M Tris, pH 7.5, and the liberated inorganic phosphate was measured 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.
- Rat liver was homogenized in 0.25M sucrose with Potter-Elvehjem homogenizer to be 10% (w/v) homogenate.
- Microsomal fraction refers to the pellets obtained by centrifugation of postmitochondrial supernatant at 100,000 x g for 1 hour.
- Microsomal suspension was solubilized with 40mM sodium deoxycholate and it was eluted on Sephadex G-200 column(12×60mm) equilibrated with 20mM sodium deoxycholate, 0.02M Tris, pH 9.2 and the resultant solution was reeluted on the same column equilibrated with 0.02M Tris, pH 7.5. Thus, the membrane-free and deoxycholate-free eluate was expressed as Gel filtration eluate.

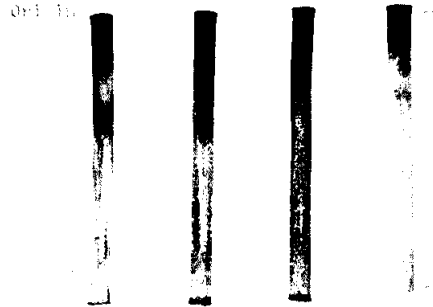


Fig. 2. Polyacrylamide gel electrophoretogram.

- Supernatant by centrifugation of sonified microsomal suspension at 100,000 ×g for 1 hour.
- The above supernatant solubilized with 10mM sodium deoxycholate.
- The pooled fraction from elution volume 4ml to 12ml as shown in Fig. 1.
- The pooled fraction from elution volume 12ml to 24ml as shown in Fig. 1.

The polyacrylamide gel electrophoresis was performed on the gel containing 7.5% acrylamide and 0.2% bisacrylamide by the procedure of Smith(1968). After electrophoresis, the gels were incubated in the solution containing 1mM AMP, 0.05M Tris, pH 7.5 and 20mA CaCl₂. The gels were then immersed in 3mM Pb(NO₃)₂ and in 2% (NH₄)₂S consecutively to convert calcium phosphate formed during the incubation to visible lead sulphide.

하여 제 2도 C와 D의 결과를 얻었다. 이 두 전기영동 상에는 제1band만 나타나고 제2band는 보이지 않았으며 제1band의 이동속도가 C에 비하여 D에서 약간 느렸다.

放置(aging)가 5'-Nucleotidase활성에 미치는 영향

Membrane-free 5'-nucleotidase를 4°C의 냉장고에 放置하면서 24시간 간격으로 활성을 측정한 결과, 제 3도에서 보는 바와 같이 시간이 경과함에 따라 그 활성이 서서히 감소하였다.

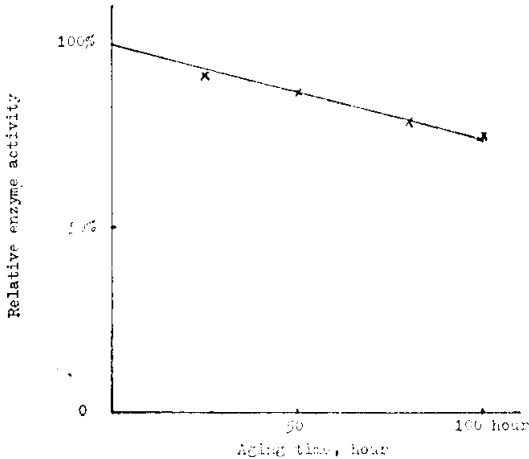


Fig. 3. Measurement for membrane-free 5'-nucleotidase activity during aging at 4°C.

最適 pH

緩衝液의 pH를 변화시키면서 membrane-free 5'-nucleotidase의 활성을 측정한 결과, 제 4도에서 보는 바와 같이 最適 pH는 8.0이었다. 또한 酸性에서는 그 활성이 매우 낮았으나 鹼性에서는 효소활성이 비교적 높게 유지되었다.

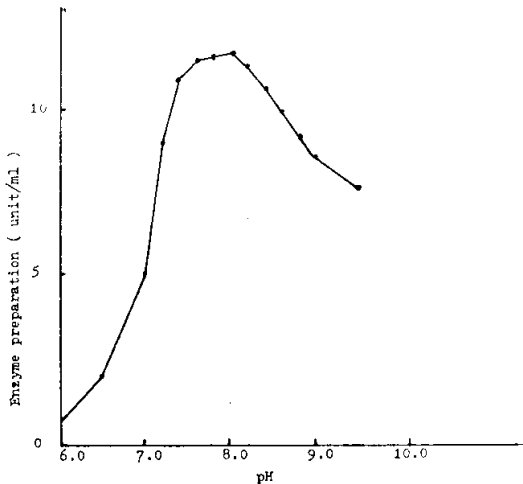


Fig. 4. Optimum pH of membrane-free 5'-nucleotidase.

각종 Nucleotide 및 Nucleoside가 5'-Nucleotidase 활성에 미치는 영향

수종의 nucleotide와 nucleoside를 0.2mM이 되도록 효소 活性測定系에 각각 첨가한 후, 효소활성에 대한 阻害효과를 측정한 결과는 제 2표와 같다. ADP의 阻害효과가 66%로 가장 심하였고 ATP 31%, GDP 20%, GTP 12%의 순으로 나타났고, nucleoside중에는 adenosine만이 4%였고 guanosine, inosine은 阻害효과가 없었으며 cyclic AMP도 아무런 영향을 미치지 아니하였다. 이와같이 adenine nucleotide는 guanine nucleotide보다 큰 阻害효과를 보였으며 diphosphate는 triphosphate보다 더 큰 阻害효과가 있음을 알 수 있었다.

