

Guanine Deaminase의 Isoenzyme 染色 定量 및 代謝調節機轉에 관한 研究

A Study on Staining, Determination and Regulatory Mechanism of Guanine Deaminase

서울大學校 醫科大學

* 生化學教室, ** 精神科學教室

金昇元* · 李符永** · 鄭弘根*

Guanine deaminase(Guanine aminohydrolase; E.C. 3.5.4.3)는 발견된지 근 50년이 되지만(Schmidt, 1932) 아직 그 特性, 代謝調節機轉등이 不分明하며, 그 精製 또한 結晶化에 이르지 못하고 있다. 비록 여러 種의 生物들의 각 組織에서 GDA活性이 檢索되어 왔다고는하나, 現今까지 알려진 이효소의 特性은 극히 粗雜하게 部分精製된 試料로써 알아낸 것에 不遇하다.

즉, 세균(Rakosky, 1955), 효모(Roush, 1954), 어류(Roy, 1966), 포유동물(Kumar et al., 1965, 1972; Currie et al., 1967)등에서 GDA活性이 檢索되어, 種特異의 特性差가 상당함을 보여주고 있으며, 같은 赤血球라할지라도 개, 토끼, 사람의 赤血球에서는 GDA活性이 전혀 검출되지 않은 반면, 마우스, 흰쥐, 햄스티등의 赤血球는 상당히 높은 活性을 보여 주고 있으며 같은 포유동물도 조직에 따른 차이, 즉 肝, 腦組織에서는 비교적 GDA活性이 높으며, 다른 조직에서는 活性이 극히 미미하다고 보고되었다. 따라서 이러한 GDA活性의 組織特異性은 組織疾患의 鑑別診斷에 이용되는 방법이 제안되기도 하였다(Han, 1971).

GDA는 또한 purine 異化代謝의 終末단계로서 guanine을 脫amino化 하여 xanthine으로 전환시킴으로써 xanthine이 xanthine oxidase에 의해 尿酸으로 代謝되어 體外로 排出되도록 작용한다. 물론 guanine은 그 일부가 salvage pathway를 통해 nucleotide의 再合成에 利用되기도 하지만, 일단 xanthine으로 轉換되면 일종의 一方回路를 형성하여 체외로 배출되는게 通例이다. 따라서 核酸代謝가 旺盛한 조직에서, 이러한 단계를 조절하는 GDA의 活性이 높으리라 예상되어 온

것이며, 癌과 같은 질환에서 GDA가 관심을 모으고 있는 실정이다(Currie et al., 1967).

그러나 전술한 바와같이 아직 GDA의 精製率을 크게 높이지 못한 실정이며 그 測定方法마저도 여러가지 短點들이 있어서, 본교실에서는 그동안 GDA의 精製率을 높이고 測定方法을 改善코져 여러가지 努力을 기울려 온 결과(Park & Kimm, 1976; Kimm, 1976), polyacrylamide gel電氣泳動法을 이용하고 GDA反應에 xanthine oxidase를 couple함으로써 formazan반응을 일으킬 수 있는 방법을 개발, 이러한 새로운 술식을 이용함으로써, 지금까지 밝혀지지 않았던 새로운 GDA의 isoenzyme의 電氣泳動像을 발견하였으며, 이들 각 isoenzyme分劃들의 生化學的 特性을 검토하여 보았고 또한 이렇게 부분정제된 GDA에 대한 각종 대사산물들의 영향을 관찰했기에 보고하는 바이다.

實驗方法

1. 實驗材料

서울의대 동물실에서 飼育한 체중 200~250g의 Sprague-Dawley種의 흰쥐를 암수 구별없이 사용하였다. Guanine, xanthine, hypoxanthine, nitro blue tetrazolium(NBT), phenazine methosulfate(PMS), tetramethylethylene diamine(Temed), xanthine oxidase(XO), guanosine-5'-monophosphate(GMP), guanosine-5'-diphosphate(GDP), guanosine triphosphate(GTP)등은 Sigma (St. Louis, Mo., U.S.A.) 會社製품을 tris-(hydroxymethyl)aminomethane(Tris), acrylamide 및 N,N-methylene-bis-acrylamide는 Merck(Darmstadt, Germany) 會社製品, 그외의 시

* 本研究의 경비의 일부는 1978年度 文敎部 學術 研究 造成費로써 충당하였음.

약은 Kanto(Tokyo, Japan)會社製品을 사용하였다.

2. 肝 homogenate 製造法

腔動脈을 切斷하여 회생시킨 흰쥐에서 즉시 肝을 적출하여 냉각된 0.25M sucrose 용액에 넣어 얇은 절편을 만든 다음 Potter-Elvehjem homogenizer에 옮겨 이를 잘 磨碎 한 후 20%(w/v) homogenate를 만들었다.

3. Guanine deaminase의 部分精製法

위와같이 얻어진 흰쥐 肝 homogenate를 105,000×g로 1시간동안 4°C에서 遠心分離하였고 이때 생성된 침전은 버리고 그 上清液만을 취하였다.

a) Ammonium sulfate에 의한 鹽析

위 上清液에 ammonium sulfate를 가하여 50%로飽和토록 한 후에 10,000×g로 20분간 원심분리하였다. 여기서 얻은 沈澱物은 역시 버리고 그 上清液에 다시 ammonium sulfate를 가하여 80%포화를 이루도록한 후에 10,000×g로 20분간 원심분리하였다. 여기서는 上清液을 버리고 그 沈澱物만을 취하여 最小量의 0.02 M phosphate 완충액(pH 7.2)에 용해하여 GDA의 鹽析된 分劃을 얻었다.

