

EDTA가 白鼠 生體膜 MARKER ENZYME의 活性에 미치는 影響에 관하여

Effects of EDTA on the Activities of Marker Enzymes for Membranes from Rat Liver

서울대학교의과대학

*소아과학교실, **생화학교실

이용길 · 최한웅*, 정홍근 · 이기영**

서 론

생체막의 구조와 기능에 관한 연구는 최근에 이에 관한 연구방법이 급격히 발달됨에 따라 매우 활발하여 매년 상당수의 논문이 발표되고 있어 오늘날 분자생물학의 하나의 중요한 연구분야를 이루고 있다.

생체막의 연구를 위해서 생체막을 분리 정제하는 일은 생체막 연구의 기본이 되는 일이다.

세포에는 세포내환경과 세포외환경의 경계를 이루어 각종 대사물의 투과를 조절하고, 세포밖의 자극을 세포내로 전달하는 receptor를 가지고 있는 원형질막(plasma membrane), 세포내 각종 대사와 각종 고분자물질의 생성에 관여하는 endoplasmic reticulum 및 Golgi apparatus, ATP생성에 관여하는 mitochondria, 그외에 핵 및 lysosome등과 같은 organelle이 존재하며 이들 organelle도 각기 고유한 생체막을 가지고 있다.

세포를 파괴하여 얻어진 균질액(homogenate)을 600×g에서 15분간 원침으로 얻어진 침전을 crude nuclear fraction, 10,000×g에서 25분간 침전으로 얻어진 것은 crude mitochondria fraction, 10,5000×g에서 1시간 원침으로 얻어진 분획을 crude microsomal fraction으로 부른다(Maddy, 1976).

세포내의 organelle인 핵과 mitochondria가 온전한 상태로 얻어지면 그 밀도 차이가 크기 때문에 비교적 쉽게 분리된다.

그러나 세포를 homogenize하는 과정에서 일부가 파괴되면 그 입자의 크기에 따라 좀더 높은 원심력에서 침전되거나 plasma membrane은 homogenize하는 조건에 따라 그 크기와 모양에 변화가 생겨 그 밀도도 크게 달라진다.

즉 plasma membrane이 cell ghost 또는 판막형태로

얻어지면 1500×g, 15분간 원침으로 침전되며 큰 vesicle은 crude mitochondria fraction에, 또 작은 vesicle은 crude microsomal fraction에 각각 나타난다(Maddy, 1976).

위에서 말한 이유외에 생체막은 응집(Avruch et al., 1971)이 일어나 다른 생체막과 함께 침전되기 때문에 균일한 생체막으로 완전히 분리되는 일은 지극히 어렵다. 그러므로 대개 생체막을 목적에 따라 어느정도 부분 정제하여 사용한다.

Homogenate을 기준으로 한 생체막의 정제도(purification fold)와 다른 생체막의 오염도(degree of contamination)는 각종 생체막에 고유하게 결합된 효소 즉 marker enzyme의 비활성(比活性)을 측정하여 homogenate의 그것과 비교함으로써 알 수 있다.

EDTA(ethylene diamine tetraacetate)는 1mM의 낮은 농도로서 생체막을 정제하는 과정에서(Avruch et al., 1971; Brotherus et al., 1977) 사용되고 있는데 그 이유는 EDTA가 생체막 지질의 과산화(Kamatagi & Kitagawa, 1973; Chung & Lee, 1977)를 방지할 뿐만 아니라 2가 금속이온과 chelate를 만들어 생체막 응집을 막아주는 효과를 가지고 있기 때문이다.

저자는 EDTA사용에 따른 여러 부작용을 검토하기 위하여 EDTA 첨가없이 부분정제된 생체막 부유액에 EDTA를 조건을 달리하여 첨가함으로써 이의 영향을 다음과 같은 면에서 검토하였다.

즉 EDTA가 plasma membrane의 marker enzyme인 ATPase(Berman et al., 1969) 및 5'-nucleotidase(Segal et al., 1960; Berman et al., 1969), mitochondrial marker enzyme인 β -hydroxybutyric dehydrogenase(Lehninger et al., 1960) 및 endoplasmic reticulum의 marker enzyme인 glucose-6-phosphatase(Maisterrena et al., 1974)의 활성에 미치는 영향과 mitochondria의 구

조에 미치는 영향을 검토하여 이에 관한 연구결과를 보고하는 바이다.

실험재료 및 방법

실험재료

고내 동물사육실에서 사육한 체중 200~250g의 Sprague-Dawley strain백서를 암수 구별없이 사용하였다.

ATP, AMP, glucose-6-phosphate(G-6-p), NAD, β -hydroxybutyrate 및 bovine serum albumin등은 Sigma Chem. Co. (St. Louis, Mo., U.S.A.), Tris, trichloroacetic acid (TCA) 및 유기용매는 Merck Co. (Darmstadt, Germany), sucrose와 기타 무기시약은 Kanto Chem. Co. (Tokyo, Japan)에서 각각 구입하였다.

Density gradient 원심분리에 사용되는 모든 sucrose 용액은 %W/W로 표시한 것이고 또 이에 0.5mM CaCl₂를 포함시켰다.

간 homogenate의 조제

전날 단식시킨 백서를 단두로 희생시킨후, 즉시 적출한 간을 적당한 전처리를 거쳐 냉각된 0.25M sucrose, 5mM Tris, 0.5mM CaCl₂, pH 7.4의 sucrose 완충액에 넣어 가위로 잘게 자른 후 용액은 딸아 버렸다. 다시 같은 용액을 가하여 간조직을 3번 더 반복하여 세척함으로써 적혈구를 가능한 제거하였다.

잘게 절단한 간조직을 험겁게 맞는 Teflon pestle로 된 Potter-Elvehjem homogenizer (clearance 0.015)에 옮겨 같은 용액을 가한 다음 이를 Arthur H. Thomas Co. 제 homogenizer motor의 가장 낮은 회전수를 사용하여 2번 상하로 움직여 homogenize하였다.

다음 이를 두겹으로 걸쳐진 가재로 여과한후 완충액을 가하여 10%(W/V) homogenate액이 되도록 하였다.

매번 실험에서 3~6마리분의 백서 간조직을 pool로 하여 간조직 homogenate액을 조제하였으며 이것을 보통 두번 되풀이 한 것에 대하여 아래 각종 효소활성을 triplicate로 측정하였다.

