무당개구리 肝의 아미노酸 成分에 關한 硏究

朴　　相　　允
(成均舘大學校・文理大・生物學科)
吳　　錫　　欣
(高麗大學校・文理大・生物學科)

Studies on Amino Acids in the Frog Liver (*Bombina orientalis* BOULENGER)

PARK, Sang Yoon
(Department of Biology, Sung Kyun Kwan University)
OH, Suk Hun
(Department of Biology, Korea University)

〔1960年11月1日 接受〕

SUMMARY

Paper partition chromatography has been applied to estimate the amino acids in the liver of *Bombina oriantalis* BOULENGER. The results obtained are as follows:

1) The presence of cystine, serine, glycine, threonine, alanine, β-alanine, tyrosine, histidine, asparagine, tryptophane, methionine, valine, phenylalanine, leucine and an unknown substance has been demonstrated in the alcoholic extracts of the material.
2) The presence of glutamine, cystine, serine, glycine, arginine, threonine, histidine, alanine, methionine, proline, valine, phenylalanine, leucine, and two unknown substances has been demonstrated in the acid-hydrolyzed liver.
3) Tyrosine, asparagine and tryptophane have been demonstrated only in the alcoholic extract.
4) Proline, glutamine and arginine have been demonstrated only in the acid-hydrolyzed liver.

Ⅰ 緖　論

무당개구리 (*Bombina orientalis* BOULENGER)에 關한 硏究로는 森(1928), 岡田(1828)의 分類學的인 것과 神邊(1933)의 形態學的인 硏究가 있으나 生理學的 硏究는 李(1960)에 依하여 esterogen에 依한 幼生의 生殖巢變化를 본 것 外는 別로 없다.

本實驗은 아미노酸 代謝의 重要한 器官인 肝의 遊離아미노酸과 蛋白質成分을 이루고 있는 아미노酸을 paper chromatography法으로 分析하였다. paper chromatography의 創始者는 Tswett (1906)였고 其後 Martin (1948)이 遊離아미노酸을 paper chromatography에 依하여 分離硏究했고, Martin and Synge (1940)가 20種 前後의 아미노酸組成의 硏究와 同時에 Fegle (1942)의 斑點分析法에 依하여 아미노酸을 paper chromatography에 依해서 分離하는 方法에 劃期的인 發展을 가져 왔다.

Kunkel and Tiselius (1951)는 paper chromatography를 electrophoresis에 應用하여 아미노酸, peptide, protein의 分離를 可能하게 하였고, Stein and Moor (1948, 1951)는 paper chromatography에 依해서 아미노酸의 定量에까지 發展시켰다. 또한 Foster and Ritenberg (1940)의 同位元素稀釋法과 같은 近代的인 方法에 이른 것이다.

Schurr, Thompson, Henderson and Elvetem (1950)은 쥐의 肝, 腦, 筋, 脾의 아미노酸을 調査하였는데 肝에서는 12種을 確認하고 있으며 Buchanan (1951)과 Buchanan and Nakao (1953)는 쥐 肝에서 18種의 아미노酸을 確認했고 그의 濃度를 밝혔으며 Tallan, Moor and Stein (1954)은 고양이 肝의 遊離아미노酸을 些細하게 調査한 것이 있다. 무당개구리는 進化學的으로 重要한 位置에 있을 뿐 아니라 韓國과 對馬島, 滿洲, 中國北部에만 分布하고 있는 兩棲類로서 生態學的인 特殊性과 關聯하여 그의 아미노酸 代謝를 硏究하는 一端으로서 本實驗을 했기에

報告한다.

Ⅱ 實驗材料와 方法

實驗材料는 서울近郊 貞陵溪谷에서 1960年 7月 8日부터 10月 31日 사이에 採集한것 170匹을 使用하였다. 水溫 23°±3°C의 넓은 水槽에서 飼育했고 每日 1回式 井水를 갈아 주었다.

1. 遊離아미노酸

무당개구리를 水槽에서 꺼내어 斷頭하여 卽死케 한後 腹部를 解剖하여 新鮮한 肝을 摘出한 다음 肝內에 含有되어 있는 血液을 除去하기 爲하여 엷게 切片을 만들어 蒸溜水로 水洗한 다음 濾過紙에 水分을 吸收시키고 이를 40°—50°C의 dry oven內에서 乾燥시켜 7g을 秤量하였다.