b) 透析

이와같이 鹽析된 分劃을 0.02M phosphate 완충액(pH 7.2)에 30時間동안 透析한 후에 이를 다시 10,000×g로 20分間 遠心分離하여 그 上清液을 GDA의 透析分劃으로 삼았다.

c) DEAE-cellulose column chromatography

0.05M NaCl를 함유하는 0.02M phosphate 완충액(pH 7.2)으로 平衡에 이르게 처리한 DEAE-cellulose의 column(1.5cm×30cm)에 위에서 준비된 透析分劃을 負荷하고 다음과 같은 density gradient를 이용하여 溶出하였다. 즉 0.05M NaCl을 함유하는 0.02M phosphate 완충액(pH 7.2) 500ml와 0.35M NaCl을 함유하는 0.02M phosphate 완충액(pH 7.2) 500ml로 NaCl density의 gradient를 만들었으며 이로써 溶出된 용액은 12ml식의 分劃으로 나누어 採取하였다. 각 分劃에 대하여 GDA의 活性및 蛋白質을 측정하였으며 제4,5 및 6번 分劃을 합하여 A分劃으로 삼았고 제10,11 및 12번 分劃을 합하여 B分劃으로 삼았으며, 제26,27,28,29 및 30번 分劃을 합하여 C分劃으로 삼은 것이다.

4. 蛋白質 定量法

위의 chromatography에서 얻은 모든 分劃에 대하여 280nm에서의 紫外線吸光度를 측정하였고 GDA의 比活性을 구하려는 分劃에 대하여서는 미리 Kjeldahlometry로 蛋白質含量을 측정해둔 牛血清 albumin을 標準

溶液으로 삼고 Lowry法(1951)에 따라 蛋白質을 定量하였다.

5. GDA의 活性測定法

GDA의 活性測定은 guanine이 xanthine으로 轉換함에 따른 吸光度의 減少를 측정함을 原理로하여 다음과 같이 시행하였다.

이 효소 活性測定系는 대략 Kumar 등(1965)의 方法에 따라 Tris 150 μmole(pH 8.0), guanine 1.5 μmole 및 효소 活性의 多少에 따라 0.1ml내지 0.5ml의 試料의 造成으로서 終末總容量이 2ml가 되도록하였다. 효소 반응은 guanine을 가함으로써 시작시켰고 효소 活性의 多少에 따라 30°C에서 10분내지 60분간 incubate한 후에 10%(w/v) HClO₄ 1ml를 가하여 효소反應을 정지시켰다. 이 용액을 遠心分離하여 그 上清液을 증류수로 20배 희석한 후 245nm에서의 吸光度를 측정하였다. 이때 pH는 대략 1~2가 되었다.

한편 對照系는 효소 活性測定系와 造成은 같으나 10% perchloric acid를 먼저가하여 효소를 變性시킨 후에 guanine을 가한점이 달랐다.

對照系에 대한 活性測定系의 吸光度減少를 구하고

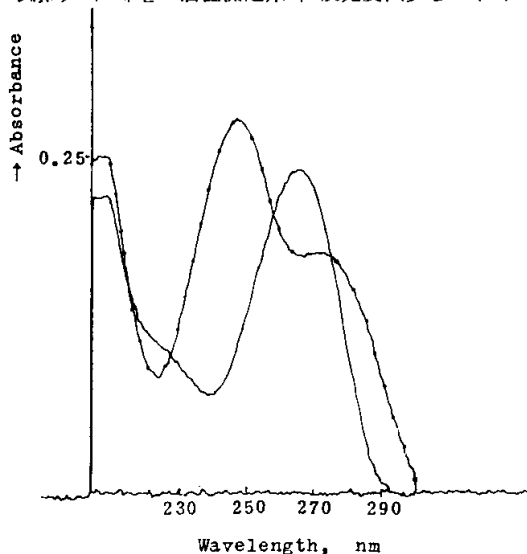


Fig. 1. Scanning profile of guanine (25μM) and xanthine (25μM) at pH 1~2 over the wavelength range from 210 nm to 300 nm respectively.

Guanine (·—·) and xanthine (—) were prepared respectively in the perchloric acid solution, the concentration of which was equivalent to that of the diluted enzyme assay system for the measurement of UV-absorbance. Each preparation was scanned on the same chart paper.

제 1 도에서 구한 guanine과 xanthine의 molar extinction coefficient의 차이(7.2×10^8 at 245nm)를 이용하여 xanthine으로轉換된 guanine의 mole수를 계산하였다. 前述하였듯이 효소活性測定系の 造成은 對照系の 造成과 같으나 UV-spectrophotometer(Pye Unicam Co., England)의 恒溫 cell housing(30°C)에서 incubate하면서 시간에 따른 吸光度의 減少를 pH 8.0에서 직접 측정하였다. 이 方法에서 10mm cuvette를 사용하면 活性測定系の 吸光度가 spectrophotometer의 측정범위(2.0)를 넘으므로 1mm microcuvette를 사용함으로써 吸光度의 측정이 가능하게 되었다. 그러나 효소의 Km值를 구하기 위하여 낮은 농도의 guanine을 사용할 경우에는 10mm의 cuvette를 사용하였다. 한편 제 2 도에서 보는 바와 같이 같은 농도의 guanine(50 μ M)과 xanthine(50 μ M)을 pH 8.0에서 scan하여 각각의 molar extinction coefficient를 구하였던 바 그係數의 차이는 250nm에서 가장 커서 3.62가 되었다. 이를 이용하여 guanine이 xanthine으로轉換된 mole數를 계산하였다.

