

# Ehrlich 腹水癌細胞 Guanine Deaminase의 特性에 關한 研究

## A Study on the Guanine Deaminase of the Ehrlich Ascites tumor cells

서울大學校 醫科大學 生化學教室

朴 鉉 培

### 序 論

高等動物의 purine 異化代謝는 adenosine deaminase (ADA)와 guanosine deaminase(GDA, guanosine aminohydrolase[E.C. 3.5.4.3.])의 두 酵素에 의해 주로 이루어지고 있다. 이들 酵素에 의해 adenosine이나 guanine으로 부터 生成된 xanthine, hypoxanthine 등은 xanthine oxidase에 의해 尿酸으로 酸化되어 體外로 排泄되기도 하고 또 hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase(HGPRT) (Kornberg et al., 1957)에 의한 salvage pathway에 再利用되기도 하며, 또 purine 鹽基 自體도 再利用되면서 細胞內에서 urine의 合成, 分解, 再利用의 복잡한 그물을 이루고 있다 (Mandil et al., 1957). 이중 guanine은 GDA 및 HGPRT에 의해 相競적으로 作用을 받으며 細胞內 平衡이 維持되고 있으며 HGPRT의 결핍으로 이런 平衡이 깨어진 것이 Lesch-Nyhan Syndrom으로 나타난다. guanine의 細胞內 平衡에 重要な 役割을 하는 GDA는 또 guanine의 誘導體인 6-thioguanine, 8-azaguanine 등이 抗癌效果를 갖는 것이 알려짐으로써 抗癌製의 作用에 있어서도 重要な 役割을 하는 것으로 생각되어졌다.

GDA가 purine 異化代謝에 重要な 役割을 하리라는 것은 그 동안의 여러 보고에 의해 示唆되고 있다. 즉 GDA가 둘 또는 셋의 isoenzyme으로 이루어져 있고 (Kumar et al., 1966; Kimm, 1976), 細胞質과 mitochondria에 各各 서로 다른 酵素가 存在하며 또 mitochondria에는 natural inhibitor가 存在한다고 보고되었으며 (Kumar et al., 1965; Ali et al., 1974) Kumar 등 (1972)은 또 GDA가 allosteric 酵素라고 보고하였다.

그러나 이런 여러 보고들은 purine 異化代謝에서의 GDA의 重要性을 示唆하고 있으나 아직 GDA의 代謝調節機轉에 關해서는 確實히 알려진 바는 없다.

癌組織은 매우 빠르게 成長하는 細胞들로 이루어져 있으며 급격한 細胞의 增殖은 必然적으로 多量の 核酸 合成과 分解를 必要로 하므로 癌組織核酸代謝의 理解

는 癌組織의 特性을 研究하는데 매우 重要하리라 생각된다. 現在까지 核酸의 合成課程은 많이 研究되어 왔으나 purine 異化代謝의 研究는 活發치 못하다. 그러나 앞서 言及한 抗癌劑外에도 ADA의 결핍이 淋巴球의 成長을 억제하는 것으로 報告되어 있어 purine 異化代謝酵素에 關한 研究가 癌의 규명에 重要的 寄與를 할 수 있으리라 생각된다.

따라서 著者는 purine 異化代謝酵素中 그 重要性에 비해 研究가 많이 되고 있지 않은 guanine deaminase의 特性을 癌組織에서 밝히고 이를 正常組織 GDA와 比較함으로써 癌組織과 正常組織의 purine 異化代謝의 差異를 규명하고자 하였다.

### 方法 및 材料

#### 1. 實驗材料

癌組織으로는 한국 원자력병원의 윤택구선생님으로부터 기증받은 mouse의 Ehrlich 腹水癌을 使用하였다.

腹腔內에 Ehrlich 腹水癌細胞를 移植한 mouse에서 10日後에 腹水を 注射器를 使用, 腹腔천자로 뽑은 후 곧 遠心分離하여 Ehrlich 腹水癌細胞를 分離하였다.

