

# 백서 간 및 뇌 MICROSOME분획의 지질 및 효소 활성의 성장에 따르는 차이

## Age-related Changes in Lipid and Enzyme Activity of Microsomal Fractions from Rat Liver and Brain

서울대학교 의과대학 소아과학교실

전 등 원·최 한 응

생화학교실

정 흥 근·이 기 영

### 서 론

생체막의 기능은 생체막을 이루는 지질과 단백질 성분의 성질에 관련되어 있다. 즉 생체막에 결합된 효소의 활성은 막지질의 존재를 필요로 하거나 또는 이에 의하여 조절된다(Duttera et al., 1968; Vessey & Zakim, 1971; Emmelot & Bos, 1968). 이러한 생체막의 구조와 기능과의 관계는 막지질을 *in vitro*로 변형시킴으로써 연구되고 있다. 생체막의 지질은 phospholipase (Zakim, 1970) 또는 유기용매 (Slater & Sawyer, 1971) 처리로써 변형될 뿐만 아니라 지질의 과산화(Pfeifer & McCay, 1971; Power et al., 1977)에 의해서도 변형된다. 이러한 지질의 변형은 효소활성의 저하(Kamatagi & Kitagawa, 1973; Chung & Lee, 1977)를 수반하므로 막지질은 막에 결합된 효소의 conformation의 유지에 필요한 것으로 생각된다. 막지질의 주성분으로 되어 있는 phospholipid의 지방산은 주로 불포화지방산 (Stadler & Kleinig, 1971; Colbeau et al., 1971; Hoeven et al., 1975; Comte et al., 1976)으로 구성되어 있다. 불포화지방산은 상온에서 액체상태로 존재하기 때문에 막의 적당한 fluidity조절을 위하여 cholesterol(Ladbrooke et al., 1968)이 필요하다.

이와같이 생체막은 막지질의 구성비에 따라 막의 fluidity가 조절됨으로써 각종 대사물의 투과가 조절 (Martonosi, 1975)되고 효소활성도 조절될 것으로 생각된다.

이와같이 생체막에 결합된 효소의 활성은 막지질을 필요로 하거나 또는 이에 의하여 조절될 뿐만 아니라 연령이 많아짐에 따라 효소의 비활성(specific activity)

이 저하된다고 보고하고 있다(Grinna & Barber, 1972; O' Bryan & Lowenstein, 1974).

이자들은 이에 관하여 어린백서와 성숙백서의 간 및 뇌조직의 microsomal membrane 지질함량과 효소활성과의 관계를 비교 검토하여 여기 보고하는 바이다.

### 실험재료 및 방법

#### 실험재료

실험동물로 Sprague-Dawley strain의 백서를 암수 구별없이 사용하였다. 생후 6~7월이 지나서 체중이 200~250g인 백서를 성숙백서로 생후 2~3주일의 체중이 20~25g인 백서를 어린백서로 사용하였다.

D-Glucose-6-phosphate monosodium salt 및 각종표준지질은 Sigma Chem. Co. (St. Louis, Mo., U.S.A)로부터 Tris와 유기용매는 Merck Co. (Darmstadt, Germany)로부터 sucrose의 무기 시약은 Kanto Chem. Co. (Tokyo, Japan)로부터 각각 구입하였으며 모든 유기용매는 재증류하여 사용한 것이고 N-nitrosomethyl urea는 합성하여 사용하였다.

#### 실험방법

##### Microsome의 분리

경동맥을 절단하여 희생시킨 백서로부터 간 및 뇌를 즉시 적출하였다. 실험 매회마다 성숙백서는 6마리씩, 어린백서는 14마리씩 희생시켜 이로부터 뇌 및 간조직을 각각 월령에 따라 pool로 하여 사용하였으며, 간은 냉각된 0.25M sucrose, 0.5mM CaCl<sub>2</sub>, 5mM Tris pH7.4인 용액에 넣고 가위로 잘게 잘라서 잘 흔들어 준 후에 그 용액을 딸아내어 버렸다. 이렇게 3번 반복함으로써 가능한한 적혈구를 제거하였다. 다음 이것을 teflon

pestle로 된 Potter-Elvehjem homogenizer로 갈아서 그 용액으로 10% homogenate를 만들었으며 뇌조직은 바로 Potter-Elvehjem homogenizer로 10% homogenate를 만들었다.

간 및 뇌조직의 homogenate를 MSE CENTRISCAN 75 원침기와 8×50ml aluminum angle rotor를 사용하여 우선 15,000×g로 20분간 원침하여 그 침전을 버린 다음 그 상층액을 다시 105,000×g로 1시간 동안 초원침하였다. 여기서 얻어진 침전을 Potter-Elvehjem homogenizer로 0.25M sucrose, 5mM Tris(pH 7.4)용액에 부유시키어 microsome분획으로 사용하였다.

**Glucose-6-phosphatase 활성측정**

효소반응계는 최종용량이 0.5ml이고 0.06M acetate-succinate (pH 6.0), 0.02M glucose-6-phosphate 및 microsomal suspension 0.1ml로 조성된 것으로(Swanson, 1955; Grinna & Barber, 1972) 이 반응용액은 38°C에서 10분간 incubate시킨 후 10% trichloroacetic acid 1ml를 가하여 반응을 정지시켰다.

침전된 단백질은 원심분리하여 제거하고 그 상층액 중에 유리된 무기인을 Fiske and Subba Row(1925) 방법에 따라 정량하였다.

