

토끼 심장근육에서 부분정제한 H₄-LDH의 특성에 관한 연구

A Study on the Properties of H₄-LDH Partially Purified from the Cardiac Muscle of Rabbits

서울대학교 의과대학 생화학교실

朴 壽 勳 · 金 昇 元

序 論

生體反應의 必須不可缺의 要素인 酵素는 高分子蛋白質化合物로서 그 構造 및 性狀은 現今 分子生物學界의 主要한 關心對象이며, 이 分子의 究明을 위해 수 많은 試圖이 있어 온 바는 周知의 事實이다. 그 中 特히 lactic dehydrogenase (LDH, L-lactate: NAD⁺ oxidoreductase, E. C. 1. 1. 1. 27)는 比較의 널리 알려진 酵素로서 그 四次構造를 비롯해 많은 研究가 되어 있다.

特히 LDH는 電氣泳動으로 쉽게 區分될 수 있는 5種의 異型分子로 이루어졌고, 이들은 各各, 母體가 되는 2種의 polypeptide 亞單位가 있어 이들이 4개모여 하나의 polymer, 즉 hybrid-tetramer로서 存在한다는 事實은 이미 알려졌다. (Wieland et al, 1957)

이들은 各各 動物의 種 또는 組織에 따라 分布가 달라 特히 그 活性이 높은 組織의 呼稱을 따라, 心臟筋에 많은 型을 H-型(또는 A型), 骨格筋에 많은 型을 M-型(또는 B型)이라 부르고, 5種의 異型分子들을 그 成分比에 따라 LDH-1(H₄), LDH-2(H₃M₁), LDH-3(H₂M₂), LDH-4(H₁M₃) 및 LDH-5(M₄)라고 表記한다. (Cahn et al, 1962).

이러한 LDH의 isoenzymes의 構成比를 決定하는 要素는 아직 완전히 究明되지는 않았지만, 이들의 混成比率는 動物의 種 및 組織에 따라 特異性을 보여줄 뿐만 아니라 分化, 發育, 成長하는 과정에 따라서도 달라지며(Wieland et al, 1957; Withycombe et al, 1965; Clausen et al, 1968; Clausen et al, 1969; Wilson et al, 1964; Fine et al 1963), 또한 妊娠(Goldman et al, 1964; Pfeleiderer et al, 1961), 嫌氣性 環境(Güttler et al, 1967; Güttler et al, 1969), 炎症 및 癌 등의 病的狀態(Widy, 1967; Fountain, 1970; Criss, 1971) 등에 따라서도 달라진다.

또한 이들 H型和 M형을 各各 순수정제하여 發表한 여러 實驗結果들에 의하면, 이들은 化學의으로도 그 構成 아미노酸의 組成 및 fingerprint pattern이 매우 다르며(Fondy et al, 1964; Pesce et al, 1964; Kaplan, 1967) 特히 돼지의 心臟筋에서 정제한 H₄-LDH와 骨格筋에서 정제한 M₄-LDH를 比較 檢討하여 보면 各各 26個의 lysine과 約 9個의 arginine 그리고 4개의 SH基를 가졌다는 點등은 비슷하나, 餘他 아미노酸 特히 histidine含量 및 fingerprint 分析結果 C末端 아미노酸(Pfleiderer et al, 1970)等 蛋白質로서의 一次의 構造가 서로 判異하고, 아울러 免疫學的으로도 相異한 蛋白質임이 立證되고 있다(Rajewsky, 1966).

더욱 H와 M型 polypeptide의 化學的性狀도 여러가지로 比較하여 본 結果 서로 달라, H型은 pyruvate에 쉽게 抑制되고, M型은 抑制效果가 크지 못하며(鄭德載外, 1971), coenzyme analogue에 對한 態度(Cahn et al, 1962), 基質 또는 產物에 依한 抑制度 및 urea(Brody, 1973), oxalate(Plummer et al, 1963 a; Plummer et al, 1963 b)等 各種抑制劑에 依한 態度, 耐熱性 등에도 많은 差異가 있으며, 基質 analogue에 對한 選擇性에도 差異가 있다(Rosalki et al, 1960)고 보고 되었다. 더욱 이들 H型和 M型の polypeptide는 遺傳的으로도 다른 gene에 依해 支配되며(Shaw et al, 1963; Davidson, 1965; Syner et al, 1966), 이들의 試驗管內的 混成實驗을 하여 본 結果는 H₄와 M₄의 兩 tetramer를 各各 정제하여 NaCl 존재하에 phosphate buffer속에서 同量을 冷却凍結시킨 뒤, 다시 녹여 5種의 isoenzyme의 混成比를 보면 1:4:6:4:1로서 binomial 分布의 活性을 보였다(Markert et al, 1963; 禹榮男外, 1972). 이러한 混成實驗은 guanidine HCl이나 urea에 依해서도 일어난다고 보고되어 있다(Chilson et al, 1972; Epstein et al, 1964).

即 위와 같이 LDH의 亞單位 H型 및 M型 polypeptide가 化學的, 物理的 및 免疫學的으로 서로 다르면서도 試驗管內 混成實驗成績이 1:1로 相應함은 이 亞單位的 組成이 種 및 組織特異性뿐 아니라, 細胞環境의 各種變化에 따라 크게 달라진다는 事實과 더불어, 分明 그 組成의 比를 決定하는 要素因子가 있음이 推測되며 이들을 이해함이 LDH 및 기타 各種酵素의 特性 및 그 調節機轉을 理解하는데 先決問題라고 사료된다.

따라서 著者の 教室에서는 위와같은 差異點等에 着限하여 우선적으로 LDH isoenzymes의 動力學的 特性의 差異를 確立하고자, Ehrlich 腹水癌細胞(金昇元外, 1970), 人血清(장정순外, 1971) 및 토끼의 心筋과 骨格筋組織등에서(鄭德載外, 1971) pyruvate 抑制效果등을 比較檢討해 보았을 뿐 아니라 各種動物에서 isoenzyme의 系統發生學的 差異등에 關하여서도 觀察하였다(李基寧外, 1974).

그러는 동안 低濃度의 尿素는 H_4 -LDH의 pyruvate 抑制를 弱화하여 酵素活性을 增加시키고, M_4 -LDH에 對해서는 抑制效果를 더욱 강조하여 結果的으로 酵素活性이 顯著하게 減少되는 事實을 알았고, 酵素의 安定劑인 cysteine이 도리어 抑制效果를 나타내어, 이를 cysteine의 SH基의 ion化에 依한 影響으로 推定하고, 無機 sulfide이온이 LDH isoenzyme에 미치는 影響을 檢討해 본 結果 H_4 -LDH 보다 M_4 -LDH가 더욱 顯著히 抑制됨을 보고한 바 있으며(金昇元外, 1973), 또한 pyruvate와 cysteine에 依한 LDH 活性抑制 實驗을 동시에 施行함으로써 血清 LDH의 鑑別的 分析을 쉽게 할 수 있다는 點을 지적하기도 하였다. 또한 著者の 教室에서는 이미 토끼 大腿筋에서 M_4 -LDH를 部分精製하여, 基質과 產物의 濃度 變化에 따른 影響, cysteine 또는 sulfide이온의 影響, 또한 이들의 存在下에서의 基質과 產物의 影響등을 觀察하였기에(崔榮外, 1974), 本實驗에서는 토끼 心臓筋에서 H_4 -LDH를 部分精製하여 같은 實驗을 하여서 M_4 -LDH와 H_4 -LDH의 差異點等을 比較觀察하여 봄으로써, 그 亞單位 polypeptide들의 特性을 밝히고자 하였다.

