

# 맹꽂이 組織內 遊離 아미노酸의 定性的 分析

河 斗 鳳 · 李 陽 林

(서울大學校 文理科大學 動物學科)

Qualitative Analysis of the Free Amino Acids in *Gallula tornieri* Tissues

HA, Doo Bong and LEE, Yang Lim

(Dept. of Zoology, College of Liberal Arts and Sciences, Seoul National University)

(1961年 12月 1日接受)

## SUMMARY

The present work deals with the patterns of the free amino acids in several tissues of *Gallula tornieri* VOGT analysed by means of paper chromatography and ion-exchange resins. The tissues used were heart, stomach, muscle, brain, testis, skin, and liver.

14 amino acids were detected in heart, 11 in muscle, 15 in stomach, 9 in brain, 10 in skin 12 in liver, and 10 in testis. It was found that there were distinguishable differences in the patterns of the free amino acids among the different tissues.

## I. 緒 論

動物組織內에는 蛋白質을 構成하는 아미노酸以外에 遊離狀態인 아미노酸이 多量存在하고 있다. 이 遊離아미노酸의 量과 種類는 動物의 種類에 따라 다름은 勿論이고 同一個體에서도 二組織에 따라 다르고 또한 同一組織에서도 二組織의 生理的 狀態, 成長度, 其他 여러 要因에 依하여 다른 것으로 알려져 있다 (Lowe, 1954). 組織에 따른 이와같은 分布相의 變異 或은 特異性은 組織의 機能과도 密接한 關係가 있는 것으로 생각되고 있다.

機能이 相異한 動物의 組織內에서 遊離 아미노酸을 分析하여 報告한 例는 많다. Awapara(1949, 1952)는 쥐의 成體組織에서 아미노酸을 分析하여 組織의 種類에 따라 各己 特異한 아미노酸 分布相이 있음을 發見하였다. Soloman, *et al* (1951)역시 쥐의 各 組織內에 含有되어 있는 아미노酸을 分析하여 報告하였다. 氏는 모든 組織內에 共通으로 가장 많이 含有되어 있는 아미노酸은 aspartic acid, glutamic acid, glutamine, glycine, alanine, serine, taurine, cystine, proline, hydroxyproline.이라고 하였다.

Roberts 와 Tishkoff (1949)는 쥐의 表皮에서, Cammarata 와 Cohen (1950)은 돼지의 心臟과 肝에서,

Roberts, *et al*(1951)은 雞胚의 腦, 肝, 心臟에서, Tallen, *et al* (1954)은 고양이의 肝, 腦, 筋肉, 腎臟에서 Hopwood (1957)는 소의 精巢와 그 附屬器官에서 遊離 아미노酸을 分析하여 報告한바 있다. Datta, *et al* (1953)에 依하면 動物의 尿의 아미노酸 成分에는 상당한 差異가 있다고 하였으며, 特히 Alton (1957)에 依하면 고양이科 動物의 尿에서만 felineine이 檢出되었다고 하였다. 이러한 事實은 種의 組織間에 아미노酸의 成分에 差異가 있다는 點을 明示해 주고 있다.

神經組織 및 腦의 아미노酸에 對한 研究는 Roberts, *et al*. (1950, 1951) Tallen, *et al*.(1957) 및 Okumura, *et al*. (1959)에 依해 行해졌다. 兩棲類에 對한 分析報告로서는 Li 와 Roberts (1949)가 *Rana pipiens*의 初期胚를 分析하여 極微量의 아미노酸의 存在만을 確認한 것이 있고 Holfreter (1950)는 同一한 調査에서 胚內 아미노酸의 種類를 判別하여 그 分布相이 다른 種類의 것과 類似하다는 것을 본것이 있다. 最近에 와서 Lowe(1954)는 쥐, 鷄, 兩棲類의 各 組織에서 아미노酸을 定性 및 定量分析하여 組織에 따라 特定된 아미노酸의 pattern을 比較觀察한바 있다.