효소활성의 단위는 1시간동안 glucose-6-phosphate로부터 1 μmole의 무기인을 유리시키는데 필요한 양을 1 unit로 정의하였다.

**단백질 정량**

각 시료의 단백질은 Lowry방법(1951)에 따라 정량하였고 crystalline bovine serum albumin을 표준단백질로 사용하였다.

**지질의 추출**

Microsomal suspension의 단백질을 Lowry방법으로 정량한 다음 그 일정용량을 polyethylene 원침관에 옮겨 MSE Centriscan 75원침기를 사용해서 105,000×g로 1시간동안 원침하였다. 이 때 생긴 침전에 chloroform-methanol, 2:1(v/v)를 가한 다음 30분간 stirring rod로 매우 세게 휘저어 만든 emulsion을 4,000×g로 20분간 원침하였다. 응고된 단백질층 밑의 chloroform-methanol층을 spoid로 뽑아 옮긴 다음 그 잔재에 chloroform-methanol을 다시 가하여 위와 같은 지질 추출 과정을 3번 더 반복하였다.

이 지질 추출용액을 함께 합하여 separatory flask에 옮기고 전체 지질 추출용액부피의 0.2에 해당하는 0.9% NaCl용액(Folch et al., 1957)를 가한후 세게 흔들어 emulsion을 만든 다음 반세도록 방치하였다가 유기용매층을 단백질층과 수용액층으로부터 분리하였다. 유

기용매층을 감압건조시킨 후 일정량의 chloroform-methanol 19:1 (v/v)에 녹이어 박층크로마토그래피(TLC) 분석 및 phospholipid의 인 정량에 사용하였다.

**Phospholipid의 인정량**

지질 추출액을 5N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 및 2N HNO<sub>3</sub>로 산화 분해시킨 다음 유리된 무기인을 Fiske-Subba Row방법에 따라 정량하였다.

**Thin layer chromatography(TLC)**

200mm×200mm의 TLC용 유리판에 Silica Gel G (Merck제)를 0.5mm의 두께로 입혀 120°C oven에서 1시간동안 활성화시킨 것을 desiccator속에 넣어 냉각시킨 다음, 시료를 적용하여 petroleum ether-diethyl ether-acetic acid 85:15:2(v/v)의 혼합용매로 전개시켰다(Hoeven & Emmelot, 1972). 전개가 끝난후에 TLC 판을 꺼내 유기용매를 증발시킨 다음, ammonium molybdate-perchloric acid(중류수 50ml, conc. HCl 2.5ml 및 60% perchloric acid 15ml의 혼합용액에 ammonium molybdate 3g을 녹임) 시약을 분무하여 80°C dry oven에 5분간 방치하므로써 분리된 지질 class를 착색케 하였으며 또 표준지질의 Rf치와 비교 동정하였다.

**지질 class의 정량**

TLC판을 6개의 길(lane)로 나누어 길 1에는 표준지질을 길 2, 3, 4 및 5에는 50μl의 시료를 각각 적용하고 길 6은 blank로 비워 두었다. 전개가 끝난 다음 길 1을 제외한 부분을 모두 aluminium박지로 덮고나서 ammonium molybdate-perchloric acid 시약을 분무하여 길 1의 표준지질만을 정색시켰다.

blank길을 포함하여 각 시료길에서 표준지질의 위치에 해당하는 부위의 gel을 잘 끊어내어 마개달린 10ml 시험관에 주의하여 모두 옮긴 다음 시험관에 potassium dichromate용액(conc. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 100ml에 0.25g의 potassium dichromate를 녹임) 2ml를 가하여 끓는 수조에서 때때로 흔들어 주면서 40분간 가열하였다. 이것을 원심분리한 후 상층액 1ml를 중류수로 10배로 희석하여 파장 350nm에서 Pye Unicam SP 1750 UV spectrophotometer를 사용하여 그 흡광도를 측정하였다. 표준지질로는 cholesterol, cholesteryl stearate, tristearin 및 stearic acid를 사용하였으며 다음과 같은 방식으로 각 지질 class의 양을 산출하였다.

$$\frac{\text{gel 대조의 흡광도} - \text{시료의 흡광도}}{\text{gel대조의 흡광도} - \text{표준지질의 흡광도}} \times \text{표준지질의 양} = \text{시료지질의 양}$$

**지방산의 methyl ester조제**

Microsomal membrane으로부터 추출된 총지질용액

을 감압건조시킨 후 지방산을 검화하기 위하여 그 잔재에 0.5N alcoholic KOH를 가하여 끓는 수조에서 30분간 가열하다가 용액을 다시 감압 건조 시켜서 생긴 잔재에 증류수를 가하여 이것을 용해시킨 다음 이 용액에 ether를 가하여 검화되지 않는 cholesterol을 ether층으로 추출하였다. 다음 수용액층을 묽은 황산으로 산성화한 후 ether를 가하여 ether층으로 지방산을 추출하고 ether에 N<sub>2</sub>가스를 도입하여 증발시켜 얻은 잔재에 다음과 같이 준비된 diazomethane-ether용액을 가하여 지방산을 methyl ester화 시켰다. 즉 N-nitrosomethyl urea를 물에 녹인 후 이에 ether를 증침시키고 conc. NaOH를 가하여 diazomethane-ether용액을 얻었다. 이와 같이 지방산 methyl ester의 ether 용액에 증류수를 가하여 그 증류수층의 pH가 중성이 될 때까지 반복 세척한 다음, 세척된 ether층을 물층으로부터 분리하여 질소가스로 증발시켜 얻은 잔재에 dichloromethane을 가하여 용액으로 만든 것을 gas chromatography 측정용으로 삼았다.

