脊椎動物 腦組織의 Energy 代謝에 關한 系統學的 比較研究

朴 相 允
(成均館大·文理大·生物學科)

A Comparative Study on the Energy Metabolism of Brains of Several Vertebrates with Respect to Their Phylogeny

PARK, Sang-Yoon

(Dept. of Biology, Sung-Kyun Kwan University)

(1964年 9月 2日 接受)

SUMMARY

The present paper deals with the comparative study on phylogenic differences in the patterns of energy metabolism of brain slices of several vertebrate species by measuring oxygen consumption with glucose-6-phosphate, glucose-1-phosphate, glyceraldehyde-3-phosphate or glutamate as respiratory substrate employing Warburg's manometric method, by determination of the utilization rate of glucose using glucose-1-C^{14}, by analyzing patterns of free amino acid distribution, and by histochemical determination of glycogen contents.

1. Glucose enhances the oxygen consumption of brain slices of animals belonging to reptile, aves and mammalia while it shows a tendency to decrease that of animals belonging to pisces and amphibia.

2. Glucose-6-phosphate increases oxygen consumption more than glucose in every species examined, while glucose-1-phosphate and glyceraldehyde-3-phosphate increase that of *Rana nigromaculata* only.

In general, it appears that phosphosugars are more effective as a respiratory substrate to those species which have less endogenous respiration than to those having larger endogenous respiration.

3. Similar patterns of free amino acid distribution and the relative amount are found among the species and in every species examined glutamic acid is detected in the largest amount. γ-Amino butyric acid, glycine, alanine and aspartic acid are found in every species.

4. *Ophicephalus* showed less oxygen consumption than endogenous respiration when glutamate was added to the medium. When sodium fluoride was added, the oxygen consumption was somewhat increased. Such phenomenon was not found in the frog.

5. The result of histochemical analysis of the brain showed that glycogen was abundantly present in the fish, amphibia, and especially in the reptile and that no distinctive grains of glycogen were found in the bird and mammal.

From these facts, it may be supposed that anaerobic glycolysis as energy source dominates in fish and amphibia and aerobic respiration through the oxidation of glucose dominates in bird and mammal, the reptile occupying transitional position between these two categories. The way of obtaining energy for brain activity by the oxidation of glucose supplied from the circulating blood is seemed to be first acquired by reptile and the function is completed both in aves and mammal.

緖 論

腦의 生化學的 硏究는 Thudichum(1884)이 사람 腦의 脂質에 대하여 상세하게 기록한 것을 선구로하여 그후 Loewi(1921)가 Vagusstoff를 발견하고 부터 神經組織의 化學的 硏究의 중요성을 인식하게 되었다.

腦의 機能을 유지하기 위해서는 血液腦 關門을 통하여 血液으로 부터 minute-to-minute로 공급되는 glucose가 가장 중요한 물질이다. Quastel(1939)은 glucose, fructose, mannose가 腦組織의 酸素消費를 현저하게 증가시킨다고 했는데 insulin을 注入하여 低血糖이 된 사람 腦의 呼吸低下와 腦活動의 障害는 glucose를 投與함으로서 회복하는데 肝除去에 의한 개와 고양이의 低血糖도 glucose로서 충분히 회복된다(Mann, 1927). 그런데 mannose와 maltose도 肝除去 動物에 투여하면 正常行動과 腦의 電氣活動을 회복하나(Mann *et al.*, 1922; Maddock *et al.*, 1939) 이러한 糖은 그대로의 형태로는 효과가 없고 glucose로 轉化한 다음에 비로소 효과가 있다. 이처럼 glucse에 대한 低血糖 動物의 反應으로서 glucose에 대한 腦機能에 特異性이 있음을 알 수 있다.

腦機能을 유지하기 위해서 力源으로써 唯一한 glucose (Gibbs *et al.*, 1942)는 minute-to-minute로 혈액에서 공급받아 Embden-Myerhof系를 거쳐 TCA 廻路로써 酸化되고 hexose-monophosphate shunt는 중요하지 않다(Bloom, 1955; Sacks, 1957). 腦의 摘出操作으로써 激減된 creatine-phosphate나 adenosinetriphosphate(ATP)도 glucose基質下에서 好氣的 條件을 유지하면 왕성하게 산소를 소비하며 일정한 level까지 회복하고 1~2시간은 일정한 값을 유지한다(McIlwain *et al.*, 1951). Glycogen은 腦중에서는 가장 많은 量이 포함되어 있다고 하지만 다른 成分에 비하면 적은 양이고 飢餓, 過食, glucose注入으로도 腦內 glycogen의 量은 인정할만한 변동이 일어나지 않는다(Kerr *et al.*, 1936; Svorad, 1958). 즉 정상상태에서 腦의 活動 energy는 대부분이 好氣的으로 이루어지고 혈액중의 glucose가 부족하면 여러가지 精神障害가 일어난다. 이러한 사실의 대부분이 進化系列의 가장 高位에 있는 哺乳類에서 알려진 것이기 때문에 系統發生學的인 意義는 희박하다. 進化와 아울러 中樞神經系의 機能은 分化했고 生理學的 活性이 强한 領域이 腦幹에서 大腦皮質로 이동했다. 이러한 機能變化에 對應하여 腦의 生化學的 進化의 方向과 glucose에 대한 血液腦關門의 出現時期를 알아보기 위하여 이를 energy 生成系의 比較로서 고찰하고져 本實驗이 試圖되었다. 그런데 脊椎動物 五綱에 걸쳐서 비교 연구한 前報(朴·崔, 1962)에서 爬虫類와 鳥類에 속한 각각 二種은 哺乳類와 마찬가지로 glucose基質에서는 endogenous respiration보다 酸素消費量이 증가 하였는데 魚類와 兩棲類에 속한 四種은 glucose基質下에서 다같이 감소하였으므로 이들 사이에는 energy生成系에 있어서 차이가 있다고 생각되므로 본 실험에서는 無羊膜類에 속한 同一種의 腦로써 解糖過程 途上의 附燐糖 數種을 基質로하여 그의 酸素消費量을 측정하는 한편 glucose의 消費여부를 알아보기 위하여 glucose-1-C^{14}의 利用率도 아울러 살폈다.

前報(1962)의 실험으로써 Pasteur效果로 미루어 腦組織의 energy源으로서 glucose를 대신하여 저장 glycogen이 중요한 역할을 한다고 생각되므로 組織化學的 方法으로 glycogen을 檢出 比較하였다.

glutamic acid, γ-aminobutyric acid(GABA)로서 guinea pig 大腦皮質의 酸素消費가 증가하고(淺野, 1960), glucose基質下에서는 ammonia生成이 없는데 glutamic acid는 酸化결과 ammonia가 생긴다(Weil-Malherbe, 1956). 즉 glutamic acid와 GABA는 glucose가 없을때는 GABA shunt를 통해서 TCA cycle로 들어가서 緊急基質로써 쓰인다. 下等 脊椎動物에 있어서의 이러한 amino酸의 利用을 알아보기 위하여 腦內 游離아미노酸을 分析하고 glutamic acid를 基質로 했을 때의 酸素消費와 sodium fluoride로서 phosphoglucomutase의 活性을 阻止하여 glycogen의 利用을 中斷한 腦組織의 酸素消費를 비교하였다.

腦內 유리 아미노산은 다른 조직에 비하여 여러가지 특색이 있고 血液 및 腦脊髓液의 아미노酸 組成과도 상당히 相異한 樣相을 볼 수 있는데 腦에서는 glutamic acid, aspartic acid, GABA가 다른 아미노산에 비하여 대단히 많을 뿐 아니라(Knauff *et al.*, 1961) 腦組織과 血漿사이의 濃度匈配에 상관 없이 active transport에 의하여 腦內 濃度가 높다(McIlwain, 1955; Stein and Moore, 1954). 腦內 游離 아미노酸의 分析은 塚田등(1961)이 脊椎動物과 頭足類의 種的變異를 비교한 것이 있고 Tallan *et al.* (1958)은 種屬에 따른 特徵的 아미노酸을 보고 했으며, Robert *et al.*(1959)은 個體發生學的 見地에서, Baxter *et al.*(1960)은 生長에 따르는 변동을 각각 보고 했다.