Table 2. Effect of nucleotides and nucleosides on membrane-free 5'-nucleotidase activity

Additive	Relative inhibition(%)
ADP	66
ATP	31
GDP	20
GTP	12
Adenosine	4
Guanosine	0
Inosine	0
Cyclic AMP	0

Additives were added to be 0.2mM in the enzyme assay system respectively. Relative inhibition was expressed as the decrease(%) in activity relative to the activity measured in the absence of the additives.

5'-Nucleotidase 활성에 대한 EDTA의 영향

제 5도에서 보는 바와 같이 5'-nucleotidase는 EDTA

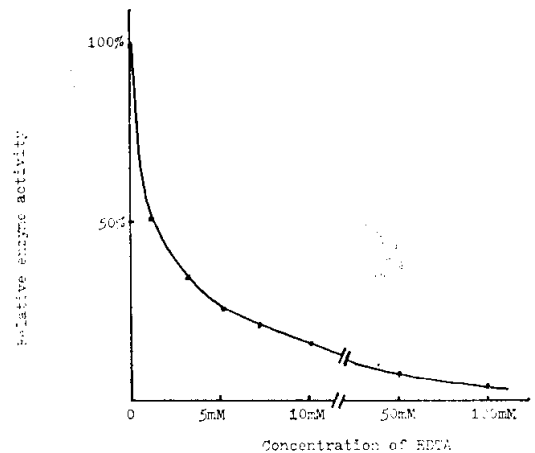


Fig. 5. Effect of EDTA on membrane-free 5'-nucleotidase.

에 의하여 현저히 阻害를 받아 1mM의 농도에서 5'-nucleotidase의 활성은 50%정도 감소하였고 100mM에서는 95%정도로 크게 감소하였다.

金屬이온이 효소활성에 미치는 영향

제 6 도에서 보는 바와 같이 1mM의 EDTA에 의하여 효소활성이 50%정도 감소하였을 때 Mg^{++} 을 첨가하면 활성이 다시 증가하였고 EDTA농도의 5배정도의 Mg^{++} 농도에서는 효소활성이 原狀으로 회복되었다.

EDTA가 포함되지 않은 測定系에 Mg^{++} 을 첨가하였을 때 5mM에서 효소활성이 대략 5% 증가하였으나 Mg^{++} 의 농도를 더 증가시켜도 더 이상의 활성증가는 보이지 않았다.

제 7 도는 Mn^{++} 에 의한 5'-nucleotidase 활성증가를 보여주는 것이다. Mn^{++} 은 Mg^{++} 보다 훨씬 낮은 0.01~0.1mM의 농도로서 10mM의 Mg^{++} 과 거의 같은 정도로 효소활성을 증가시켰으나 역시 농도를 그 이상으로 높여도 더 이상의 증가는 없었으며, 1mM 이상에서는 오히려 효소활성이 감소하였다.

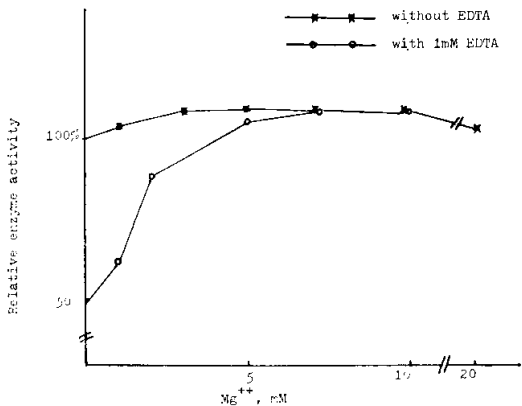


Fig. 6. Effect of Mg^{++} on membrane-free 5'-nucleotidase in the presence and absence of 1mM EDTA.

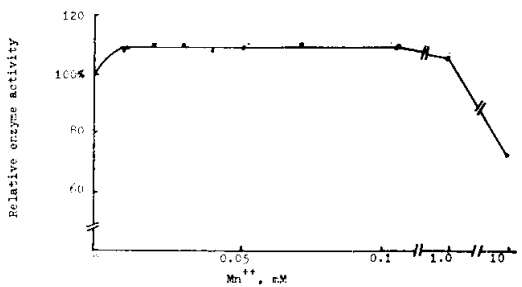


Fig. 7. Effect of Mn^{++} on membrane-free 5'-nucleotidase.

각종 淸淨劑(detergent)가 Membrane-free 5'-Nucleotidase 활성에 미치는 영향

膜脂質을 용해시키는 목적으로 사용되는 각종 淸淨

劑中 가장 널리 쓰이는 Triton X-100, SDS 및 SDC의 농도에 따른 5'-nucleotidase의 活性化효과를 측정한 결과는 각각 제8, 9, 10도와 같다. Triton X-100은 0.1%의 낮은 농도로서 효소활성을 20%가량 상승시켰으며

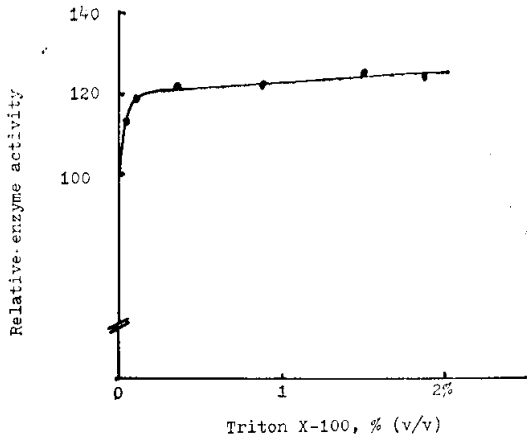


Fig. 8. Effect of Triton X-100 on membrane-free 5'-nucleotidase.

