

Rhodopsin 의 再生에 對한 Nicotinamide 와 Folic Acid 의 影響에 關한 研究

姜 成 浩* · 崔 泰 周**

(1962. 2. 14 受理)

Studies on the Influence of Nicotinamide and Folic Acid on the Regeneration of Rhodopsin

By Seoung Ho Kang and Tae Joo Choi

Department of Chemistry, Ewha Womans University

Six frogs (*Rana nigromaculata* 25~40 gm) were adapted to light for 2 hours. Then 0.02 ml of 3% nicotinamide and 0.02 ml of 0.6% folic acid were injected into the vitreous body of the right eye-ball, and 0.02 ml normal saline solution into the vitreous body of the left eye-ball respectively.

After dark adaptation for an hour their heads were cut off under a dim red light (650 m μ).

The retinae were removed from the left eye-ball for the control group and from the right for the test group respectively. Then rhodopsin was extracted from the retinae with 3 ml of 2% digitonin solution (pH=7.0) for 17 hours at 0°C in the dark.

The optical densities before and after the illumination of the extract were measured and compared with those of the control group.

The results are as follows:

- 1) The group which had been injected with 0.02 ml of 3% nicotinamide solution had the promotive action on the regeneration of rhodopsin in comparison with the control group.
- 2) The group which had been injected with 0.02 ml of 0.6% folic acid solution had the controlling action on the regeneration of rhodopsin in comparison with the control group.

1. 結 論

rhodopsin 의 光分解에 關하여서는 Wald¹⁾ 一派에 依하여 詳細히 研究되고 있다. 그리고 rhodopsin 의 合成機作에 關한 研究는 Wald 와 Hubbard 等²⁾이 試驗管內에서 그 合成에 成功한 以來 急速히 進展되었으나 生體內의 再生機作에 關하여서는 아직도 不明한 點이 많다.

Wald²⁾ 等은 褐色網膜의 homogenate 에 合成 retinene 을 加하면 dark 에서 70%의 rhodopsin 이 合成됨을 報告하였다. 그 後 Collins³⁾ 等은 retina 에 結晶 alcohol dehydrogenase, vitamin A 및 DPN 을 加하여 dark 에서 rhodopsin 이 合成되는 것을 確證하였으며 이 成分만으로는 40~50% 程度밖에 되지 않으나 ATP, Cytochrome C, nicotinamide 를

加하면 92%까지 rhodopsin 이 合成되었다고 報告하였다. 또한 Wald⁴⁾ 에 依하면 rhodopsin 은 light energy 에 依하여 發色團과 蛋白質의 結合이 끊어져 褪色되나 dark 에서 簡單히 再合成되므로 그 合成에 는 energy 가 必要하지 않고 오히려 그 合成反應은 energy 生成反應이라고 하였다. 그러나 Collins³⁾ 와 古城⁵⁾ 는 rhodopsin 의 再生에는 energy 가 必要하며 glycolysis 에 依하여 그 energy 를 얻는것으로 생각하고 있다. 그런데 dark 에서 rhodopsin 이 再生될 때 藥用物質이 그 再生作用을 促進 또는 抑制함이 여러가지로 報告되고 있다. 卽 Kühne 및 Ayres⁶⁾ 가 pilocarpine 에 對한 實驗을 하여 그것이 哺乳動物의 rhodopsin 再生을 促進시키는 點이 알려졌고 細谷⁷⁾ 는 개구리에 對하여 arecoline 이 pilocarpine 보다 強力한 rhodopsin 의 再生促進作用이 있음을 報告하였으며 또한 Hosoya^{8), 9), 10), 11), 12)} 等은 lipotropic substance 인 choline, methionine, betaine 이 rhodopsin 의 再

* 梨花女子大學校 化學科

** 慶熙大學校 生物科

生을 促進시키며 cystine, cysteine, creatine, creatinine 은 cocaine 에 못지않은 再生 抑制作用이 있을을 報告하였다. 그리고 lipotropic substance 의 rhodopsin 再生促進作用은 transmethylation 에 起因된 것이라고 報告하였다. 또한 Hwang¹⁴⁾은 0.1% mono iodo acetic acid 를 개구리에 注射하면 rhodopsin 의 再生이 完全히 抑制됨을 報告하였으며 花岡¹⁵⁾은 melamphore-hormone 이 rhodopsin 再生을 促進시킨다고 報告하였다. 著者^{16, 17)}는 lipotropic substance 인 methionine, betaine, acetylcholine 을 개구리에 注射하여 Hosoya 等이 報告한 rhodopsin 의 再生促進作用을 再確認하였고 또한 著者¹⁸⁾는 vitamin B₁, B₂, B₆를 개구리에 注射하였더니 rhodopsin 의 再生에는 變化가 없음을 確認하였으며 vitamin C 는 rhodopsin 의 再生이 促進됨을 確認하였다. 또한 著者¹⁹⁾는 vitamin B₁₂ 및 -erine 을 개구리 眼球의 vitreous body 에 注射하였더니 rhodopsin 의 再生이 抑制됨을 確認하였다. 著者는 이번 다시 水溶性 vitamin 인 nicotinamide 및 folic acid 를 개구리 眼球의 vitreous body 에 注射하여 rhodopsin 의 再生에 미치는 影響을 實驗한바 茲에 報告하고자 한다.