Gas chromatography

지방산의 gas chromatography는 Pye Unicam GCV를 사용하여 다음과 같은 조건에서 시행하였다. Column (4mm×1.5m)은 15% DEGS로 피막된 80~100mesh의 Diatomite로 채웠다.

Column의 온도는 180°C이고, carrier gas로는 질소를 사용하여 column을 30ml/min속도로 용출하였으며 용출된 물질은 flame ionization detector로 200°C에서 검출하였다. 시료중의 각 지방산은 표준지방산의 retention time과 시료의 각 지방산의 그것과 비교함으로써 동정하였고 몇가지의 지방산은 지방산의 탄소수에 대한 log<sub>10</sub> retention time의 그래프상으로부터 동정하였다. 각 peak의 면적은 Pye Unicam DP 88 computing integrater로 계산하였다.

결 과

Table 1은 백서가 성장함에 따라 간과 뇌조직의 발육속도가 다름을 보여주고 있다. 즉 체중 20~25g의 어린백서의 간의 무게는 평균 1.4g이고 체중 200~250g의 성숙백서의 간의 무게는 평균 8.7g으로서 약 6배의 차가 있으나 뇌의 무게는 어린백서의 평균치인 1.3g에 비하여 성숙백서의 그것은 평균 1.6g에 불과하여 큰 차이가 없음을 알 수 있다.

이와같이 어린백서의 뇌는 간의 발육과는 대조적으로 생후 3주일만에 벌써 거의 성숙뇌에 육박하고 있음

Table 1. Weight of liver and brain from young and adult rats.

	Body weight (g)	Liver weight (g)	Brain weight (g)
Young rat(2~3 weeks)	20~25	1.4±0.2	1.3±0.1
Adult rat(6~7 months)	200~250	8.7±0.5	1.6±0.2

Each value represents the average±S.D. of weights of liver and brain from 14 young and 6 adult rats.

Table 2. Specific activity of glucose-6-phosphatase of microsomal fraction from liver and brain of young and adult rats

	G-6-Pase (μ mole Pi/mg protein/hour)	
	Liver	Brain
Young rat	18.2	0.97
Adult rat	11.3	0.88

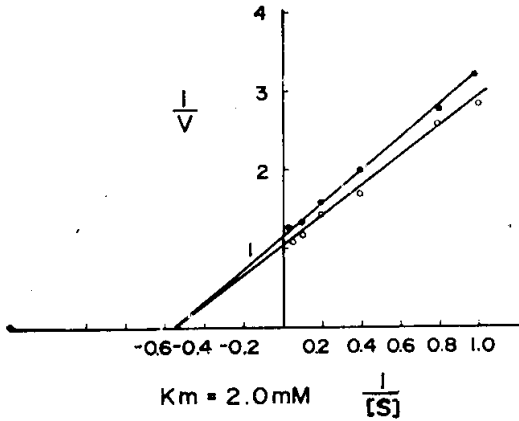
Each value represents the average from triplicate determinations.

을 알 수 있다(Table 1).

Endoplasmic reticulum의 marker enzyme인 glucose-6-phosphatase의 비활성은 발육이 한창 왕성한 단계에 있는 어린백서의 간조직에서는 18.2(μmole of Pi/hour/mg protein)로서 성숙백서의 11.3보다 훨씬 높지만 발육이 거의 성숙단계에 이른 어린백서 뇌조직에서는 0.97로서 성숙백서 뇌조직에서의 0.88보다 별로 높지 않았다(Table 2). 간조직의 glucose-6-phosphatase 비활성을 Lineweaver-Burk plot한 결과 어린백서와 성숙백서의 glucose-6-phosphatase의 Km값은 각각 2.0 mM로서 같았으나(Fig. 1) 성숙백서의 Vmax값이 어린백서의 그것보다 낮았다.

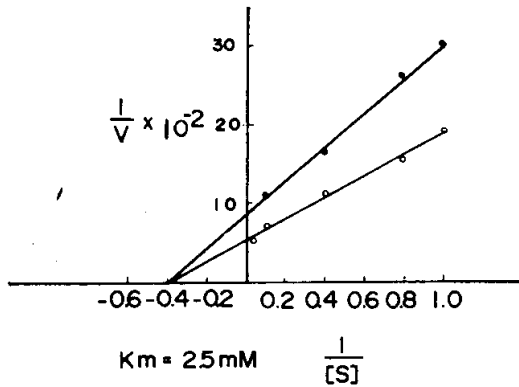
어린백서와 성숙백서의 뇌조직의 glucose-6-phosphatase의 Km값은 각각 2.5mM로서 같지만(Fig. 2) 간조직의 그것보다는 약간 높고 어린백서의 Vmax는 성숙백서의 그것에 비하여 별로 높지 않았다.