Plasma membrane의 정제

백서 간 homogenate(10%)를 1500×g로 10분간 원침하여 (Neville, 1968) 그 상층액을 딸아내고 그 침전을 험겁게 맞는 Dounce homogenizer로 homogenate 본래 용량의 절반에 해당하는 0.25M sucrose, 0.5mM CaCl₂, 5mM Tris(pH 7.4) 완충액으로 부유시켜 homogenize하였다.

다시 이것을 1500×g로 10분간 원침한후 이 침전을 같은 용액으로 Dounce homogenizer에 옮겨 넣어 대략 5mg protein/ml의 부유액이 되도록 homogenize시켰다 이 부유액 1ml를 다음과 같이 준비된 sucrose density gradient위에 주의하여 중첩시켰다.

5.5ml polyethylene tube에 45% sucrose용액 1ml를 가한 다음 41.5% sucrose용액 1.5ml를 경사진 관벽을 통하여 주의하여 중첩하고 다시 그위에 37% sucrose 용액 1.5ml를 같은 요령으로 경계가 교란되지 않게 첨가하였다. (Berman et al., 1969). 이와같이 sucrose density gradient위에 중첩된 부유액을 MSE Centriscan 75 ultracentrifuge와 MSE aluminum swing-out rotor를 사용하여 200,000×g(41,000rpm)로 90분간 4°C에서 원심 분리하였다.

원심분리후 41.5%와 37%사이의 경계면에 생성된 막층을 주사기로 주의하여 뽑아내어 증류수로 대략 5배 정도로 희석한 후 5000×g로 10분간 다시 원심분리 하였다.

이 침전을 대략 3mg protein/ml정도의 부유액이 되도록 0.25M sucrose, 5mM Tris (pH 7.4) 완충액에 부유시켜 이것을 부분정제된 plasma membrane분획으로 사용하였다.

Mitochondria의 분리 및 정제

핵분획을 제거하기 위하여 10% homogenate액은 600×g에서 15분 원침하여 그 침전을 버리고 그 상층액을 8,000×g에서 다시 10분간 원침하였다.

이 crude mitochondrial fraction을 Dounce homogenizer로 homogenate액 본래 용량의 절반에 해당하는 0.25M sucrose, 0.5mM CaCl₂, 5mM Tris (pH 7.4)의 완충액에 부유시켜 위와 같이 다시 원심분리 하였다.

여기서 얻어진 침전을 대략 5mg protein/ml가 되도록 다시 그 완충액에 부유시켜 얻어진 부유액 1ml를 다음과 같이 준비된 sucrose density gradient위에 중첩케 하였다.

5.5ml드리 polyethylene tube에 상기한바 동일한 방법으로 48% sucrose용액 1ml를 가하고 그 위에 45% sucrose용액 1.5ml를 넣고 다시 그 위에 41.5% sucrose 용액 1ml를 중첩시켰고 여기에 부유액 1ml를 넣어 MSE Centriscan 75 ultracentrifuge와 MSE aluminum swing-out rotor (5.5ml×6)를 사용하여 200,000×g(41,000 rpm), 90분간, 4°C에서 원심분리후 sucrose완충액 41.5%와 45% 경계면의 분획과 45%와 48% 경계면의 분획을 주사기로 각각 주의하여 뽑아낸 다음 0.25M sucrose용액으로 8배정도 희석한 후에 10,000×g로 4°C

에서 20분간 원침하였다.

여기서 얻어진 침전을 다시 0.25M sucrose, 5mM Tris (pH 7.4) 완충액에 대략 4mg protein/ml가 되도록 부유시키었다.

Mitochondria의 marker enzyme인 β -hydroxybutyric dehydrogenase (β -HBD)의 비활성 측정을 참고로하여 45%와 48% 경계면의 분획을 부분정제된 mitochondria 분획으로 사용하였다.

EDTA첨가 mitochondria의 density gradient 원심분리

회편 상기한바 density gradient 원심분리에서 사용한 모든 sucrose 완충용액에 최종농도가 1mM이 되도록 0.1M EDTA완충용액 (pH 7.4)을 추가한 후에 refractometer를 사용하여 sucrose용액의 밀도가 EDTA를 가하기 전의 밀도가 되도록 70% sucrose-용액을 가하여 조절하였다. 또 crude mitochondria 부유액에도 역시 EDTA 완충액을 가하여 최종농도가 1mM이 되도록 하였다.

위에서와 같은 조건으로 원심분리하여 원액과 41.5% 경계면의 분획, 41.5%와 45% 경계면의 분획 및 45%와 48% 경계면의 분획을 각각 얻은 후 각 분획에 대하여 β -HBD의 활성을 측정하였다.

Microsome의 분리

핵 및 mitochondria분획을 제거하기 위하여 10% homogenate를 MSE Centriscan 75 ultracentrifuge와 MSE aluminum angle rotor (50ml \times 8)를 사용, 15,000 \times g 4°C에서 15분간 원침하여 침전은 버리고 그 상층액을 105,000 \times g에서 1시간 동안 다시 원침하였다.

이때 얻은 침전을 0.25M sucrose, 5mM Tris (pH 7.4) 완충액에 대략 4mg protein/ml가 되도록 부유시켜 microsome분획으로 하였다.

(Mg⁺⁺+Na⁺+K⁺)—ATPase의 활성 측정

이 효소반응계는 최종용량이 1ml로 115mM NaCl, 8mM KCl, 3mM MgCl₂, 3mM disodium ATP, 70mM Tris (pH 7.4)의 조성을 가진 것에 membrane 부유액 0.1ml가 첨가된 것이다. (Wilson & Vilee, 1975)

이 반응용액을 37°C에서 10분간 방치하여 효소반응을 일으킨 후 10% trichloroacetic acid (TCA) 2ml를 가함으로써 반응을 정지시켰다. 이때 침전된 단백질을 원심분리로 제거한 후에 기질인 ATP에서 유리된 무기인을 Fiske and SubbaRow (1925)방법에 따라 정량하였다.

EDTA 존재하에서 효소활성을 측정할 때는 0.1M EDTA완충액 (pH 7.4)을 최종농도가 1mM이 되도록

membrane 부유액에 가하였으며 EDTA를 넣지 않는대 조로서는 membrane 부유액에 EDTA용액의 동량에 해당되는 0.25M sucrose, 5mM Tris (pH 7.4)완충액을 가하였다.

효소활성의 단위는 1시간동안 작용시켜 기질 ATP에서 1 μ mole의 무기인을 유리시키는데 필요한 효소의 활성을 1unit로 정의하였다.