I. 實驗方法

참개구리 (*Rana nigromaculata* 體重 25~40g) 5~6 마리씩을 group 으로하여 양철로된 容器(diameter 23 cm, depth 10cm)에 넣고 밑면에서 10cm 되는곳에 115 volt 200 watt 電球를 켜서 2時間 light adaptation 시킨後 rhodopsin 이 完全히 褪色된 것을 確認하고 개

구리의 口腔으로 藥物(3% nicotinamide pH=7.0 및 0.6% folic acid pH=7.0) 0.02ml 를 right eye ball 의 vitreous body 에 注射하고 0.85%의 saline 을 left eye ball 의 vitreous body 에 注射하여 室溫(20~25°C)에서 한 時間 dark adaptation 시킨 다음 微赤色光下(波長 650m μ 以上)에서 斷頭하여 test group 인 right eye ball 과 control group 인 left eye ball 을 各各 뽑아 各 눈의 赤道部를 銳利한 가위로 切斷하고 眼球의 後半部를 生理食鹽水에 넣고 pincette 로 retina 를 剝離하여 group 別로 slide glass 위에 모아 磨碎한 다음 test tube (10 ml)에 넣고 3ml 의 2% digitonin 水溶液(pH=7.0)을 넣어 0°C에서 17時間 rhodopsin 을 抽出하였다. 이것을 微赤色光下에 遠心分離 (5,000 r. p. m 15分間)한 다음 上澄液을 spectronic-20 spectrophotometer 로 波長 500m μ 에서 10mm cell 로 그 optical density 를 測定한 後 그것을 다시 115 volt 200 watt 의 電球로 10cm 거리에서 20分間 光照射하여 rhodopsin 을 完全히 파괴시킨 後 다시 그 optical density 를 測定하여 test group 과 control group 을 比較하였다. 그런데 light adaptation 시킬때와 光照射以外에는 모든 操作을 微赤色光下(650m μ 以上)에서 하였으며 이때 室溫은 25°C였다.

II. 結果

1) 3% nicotinamide 水溶液(pH=7.0)을 개구리 6 마리 眼球의 vitreous body 에 0.02ml 씩을 注射한 結果는 다음 table 1 과 같다.

control group 의 rhodopsin 再生량을 100 이라고

TABLE 1

Optical Density of the Group Injected into the Vitreous Body with 0.02 ml of 3% Nicotinamide Solution

number of experiment	E		E'		E-E'		$\frac{E-E' \text{ of T}}{E-E' \text{ of C}} \times 100$
	T	C	T	C	T	C	
1	0.319	0.229	0.102	0.076	0.217	0.153	140
2	0.552	0.337	0.382	0.181	0.170	0.156	109
3	0.367	0.420	0.177	0.280	0.190	0.140	135.7
4	0.552	0.347	0.272	0.143	0.280	0.204	132.4
5	0.377	0.208	0.116	0.046	0.211	0.162	130.3

average 129.5

E: Optical density before illumination.

E': Optical density after illumination.

E-E': The difference of optical density before and after illumination.

T: Test group.

C: Control group.

$\frac{E-E' \text{ of T}}{E-E' \text{ of C}} \times 100$: The regeneration ratio (%) of the rhodopsin.

하면 그 test group 은 平均 129.5 였다.

이것으로써 3% nicotinamide 를 注射한 group 은 rhodopsin 의 再生이 促進되었음을 確認하였다.

2) 0.6% folic acid 水溶液(pH=7.0)을 개구리 5마리 眼球의 vitreous body 에 各各 0.02ml 역을 注射한 結果는 Table I 와 같다.