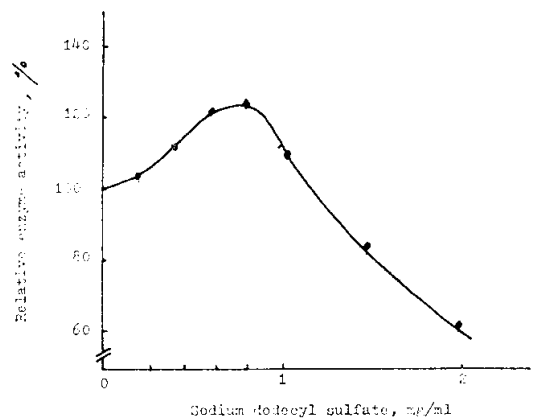


Fig. 9. Effect of sodium dodecyl sulfate on membrane-free 5'-nucleotidase.

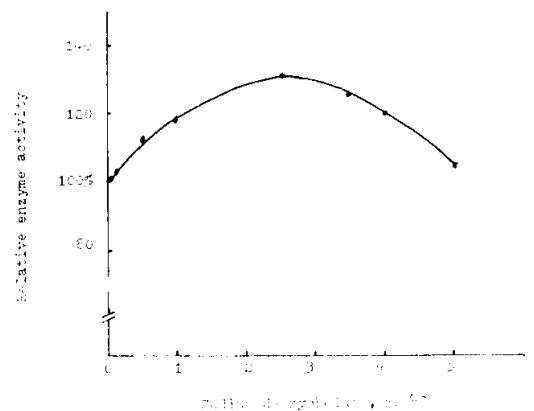


Fig. 10. Effect of sodium deoxycholate on membrane-free 5'-nucleotidase.

농도를 더 이상 증가시켜도 효소활성은 별로 증가하지 않았다.

또한 SDS는 그 농도를 증가시키에 따라 0.8mg/ml까지는 계속 효소활성을 증가시켜 약 20%의 증가효과를 보였으나 그보다 더 높은 농도에서는 오히려 효소활성을 급속히 阻害하였다.

그리고 SDC는 그 농도를 증가시키에 따라 2.5mg/ml까지는 효소활성을 증가시켜 대략 30%의 증가효과를 보였고 그보다 더 높은 농도에서는 효소의 활성을 약간 감소시켰다.

이상과 같이 각종의 淸淨劑는 종류에 관계없이 最適濃度에서 효소활성을 20~30%정도 증가시켰다.

金屬이온과 淸淨劑의 併用효과

위의 세가지 淸淨劑를 金屬이온과 併用하였을 때는 제 3표에서 보듯이 효소활성의 증가가 더욱 현저하였다. 0.1mM Mn⁺⁺을 2.5mg/ml의 SDC와 함께 사용했을 경우 효소활성은 무려 92%나 증가하였고 이를 SDS와 함께 사용했을 경우는 38%, Triton X-100과 함께 사용했을 경우는 33%의 증가를 보였다. 한편 Mg⁺⁺은 SDC와 沈澱을 형성함으로 併用할 수 없었으며, SDC 및 Triton X-100과 併用했을 때는 Mn⁺⁺과 併用했을 때와 거의 비슷하여서 각각 38%와 36%의 증가를 보였다.

對照系 및 活性化系에서 30°C에 放置된 Membrane-free 5'-Nucleotidase활성의 시간에 따른 변화

50mM Tris, pH 7.5와 1mM AMP만을 포함하는 효소活性測定系를 對照系로 하고 이에 2.5mg/ml의 SDS와 0.1mM Mn⁺⁺을 첨가한 것을 活性化系라고 하여 이 두 測定系로 30°C항온조에 시료를 계속 방치하면서 그

Table 3. Relative increases in membrane-free 5'-nucleotidase activities by detergent only and detergent combined with metallic ion

Detergent	Sodium deoxycholate (2.5mg/ml of enzyme assay medium)	Sodium dodecyl sulfate (0.4mg/ml of enzyme assay medium)	Triton X-100 (1%, v/v)
None	31%	23%	22%
0.1mM* Mn ⁺⁺	92%	33%	33%
10mM* Mg ⁺⁺	(-)**	38%	36%

Relative increases in 5'-nucleotidase activities by the additives were expressed as the increase (%) in activity relative to the activity measured in absence of the additives.

* indicates the final concentration of the ion in the enzyme assay medium.

** 10mM Mg⁺⁺ precipitates sodium deoxycholate.

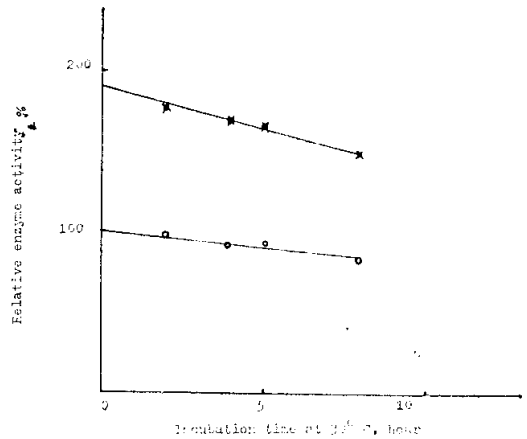


Fig. 11. Measurement for membrane-free 5'-nucleotidase activity in control system and in activation system during incubation at 30°C.

