

척추동물의 Isozyme에 관한 비교연구 II. 개구리목 뇌조직의
Lactate 및 Malate Dehydrogenase Isozyme*

박상윤·조동현·고정식
(성균관대·생물학과)

Comparative Studies of Isozymes in Vertebrate. II. Lactate and Malate
Dehydrogenase Isozymes of Brain Tissues from Korean Anura

Sang Yoon Park, Dong Hyun Cho and Jung Sik Ko
(Dept. of Biology, Sung Kyun Kwan University)

(1972. 9. 10 수록)

SUMMARY

A cellulose acetate electrophoretic survey of Korean Anura has revealed the presence of diverse lactate and malate dehydrogenase (LDH and MDH) isozymes. The pattern of LDH and MDH isozymes in the tissues of the central nervous system of the six species of Anura examined are species specific and differ from those of mammals and birds.

Both *Rana nigromaculata nigromaculata* and *Rana nigromaculata coreana* have two molecular forms of LDH and MDH, respectively, with almost the same pattern. Whole brain homogenate of *Rana temporaria* shows also a maximum of only two LDH isozymes. Both *Bufo bufo asiaticus* and *Bombina orientalis* have five molecular forms of LDH with an entirely different spacing on the zymograms, whereas *Rana rugosa* has three.

Two molecular forms of MDH are present in all animals examined and one band is shown in olfactory lobe and mixture of cerebellum and medulla oblongata of *Rana nigromaculata nigromaculata*.

서 론

척추동물의 isozyme 중에서 가장 잘 밝혀진 것은 lactate dehydrogenase(LDH)이다(Markert, 1963; Kaplan, 1963, 1964; Wieland and Pfleiderer, 1963). 포유류와 조류의 LDH는 다섯개의 기본적인 isozyme으로 구성되어 있으나 양서류에서는 이들과 서로 틀리

는 isozyme 형이 나타난다(Chen, 1968). 이와 같은 LDH isozyme의 다양성은 척추동물의 뇌조직에서도 볼 수 있었다(박·홍·조, 1971).

한편 malate dehydrogenase(MDH)에서도 그 isozyme 형에 다양성이 있다(Chen, 1968; Wieme, 1965; Wright and Subtelny, 1971). 이러한 다양성 즉 isozyme의 전기영동상(zymogram), 전기영동이동도,

*본 연구를 위한 연구비 일부는 1972년도 문교부 학술연구조성비에 의한 것이다.

온도에 대한 저항성, 조효소와의 관계 따위는 계통학적
인 면에서 큰 의미를 갖고 있다(Kaplan, 1970; Wilson
et al., 1964). 본 실험은 개구리류 뇌조직의 LDH(EC
1.1.1. 27)와 MDH(EC 1.1.1. 37)의 isozyme을 통
하여 개구리류 상호간의 계통학적인 의미를 찾아 보려
는 시도야래 이루어졌다.

재료 및 방법

실험동물은 서울근교와 연천, 용문리, 춘천, 영월등
지역에서 채집한 무당개구리(*Bombina orientalis*), 두꺼
비(*Bufo bufo asiaticus*), 참개구리(*Rana nigromacu
lata nigromaculata*), 금개구리(*Rana nigromaculata
coreana*), 산개구리(*Rana temporaria*), 및 올개구
리(*Rana rugosa*)를 사용하였다. LDH 및 MDH isozyme은 cellulose acetate strip 전기영동법으로 분리
하였는데, barbituric acid buffer(pH8.6, $\mu=0.075$)
에서 폭 1cm 당 0.75mA의 정전류로 60분간 실시하였
다. 기타 방법은 박, 흥, 조(1971) 및 박, 조(1972)에
따랐다.