Microsomal membrane으로부터 추출된 중성지질은 TLC로 분리(Fig. 3) 정량되었고 phospholipid는 인 정량을 통하여 평균분자량으로 계산되었으며 Table 3은 이에 관한 결과를 보여주고 있다. 간 microsomal membrane의 cholesterol ester의 함량은 단백질 1mg당 성숙백서가 10.7μg이고 어린백서는 8.5μg으로서 성장에 의한 차이는 없었다. 뇌 조직에서의 cholesterol ester 함량은 성숙백서가 7.4μg이고 어린백서는 6.8μg으로



**Fig.1.** Lineweaver-Burk plot of glucose 6-phosphatase activity of isolated microsomal membrane from rat liver.

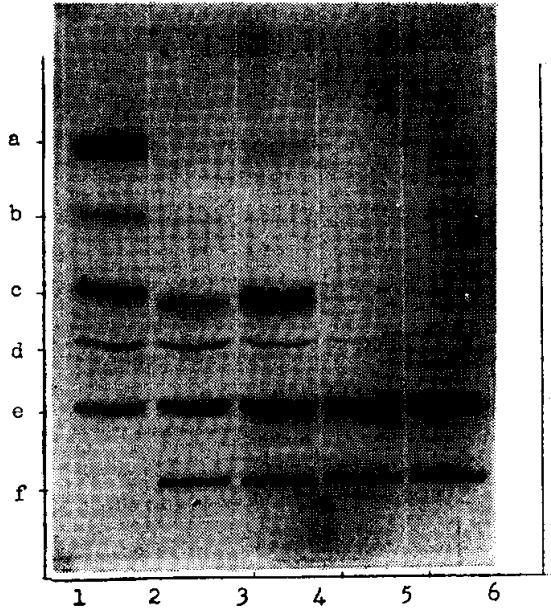
The velocity of the reaction is expressed as  $\mu$  moles of Pi released per hour per mg protein. The substrate is expressed as millimolar concentration of glucose 6-phosphate.



**Fig.2.** Lineweaver-Burk plot of glucose 6-phosphatase activity of isolated microsomal membrane from rat brain.

The velocity of the reaction is expressed as  $\mu$  moles of Pi released per hour per mg protein. The substrate is expressed as millimolar concentration of glucose 6-phosphate.

서 간조직에서보다 약간 낮았다. 간 조직에서의 triglyceride의 함량은 대략 10 $\mu$ g정도로서 성장에 의한 차이



**Fig.3.** Thin layer chromatogram for reference lipid classes and total lipids extracted from isolated microsomal membranes of rat liver and brain.

- a: cholesterol ester
- b: fatty acid methyl ester
- c: triglyceride
- d: free fatty acid
- e: cholesterol
- f: phospholipid
- 1: a lane for reference lipids
- 2: a lane for lipid from young rat liver
- 3: a lane for lipid from adult rat liver
- 4: a lane for lipid from young brain
- 5: a lane for lipid from adult rat brain
- 6: a blank lane

는 거의 없었고 뇌조직에서는 triglyceride는 거의 검출되지 않았다. 간조직에서의 유리지방산의 함량은 성숙백서가 20.8 $\mu$ g이었고 어린백서가 18.5 $\mu$ g으로서 성장에 의한 차이는 별로 없었다. 그러나 뇌조직에서의 유리지방산 함량은 간 조직에서의 함량보다 약간 높은 편이며 성숙백서가 26.0 $\mu$ g으로서 어린백서의 20.0 $\mu$ g보다 약간 높았다. 간 조직에서의 cholesterol함량은 성숙백서가 32.8 $\mu$ g으로서 어린백서의 21.2 $\mu$ g보다 훨씬 높고 뇌 조직에서의 cholesterol함량은 간 조직에서의 그것보다 훨씬 높아서 성숙백서가 168 $\mu$ g이고 어린백서가 106 $\mu$ g으로서 성장에 의한 변화도 컸다.

간 조직에서의 인지질의 함량은 성숙백서가 386 $\mu$ g으

**Table 3.** Lipid content of isolated microsomal membrane from liver and brain of young and adult rats.

	Lipid class( $\mu\text{g}/\text{mg}$ protein)				
	Cholesterol ester	Triglyceride	Free fatty acid	Cholesterol	*Phospholipid
Young rat liver	8.52	10.1	18.5	21.2	341
Adult rat liver	10.7	10.9	20.8	32.8	386
Young rat brain	6.8	trace	20.0	106	491
Adult rat brain	7.4	trace	26.0	168	530

\* Based on the average molecular weight of phospholipids, 1 $\mu\text{mole}$  lipid phosphorus was converted to 930 $\mu\text{g}$  phospholipid.

로서 어린백서의 341 $\mu\text{g}$ 보다 약간 높은 편이고 뇌 조직에서의 인지질 함량은 성숙백서가 530 $\mu\text{g}$ 이고 어린백서의 그것은 491 $\mu\text{g}$ 으로서 성장에 따라 약간의 차이가 있었고 간 조직에서의 그것보다 훨씬 높았다.

막의 fluidity 조절에 중요한 역할을 하는 cholesterol 함량의 비를 표시한 것이 Table 4이다. 간 조직에서의 cholesterol/phospholipid(w/w)의 비는 성숙백서가  $8.5 \times 10^{-2}$ 로서 어린백서의  $6.2 \times 10^{-2}$ 보다 약간 높은 편이고, 뇌조직에서의 그 비는 성숙백서가  $31.7 \times 10^{-2}$ 로서

**Table 4.** The ratio(w/w) of cholesterol to phospholipid content of microsomal membrane from liver and brain of young and adult rats

Source of microsomal membrane	Cholesterol/Phospholipid (w/w)
Young rat liver	$6.2 \times 10^{-2}$
Adult rat liver	$8.5 \times 10^{-2}$
Young rat brain	$21.6 \times 10^{-2}$
Adult rat brain	$31.7 \times 10^{-2}$

**Table 5.** Fatty acid distribution in the lipid of isolated membrane from liver and brain of young and adult rats

Source of fatty acid	Fatty acid										
	14:0	16:0	18:0	18:1	18:2	18:3	20:4	20:5	22:0	22:5	22:6
Young rat liver	1.0	27.4	26.1	12.3	10.0	0.1	16.0	3.6	0.9	0.3	2.3
Adult rat liver	1.0	24.7	28.8	13.3	11.5	0.7	10.4	3.3	1.7	0.4	4.2
Young rat brain	0.7	9.2	5.8	18.3	—	0.2	2.8	20.6	—	18.2	24.2
Adult rat brain	0.7	13.4	9.5	18.2	—	1.9	2.7	19.2	—	17.0	17.4

Each figure is the mean of two separate determinations and is expressed as weight percent which is equivalent to area percent on the gas chromatogram.