○—○ : Control system (100μmoles of Tris, pH 7.5+2μmoles of 5'-AMP in 2ml)
 ×—× : Activation system (100μmoles of Tris, pH 7.5+2μmoles of 5'-AMP+5mg SDC+0.2μmoles of Mn⁺⁺ in 2ml)

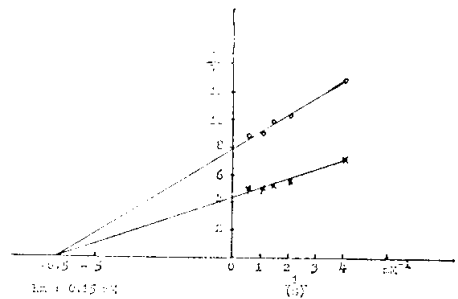


Fig. 12. Lineweaver-Burk plot of membrane-free 5'-nucleotidase activity measured in the control system (○—○) and in the activation system (×—×). Substrate was expressed as the reciprocal of concentration of 5'-AMP in mM and velocity was expressed as the reciprocal of absorbance measured by Fiske and Subba Row method.

효소활성을 측정된 결과 제11도에서 보는 바와 같이 시간이 경과함에 따라 효소활성이 서서히 감소하였다.

이 때 對照系에서보다 活性化系에서 효소활성이 더 빨리 감소하는 것을 볼 수 있었다.

對照系와 活性化系에서의 K_M值

같은 양의 효소를 사용하여 對照系 및 活性化系에서 AMP의 농도에 따라 효소활성을 측정하고 이를 제12도

와 같이 Lineweaver-Burk에 의해 plot하여 Michaelis-Menten 常數(K_M)와 최고 반응속도(V_{max})를 구하였다. 이 때 두系の K_M 은 0.15mM로서 일치하였고 V_{max} 는 活性化系에서 2배정도 높은 것으로 나타났다.

고 찰

5'-nucleotidase는 각종 mononucleotide를 加水分解할 수 있는 넓은 特異性(specificity)을 가지고 있는 점을 고려하여 이 효소를 isoenzyme으로 분리하려는 많은 노력이 있었으나(Kowlessar 등, 1959; Barka, 1961; Bernsohn & Barron, 1964; Lisowski, 1966) 대부분의 경우 그 증거를 발견하지 못하였었다. 그러나 Pilcher와 Scott(1967)는 5'-nucleotidase를 polyacrylamide gel 상에서 전기영동을 한 후에 이를 염색하는 방법을 개발하여, bovine seminal-plasma 5'-nucleotidase에는 3개의 isoenzyme이 존재한다고 보고하였다.

본 실험에서도 이와같은 방법을 이용하여 흰쥐 肝세포 원형질막에 결합된 5'-nucleotidase를 isoenzyme으로 분리하려고 시도하였던 바, 제 2도와 같이 두개의 isoenzyme band를 관찰하였다. 원형질막에 결합되어 있는 5'-nucleotidase는 그 자체로서는 分子量이 매우 크기 때문에 전기영동시 polyacrylamide gel을 통과하지 못하여 시료를 重疊한 gel 최상부에서만 염색되었다. 따라서 원형질막에서 유리된 5'-nucleotidase시료를 얻기 위하여 가장 간단한 방법인 sonification을 택하게 된 것이다. 이는 복잡한 정제과정을 통하여 membrane-free 5'-nucleotidase를 얻을 경우 정제과정에서 일부 isoenzyme의 손실가능성을 배제할 수 없기 때문이었다.

제 2도 A에서와 같이 sonify한 上清液의 5'-nucleotidase 전기영동상에는 두개의 isoenzyme band외에 gel 최상부가 진하게 염색되었는데 이것은 isoenzyme band라기 보다는 凝結된 5'-nucleotidase로 보아야 할 것이다. 그 증거로 A에서와 똑같은 양의 시료를 SDC로 처리한 후에 이를 전기영동하여 얻은 B에서는 gel 최상부가 A에 비하여 매우 일게 염색된 반면 제 1 band가 훨씬 더 진하게 염색되었다는 점이다. 이는 SDC로 처리함에 따라 주된 isoenzyme이 凝結되지 않고 제 1 band로 이동한 것으로 볼 수 있다. 그러나 Pilcher와 Scott(1967)는 gel 최상부도 isoenzyme band로 간주하여 보고하였다.

한편 Evans와 Gurd(1973)는 마우스 간 원형질막으로부터 5'-nucleotidase를 대략 17개로 정제하여 이를 polyacrylamide gel 전기영동한 후 gel을 절단하여 각 분획의 5'-nucleotidase 활성을 측정하였는데 제 2도 B

와 비슷하게 제 1 band에서는 효소활성이 높았고 제 2 band에서는 낮았다고 보고하였다. 그러나 이들은 이것을 isoenzyme으로 설명하지 않고 dimer인 5'-nucleotidase(제 1 band)가 활성형인 monomer 5'-nucleotidase(제 2 band)로 분해된 것으로 설명하였다.

한편 제 1도에서의 溶出容量 4ml로부터 12ml까지를 합한 시료와 溶出容量 12ml부터 24ml까지를 합한 시료 각각의 전기영동상 C와 D에서는 제 1 band만 보였고, 제 2 band는 보이지 않았다. 이와같이 SDC 존재하에서 gel 濾過로 얻은 membrane-free 5'-nucleotidase의 전기영동상에서 제 2 band가 보이지 않는 것은 장시간에 걸친 gel 濾過과정에서 제 2 band의 isoenzyme이 SDC에 불안정하여 변성된 것으로 생각되며 C와 D에서 제 1 band의 이동거리가 다른 것은 제 1도에서 보는 바와 같이 각 시료의 磷脂質含量差異에 의한 것으로 해석된다.