실험결과

무당개구리의 조직에서는 다섯개의 LDH isozyme
이 나타났으며, 대뇌, 시엽 및 소뇌와 연수에서 얻
은 isozyme의 pattern은 근본적으로 동일함을 알
수 있고, 근조직과 같은 계통의 pattern이었다(Fig.
1). 무당개구리의 MDH는 두개의 isozyme band
를 보여 주는데(Fig. 2), 시엽의 isozyme이 다른 조
직과 약간 다르다. 이동속도와 isozyme 사이의 간격
에 차이는 있으나 MDH isozyme형은 실험동물 선
체를 통하여 유사하였다. 그러나 참개구리에서는 약간
의 차이가 있었다(Fig. 4). 즉 대뇌, 간뇌, 시엽의

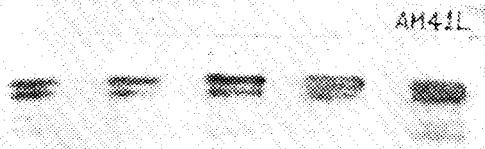


Fig. 1. Lactate dehydrogenase isozymes of the frog, *Bombina orientalis*. Left to right; cerebrum, optic lobe, mixture of cerebellum and medulla oblongata, muscle and liver. Electrophoresed for 60 minutes on the Separax strip.



Fig. 2. Malate dehydrogenase isozymes of *Bom
bina orientalis*. Left to right; cerebrum, optic lobe,
mixture of cerebellum plus medulla oblongata,
muscle and liver. Electrophoresed for
60 minutes on the Separax strip.



Fig. 3. Malate dehydrogenase isozymes of toad
central nervous tissues. Left to right; olfactory
lobe, cerebrum, diencephalon, optic lobe and
the mixture of cerebellum plus medulla oblon
gata of *Bufo bufo asiaticus*.



Fig. 4. Malate dehydrogenase isozymes of *Rana
nigromaculata nigromaculata*. Left to right;
olfactory lobe, cerebrum, diencephalon, optic
lobe and the mixture of cerebellum plus me
dulla oblongata.

MDH isozyme은 두개의 band로 구성되어 있으나
후엽과 소뇌 및 연수 부위는 단일 band를 보여 주었
다(Fig. 4).

두꺼비의 LDH isozyme도 무당개구리나 마찬가지

로 다섯개의 isozyme으로 구성되어 있으며 LDH-5가 가장 강하게 나타난다. 그러나 무당개구리에 비하여 isozyme 사이의 간격이 매우 조밀하고, 이동속도 역시 무당개구리 보다 빠르다(Fig. 5). 간뇌와 시엽의 LDH isozyme은 영동상이 약간 다르기는 하나 대체적으로 후엽, 대뇌, 소뇌 및 연수의 그것과 별로 다른 점은 없다.

참개구리에서는 두 개의 LDH isozyme이 나타나는데(Fig. 6), 대뇌와 간뇌의 전기영동상이 서로 같고, 후엽과 소뇌가 또한 서로 유사한 형을 보이고 있다. 그러나 전체적인 전기영동상은 참개구리의 뇌조직사이에서도 같다고 볼 수 있다. Fig. 7은 금개구리 뇌조직의 LDH isozyme이다. 참개구리와 마찬가지로 두 개의 band가 나타났으며, 전반적인 pattern 또한 서로 비슷하다. 단지 간뇌에서 약간의 차이가 나타나고 있다.

Fig. 8은 개구리류 대뇌의 LDH isozyme을 비교하여 본 것으로 산개구리만은 전뇌를 전기영동하였다. 이를 통하여 종에 따른 특별한 LDH isozyme을 확인



Fig. 5. Lactate dehydrogenase isozymes of the brain tissues from the toad, *Bufo bufo asiaticus*. Left to right; olfactory lobe, cerebrum, diencephalon, optic lobe and the mixture of cerebellum plus medulla oblongata.

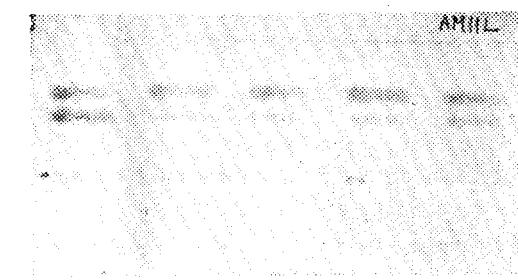


Fig. 6. Lactate dehydrogenase isozymes of *Rana nigromaculata nigromaculata*. Left to right; olfactory lobe, cerebrum, diencephalon, optic lobe and cerebellum.