어린백서의  $21.6 \times 10^{-2}$ 보다 훨씬 높았으며 또한 간 조직에서의 비보다 대략 4배정도 높았다.

Table 5는 백서 간 및 뇌의 microsomal membrane 으로부터 추출된 인지질의 지방산 분포를 gas chromatography로 분석한 결과이다.

간 조직 및 뇌 조직에서의 지방산 분포는 성장에 의한 큰 변화는 없었다. 그러나 간과 뇌의 두 조직사이의 지방산 분포차이는 대단히 컸다. 간 조직에서 palmitic acid(16:0)와 stearic acid(18:0)는 대략 각각 25% 정도였으나 뇌 조직에서는 대략 10%로서 간 조직에 포화지방산이 많음을 보여주고 있다. 그리고 불포화지방산인 arachidonic acid(20:4)의 분포를 보면 간 조직에서는 성숙백서가 10.4%이고 어린백서가 16.0%로서 어

린백서가 성숙백서보다 불포화지방산의 함량이 클 수 있다.

한편 뇌조직에서는 성숙백서가 2.7%, 어린백서가 2.8%로서 성장에 의한 차이는 없지만 이러한 불포화지방산의 함량은 간조직이 뇌 조직보다 훨씬 높은 것을 알 수 있다.

그러나 좀더 불포화도가 높은 지방산인 22:5의 분포는 간조직(Fig. 4, 5)에서는 성숙백서가 0.4%, 어린백서가 0.3%이나 뇌 조직에서는 성숙백서가 17.0% 및 어린백서가 18.2%로서 성장에 의한 차이는 거의 없으나 뇌 조직에서의(Fig. 6, 7) 분포는 간 조직에서의 그것보다 대략 40배 정도 높은 결과이다. 또한 22:6의 분포는 간 조직에서 성숙백서가 4.2%, 어린백서가 2.3%

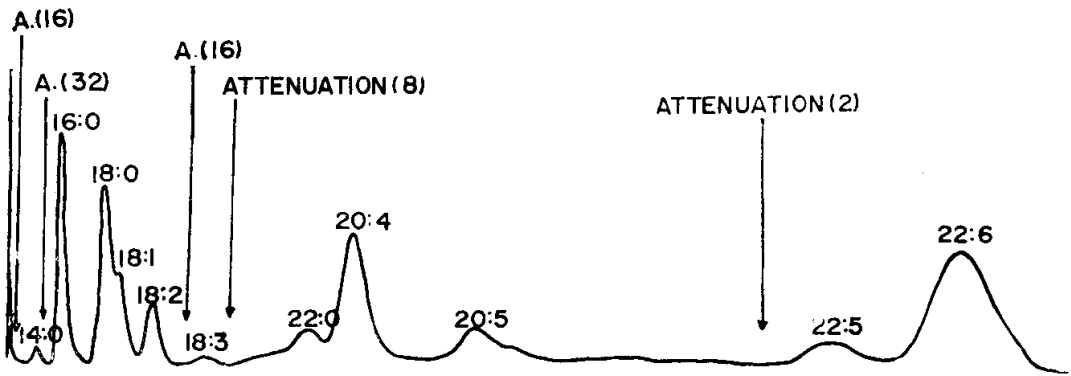


Fig. 4. Gas chromatogram of methyl esters of fatty acids in the lipid of isolated microsomal membrane from adult rat liver. 1.5m×4mm (I.D.) glass column packed with 10% DEGS on 80-100mesh Diatomite; temperature 180°C; nitrogen carrier gas 30ml/min; flame ionization detector; attenuation of the amplifier 10<sup>2</sup>xl; attenuation of the integrating calculator (Pye Unicam DP 88) is indicated on the gas chromatogram.

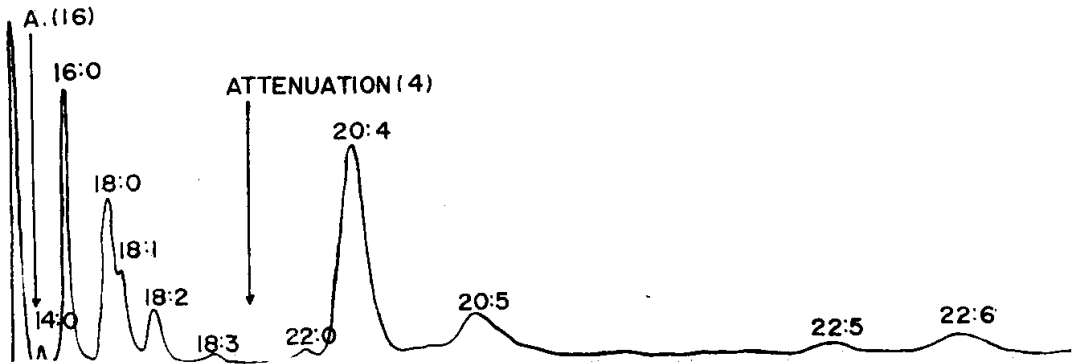


Fig. 5. Gas chromatogram of methyl esters of fatty acids in the lipid of isolated microsomal membrane from young rat liver.