원형질막에 결합된 5'-nucleotidase는 원형질막의 粒子크기에 따라 活性化되는 정도가 다르며 small vesicle인 microsome분획의 5'-nucleotidase활성은 10mM Mg^{++} 에 의하여 대략 20% 상승한다고 보고된 바 있다(Kim 등, 1979). 그러나 제 6도에서 보는 바와 같이 membrane-free 5'-nucleotidase는 Mg^{++} 에 의하여 대략 5%의 활성증가를 보였다. 이로써 5'-nucleotidase는 막 지질함량 내지는 막구조에 따라 Mg^{++} 에 의하여 活性化되는 정도가 달라짐을 알 수 있다.

제 5도에서 보는 바와 같이 5'-nucleotidase는 chelating agent인 EDTA에 의하여 매우 강력히 阻害되었다. *E. coli*의 5'-nucleotidase가 Zn^{++} 을 함유하는 metalloenzyme(Dvorak & Heppel, 1967)임이 보고된 것을 감안컨대 흰쥐 肝세포 원형질막 5'-nucleotidase도 이와 유사하게 Zn^{++} 類의 金屬을 함유하는 metalloenzyme일 것으로 생각되며, 이 효소가 chelating agent인 EDTA에 의하여 강력히 阻害되는 사실은 이를 뒷받침한다고 하겠다. EDTA에 의하여 阻害된 효소가 Mg^{++} 을 첨가함에 따라 그 활성이 회복되는 사실은 EDTA가 첨가된 Mg^{++} 과 chelate를 형성함으로써 효소로부터 유리되는 것으로 생각되며 EDTA가 효소자체를 변성시키는 것은 아니라는 것을 입증하고 있다.

EDTA에 의한 阻害효과가 Mg^{++} 에 의하여 消滅된다는 사실은 1mM의 EDTA를 사용하여 subcellular fractionation을 할 때(Avruch & Wallach, 1970; Brothrus & Renkonen, 1977) 매우 유용하게 이용될 수 있을 것으로 생각된다. 1mM EDTA는 5'-nucleotidase 활성을 50%정도 阻害하므로 EDTA를 사용한 subcellular fractionation과정에서 원형질막의 追跡효소로서

5'-nucleotidase의 활성을 측정하는 것은 상당한 오차가 있을 것으로 생각된다. 따라서 이러한 오차를 배제하기 위하여 제 6도에 나타난 대로 마땅히 EDTA농도의 5배이상의 Mg^{++} 을 첨가하는 것이 타당할 것으로 생각된다.

생체막에 결합된 효소들은 대부분이 그 활성의 發現을 위해서 膜脂質을 필요로 하며 또 이에 의하여 그 활성이 調節되는 것으로 알려져 있다(Duttera 등, 1968; Zakim, 1970; Vessey & Zakim, 1971). 따라서 膜脂質을 제거하거나 또는 膜을 손상시키면 膜에 결합된 대부분의 효소들은 그 활성이 현저히 감소한다. 예를 들면 uridine diphosphate glucuronyl transferase는 phospholipase의 처리로 不活性化되며 이에 다시 膜脂質을 첨가하면 그 활성이 회복된다(Attwood 등, 1971). 그러나 5'-nucleotidase는 원형질막을 phospholipase C로 처리하거나 또는 butanol-ether용매로 膜脂質을 제거하여도 그 활성에는 변화가 없으며(Emmelot & Bos, 1968), 淸淨劑로 膜脂質을 용해하면 그 활성이 오히려 증가한다고 보고된 바 있다(Chung & Lee, 1980).

따라서 5'-nucleotidase는 효소활성 發現을 위해서는 膜脂質이 필요없는 것으로도 간주되나 제 3도에 의하면 membrane-free 5'-nucleotidase는 이를 放置함에 따라 그 활성이 현저히 감소하는 것으로 보아 膜脂質은 5'-nucleotidase의 熱安定度에 중요한 것으로 생각된다.

한편 Chung 등(1980)이 보고한 바에 의하면 원형질막에 결합된 5'-nucleotidase는 매우 열에 안정하며 이를 장시간 방치하여도 5'-nucleotidase의 활성은 감소하지 않고 오히려 증가하였다. 이에 관한 機轉으로 그는 5'-nucleotidase의 調節물질의 존재를 제안하여 放置에 따른 효소활성증가를 다음과 같이 설명하였다. 즉 調節물질이 결합된 5'-nucleotidase는 불활성이거나 放置함에 따라 調節물질이 서서히 유리되면 불활성효소가 활성효소로 변하여 결과적으로는 효소활성이 증가하는 것으로 설명하였다.

그러나 이 調節물질이 단백질인지 또는 脂質인지는 확인된 바 없었다. 저자는 본 실험을 통하여 5'-nucleotidase의 調節물질이 존재할 가능성을 재삼 확인하였고 이 물질이 脂質일 가능성을 示唆하는 증거를 얻었다. 제 1도에서 보는 바와 같이 대부분의 膜脂質은 溶出容量 40ml 내외에서 溶出되었지만 소량의 膜脂質은 12ml 내외에서 5'-nucleotidase와 함께 溶出되고 있다. 이것을 정량한 결과 단백질 단위 mg당 대략 0.2 μ mole의 磷이 포함되어 있음을 알았다.