實驗方法

1) 試料의 準備

成熟한 토끼를 開胸하여 心臓을 摘출하는 即時, 心臓筋肉을 剝離한 後 寒冷한 0.25M sucrose 溶液을 使用하여 數次 血液을 씻어내 버리고, 同溶液으로 20%(W/V)의 組織 homogenate를 얻기 위해 미리 冷凍된 mortar에다 心臓筋肉을 넣고, 약간의 sea sand를 加한 後, 前記한 0.25M sucrose 용액을 少量 加하여 가면서 磨碎

하였다. 이를 International Refrigerating centrifuge (PR-2)로 2,500RPM에서 20分間 遠心分離하여 遠沈된 세포膜, 核成分, 그리고 cell debris 등을 제거하고, 그 上澄液을 酵素의 部分精製용 試料로 使用하였다.

2) H_4 -LDH의 部分精製

心臓筋肉 homogenate를 遠沈한 上澄液을 ammonium sulfate로 포화시켜 그 35~65% 사이의 分劃을 얻고(鄭德載外, 1971; Bergemeyer et al, 1963), 이를 5mM Tris 緩衝液 pH 8.4에 녹이고, 이어 같은 緩衝液으로 하루 밤 동안 透析시켰다. 透析된 용액을, DEAE-cellulose가 H_4 -LDH 단을 選擇的으로 吸着시키는 性質을 利用하여(Bergemeyer et al, 1963), 같은 緩衝液으로 미리 平衡에 이르게 한 DEAE cellulose column에 吸着시키고, 같은 緩衝液으로 數次 溶出시킨 分劃을 버리고, 다음에 NaCl 濃도가 pH 8.4인 5mM Tris 緩衝液에서 0.06M과 0.15M이 되도록 한 뒤, 0.06M로 column을 洗滌한 後 이어 0.15M로 column을 溶출하여 여러 分劃으로 받아 이를 電氣泳動으로 確認한 뒤, 酵素動力學的 實驗의 材料로 使用하였다.

3) 蛋白質 定量法

蛋白質定量은 Kjeldahlometry로서 미리 窒素의 含有量을 分析해 둔 牛血清 albumin(Nutritional Biochemicals製)을 標準液으로 삼고 Lowry方法으로(Lowry et al, 1951) 定量하되 약간의 變法을 擇하였다.

即 0.1N Na OH에 Na_2CO_3 (2%)와 potassium tartrate(0.2%)를 同時에 溶解한 溶液과 0.5%의 $CuSO_4$ 水溶液을 50:1의 容量比로 混合한 stock 溶液을 만들었다.

즉 元來의 Lowry法에서는 potassium tartrate가 $CuSO_4$ 와 함께 溶解된 것이었으나, 이 copper-tartrate 溶液에서 생기는 沈澱物을 막기 위해서 溶液處方을 달리하였다.(Oyama et al, 1956)

또한 Folin-Ciocalteu의 phenol 試藥(Folin et al, 1927)은 알칼리로 滴定하여 酸의 濃도가 1.0N에 이르도록 稀釋하여 使用하였다.

分析試料 1.0ml에 前記 stock 溶液 5.0ml를 加하고 혼든 다음 10分間 室溫에 放置하고 이어서 稀釋된 phenol 試藥 0.5ml를 1~2秒 사이에 혼들면서 加하여 亦是 室溫에 30分間 放置한 후 spectronic 20 spectrophotometer (Bausch and Lomb製)를 利用해서 750nm의 波長에서 吸光度를 測定함으로써 比色定量한 것이다.

4) LDH의 活性測定法

UV Spectrophotometer인 Calbiometer(Calbiochem

社製)를 사용하여 Neiland 방법(Neiland, 1955)에 따라 LDH 활성을測定하였다. 즉 pH 10.0의 glycine-NaOH緩衝液 180 μ mole, NAD 2 μ mole, sod. lactate 50 μ mole로總量 2.0ml가 되도록 한 뒤, 25°C 恒溫槽에서 10分間 incubate 하였다가 酵素試料 0.02ml를加하여 반응을始作하고, 이때 340nm에서吸光度를測定하였다.

lactate가 pyruvate로酸化되는 동안에 NAD⁺가還元되어生成된 NADH의 μ mole數를, 340 nm에서의吸光係數로서算出하였고, 1分間の incubation 期間에 NADH를 1 μ mole生成시키는 LDH의 활성을 1 unit로삼았다.

또한 sulfide ion과 cysteine이 LDH 활성에 미치는影響을測定할 때는 pH變化에依한影響을막기 위해, 미리 glycine-NaOH緩衝液에顯하는濃도로이物質들을 녹여 Beckman expandomatic pH meter를 사용하여 pH 10.0으로 맞추었다.

5) 電氣泳動法

LDH isoenzyme의 電氣泳動은 pH 8.6, 이온強度 0.04인 0.05M의 veronal緩衝液을 사용하여 Separaphore III (Gelman製)에 酵素試料를塗抹하여 4°C에서 cellulose acetate strip의 cm 당 25V의電壓으로 90分間 電氣泳動한後, NAD⁺와 phenazine methosulfate 및 nitrobluetretazolium을 사용하여 formazan反應을 야기시켜(Masek et al, 1970) LDH isoenzyme을染色하였고, 이 確認을 위한 control로서는 토끼腎臟의髓質組織의 20%(W/V) homogenate를亦是 2,500RPM으로遠心하여 그上澄液을 그대로 cellulose acetate에塗抹하여泳動하여 봄으로써 본實驗에서部分정제된 LDH가 H₄임을 確認하였다.

實驗結果

1) 토끼心臓筋肉에서 H₄-LDH 部分정제

토끼心臓筋肉에서는 H₄-LDH의 활성이 높아 數次에

걸쳐 토끼心臓筋肉에서의 H₄-LDH 部分정제를 試圖하여 그中 代表的인 것을 要約해 보면 第1表와 같다.

즉 酵素試料의 總蛋白質量이 (NH₄)₂SO₄ 35~65% 포화액에서 염석시킨 分割에서 거의 1/2로減少함에 따라 酵素의 比活性은 거의 2倍로增加되고, DEAE cellulose column에 吸着溶出處理시킴으로써 總蛋白質量이 1/60 정도로減少한 反面, 酵素比活性은 1.16unit/mg. protein에서 13.6unit/mg. protein으로增加하였다.