효소활성의 단위는 1분간에 1 μ mole의 guanine을

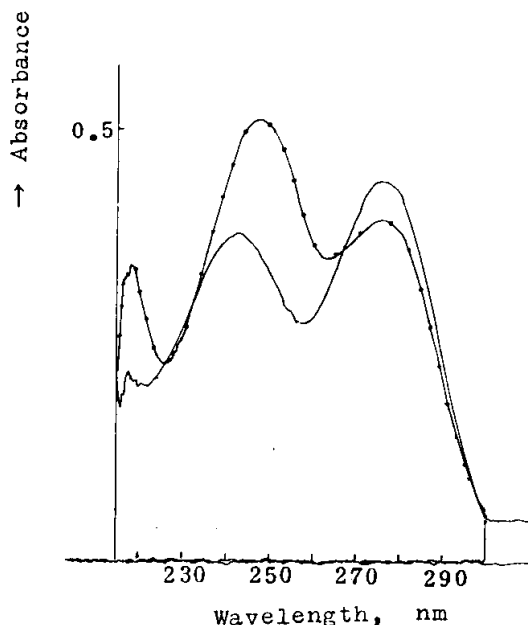


Fig. 2. Scanning profile of guanine (50 μ M) and xanthine (50 μ M) at pH 8.0 over the wavelength range from 210 nm to 300 nm respectively. Guanine(---) and Xanthine(—) were prepared respectively in 0.15M Tris buffer, pH 8.0, which were scanned on the same chart paper.

xanthine으로轉換시키는데 필요한 효소환성을 1 unit 로 定義하였다.

6. Acrylamide gel 電氣泳動法 및 GDA染色法

Acrylamide gel 電氣泳動은 Smith(1968)방법에 따라 시행하였다. 管的 크기는 7.5cm \times 0.5cm(I.D.)였고 gel은 7.5% acrylamide와 0.2% bisacrylamide로 만들었으며 시료 gel 및 spacer gel은 생략하였다. 효소試料용액과 標示染色劑인 0.5% bromphenol blue를 含有하는 40% sucrose용액은 2:1의 容量比로 혼합한후 試料의 효환성의 多少에 따라 10 μ l~50 μ l의 試料를 gel위에 負荷하고 이어서 電極에 걸었다. 電氣泳動 초기 즉 染料가 gel에 들어가기전까지는 每管當 2mA의 電流를 통했지만 염료가 gel에 들어가자 곧 5 mA의 電流를 흐르게 하였고 염료가 gel 끝으로 빠져나간후 10분까지 이런 상태를 지속하였다.

電氣流動이 끝난 다음 isozyme을 染色은 xanthine oxidase를 couple하여 formazan反應을 이용하여 NBT를 환원시켜 呈色케 했다.

즉 GDA는 그자체가 flavoprotein의 일종인 xanthine oxidase와 연쇄적으로 反應하여 尿酸을 生成하는 바, 이때 PMS를 매개로하여 NBT를 환원呈色하는 formazan反應을 일으키는 것을 원리로 삼았다. 즉 위와 같은 반응을 토대로하여 다음과 같은 造成으로 GDA 染色溶液을 만들었다.

3.0mM guanine	0.5ml
0.1M Tris buffer, pH 8.0	2.0ml
400mg NBT/100ml	0.3ml
50mg PMS/100ml	0.1ml
1.0 unit xanthine oxidase/ml	0.1ml

總 量 3.0ml

GDA를 染色하기 위하여 電氣泳動이 끝난후 가느다란 철침을 이용하여 gel을 gel管에서 빼내어 7mm(내경) \times 10cm管에 옮기고 GDA 염색용액을 gel이 완전히 잠기도록 가한후 이를 30°C에서 5시간 incubate하여 呈色케 하였다.

實驗 結果

1. GDA活性測定

제 1 도에서 보듯이 pH 1~2에서의 guanine과 xanthine의 吸光度 차이는 245nm에서 가장커서 그 molar extinction coefficient는 7.20×10^8 이었다. Kumar(1965) 등의 방법으로 GDA의 活性를 측정할때는 이 係數를 이용하여 guanine이 xanthine으로轉換된 μ mole수를

제산하여 GDA의 활성을 표시하였다.

한편 제 2도에서 보는 바와같이 pH 8.0에서의 guanine과 xanthine의 吸光度 차이는 250nm에서 가장 커서 molar extinction coefficient 차이는 3.62×10^3 임을 보여주고 있음으로 이의 차이를 이용하여 guanine이 xanthine으로 轉換된 $1 \mu\text{mole}$ 을 계산함으로써 GDA의 활성 1 unit로 삼은 것이다.

2. 흰쥐 肝 GDA의 部分精製 및 polyacrylamide gel 電気泳動을 이용한 isoenzyme의 染色

흰쥐 肝조직의 homogenate중 세포질의 溶解性分劃을 ammonium sulfate로써 포화되 50%에서 80% 포화分劃의 단백질을 鹽折하여 이를 다시 透折해서 DEAE-cellulose column chromatography를 이용, NaCl의 concentration gradient로써 分離한 GDA를 部分精製한 결과는 제 1표 및 제 3도와 같다. 또한 GDA活性을 polyacrylamide gel bed상에서 xanthine oxidase와 couple 하여 formazan反應으로써 染色한 결과는 제 4도와 같다. 즉 肝 homogenate에서는 GDA isoenzyme pattern이 3개의 band로 나타났다. 제 1 band는 명확하였지만, 제 2, 제 3 band는 약간 광범위하고 흐릿하였다. 이 homogenate를 ammonium sulfate로 염색한 分劃에서는 여러개의 band로 重疊되어 染色되었으며, 다음 DEAE-cellulose column chromatography에 의하여