秤量한 7g의 肝에 80% ethanol 60cc를 加하여 homogenizer로 磨碎한 다음 室溫에서 24時間 處理한 後 濾過하여 濾液에 50%의 trichloroacetic acid (T.C.A.)를 加하여 protein을 一次 除去하였다. 다시 T.C.A.를 加하여 3,000 rpm으로 5分間 遠心分離하여 上澄液만을 얻어 이를 Holtfrester, Koszalka and Miller의 方法에 依하여 ice box에 一晝夜 放置한後 白色沈澱을 濾過하여 80°C의 water bath 위에서 加熱濃縮시킨 다음 10% isopropyl alcohol 0.5cc와 蒸溜水 5cc를 加하여 paper chromatography의 試料로 使用하였다.

2. 加水分解

무당개구리 肝 切片 3.5g을 秤量한 다음 12時間 soxhlating하여 脂肪을 完全히 除去하였다. 脂肪을 除去한 肝 切片을 다시 6N의 鹽酸 45cc를 넣은 round bottom flask에 投入하여 115°—125°C되는 oil bath 위에서 20時間 加熱分解시켰다. 分解物을 濾過하여 10cc의 dist. water을 10回 反復하여 주면서 加熱濃縮시켜 HCl을 完全히 蒸發시키고 여기에 10%의 isopropyl alcohol 0.5cc와 dist. water 4cc를 加하여 paper chromatography의 試料로 使用하였다.

3. 아미노酸의 分離

Paper chromatography의 吸着劑로서는 東洋濾紙 No. 52를 四方 26cm로 切斷한 것을 使用하였다. 溶媒는 一次元에 있어서는 phenol과 H_2O를 7:3의 比率로 混合한 것을 使用하였고 二次元에 있어서는 butanol과 acetic acid 그리고 H_2O를 4:1:1의 比率로 混合하여 24時間 放置한後 그 上澄液만을 使用하였다.

展開時間은 一次元에서 11時間 20分, 二次元은 8時間이 所要되었으며 溫度는 21°±1°C에서 行하였다.

Chromatogram의 乾燥는 Brush, Bontwall, Barton and Heiderberger (1951)는 80°C 以下가 適當하다 하였고, Novellie (1950)는 20°C가 最適當함을 報告하였는데 本實驗에서는 이를 兩者의 中間인 50°—60°C에서 butanol 냄새가 나지 않을 때까지 乾燥시킨 다음에 이 濾紙에 0.2% ninhydrine solution을 spray하여 80°C에서 10分間 呈色시켜 各 아미노酸의 spot를 얻어 standard 아미노酸의 Rf値와 對照하였다.

Ⅲ 結 果

1. 무당개구리 肝의 alcohol 抽出物에 依한 試料를 二次元 展開시켜 ninhydrine을 噴霧한 結果 遊離아미노酸의 spot는 Fig. 1과 같고 Fig. 1에 나타난 spot의 Rf 値로서 確認된 아미노酸의 種類와 發色한 spot의 크기와 色의 濃度로서 決定한 比較含量은 Table 1과 같다.

2. 무당개구리 肝의 鹽酸加水分解物을 試料로 하여서 二次元 展開시켜 ninhydrine을 噴霧한 結果 아미노酸 spot의 位置는 Fig. 2와 같고 Fig. 2에 나타난 spot의 Rf 値로서 確認한 아미노酸의 種類와 發色한 spot의 크기와 色의 濃度로서 決定한 比較含量은 Table 2와 같다.

遊離아미노酸及 鹽酸加水分解物의 아미노酸을 一次元 及 二次元 展開시킨後 Rf 値를 決定하여 標準아미노酸의 Rf 値와 比較한 結果 一次元에 있어서는 cystine, asparagine, tryptophane, glutamine, threonine이 一般的으로 上昇된 값을 表示했는데 二次元에 있어서는 glycine,

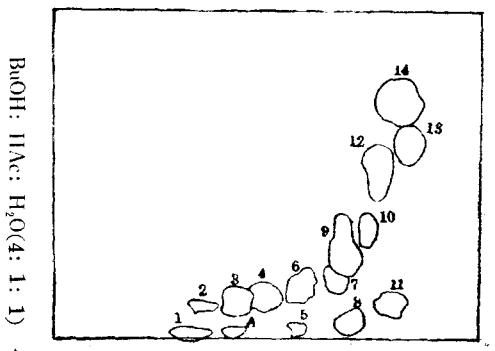

Fig. 1. Two dimensional paper chromatography of free amino acids in the frog liver.