結果의으로 大略 12倍 정도 정제되었다. 즉 정제과정에서 LDH 이외의蛋白質은 제거되었고, 따라서蛋白質量減少에不拘하고, 反比例的으로 酵素의 比活性이增加되었다.

또한 본 정제법에서 얻은 마지막 酵素정제물을 電氣泳動하여 본 結果는 對照用으로 동시에 電氣泳動하여 본 토끼腎臟髓質의 LDH isoenzyme의 양상과 比較檢討하여 본 結果, 본 酵素정제물에는 H₄-LDH만이檢索되었고, M₄ 또는 LDH-2, LDH-3 또는 LDH-4와 같은 混成型은 전혀檢索되지 않아 본 정제물이 비록 回收率 20%, 정제율 12倍에 不過하였으나 H₄-LDH의 動力學의 特性을 研究하는데는 아무런 支障이 없는 것으로 確認하였다.

2) H₄-LDH에 對한 Pyruvate의 抑制效果

Pyruvate에 依해 H₄-LDH보다 M₄-LDH가 抑制를 많이 받는다는 사실은 이미 알려졌다(金昇元外, 1970; 金昇元外, 1973). 著者が 確認하여 본 바에 依하면, 第II表와 第I圖에 要約하여 본 바와 같이 pyruvate極少量 즉 0.50 $\times 10^{-3}$ M 정도에 대해서는 約 10%정도 抑制받으나, pyruvate의 濃도가 증가될수록 더욱 抑制를 많이 받아 20 $\times 10^{-3}$ M 정도의 pyruvate 濃도에 對해서는 90% 정도가 抑制되어 그 活性이 11%로減少되었는바, 이는 著者の 교실에서 試行한 M₄-LDH에서의 Pyruvate에 의한 濃度影響(崔榮外, 1974)보다 훨씬 더 顯著한 抑制를 보임을 나타냈다.

3) Pyruvate 濃도에 依한 H₄-LDH 活性의 抑制效果에 對한 Sulfide ion 濃도에 따른 影響

Table I. Summary of crude preparation of H₄-LDH from rabbit heart muscle

Preparation steps	Total activity (μ mole/min)	Total protein (mg)	Specific activity (Unit/mg. prot)	Yield (%)	Purification (fold)
Supernatant of 20% homogenate	138	119	1.16	100	1.00
35~65% saturation of (NH ₄) ₂ SO ₄	130	49.6	2.62	94.2	2.26
Dialyzate	128	49.5	2.59	92.8	2.23
DEAE-cellulose column eluate	25.3	1.86	13.6	18.3	11.7

Table II. Pyruvate inhibition of H₄-LDH activity

Concentration of pyruvate	0	0.50 × 10 ⁻³ M	1.25 × 10 ⁻³ M	2.5 × 10 ⁻³ M	5.0 × 10 ⁻³ M	10 × 10 ⁻³ M	20 × 10 ⁻³ M
Activity (μmole/min)	2.38 (100%)	2.14 (89.9%)	1.80 (75.6%)	1.39 (58.4%)	1.13 (47.5%)	0.530 (22.3%)	0.262 (11.0%)

Table III. Effect of Sulfide ion on the Pyruvate inhibition of H⁴-LDH activities in the function of their concentration.

Concentration of Sulfide ions	Concentration of Pyruvate							
	0	0.50 × 10 ⁻³ M	1.25 × 10 ⁻³ M	2.5 × 10 ⁻³ M	5.0 × 10 ⁻³ M	10 × 10 ⁻³ M	20 × 10 ⁻³ M	
0	2.38 (100%)	2.14 (89.9%)	1.80 (75.6%)	1.39 (58.4%)	1.13 (47.5%)	0.530 (22.3%)	0.262 (11.0%)	
5.0 × 10 ⁻³ M	1.99 (83.6%)	1.94 (81.5%)	1.73 (72.7%)	1.46 (61.3%)	1.20 (50.4%)	0.672 (28.2%)	0.460 (19.3%)	
5.0 × 10 ⁻² M	1.80 (75.6%)	1.75 (73.5%)	1.72 (72.4%)	1.39 (58.5%)	1.18 (49.6%)	0.671 (28.2%)	0.410 (17.2%)	

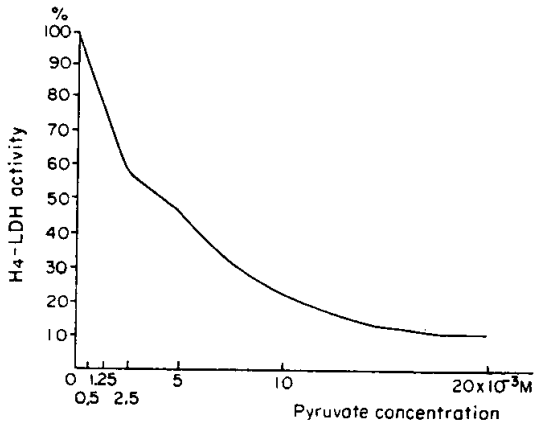


Fig. 1. Pyruvate inhibition of H₄-LDH activity

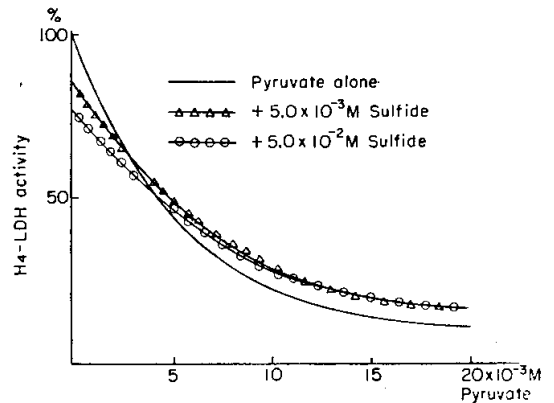


Fig. 2. Effect of Sulfide ion on the Pyruvate inhibition of H₄-LDH activities in the function of their concentration

Sodium sulfide 를 사용하여 sulfide 이온의 H₄-LDH 활성에 대한 pyruvate 의 抑制效果에 대한 影響을 檢索하여 본 結果는 第III表와 第2圖에 表示한 바와 같다.

즉 sodium sulfide 를 사용하여 施行한 sulfide ion 의 效果는 pyruvate 가 없더라도 그 自體가 酵素 即 H₄-LDH 활성의 抑制效果를 가져, 5.0 × 10⁻³M 의 sulfide 이온과 5.0 × 10⁻²M 의 sulfide 이온이 存在하면, pyruvate 가 없더라도 各各 15%, 25%에 達하는 抑制를 보여, 2.38 unit/min 의 H₄-LDH 활성이 各各 1.99unit/min, 1.80 unit/min 로 減少하였다. 그러나 이러한 sulfide 이온의 抑制效果는 pyruvate 와 共存함으로써 兩 抑制效果가

相乘의으로 比例해서 증가되지 않고 高濃度의 pyruvate 를 使用하였을때 即 5.0 × 10⁻³M 이상의 pyruvate 濃度에서는 오히려 H₄-LDH 활성에 대한 pyruvate 抑制效果를 약간 減少시켰으나, sulfide 이온의 濃度差에 따른 pyruvate 抑制效果의 減少에는 큰 差가 없었다. 위와 같은 實驗結果는 著者의 教室에서 施行한 M₄-LDH 에 대한 같은 實驗結果에서와 비슷하나(崔榮外, 1974), M₄-LDH 에서 보다는 H₄-LDH 에서 sulfide 이온이 LDH 활성에 대한 pyruvate 抑制效果를 약간 더 減少시켜 주는 듯하다.