The condition of gas chromatography is the same as described in Fig. 4.

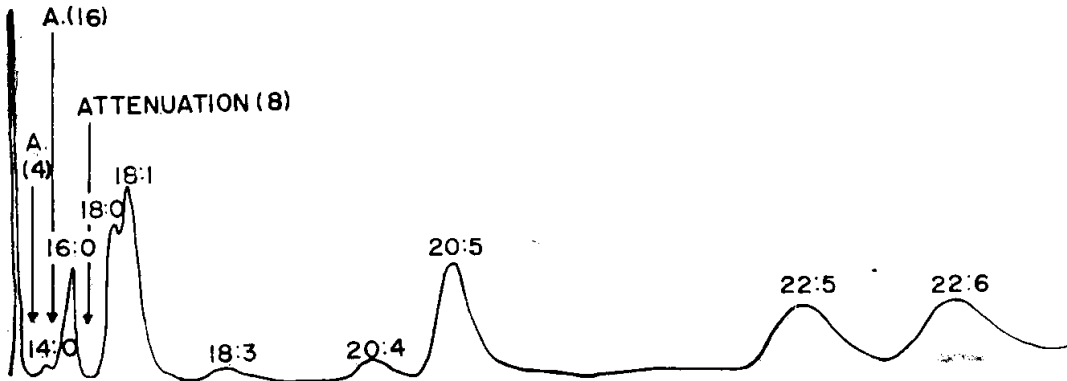


Fig. 6. Gas chromatogram of methyl esters of fatty acids in the lipid of isolated microsomal membrane from adult rat brain.

The condition of gas chromatography is the same as described in Fig. 4.

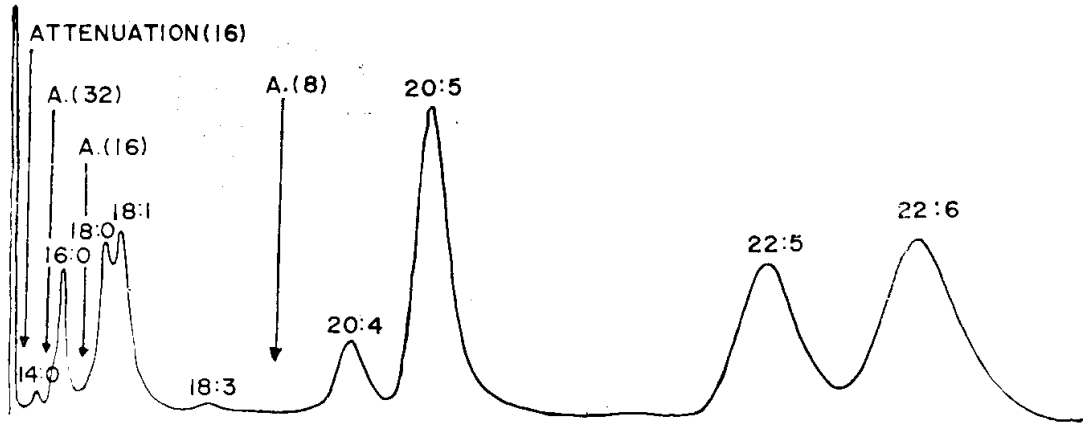


Fig. 7. Gas chromatogram of methyl esters of fatty acids in the lipid of isolated microsomal membrane from young rat brain.

The condition of gas chromatography is the same as described in Fig. 4.

이며 뇌 조직에서는 성숙백서가 17.4%, 어린백서가 24.2%로서 22:5와 함께 간 조직에서 보다는 뇌 조직에서 훨씬 높았다.

결과적으로 전체 불포화 지방산의 분포는 간 조직에서 보다는 뇌 조직에서 훨씬 높은 결과를 보여주고 있다.

### 고 찰

생체막은 주로 효소를 포함한 단백질 성분 및 지질 성분인 인지질과 cholesterol외에 약간의 당질을 포함하고 있다. 생체막에 결합된 효소의 활성은 막을 이루는 지질을 필요로 하거나 이에 의하여 조절된다고 보고하고 있다(Duttera et al. 1968; Vessey & Zakim. 1971; Emmelot & Bos, 1978). 본 실험에서는 성장에 의한 막 지질성분의 변화가 microsomal membrane에 결합된 glucose-6-phosphatase의 활성에 미치는 영향을 검토하였다. Glucose-6-phosphatase의 비활성은 간 조직에서는 어린 백서가 성숙백서보다 훨씬 높았지만 뇌 조직에서는 어린백서와 성숙백서 사이에 별차가 없었다. (Table 2).

그런데 6개월과 24개월 두 월령군의 백서 microsomal fraction의 NADPH cytochrome C reductase 활성(Grinna & Barber. 1972)과 3개월과 24개월 두 연령군의 백서 신장 plasma membran의 maltase 활성(O'Bryan & Lowenstein. 1974)은 월령이 증가함에 따라 감소한다는 보고도 있다.

