

Vitamin B₁₂ 와 Acetyl Choline 이 Rhodopsin 의
再生에 미치는 影響에 關하여

姜 成 浩
(梨花女子大學校 師範大學)

Studies on the Influence of Vitamin B₁₂ and Acetyl Choline
on the Regeneration of Rhodopsin

KANG, Sung Ho
(Department of Chemistry, Ewha Womans University)

(1959年 12月 8日 接受)

SUMMARY

The test group and control group, which were grouped with the same weight of five frogs (*Rana nigromaculata*) respectively, were adapted to light for two hours. Then the anterior lymph heart of the test group were injected with 0.5 cc of 0.1% acetyl choline and 0.5 cc of Vitamin B₁₂ (50mc gm/cc). After the frogs of this group were dark-adapted for 90 minutes, their heads were cut off under the dim red light and then their retinae removed from eye-balls were extracted with 2% digitonin solution for 20 hours at 0° C.

The results of the comparison of these two groups whose optical densities were measured before and after the illumination areas follows:

(1) The group which had been injected with 0.5 cc of 0.1% acetyl choline solution had the promotive action on the regeneration of rhodopsin in comparison with the control group.

(2) The group which had been injected with 25mc gm of Vitamin B₁₂ and 0.5 cc of 0.1% acetyl choline solution had the controlling action on the regeneration of rhodopsin in comparison with the control group.

I. 緒 論

Rhodopsin의 光作用에 關하여는 오랫동안 Wald 1), 2), 3), 4) 一派에 의하여 詳細히 研究가 推進되고 있는 중이다. 그 光作用의 mechanism에 關하여서도 상당히 廣範하게 알려져 있으며 특히 vitamin A 및 그 aldehyde가 rhodopsin의 光作用에 重要な 役割을 하고 있음은 周知의 事實이다. 그런데 vitamin A 以外の 藥物이 rhodopsin 再生에 關與하여 促進 또는 抑制作用을 함이 또한 여러가지로 報告되고 있다. 即 Kühne 및 Ayres⁵⁾가 pilocarpine에 對한 實驗을 하여 그것이 哺乳動物의 rhodopsin 再生을 促進시킴을 報告하였고 細谷⁶⁾는 개구리에 대하여 arecoline이 pilocarpine 보다 強力한 rhodopsin

再生 促進作用이 있음을 報告하였으며 그후 Hosoya 7), 8), 9), 10), 11), 등은 소위 lipotropic substance인 methionine, choline, betaine은 rhodopsin의 再生促進作用과 人眼暗應增進作用이 있으며 cystine, cysteine, creatine, creatinine은 cocaine에 못지않게 rhodopsin 再生의 抑制作用이 있음을 報告하였다. 또한 Hosoya는 lipotropic substance의 rhodopsin 再生促進作用은 그 transmethylation에 起因된 것이며 methionine과 betaine의 rhodopsin 再生促進作用의 差異는 methionine이 가진 S-CH₃基와 betaine이 가진 N-CH₃基의 差異에 依한 것이 아닌가고 解釋하였다. 그 후 Lee¹³⁾는 pilocarpine과 arecoline이 rhodopsin 및 visual violet의 再生促進作用

이 있음을 確認하고 이들 藥物은 N-CH₃基를 가졌기 때문일 것이라고 하였다. 또한 Hwang¹⁴⁾은 0.1% mono-iodo acetic acid를 개구리에 注射하면 rhodopsin의 再生이 完全히 抑制됨을 報告하였다. 著者¹⁵⁾는 methionine과 vitamin B₁₂가 rhodopsin의 再生에 미치는 影響을 研究하여 methionine은 rhodopsin의 再生을 促進시키나 vitamin B₁₂는 強力한 抑制作用을 하며 또한 methionine과 vitamin B₁₂를 함께 注射하였을 때 rhodopsin 再生을 抑制함을 確認하였다. 이번 다시 lipotropic substance인 choline과 vitamin B₁₂가 rhodopsin 再生에 미치는 影響을 實驗한 結果 새로운 知見이 생겼기 때문에 이에 報告하고자 한다.