Table IV. Effect of cysteine on the pyruvate inhibition of H₄-LDH activities in the function of their concentrations.

Concentration of cysteine	Concentration of pyruvate						
	0	$0.50 \times 10^{-3}M$	$1.25 \times 10^{-3}M$	$2.5 \times 10^{-3}M$	$5.0 \times 10^{-3}M$	$10 \times 10^{-3}M$	$20 \times 10^{-3}M$
0	2.38 (100%)	2.14 (89.9%)	1.80 (75.6%)	1.39 (58.4%)	1.13 (47.5%)	0.530 (22.3%)	0.262 (11.1%)
$2.0 \times 10^{-2}M$	2.31 (97.1%)	2.28 (95.8%)	2.25 (94.5%)	2.21 (92.9%)	1.66 (69.8%)	1.08 (45.4%)	0.530 (22.3%)
$2.0 \times 10^{-1}M$	1.73 (72.7%)	1.73 (72.7%)	1.66 (69.8%)	1.76 (74.0%)	1.81 (76.1%)	1.71 (71.9%)	1.73 (72.7%)

Table V. Effect of substrate, lactate, in its various concentration on the H₄-LDH activities in the presence of sulfide ions.

Concentration of sulfide	Concentration of lactate							
	$0.125 \times 10^{-3}M$	$0.25 \times 10^{-3}M$	$0.50 \times 10^{-3}M$	$1.25 \times 10^{-3}M$	$2.5 \times 10^{-3}M$	$5.0 \times 10^{-3}M$	$12.5 \times 10^{-3}M$	$25 \times 10^{-3}M$
0	0.134 (5.63%)	0.260 (10.9%)	0.461 (19.4%)	0.860 (36.1%)	1.39 (58.4%)	1.80 (75.6%)	1.99 (83.6%)	2.38 (100%)
$5.0 \times 10^{-3}M$	0.040 (1.68%)	0.081 (3.40%)	0.158 (6.64%)	0.305 (12.8%)	0.531 (22.2%)	0.865 (36.3%)	1.37 (57.6%)	2.01 (84.5%)

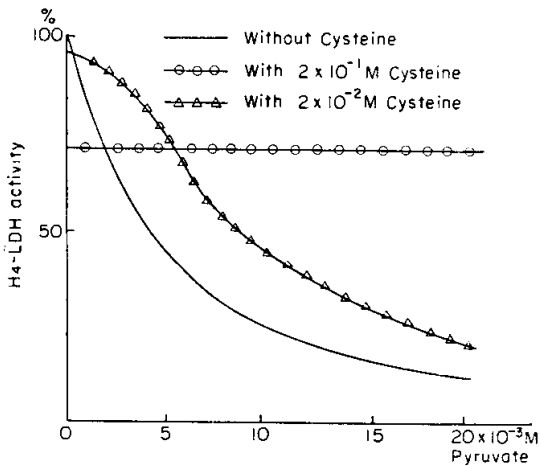


Fig. 3. Effect of the cysteine on the pyruvate inhibition of H₄-LDH activities in the function of their concentrations.

(4) Pyruvate의 H₄-LDH 활성 억제에 대한 Cysteine의 影響

Cysteine에 의한 pyruvate의 濃度變化에 따른 H₄-LDH 활성 억제 효과에 대한 影響을 要約하여 보면 第IV

表와 第3圖에 제시한 바와 같다.

即 cysteine 역시 SH 基를 가져 本反應系에서와 같은 pH 10.0에서는 쉽게 sulfide로 ion化하기 때문에 前項의 sodium sulfide를 使用하여 實驗하여 본 sulfide이온의 結果와 비슷한 結果를 보여 주었으며, pyruvate가 없었을 때, cysteine 自體가 $2.0 \times 10^{-2}M$ 과 $2.0 \times 10^{-1}M$ 의 濃度에서 各各 97.1%와 72.7%의 LDH 活性을 보였든 바, 이는 cysteine의 高濃度에서 LDH 活性抑制가 보다 큼을 밝혀준다. 그러나 cysteine의 2가지 濃度에서의 H₄-LDH 活性에 對한 pyruvate 抑制效果는 서로 判異하여 低濃度의 cysteine 即 $2.0 \times 10^{-2}M$ 의 cysteine의 存在下에서는 pyruvate의 H₄-LDH 活性抑制效果가 조금씩 減少되었으나 比較的 比例的으로 H₄-LDH의 活性이 減少되었다.

高濃度 cysteine 即 $2.0 \times 10^{-1}M$ cysteine의 存在下에서는 pyruvate의 濃度變化에 相關없이 H₄-LDH의 活性이 一定하게 69~76% 정도였다.

即 이 경우는 H₄-LDH 活性에 對한 pyruvate 抑制效果보다는 거의 全的으로 cysteine의 抑制效果만이 나타난 바, 역시 著者의 教室에서 M₄-LDH에 對하여 實驗하여 본(崔榮外, 1974) 結果와 類似하다.

Table V. Effect of substrate, lactate, in its various concentration on the H₄-LDH activities in the presence of cysteine.

Concentration of cysteine	Concentration of lactate							
	0.125 × 10 ⁻³ M	0.25 × 10 ⁻³ M	0.50 × 10 ⁻³ M	1.25 × 10 ⁻³ M	2.5 × 10 ⁻³ M	5.0 × 10 ⁻³ M	12.5 × 10 ⁻³ M	25 × 10 ⁻³ M
0	0.134 (5.63%)	0.260 (10.9%)	0.461 (19.4%)	0.860 (36.1%)	1.39 (58.4%)	1.80 (75.6%)	1.99 (83.6%)	2.38 (100%)
2.0 × 10 ⁻² M	0.114 (4.79%)	0.221 (9.29%)	0.422 (17.7%)	0.810 (34.0%)	1.32 (55.5%)	1.71 (71.9%)	1.91 (80.3%)	2.30 (96.6%)

M₄-LDH에 대한 cysteine의 pyruvate 抑制效果에 대한 影響을 보면 cysteine의 LDH 活性抑制가 顯著하여 cysteine 2.0 × 10⁻²M의 濃度下에서 M₄-LDH 活性은 30%밖에 되지 않았으나, 역시 pyruvate 抑制效果는 cysteine의 같은 濃度에서 露呈되지 않아 cysteine에 의한 pyruvate의 H₄-LDH 活性抑制效果의 顯著한 減少로 본다.