이러한 事實로 미루어 보아 組織內에 含有된 아미노酸의 種類는 그 組織의 特定된 機能을 反映하는 것 같으며 따라서, 組織에 따른 分布相의 差異를 研究하는 것

은 動的狀態에 있는 組織內物質代謝의 樣相을 究明하는데 도움이 되리라고 생각된다. 이에 筆者는 遊離 아미노酸이 生物體構成物質合成의 一次의 材料이며 各種 物質代謝에서 重要な 役割을 하고, 또한 組織機能은 그 組織內物質代謝와 密接한 關聯이 있을 것이므로 nitrogen equilibrium에 있는 個體에서 數個 組織 사이의 分布相 差異를 調査하여 組織機能과 遊離 아미노酸 分布相의 相互 關係를 究明코져 멍꽂이 皮膚의 心臟, 筋肉, 肝, 精巢, 胃, 腦, 表皮內 遊離 아미노酸을 分析하였다.

本 實驗을 爲하여 始終 實驗上 여러가지 便宜를 提供하여준 서울大學校 文理科大學 動物學科의 여러 敎 室員들에게 感謝의 뜻을 表하는 바이다.

## II. 實驗 方法

### 1) 實驗動物 및 試料採取

個體平均重量 16g인 멍꽂이 (*Gallula tornieri* VOGT) 17個體에서 7個 組織을 取하여 實驗材料로 使用하였다.

10分間 ether로 마취시킨 個體의 腹部를 切開하고 精巢, 心臟, 胃, 肝, 筋肉, 腦, 表皮의 順으로 組織을 摘出하여 蒸溜水로 씻은 後 5% Trichloroacetic acid(TCA) 溶液內에 넣고 homogenize시켰다. Homogenize된 混濁液을 80~90°C의 oven에서 完全乾燥시킨 後 이 것을 mortar에서 磨碎하여 乾燥量을 稱量하고, 다시 5% TCA溶液속에서 36時間동안 放置시켜 蛋白質을 沈澱케 했다. 이 TCA溶液을 glass microfilter와 aspirator를 使用하여 減壓濾過하고 殘滓가 ninhydrin negative가 될때 까지 TCA를 加하여 濾過를 계속하였다. 이 濾過液을 다루기에 적당한 量으로 濃縮시킨 後, ether를 加하여 condensor로 reflux 시키면서 5% TCA 및 脂肪을 除去하여 아미노酸 水溶液을 얻었다. 脂肪과 5% TCA가 除去된 水溶液을 oven에서 加熱하여 ether를 完全揮發시키고 이온 交換樹脂(Merck 5)를 使用하여 無機이온 및 不純物을 除去한 後 一定한 比率로 濃縮시켜 paper chromatography 用 試料로 使用하였다.

### 2) Paper chromatography

micropipette로 0.1ml의 試料를 濾紙의 一端에 直徑 3~5 mm로 spotting하여 乾燥시킨 다음 18~20°C에서 一次元과 二次元을 展開시켰다. 本 實驗에 使用한 paper chromatography用 濾紙는 Whatman No. 1 이었으며 chromatogram의 크기는 26.5×23.3 (cm)이었다. 一次元 展開時 溶媒로는 phenol: dist. water

(7:3)를 使用하였으며, 二次元 展開時 溶媒로는 n-butanol : acetic acid : dist. water (4:1:3)의 上澄液, 즉 n-butanol과 acetic acid가 물에 飽和된 溶媒를 使用하였다. 그리고 18°C±2°C에서 展開시켰으며 一次元 展開에 所要된 時間이 10時間30分, 二次元 展開에 所要된 時間이 5時間30分이었다. 展開가 끝난 濾紙에 0.2% ninhydrin-in-acetone溶液을 噴霧하여 水蒸氣가 飽和된 80~100°C의 oven에서 10分間 加熱하여 아미노酸의 紫色反應을 일으켰다. 每試料展開와 同時에 標準 아미노酸을 같이 展開시켜 試料內 아미노酸의 同定에 對備하였다.

標準 아미노酸으로서 使用한것은 alanine,  $\beta$ -alanine, asparagine, aspartic acid, arginine, cysteine, cystine, citrulline, glutamic acid, glycine, leucine, isoleucine, lysine, histidine, methionine, ornithine, phenylalanine, proline, hydroxyproline, serine, threonine, tyrosine, valine, tryptophane의 24種이며 그中 cystine, tyrosine, tryptophane 3種은 水溶度가 작으므로 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 溶液을 1~2방울 加하여 溶解시켰다. 試料 아미노酸의 同定은 同一條件下에서 展開된 標準 아미노酸의 R<sub>F</sub>值와 色彩를 基準으로 하여 行하였다. 따라서 濾紙上에 나타난 試料의 아미노 酸가운데 標準 아미노酸의 R<sub>F</sub>值와 相異한것에 對하여는 同定할수 없었기에 未知物로 取扱하였다.