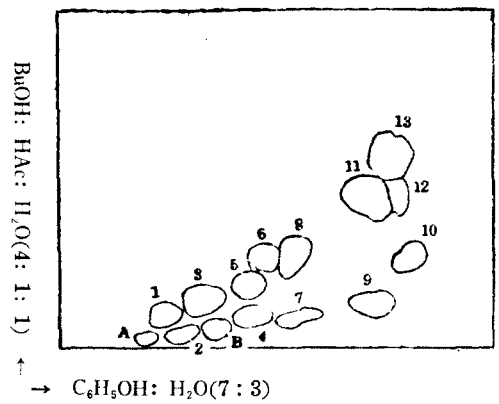

Fig. 2. Two dimensional paper chromatography of hydrolyzed solution of the frog liver.

Table 1. Free amino acids in the frog liver.

Number of spots	Constituents	Relative contents
1	Cystine	+ +
2	Serine	+
3	Glycine	+ +
4	Threonine	+ +
5	β-alanine	+
6	Alanine	+ +
7	Tyrosine	+
8	Histidine	+
9	Asparagine	+ + +
10	Tryptophane	+ +
11	Methionine	+ +
12	Valine	+ + +
13	Phenylalanine	+ +
14	Leucine	+ + +
A	Unknown	

histidine, methionine이 若干 上昇된 값을 表示했다.

遊離아미노酸(Fig. 2)의 chromatogram에서는 asparagine은 濃紫色, histidine, alanine, β-alanine, cystine, serine, glycine, threonine, tyrosine, tryptophane, valine, phenylalanine, leucine은 弱紫色을, 그리고 methionine은 엷은 紫色을 表示했다. 鹽酸加水分解에 依한 아미노酸(Fig. 2)의 chromatogram은 serine, glutamine은 濃紫色을, glycine, arginine, threonine, alanine, leucine은 强紫色을 表示하였다. Dent (1948)에 依하면 最少檢出量은 各 아미노酸에 따라 다른데 同一濃度의 標準液에 있어서는 色調의 强弱으로 確認할 수 있다 하였다.

Table 2. Amino acids of hydrolyzed liver extract of the frog.

Number of spots	Constituents	Relative contents
1	Glutamine	+ +
2	Cystine	+
3	Serine	+ +
4	Glycine	+ +
5	Arginine	+ +
6	Threonine	+
7	Histidine	+
8	Alanine	+ +
9	Methionine	+ +
10	Proline	+ +
11	Valine	+ + +
12	Phenylalanine	+ +
13	Leucine	+ + +
14	Unknown (A)	
15	Unknown (B)	

Ⅳ 考 察

Tallen, Moor, Stein (1954)이 고양이 肝에 含有되어 있는 遊離아미노酸과 蛋白質加水分解에 依하여 얻은 아미노酸에 對하여 報告한 것과 比較하여 보면 本實驗에서 抽出한 무당개구리 肝의 遊離아미노酸 以外에 arginine, asparagine, aspartic acid, citrulline, isoleucine, ornithine, proline, taurine, γ-aminobutylic acid, β-aminobutylic acid, aspartic acid, felinine, glutamic acid, glycerophosphoethanolamine, 3-methylhistidine, phosphoethanolamine이 많았으며 蛋白質加水分解物에 있어서는 aspartic acid, asparagine, glutamic acid, β-alanine, isoleucine, tyrosine, ornithine, lysine이 많았고, 무당개구리 肝의 蛋白質加水分解物에서 抽出한 glutamine과 methionine은 고양이 肝의 蛋白質加水分解物에서는 抽出되지 않았다.

Cohen (1955)은 glucose에서 分解된 C_3-compound에서 serine이 生成되어 glycine과 相互 轉換된다고 하였고, 其後 Arnstein and Kegelevic (1956) 及 Tchihara and Greenberg (1955)는 C^{14}-glucose를 쥐에 주었을 때 serine과 glycine에 C^{14}이 labeled 된 것을 보아 亦是 glucose에서 分解된 C_3-compound에서 serine이 生成되어 glycine과 相互轉換 된다 하였다. 무당개구리 肝에서도 serine

과 glycine이 共存하므로 이러한 反應의 可能性이 있으리라고 生覺한다.