#### 2. 酵素의 部分精製

分離된 Ehrlich 腹水癌細胞는 즉시 0.25M sucrose를 2배量 加한 후 Potter-Elvehjem homogenizer로 homogenize 하였으며 homogenize후 細胞의 파괴 與否를 현미경으로 確認하였다. homogenate는 冷凍遠心分離器에서 600×g로 10分間 遠心分離하여 細胞膜 및 核을 제거하고 그 上清液은 다시 15,000×g에서 1時間 遠心分離하여 mitochondria를 제거한 후 그 上清液을 回收하였다. 이 上清液을 ammonium sulfate로 鹽析하였으며 40~80% 鹽析分割을 回收하여 이를 증류수에 24時間 透析하고 다시 10,000×g로 20分間 遠心分離하여 그 上清液만을 취하여 試料로 使用하였다. 한편 mitochondria는 따로 pH 8.0 Tris buffer로 그 浮遊液을 만들어 두었다가 mitochondria 成分 抑制實驗에 使用하였다.

### 3. GDA의 활성測定

GDA의 활성測定은 Rous와 Norris(1950)의 U.V. 分光分析法을 使用하였으며 Kumar 등 (1965)의 方法에 따라 다음과 같이 시행하였다.

즉 基質로서는 guanine을 使用하고 酵素試料과 함께 30°C 水槽에서 20分間 incubate한 후 10%(w/v) HClO<sub>4</sub>를 加하여 酵素反應을 中止시켰다. 이때 緩衝液으로는 Tris buffer, pH 8.0을 使用하였으며 10%(w/v) HClO<sub>4</sub>를 加한 후 遠心分離하여 그 上清液을 증류수로 稀釋한 후 245nm에서의 吸光度를 測定하였다. 한편 對照群은 10%(w/v) HClO<sub>4</sub>를 加하여 酵素를 變性시킨 후 guanine을 加했으며 對照系과 酵素活性測定系 사이의 吸光度差를 구하고 이를 245nm에서의 guanine과 xanthine의 吸光係數의 差를 利用하여 xanthine으로 轉換된 guanine의 mole수를 계산하였다.

吸光度의 測定은 Beckman DU Spectrophotometer를 使用하였으며 酵素活性의 單位는 1分間에 1 $\mu$ mole의 guanine을 xanthine으로 轉換시키는데 必要한 酵素活性을 1unit로 정의하였다.

### 4. 蛋白質의 定量

試料中の 蛋白質含量은 Lowry法(1951)의 Oyama 變法을 使用하였다. 標準으로는 소의 血清 albumin(Sigma 製 Mo. U.S.A.)를 使用하였으며 이의 질소량을 미리 micro-kjeldahlometry로 分析하였다. Folin-Ciocalteu의 phenol 試藥에 依한 發色은 Spectronic 20(Bausch & Lomb)을 使用하여 750nm에서 측정하였다.

## 實驗 結果

### 1. Ehrlich腹水癌細胞 GDA의 部分精製

GDA를 部分精製하기 爲하여 Ehrlich 腹水癌細胞를 homogenize한 후 다시 ammonium sulfate로 鹽析한 結果는 第1表와 같다. 40~80%의 鹽析分割을 증류수에 透析한 후의 GDA 回收率은 96%였으며 比蛋白活性은 0.00187 I.U./mg.protein으로 3.3倍 精製된 結果를 나타내었다.

### 2. Ehrlich 腹水癌細胞 GDA의 動力學的 特性

Ehrlich 腹水癌細胞 GDA의 基質, guanine 濃도에

對한 反應速度曲線은 제1(a)圖에서 보는 바와 같이 雙曲線型 反應을 나타내었으며 이를 Lineweaver-Burk Plot한 結果 第1(b)圖와 같은 直線을 얻었으며 이로부터 측정된 apparent Km值는 0.12mM이었다.

### 3. Ehrlich腹水癌細胞 GDA의 安定性

蛋白質의 3次 構造를 形成하는 수소結合의 瓦解를 가져옴으로써 酵素의 變性을 일으키는 것으로 알려진 guanidine HCl에 의한 影響을 검토한 結果는 第2表에 있는 바와 같다. 0.67M guanidine HCl 以後엔 거의 直線的인 減소를 보였으며 2.0M guanidine HCl에서는 約 3/4의 活性減소를 나타내었다.