## III. 結 果

Paper chromatography와 이온 交換樹脂를 利用하여 멍꽂이 7個組織에서 檢出한 遊離 아미노酸의 種類는 表1에서 보는 바와 같다.

表에 依하면 alanine, aspartic acid, leucines (leucine or/and isoleucine), serine은 7個 組織에서 全部 檢出되었으며, cystine은 腦를 除外한 모든 組織에서, valine은 表皮를 除外한 모든 組織에서 檢出되었다. 또한 asparagine은 胃에서만, cysteine은 腦에서만, citrulline은 心臟에서만, methionine은 心臟과 精巢에서, tyrosine은 心臟에서만 檢出되었다.  $\beta$ -alanine은 筋肉, 胃, 腦에서, arginine은 心臟, 筋肉, 胃, 腦에서, glutamic acid는 胃, 肝, 精巢에서, glycine은 腦와 精巢를 除外한 全 組織에서, ornithine은 筋肉과 腦를 除外한 全 組織에서, proline은 心臟과 筋肉을 除外한 全 組織에서, hydroxyproline과 threonine은 腦와 精巢를 除外한 全 組織에서 檢出되었다. 따라서 心臟에서는 alanine, aspartic acid, arginine, cystine, citrulline, glycine, leuc-

ines, methionine, ornithine, hydroxyproline, serine, threonine, tyrosine, valine의 14種, 筋肉에서는 alanine,  $\beta$ -alanine, aspartic acid, arginine, cystine, glycine, leucines, serine, hydroxyproline, threonine, valine의 11種, 胃에서는 alanine,  $\beta$ -alanine, asparagine, aspartic acid, arginine, cystine, glutamic acid, glycine, leucines, ornithine, proline, hydroxyproline, serine, threonine, valine의 15種, 腦에서는 alanine,  $\beta$ -alanine, aspartic acid, arginine, cysteine, leucines, proline, serine, valine의 9種, 表皮에서 alanine, aspartic acid, cystine, glycine, leucines, ornithine, proline, hydroxyproline, serine,

Table 1. Patterns of Free Amino Acids in *Gallula tornieri* Tissues

	Heart	Mu- scler	Sto- mach	Brain	Skin	Liver	Testis
alanine	++	※ +-	++	+	++	+	+-
$\beta$ -alanine		+	+-	+-			
asparagine			+-				
aspartic acid	+-	+	+-	+-	+	+-	+
arginine	+	+-	+-	+			
cysteine				+			
cystine	+	+-	+-		+	+	+
citruiline	++						
glutamic acid			+			+	+-
glycine	++-	+-	+-		+	+-	
leucines	+-	+-	++	+-	+-	+-	+-
methionine	+-						+-
ornithine	+		+	+	+	+	+
proline			+	+	+-	+	+
hydroxyproline	+	++	+		+-	+	
serine	+	+-	++-	+-	+-	+-	+-
threonine	+-	+-	+		+-	+-	
tyrosine	+						
valine	+	+-	+-	+		+-	+

※ + indicates a spot of 1 cm in diameter, and-that of 1/2 cm.

threonine의 10種, 肝에서 alanine, aspartic acid, cystine, glutamic acid, glycine, leucines, ornithine, proline, hydroxyproline, serine, threonine, valine의 12種, 精巢에서 alanine, aspartic acid, cystine, glutamic acid, leucines, methionine, ornithine, proline, serine, valine의 10種의 遊離 아미노酸이 各各 檢出되었다.