TABLE I
Optical Density of the Group Injected into the Vitreous Body with 0.02ml of 0.6% Folic Acid

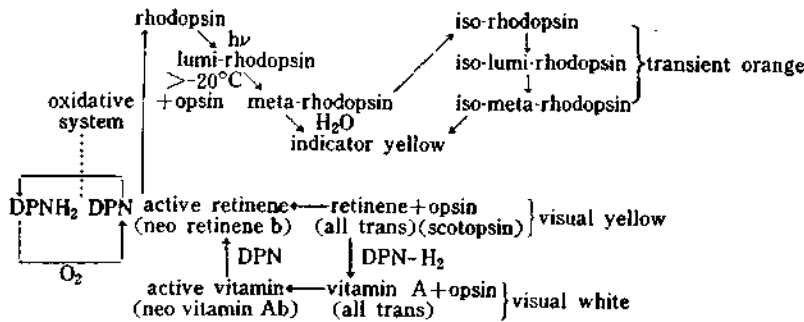
number of experiment	E		E'		E-E'		E-E' of T / E-E' of C × 100
	T	C	T	C	T	C	
1	0.393	0.420	0.284	0.310	0.109	0.110	99.1
2	0.357	0.347	0.292	0.256	0.065	0.091	71.4
3	0.357	0.328	0.201	0.137	0.156	0.191	81.7
4	0.229	0.393	0.086	0.174	0.143	0.219	65.3
5	0.268	0.337	0.155	0.187	0.113	0.150	75.3

control group 의 rhodopsin 再生량을 100 이라고 하면 그 test group 의 rhodopsin 再生량은 平均 78.6 이었다. 即 0.6% folic acid 를 注射한 group 은 그 rhodopsin 의 再生이 抑制됨을 確認하였다.

N. 考 察

Wald²⁰가 直接 retina 에서 vitamin A 의 存在를 證明한 以後 rhodopsin 의 化學은 急速히 前進되었다.

Wald 一派와 Morton 一派에 依하여 證明된 rhodopsin 의 分解와 合成過程은 다음 cycle²¹과 같다.



함께 많은 dehydrogenase 를 形成하여 生體의 여러 가지 酸化還元過程에 關여하며 특히 糖代謝에 重要な 役割을 하고 있다.

그런데 nicotinamide 가 rhodopsin 의 再生에서 促進作用을 하는것은 그것이 위의 cycle 에서 rhodopsin 의 再生에 가장 重要な 役割을 하는 DPN, DPN-H₂ 의 成分이기 때문에 眼球內에 注射하였을 때 nicotinamide 가 DPN을 形成하면서 rhodopsin 再生에 關여하여 그 再生을 促進시키는 것이 아닌가 解釋되는 바이며 또한편으로는 古城⁵가 主張하는 바와 같이

average 78.6 이 cycle 에 依하면 rhodopsin 이 光分解된 後 다시 再生되는 過程에서 가장 重要的 役割을 하는 것은 DPN-H₂ 및 DPN인 것이다.

即 retinene $\xrightarrow{DPN-H_2}$ vitamin A가 될때의 還元作 (all trans form) (all trans form)

用과 active vitamin A \xrightarrow{DPN} active retinene이 될 때 (neo vitamin Ab) (neo retinene b)

의 酸化作用이 rhodopsin 의 再生能을 支配하는 factor 가 된다고 Wald²²는 主張하였다. 그런데 nicotinamide 는 DPN, TPN 의 構成因子이며 apoenzyme과

rhodopsin 再生에는 retina 中에서의 glycolysis 에 依하여 生成된 energy 가 TCA cycle 을 거쳐 ATP 로 저장되어 이것이 rhodopsin 再生의 energy 源이 된다고 하였는데 이 glycolysis 에는 많은 DPN, DPN-H₂가 關여하는데 眼球에 注射한 nicotinamide 에 依하여 DPN, DPN-H₂가 形成되어 이것이 glycolysis 에 關여하여 間接的으로 rhodopsin 의 再生 energy 源을 증가시킴으로써 그 再生을 促進시키는 因子가 되는 것이 아닌가도 解釋되는 바이다.

Collins³ 등은 in vitro 에서 Wald가 말한 4 成分

(vitamin A, retinene reductase, DPN, opsin)以外에 nicotinamide, ATP, cytochrome C를 加하면 92%까지 rhodopsin의 合成이 增加되었다고 한다. 그런데 著者는 in vivo에서도 nicotinamide에 依하여 rhodopsin의 再生率이 增加됨을 確認하였다.

다음에는 folic acid의 生化學的 作用을 살펴 보면 大略 다음과 같다.