5'-Nucleotidase의 활성 측정법

이 효소 반응계는 총용량이 2ml이고 0.07M Tris buffer (pH 7.5), 1mM 5'-AMP의 조성으로서 plasma membrane 부유액 0.1ml가 함유되어 있다 (Segal et al., 1960).

이 반응계를 30°C에서 20분간 incubate한후에 30% TCA 0.5ml를 가함으로써 반응을 정지시켰다.

침전된 단백질을 원심분리로 제거한 후에 유리된 무기인을 Fiske and SubbaRow (1925)방법에 따라 정량하였다.

EDTA 첨가반응계에서 5'-Nucleotidase의 활성을 측정할 때는 EDTA완충액 (pH 7.5)을 plasma membrane 부유액에 가하든가 또는 EDTA를 반응계의 Tris buffer에 직접 포함시켰다.

효소활성의 단위는 1시간동안 AMP로부터 1 μ mole의 무기인을 유리시키는데 필요한 효소의 양을 1unit로 정의하였다.

β -Hydroxybutyric dehydrogenase의 활성 측정

이 효소반응계는 최종용량이 2.02ml이며 10% ethanol (V/V), 0.04M Tris (pH 8.0), 0.002M NAD, 0.02M DL- β -hydroxybutyrate의 조성을 갖고 있으며 mitochondria 부유액 0.02ml를 포함하고 있다 (Lehninger et al, 1960).

이 효소반응에 있어 NADH증가에 의한 340nm에서의 흡광도 증가는 Pye Unicam SP 1750 UV spectrophotometer로 30°C에서 15초 간격으로 측정하고 이것으로 효소활성을 산출하였다.

EDTA 존재하에서 효소활성을 측정할 때는 EDTA (pH 8.0)를 intact mitochondria 시료에 가하거나 또는 Sonifier Model W 185 (Heat Systems-Ultra Sonic Inc.)을 사용하여 1분간 최대출력으로 sonify한 fragmented mitochondria 시료에 가하였고 시료에 직접 EDTA용액을 가하지 않을 때는 EDTA를 효소반응액에 첨가하여 각기 EDTA 최종농도가 0.01mM이 되게 하였다.

효소활성의 단위는 1시간에 1 μ mole의 NAD를 NADH로 환원시키는데 필요한 효소의 양을 1 unit로 정의하였다.

Glucose-6-phosphatase (G-6-Pase) 활성 측정

효소반응액의 총용량은 0.5ml이며 0.06M acetate-succinate(pH 6.0), 0.02M glucose-6-phosphate(G-6-p)의 조성을 가진 것으로 이것에 microsomal suspension 0.1ml를 포함시켰다. (Swanson, 1955; Grinna & Barber, 1972).

이 반응계를 38°C에서 10분간 incubate한 후에 10% TCA 1ml를 가하여 반응을 정지시켰다. 침전된 단백질을 원심분리로 제거한 후에 유리된 무기인을 Fiske and SubbaRow방법에 따라 정량하였다.

EDTA 존재하에서 효소활성을 측정할 때는 0.1M EDTA 완충액(pH 6.0)을 microsomal suspension에 가하여 그 최종농도가 1mM이 되도록 하였다.

효소활성의 단위는 1시간 동안에 G-6-p로부터 1μmole의 무기인을 유리시키는데 필요한 효소활성을 1unit로 정의하였다.

단백질 정량

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

실험 결과

Table 1에서 보는바와 같이 plasma membrane의 marker enzyme인 5'-nucleotidase의 비활성(比活性)은 10% homogenate를 1,500×g로 10분간 원침하여 얻은 crude plasma membrane에서는 homogenate의 그것에 비하여 약 1.7배 증가하였고 이 분획을 다시 sucrose density gradient 원침으로 부분적으로 정제한 plasma membrane에서는 약 10.6배로 증가하였다. 또 효소활성의 회수율을 보면 1,500×g분획에서 약 33%였고 sucrose density gradient 원침분획에서는 약 21%였다.

mitochondria의 정제과정을 보면 Table 2에서 표시한바와 같이 mitochondria의 marker enzyme인 β-hy-

Table 1. Purification of plasma membrane from rat liver.

	Specific activity	Purification fold	Recovery of the enzyme activity
10% homogenate	0.63	1.0	100%
Crude plasma membrane	1.07	1.7	33.5%
Purified plasma membrane	6.67	10.6	21.4%

5'-Nucleotidase was used as a marker enzyme for plasma membrane to assess the purity. Crude plasma membrane represents the pellet from centrifugation of 10% homogenate at 1500×g for 10 min. Purified plasma membrane represents the fraction from density gradient centrifugation of the crude plasma membrane as described in Methods. Specific activity of the enzyme is expressed as μmolcs of Pi released per hour per mg protein. Purification fold is the relative specific activity of the membrane fraction to 10% homogenate.

Each value is given as a mean from triplicate determinations of the sample prepared from the pooled livers of 6 rats.

Table 2. Purification of mitochondria from rat liver.

	Specific activity	Purification fold	Recovery of the enzyme activity
10% homogenate	1.50	1.0	100%
Crude mitochondrial fraction	5.27	3.51	45.7%
Purified mitochondrial fraction	12.2	8.13	32.1%

β-Hydroxybutyric dehydrogenase was used as a marker enzyme for mitochondria to assess the purity. Crude mitochondrial fraction represents the pellet from differential centrifugation of the 10% homogenate between 600×g and 8000×g. Purified mitochondrial fraction represents the fraction from density gradient centrifugation of the crude mitochondrial fraction as described in Methods. Specific activity of the enzyme is expressed as μmole of NADH per mg protein per hour. Purification fold is the relative specific activity of the mitochondrial fraction to 10% homogenate.

Each value is given as a mean from triplicate determinations of the sample prepared from the pooled livers of 6 rats.

Table 3. Effect of EDTA on the activities of plasma membrane ($Mg^{++}+Na^{+}+K^{+}$)-ATPase and microsomal glucose-6-phosphatase.

	Sample without EDTA	Sample with 1mM EDTA
($Mg^{++}+Na^{+}+K^{+}$)-ATPase activity (μ mole of Pi/hour/mg protein)	58.7	65.7
G-6-Pase activity (μ mole of Pi/hour/mg protein)	11.7	12.9

The activity of ($Mg^{++}+Na^{+}+K^{+}$)-ATPase was measured as the release of Pi from ATP in the presence of $Mg^{++}+Na^{+}+K^{+}$. Glucose-6-phosphatase (G-6-Pase) activity was measured as the release of Pi from glucose-6-phosphate (G-6-P). Results are expressed as μ moles of Pi from ATP and G-6-P respectively per hour per mg protein.