IV. 考 察

既述한 바와 같이 本實驗에서는 paper chromatogram 上에 나타난 定性的인 結果만을 다루고 있으므로 chromatogram 上에 나타나지 않은 아미노酸이라 할지라

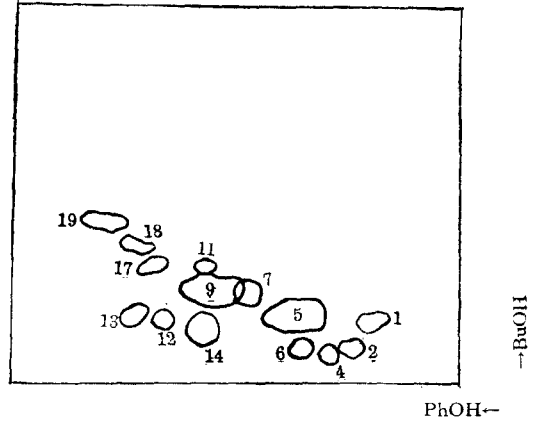


Fig. 1. Chromatogram of free amino acids in heart

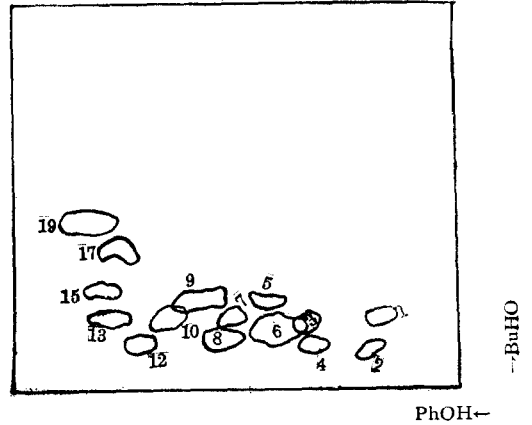


Fig. 2. Chromatogram of free amino acids in muscle

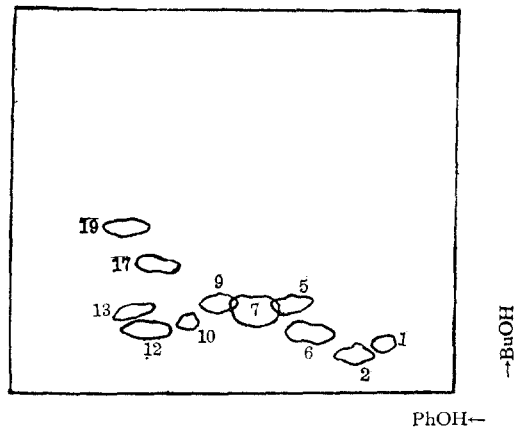


Fig. 3. Chromatogram of free amino acids in stomach.

도 그것이 存在하지 않는 다는것을 意味하는 것은 아니며 다만 chromatogram上에 나타날 만큼 充分한 量으로 存在하는 것이 아님을 意味할 뿐이다. 또한 本實驗에서 使用한 標準 아미노酸은 24種뿐이므로 定性 可能한 試料의 아미노酸도 이 種類內에 局限되어 있고 其他의 아미노酸은 未知物로 取扱되어 있으므로 어느 組織에 나타날 아미노酸의 種類가 반드시 表에서 보는 種類數 뿐이라는 것을 意味하지는 않는다. 다만 本實驗에서 可能하였던 範圍內에서의 結果임을 明記하여 두는 타이다.

生物體內에 遊離 아미노酸群의 pool이 存在하는 것은 攝取된 蛋白質의 消化, 分解 結果 生成된 아미노酸이 deamination, transamination 등의 過程을 겪고, 或은 이러한 過程을 거침이 없이 直接, 그 生體의 必要 蛋白質 合成에 쓰이기 때문이고, 또 體構成蛋白質이 分解되는 過程에서 遊離되어 나온 아미노酸이 上記한 타 deamination, transamination의 여러 過程에 加擔하기 때문인 것으로 생각된다. 또한 個個의 아미노酸에는 蛋白質以外의 窒素含有 或은 非含有化合物 合成을 爲한 獨自의인 代謝過程이 있으므로 이 代謝經路를 걸기 爲한 始發點에 아미노酸들이 存在하기 때문인 것으로 생각된다. 따라서 이 遊離 아미노酸 pool의 pattern은 그 生體組織의 物質代謝의 一面을 이루는 것으로 組織機能과 깊은 關係가 있다고 생각된다.

Paper chromatography를 使用하여 行해진 本實驗의 結果에 依하면 모든 組織을 通하여 檢出된 아미노酸은 alanine, aspartic acid, leucines, serine이며 이들 이외의 아미노酸은 組織에 따라 그 分布相이 서로 다르다.