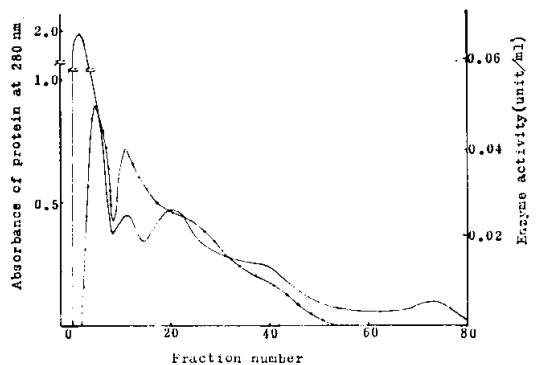


Fig. 3. Elution pattern from a DEAE-cellulose column of rat liver 105,000xg supernatant guanine deaminase.

The column (1.5cm x 30cm) was eluted with sodium chloride concentration gradient which was formed by mixing 500ml of 0.02M phosphate buffer, pH 7.2 containing 0.05M NaCl with 500ml of 0.02M phosphate buffer, pH 7.2 containing 0.35M NaCl.

— : Absorbance of protein at 280nm of each fraction (12ml)
 - - - : Guanine deaminase activity of each fraction (12ml)

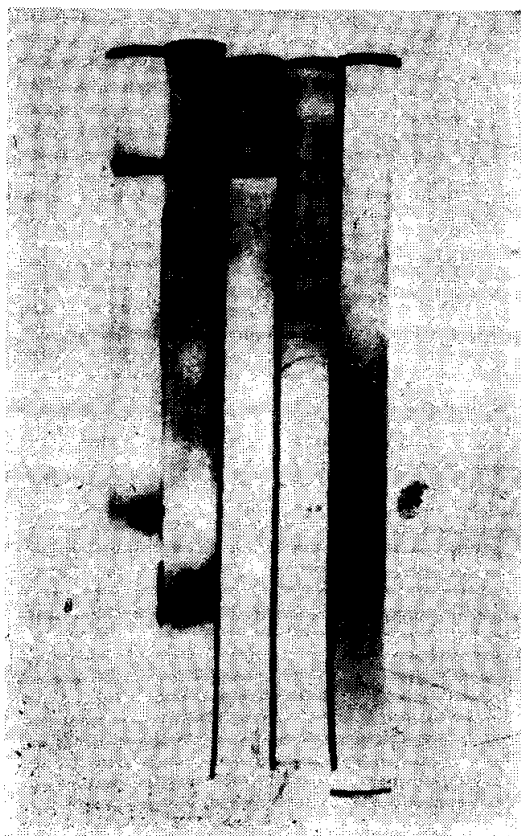


Fig. 4. Polyacrylamide gel electropherogram of guanine deaminase isoenzymes of rat liver

- a: 105,000xg supernatant
- b: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -salting-outed (50~80%) fraction
- c: Fraction A from the DEAE-cellulose column
- b: Fraction B from the DEAE-cellulose column
- e: Fraction C from the DEAE-cellulose column

After dialysis, all samples were subjected to electrophoresis.

나누어진 A,B,C分劃을 각각 별도로 polyacrylamide gel electrophoresis한 결과 移動속도는 C,B,A 分劃의 순서였으며, 이들은 homogenate를 gel electrophoresis시행했을 때의 A,B,C 分劃과 비교적 일치되었으며, B,C 分劃은 마찬가지로 광범위하고 명료하지 않은 상태였다.

따라서 저자들은 肝 GDA를 DEAE-cellulose column chromatography와 polyacrylamide gel electrophoresis의 결과로 그 isoenzyme이 3개의 分劃으로 나누어짐을 규명하고 각 分劃의 동력학적 특성을 검토하였다.

Table 1. Partial purification of guanine deaminase from rat liver

Purification Step	Volume (ml)	Total activity (unit)	Total protein (mg)	Specific activity (unit/mg of protein)	Recovery (%)	Purification
Supernatant of 20% homogenate (105,000×g for 1 hour)	62.5	20.7	1150	0.0180	100	1.00
50~80% saturated (NH ₄) ₂ SO ₄ -precipitates	8.20	16.5	388	0.0425	80.1	2.36
Dialyzed, centrifuged supernatant	15.0	15.6	364	0.0429	75.3	2.38
DEAE-cellulose column chromatography:						
Fraction A	36	1.50	38.7	0.0387	7.2	2.15
Fraction B	36	1.38	14.4	0.0958	6.7	5.32
Fraction C	60	1.22	17.3	0.0705	5.9	3.92

본 실험에서는 肝 GDA部分精劑과정에서 GDA 回收率이 매우 저조하였다. 즉 GDA의 回收率は homogenate의 ammonium sulfate(50~80%)염색으로 80.1%, 투석후 75.3%였으나 DEAE-cellulose column chromatography후에는 分割 A, 7.2%, 分割 B, 6.7%, 分割 C, 5.9%였다. 한편 精製率は GDA의 比活性으로 비교하여본 DEAE-cellulose column chromatography 후라도, ammonium sulfate염색시보다 精製도가 별로 증가되지 않은, 分割 A 2.15배, 分割 B 5.32배, 分割 C 3.92배였다.