이 밖에도 朴등(1964), 河·李(1961), Okumura *et al.* (1959) 이 脊椎動物의 腦內 遊離 아미노酸을 분석하였는데 본 실험에서는 이에 추가하여서 腦內 遊離 아미노酸을 검출하였다.

本實驗을 위하여 시종 지도 편달하여주시고 실험에 편의를 주신 姜永善 博士와 硏究費를 支給하여 준 成均館大學校 當局에 깊이 感謝드린다.

實驗材料와 方法

Ⅰ. 酸素消費量의 測定

實驗材料는 실험을 실시할 때 마다 서울 近郊에서 採集한 動物을 사용했는데 동물은 붕어 *Carassius carassius*, 가물치 *Ophicephalus argus*, 개구리 *Rana nigromaculata* 및 옴개구리 *R. rugosa* 의 4種이다. 일반 마취제로써 glucose, sodium lactate, sodium pyruvate 등의 酸化가 강하게 억제될 염려가 있으므로(Quastel *et al.*, 1932) 마취제는 사용하지 않았고 그대로 斷頭하여 腦를 摘出한 다음 延髓部를 除去한 全腦를 切片으로 만들어서 사용했고 摘出後의 모든 操作은 이들위에서 行하였다.

Glucose-6-phosphate(G-6-P), glucose-1-phosphate(G-1-P) 및 glyceraldehyde-3-phosphate(PGAL)은 Nutritional Corporation 製를 사용했고 腦組織의 酸素消費量은 前報(朴·崔, 1962)와 같은 방법으로 측정했다.

Ⅱ. 放射性 同位元素 Glucose-1-C^{14}의 處理

放射性 同位元素의 처리는 labeled glucose-1-C^{14}(specific activity, 1 μc/2 ml)를 0.5 ml 씩 incubation media에 加하여 Warburg's manometric flask에 試料와 같이 넣어 30°C에서 glucose의 uptake를 測定하였다. glucose의 uptake rate는 incubation medium의 initial specific activity와 組織을 넣어서 30分間 incubation 시킨 後의 final specific activity의 차이로서 결정하였다.

Glucose-1-C^{14}을 incubation medium에 加한 다음 同 medium에서 micropipette로 100 λ 씩을 얻어서 specific activity를 測定하고 그 medium을 사용하여 組織을 incubation 시킨다음 遠心分離하여 上澄液에서 다시 100 λ 씩 採取하여 specific activity를 測定하여 兩者의 差를 구하였다. 放射能의 測定은 100 λ의 medium을 aluminum planchet에 넣어 80°C 이하에서 서서히 건조시킨 다음 gas-flow type, mica thin-window Geiger counter(Tracerlab TGC-14 Carbon Counter)로서 1225 volts에서 3分間씩 測定하고 background를 補正한 값을 cpm으로 환산하였다. 同位元素 glucose-1-C^{14}는 Isotopes Specialities Company 製를 사용했다.

Ⅲ. 游離 아미노酸의 定性的 分析

實驗材料는 살모사(*Agkistrodon halys brevicaudus* STENZNEGER), 개구리, 옴개구리, 붕어 및 가물치의 5種으로서 서울 近郊에서 채집한 成熟動物을 사용했다.

動物을 斷頭하여 即死케 한後 延髓를 除外한 全腦를 摘出하여 2~3 g을 秤量하여 塚田등(1961)의 方法에 따라서 2次元 paper chromatography 法으로 아미노酸을 분리하였는데 그 밖의 조건은 前報(朴등, 1964)와 같다.

Ⅳ. Glycogen의 組織化學的 檢出

實驗動物은 서울 近郊에서 採集한 脊椎動物 5綱 9種이고 사용한 동물은 쥐(*Rattus norvegicus* BERKENHAUT), 꼬까참새(*Emberiza rutila* PALLAS), 쇠밀화부리(*Eophona migratoria migratoria* HARTERT), 붉은 뺨멧새(*Emberiza fucuta fucuta* PALLAS), 자라(*Amyda maackii* BRANDT), 살모사, 옴개구리, 개구리 및 가물치이다.

動物을 斷頭 屠殺한다음 腦를 摘出하여 Gendre의 alcoholic Bouin 液, Opie Lavin 씨의 A.A.F. 液, Carnoy 씨液(6 : 3 : 1)에 固定, paraffin 包埋, 6μ의 部分的 連續切片을 作成하였다.

糖의 組織化學的 檢出은 Bauer chrome 酸 Schiff 反應과 Hotchkiss의 periodic acid Schiff 反應(以下 PAS라 함)을 한 다음 Harris hematoxylin으로 核染色을 하였다. 過沃度의 用法은 Lillie 씨의 變法에 의하여 過沃度酸 0.5 % 水溶液에 10分間 처리하고 Schiff 液에 15分間 反應시켰다. 이 反應으로 나타나는 赤紫色 PAS 陽性物質은 多糖類 全般, 특히 粘液多糖類와 粘液蛋白이 陽性反應을 하고, 또 腦髓成分의 하나인 cerebrosides도 같은 반응을 한다. 그러나 動物體內에서 窒素를 함유하지 않은 多糖類는 glycogen으로서 이를 特異的으로 證明하기 위하여 本實驗에서는 切片을 0.5% celloidin 膜으로 被覆하여 glycogen의 脫失을 防止하고 또 36°C에서 30分間 唾液消化를 하여 陰性化하는 PAS 陽性反應物質을 glycogen으로 단정했다. 對照標本은 같은 동물의 肝組織을 材料로 하여 同一條件下에서 처리하여 비교함으로서 glycogen을 확인했다. 組織觀察은 單眼顯微鏡으로 1,000倍 視野에서 glycogen의 分布와 種屬間의 量的差異를 定性的으로 비교하였다.

Ⅴ. Glutamate와 sodium fluoride의 처리

실험 동물은 서울 近郊에서 채집한 가물치와 개구리를 사용했으며 실험 방법은 前報(朴·崔, 1962)와 같으나 glutamate는 10 mM, sodium fluoride는 1×10^{-3} M로 했다.

實驗結果

Ⅰ. 附燐糖을基質로 했을 때의 酸素消費量

數種의 phosphorylation한 糖을 基質로 하여서 腦切片의 酸素消費量을 測定한 結果는 table 1 및 fig. 1과 같다. G-6-P를 基質로 했을 경우 가물치와 옴개구리는 endogenous respiration에 비해서 감소했으나 붕어와 개구리는 酸素消費量이 증가 하였다. 그러나 이느 경우든지 glucose 區보다는 증가하고 있고 G-1-P 添加區보다도 많은 酸素를 消費했으며 가물치와 개구리를 除外하고는 PGAL을 基質로 했을 경우 보다도 증가하였다. PGAL을 基質로 했을 경우 가물치는 endogenous respi-

ration과 별차이가 없고 붕어와 옴개구리는 상당히 감소했는데 개구리만은 상당히 증가하였다.

glucose區에 비하면 가물치와 개구리는 상당한 증가를 보여주고 옴개구리는 비슷한 量인데 붕어는 상당히 감소하였다.