한편 Evans와 Gurd(1973)는 淸淨劑인 N-dodecyl sarcosinate를 사용하여 17배로 정제한 5'-nucleotidase는

脂質을 포함하지 않았다고 주장하는 반면에 Lelievre 등(1977)은 French pressure에 의한 방법과 sucrose density gradient방법으로 40~90배 정제한 5'-nucleotidase는 그 구성성분으로서 sphingomyelin을 포함한다고 보고하였다. 이와 같이 이들은 5'-nucleotidase의 脂質성분에 관하여 상반된 보고를 하였다.

본 실험에서 시도한 gel濾過方法是 Helenius와 Simons 등(1972)이 제안한 방법을 일부 수정한 것인 바 이들은 적혈구 stroma의 膜脂質을 단백질로부터 거의 완전히 분리시킬 수 있었다. 이러한 점을 감안한다면 본 실험에서 행한 gel濾過과정에서 5'-nucleotidase를 함유하고 있는 분획중에 膜脂質이 검출되었다는 사실은 5'-nucleotidase가 구성성분으로서 膜脂質을 함유하고 있음을 示唆하는 것이다.

이와 같은 膜脂質이 5'-nucleotidase의 調節물질이라면 종류에 관계없이 각종 淸淨劑에 의하여 膜脂質을 유리시킴으로써 5'-nucleotidase의 활성이 증가할 것으로 기대되며, 본 실험결과(제 8, 9, 10도)는 이러한 이론과 잘 일치하고 있다.

또한 金屬이온인 Mg^{++} 과 Mn^{++} 에 의하여 5'-nucleotidase가 활성화되는 정도는 5'-nucleotidase의 脂質環境에 따라 다름을 감안하여 淸淨劑와 金屬이온을 併用할 때 5'-nucleotidase의 활성증가는 더욱 클 것으로 기대되며 본 실험의 결과(제 3표) 이를 입증할 수 있었다. 즉 5'-nucleotidase의 활성을 가장 크게 활성화시키는 효소活性測定系(活性化系)는 對照系에 5mg의 SDC와 0.2 μ mole의 Mn^{++} 을 포함시킨 것으로 活性化系에서 측정된 5'-nucleotidase活性는 對照系에서 보다 92% 높았다. 이와 같은 활성증가는 活性化系가 調節물질인 脂質을 가장 효과적으로 유리시킬 수 있다고 가정한다면 설명이 가능할 것이다.

活性化系가 調節물질을 효과적으로 유리시킬 수 있는지의 여부를 확인하기 위하여 對照系와 活性化系에서 5'-nucleotidase의 K_M 值를 측정하였던 바 제 12도와 같이 두系에서 K_M 值는 같았고 V_{max} 는 活性化系에서 對照系보다 대략 두배가 높았다. 즉 두系에서 측정된 K_M 值가 같다는 사실은 活性化系는 5'-nucleotidase의 단백질구조에 영향을 미치지 아니함을 의미하고 活性化系에서 측정된 V_{max} 가 對照系보다 두배정도 증가하였다는 것은 同量의 효소를 사용하였음에도 불구하고 효소분자수가 活性化系에서 對照系보다 두배로 증가하였음을 의미한다. 즉 活性化系는 불활성형인 효소분자로부터 調節물질을 유리시킴으로써 활성효소분자수를 증가시키는 것으로 해석할 수 있는 것이다.

또한 調節물질의 존재를 더욱 뒷받침하는 결과를 제

11도에서 볼 수 있다. 5'-Nucleotidase를 30°C에서 放置하면서 對照系와 活性化系로 5'-nucleotidase를 측정 한 결과 효소변성에 의하여 시간에 따르는 활성감소율은 對照系보다 活性化系에서 더 높았다.

만약 活性化系에 의한 효소활성증가가 단순히 효소 분자 자체의 성질에 의한 것이라면 효소분자가 변성 되어 그 숫자가 감소함에 따라 시간에 따른 활성감소율은 두 系에서 같아야 할 것이다. 그러나 이에 반하여 對照系에서 활성감소율이 더 완만하다는 사실은 調節물질의 존재를 가정함으로써 설명될 수 있다. 즉 30°C에 放置한 5'-nucleotidase는 시간이 경과함에 따라 변성되면서 그 분자수가 감소하나 불활성인 분자에서 調節물질이 放置期間중에 자연적으로 유리된다면 변성에 의한 감소를 어느 정도 보충하여 줌으로 그 감소율이 活性化系보다 완만한 것으로 설명할 수 있다.

이로써 5'-nucleotidase의 調節물질의 존재가능성을 더욱 확실히 하고 그 물질이 脂質일 가능성을 示唆하는 바이다.

결 론

5'-nucleotidase는 각종세포의 원형질막에 결합되어 있는 ectoenzyme으로 밝혀짐에 따라 subcellular fractionation과정에서 원형질막분획을 확인하는 追跡효소로 널리 이용되기에 이르렀다. 이 효소는 광범위한 基質特異성을 나타내므로 isoenzyme의 특성이 있을 것으로 기대되는 바 이의 확실한 증거를 보고한 문헌은 드물다. 5'-nucleotidase는 최근에 이르러 시험관내에 放置함에 따라 그 활성이 서서히 증가하는 것으로 보고되었고 이에 관한 機轉으로 이 효소에 결합된 어떤 調節물질이 효소활성을 調節하리라는 설이 제안된 바 있다.

저자는 본 실험에서 흰쥐(Sprague-Dawley종)간세포 원형질막으로부터 膜脂質을 제거한 membrane-free 5'-nucleotidase를 분리해 내었고 이를 이용하여 isoenzyme의 존재여부를 구명하고 효소동력학적특성을 연구하고자 하였다. 또한 최근에 제안된 본 효소의 활성調節물질의 본질을 파악하고자 일련의 실험을 행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. Sonification으로 얻은 membrane-free 5'-nucleotidase에서 polyacrylamide gel을 이용한 disk 전기영동으로 2개의 isoenzyme band를 발견하였다.