3. 원위 肝GDA 각 分割의 動力學的 特性

NaCl concentration gradient로 DEAE-cellulose column chromatography에서 얻은 分割中 첫번째 GDA 分割(分割 A)의 基質농도對 反應速度 曲線은 제5(a)도이며 이를 Hill plot로 轉換하여 제5(b)도를 얻었다. 여기서 구한 apparent Km 값은 18μM이었다. 두번째 GDA 分割(分割 B)의 基質농도對 反應速度 관계는 제6(a)도에 圖示하였으며 Lineweaver-Burk plot로 轉換하여 제6(b)를 얻었다. 세번째 GDA 分割에서는 分割 B에서와 마찬가지로 제7(a)도와 제7(b)도를 얻었다.

이러한 分割 A,B,C의 動力學的 特性을 검토하여 보면 分割 A는 基質농도에 대하여 sigmoidal curve의 反應速度를 나타내어 이 GDA 分割이 allosteric한 特性을 가지고 있음을 보여 주고 있다. 한편 分割 B와 分割 C의 基質농도對 反應速度관계는 兩者 共히 hyperbolic 하였으며 Lineweaver-Burk plot에 의한 Km値는 分割 B가 22μM, 分割 C가 12μM이었다.

4. 代謝調節機轉에 미치는 GDA의 影響

著者등의 GDA가 代謝調節機轉에 미치는 影響을 검토해 보고자 우선 GDA의 終產物인 xanthine과 NH₃, hypoxanthine 그리고 원위 purine 代謝의 終產物인

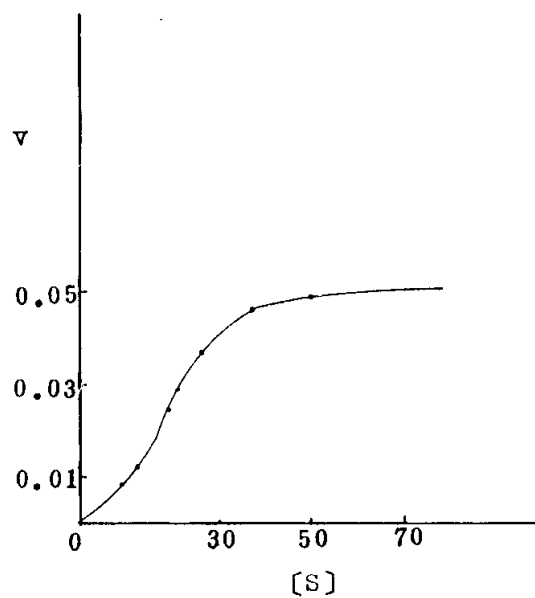
allantoin을, 그외에 guanine nucleotide인 GMP, GDP, GTP를 각각 0.1mM까지의 농도로 GDA 활성 측정계에 첨가하여 보았지만 GDA의 活性에 미치는 影響을 관찰할 수 없었다.

考 察

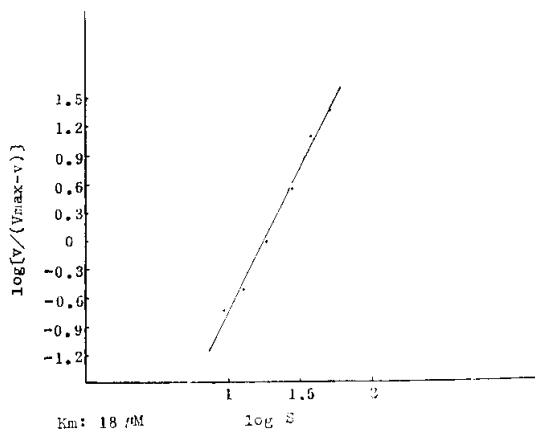
Purine catabolism의 代謝效率는 核酸代謝를 조절하는 큰 要因의 하나이며, 특히 GDA는 guanine을 脫아미노基시켜 xanthine으로 不可逆的으로 轉換시킴으로서, purine代謝에 있어서 이른바 “point of no return” 적진의 反應을 觸媒하여, 세포질내에서 guanine이 salvage pathway로 들어가는 phosphoribosyl transferase와 guanine에 대하여 결합하는 중요한 효소이다.

그러나 아직까지도 GDA 活性의 측정방법마저도 普通化되지 못하였을 뿐만 아니라, 효소의 精製率마저 純도가 높지 못하여, 그 生化學的 特性이 명확하게 알려지지 있지 않다. Kalckar(1947)나 Roush & Norris(1950)의 spectrophotometry에 의한 基礎的 연구와 Hue & Free(1965)와 Knight(1965)의 방법이나 Berthelot 反應을 이용한 比色法(Lee, 1969)으로 일상적인 연구가 진행되어 왔다.

특히 조직내 GDA의 isoenzyme pattern은 커다란 關心의 對象이었으며, 저자등(Park & Kimm, 1976; Kimm, 1976)은 이러한 GDA의 isoenzyme pattern을 可視化하고자 xanthine oxidase를 coupling시켜 formazan을 形成함으로써 GDA를 呈色하는 方法을 開發하였고, 실제로 polyacrylamide gel bed상에서 GDA isoenzyme분획을 可視化하였다. 본실험에서의 formazan반응에 의한 GDA isoenzyme pattern은 gel bed 상에서 명확한 경계를 짓지 않고 있으나 이들 분



(a)



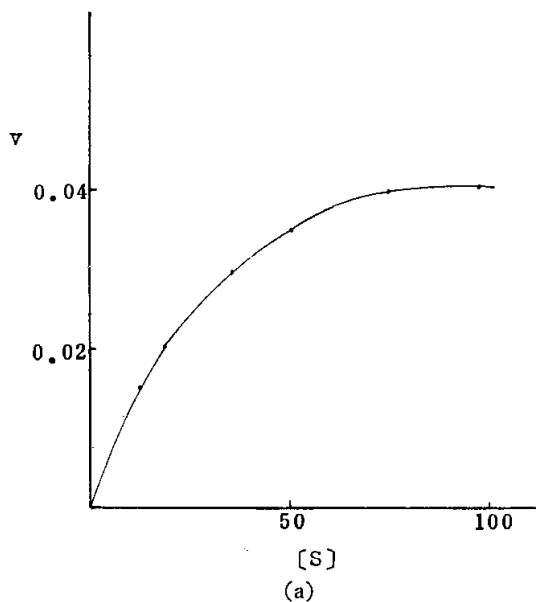
(b)

Fig. 5. Substrate concentration-reaction velocity relationship of Fraction A of rat liver guanine deaminase.