G-6-P와 비교하여도 glucose와 마찬가지로 붕어는 상당히 감소했으나 옴개구리에서 약간의 감소가 보이고 가물치와 개구리에서는 증가하였다. 그러나 붕어를 除外하고는 어느 경우든지 G-1-P를 基質로 했을 때 보다는 증가하고 있다. G-1-P를 基質로 했을 경우 개구리를 除外하고는 endogenous respiration과 비교할 때 전부 감소하였는데 glucose區와 비교 하여도 마찬가지이다. G-6-P添加區와 비교하면 全種이 다같이 감소를 보여주고 있고, PGAL區와의 비교도 붕어를 제외한 三種은 다같이 감소하고 있다.

위의 실험성적으로 보아서 前報(朴·崔, 1962)에서와 마찬 가지로 개구리는 glucose를 제외한 어느 基質에서도 endogenous respiration보다 증가하여 다른 無羊膜類에

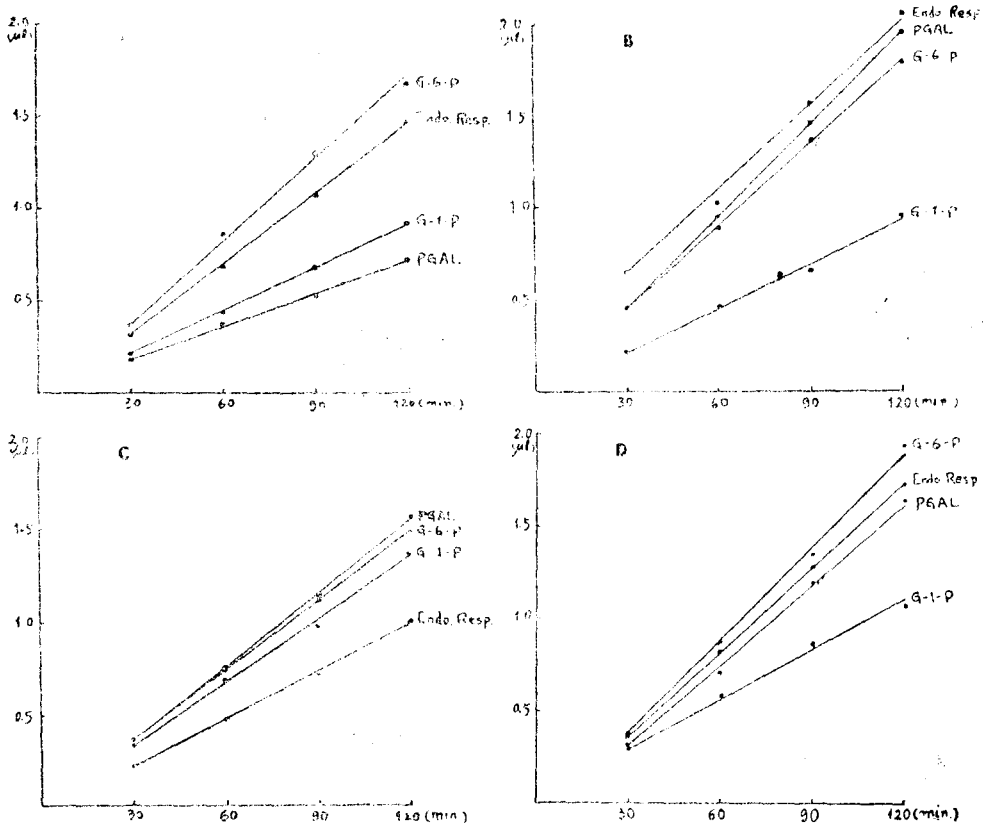


Fig. 1. Influence of several substrates on the rate of oxygen consumption(QO_2 μl/mg/hr).
Buffer, Kreb's Ringer phosphate; pH, 7.2; gas, air; temp.: 30°C.
A. *Carassius carassius* B. *Ophicephalus argus* C. *Rana nigromaculata* D. *R. rugosa*

Table 1. Influence of several substrates on the rate of oxygen consumption (QO_2μl/mg/hr).

	Endogenous respiration*	Glucose*	G-6-P	G-1-P	PGAL
Carassius carassius	0.73	0.69	0.83	0.45	0.35
Ophicephalus argus	0.98	0.88	0.89	0.43	0.97
Rana nigromaculata	0.56	0.47	0.74	0.67	0.78
R. rugosa	0.88	0.84	0.86	0.58	0.82

* Previously reported by Park and Choi (1962).

Table 2. Utilization of glucose-1-C^{14} during 30 minute incubation of silver carp brain slices.

Specific activity of the medium before incubation	Specific activity of the medium after incubation	Per cent decrease in specific activity
1463 cpm/100λ	675 cpm/100λ	53.18

비하여 특별한 위치에 있는 것을 볼 수 있다.

Ⅱ. Glucose 1-C^{14}의 利用率

glucose가 力源으로서 腦에서 어떤 경로로 어느 정도 이용되는지 또 無羊膜類 腦의 呼吸基質로서 중요한 구실을 하지 않은지를 알아보기 위하여 glucose-1-C^{14}을 붕어의 腦切片과 같이 30分間 incubation 한 뒤 그 차이를 구해본 결과는 table 2와 같이 53.18%나 감소 하였다.

Ⅲ. 腦內 游離 아미노酸의 種屬間 分布狀態

Paper chromatogram의 pattern은 fig. 2와 같고 脊椎動物 五綱 十六種에서 얻은 아미노酸의 종류와 비교함량은 table 3과 같다. Aspartic acid, glutathione, glutamic acid, serine, glycine, alanine, tyrosine, GABA, leucine 등 9종은 닭(*Gallus gallus*)과 메기를 제외하고는 전 실험동물의 腦에서 검출되었고 cystine은 밴댕이(*Harengula zunashi*), 메기(*Parasilurus asotus*) 등 2종의 魚類와 닭을 除外한 鳥類, 爬虫類에서 검출되었으며 兩棲類에서는 확인되지 않았다. arginine은 밴댕이와 爬虫類 그리고 닭을 제외한 鳥類에서 검출되었고, valine은 밴댕이에서만 검출되었다. 쇠밀화부리와 꼬까참새 등 鳥類와 爬虫類에서만 methionine을 찾아 볼 수 있고 살모사에서는 phenylalanine과 unknown B가 검출되었으며 소에서는 unknown A가 있었다.