Each value represents a mean of triplicate determinations of each sample separately prepared from the pooled livers of 3 rats each.

droxybutyric dehydrogenase(β -HBD)의 비활성이 8,000 \times g로 분별 원심 분리된 분획에서 homogenate의 그것에 비하여 약 3.5배로 증가하였고 이 분획을 다시 sucrose density gradient원침으로 정제한 분획에서는 대략 8배로 증가하였다.

효소활성의 회수율은 8,000 \times g 원침분획에서 대략 46%였고 density gradient원침분획에서는 대략 32%였다.

Table 3에서 보는 바와 같이 plasma membrane의 ($Mg^{++}+Na^{+}+K^{+}$)-ATPase 및 endoplasmic reticulum의 marker enzyme인 G-6-Pase 활성이 EDTA에 의하여 약간 증가되는 경향을 보여주고 있다.

그러나 이와 반대로 Fig. 1에서 보는바와 같이 5'-nucleotidase 활성은 EDTA에 의하여 억제되었다.

EDTA농도가 증가함에 따라 이 효소활성은 계속 감소되어 EDTA농도가 100mM에 달하면 본래 활성의 대략 20%까지 억제되었다.

Fig. 2에서 표시한바와 같이 5'-nucleotidase 활성의 Lineweaver-Burk plot를 보면 EDTA를 첨가하지 않은 대조의 K_m 치는 0.38mM이고 10mM EDTA존재하에서는 K_m 치는 대략 1.2mM이었고 V_{max} 치는 EDTA유무에 관계없이 같았다.

이것으로써 EDTA는 5'-nucleotidase의 competitive inhibitor임을 알 수 있다.

Plasma막의 5'-nucleotidase활성은 AMP를 기질로 하여 측정할 때 non-specific phosphatase활성도 나타나기 때문에 실제 5'-nucleotidase활성보다 크게 정량된다. 그러나 EDTA가 5'-nucleotidase활성을 경쟁적으로 억제한다는 사실을 이용하여 5'-nucleotidase 고유한 활성을 측정할 수 있다.

Fig. 3에서 보는바와 같이 Mg이온은 5'-nucleotidase가 EDTA존재로 그 활성이 억제되었을 때는 Mg이온의

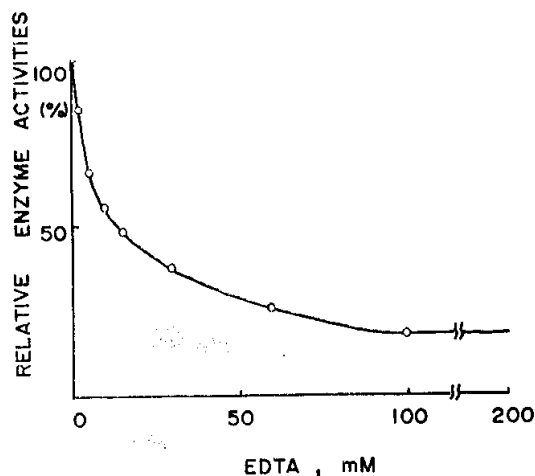


Fig. 1. Inhibition by EDTA of 5'-nucleotidase of plasma membrane.

The activity of enzyme preparation was 6.67 μ moles of Pi released per hour per mg protein. Relative enzyme activities in the presence of EDTA were expressed as % of the original enzyme activity. Enzyme activity was assayed in triplicate in two mitochondrial samples prepared separately, from the pooled liver of 3 rats each, and the mean of these determinations represents each enzyme activity.

첨가로 그 활성이 회복됨을 알 수 있다. Mg이온의 농도가 EDTA농도의 대략 3배가 되면 EDTA의 억제효과가 소멸되었다.

Table 4는 여러 조건하에서 mitochondria에 대한 EDTA효과를 관찰한 것을 요약한 것이다. mitochondria의 marker enzyme인 β -hydroxybutyric dehydrogenase (β -HBD)에 대한 EDTA의 영향을 살펴내어 EDTA 첨가양식을 두가지로 취하였다. 즉 하나는 EDTA를 직

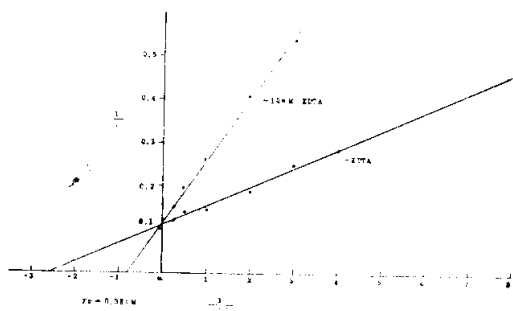


Fig. 2. Lineweaver-Burk plot of the 5'-nucleotidase activity of plasma membrane in the presence and absence of EDTA.

Velocity of the reaction is expressed as μ moles of Pi released per hour per mg protein. Substrate are expressed as the millimolar concentration of 5'-AMP.

집 정제한 mitochondria 시료속에 넣고 (A system), 또 하나는 시료를 가하기 전에 효소반응액에만 EDTA를 첨가(B system)하였는데 그 EDTA 최종농도는 다같이 0.01mM이 되게 조정하였다. Table 4에서 보는바와 같이 EDTA를 가하지 않은 mitochondria 시료의 β -HBD 활성을 대조치로 하여 100%로 하였을때 B system 즉 효소반응액속에만 존재하는 EDTA로 mitochondria의 효소활성은 대조치의 약 70%로 감소되어 EDTA의 억제작용을 알 수 있다. 그러나 A system에서는 그 효소활성은 대조치에 비하여 168%로 상당히 증가되었다. 이와같이 0.01mM EDTA 농도 의 영향은 조건 즉 작용여

Table 4. Effects of EDTA on the β -hydroxybutyric dehydrogenase activities of mitochondrial membrane under varying conditions.

Sample	No EDTA in sample and enzyme assay medium Unit ⁺	Sample containing 1mM EDTA added plus enzyme assay medium (0.01mM EDTA)* Unit ⁺	Sample plus enzyme assay medium containing 0.01mM EDTA added (0.01mM EDTA)* Unit ⁺
Intact mitochondrial fraction	12.2 (100%)**	20.5 (168%)	8.6 (70.9%)
Fragmented mitochondrial fraction	31.3 (256%)	21.4 (175%)	21.7 (177%)

β -Hydroxybutyric dehydrogenase (β -HBD) activity was measured by starting the reaction with the addition of 0.02ml of mitochondrial suspension to 2ml of the enzyme assay system as described in Methods.