한편 Ehrlich 腹水癌細胞 GDA의 耐熱性을 50°C에서 時間別로 測定한 結果는 第3表에 要約한 바와 같다. 즉 酵素를 50°C에서 30分間 incubation시켰을 때는 酵素活性의 減소가 거의 나타나지 않으나 60分間 incubate했을 때는 50%의 活性減소가 나타나고 120分 incubate했을 때는 完全히 活性이 消失되었다.

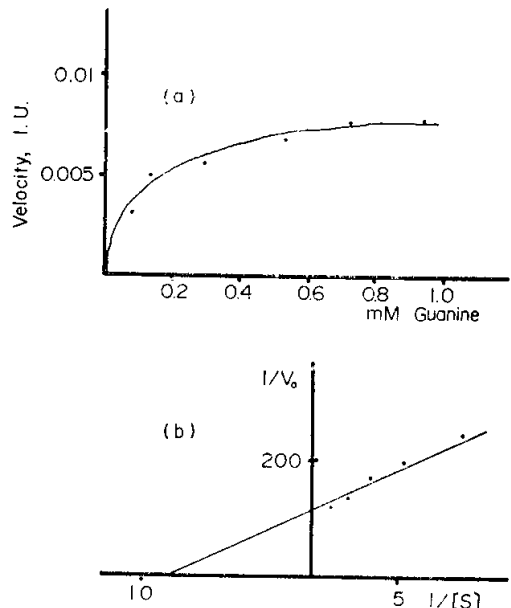


Fig. 1. Substrate (guanine) concentration versus reaction velocity relationship of GDA. (a) substrate concentration versus reaction velocity, (b) Lineweaver-Burk plot.

Table 1. Partial purification of GDA from Ehrlich ascites tumor cell

	Total GDA activity	Total protein	Yield	Relative activity	Purification fold
Total homogenate	0.269 I.U.	482.0 mg	100%	0.00056 I.U./mg.protein	1
Salting-out fraction	0.258 I.U.	138.3 mg	96%	0.00187 I.U./mg.protein	3.3

Table 2. Guanidine HCl denaturation of the activity of GDA

	Guanidine-HCl concentration (M)						
	0	0.33	0.67	1.0	1.33	1.67	2.0
Activity(Unit/ml)	0.0091 (100%)	0.0086 (95%)	0.0077 (84%)	0.0062 (68%)	0.0048 (53%)	0.0038 (42%)	0.0024 (26%)

Table 3. Heat stability of GDA at 50°C

	Incubation period (min.)			
	0	30	60	120
Activity (I.U./ml)	0.0096 (100%)	0.0091 (95%)	0.0053 (55%)	0 0

4. GDA 活性에 미치는 pH의 영향

Ehrlich 腹水癌細胞 GDA의 活性에 미치는 pH의 영향을 살펴 본 결과는 第2圖에 나타내었으며 이는 圖示한 바와 같이 pH 7에서 pH 9에 이르기까지 단일 peak의 폭넓은 pH optima를 나타내고 있다.

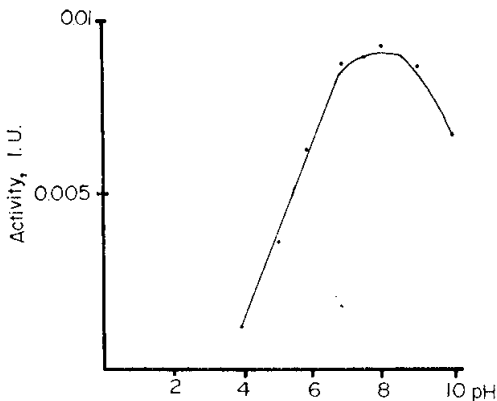


Fig. 2. pH-activity profile of the Ehrlich ascites tumor GDA.

5. Mitochondria 分割의 영향

Kumar 등(1965)이 주장한 mitochondria에 存在하는 GDA의 inhibitor가 Ehrlich腹水癌細胞에도 存在하는지를 관찰하기 위해 미리 마련해둔 mitochondria 分割을 酵素試料에 첨가하여 抑制 有無를 관찰하였으나 酵素 活性의 감소를 관찰할 수가 없었으며 오히려 活性의 증가를 나타내었다.