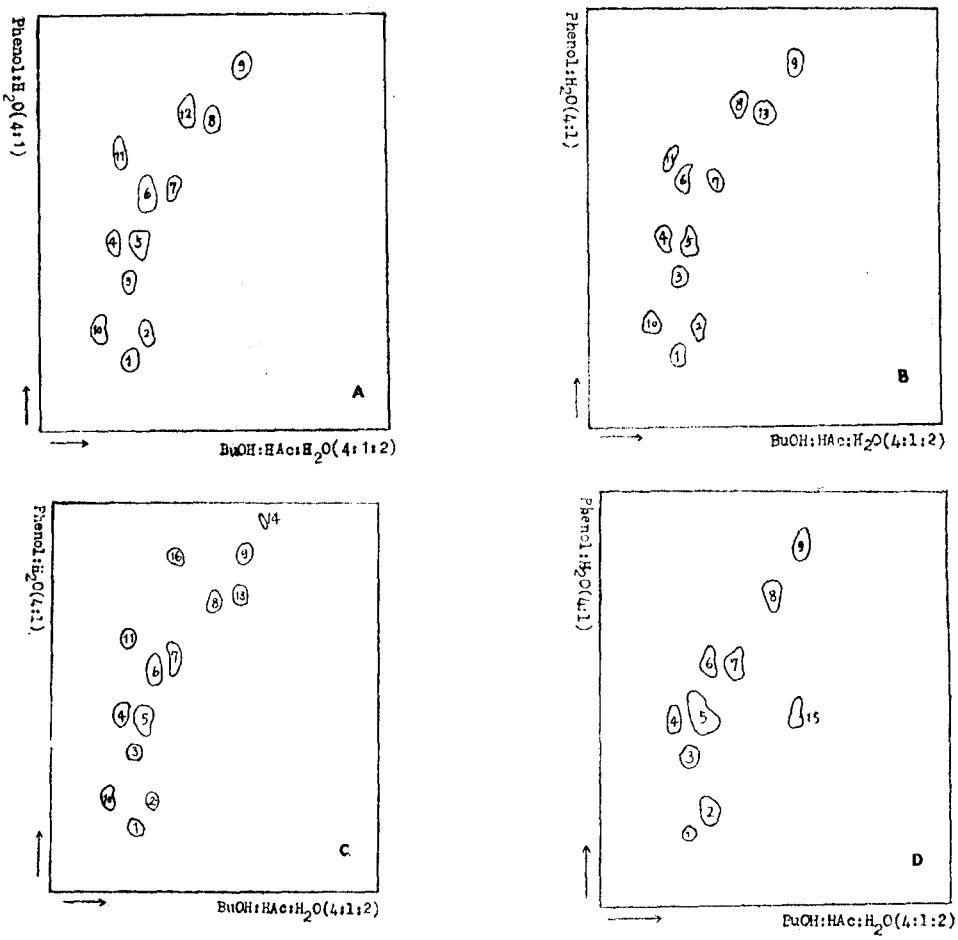


Fig. 2. Patterns of free amino acids in brain tissues.
1. aspartic acid 2. glutathione 3. serine 4. glycine 5. glutamic acid 6. alanine 7. tyrosine 8. γ-aminobutyric acid 9. leucine 10. cystine 11. arginine 12. valine 13. methionine 14. phenylalanine 15. unknown A 16. unknown B
A. *Harengula zunashi** B. *Amyda maackii** C. *Agkistrodon halys brevicaudus* D. *Bos taurus**
* Previously reported by Park *et al.* (1964).

十六種의 動物腦內 游離 아미노酸의 비교함량은 glutamic acid가 全種에 걸쳐서 가장 많은 量을 차지하고 있고 이어서 GABA, alanine이 상당량 검출 되었으며 aspartic acid, glycine, leucine 등도 비교적 많았다.

Table 3. Contents of free amino acids in brain tissues.

		Asp	GSH	Ser	Gly	Glu	Ala	Tyr	GABA	Leu	Cys	Arg	Val	Met	Phe	unknown A	unknown B
Pisces	*Hemibarbus labeo**	++	+	++	++	+++	+++	+	++	+							
	*Harengula zunashi**	++	+++	++	++	++++	+++	++	++	++	++	++	+				
	*Parasilurus asotus**	++		++	++	++++	++		+	++	+						
	*Sawara niphonia**	++	+++	++	++	++++	+++	++	++	++							
	Ophicephalus argus	++	+	++	++	+++	+++	+	++	+							
	Carassius carassius	++	+	++	++	+++	+++	+	++	+							
Amphibia	*Bombina orientalis**	++	+++	++	++	++++	++	+++	+++	++							
	Rana rugosa	++	+++	++	++	++++	++	+++	++	++							
	Rana nigromaculata	++	++	++	++	++++	+++	++	++	+							
Reptilia	*Amyda maackii**	++	+++	++	++	++++	+++	++	++	++	++	+		+++			
	Agkistrodon halys brevicaudus	+	+	+	++	+++	+	++	+++	++	+	+		++	+		+
Aves	*Gallus gallus**	++			++	+++	+++		++								
	*Eophona migratoria**	++	+++	++	++	++++	+++	++	+++	++	++	+		+			
	*Emberiza spodocephala**	++	+++	++	++	++++	+++	++	+++	++	++	+					
	*Emberiza rutina**	++	+++	++	+++	++++	+++	++	+++	++	+	+		+			
Mammalia	*Bos taurus var. domesticus**	++	+++	++	+++	++++	++	++	+++	++							+

* Previously detected by Park *et al.* (1964).

Ⅳ. Glycogen의 種屬間 分布

組織化學的으로 glycogen을 檢出한 結果는 table 4, fig. 4~10과 같다.

軟蜘蛛膜은 섬세한 膠原纖維束이 軟弱彈力 纖維網과 서로 얽혀있고 많은 血管, 大喰細胞, 游離喰細胞, 특히 개구리는 色素細胞등으로 구성되어 있는데 PAS陽性物質인 glycogen은 哺乳類인 쥐와 鳥類인 꼬까참새 붉은 뺨멧새, 쇠밀화부리는 거의 없는데 그밖의 실험 동물은 陽性顆粒의 크기, 分布 및 含量에 여러 程度로 種的變異가 있으나 魚類, 兩棲類, 爬虫類에 속한 실험동물에서

Table 4. Distribution of the PAS positive material(glycogen) in vertebrate brain tissues.

		Arachnoid membrane	Epithelial cells of choroid plexus (anterior)	Nerve cells	Telencephalon dielencephalon	Optic lobe in mesencephalon	Mesencephalon and myelencephalon	Interstitial tissue
Pisces	*Ophicephalus argus*	++	++	++	+	±	+	+
Amphibia	*Rana nigromaculata*	++	++	++	+	±	+	+
	Rana rugosa	++	++	++	+	±	+	+
Reptilia	*Agkistrodon halys brevicaudus*	++	+++	+++	+	±	+	+
	Amyda maackii	+++	+++	+++	+++	++	+++	+
Aves	*Emberiza rutina*	—	—	—	—	±	—	—
	Emberiza fucuta fucuta	—	—	—	—	±	—	—
	Eophona migratoria migratoria	—	—	—	—	±	—	—
Mammalia	*Rattus norvegicus*	—	—	—	—	±	—	—

는 전부 검출되었다. 그중에서도 자라가 가장 많고 남아지 4種은 뚜렷하게 量的比較를 할수 없었다.

脈絡叢의 上皮細胞는 腦室底에 五皮板으로 되고 여기에 血管이 풍부한 腦軟膜이 부착하여서 이루어진 특수한 血管性 上皮細胞塊인데 PAS陽性物質인 glycogen은 쥐, 꼬까참새, 붉은 뺨멧새, 쇠밀화부리에서는 증명할만한 양이 못되나 다른 種은 顆粒의 크기와 分布狀態는 여러가지 정도로 다르지만 上皮細胞內에서 증명되고 대부분의 경우 上皮細胞質의 一極에 모여서 顆粒狀을 구별할 수 없을 정도로 板狀塊 物質로 나타난다.

이처럼 細胞質內에서 glycogen이 一極에 모여 極性을 나타내는 것은 生體材料에서는 細胞質內에 고르게 分布하든 것이 固定처리로 말미암아 固定液의 侵入方向과는 반대 방향으로 蓄積 내지는 침전한 것이 아닌가 생각된다. 이러한 결과는 脈絡叢의 上皮細胞에서 뿐 아니라 神經細胞體에서도 볼 수 있다.

神經細胞는 腦의 부위에 따라서 群集내지 散在하고 있고 分布와 수효는 차이가 있는데 神經細胞에서도 쥐와 꼬까참새, 붉은빰맷새, 쇠밀화부리는 인정할 만한 glycogen의 顆粒을 볼 수 없으나 그밖의 動物에서는 쉽게 관찰할 수 있다. 특히 자라의 神經細胞의 細胞質內에는 好鹽基性인 Nissl小體를 구별할 수 없을 정도로 PAS陽性物質을 포함하고 있는 細胞가 허다하다. 이보다 少量 함유된 神經細胞라 하드라도 樹枝狀突起의 基始部까지 PAS陽性物質을 관찰할 수 있고 고정처리에 인하여 顆粒이 極性化한 것도 있다. 그밖의 동물은 자라에 비교할 수는 없으나 비교적 선명한 Nissl小體사이에 散在한 小滴狀顆粒으로 나타나는 경우와 고정처리로 인하여 세포질의 一極에 板狀物로 검출되는 경우 등 여러가지 정도로 관찰되었다. 이러한 顆粒을 포함한 神經細胞의 수효 및 量的出現頻度는 자라를 除外하면 살모사가 가장 많고 옴개구리, 개구리, 가물치의 順으로 되어 있다. 쥐와 꼬까참새, 붉은빰맷새, 쇠밀화부리의 神經細胞에는 PAS陽性物質인 glycogen이라고 단정할 만한 것이 없고 다만 多極性 大形細胞에서 간혹 反應이 극히 약한 小滴狀顆粒을 볼 수 있는데 이것은 glycogen이라고 단정할 만한 조건을 갖추고 있지않다. 中樞神經系統에서 支柱的 구실과 영양을 담당하고 있는 間質組織과 neurone의 突起로서 구성되어 있는 腦組織에서도 PAS陽性인 glycogen은 쥐와 꼬까참새, 붉은빰맷새, 쇠밀화부리에는 전혀없고 他種은 部位別分布와 顆粒의 크기 그리고 量은 틀리지만 檢出되었다.