⁺Each enzyme activity is expressed as μ moles of NADH reduced from NAD per hour per mg protein, one μ mole corresponding to one unit.

*Final concentration of EDTA.

**Enzyme activity of intact mitochondrial sampe without EDTA is assumed 100% as referencee.

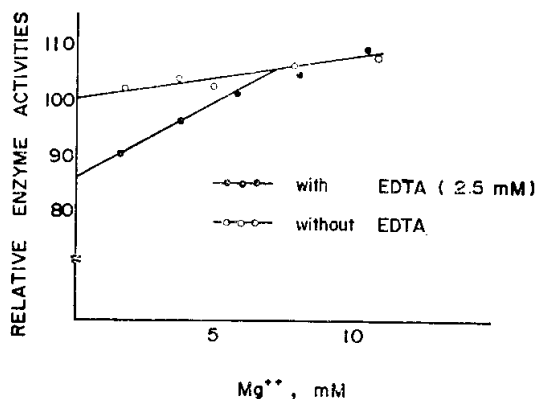


Fig. 3. Effect of Mg^{++} on the 5'-nucleotidase activity of plasma membrane in the presence and absence of EDTA.

The enzyme activity was 6.67 μ mole of Pi released per hour per mg protein. Relative enzyme activities were expressed as % of the enzyme activity measured in the absene of Mg^{++} and EDTA

건(시간)에 따라 큰 차이가 있음을 알 수 있다.

한편 mitochondria를 sonication으로 파쇄한 fragmented mitochondria를 사용하여 전자 즉 온전한 것과 똑같은 조건으로 실험한 결과 EDTA를 가하지 않은 분쇄한 mitochondria의 효소활성은 온전한 것의 대조치에 비하여 265%로 무려 2.5배나 항진되었다. 그러나 EDTA첨가로 A system이나 B system 구별없이 즉 EDTA첨가조건에 관계없이 효소활성이 EDTA를 가하지 않은 것에 비하여 거의 같이 30% 감소되었다.

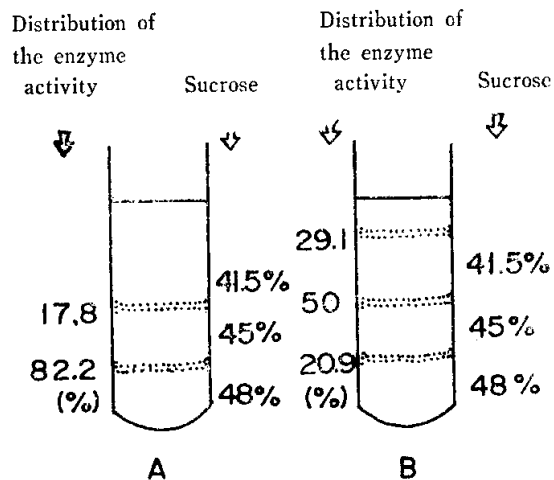
그러나 intact mitochondria의 대조치에 비하면 176%로 약 1.7배가 증가되었다. 이상과 같이 mitochondria

의 integrity가 파괴되면 그 효소활성은 크게 증가되지만 EDTA첨가로 역시 효소활성은 억제되었음을 알 수 있다. 그러나 intact mitochondria와 다르게 A system과 B system의 감소율이 거의 같은 것이 특이하다.

Fig. 4에서 보는바와 같이 crude mitochondria 부유액은 sucrose density gradient 원침으로 2층으로 분리되었으며 mitochondria의 marker enzyme인 β -HBD활성분포는 상층에서 17.8% 하층에서 82.2%였다. 그러나 EDTA완충액을 crude mitochondria부유액에 가해서 1mM이 되도록 한 후 이것을 같은 조건으로 sucrose density gradient로 원침분리한 결과 이번에는 3층으로 분리되었다.

효소활성의 분포를 보면 상층에서 29.1% 중층에서 50% 및 하층에서 20.9%였다.

Sucrose density의 45%~48% 경계층을 heavy mitochondria분획, 41.5%~45% 경계층 및 0.25M의 soluble fraction과 41.5%의 경계층을 합쳐 light mitochondria분획으로 본다면 EDTA처리로 mitochondria시료는 heavy mitochondria(intact)분획은 대조의 82.2%에 비하여 20.9%로 크게 감소된 반면 light mitochondria(ruptured)분획은 대조의 17.8%에 비하여 79.1%로 적



(In the absence of EDTA) (In the presence of 1mM EDTA)

Fig. 4. Diagrammatic representation of mitochondrial enzyme distribution after sucrose density gradient centrifugation of crude mitochondrial suspension with or without EDTA.

A represents the distribution of β -HBD activity in interfaces of sucrose density gradient.

B represents the distribution of β -HBD activity in interfaces of sucrose density gradient containing 1mM EDTA.

증하였다.

이와같이 EDTA처리로 mitochondria가 파괴되어 비층이 적은 ruptured mitochondria가 많이 생긴 것을 알 수 있다.

고 찰

Neville(1968)은 1mM bicarbonate를 사용하여 plasma membrane을 정제하는 방법을 처음 보고하였는데 이 방법이 아직도 많이 이용되고 있다. 그러나 이 방법에 쓰이는 완충액은 그 hypotonicity로 핵막의 파열을 초래하여 핵성분의 오염을 가져올 뿐만 아니라 plasma membrane의 구조상의 물리적인 변화를 초래할 가능성이 있기 때문에 isotonic buffer를 사용하여 plasma membrane을 정제하는 방법이 제안되었다.

Berman(1969)등은 isotonic sucrose 완충액을, Brown(1976)등은 isotonic KCl완충액을 각각 사용하였다. Plasma membrane은 homogenize하는 과정에서 cell ghost 또는 판막으로 얻어질 때는 1500×g에서 침전이 되기 때문에 세포내 다른 organelle로부터 비교적 쉽게 분리된다. 그러나 plasma membrane이 작은 vesicle형태로 얻어질 때는 endoplasmic reticulum과 함께 microsomal fraction에 나타난다.