5) 基質濃度變化에 따른 Sulfide 이온 및 Cysteine의 H₄-LDH 活性에 미치는 影響

본 反應系는 lactate를 基質로 삼고 pyruvate를 產物로 하므로, 前記한 바와 같은 產物抑制效果 및 그에 대한 sulfide, cysteine에 의한 LDH 活性抑制效果를 比較檢討해 보았으므로, 이러한 效果에 基質誘導가 미치는 影響을 究明하고자 基質인 lactate의 濃度를 變化시키면서 sulfide와 cysteine의 一定濃度가 미치는 効

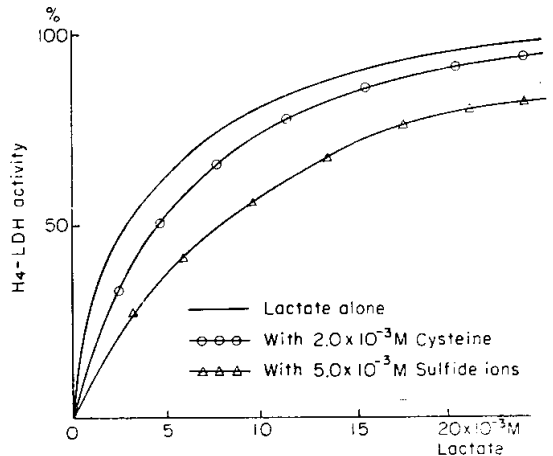


Fig. 4. Comparison of the H₄-LDH activities as induced by the substrate alone, and with cysteine and sulfide ions

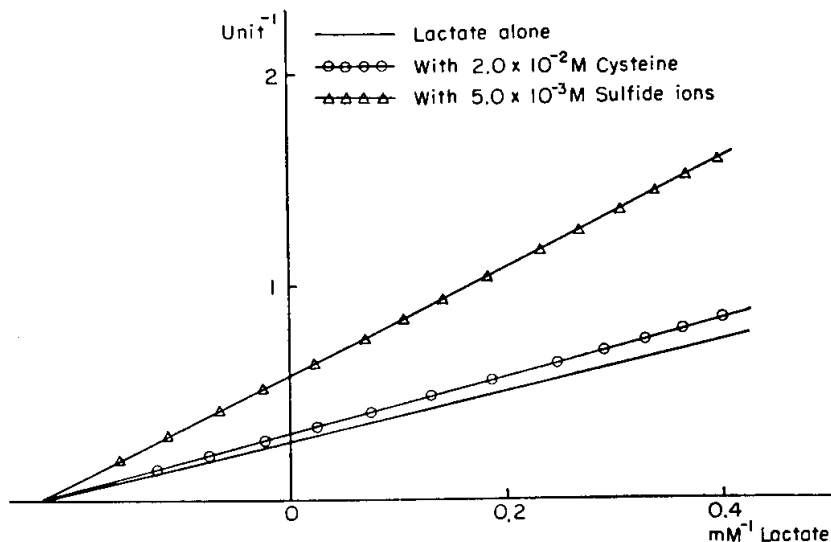


Fig. 5. The Lineweaver-Burk plots of the H₄-LDH activity

Table V. Effect of substrate, pyruvate, in its various concentration on the H_4 -LDH activities in the presence of cysteine

Concentration of cysteine	Concentration of pyruvate									
	$0.125 \times 10^{-3}M$	$0.25 \times 10^{-3}M$	$0.50 \times 10^{-3}M$	$1.25 \times 10^{-3}M$	$2.5 \times 10^{-3}M$	$5.0 \times 10^{-3}M$	$10 \times 10^{-3}M$	$15 \times 10^{-3}M$	$20 \times 10^{-3}M$	$40 \times 10^{-3}M$
0	0.140 (4.49%)	0.266 (8.53%)	0.539 (17.3%)	0.948 (30.4%)	1.39 (44.6%)	2.21 (70.8%)	2.86 (91.7%)	3.12 (100%)	2.59 (83.0%)	2.21 (70.8%)
$2.0 \times 10^{-2}M$	0	0	0.080 (2.55%)	0.096 (3.08%)	1.190 (6.09%)	0.832 (26.7%)	2.21 (70.8%)	3.00 (96.2%)	2.54 (81.4%)	2.21 (70.8%)

果를 요약하여 보면 第V表 및 第VI表와 같다.

즉 sulfide $5.0 \times 10^{-3}M$ 과 cysteine $2.0 \times 10^{-2}M$ 濃度에서 比較하여 보면 兩者 모두 基質인 lactate 에 의한 H_4 -LDH 活性의 基質誘導效果를 抑制하고 있으나, M_4 -LDH에서의 같은 농도의 sulfide 및 cysteine 농도에서의 基質誘導抑制效果(崔榮外, 1974) 보다는 훨씬 未及하다.

또한 cysteine 濃度の 1/4에 해당하는 sulfide 이온의 濃度에서 더욱 基質誘導의 抑制가 顯著하였고 이 關係를 百分率로 圖示하면 第4圖과 같으며 위의 關係를 Lineweaver-Burk plot 로 圖示하여 보면 第5圖과 같아, 이들의 抑制양상이 非相競性임을 알 수 있겠다.

6) Pyruvate 를 基質로 한 逆反應系에서의 Sulfide 이온 및 Cysteine 이 H_4 -LDH 活性에 미치는 影響

H_4 -LDH 活性에 대한 lactate 基質의 誘導效果에 대해 sulfide 이온과 cysteine 이 典型的 非相競的 抑制를 보여, pyruvate 를 대신 基質로 하고 NAD^+ 대신 $NADH$ 를 coenzyme 으로 넣어준 逆反應系에서 역시 sulfide 이온과 cysteine 의 影響을 檢討要約해 보면 第VII表와 第6圖과 같다.

즉 pyruvate 를 基質로한 LDH 의 活性은 著者の 教室에서 M_4 -LDH 의 逆反應系에서 施行하여 본 實驗結果值(崔榮外, 1974) 보다 本 H_4 -LDH 의 逆反應系에서 基質인 pyruvate 의 低濃度에서 turn over 가 크며 H_4 -LDH 의 逆反應系에서는 pyruvate 의 濃度가 $20 \times 10^{-3}M$ 이상에서는 오히려 LDH 活性이 抑制되었다.

또한 cysteine 의 效果를 보면 低濃度 pyruvate 에 의한 H_4 -LDH 의 活性誘導를 크게 抑制하여 M_4 -LDH(崔榮外, 1974)에서 보다 顯著하나, 역시 $20 \times 10^{-3}M$ 이상의 pruvate 濃度에서는 그 抑制效果가 減少되었고 $40 \times 10^{-3}M$ 의 pyruvate 濃度에서는 pyruvate 基質自體의 抑制效果뿐이었다.