終腦 및 間腦의 PAS陽性物質은 자라에서는 어떤 部位에서나 顆粒狀으로 存在하지만 살모사, 개구리, 옴개구리, 가물치는 극히 少量이고 種間差異는 있으나 缺한 部位가 많다. 中腦의 視葉에도 자라를 제외한 다른 종류에서는 극히 少量이다. 後腦 및 末腦에는 많은 顆粒이 있는데 특히 자라의 경우는 後腦의 小腦顆粒層糸球에 群集하고 神經節細胞層까지 연장되었으며 分子層에도 상당한 量이 있다. 末腦에는 部分的으로 群集된 곳이 있는데 대부분의 경우는 顆粒性 PAS陽性物質이 散在한다. 살모사, 개구리, 옴개구리, 가물치는 자라에서 처럼 群集한 것이 극히 적고 散在하는데 자라와는 비교할 수 없을 정도로 量이 적다.

가물치의 腦에 分布하고 있는 毛細血管內에 간혹 PAS陽性顆粒이 內容物처럼 나타나는데 이것은 glycogen이 血流中에 순환하지 않는다는 의견과는 相反된다. 그런데 이는 血管內皮細胞質內의 glycogen이 고정처리로 인하여 內皮細胞 形質膜의 損傷으로 인하여 혈관 속으로 流出된 것인지 또는 표본제작중에 생긴 人工的產物이 아닌가 생각된다.

이상 脊椎動物 各綱에 걸친 動物腦內 glycogen을 組織化學的으로 증명하였는데 이를 종합하면 자라가 腦의 각 부위에서 가장 많고 이어서 살모사, 옴개구리, 개구리, 가물치의 順으로 되어있는데 쥐와 꼬까참새, 붉은빰맷새, 쇠밀화부리는 軟蜘蛛膜과 脈絡叢 및 神經細胞體에서 不確實한 PAS陽性物質이 출현하지만 組織化學的方法으로 증명할 수 없을 정도로 少量이든가, 표본제작중에 생긴 人工產物인지 모르나 glycogen이라고 단정할만한 PAS陽性物質이 檢出되지 않았다. 즉 本實驗 結果로 보아 자라를 비롯하여 爬蟲類이하의 脊椎動物 五種에서는 전부 檢出되었으나 鳥類와 哺乳類에 속한 四種에서는 다같이 檢出되지 않았다.

Ⅴ. Glutamate에 의한 呼吸

아미노酸의 分析結果로 보아서 glutamic acid가 전체 실험동물을 통해서 함량에 있어서 최고치를 표시하고 있기 때문에 GABA shunt를 통해서 TCA cycle에 대한 feedback의 역할을 하는 機構도 아울러 존재한다고 생각되어 glutamate를 基質로 했을 때의 산소 소비량과 sodium fluoride로서 phosphoglucomutase를 inhibit하여 glycogen의 消費를 阻止한 腦切片의 산소 소비량을 비교한 결과는 table 5, fig. 3과 같다.

Table 5. Influence of glutamate on the rate of oxygen consumption (QO_2 μl/mg/hr).

	Endo. resp.*	Glutamate	NaF
Ophicephalus argus	0.98	0.60	0.66
Rana nigromaculata	0.56	0.60	0.60

* Previously reported by Park and Choi (1962).

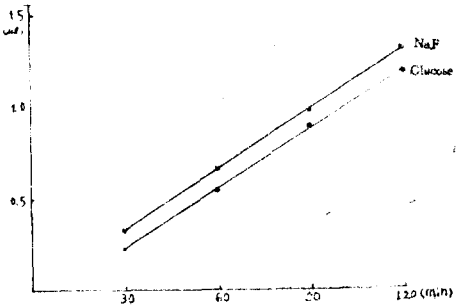


Fig. 3. Influence of glutamate on the oxygen consumption in the *Ophicephalus argus* brain slices (QO_2 μl/mg/hr.). Buffer, Krebs-Ringer phosphate; pH, 7.2; gas, air; temp., 30°C.

가물치는 endogenous respiration에 비하여 glutamate로서 감소했는데 sodium fluoride를 添加했을 때는 endogenous respiration에는 미치지 못하나 glutamate區보다는 약간 많은 산소를 소비했다. 개구리는 어느 경우든지 endogenous respiration과 인정할 만한 차이가 없었다.

考 察

정상 腦組織에서는 血液에서 minute-to-minute로 공급되는 glucose가 唯一한 力源이라고 하는 의견은 諸家의 一致된 見解인데(McIlwain, 1955; Elliot *et al.*, 1962), glucose는 정상 상태에서는 Embden-Myerhof 系를 거쳐서 TCA cycle로서 酸化되고 hexosemonophosphate shunt는 중요하지 않다(Bloom, 1955; Sacks, 1957). Quastel(1939)은 정상 腦組織에서 glucose, fructose, mannose로서 현저하게 증가한다고 했는데 이들은 enediole form을 介在하여 서로 interconvert하기 때문에 다른 기관에서 glucose로 변화한 다음에 이용되는 것이고 fructose나 mannose 그대로의 형태로는 이용할 수 없다. 朴·崔(1962)는 glucose를 基質로 했을 때 哺乳類와 鳥類 爬蟲類에서는 酸素消費가 증가했으나 進化系列에 있어서 그보다 下位에 있는 兩棲類와 魚類는 오히려 glucose로서 呼吸阻害가 일어난 것을 보고하여 이들은 glycogen을 力源으로서 利用하지 않는가 하는 의견을 말한 바 있는데 本實驗에서 燐酸이 附加되어 있는 glucose-6-phosphate와 glyceraldehyde-3-phosphate 그리고 glycogenolysis의 成員의 하나인 glucose-1-phosphate를 基質로 하여 無羊膜類 四種에 대한 腦切片의 酸素消費量을 측정하여 보아도 이렇다 할 傾向性을 찾아볼 수 없었는데 본실험에서 사용한 동물의 腦切片의 endogenous respiration이 羊膜類에 비하여 일반적으로 높기 때문에(朴·崔, 1962) 이번 경우도 哺乳類에서 처럼 그때 그때 血流에서 공급되는 glucose를 力源으로 쓰는 好氣性 呼吸보다 glycogen의 이용이 더욱 중요한 구실을 하기 때문이라고 생각할 수 있다. 그런데 개구리만은 例外的으로 모든 基質로서 酸素消費量이 증가했는데 개구리가 다른 종류에 비하여 endogenous respiration이 훨씬 얕은 사실에 비추어 볼때 附燐糖의 효과가 있었다고 생각할 수 있다. 그러나 glycolysis의 中間成員인 hexose-diphosphate, hexose-6-phosphate(Quastel *et al.*, 1932) 및 phosphoglycerate(Jowett *et al.*, 1937)로서 腦呼吸이 미미한 것은 phosphate acceptor가 medium에 없기 때문에라는 의견도 있다.