II. 實驗方法

크기가 같은 참개구리 (*Rana nigromaculata* 25-40 g) 5 마리를 group로 하여 test group과 control group로 나누어서 glass製 水槽(徑30cm 길이 15cm)에 넣고 115 volt 200 watt 電球를 水槽 밑면에서 15cm되는 곳에 켜서 2時間 light adaptation시키고 rhodopsin이 完全히 褪色됨을 確認한 다음 test group에 對하여 acetyl choline (0.1% solution), vitamin E₁₂ (50mc gm/cc)를 各各 0.5 cc씩 胸部淋巴 心臟에 注射하여 90分間 暗室에 넣어 dark adaptation을 시킨 다음 微赤色光下(波長 650m μ 以上)에서 斷頭하여 눈을 뽑아 눈의 赤道部를 銳利한 가위로 切斷하여 眼球의 後半部를 生理食鹽水中에 넣고 핀셋으로 網膜을 剝離하여 group別로 모아 slide glass 위에서 網膜組織을 磨碎한 다음 3cc의 2% digitonin 水溶液으로 0°C에서 20時間 抽出하였다. 이것을 微赤色光下에서 遠心分離 (7000 rpm: 10分)한 다음 上澄液을 DU-Beckmann spectrophotometer로 波長 500m μ 에서 10mm cell로 그 optical density를 測定한 후 115 volt 200 watt의 projector로 20分間 光照射하여 rhodopsin을 完全히 破壞시켜서 다시 optical density를 測定하여 test group과 control group을 比較하였다. 그런데 light adaptation 시킬 때와 光照射時以外에는 모든 操作을 微赤色光下(650m μ 以上)에

서 進行하였으며 이때 室溫은 20°C였다. 또한 rhodopsin의 抽出은 暗室에서 行하였다.

III. 結果

1) 0.1% acetyl choline 鹽酸水溶液 (Roche 製)을 개구리 5마리에 各各 0.5 cc씩 注射한 結果는 表1과 같다.

Table 1. Optical density of the group injected with 0.5 cc of 0.1% acetyl choline solution.

| Number of Experiments | E | | E' | | E-E' | | T/C \times 100 of E-E' |
|-----------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------------------------|
| | T | C | T | C | T | C | |
| 1 | 0.040 | 0.032 | 0.020 | 0.020 | 0.020 | 0.012 | 166 |
| 2 | 0.024 | 0.016 | 0.006 | 0.002 | 0.018 | 0.014 | 129 |
| 3 | 0.030 | 0.024 | 0.010 | 0.008 | 0.020 | 0.016 | 125 |
| 4 | 0.028 | 0.024 | 0.015 | 0.006 | 0.013 | 0.018 | 138 |

E; Optical density of before bleaching. Average; 139.5
E'; Optical density of after bleaching.

E-E'; Difference optical density of before and after bleaching.

T; Test group C; Control group

0.1% acetyl choline을 注射한 group은 그 control group에 比하여 rhodopsin 再生量이 많아서 control group을 100으로 하면 平均 139.5였다. 이 結果로 細谷^{7), 8)} 등의 結果를 再確認하였다. 即 acetyl choline도 methionine과 같이 rhodopsin의 再生을 促進시킴을 確認하였다. 그런데 著者¹⁵⁾가 實驗한 methionine에 比하면 그 再生促進作用이 弱한것 같았다.

2) 0.1% acetyl choline과 vitamin B₁₂ (50mc gm per cc, PACIFIC STATES LABORATORIES INC. 製)를 各各 0.5 cc씩 함께 개구리 5마리에 注射하였을 때의 結果는 表2와 같다.