한편 Table 1에서 보는 바와같이 어린백서의 간조직

은 한창 발육단계에 있는 조직이고 뇌조직은 거의 발육이 다된 상태에 있는 조직임을 알 수 있다. 이와 같은 사실은 성숙에 의한 glucose-6-phosphatase의 비활성의 차이가 조직의 발육 또는 membrane genesis와 관련이 있을 가능성을 말해 준다. 어린백서의 간 조직에서는 뇌조직에서 보다 세포증식에 필요한 각종 대사 과정이 훨씬 더 활발할 것으로 생각되며 이에 따라 membrane genesis도 더 활발할 것으로 생각된다. Membrane genesis의 기전은 아직도 잘 밝혀지지 않았지만 membrane genesis가 일어나려면 우선 membrane에 결합되는 단백질이 gene expression으로 생합성이 되어야 할 것이고 이어서 인지질, cholesterol 및 당질 등과 결합하여 생체막을 형성할 것으로 생각된다. 막에 결합된 효소의 비활성은 membrane genesis이후에 시간이 경과함에 따라 효소의 일부가 변성되고 이에 따라 gene expression으로 새로이 보충이 잘 안이루어질 경우에는 감소할 수 있고 막을 이루는 지질의 성분 변화 역시 효소의 conformation의 변화를 유도함으로써 감소할 수 있다고 추측할 수 있으나 본 논문에서는 후자의 경우만을 검토하였다.

Microsomal membrane으로부터 추출된 지질을 TLC 및 gas chromatography로 분석한 결과 성숙에 의한 지방산의 분포의 차이는 별로 없었지만 인지질 및 cholesterol함량은 현저한 차이가 있었다. 그런데 cholesterol은 생체막에서는 액체 결정상으로 존재하는 polyunsaturated fatty acid hydrocarbon chain의 유동성을 조절함으로써 안정된 막의 구조를 형성하는 것으로 알려져 있다.(Ladbooke et al., 1968). 이러한 cholesterol등의

합량 차이가 효소의 conformation을 변화시키어 효소 활성을 감소시킬 수 있는 가를 살피기 위하여 Km치를 측정된 결과 성장에 의한 차이는 없었다(Fig 1, 2). 이로써 성장에 의한 효소의 비활성의 감소는 막지질의 성분의 변화에 따른 효소의 conformation 변화에 크게 영향을 입은것 같지는 않다. 같은 월령에서 glucose-6-phosphatase의 비활성이 간 조직에서는 높고 뇌조직에서는 낮은 것은 조직에 따르는 지질성분의 변화도 있겠지만(Table 3, 4, 5) 세포가 분화되는 과정에서 그 조직의 특수한 대사의 필요에 따라 유전자에 의한 조절로 생각된다.

결론적으로 성장에 의한 효소활성의 감소는 막중의 활성효소분자농도의 감소에 기인한다고 생각된다.

## 요 약

Microsomal membrane의 효소활성 및 지질합량의 성숙에 의한 차이를 관찰하기 위하여 다음과 같은 실험을 하였다.

어린백서(체중 20~25g)와 성숙백서(체중 200~250g)로부터 microsomal membrane을 분리한 후 이에 결합된 glucose-6-phosphatase의 활성을 측정하고 또 막을 이루는 지질의 성분을 TLC 및 gas chromatography로 분석하였다.

그 결과를 요약하면 다음과 같다.

1. 두 연령군에서 간 무게의 현저한 차이로 보아 어린백서의 간은 한창 발육단계에 있는 조직임을 알수 있으나 성숙백서의 뇌의 무게는 어린백의 그것에 비하여 별차가 없으므로 백서의 뇌는 출생초기에 이미 발육이 거의 완결되는 것으로 볼 수 있다.

2. G-6-Pase의 비활성은 간조직에서는 어린백서가 성숙백서보다 상당히 높고 뇌조직에서는 어린백서가 성숙백서보다 약간 높으나 그 정도는 간조직에서보다 상당히 낮았다. 이러한 효소비활성의 차이를 조직의 발육과 관련하여 논의하였다.

3. Cholesterol ester, triglyceride 및 유리지방산의 함량은 어린백서와 성숙백서의 간 및 뇌조직의 microsome분획에서 의미있는 차이를 볼 수 없었다. 그러나 cholesterol과 인지질의 함량은 성숙백서가 어린백서에 비하여 상당히 증가하였으나 cholesterol/phospholipid의 비율은 약간 증가하는 경향을 보였다. 같은 연령군에서 cholesterol 및 인지질의 함량은 간조직보다는 뇌조직에서 상당히 높았다. 간 및 뇌 조직에서의 지방산 분포는 두 연령군 사이에 의미있는 차가 없으나 같

은 연령군에서는 불포화도가 높은 지방산의 함량은 간 조직보다는 뇌 조직에서 높았다.

4. 백서 간 및 뇌 microsome효소인 G-6-Pase의 Km치는 조직의 발육에 따른 변화가 없는 것으로 보아 백서 간 및 뇌 조직에서 성장에 의한 G-6-Pase의 감소는 성장에 의하여 지질성분의 변화에 따라 효소가 conformation의 변화를 받은 것 같지는 않고 막의 활성효소 분자의 농도 감소에 의한것으로 추측된다.

## —ABSTRACT—

### Age-related Changes in Lipid and Enzyme Activity of Microsomal Fractions from Rat Liver and Brain

Dong Won Chun and Han Woong Choi

Department of Pediatrics

Hong Keun Chung and Ki Yung Lee

Department of Biochemistry

College of Medicine, Seoul National University

The microsomal membranes were prepared from liver and brain tissues in two age groups of young(2-3 weeks) and adult(6-7 months) rats.

The activity of microsomal glucose-6-phosphatase (G-6Pase) was determined and the microsomal lipid composition was analyzed by means of TLC and gas chromatography.