일반적으로 魚類와 兩棲類에 屬하는 실험동물 腦組織의 呼吸基質에 대한 태도는 Pasteur 效果에 비추어 보드라도 glucose의 酸化보다 解糖이 이루어 진다고 생각할 수 있는데 glycogen의 組織化學的 方法에 의한 檢出결과도 魚類, 兩棲類, 그리고 爬蟲類까지도 많은 量이 含有되어 있었는데 魚類와 哺乳類에서는 確認되지 않은 사실은 魚類와 兩棲類는 energy 代謝의 力源으로서 glycogen에 의존하고 있고 glucose를 血流에서 minute-to-minute로 공급받아서 energy 源으로 쓰는 mechanism은 爬蟲類에서 획득한 機能이고 鳥類와 哺乳類에 이르러 완성되었다고 할 수 있다. 그리고 爬蟲類는 위의 두가지 機構가 並行할 수 있는 中間型이라고 생각된다.

高橋등은(1957) 쥐와 메기의 腦 *mitochondria*로서 呼吸基質에 대한 酸素消費를 비교했는데 glucose에 의한 酸素消費나 glucose에 의한 乳酸形成이 쥐보다 메기가 적었는데 이는 魚類의 解糖이 强하다는 것을 의미한다. 또 Lφvtrup *et al.* (1963), Lφvtrup(1964)도 brain mitochondria로서 glucose-6-phosphate基質에서는 호흡에 별다른 변동이 없고 glycerol-1-phosphate로서 약간의 증가가 있었는데 이러한 사실도 본실험 결과와 흡사하다.

붕어의 腦切片을 glucose-1-C^{14}과 같이 *incubation*했을 때 53.18%나 glucose가 減少했음에도 불구하고 酸素消費量은 5.47%나 감소했다. 이것은 glucose의 감소가 乳酸이나 glutamic acid, aspartic acid, glutamine, γ-aminobutyric acid등의 아미노酸으로 전환될 가능성이 있다(Tsukada *et al.*, 1958). Glucose의 C^{14}-carbon이 아미노酸으로 incorporation하는 일은 다른 器官에서는 볼수 없는 현상이기 때문에 腦切片에서는 glucose가 아미노酸 代謝에 참여함으로서 glucose-1-C^{14}의 감소가 일어날 수도 있다. 더욱 遊離아미노酸의 분석결과(table 3)를 보아도 脊椎動物 전반에 걸쳐서 아미노산 代謝樣式은 별다른 차이가 없는 것 같다. 즉 glutamic acid를 비롯하여 GABA, aspartic acid, glutamine, N-acetyl aspartic acid가 腦代謝의 중요한 구실을 한다고 생각되는데 魚類이상의 脊椎動物은 遊離아미노酸의 종류나 함량으로 보아서 相同的 機能이 수행되고 아미노酸의 代謝 pattern이 비슷하리라고 생각된다. 그것은 頭足類(塚田등, 1961)의 아미노酸과 비교하여 볼때 脊椎動物 相互間의 類似性에 비하여 종류와 함량에 있어서 현격한 차이가 있기 때문이다. 더욱 본실험에서 脊椎動物 전반에 걸쳐서 glyceraldehyde-3-phosphate에서 출발하여 GABA shunt에 연결되는 經路에 관여하는 아미노산과 GABA shunt에 관여하는 아미노산이 전부 검출되었는데 energy 代謝와 관련하여 이러한 shunt가 脊椎動物 各綱에 걸쳐서 보편적으로 존재한다고 생각된다. Glucose-6-phosphate와 glyceraldehyde-3-phosphate를 基質로 했을 경우 붕어를 제외하고는 glucose를 基質로 했을 때보다 酸素소비가 많든가, 거의 비슷하였고 glucose-1-phosphate는 개구리를 제외한 三種에서는 다같이 산소 소비량이 적었다. Lφvtrup *et al.* (1963)과 Lφvtrup(1964)에 의하면 腦에서 glucose-6-phosphate의 酸化經路는 unknown pathway를 거친듯 하다고 했는데 附燐糖을 基質로 했을 때의 산소소비와 glucose-1-C^{14}에 대한 본 실험을 아울러 생각할 때 흥미있는 일이다. 따라서 본 실험의 附燐糖도 Lφvtrup

의 unknown pathway에 참여할지도 모르고 이 pathway는 아미노酸의 代謝와 관련되어 있을지도 모른다.

한편 glutamate와 sodium fluoride로서 phosphohexomutase의 작용을 억제한 腦切片의 산소 소비량을 보면 가물치는 endogenous respiration보다 약간 저하했고, sodium fluoride를 添加함으로서 어느정도 증가하였으나 개구리는 어느 경우든지 endogenous respiration과 차이가 없었다. 이처럼 glutamate나 inhibitor에 대해서 인정할만한 영향이 없는 것은 附燐糖을 基質로 했을 경우 가물치는 모든 基質에서 산소 소비가 억제되었고 개구리는 모든 基質에서 증가했다는 것과 符合되는데 이러한 점과 EMP 經路에 참여하는 酵素系의 抑制劑로서 腦切片 代謝에 현저한 障害가 없다는 의견(Weil-Malherbe, 1952; Takagaki, *et al.*, 1958)에 비추어 볼 때 glutamate나 sodium fluoride에 對한 腦切片의 태도도 수긍할 수 있다. 附燐糖이나 glutamate를 基質로 했을 때의 이러한 腦切片의 태도는 glucose에 대한 태도에 비추어 생각할 때 解糖이 優勢하다고 볼수 있는데 개구리는 endogenous respiration이 적으므로 燐酸에 대한 효과가 있다고 생각한다.

腦內貯藏 glycogen의 組織化學的 檢出로 보아 無羊膜類에 속한 4種의 실험동물은 好氣的 酸化보다 解糖이 더욱 우세하고 鳥類와 哺乳類로 발달하면서 glucose의 好氣的 酸化樣式으로 進化했으며 爬虫類는 過渡的으로 두가지 樣式이 並行되고 있다는 것을 확실하게 하고 있다. 즉 魚類와 兩棲類는 嫌氣型의 energy生成系가 우세하나 爬虫類 二種은 다같이 嫌氣型과 好氣型의 代謝를 겸하고 있으며 鳥類와 哺乳類는 血液腦關門의 成立과 아울러 好氣型의 energy生成系가 월등 우세하다고 할 수 있다. 魚類, 兩棲類를 거쳐서 발달한 嫌氣的 解糖機構는 爬虫類에서 절정에 달하여 가장 많은 glycosgn을 포함하고 있으며 鳥類와 哺乳類에 이르러서는 好氣型의 energy生成機構를 획득하면서 glycogen의 저장도 미약하게 되었다고 할 수 있다.

水中에서 陸上生活로 옮겨지면서 酸素가 보다 풍부하다는 物理的 原因도 생각할 수 있겠으나 動物行動의 發達과 大腦의 發達이라는 점을 고려할 때 進化學的 意義를 찾아 볼 수 있다.

摘 要

脊椎動物 腦組織의 energy代謝樣式의 系統學的 변화를 알아보기 위하여 Warburg's manometric method로 glucose-1-phosphate, glucose-6-phoshate, glyceraldehyde-3-phosphate등 附燐糖과 緊急 呼吸基質이라고 생각되는 glutamate를 基質로하여 腦組織의 산소 소비를 측정 했고, glucose-1-C^{14}의 利用率 및 아미노酸의 分析과 組織化學的 方法으로 glycogen의 種間分布를 測定하였다.

1. Glucose를 基質로 했을 때 腦切片의 산소 소비량은 爬虫類, 鳥類, 哺乳類에 속하는 동물은 다같이 endogenous respiration에 비하여 증가했는데 魚類와 兩棲類에 속한 동물은 다같이 억제되는 경향이 있다.