또한 sulfide 이온의 경우는 거의 抑制效果가 없고,

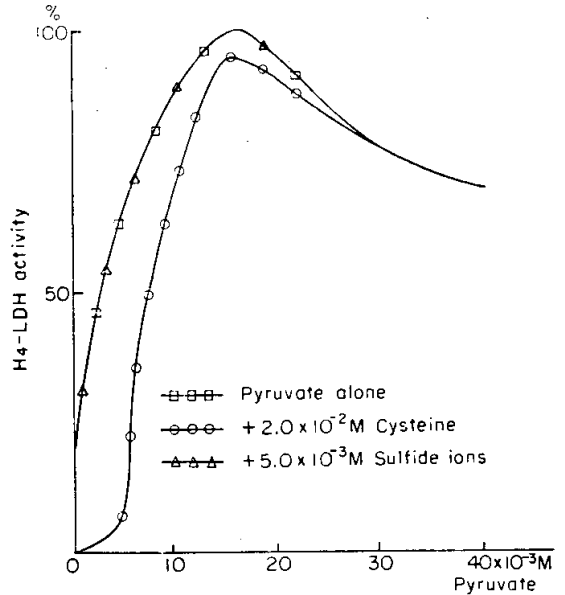


Fig. 6. Comparison of the H_4 -LDH activities as induced by the substrate alone, and with cysteine and sulfide ions.

pyruvate 基質自體에 依한 效果밖에 나타나지 않았다.

考 察

LDH 는 周知하다 싶이 解糖作用의 終產物인 pyruvate 와 lactate 間의 酸化還元反應을 主宰하는 酵素로 pyruvate 의 解糖作用時 생긴 $NADH$ 를 coenzyme 으로 利用하여 lactate 로 還元시키거나 또는 그 逆反應을 촉매시킨다. 特히 低酸素의 狀態下에서는 Krebs cycle 이 圓滿히 回轉치 못하므로 必要한 energy 를 解糖과정에서 取得하여야 하는데, 이 과정에 必須的인 NAD^+ 가 glycerol phosphate shuttle 만으로는 充分히 補償되지 못하므로 LDH 가 pyruvate 를 lactate 로 還元시키면서

NADH를 NAD⁺로 酸化시켜서 NAD⁺를 供給해 주는 등의 主要한 役割을 하며 이러한 反應은 NAD/NADH의 比率에 크게 左右된다(MeGilvery, 1970).

이러한 LDH는 거의 大部分의 生物體의 組織에서 쉽게 檢出되며 특히 高等動物에서 2種의 polypeptide를 亞單位로 하여 hybrid tetramer를 이루고 있는데(Wieland et al, 1957) 특히 mitochondria에 풍부하고 酸素供給이 圓滑하여 계속적이고 rhythmic한 運動을 하는 心臟筋에 많은 H型 亞單位와 단속적이고 갑작스런 運動을 하는 骨格筋에 많은 M型 亞單位에 對해서는 物理的, 化學的, 免疫學的으로 여러가지 差異點들이 檢討되었다.(Fondy et al, 1964; Pesce et al, 1964; Kaplan et al, 1967; Pfleiderer et al, 1970; Rajewsky, 1966; 鄭德載外, 1971; Brody, 1973; Plummer et al, 1963; Plummer et al, 1963; Rosalki et al, 1960)

이러한 여러 差異點들 중에서 특히 解糖作用의 終産物인 pyruvate에 依한 影響은 서로 크게 달라 H型 亞單位 만으로 구성된 LDH는 第Ⅱ表와 第1圖에서 보는 바와 같이 pyruvate 20×10⁻³M의 농도에서 11%정도로 活性이 떨어지는 反面, M型 亞單位로 구성된 LDH는 pyruvate 같은 농도에서 22%(崔榮外, 1974) 정도로 活性이 떨어지지 않았다.

이들은 더욱 lymphocyte를 phytohemagglutinin으로 處理하여 여러가지 濃度の 酸素下에서 incubate시킨後 그 LDH의 H型亞單位와 M型亞單位の 構成比率을 比較해 본 結果, 低 酸素下에서는 주로 M型亞單位로 된 LDH isoenzyme이 나타났고 酸素分壓이 높은 狀態下에서는 H型亞單位가 많은 LDH isoenzyme로 나타났다는 Hellung-Lasen과 Anderson(Hellung-Larsen et al, 1970)의 報告에서 指摘된 바와 같이 LDH의 組成에 있어서는 酸素分壓이 重要한 制御역할을 하며, 따라서 好氣性組織과 嫌氣性組織에 따른 pyruvate 利用率이 달라 이러한 산소분압과 pyruvate와의 相關關係에서 LDH 組成을 理解하여 볼 수 있겠으며 더욱 pyruvate에 依한 LDH 活性抑制의 여러가지 양상을 理解함으로써 LDH 亞單位の 特性도 究明될 수 있겠다.

本實驗에서 使用한 H₄-LDH의 部分精製는 DEAE cellulose column chromatography를 利用하여(金昇元外, 1973) 13.6unit/mg. protein의 比活性을 가져 回收率 18.3%, 部分精製倍數 11.7배 밖에 되지 않는 部分精製品이나, DEAE가 매우 選擇的으로 H-LDH를 吸着하는 까닭에 H₄-LDH 이외의 다른 LDH isoenzyme들은 除去되었음을 電氣泳動相으로 確認하였고, 따라서 本實驗에서 H₄-LDH의 各種 動力學的 實驗을 시행하

는데는 支障이 없었다.

前述한 바와 같이 H₄-LDH와 M₄-LDH는 pyruvate에 依해 抑制되는 率이 다른데 이러한 pyruvate 抑制에 對한 差異는 Plagemann 등(Plagemann et al, 1961)과 Nisselbaum 등(Nisselbaum et al, 1961)이 報告한 바와 같이 兩 isoenzyme의 Michaelis 恒數가 서로 다르기 때문이며, 이 抑制는 溫度에 의해서도 差異가 나는 것으로 報告하였으나, 著者の 教室에서 實驗하여 본 結果 25°C~37°C 사이에서는 溫度依存性이 없는 것으로 밝혀졌다(金昇元外, 1970). 또한 Wuntch 등(Wuntch et al, 1969)에 의하면 LDH와 pyruvate, 그리고 NAD⁺와의 사이에 abortive ternary complex를 形成하여 pyruvate 抑制가 이루어 진다고 보고하였으며, 특히 H₄-LDH는 이러한 abortive ternary complex를 M₄-LDH보다 빨리 形成하고, 또한 이 complex는 M₄-LDH에서 보다 더욱 堅固하게 結合되어 있다고 報告하였다(Wuntch et al, 1969).

이러한 pyruvate 抑制와 더불어 著者の 教室에서 sulfide 이온과 cysteine이 LDH 活性을 抑制함을 觀察하였기에(金昇元外, 1973), 먼저 M₄-LDH에서의 影響을 檢討하였고(崔榮外, 1974), 본 實驗에서는 H₄-LDH에 있어서의 sulfide 이온과 cysteine의 pyruvate 抑制에 對한 양상을 比較檢討해 보았다.