The results were discussed in special reference to age-related changes, and are summarized as follows.

1. The marked difference in liver weight was observed between two age groups, showing active growing of liver tissue in young rats whereas no appreciable increase in brain weight was seen in adult rats, indicating the halt of brain tissue growth in very early stage of life.

2. The specific activity of G-6-Pase was much higher in young rat liver than in adult one and the slightly higher level of this enzyme was also observed in young rat brain, but much lesser extent than in liver.

The difference in the specific activity of the enzyme was discussed in relation to development of the tissues.



3. The contents of cholesterol ester, triglyceride and free fatty acid were not significantly changed in microsomal fractions from liver and brain between young and adult rats. The contents of cholesterol and phospholipid, however, were significantly increased in adult microsomal fraction as compared to young one, whereas the ratio of cholesterol to phospholipid was slightly increased in adult tissues. The contents of cholesterol and phospholipid were much higher in brain than in liver at the same age group. No significant change was observed in the fatty acid pattern in liver and brain at different age groups, but the polyunsaturated fatty acid content was much higher in brain than in liver at the same age group.

4. The apparent  $K_m$  value for microsomal G-6-Pase did not vary during development of the organs of rat, thus the decrease in the enzyme specific activity during development is supposedly due to the decrease in concentration of active enzyme molecules on the membrane rather than conformational alteration of the enzyme caused by alteration in lipid composition.

## REFERENCES

- Chung, H.K. and Lee, K.Y.: *A study on the lipid peroxidation in mitochondrial fraction from rat liver.* *New Med. J.*, 20:101, 1977.
- Colbeau, A., Nachbaur, J. and Viganais, P.M.: *Enzymic characterization and lipid composition of rat liver-subcellular membranes.* *Biochim. Biophys. Acta*, 249:462, 1971.
- Comte, J., Maisterrena, B. and Gautheron, D.C.: *Lipid composition and protein profiles of outer and inner membranes from pig heart mitochondria. Comparison with microsomes.* *Biochim. Biophys. Acta*, 419:271, 1979.
- Duttera, S.M., Byrne, W.L. and Ganoza, M.C.: *Studies on the phospholipid requirement of glucose-6-phosphatase.* *J. Biol. Chem.*, 243:2216, 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.
- Fiske, C.H. and Subbarow, Y.: *J. Biol. Chem.*, 66:375, 1925.
- Floch, J., Lees, M. and Sloane-Stanley, C.H.: *A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues.* *J. Biol. Chem.*, 226:497, 1957.
- Grinna, L.S. and Barber, A.A.: *Age-related changes in membrane lipid content and enzyme activities.* *Biochim. Biophys. Acta*, 288:347, 1972.
- Hoeven, R.P. Van and Emmelot, P.: *Studies on plasma membranes. XVIII. Lipid class composition of plasma membranes isolated from rat and mouse liver and hepatomas.* *J. Membrane Biol.*, 9:105, 1972.
- Hoeven, R.P. Van, Emmelot, P., Krol, J.H. and Oomen-meulemans: *Studies on plasma membranes. XXII. Fatty acid profiles of lipid classes in plasma membranes of rat and mouse livers and hepatomas.* *Biochim. Biophys. Acta*, 380:1, 1975.
- Kamataki, T. and Kitagawa, H.: *Effects of lipid peroxidation on activities of drug-metabolizing enzymes in liver microsomes of rats.* *Biochem. Pharmacol.*, 22:3199, 1973.
- Ladbrooke, B.D., Williams, R.M. and Chapman, D.: *Studies on lecithin-cholesterol-water interactions of differential scanning calorimetry and X-ray diffraction.* *Biochim. Biophys. Acta*, 150:333, 1968.
- 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.
- Martonosi, A.: *Membrane transport during development in animals.* *Biochim. Biophys. Acta*, 415:311, 1975.
- O'Bryan, D. and Lowenstein, L.M.: *Effect of aging on renal membrane-bound enzyme activities.* *Biochim. Biophys. Acta*, 339:1, 1974.
- Pfeifer, P.M. and McCay, P.B.: *Reduced triphosphopyridine nucleotide oxidase-catalyzed alterations of membrane phospholipids.* *J. Biol. Chem.*, 246:6401, 1971.
- Power, J.A., Harris, J.W. and Bainton, D.F.: *Lipid peroxidation and morphological changes in mammalian cells treated with the glutathione oxidant, diamide.* *Exp. Cell. Res.*, 105:455, 1977.
- Slater, T.F. and Sawyer, B.C.: *The stimulatory effects of carbon tetrachloride and other halogenoalkanes on peroxidative reactions in rat liver fractions in*

- vitro*. *Biochem. J.*, 123:805, 1971.
- Stadler, J. and Kleining, H.: *Nuclear membranes from mammalian liver. III. Fatty acids. Biochim. Biophys. Acta*, 223:315, 1971.
- Swanson, M.A.: *Glucose 6-phosphatase from liver. in Methods in Enzymology ed. by S.P. Colowick and N.O. Kaplan, Academic Press, Vol. 2, p. 541, 1955.*
- Vessey, D. and Zakim, D.: *Regulation of microsomal enzymes by phospholipids. II. Activation of hepatic uridine diphosphate-glucuronyltransferase. J. Biol. Chem.*, 246:4649, 1971.
- Zakim, D.: *Regulation of microsomal enzymes by phospholipids. I. The effect of phospholipases and phospholipids on glucose-6-phosphatase. J. Biol. Chem.*, 245:4963, 1970.