2. 附燐糖을 呼吸基質로 했을 때 G-6-P는 呼吸基質로서 glucose보다는 효과적이나 G-1-P, PGAL은 개구리에서만 효과적이다.

일반적으로 endogenous respiration이 큰 種은 附燐糖으로서 산소 소비율이 낮고 endogenous respiration이 얕은 種은 附燐糖으로서 산소 소비율이 높은 경향이 있다.

3. 脊椎動物 全般에 걸쳐서 아미노산의 종류나 비교함량의 pattern은 대체로 비슷하고 어느 種에 있어서나 glutamic acid가 가장 많고 이어서 γ-aminobutyric acid, glycine, alanine, aspartic acid등이 검출되었다.

4. Glutamate를 基質로 했을 때의 산소 소비량은 가물치에서는 endogenous respiration보다 감소하였으나 sodium fluoride를 첨가함으로서 어느 정도 증가 하였다. 개구리에서는 어느 경우든지 endogenous respiration과 별다른 차이를 찾아볼 수 없다.

5. 組織化學的 方法으로 glycogen을 검출한 결과 魚類와 兩棲類 및 爬虫類에 속하는 동물은 例外없이 確認되었고 특히 자라에는 多量含有되어 있었다. 그러나 鳥類와 哺乳類에 속한 동물에서는 glycogen이라고 단정할만한 顆粒이 없었다. 이로서 魚類와 兩棲類 및 爬虫類는 力源으로서 嫌氣性 解糖이 우세하고 鳥類와 哺乳類는 glucose酸化의 好氣性呼吸이 우세하며 爬虫類는 위의 두 가지를 兼한 過渡的 機能을 가지고 있다고 할 수 있다. 즉 血流에서 그때 그때 공급되는 glucose를 酸化하여 腦活動의 energy를 얻는 방법은 爬虫類에서 획득한 機能이고 이 機能이 鳥類와 哺乳類에 이르러서 완성되어다고 생각할 수 있다.

文 獻

淺野正夫, 1960. 大腦皮質切片に於けるアミノ酸の代謝に關する硏究. 日本生理誌 22 : 7, 644—652.

Baxter, C., J.P. Schade and E. Robert, 1960. Inhibition in the Nervous System and γ-Aminobutyric Acid. Pergamon Press. 214.

Bloom, B., 1955. *Proc. Soc. Exper. Biol. & Med.* 88, 317 (cited from Elliott *et al.*, 1962).

Elliott, K. A. C., I. H. Page and J.H. Quastel(editor), 1962. Neurochemistry(2nd ed). Charles & Thomas Publisher, Springfield, Illinois.

Gibbs, E.L., W. G. Lennox, L.F. Nims and F.A. Gibbs,

1942. Arterial and cerebral venous blood (Arterial-venous differences in man). *J. Biol. Chem.* 144, 325—332.

河斗鳳・李陽林, 1961. 맹꽁이 組織內遊離아미노酸의 定性的分析. 동학지 4 : 2, 39—44.

Jowett, M. and J.H. Quastel, 1937. Effects of hydroxymalonate on the metabolism of brain. *Biochem. J.* 31, 275—281.

Kerr, S.E. and M. Ghantus, 1936. Carbohydrate metabolism of brain(Ⅱ). The effect of varying the carbohydrate and insulin supply on the glycogen, free sugar and lactic acid in mammalian brain. *J. Biol. Chem.* 116, 9.

Knauff, H.G.,G. Meyer and D. Marx, 1961. Amino acid of brain proteins. *Z. Physiol. Chem.* 326, 78—88.

Loewi, O., 1921. Über humorale Übertragbarkait der Herznervenwirkung. *Pflüg. Arch. ges. Physiol.* 189, 239.

Lφvtrup, S. and L. Svennerholm, 1962. Chemical properties of brain mitochondria. *Exptl. Cell Research* 29, 298—313.

Lφvtrup, S., 1964. Brain Mitochondria. Progress in Brain Research 4(D.P. Purpura and J.P. Schadé, editors). Elsevier Publishing Company, Amsterdam, Netherlands.

Maddocks, S., J.E. Hawkins and E. Holmes, 1939. The inadequacy of substance of the glucose cycle for maintenance of normal cortical potentials during hypoglycemia produced by hepatectomy with abdominal evisceration. *Am. J. Physiol.* 125, 551—565.

Mann, F.C., 1927. *Medicine* 6, 419 (cited from McIlwain, 1955).

Mann, F.C. and T.B. Magath, 1922. *Arch. Int. Med.* 30, 171(cited from McIlwain, 1955).

McIlwain, H., L. Buchel and J.D. Cheshire, 1951. Inorganic phosphate and phosphocreatine of brain especially during metabolism *in vitro*. *Biochem. J.* 48, 12—20.

McIlwain, H., 1955. Biochemistry and the Central Nervous System. J.&A. Churchill, LTD., London.

Okumura, N., S. Otsuki and T. Aoyama, 1959. Studies on the free amino acids and related compounds in the brain of Fish, Amphibia, Reptile, Aves and Mammals by ion exchange chromatography. *J. Biochem.* 46 : 2, 207.

朴相允・崔媛永, 1962. 脊椎動物腦組織의 酸素消費에 관하여. 成均館大學校論文集 7, 234—242, 410—411.

朴相允・李相億・崔志赫, 1964. 脊椎動物腦組織內游離아미노酸의 比較生化學的研究. 李徽載博士華甲記念論文集 55—59.

Quastel, J.H. and A.H.M. Wheatley, 1932. *Proc. Roy. Soc.*, B 112, 60(cited from Ito *et al.*, 1957).

Quastel, J.H. and A.H.M. Wheatley, 1932. Oxidation by the brain. *Biochem. J.* 26, 725—744.

Quastel, J.H., 1939. *Physiol Rev.* 19, 135(cited from Ito et al., 1957).

Roberts, R.B.,J.B. Flexner and L.B. Flexner, 1959. Biochemical and physiological differentiation during morphogenesis, XXIII. Further observations relating to the synthesis of amino acids and proteins by the cerebral cortex and liver of the mouse. *J. Neurochem.* 4, 78.

Sacks, W., 1957. Cerebral metabolism of isotopic glucose in normal human subjects. *J. Appl. Physiol.* 10, 37—44.

Stein, W.H. and S. Moore, 1954. The free amino acids of human blood plasma. *J. Biol. Chem.* 211, 915—926.

Svorad D., 1958. Diurnal change in the brain glycogen. *Experientia* 14 : 12, 452.

Takagaki, G., S. Hirano and Y. Tsukada, 1958. Effects of some inhibitors on the metabolism of guinea pig brain slices. *J. Biochem.* 45, 41—48.

高垣玄吉郎・石川晋次, 1960. 腦の糖質代謝とその意義. 蛋白質・核酸・酵素 7 : 13, 61—70.

Tallan, H.H., S. Moore and W.H. Stein, 1958. L-cystathionine in human brain. *J. Biol. Chem.* 230, 707—716.

高橋泰常・白寄邁・長野敬, 1957. 腦の呼吸に關する比較生化學的研究(Ⅱ). 生化學 29 : 9, 590.

Thudichum, J.W., 1884. A Treatise on the Chemical Constitution of the Brain. Bailliere, Tindal & Cox.

塚田裕三・永田豊, 1961. ペパクロマトグラフイによる腦組織內游離アミノ酸の定量分離法について. 生化學 33 : 1, 6—55.