H₄-LDH에서는 pyruvate 抑制效果가 sulfide 이온에 依해 第Ⅲ表와 第2圖에서 보는 바와 같이 低濃度 pyruvate에서는 M₄-LDH보다 影響을 적게 받고 高濃度 pyruvate에서는 M₄-LDH보다 큰 影響을 받았으나 전체적으로 보아 大差가 없다고 볼 수 있으며 또한 cysteine에 依한 pyruvate 抑制양상은 判異하여 第Ⅳ表와 第3圖에 要約한 바와 같이 全體的으로 보아 pyruvate 抑制效果를 크게 減少시켰으나 M₄-LDH의 경우(崔榮外, 1974)에서 보다는 그 減少效果가 더욱 顯著하였다.

著者の 教室에서는 일찌기 cysteine의 이러한 效果가 cysteine의 還元力 또는 pH10에서의 cysteine sulfhydryl group의 이온화에 基因하리라고 假定하여 實驗을 하여 還元力보다는 sulfhydryl group의 이온화 때문일 가능성이 크다고 報告하였다(金昇元外, 1973). 즉 cysteine의 sulfhydryl group의 이온화한 mole fraction은 pH 10.0에서 算出하여 보면 cysteine의 carboxyl group의 pKa는 1.92이고, amino group의 pKa는 8.35이며 sulfhydryl group의 pKa가 10.46이므로 이온화한 sulfhydryl group의 mole fraction은 0.25이다(金昇元外, 1973).

따라서 cysteine 농도의 1/4 즉 25%에 해당하는 농도

의 sodium sulfide를 사용하여 比較하여 본 結果 本實驗에서 pyruvate 抑制效果는 豫想한 바와는 달리 第 V 表, 第 VI 表, 第 4 圖 및 第 5 圖에서 보는 바와 같이 이들은 非相競性인 抑制를 보여 반드시 이러한 ion 化만으로는 설명하기 어려운 結果를 보였다.

또한 cystine/cysteine의 standard oxidation potential은 $-0.220v$ 이고 (Jocelyn, 1972), NAD/NADH의 그것은 $-0.320v$, 또한 pyruvate/lactate의 그것은 $-0.185v$ 로 되어 있어 (Sober), NAD⁺가 cysteine을 酸化하고, 이 cysteine이 中間生成物質이 되어 다른 基質과의 反應에 利用될 수 있으며 (Jocelyn, 1972), 또는 cysteine 자체가 lactate와 相競적으로 NAD⁺에 反應할 수도 있겠다. 그러나 이에 대해서는 第 5 圖에서 보는 바와 같이 lactate와 cysteine間에는 LDH에 대해 非相競적으로 作用하여 이의 可能性은 稀薄하다.

그러나 本實驗에서 分明히 立證되었듯이 sulfide이온과 cysteine에 依한 pyruvate의 LDH 活性抑制는 특히 cysteine에서 顯著하며 이들의 pyruvate에 依한 LDH의 影響을 抑制하는 機轉은 第 5 圖 및 第 6 圖에서도 分明하듯이 非相競性이며 그들의 效果는 단순한 이온化 또는 還元力에 依한 바 만이 아닌 것이다.

따라서 본 結果를 가지고 思料되는 바는 이들 pyruvate가 cysteine과 本反應界에서 서로 反應하여 어떤 complex를 形成한다고 假定하면, 쉽게 pyruvate의 LDH 活性에 미치는 影響에 대한 cysteine의 抑制效果를 說明할 수 있겠다.

즉 sulfide이온은 pyruvate와 어떤 complex를 形成하지 않고 cysteine만이 어떤 complex를 形成한다면, sulfide이온과 cysteine의 效果가 서로 다른 바를 쉽게 說明할 수 있으며, pyruvate 抑制效果를 說明하는데 立證된 pyruvate에 의한 abortive ternary complex의 生成을 cysteine이 pyruvate와 어떤 complex를 形成함으로써 그 作用을 一部 막아 준다고 생각할 수 있고, pyruvate가 없는 狀態에서는 sulfide이온의 농도와 그 4배되는 cysteine의 농도하에서의 LDH 活性抑制效果가 비슷한 것으로 보아 이때는 sulfhydryl group의 이온化에 依한 影響을 強力히 시사하고 있다.

또한 sulfhydryl group에 依한 效果는 NAD⁺에 대한 SH group의 影響을 우선적으로 생각할 수 있겠는데, NAD⁺는 LDH 活性에 있어서 必須적인 助酵素인 周知하는 바와 같으나 특히 LDH의 3次構造를 安定시키는 데 寄與할 뿐만 아니라 (Clausen, 1970), 또 pyridine ring은 NAD⁺와 LDH의 結合에도 必要하여 (Shifrin, 1959), 酸化還元反應에 主要한 역할을 한다. 이러한

NAD⁺ pyridine ring의 4번 炭素는 pH 10.0에서 충분히 많은 thiol만 있으면 곧 直接結合하여 NAD⁺의 還元을 阻害함으로써 (Jocelyn, 1972) LDH의 活性을 크게 抑制할 수 있다고 생각된다.

또한 第 6 圖를 보면 cysteine의 H₄-LDH 活性抑制 profile에서 마치 cysteine이 allosteric inhibitor인 듯한 印象을 주나 本論文의 結果만으로는 速斷키 어려우며, M₄-LDH에 대한 本教室의 實驗에서도 비슷한 結果를 얻었다.

이상과 같은 H₄-LDH에 대한 sulfide이온과 cysteine의 效果는 M₄-LDH에 對한 경우보다 분명, 定量的으로 有意한 差異를 發見했으나 이러한 定量的인 差異가 LDH 組成의 比를 決定하는 重要한 因子가 될 것인가는 등의 生物學的 意義에 對해서는 계속 追求해 볼 豫定이다.

結 論

1. 토끼心臟肌肉에서 H₄-LDH를 다른 isoenzyme으로부터 대략 12배 정도로 分離정제하였다.
2. H₄-LDH 活性은 產物인 pyruvate에 의하여 顯著한 抑制效果를 받아 pyruvate 0.02M일 때 11% 정도로 活性이 減少되었다.
3. Sulfide이온은 H₄-LDH 活性에 대한 pyruvate 抑制效果를 약간 減少시켰다.
4. Cysteine은 H₄-LDH 活性에 대한 pyruvate 抑制效果를 顯著히 減少시켰다.
5. 基質(substrate)인 lactate濃度變化에 따른 H₄-LDH 活性의 變化를 cysteine 및 sulfide이온의 存在下에서 觀察하였던 바 cysteine濃度の 1/4에 該當하는 sulfide이온의 抑制效果는 cysteine보다 顯著하였다.
6. Pyruvate를 基質로 하는 酵素活性測定系에서 cysteine은 allosteric한 듯한 抑制效果를 보이지만 sulfide이온은 아무런 效果가 없었다.

ABSTRACT

A study on the properties of H₄-LDH partially purified from the cardiac muscle of rabbits

Soo-Hoon Park, M. D. Seung-Won Kimm, M. D.