Lowe에 依하면 *Rana catesbeiana*의 肝, 腦, 腎臟 및 쥐의 腦, 肝, 腎臟, 筋肉, 心臟에서 glutamic acid가 비교적 많은 量으로 檢出되었다고 하며, 其他의 여러 實驗結果로 보아 glutamic acid는 거의 모든 組織內에 含有되어 있는 것으로 생각되나 本實驗에서 보면 胃, 肝, 精巢에서만 檢出되었다. 特히 腦에서 檢出되지 않았다는 事實은 興味있는 것이라 생각된다. Okumura, et al 에 依하면 冷血動物의 腦에서는 glutamic acid가 거의 檢出되지 않았으나 개구리의 腦에서는 glutamic decarboxylase 의 activity가 높다고 報告하였다. 그러나 本實驗에서는 腦, 表皮, 心臟에서는 檢出되지 않았다. Aspartic acid는 모든 組織을 通해서 나타나고 있는데, 이 아미노酸은 glutamic acid와 더불어 生體內 transamination에 活潑하게 쓰이는 物質이어서 specific protein의 合成, 各種 아미노酸의 相互轉換 등에 關與하며, 이

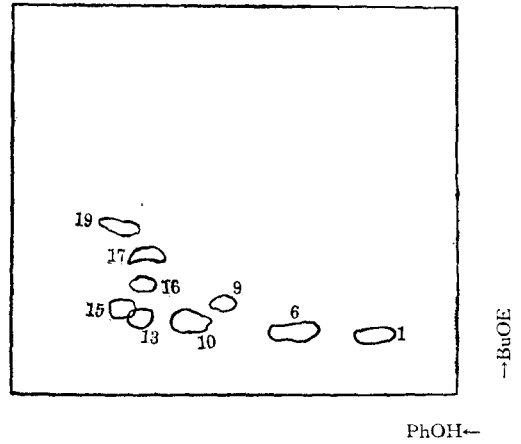


Fig. 4. Chromatogram of free amino acids in brain

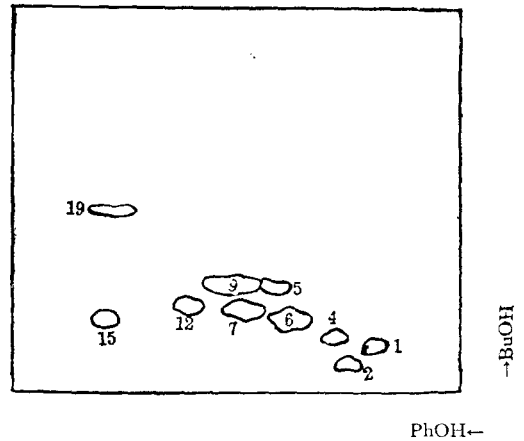


Fig. 5. Chromatogram of free amino acids in skin

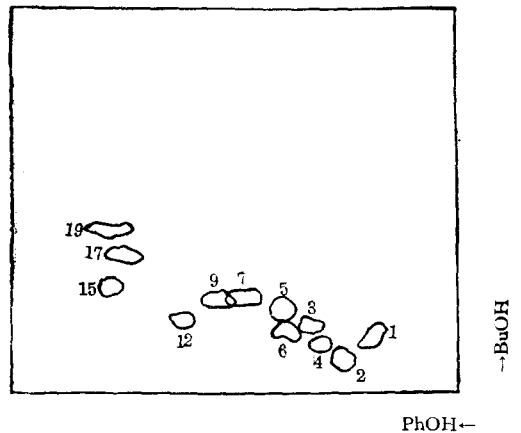


Fig. 6. Chromatogram of free amino acids in liver

와 같은 生化學的 過程은 거의 모든 組織에서 共通의 으로 일어나고 있을 것이므로, 이 아미노酸이 本 實驗에서 擇한 7個 組織에서 다 같이 檢出된 것으로 보인다. 다만 glutamic acid가 上記한 바와 같이 數個 組織에서 檢出되지 못한 것은 微量存在때문인지 或은 transamination이 주로 aspartic acid만을 仲介로 하여 일어나기 때문인지는 아직 알수없다.