그런데 세포를 homogenize하는 용액에 0.5mM의 Ca⁺⁺가 존재하면 plasma membrane은 대부분이 1500×g에서 침전된다(Ray, 1970). 그러나 Ca⁺⁺이 과량으로 존재할 때는 membrane fragment가 서로 응결되며 homogenize하더라도 확산되지 않으므로 원침분리가 불가능하다. 이러한 알칼리 금속이온의 효과도 chelating 물질인 EDTA존재하에서 조직 homogenate를 만들 때는 membrane의 응결현상이 억제되기 때문에 조직을 homogenize하는 용액에 1mM정도의 EDTA를 포함시키는 방법이 흔히 사용되고 있다(Stein et al., 1968; Avruch et al., 1971; Brotherus et al., 1977).

저자는 EDTA의 사용에 따르는 부작용을 검토하기 위하여 EDTA를 포함하지 않은 0.5mM Ca⁺⁺, 0.25M sucrose, 5mM Tris buffer(pH 7.4)를 사용하여 백서 간 조직에서 plasma membrane 및 mitochondria를 부분정제하였고 microsome을 분리하였다.

EDTA가 이들 membrane의 marker enzyme의 활성에 미치는 영향을 검토하기 위하여 membrane suspension에 EDTA를 가해서 1mM이 되도록 하거나 또는 효소 반응계에 EDTA를 직접 가해서 효소활성을 측정하였다.

Plasma membrane의 marker enzyme인 ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)—ATPase활성이 Mg^{++} —ATPase와 함께 측정되었기 때문에 EDTA효과를 이들 두 효소로 구분하여 말할 수는 없으나 이 두효소의 전체활성은 EDTA에 의하여 약간 증가되는 경향을 보였다(Table 3).

Endoplasmic reticulum의 marker enzyme인 glucose-6-phosphatase도 EDTA에 의하여 그 활성이 약간 증가되는 경향이 있다.

이들 효소활성의 약간의 증가는 응결된 membrane fragment가 EDTA에 의하여 잘 확산되어 표면적의 증가에 따른 것으로 해석된다.

한편 EDTA는 5'-nucleotidase를 경쟁적(competitive)으로 억제하기 때문에(Fig. 2), EDTA를 사용하여 plasma membrane을 정제할 때는 이 효소활성 측정에 주의할 필요가 있다. 그러나 이러한 문제는 Mg^{++} 첨가로 해결될 수 있다.

즉 Mg^{++} 은 EDTA와 chelate를 형성하여 EDTA효과를 억제하기 때문에 EDTA농도의 대략 3배에 해당하는 Mg^{++} 을 그 효소반응계에 가하기만 하면 된다(Fig.3). 일반적으로 phosphatase는 그 기질에 대하여 nonspecific하기 때문에 5'-AMP를 기질로 사용하여 5'-nucleotidase의 활성을 측정할 때 유리된 모든 인(磷)이 5'-nucleotidase에만 기인한 것으로 볼 수 없다.

5'-AMP는 nonspecific phosphatase에 의하여 분해될 수 있기 때문이다.

Ahmed(1968) 등은 nickel이온이 5'-nucleotidase만을 specific하게 억제하는 사실을 이용하여 순수한 5'-nucleotidase의 활성을 측정하는 방법을 개발하였다. 즉 효소반응계에 nickel이 존재할 때와 존재하지 않을 때의 효소활성을 측정하여 그 차를 구하면 이 값이 바로 5'-nucleotidase의 활성에 해당된다고 하였다.

그러나 nickel이온효과에 의문점이 있어 오늘날 이 방법은 별로 이용되지 않고 있다.

EDTA는 5'-nucleotidase만을 경쟁적으로 억제하기 때문에 높은 농도의 EDTA존재하에서는 5'-nucleotidase의 활성이 거의 완전히 억제될 수 있다. Fig. 1에서 보는바와 같이 100mM의 EDTA는 5'-nucleotidase활성을 80%이상 억제하였으나 200mM이상 되는 농도의 EDTA도 더 이상 억제효과를 나타내지 않았다.

이것으로 5'-nucleotidase는 거의 완전히 억제되었음을 알 수 있고 나머지 20%에 해당하는 효소활성은 다른 phosphatase에 기인한 것으로 볼 수 있다.

저자는 이러한 사실을 토대로 하여 순수한 5'-nucleotidase의 활성만을 측정하는 새로운 방법을 제안하는

바이다.

즉 5'-AMP를 기질로 하여 EDTA없이 시료의 효소활성을 측정하고 한편 시료에 100mM EDTA를 첨가한 것에 대하여 효소활성을 측정하여 이 두 값의 차를 구하면 이것은 5'-nucleotidase의 고유한 활성으로 볼 수 있다.

한편 여러조건하에서 mitochondria에 대한 EDTA효과를 관찰한 결과를 Table 4에 요약하여 표시하였다.

EDTA효과를 살피는데 있어 EDTA를 직접 mitochondria시료에 가하든지 또는 이것을 시료대신 효소반응액 속에만 포함시켰을 때 EDTA의 최종농도는 다같이 0.01mM로 조정하였다. 이것은 EDTA첨가조건에 따른 EDTA효과의 변화를 보기 위해서다.

Table 4에서 보는바와 같이 intact mitochondria의 β -hydroxybutyric dehydrogenase(β -HBD)활성을 대조(control)삼아 100%로 보았을 때 효소반응액속에 0.01mM의 EDTA함유로 이 시료의 활성은 대조에 비하여 약 70%로 감소되었다. 그러나 효소반응액 대신 mitochondria시료에 미리 1mM의 EDTA용액을 첨가하였을 때는 그 효소활성은 168%로, 대조에 비하여 오히려 상당히 향진되었다.

이때 두효소반응계의 EDTA최종농도는 다같이 0.01mM인데도 이와 같은 격차를 보여준다. 이러한 사실은 효소반응액의 osmolarity가 hypotonic하다는 사실을 고려에 넣어 다음과 같이 설명할 수 있다.

즉 Ca이온은 mitochondria막에 결합되어 막의 integrity에 중요한 역할을 하고 있다. EDTA를 mitochondria시료에 가하면 EDTA는 Ca^{++} 과 chelate를 만든다.

따라서 막구조가 변형되어 외부적인 인자 즉 효소반응액의 hypotonicity에 의하여 막은 아주 미세한 조각으로 파괴된다.