Table 2. Optical density of the group injected with 0.5 c.c of 0.1% acetyl choline solution and 25 mc gm. of Vitamin B₁₂.

| Number of Experiments | E | | E' | | E-E' | | T/C \times 100 of E-E' |
|-----------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------------------------|
| | T | C | T | C | T | C | |
| 1 | 0.038 | 0.032 | 0.028 | 0.020 | 0.010 | 0.012 | 83 |
| 2 | 0.052 | 0.042 | 0.028 | 0.012 | 0.024 | 0.030 | 80 |
| 3 | 0.026 | 0.032 | 0.018 | 0.018 | 0.008 | 0.014 | 57 |
| 4 | 0.014 | 0.016 | 0.004 | 0.002 | 0.010 | 0.014 | 71 |
| 5 | 0.030 | 0.024 | 0.016 | 0.008 | 0.014 | 0.016 | 87 |

Average; 75.4

0.1% acetyl choline과 vitamin B₁₂를 함께注射한 group은 그 rhodopsin 再生이 抑制됨을 C 確證하였다. 即 control group의 rhodopsin 再生量을 100 이라고 하면 그 test group은 平均 75.4였다. 著者¹⁵⁾가 實驗한 methionine과 vitamin B₁₂를 함께注射하였을 때와 同一한 結果가 되었다.

그런데 vitamin B₁₂ 注射藥의 安定劑로서 使用된 15% benzyl alcohol 生理食鹽水溶液은 rhodopsin 再生과는 아무 關係가 없음을 著者¹⁵⁾가 먼저 實驗하였기 때문에 이번에는 그 實驗은 하지 않았다.

VI. 考 察

먼저 著者¹⁴⁾는 methionine과 vitamin B₁₂가 개구리 網膜中の rhodopsin 再生에 미치는 影響을 考察하여 methionine은 強力한 促進作用이 있고 生體內에서 labile methyl group의 transmethylation에 關係가 깊은 vitamin B₁₂는 強力한 抑制作用이 있음을 確證 한바있는데 labile methyl group의 하나인 acetyl choline도 亦是 methionine과 같이 rhodopsin의 再生을 促進시키는데 그것을 vitamin B₁₂와 함께注射하면 強力한 抑制作用이 있음은 아마도 vitamin B₁₂의 強力한 抑制作用으로 因한 것이 아닌가 생각되는바이다. 이제 生體內에서의 choline과 vitamin B₁₂와의 作用을 살펴보면 다음과 같다.

即 Gills¹⁶⁾는 vitamin B₁₂가 choline, methionine과 같이 methyl group doner의 節減作用이 있으므로 transmethylation의 co-enzyme이 되어 있다고 하였으며 Schaefer¹⁷⁾ 등도 vitamin B₁₂ 投與로 병아리의 choline要求量은 減少된다고 報告하였다. 또한 Stekol¹⁸⁾ 등은 vitamin B₁₂가 labile methyl group의 合成에 關與하여 methionine, choline, creatine 등의 methyl 基 生成에 關與함을 證明하였다. Welch¹⁰⁾는 C¹⁴-formate을注射한 쥐의 組織中에서 C¹⁴-labelled methionine을 發見하고 그 生合成은 in vivo의 實驗이었는데 C¹⁴-formate, homocysteine, dimethyl-amino-ethanol, folic acid 및 vitamin B₁₂의 存在下에 肝切片中에서 C¹⁵H₃를 가진 methion-

ine, choline을 發見하였다. 또한 Chang²⁰⁾은 α-C¹⁴ labelled glycine을 使用하여 돼지에 實驗하였는데 vitamin B₁₂의 投與量을 增加시키면 glycine의 α-carbon이 choline의 methyl 基에 移行하는 量이 增加함을 觀察하였다.

이와같이 vitamin B₁₂는 choline, methionine, bataine 등의 labile methyl group의 合成과 그 methyl-group의 轉移에 깊은 關係가 있음이 報告되고 있다.