Glycine은 아미노酸 中에서 가장 많이 利用되는 蛋白質의 成分이며 또한 가장 基本的인 細胞成分이다. 또한 여러가지 代謝過程에 關與하는 物質의 最終生成物 或은 先驅物質임이 알려져 있다. 이러한 點에 對해서는 Weinhouse (1955)에 依해 이미 밝혀져 있다. 그러나 本 實驗에서 腦와 精巢에서는 나타나지 않았다. 또한 Lowe (1954)는 어린 쥐의 心臟筋肉에서는 glycine과 serine을 多量 檢出하였으나 成體에서는 glycine과 serine을 거의 찾아 볼수 없었다고 했는데 本 實驗에서는 心臟에서 glycine의 量이 가장 많음을 보여 주고 있다.

맹공이 에서 alanine과 serine은 모든 組織에서 다 같이 檢出되었는데 이는 alanine, serine, glycine 三者間의 容易한 相互轉換 때문인 것 같고 glycine에 限하여 腦와 精巢에서 나타나지 않은 것은 glycine의 微量으로 인한 것이거나 或은 아직 알려져 있지 않는 다른 要因들의 存在때문인 것으로 생각된다. 組織에 따라 存在하는 아미노酸의 種類가 다른 것은 그 組織의 機能과 密接한 關聯이 있는 것이므로, 위와같은 要因의 分析은 곧 그 組織의 機能을 物質의 으로 解析하는 길 일 것이다.

表1에서 보면 cystine은 腦를 除外한 모든 組織에서 檢出되었으나 反對로 cysteine은 腦에서만 檢出되었다는 것은 대단히 흥미 있는 현상이라 생각된다. cysteine이 거의 檢出되지 못한 것은 cysteine의 不安定性으로 말미암아 cystine의 형태로 나타났다고 생각되지만, 腦에서는 cystine이 없고 cysteine이 나타난 것은 腦의 아미노酸 代謝의 特性인 것 같다.

Leucine과 isoleucine은 chromatogram上 그 位置가 대단히 비슷하여 本 實驗에서는 leucines로 一括 取扱하였는데, 表1에서 보면 모든 組織에서 leucines가 나타나고 있는 것은 上記 兩者가 單獨으로 同時에 存在하거나 或은 相補的으로 나타날 것이거나 하나일 것이다.

物質代謝가 가장 活潑한 것으로 생각되는 肝에서 아미노酸의 分布相을 보면 methionine이 檢出되지 않았다. 이 點은 대단히 意外的 現象이다. 그러나 材料動

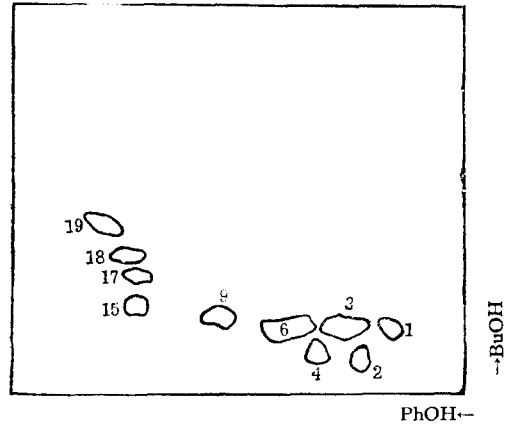


Fig. 7. Chromatogram gram fo free acids in testis.

Remarks of chromatograms

- |                                |                    |
|--------------------------------|--------------------|
| 1. aspartic acid               | 2. cystine         |
| 3. glutamic acid               | 4. ornithine       |
| 5. glycine                     | 6. serine          |
| 7. threonine                   | 8. asparagine      |
| 9. alanine                     | 10. β-alanine      |
| 11. tyrosine                   | 12. hydroxyproline |
| 13. arginine                   | 14. citrulline     |
| 15. proline                    | 16. cysteine       |
| 17. valine                     | 18. methionine     |
| 19. leucine and/or iso-leucine |                    |

물이 生殖期間이어서 體內代謝가 極히 活潑할 때였으므로 methionine의 lable methyl基의 急速한 供給을 爲하여 쓰였기 때문에 肝에 極히 微量으로만 恒常 存在한것이라고도 생각된다. 또 이 點은 肝 以外の 다른 거의 모든 組織에서도 나타나지 않은 것으로 보아도 妥當視된다. 또 肝에서의 分布相 가운데 注目할 것은 urea cycle에 關與하는 아미노酸이 하나도 檢出되지 않았다는 點이다. 朴 및 吳(1960)는 *Bombina orientalis*의 肝을 分析하여 ornithine, citrulline 및 arginine 이 없음을 보고 무당개구리는 ammonoteric 일 것이라고 推測한 바가 있다. 이것으로 볼때 *Gallula tornieri*도 역시 ammonoteric가 아닌가 생각된다. 그러나 Smith (1929)는 *Rana catesbeiana*는 ureoteric하다고 하였다.