考 察

GDA는 1932년 Schmidt에 의해 토끼의 肝에서 發見

된 이래 이의 特性에 關해 많은 研究報告가 여러 研究者에 의해 이루어져 왔지만 近年에 isoenzyme으로 存在함이 밝혀짐에 따라(Kumar & Krishnan, 1970; Sitaramayya & Krishnan, 1970; Fogle, 1974; Bieber, 1974) 그 isoenzyme의 특성과 함께 purine 異化代謝에서의 代謝調節機轉에 關한 關心이 높아졌다. 특히 GDA isoenzyme이 cytosole 뿐만 아니라 mitochondria에도 存在하며 또 GDA의 inhibitor가 亦是 mitochondria에 存在한다고 報告됨으로써(Kumar et al., 1965; Ali et al., 1974) GDA가 purine 異化代謝에서 重要な 役割을 하리라 생각되어 왔다. 그러나 現在까지, purine 異化代謝에 대한 精確한 作用機轉은 確實하게 알려져 있지 않으며 특히 核酸의 合成과 分解가 매우 빠른 속도로 進行되리라 짐작되는 癌組織의 GDA特性에 關한 研究는 별로 이루어져 있지 않은 실정이다. 따라서 앞으로 正常組織 GDA의 特性 研究와 함께 癌組織 GDA의 特性 研究가 필요하리라 생각된다.

本 實驗의 結果로는 Ehrlich 腹水癌細胞 GDA는 그 動力學의 特性에 있어 Km值가 0.12mM로써 대체로 다른 報告보다 낮은 Km值를 보여 基質親和力이 높은 것으로 나타났으나 GDA의 Km值는 報告者에 따라서 또 組織에 따라 많은 差를 나타내므로 mouse ascites cell의 GDA와 比較하여야만 그 意義를 알 수 있을 것이다.

Kumar 등(1965)이 보고한 mitochondria의 GDA inhibitor는 Ehrlich 腹水癌細胞에서는 存在하지 않는 것으로 관찰되었으며 이러한 inhibitor가 갖는 代謝調節이나 癌組織에서의 重要性은 보다 廣範圍한 研究에 依해서 알 수 있을 것이며 mitochondria의 膜結合 蛋白質을 溶解시킨 後 그 蛋白分割을 研究하여야 할 것이다.

Ehrlich腹水癌細胞 GDA의 pH에 의한 영향은 韓 등(1974)이 개의 腦에서 報告한 것과 거의 一致하고 있고 기타 다른 研究者의 報告(Ray, 1968; Kumar et al., 1967)와도 대체로 一致하여 pH에 의한 영향은 여러 正常組織 GDA와 Ehrlich 腹水癌 GDA 사이에 별다른 差가 없는 것으로 나타났다.

한편 熱處理에 依한 活性消失의 정도를 보면 Ehrlich 腹水癌細胞 GDA는 50°C에서 30分間 incubation했을 때는 거의 酵素活性의 消失이 없었으며 1時間에는 50%,

2時間後에는 完全に 消失되었다. 이러한 結果는 韓 등 (1974)이 보고한 개의 腦 GDA에 比하면 낮으나 Kumar (1967) 등이 보고한 50°C에서 5分間 incubation으로 酵素活性이 完全に 消失된다는 보고보다는 매우 높은 耐熱性을 나타내었다. 또 guanidine HCl에 對한 Ehrlich 腹水癌細胞 GDA의 저항도는 상당히 強해 2M의 guanidine HCl로 처리해도 25% 정도의 活性을 나타내어 韓 등(1974)의 보고보다 강한 저항성을 보였다. 대체로 Ehrlich 腹水癌細胞의 GDA는 다른 正常組織 GDA에 比해 變性에 대해 강한 저항성을 보여 상당한 安定性을 나타내었다.

### 要 約

Ehrlich 腹水癌 細胞로부터 鹽析 및 透析에 依해 約 3.3倍 部分精製된 GDA를 얻고 이의 特性을 研究하여 다음과 같은 結果를 얻었다.

1. Ehrlich 腹水癌 細胞 GDA의 apparent Km値는 0.12mM이었다.

2. 2M의 guanidine HCl로 처리하면 75%의 活性消失을 가져왔고 50°C에서 30分間 처리했을 때는 거의 活性의 감소를 나타내지 않으나 2時間 처리하면 完全한 活性消失을 나타내었다.

3. pH 7.0에서 pH 9.0에 이르는 단일의 폭넓은 最適 pH를 나타내었다.