그런데 細谷¹²⁾ 등은 lipotropic substance가 rhodopsin의 再生을 促進시키는 것은 그 labile methyl group에 起因된다고 하였는데 그 labile methyl group의 轉位에 깊은 關係가 있는 vitamin B₁₂의 強力한 抑制作用은 앞으로 究明되어야 할 興味있는 問題라고 생각 되는바이며 또한 labile methyl group인 acetyl choline과 그 methyl group의 轉位에 co-enzyme 役割을 하는 Vitamin B₁₂가 rhodopsin의 再生에서는 正反對作用을 함은 앞으로 究明되어야 할 興味 있는 問題라고 생각되는바이다.

V. 結 論

크기가 같은 참개구리 (*Rana nigromaculata*)를 5마리씩 group로 하여 test group과 control group로 나누어 2時間 light adaptation 시킨 다음 test group에 대하여 0.1% acetyl choline (0.5 cc)과 vitamin B₁₂ (25 mc gm)를 각각 胸部淋巴心臓에注射하여 90分間 dark adaptation 시킨후 微赤色光下 (650mμ 以上)에 그 눈에서 網膜을 剝離하여 3 cc의 2% digitonin 溶液으로 (6°C에서 20時間 抽出한 것을 光照射前과 後의 optical density를 測定하여 control group과 比較한 結果는 다음과 같다.

1) 0.1% acetyl choline 0.5 cc를注射한 group은 그 control group과 比較하여 불때 rhodopsin 再生의 促進作用이 있었다.

2) 0.1% acetyl choline 0.5 cc와 25 mc gm의 vitamin B₁₂를 함께注射한 group은 그 control group과 比較하여 불때 rhodopsin 再生의 抑制作用이 있었다.

本實驗을 積極의으로 指導해 주신 韓相準博士

와李世珪博士에게 深甚한 謝意를 表하는 바입니다.

文 獻

- (1) Wald, G. and Hubbard, R., Proc. Natl. Acad. Sci., 36, 92. 1950
- (2) Hubbard, R. and Wald, G., J. Gen. Physiol., 36, 269. 1952
- (3) Hubbard, R., Gregerman, R.I. & Wald, G., ibid, 36, 415. 1952
- (4) Wald, G., Science, March, 16, 1951
- (5) Ayres, W.C. U. W. Kuhne, Unters, Physiol. Intst. Heiderberg 2, 215. 1878-82
- (6) 細谷雄二, 日本生理誌, 7, 499. 1942
- (7) Hosoya, Y., H.S. Fang and M.T. Peng., Tohoku J. Exp. Med., 53, 103. 1950
- (8) Hosoya, Y. H.S. Fang and M. T. Peng, ibid. 53, 109. 1950
- (9) Hosoya, Y., Abst. 19 Intern. Physiol. Congr., 480. 1953
- (10) Hwai, S. T., Tohoku J. Exp. Med., 53, 115. 1950
- (11) Hwang, T. F. and Y. Hosoya, Jap. J. Physiol., 1, 64. 1950
- (12) 細谷雄二, 日本生理誌, 19, 227. 1957
- (13) Lee, J. Physiol. Soc. Jap. 19, 837. 1957
- (14) Hwang, T. F., Jap. J. physiol. 1, 69. 1950
- (15) 姜成浩 (梨花女子大學校 韓國文化研究院學術論文集, 發刊中)
- (16) Gillis, M.B., Norris, L. G., J. Biol. Chem., 179, 489. 1949
- (17) Schaefer, A. E., Proc. Sec. Exp. Biol. Med., 71, 202. 1949
- (18) Stecol. T. A., et al. J. Biol. Chem., 203, 763. 1953
- (19) Welch, A. D., et al Federation proc., 9, 245. 1950
- (20) Chang, I., et al, Arch. Biochem. Biophys., 55, 151. 1955