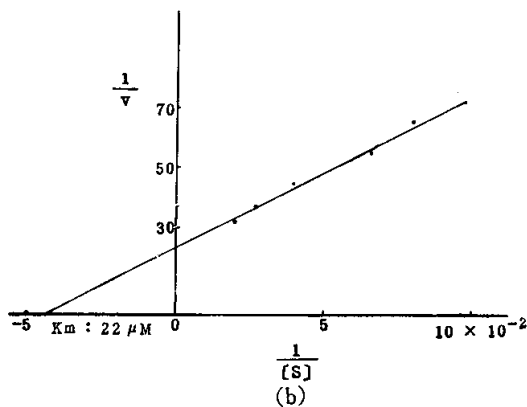
(a): Substrate concentration versus reaction velocity plot

(b): Hill plot

Fraction A was the first peak of guanine deaminase activity eluted from the DEAE-cellulose column. Substrate(S) was expressed as the concentration of guanine in μ mole and the velocity(V) was expressed as the absorbance decrease of guanine at pH 8.0 at 250 nm per 10 min.



(a)



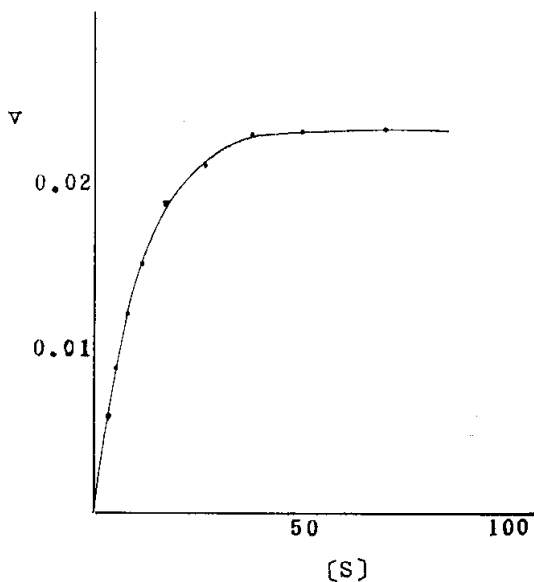
(b)

Fig. 6. Substrate concentration-reaction velocity relationship of Fraction B of rat liver guanine deaminase

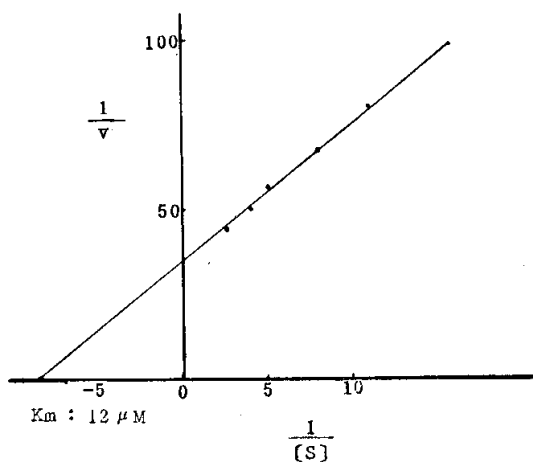
(a): Substrate concentration versus reaction velocity plot

(b): Lineweaver-Burk plot.

Fraction B was the second peak of guanine deaminase activity eluted from the DEAE-cellulose column. Substrate(S) was expressed as the concentration of guanine in μ mole and the velocity (V) was expressed as the absorbance decrease of guanine at pH 8.0 at 250 nm per 10 min.



(a)



(b)

Fig. 7. Substrate concentration-reaction velocity relationship of Fraction C of rat liver guanine deaminase

(a): Substrate concentration versus reaction velocity plot.

(b): Lineweaver-Burk plot.

Fraction C was the pooled one of fraction number from 25 to 29, eluted from the DEAE-cellulose column. Substrate(S) was expressed as the concentration of guanine in μ mole and the velocity (V) was expressed as the absorbance decrease of guanine at pH 8.0 at 250 nm per 10 min.

劃이 DEAE-cellulose column chromatography에 의한 分割과 대략 일치한다는 사실로 흰쥐 肝 GDA는 最小限 3개의 分割으로 나누어진다는 것을 確認하였다.

또한 저자들의 실험에서 肝 GDA가 DEAE-cellulose column chromatography로 3개의 分割으로 구분된다는 사실은 Kumar등(1972)이 흰쥐 肝 조직에서 2개의 分割을 얻었다는 사실과 相反된다. 그러나 Fogle(1974)은 저자들과 類似하게 DEAE-cellulose column chromatography를 통해 3개의 分割을 얻었다고 보고하였다. 또한 Bieber(1975)는 토끼의 肝組織 GDA가 polyacrylamide gel 전기영동으로 4개의 isoenzyme band로 나누어진다고 주장하였으며 Lewis와 Glantz(1974)는 Sephadex gel filtration과 polyacrylamide gel electrophoresis를 이용하여 GDA가 isoenzyme이 없는 분자량 550,000 정도의 單一 peptide임을 주장하였다. 본 교실에서도 Kimm(1976)은 Xanthine oxidase를 coupling시키되, NBT 대신 INT(2-p-(iodophenyl)-3-nitrophenyl-5-phenyl tetrazolium)를 이용하여 polyacrylamide gel bed상에서 2개의 흰쥐 肝GDA의 isoenzyme을 染色하였음을 보고하였다. 이러한 GDA isoenzyme pattern에 대한 相異한 보고들은 본 실험의 결과에 비추어 볼때 GDA가 multimolecular 형태로 존재할 가능성을 시사하고 있으며 이는 Currie(1967)등의 견해와 일치하고 있다.