4. Ehrlich 腹水癌 細胞의 mitochondria에는 GDA inhibitor가 存在하지 않는 것으로 나타났다.

### —ABSTRACT—

#### A Study on the Guanine Deaminase of the Ehrlich Ascites tumor cells

Joo-Bae Park

Department of Biochemistry, College of Medicine,  
Seoul National University

Crude preparation of the guanine deaminase (EC 3.5.4.3.) was obtained from the Ehrlich ascites tumor cells, by means of salting-out with ammonium sulfate, and the properties of the enzyme were observed with the following conclusions.

1. The Km value of the crude GDA was 0.12mM.

2. 2M guanidine-HCl inhibited 75% of the activity of GDA, and all of the activity was lost after 2 hour incubation of the enzyme at 50°C.

3. The GDA showed a single broad spectrum of its pH versus activity profile ranging from pH 7.0 to 9.0.

4. There was no evidence of the presence of the natural inhibitor of the Ehrlich ascites tumor cell GDA in the mitochondrial fraction of the cell.

### REFERENCES

- 한 경숙, 김 승원 : 개의 대뇌 후두엽 조직의 *guanine aminohydrolase*에 관한 研究. 서울의대잡지, 15(3): 175, 1974.
- Ali, S., Sitaramayya, A., Kumar, S. and Krishnan, P.S.: *Guanine deaminase inhibitor from rat liver. Biochem. J.*, 137:85-92, 1974.
- Bieber, A.: *A sliced gel assay for some enzymes which utilize guanine as substrate. Anal. Biochem.*, 60:206, 1974.
- Fogle, P.J.: *Purification and characterization of rabbit liver guanine aminohydrolase. Ph.D. thesis, Arizona State Univ. Microfilms. Ann. Arbor. Mich. 1974.*
- Kimm, S.W.: *A staining method for guanine deaminase on the electrophoretic gel bed. Korean J. Biochem.*, 8:45, 1976.
- Kumar, S., Tewari, K.K. and Krishnan, P.S.: *Solubilization and partial purification of particulate guanine deaminase from rat brain. J. Neurochem.*, 13: 1550-52, 1966.
- Kornberg, A., Lieberman, I. and Simms, E.C.: *Enzymatic synthesis and properties of 5-phosphoribosyl pyrophosphate. J. Biol. Chem.*, 215:389, 1955.
- Kumar, S., Tewari, K.K. and Krishnan, P.S.: *Guanine deaminase activity in rat brain and liver. Biochem. J.*, 95:797, 1965a.
- Kumar, S., Tewari, K.K. and Krishnan, P.S.: *Partial purification of guanine deaminase inhibitor from rat brain. J. Neurochem.*, 12:1003-1004, 1965b.
- Kumar, K.S., Josan, V., Sanger, K.C.S., Tewari, K.K. and Krishnan, P.S.: *Studies on guanine deaminase and its inhibitor in rat tissue. Biochem. J.*, 102: 691, 1967.
- Kumar, K.S. and Krishnan, P.S.: *An allosterism and a non-allosteric guanine deaminase isoenzyme in rat liver supernatant. Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 39:1087, 1970.

- Kumar, K.S., Sitaramayya, A. and Krishnan, P.S.: *Guanine deaminase in rat liver and mouse liver and brain. Biochem. J.*, 128:1079, 1972.
- Lowry, O.H., Rosenberg, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.: *Protein measurement with the Folin-phenol reagent. J. biol. Chem.*, 193:265-275, 1951.
- Mandil, H.G., Way, J.L. and Smith, P.K.: *The effect of purines into liver nucleic acids of the mouse. Biochem. biophys. Acta*, 24:402, 1957.
- Roush, A. and Norris, E.R.: *Deamination of 8-azaguanine by guanase. Arch. Biochem.*, 29:124-129, 1950.
- Roy, J.E.: *Lincod muscle guanine deaminase. Canad. J. Biochem.*, 44:1093, 1966.
- Schmidt, G.: *Enzymatic breakdown of guanilic acid in the rabbit liver. Z. Physiol. Chem.*, 208:185, 1932.
- Sitaramayya, A. and Krishnan, P.S.: *Allosterism in rat brain supernatant guanine deaminase. Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 40:565, 1970.