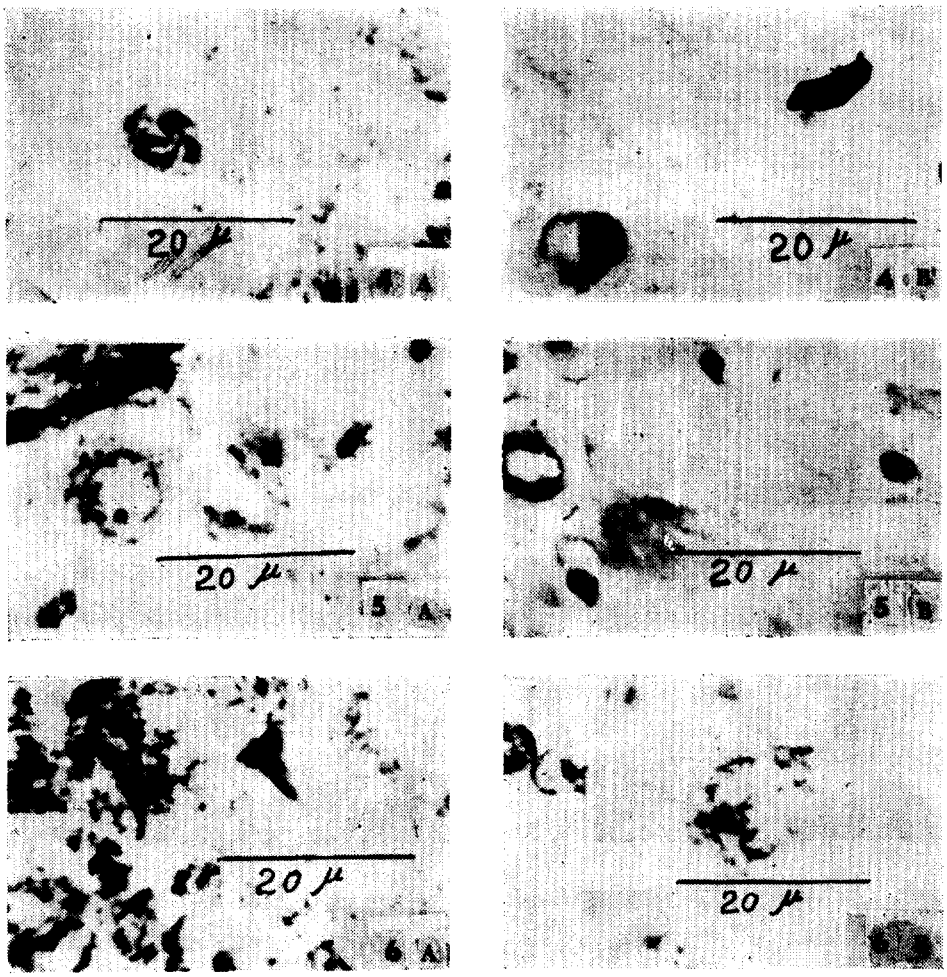
塚田裕三・永田豊・植村慶一・平野修助, 1961. 腦內游離アミノ酸の比較生化學的研究. 科學 31 : 2, 89—90.

Tsukada, Y., Y. Nagata and G. Takagaki, 1958. Metabolism of γ-aminobutyric acid in brain slices. *J. Biochem.* 45, 979.

Weil-Malherbe, H., 1956. *Biochem. J.* 30, 655(cited from Naruse *et al.*, 1962).

Weil-Malherbe, H., 1952. Colloquium der Gesellschaft für physiologische Chemie 41.

PLATE 1



Explanation of the plates

A: Tissues containing PAS positive material(glycogen).

B: The same tissues as A after saliva test.

Distinctive PAS positive grains are seen in figs. 4—9; no corresponding spots are found in fig. 10.

Fig. 4. *Ophicephalus argus*(brain cortex)

Fig. 5. *Rana nigromaculata*(brain cortex)

Fig. 6. *Rana rugosa*(brain cortex)

PLATE 2

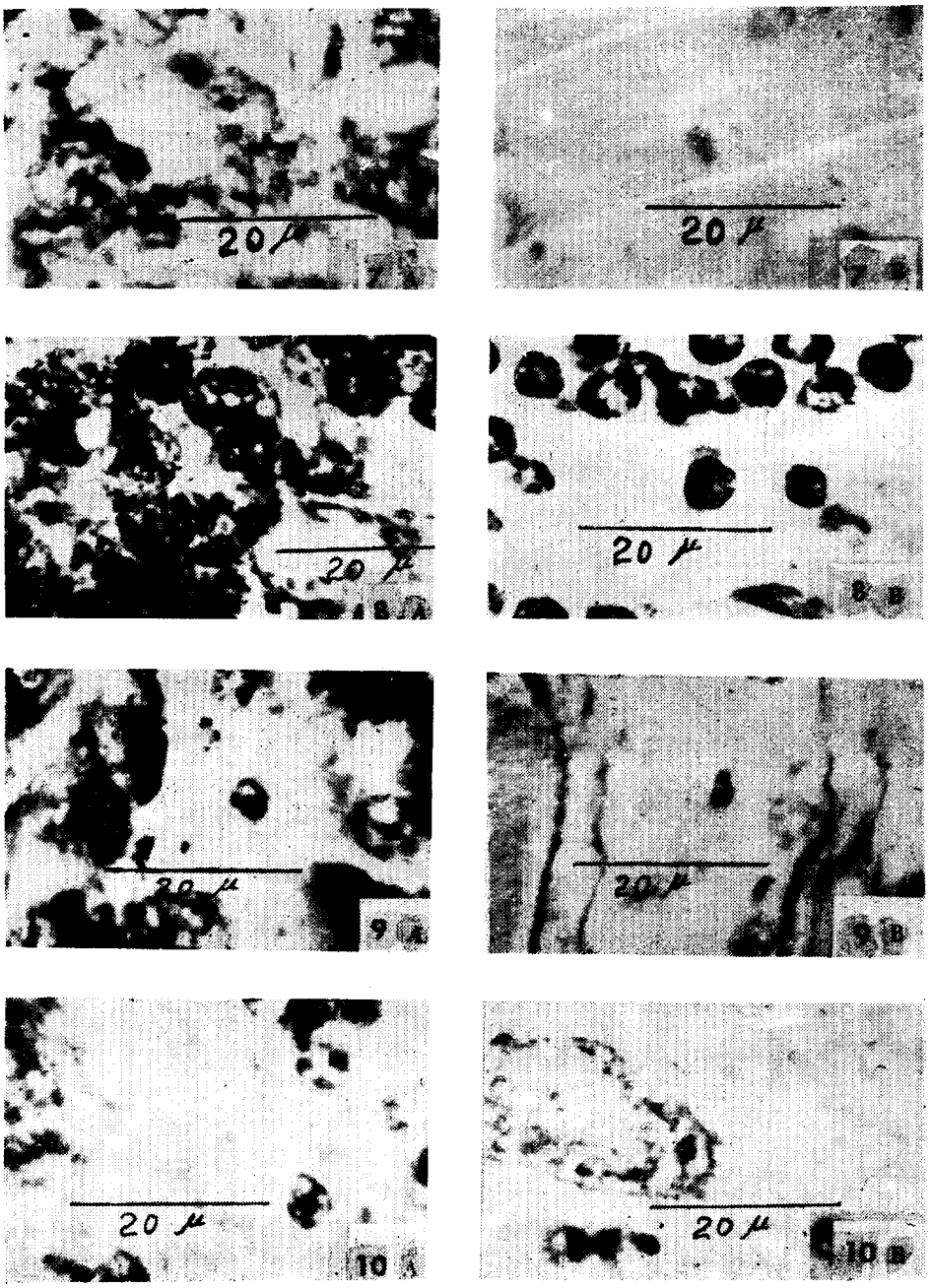


Fig. 7. *Agkistrodon halys brevicaudus*(brain cortex)

Fig. 8. *Amyda maackii*(grey matter of cerebellum)

Fig. 9. *Amyda maackii*(choroid plexus)

Fig. 10. *Emberiza rutina*(brain cortex)