Dinning²¹ 등은 生體內에서 homocystine으로부터 methionine의 合成에는 folic acid가 參與한다고 하였으며 또한 folic acid는 脂肪代謝에도 重要な 役割을 하여 ethanolamine을 methyl 化하여 choline의 合成을 증가시킨다고 한다. 即 Du Vigneaud²² 등은 rat에 C¹⁴-methanol을 주었더니 C¹⁴가 choline의 methyl 基에 導入되는것을 確認하고 다시 folic acid 결핍 動物에서는 choline의 C¹⁴가 減少됨을 報告하였다. 이러한 事實에서 folic acid는 lipotropic action이 있음을 確認하였다. folic acid가 methyl 基 및 formate의 轉移에 參與할 때는 folinic acid로써 作用하며²³ B₁₂와 함께 生體內에서 여러가지 作用을 하고 있다. 細谷 등은²⁴ lipotropic substance가 rhodopsin의 再生을 促進시키는것은 transmethylation에 起因된다고 하였는데 本實驗에서 lipotropic action이 있고 transmethylation에 관계가 깊은 folic acid가 rhodopsin의 再生에서 抑制作用을 한다는것은 興味있는 事實이다. 다만 著者²⁵가 transmethylation에 관계가 깊은 vitamin B₁₂를 개구리에 注射하였더니 rhodopsin의 再生이 抑制됨을 確認하였다. folic acid가 vitamin B₁₂와 비슷한 生化學的인 作用을 하기 때문에 抑制作用이 있는것이 아닌가 解釋된다. 그러나 folic acid가 rhodopsin의 再生에서 抑制作用을 하는 事實은 앞으로 究明되어야 할 興味있는 問題라고 생각되는 바이다.

V. 結 論

참개구리(*Rana nigromaculata*) 5~9마리를 2時間 light adaptation시킨 다음 한쪽 눈의 vitreous body에는 3% nicotinamide 또는 0.6% folic acid를 注射하고 그 control로써 다른쪽 눈의 vitreous body에는 生理食鹽水를 各各 注射하여 1時間 dark adaptation시킨 다음 微赤色光下(650 m μ 以上)에 斷頭하여 눈에서 group 別로 retina를 別離한 다음 2% digitonin 水溶液 3ml로 0°C에서 17時間 rhodopsin을 抽出하였다. 이것을 遠心分離하여 光照射前과 後의 optical density를 測定하고 rhodopsin의 再生率을 計

算하였다.

그 結果는 다음과 같다.

2) 3% nicotinamide 0.02ml를 注射한 것은 control group에 比하여 rhodopsin의 再生이 促進되었다.

2) 0.6% folic acid 0.02ml를 注射한것은 그 control group에 比하여 rhodopsin의 再生이 抑制되었다.

VI. 文 獻

- 1) R. Hubbard and G. Wald, *J. Gen. Physiol.*, **36**, 269 (1952).
- 2) G. Wald and R. Hubbard, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **36**, 92(1950).
- 3) F. D. Collins, J. N. Green and R. A. Morton, *Biochem. J.*, **53**, 135 (1953).
- 4) G. Wald, *Fed. Proc.*, **12**, 606 (1953).
- 5) 古城 力, 生體の科學, **6**, 80 (1954).
- 6) W. C. Ayres, W. U. Kühne, *Unters. physiol. Inst. Heiderberg*, **2**, 215, 1878~82.
- 7) 細谷雄二, 日本生理誌, **7**, 499 (1942).
- 8) Y. Hosoya, H. S. Fang and M. T. Peng, *Tohoku J. Exp. Med.*, **53**, 130 (1950).
- 9) Y. Hosoya, H. S. Fang and M. T. Peng, *ibid.*, **53**, 109 (1959).
- 10) Y. Hosoya, Abst. 19 Intern. Physiol. Congr., 484, 1950.
- 11) S. T. Hwai, *Tohoku J. Exp. Med.*, **53**, 115 (1950).
- 12) T. F. Hwang and Y. Hosoya, *Jap. J. Physiol.*, **1**, 64 (1950).
- 13) 田邊市之藏, 大阪市立醫大誌, **1**, 18 (1951).
- 14) T. F. Hwang, *Jap. J. Physiol.*, **1**, 69 (1950).
- 15) T. Hanaoka, *Jap. J. Physiol.*, **2**, 9 (1951).
- 16) S. H. Kang, *Journal of Korean Culture Research Institute.*, **2**, 397 (1960).
- 17) S. H. Kang, *Korean J. Zoology*, **3**, 2 (1960.)
- 18) S. H. Kang, *J. Korean Cult. Research Ins.*, **2**, 402 (1960).
- 19) S. H. Kang, *ibid.* 419 (1960).
- 20) G. Wald, *Nature*, **123**, 316 (1933).
- 21) 細谷雄二, 木村英一, 蛋白質, 核酸, 酵素, **5**, 462 (1960).
- 22) G. Wald, *Science*, march, **16**, (1951).
- 23) Dinning, Keith, Day, *Biochem. J.*, **189**, 515 (1951).
- 24) Du Vigneaud, Verly, *J. Am. Chem. Soc.*, **72**, 1049 (1950).
- 25) V. M. Doctor, et al., *Arch. Biochem. and Biophys.*, **48**, 249 (1954).
- 26) 細谷雄二, 日本生理誌, **19**, 227 (1957).