Kumar등(1972)은 DEAE-cellulose column chromatography로 두개의 isoenzyme을 보고하고 있는데 이중 enzyme A는 allosteric한 特性을 나타내어 본 실험의 分割A와 같은 성질을 보였으나 그 K_M 値는 $5.3\mu M$ 로 分割A의 K_M 値 $18\mu M$ 과 큰 差異를 나타내었다. 한편 본실험에서는 分割B와 C가 allosteric한 特性을 나타내지 않아 Kumar등의 enzyme B와 同一하였으며 이중 分割B는 K_M 値가 $22\mu M$ 로서 enzyme B의 $20\mu M$ 과 비슷하여 同一한 isoenzyme 分割일 가능성을 나타내고 있다.

GDA는 purine catabolism의 終段階에서 일종의 일 방회로를 형성하는데 기여하고 있으므로, purine nucleotide의 catabolic rate를 조절하는데 중요한 역할을 하고 있다. 물론 GDA의 基質인 guanine이 nucleotide로 再合成해 들어가거나(Abrams, 1951; Brown et al., 1949), GDA의 산물인 xanthine 역시 nucleic acid, 또는 nucleotide로 再合成되어 들어감이 보고되기도 하였다(Kelly et al., 1967; Pornales et al., 1965; Mager et al., 1967). 특히 free guanine이 salvage pathway로 들어가는데는 phosphoribosyl transferase

—ABSTRACT—

(Korn et al., 1955; Kornberg et al., 1955), 또는 nucleoside phosphorylase (Kalckar, 1947)에 의하여 진행되는데, 이들 효소들은 GDA와 더불어 세포내 guanine에 대하여 경합을 하게 되므로, GDA가 세포내 대사조절기전에 중요한 역할을 하리란점은 예상되어 왔다(Kumar et al., 1972).

따라서 저자들은 GDA의 대사조절기전에 미치는 영향을 검토해 보고자 우선 GDA반응의 종산물인 xanthine과 NH₃, hypoxanthine, 그리고 흰쥐 purine代謝의 종산물인 allantoin을, 또한 guanine nucleotide 들인 GMP, GDP, GTP를 각각 0.1mM까지의 농도로 GDA반응계에 첨가하여 보았지만 GDA의 活性에는 전혀 영향을 미치지 않았다. 특히 GTP가 GDA의 allosterism에 영향을 미친다는(Sitaramayya & Krishnan, 1970)보고와 相異하였다. 즉 본실험에서는 分劃 A는 基質농도에 대해 allosterism을 보여주고 있지만 각종 대사산물에 의해서는 영향을 받고 있지 않는 것으로 나타났다.

要 約

흰쥐 肝조직을 적출하여 homogenize 한다음, 105,000×g上清液을 ammonium sulfate로 포화도 50%에서 80%까지 염석한 다음, 투석한 뒤, DEAE-cellulose column chromatography에서 NaCl농도경사로 분획시킨 결과 3개의 isoenzyme분획을 얻었으며, 각 단계마다 polyacrylamide gel electrophoresis를 시행하여 xanthine oxidase를 coupling시키고 NBT를 formazan으로 전환시키는 술식을 이용하여 GDA活性을 분색시켜 可視化함으로 확인하였다.

이중 GDA A 분획은 基質농도에 대하여 allosteric한 특성을 보여 준 반면, B,C 분획은 non-allosteric하였으며, B,C, 분획은 K_M值가 각각 22μM, 12μM로 상이하였으며, polyacrylamide gel electrophoresis에서도 그 migration속도가 다른 효소들이었다. 그러나 이들의 효소반응계에 첨가하여본 hypoxanthine xanthine, NH₃, allantoin, GMP, GDT, GTP등은 0.1 mM농도에 이르도록 전혀 GDA活性에 영향을 미치지 않았다.

A Study on Staining, Determination and Regulatory Mechanism of Guanine Deaminase

Scung-Won Kimm*
Bou Yong Rhi**
Hong Keun Chung*

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

For preparation of the isoenzymic forms of guanine deaminase(GDA), the supernatant from rat liver homogenate was subjected to salting-out, followed by dialysis and DEAE-cellulose column chromatography. The fractions collected from the column were pooled into Fraction A, B and C according to the chromatographic elution pattern. To characterize the isoenzymic nature of each fraction, the enzyme kinetic properties were studied and the isoenzymes were visualized on the polyacrylamide gel after electrophoresis. The results obtained are summarized as follows:

1. GDA isoenzymes were stained by coupling with a flavoprotein, xanthine oxidase in the presence of an electron carrier, phenazine methosulfate and nitro blue tetrazolium which in turn is reduced to a water-insoluble dye, formazan.

2. Fraction A was the first-eluted peak of GDA activities from the DEAE-cellulose column and was separated into two major bands on the polyacrylamide gel after electrophoresis which showed slow migration through the gel. The slowest-moving band of Fraction A was not shown in the electropherogram of the 105,000×g supernatant. Fraction A showed a sigmoidal response to the substrate concentration of guanine and its apparent K_m value was 18μM.