V. 要 約

本 實驗은 paper chromatography와 이온 交換樹脂를 使用하여 맹공이 (*Gallula tornieri* VOGT.)의 心臟, 筋肉, 胃, 腦, 表皮, 肝, 精巢의 7個 組織에서 遊離 아미노酸을 分析하는데 그 目的이 있다.

分析結果를 보면 心臟에서 14種, 筋肉에서 11種, 胃에서 15種, 腦에서 9種, 表皮에서 10種, 肝에서 12種, 精巢에서 10種의 遊離 아미노酸을 檢出하였고, 各組織에

파라 遊離 아미노酸의 分布相에 差異가 顯著함을 알 수 있었다.

### REFERENCES

- Awapara, J., 1949, Application of paper chromatography to the estimation of some free amino acids in tissues of the rat. *J. Biol. Chem.*, **178**; 113-116.
- Awapara, J. and Seale, B., 1952, *J. Biol. Chem.*, **194**; 497.
- Cammarata, P. S. and Cohen, P. P., 1950, The scope of the transamination reaction in animal tissues. *J. Biol. Chem.*, **187**; 439
- Datta, S. P. and Harris, H., 1953, *Ann. Engen. (London)* **18**; 107.
- Holfreter, J., T. R. Kozsallia and L. L. Miller, 1950, Chromatographic studies of amino acids in the eggs and embryos of various species. *Exp. Cell. Res.*, **1**; 453-459.
- Hopwood, M. L. and Gassner, F. X., 1957, Free amino acid concentration in Bovine testis and accessory sex organ. *Proc. 38th Ann. Meeting Western Div. Ann. Dairy Sci. Assoc.* 8pp.
- Li, C. and E. Reports, 1949, Free amino acids and peptides in frog embryos. *Science*, **110**; 425-426.
- Lowe, I. P., 1954, Patterns of free amino acids and related compounds in tissues of several species.
- Okumura, N., Saburo, O., and Tatsuya, A., 1959, Studies on the free amino acids and related compounds in the brains of fish, amphibia, reptile, aves and mammal by ion exchange chromatography. *J. Biol. Chem.*, **46**; 2, 207-212.
- Robert, E., D. A. Karnofsky, and S. Frankel, 1951, Influence of cortisone on free hydroxyproline in the developing chick embryo. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **76**; 289-292.
- Roberts, E. and A. H. Tishkoff, 1949, Distribution of free amino acids in mouse epidermis in various phases of growth as determined by paper chromatography. *Science*, **109**; 14-16.
- Roberts, E., S. Frankel and P. J. Harmon, 1950, Amino acids in nervous tissue. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **74**; 382-387.
- Roberts, E., P. J. Harmon and S. Frankel, 1951,  $\alpha$ -Aminobutyric acid content and glutamic decarboxylase activity in developing mouse brain. *Paoc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **78**; 799-803.
- Smith, H. W., 1929. *J. Biol. Chem.*, **81**; 727.
- Soloman, J. D., C. A. Johnson, A. L. Sheffner and O. Bergeim. 1951, The determination of free and total amino acids in rat tissues. *J. Biol. Chem.*, **189**; 629-635.
- Tallen, H. H., Moore, S., and Stein, W. H., 1954, *J. Biol. Chem.*, **211**, 927.
- Tallen, H. H., 1957, *J. Biol. Chem.*, **244**, 41.
- Weinhouse, S. 1955, A symposium on amino acid metabolism. 637-57. (Ed. W. D. McElory and H. B. Glass.) (The John Hopkins Press, Baltimore.)
- 朴相允, 吳錫欣, 1960, 무당개구리 肝의 아미노酸 成分에 關한 研究. *동학지*, III, 2, 5~8.