즉 mitochondria시료에 EDTA를 첨가함으로써 mitochondria 막은 파괴되는 고로 mitochondria조각의 총 표면적은 대조에 비하여 크게 증가되었을 것이다. 그러나 0.01mM EDTA를 함유한 효소반응액에서는 mitochondria는 EDTA의 접촉시간이 짧기 때문에 파괴는 되지만 그 정도가 약하여 ghost가 되거나 또는 커다란 조각으로 분해되어 mitochondria전체 표면적은 그리 증가하지 않는 것으로 생각된다. 이것은 EDTA에 의한 막구조의 변형은 어느정도 시간을 필요로 하는 과정으로 생각한다면 이때 mitochondria는 EDTA에 의하여 막구조의 변형을 받기전에 먼저 hypotonicity에 의하여 파괴됨으로 mitochondria전체 표면적은 대조의 그것과 거의 비슷하다고 볼 수 있다. EDTA는 원래 mitochon-

dria의 효소인 β -HBD활성을 억제하는 것이지만 EDTA는 간접적인 막분해작용으로 mitochondria막 표면적을 크게 증가시키는고로 결과적으로 그 효소억제작용을 증가하여 효소활성의 증가를 초래한 것으로 볼 수 있다. mitochondria시료가 효소반응액의 EDTA와 짧게 접촉하였을 때 mitochondria의 전체면적은 대조의 그것과 거의 다를 것이 없지만 EDTA존재로 그 효소활성은 대조보다 감소한 것으로 볼 수 있다. 그러나 mitochondria시료에 직접 EDTA를 넣어주면 EDTA와의 접촉시간이 길어지는고로 효소활성이 억제되더라도 mitochondria의 파괴로 그 표면적이 크게 증가되어 결국 효소활성은 대조에 비하여 크게 증가한 것으로 볼 수 있다. mitochondria표면적 증가에 따른 β -HBD활성의 증가는 다음과 같은 실험적 성격으로 확인되었다.

즉 intact mitochondria를 sonication으로 fragmented mitochondria를 조제하여 효소활성을 측정한 결과 이때의 효소활성은 대조의 intact mitochondria의 그것에 비하여 크게 항진되어 대략 2.5배나 증가하였다. (Table 4).

즉 분단된 mitochondria는 EDTA존재로 그 효소활성이 약 30%정도 감소되었다. 이것은 분단된 mitochondria가 EDTA효과로 막구조가 변형되었다 해도 그만큼 sonication으로 이미 파괴되었으므로 hypotonicity에 의한 변화를 더이상 입을 수 없게 되어 EDTA에 의한 효소억제작용만 나타난 것으로 볼 수 있다.

이와같은 사실은 intact mitochondria와는 전혀 달리 fragmented mitochondria에서는 EDTA를 시료에 먼저 첨가하든지 또는 효소반응액에만 가하든지 간에 거의 같은 정도로 감소된 사실로도 증명할수 있다. 그림 4에서 보는 것과 같이 EDTA에 의하여 변형된 mitochondria membrane은 외부적인 자극에 의하여 쉽게 깨질 수 있다는 사실을 알 수 있다. 즉 crude mitochondrial suspension은 sucrose density gradient 원침으로 대부분이 heavy mitochondria(intact mitochondria)로 얻어졌지만 1mM EDTA를 포함한 mitochondrial suspension은 동일한 조건하에서 대부분이 light mitochondria(ruptured mitochondria)로 얻어진 것으로 알 수 있다. 이와 같이 mitochondria시료의 β -HBD활성은 이 시료에다 EDTA를 첨가한 것의 그것과 비교하므로써 그 mitochondrial preparation의 integrity를 간단히 검증할 수 있다. 즉 mitochondria시료의 활성에 비하여 이것에 EDTA를 첨가한 것의 활성이 크면 클수록 intact mitochondria에 비하여 ruptured mitochondria가 적은, 다시 말하면 mitochondria 시료의

integrity가 높은 것을 시사하는 것으로 볼 수 있다. Mitochondria 시료에 있어 그 integrity순도를 확인하는 방법으로 전자현미경을 들 수 있다(Colbeau et al., 1971; Sottocasa et al., 1967).

전자현미경의 시설이 없는 곳에서도 위에 언급한 방법으로 쉽게 대략 가려낼 수 있다.

세포내 organelle을 분리할 때 조직을 homogenize하는 용액에 EDTA를 포함시키는 문제가 야기되었을 때 위의 모든 실험결과를 종합하여 보면 EDTA사용을 회피하는 것이 좋을 것으로 믿어진다.

요 약

EDTA가 membrane marker enzyme의 활성에 미치는 영향을 검토하기 위하여 백서간으로부터 plasma membrane과 mitochondria를 부분정제하였고 또 microsome를 분리하였다. 이상 각종 막성분시료에 직접 0.1M EDTA 완충액을 가하여 그 최종농도가 1mM이 되도록 하거나 또 그 효소반응액에만 EDTA 완충액을 직접 가하여 EDTA존재하에서 효소활성을 측정하였다. 그 결과를 요약하면 다음과 같다.

1. Plasma membrane분획과 mitochondria분획은 분별 원심분리와 sucrose density gradient원침으로 각각 10.6배와 8.1배로 정제되었다.

2. Plasma membrane의 ($Mg^{++}+Na^{+}+K^{+}$)-ATPase 활성과 microsome의 G-6-Pase활성은 EDTA에 의하여 약간 증가되는 경향을 보였다.

3. Plasma membrane의 5'-nucleotidase활성에 대한 EDTA의 영향을 동역학적으로 분석하였다.

즉 5'-nucleotidase의 K_m 값은 0.38mM이었고 5'-nucleotidase는 EDTA에 의하여 경쟁적으로 억제되었으며 EDTA농도가 0.1M 이상이 되면 효소의 활성은 더이상 감소하지 않았다.

4. 5'-Nucleotidase에 고유한 활성을 측정하는 새로운 방법을 제시하였다. 즉 5'-AMP를 기질로하여 0.1M EDTA존재하에 nonspecific phosphatase의 활성을 우선 측정하고 다음 EDTA없이 효소활성을 측정하여 이 두 값의 차를 구하면 순수한 5'-nucleotidase에 의한 활성치가 된다.

EDTA에 의하여 억제된 5'-nucleotidase의 활성은 EDTA농도의 대략 3배에 해당하는 Mg이온으로 회복되었다.

5. EDTA존재하에서 mitochondria의 β -hydroxybutyric dehydrogenase(β -HBD)활성을 바로 측정하면

EDTA로 그 활성은 억제되었다. 그러나 EDTA 작용시간이 길어지면 오히려 효소활성은 크게 항진되었다. 이러한 사실은 EDTA는 원래 β -HBD활성을 억제하는 것이지만 한편 EDTA는 막성분의 Ca이온과 chelate되어 간접적으로 mitochondria를 파괴시켜 그 표면적 증대에 의한 효소활성의 증가가 억제작용 이상으로 효과를 나타낸 것으로 설명할 수 있다.