3. Fraction B was the second-eluted peak from the column and was stained as a diffuse band on the electropherogram which showed intermediate migration through the gel. Fraction B revealed a

hyperbolic response to the substrate concentration of guanine and its apparent K_m value was $22\mu\text{M}$.

4. Fraction C was the lastly eluted fractions from the column and was separated into two diffuse bands on the gel which showed the most rapid migration through the gel. Fraction C revealed a hyperbolic response to the substrate concentration of guanine and its apparent K_m value was $12\mu\text{M}$.

5. All fractions were unaffected at 0.1mM concentration of xanthine, hypoxanthine, NH_3 , allantoin, GMP, GDP and GTP.

참 고 문 헌

- Abrams, R.: *Arch. Biochim. Biophys.*, **33**:436, 1951.
- Bieber, A.: *A sliced gel assay for some enzymes which utilize guanine as substrate. Anal. Biochem.*, **60**:206, 1974.
- Brown, G.B., Bendich, A., Roll, P.M. and Suguira, K.: *Proc. Soc. Europ. Biol. Med.*, **72**:501, 1949.
- Currie, R., Bergel, F. and Bray, R.C.: *Preparation and some properties of guanase from rat liver. Biochem J.*, **104**:634, 1967.
- Fogle, P.J.: *Purification and characterization of rabbit liver guanine aminohydrolase. Ph. D. thesis, Arizona State Univ. Microfilms. Ann. Arbor. Mich.*, 1974.
- Gribnau, A.M., Schoenmaker, J.G.G., Kraaikamp, M.V., Hilak, M. and Bloemendal, H.: *Further studies on the RNase inhibitor from rat liver; stability and other properties. Biochim. Biophys. Acta.*, **224**:55, 1970.
- Han, S.K. (1971): *A study on the guanine aminohydrolase activity in the serum and cerebrospinal fluid of liver and brain disease. Kor. Cent. J. Med.*, **21**:41, 1971.
- Hue, A.C. and Free, A.H.: *An improved method for the determination of guanase in serum or plasma. Clin. Chem.*, **11**:708, 1965.
- Kalckar, H.M.: *Differential spectrophotometry of purine compounds by means of specific enzymes. J. Biol. Chem.*, **197**:491, 1947.
- Kelly, W.N., Rosenbloom, F.M., Henderson, J.F. and Seegmiller, J.E.: *Biophys. Biochem. Res. Comm.*, **28**:340, 1967.
- Kimm, S.W.: *A staining method for guanine deaminase on the electrophoretic gel bed. Korean J. Biochem.*, **8**:45, 1976.
- Knight, E.M., Whitehouse, J.L., Hue, A.C. and Santos, C.V.: *Serum guanase determination: A liver function test. J. Lab. and Clin.*, **65**:355, 1965.
- Korn, E.D., Reny, C.N., Warilejko, H.C., and Buchanan J.M. *J. Biol. Chem.*, **217**:875, 1955.
- Kornberg, A., Lieberman, J., and Simms, E.C.: *J. Biol. Chem.*, **215**:389, 1955.
- Kumar, 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, S. and Krishnan, P.S.: *An allosteric and a nonallosteric guanine deaminase isoenzymes in rat liver supernatant. Biophys. Biochem. Res. Comm.*, **39**:1087, 1970.
- Kumar, S., Sitaramayya, A. and Krishnan, P.S.: *Guanine deaminase in rat liver and mouse liver and brain. Biochem. J.*, **128**:1079, 1972.
- Kumar, S., Tewari, K.K. and Krishnan, P.S.: *Guanine deaminase activity in rat brain and liver. Biochem J.*, **95**:797, 1965.
- Lee, S.R.: *Partial purification and molecular heterogeneity of guanine aminohydrolase from mouse liver and brain. Kor. Cent. J. Med.*, **17**:421, 1969.
- Lewis, A.S. and Glantz, M.D.: *Rabbit liver guanine deaminase; chemical, physical and kinetic properties. J. Biol. Chem.*, **249**:3862, 1974.
- 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.
- Mager, J., Hershko, A., Zeitlin-Beek, R., Shoshani, T., and Razin, A.: *Biochim. Biophys. Acta.*, **149**:50, 1967.
- Park, J.B. and Kimm, S.W.: *A New Colorimetric method for the determination of guanine aminohydrolase activity. Seoul J. Med.*, **17**:136, 1976.
- Pomales, R., Elion, G.P., and Hitchings, G.H.: *Biochim. Biophys. Acta.*, **95**:505, 1965.
- Rakosky, J. Jr. and Zimmerman-Beck, J.V.: *Guanine degradation by Clostridium aciduria. J. Bacteriol.*,

- 69: 566, 1955.
- Roth, J.S.: Possible function of intracellular ribonuclease. *Nature*, **174**:129, 1954.
- Roush,: Yeast adenase. *Arch. Biochem. Biophys.*, **50**: 510, 1954.
- Roy, J.E.: Lingcod muscle guanine deaminase. *Canad. J. Biochem.*, **44**:1093, 1966.
- Schmidt, G.: Enzymic breakdown of guanylic acid in the rabbit liver. *Z. physiol. Chem.*, **208**:185, 1932.
- 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.
- Sitaramayya, A., and Krishnan, P.S.: Allosterism in rat brain supernatant guanine deaminase. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **40**:565, 1970.
- Vogel, R., Trautschold, I., and Werle, E.: *Natural proteinase inhibitors*. Acad. Press. New York, 1968: *Transtion of naturliche Proteinase-Inhibitoren* (1966), G. Thieme, Stuttgart