Dept. of Biochemistry, Seoul National University, College of medicine

1. The H₄-LDH was partially purified approximately

- 12 folds of its activity from the cardiac muscle of rabbits by means of 'salting-out with ammonium sulphate and of DEAE-cellulose column chromatography.
2. The activity of the H₄-LDH was inhibited markedly by 0.02M pyruvate to 11% of its original activity
 3. Sulfide ions, when added to the reaction system using lactate as the substrate, reduced slightly the inhibition caused by pyruvate.
 4. Cysteine, on the other hand, lowered significantly the magnitude of pyruvate inhibition in its lower range of concentration, but showed its own inhibitory effect regardless of the pyruvate inhibition in its higher range of concentration.
 5. The activity of H₄-LDH, using lactate as the substrate was more inhibited by the addition of the sulfide ions than by the addition of 4 folds concentration of cysteine.
 6. When pyruvate was used as substrate, cysteine showed an apparently allosteric effect, while sulfide ions showed no particular effect different from the pyruvate induction itself.

參 考 文 獻

1. Bergemeyer, H. U., Berst, E., & Hess, B., *In Enzymatic Analysis*(Bergemeyer Ed.) Acad press. p. 736, 1963.
2. Brody, I. A.: *Nature(Lond)* 201, 685, 1973.
3. Cahn, R. D., Kaplan, N. O., Levine, L., & J. Zwilling, E.,: *Science* 136, 962, 1962.
4. Chilson, O. P., Costello, L. A., & Kaplan N. O.: *J. Mol. Biol.* 10, 349, 1964.
5. 崔榮, 金昇元: 서울의대잡지 15, 153, 1974.
6. Clausen, J.: *FEBS symposium.* 18, 133, 1970.
7. Clausen, J., & Hustrulid, R.,: *Biochim. Biophys. Acta.* 167, 221, 1968.
8. Clausen, J., & Hustrulid, R.,: *Biochem. J.* 111, 219, 1969.
9. Criss, W. E.: *Cancer Res.* 31, 1523, 1971.
10. Davidson, R. G., Fildes, R. A., Glenbott, A. M., Harris, H., & Robson, E. B.: *Ann. Hum. Gen.* 29, 5, 1965.
11. Epstein, C. J., Carter, M. M., & Goldberger R. F.: *Biochim. Biophys. Acta.* 92, 391, 1963.
12. Fine, I. H., Kaplan, N. O., & Kufitinec, D.: *Biochemistry* 2, 116, 1963.
13. Folin, O., & Ciocalteu, V.: *J. Biol. Chem.* 73, 627, 1972.

14. Fondy, T. P., Pesce, A., Stolzenbach, F., Freedberg, I., & Kaplan, N. O.: *Biochem.* 3, 522, 1964.
15. Fountain, J. A.: *Cancer.* 30, 998, 1970.
16. Goldman, R. D., Kaplan, N. O., & Hall, T. C.: *Cancer Res.* 24, 389, 1964.
17. Güttler, F. & Clausen, J.: *Biochem. J.* 114, 839, 1969.
18. Güttler, F. & Clausen, J.: *Enz. Biol. Clin.* 8, 456, 1967.
19. Hellung-Larsen, P. & Anderson, V.: *FEBS symposium* 18, 163, 1970
20. Sober, H. A. (ed): *Handbook of Biochemistry. The Chemical Rubber Co.*
21. 장정순, 이진순: 中央醫學, *Korean Central J. Med.* 20, 17, 1971.
22. Jocelyn, P. C.,: *Biochemistry of SH groups.* Acad. Press. p. 56. 1972a.
23. Jocelyn, P. C.,: *Biochemistry of SH group.* Acad. Press. p. 190, 1972b.
24. 鄭德載, 金昇元: 서울醫大雜誌 *Seoul. J. med.* 12, 219, 1971.
25. Kaplan, N. O.: *J. Biol. Chem.* 242, 2151, 1967.
26. 金昇元, 鄭弘根, 朴壽勳, 崔榮, 安賢瑠, 朴源益: 中央醫學 *Korean Central J. Med.* 24, 547, 1973.
27. 李麒相, 金昇元,: *Korean Med. J.*(綜合) 15, 17, 1970.
28. 李基寧, 朴相哲: 서울의대잡지 15, 224, 1974.
29. Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J.: *J. Biol. Chem.* 193, 265, 1951.
30. Markert, C. L., & Apella, E.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 103, 915, 1963.
31. Masek, Z., Breinek, P. & Vecerek, B.: *FEBS symposium.* Vol 18, p. 177, 1970.
32. McGilvery, R. W.,: *Biochemistry, a functional approach.* W. B. Saunders Co. p. 266, 1970
33. Neiland, J. B. *Methods in Enzym.* (Boyer et al Ed.) Acad. Press. N. Y. Vol. 1. p. 449, 1955.
34. Nisselbaum, J. S. & Bodansky, O.,: *J. Biol. Chem.* 236, 969, 1961.
35. 禹榮男, 金昇元: 大韓泌尿器科學會雜誌 *Korean. J. Urol.* 13, 9, 1972.
36. Oyama, V. I. & Eagle, H.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 91, 305, 1956.
37. Pesce, A., McKay, R. H., Stolzenbach, F., Cahn, R. O. & Kaplan, N. O.: *J. Biol. Chem.* 239, 1753, 1964.
38. Pfleiderer, G., & Mella, K.,: *In Enzymes and Isoenzymes*(Shugar, D, Ed.) Acad. Press. p. 154, 1970.

39. Pfleiderer, G. & Wachsmuth, E. D. : *Biochem. Z.* 334, 185, 1961.
40. Plagemann, P. G. W., Gregory, K. F. & Wroblewsky, F. : *Biochem. J.* 234, 37, 1961.
41. Plummer, & Wilkinson, J. H. : *Biochem. J.* 87, 416, 1963a.
42. Plummer & Wilkinson, J. H. : *Biochem. J.* 87, 423, 1963b.
43. Rajewsky, K. : *Biochim, Biophys. Acta.* 121, 51, 1966.
44. Rosalki, S. B., & Wilkinson, J. H. : *Nature* 188, 1110, 1960.
45. Shaw, C. R., & Barto, E. : *Proc. Natl. Acad. Sci.* 50, 211, 1963.
46. Shifrin, S., Kaplan, N. O., Ciotti, M. M. : *J. Biol. Chem.* 234, 1555, 1959.
47. Syner, F. N., & Goodman, M. : *Science*, 151, 206, 1966.
48. Widy, K. : *Acta Cytol. (Balt)* 11, 231, 1967.
49. Wieland, T., & Pfleiderer, G. : *Biochem. J.*, 329, 112, 1957.
50. Wilson, A. C., Kaplan, N. O, Levine, L., Pesce, A., Reichlin, M., & Allison, W. S. : *Federation Proceedings*, 23, 1258, 1964.
51. Withycombe, W. A., & Wilkinson, J. H. : *Biochem. J.* 94, 384, 1965.
52. Wuntch, T., Vesell, E. S., & Chen, R. F. : *J. Biol. Chem.* 244, 6100, 1969.