이러한 추측은 sonicate한 fragmented mitochondria를 사용한 동일한 실험으로 확인되었다.

6. Mitochondria시료를 EDTA로 처리한 것과 처리하지 않은 것에 대하여 β -HBD활성을 측정 비교함으로써 mitochondria의 integrity정도를 쉽게 평가할 수 있는 새 방법을 제안하였다.

—ABSTRACT—

Effects of EDTA on the Activities of Marker Enzymes for Membranes from Rat Liver.

Yong Kil Lee and Han Woong Choi

Department of Pediatrics

Hong Keun Chung and Ki Yung Lee

Department of Biochemistry

College of Medicine, Seoul National University

For the examination of effects of EDTA on the activities of membrane marker enzymes, plasma membrane, mitochondria and microsomal membrane were partially purified from rat liver. 0.1M EDTA solution buffered with 5mM Tris (pH 7.4) was added to these subcellular particle suspensions to be 1mM or added directly to the enzyme assay system to survey the effects of EDTA on the enzyme activities under the varying conditions. The results obtained are as follows:

1. 5'-Nucleotidase and β -hydroxybutyric dehydrogenase were enriched 10.6-fold in the plasma membrane fraction and 8.1-fold in the mitochondrial fraction, respectively through differential centrifugation followed by discontinuous sucrose density gradient.

The activities of $(Mg^{++}+Na^{+}+K^{+})$ -ATPase and glucose-6-phosphatase were slightly elevated by the presence of 1mM EDTA in the enzyme preparations.

2. According to kinetic study, the apparent K_m for 5'-nucleotidase was 0.38mM and 5'-nucleotidase was

inhibited competitively by EDTA. The enzyme activity was suppressed up to around 80% in the presence of 0.1M EDTA, but no further inhibition was observed beyond this concentration, and thus the rest of 20% is supposedly caused by other nonspecific phosphatases.

3. A modified method was attempted to establish determination of 5'-nucleotidase, taking advantages of selective inhibition of this enzyme by EDTA. The activity of phosphatases other than this enzyme is measured in the presence of 0.1M EDTA and the enzyme assay is once repeated but in the absence of EDTA, thus the difference of above two assayed activities would be the proper activity of 5'-nucleotidase.

4. Despite β -hydroxybutyric dehydrogenase(β -HBD) was actually inhibited by the presence of 0.01mM EDTA in the enzyme assay system, this mitochondrial enzyme activity, however, increased considerably when it was measured with the mitochondrial preparation with 1mM EDTA which was diluted to 0.01mM in the enzyme assay system. This apparent contradiction can be explained on the following assumption.

The mitochondrial membrane structure is impaired by EDTA through the chelation of Ca^{++} bound to membrane, rendering them vulnerable to the hypotonicity of enzyme assay medium, which results in the ruptured structures of mitochondrial membrane, offering much enhanced surface area with exposed enzyme. The resulting increased enzyme activity could well cover its inhibition. This presumption was proved by appropriate experimental design using intact mitochondria and fragmented one by sonication.

5. The ratio of intact mitochondria to ruptured one in mitochondrial preparation could be easily measured by the increase in β -HBD activity in the presence of 1mM EDTA, as compared with that of the sample without EDTA.

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.* 233:331, 1971.
- Berman, H.M., Gram, W. and Spirtes, M.A.: *An improved, reproducible method of preparing rat liver plasma cell membranes in buffered isotonic sucrose. Biochim. Biophys. Acta.* 183:10, 1969.
- Brotherus, J. and Renkonen, O.: *Phospholipids of subcellular organelles isolated from cultured BHK cells. Biochim. Biophys. Acta.* 486:243, 1977.
- Brown, A.E., Lok, M.P. and Elovson, J.: *Improved method for the isolation of rat liver plasma membrane.*
- 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.
- Colbeau, A., Nachbaur, J. and Vignais P.M.: *Enzymic characterization and lipid composition of rat liver subcellular membranes. Biochim. Biophys. Acta.* 249:462, 1971.
- Fiske, C.H. and SubbaRow, Y.: *J. Biol. Chem.*, 66:375, 1925.
- Grinna, L.S. and Barber, A.A.: *Age-related changes in membrane lipid content and enzyme activities. Biochim. Biophys. Acta.* 288:347, 1972.
- Kamataki, T. and Kitagawa, H.: *Effects of lipid peroxidation on activities of drug-metabolizing enzymes in liver microsomes of rats. Biochem. pharmac.*, 22:3199, 1973.
- Lehninger, A.L., Sudduth, H.C. and Wise, J.B.: *D-β-Hydroxybutyric dehydrogenase of mitochondria. J. Biol. Chem.*, 235:2450, 1960.
- 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 Membrane, Chapman and Hall press p.55-72.*
- Maisterrena, B., Comte, J. and Gautheron, D.C.: *Purification of pig heart mitochondrial membranes. Enzymatic and morphological characterizations as compared to microsomes. Biochim. Biophys. Acta.* 367:115, 1974.
- Neville, D.M. JR.: *Isolation of an organ specific protein antigen from cell surface membrane of rat liver. Biochim. Biophys. Acta.* 154:540, 1968.
- Rag, T.K.: *A modified method for the isolation of the plasma membrane from rat liver. Biochim. Biophys. Acta.* 196:1, 1970.
- Segal, H.L. and Brenner, B.M.: *5'-Nucleotidase of rat liver microsomes. J. Biol. Chem.*, 235:471, 1960.
- Sottocasa, G.L., Kuylenstierna, B., Ernster, L. and Bergstrand, A.: *An electron-transport system associated with the outer membrane of liver mitochondria. J. Cell Biol.*, 32:415, 1967.
- Stein, Y., Widnell, C and Stein, O.: *Acylation of lysophosphatides by plasma membrane reactions of rat liver. J. Cell Biol.*, 39:185, 1968.
- Swanson, M.A.: *Glucose-6-phosphatase from liver. in Method in Enzymology Ed. by S.P. Colowick and N.O. Kaplan, Academic Press, Vol. 2, p.541, 1955.*
- Wilson, M.J. and Villet, C.A.: *Preparation of prostatic plasma membranes. Distribution of (Na⁺+K⁺)-ATPase and Mg⁺⁺-ATPase in the rat ventral prostate., 394:1, 1975.*