2. 肝 homogenate를 differential centrifugation한 후 20mM SDC-20mM Tris, pH9.2로 평형을 이룬 Sephadex G-200 column으로 gel濾過하여 얻은 membrane-free 5'-nucleotidase의 효소시료는 肝 homogenate에 비

해 그 활성이 12배 높았다.

3. Mn^{++} 은 0.01~0.01mM의 낮은 농도로 10mM Mg^{++} 과 같은 정도(5%)의 효소활성증가를 나타내었다.

4. EDTA는 효소활성을 크게 阻害하였으며 EDTA 농도보다 5배 높은 농도의 Mg^{++} 을 가하면 효소활성은 原狀으로 회복되었다.

5. 5'-Nucleotidase는 adenine nucleotides에 의하여 guanine nucleotides보다 크게 阻害되었고 diphosphate가 triphosphate보다 阻害효과가 컸으며 nucleosides에 의하여는 阻害받지 아니하였다.

6. Membrane-free 5'-nucleotidase의 最適 pH는 8.0이었으며 K_M 値는 0.15mM이었다.

7. Membrane-free 5'-nucleotidase는 그 구성성분으로 磷脂質을 함유하고 있으며, sodium dodecyl sulfate(SDS), sodium deoxycholate(SDC) 및 Triton X-100과 같은 각종 淸淨劑에 의하여 활성이 증가하였다. 효소반응의 최대속도는 5mg의 SDC와 0.2 μ mole의 Mn^{++} 을 함유하는 活性化系에서 對照系보다 2배 정도 높았으나 K_M 値는 두 系에서 일치하였다. 한편 30°C에서 放置한 시료의 對照系 및 活性化系에서의 효소활성은 活性化系에서 더 빨리 감소하였다.

이상과 같은 결과를 토臺로 하여 볼 때 5'-nucleotidase에 함유되어 있는 磷脂質은 이 효소의 調節물질로 생각되며 淸淨劑 및 金屬이온에 의하여 이것이 효소로부터 유리되면 불활성인 효소가 활성형으로 되어 효소의 활성이 크게 증가하는 것으로 考察하였다.

—ABSTRACT—

Properties of 5'-Nucleotidase from Rat Liver Cell Plasma Membrane

*Kwang Hyun Kim, *Man Kee Paik,
**Hong Keun Chung, and
**Seung-Won Kimm

*Department of Otolaryngology and
**Department of Biochemistry, College of Medicine,
Seoul National University

5'-Nucleotidase has been shown to be localized in the plasma membranes of various cell types. It is widely used as a marker enzyme for plasma membrane in subcellular fractionation. It has been reported

as well that 5'-nucleotidase has broad specificities for nucleotide 5'-monophosphates.

Attempts have been made for such a reason to resolve this enzyme into isoenzymes, but in most cases evidences for isoenzymes were not obtained.

5'-Nucleotidase has been reported recently to increase in its activity upon aging the plasma membrane fraction *in vitro* at low temperature. A mechanism involved for the increase has been put forward in effect that a regulatory substance is bound to the enzyme, forming a latent 5'-nucleotidase.

The present investigation was carried out to prepare membrane-free 5'-nucleotidase from rat liver plasma membrane and to study the kinetic properties of the enzyme. Attempts also were made to resolve 5'-nucleotidase into isoenzymes and to confirm and characterize the proposed regulatory substance.

The results obtained are summarized as follows:

1. Membrane-free 5'-nucleotidase obtained by sonication from rat liver plasma membrane was resolved into two isoenzyme bands by disk electrophoresis on the polyacrylamide gel. The slow-moving isoenzyme was major component whereas the fast-moving isoenzyme, a minor component.

2. Membrane-free 5'-nucleotidase comprising the major isoenzyme was purified about 12-fold from rat liver homogenate by differential centrifugation and gel filtration on Sephadex G-200 column equilibrated with 20mM sodium deoxycholate-20mM Tris, pH 9.2.

3. Activation of membrane-free 5'-nucleotidase was brought about to the same extent(5%) by the much lower concentration of Mn^{++} (0.01-0.1mM) and by much higher concentration of Mg^{++} (10mM).

4. The enzyme was strongly inhibited by EDTA and recovered completely by the addition of about 5 times as much Mg^{++} in molar concentration as EDTA.

5. The enzyme was strongly inhibited by ADP and to a much less extent by GDP and GTP. Purine nucleosides did not affect the enzyme activity.

6. The pH optimum and K_M value of the enzyme were 8.0 and 0.15mM respectively.

7. Phospholipid was detected in the membrane-free 5'-nucleotidase and the enzyme was activated by widely used detergents such as sodium dodecyl sulfate (SDS), sodium deoxycholate(SDC) and Triton X-100.

V_{max} of the enzyme was increased about 2-fold by addition of 5mg of SDC and 0.2 μ moles of Mn^{++} to 2ml of the enzyme assay system, but K_M value of the enzyme was not altered. And the slope of the decrease in enzyme activity with time due to thermal denaturation at 30°C was greater in the SDC and Mn^{++} -containing assay system than in the control assay system.

Based on the above results, it was discussed that the phospholipid bound to 5'-nucleotidase could be regulatory substance which could be released by the detergents, most effectively by SDC combined with Mn^{++} , and by incubation itself, causing the enzyme to increase in activity.