Embden (1913)에 依하면 phenylalanine에서 tyrosine이 生成된다는 것이 일찌기 알려졌는데 Udenfriend and Cooper (1952)는 흰쥐, 개, 海猪, 사람 따위 哺乳類 肝에 이反應을 進行하는 酵素를 發見했는데 本實驗에서 이들 兩者가 共存하는 것으로 보아 兩棲類 肝에서도 위의 反應이 進行되리라고 生覺한다. 또한 尿素形成의 ornithine cycle에 關與하는 아미노酸인 ornithine, citrulline, arginine의 3가지가 다 같이 檢出되지 않았는데 *Rana catesbiana*는 Smith에 依하여 ureoteric라고 알려진데 比하여 生態的인 特性과 아울러 生覺할 때 무당개구리는 ammonetelic가 아닌가 生覺된다.

Ⅴ 摘 要

Paper chromatography 法에 依해서 무당개구리 肝의 아미노酸 成分을 分離한 結果는 다음과 같다.

1. Alcohol 抽出物中의 아미노酸은 cystine, serine, glycine, threonine, alanine, β-alanine, tyrosine, histidine, asparagine, tryptophane, methionine, valine, phenylalanine, leucine 그리고 未知物 A의 15種이다.

2. 鹽酸加水分解物中의 아미노酸은 glutamine, cystine, serine, glycine, arginine, threonine, histidine, alanine, methionine, proline, valine, phenylalanine, leucine, 그리고 未知物 A, B의 15種이 있다.

3. Tyrosine, asparagine, β-alanine, tryptophane은 alcohol 抽出液의 境遇에서만 檢出되었고 加水分解物에서는 檢出되지 않았다.

4. Proline, glutamine은 鹽酸加水分解物에서만 檢出되었다.

文 獻

Arnstein, H. R. V. & Kegelevic, D., 1952, Biochem. J. **62**; 199

Brush, M. M., Bontwell, R. K., Barton, A. D. M. & Heiderberger, C., 1951, Science, **113**; 4

Buchanan, D. K. M. 1951, J. Gen. Physiol. **34**; 407

Buchanan, D. K. M. & Nakao., Q. M., 1953, J. Biol. Chem. **200**; 470

Cohen, P., 1955, Amino Acids, Biogenes and Protein Synthesis, **51**

Dent, C. E., 1913, Biochem. J., **66**; 301

Embden, 1913, Biochem. J., **66**; 301

Feigl, F., 1938, Qualitative Analyse mit Hilfe von Tuperreaktionen.

Foster, G. L. & Ritenberg, D., 1940, ibid, **133**; 737

Holgester, J. M., Koszalka, U. R. M. & Leonal Miller, M., 1950, Exp. Celleres., **1**; 453

Ichinara and Greenberg, 1955, Natl. Acad. Sci. U. S., **41**; 605

神邊利重, 1933, 朝·溥·誌 15; 36

Kunkel, H. G. M. & Tiselius, A., 1951, J. Gen. Physiol., **35**; 89

Martin, A. J. P. & Synge, R. L. M., Advance in Chem., **2**; 1

Martin, A. J. P., 1948, ibid, **49**; 249

森爲三, 1928, 朝·溥·誌 **6**; 47

Novellie, L., Nature, **166**; 1000

岡田彌一郎, 1928, 朝·溥·誌 **6**: 15

Schurr, P. E., Thompson, H. T., Henderson, L. M. and Elvetem, C. A., 1950, J. Biol. Chem., **82**; 47

Smith, H. W., 1929, J. Biol. Chem., **81**; 727

Stein, W. H. & Moor, S., 1948, J. Biol. Chem., **176**; 337

Stein, W. H. & Moor, S., 1951, ibid, **192**; 663

Tallan, H. H., Moor, S. & Stein, W. H., 1954, J. Biol. Chem., **211**; 927

Tswett, M., 1906, Ber. Deutsche. Bot. Gesel., **24**;384

Udenfriend, S. & Cooper, 1952, J. Biol. Chem., **194**; 503

李元求, 未發表