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 glucuronyl transferase.* *Biochem. J.*, 123:875, 1971.
- Avruch, J. and Wallach, D.F.H.: *Preparation and properties of plasma membrane and endoplasmic reticulum fragments from isolated rat cells.* *Biochim. Biophys. Acta*, 233:334, 1971.
- Barr, L., Connor, J.A., Dewey, M.M. Aprille, J. and Johnston, P.V.: *The isolation of plasma membrane from frog cardiac muscle cells.* *Biochim. Biophys. Acta*, 345:336, 1974.
- 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.
- Bingham, R.W. and Burke, D.C.: *Isolation of plasma membrane and endoplasmic reticulum fragments from chick embryo fibroblasts.* *Biochim. Biophys. Acta*, 274:348, 1972.
- Bosmann, H.B. and Pike, G.Z.: *Membrane marker enz-*

- Yim, S.: Isolation, purification and properties of 5'-nucleotidase from rat cerebellum. *Biochim. Biophys. Acta*, 227:402, 1971.
- Bryce, J. and Renkonen, O.: Phospholipids of subcellular organelles isolated from cultured BHK cells. *Biochim. Biophys. Acta*, 486:243, 1977.
- Burger, R.M. and Lowenstein, J.M.: 5'-Nucleotidase from smooth muscle of small intestine and from brain. Inhibition by nucleotides. *Biochemistry*, 14:2363, 1975.
- 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.
- Chung, H.K. and Lee, K.Y.: Mechanism for increase in 5'-nucleotidase activity of rat liver plasma membrane upon aging in vitro. *Seoul J. Med.*, 21:1, 1980.
- DePierre, J.W., and Karnovsky, M.L.: Ecto-enzymes of the guinea pig polymorphonuclear leukocyte. I. Evidence for an ecto-adenosine monophosphatase, 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.
- Dobson, J.G. Jr., Rubio, R. and Berne, R.M.: Role of adenine nucleotides, adenosine and inorganic phosphate in the regulation of skeletal muscle blood flow. *Circ. Res.*, 29:375, 1971.
- Duttara, 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. V. On the lipid dependence of some phosphohydrolases of isolated 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.: In: *Methods in Enzymology*, Vol. III, Academic Press, p.843, 1957.
- 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, p. 871, 1974.
- Gurd, J.W. and Evans, W.H.: Distribution of liver plasma membrane 5'-nucleotidase as indicated by its reaction with anti-plasma membrane serum. *Arch. Biochem. Biophys.*, 164:305, 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.
- 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.
- Kamatani, T. and Kitakawa, H.: Effects of lipid peroxidation on activities of drug-metabolizing enzymes in liver microsomes of rats. *Biochem. Pharmac.* 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, N.K., Yasmineh, M.G., Freier, E.F., Goldman, A.I. and Thelgides, A.: Value of alkaline phosphatase, 5'-nucleotidase, γ -glutamyltransferase, and glutamate dehydrogenase activity measurements (single and combined) in serum in diagnosis 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., Haeflner, 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.
- Lelievre, L., Zachowski, A., Maget-Dana, R., Aubry J. and Bark, C.J.: *Differences in the modulations of the soluble or plasma-membrane-bound 5'-nucleotidase.* *Eur. J. Biochem.*, 80:185, 1971.
- 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.
- Misra, D.N., Gill, T.J. III, and Esters: L.W. *Lymphocyte plasma membranes. II. Cytochemical localization of 5'-nucleotidase in rat lymphocyte.* *Biochim. Biophys. Acta*, 352:455, 1974.
- 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.
- Paglia, O.E. and Valentine, W.N.: *Characteristics of a pyrimidine-specific 5'-nucleotidase in human erythrocytes.* *J. Biol. Chem.* 250:7973, 1975.
- Pilcher, C.W.T. and Scott: T.G.: *Electrophoretic heterogeneity of bovine seminal-plasma 5'-nucleotidase.* *Biochem. J.*, 104:41c, 1967.
- Polya, G.M.: *Purification and characterization of cyclic nucleotide-regulated 5'-nucleotidase from potato.* *Biochim. Biophys. Acta*, 384:443, 1975.
- 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 Widdnell, C.C.: *The demonstration of specific 5'-nucleotidase activity in rat tissues.* *Arch. Biochem. Biophys.*, 171:353, 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.
- Rubio, R., Berne, R.M. and Dobson, J.G. Jr.: *Sites of adenosine production in cardiac and skeletal muscle.* *Am. J. Physiol.*, 225:938, 1973.
- Rubio, R. and Berne, R.M.: *Release of adenosine by the normal myocardium in dogs and its relationship to the regulation of coronary resistance.* *Circ. Res.*, 25:407, 1969.
- 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.
- 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.
- 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.
- Song, C.S., Kappas, A. and Bodansky, O.: *5'-Nucleotidase of plasma membranes of the rat liver: Studies on subcellular distribution.* *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 166:565, 1969.
- 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 fraction of rat liver.* *J. Cell Biol.*, 39:185, 1968.
- Trams, E.G. and Lauter, C.G.: *On the sidedness of plasma membrane enzymes.* *Biochim. Biophys. Acta* 345:180, 1974.
- Vessey, D.A. and Zakim, D.: *Regulation of microsomal enzymes by phospholipid.* *J. Biol. Chem.*, 246:4469, 1971.
- Woo, Y.T. and Manery, J.F.: *5'-nucleotidase: An ectoenzyme of frog skeletal muscle.* *Biochim. Biophys. Acta*, 397:144, 1975.
- Zakim, D.: *Regulation of microsomal enzymes by phospholipids.* *J. Biol. Chem.*, 245:4953, 1970.