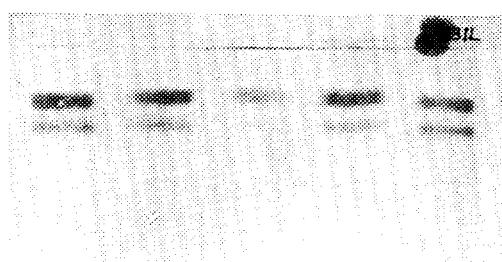


Fig. 7. Lactate dehydrogenase isozymes of the central nervous tissues from *Rana nigromaculata coreana*. Left to right; olfactory lobe, cerebrum, diencephalon, optic lobe and the mixture of cerebellum and medulla oblongata.

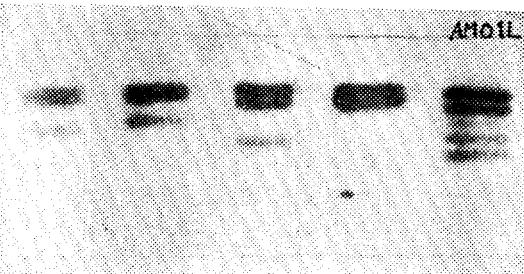


Fig. 8. Lactate dehydrogenase isozymes of the cerebrum homogenates except *Rana temporaria*, whole brain. Left to right; *Rana nigromaculata coreana*, *Rana nigromaculata nigromaculata*, *Rana rugosa*, *Rana temporaria* and *Bombina orientalis*.

하게 알 수 있는데, 전체적으로 LDH-5가 강하게 나타나는 것이 공통적이다. 무당개구리를 기준으로 하여 비교하여 보면, 산개구리는 LDH-5와 LDH-4만을 갖고 있다. 옴개구리는 LDH-5, LDH-4 및 LDH-2를 나타내는 데에 반하여, 참개구리와 금개구리는 LDH-5와 LDH-3을 보여 준다.

고찰

Chen(1968)은 *Bombina variegata*에서 acrylamide gel 전기영동법으로 MDH isozyme의 단일 band를 정소에서, 심장에서는 두개의 isozyme을 검출하였다. 한편 *Triturus alpestris*의 콩팥과 간장에서는 단일 MDH isozyme을, 근조직에서는 두개의 MDH isozyme을 확인하였다. 그러나 *R. temporaria*에서는 단 하나의 MDH isozyme 단이 발생단계에서는 물론 성체에서 까지 나타난다고 하였다. 이러한 점에서 보면 본 실험결과 대부분이 두개의 MDH isozyme을 보여

주고 있는 사실은 어느정도 일치된다고 하겠다. 본 실험결과를 종합하여 보면 크게 두가지 형의 MDH isozyme이 발견되는데, 하나는 참개구리와 굽개구리에서처럼, 두 MDH band가 아주 가깝게 나타나는 것과 다른 종에서처럼 두 isozyme이 비교적 먼거리에 떨어져 있는 것이다. 그러나 전분·겔 전기영동법을 써서 Wright and Subtelny(1971)는 두 개 이상의 MDH isozyme이 있음을 *R. pipiens pipiens* 와 *R. pipiens sphenocephala*에서 확인하였다.

지금까지 대부분의 동물이나 고등식물에서 malate dehydrogenase는 두가지 형이 알려졌다. 이를 MDH isozyme은 서로 다른 유전인자화의 조절하에 있는데 (Shaw, 1969 a,b), 하나는 상증액에 있고(MDH-s), 다른 한가지는 mitochondria에 존재한다(MDH-m) (Grimm and Doherty, 1961). 이를 서로 다른 MDH에서 나타나는 isozyme은 conformational isomer일 것이라는 주장도 있다(Kitto et al., 1966). 본실험에서 검출된 MDH isozyme은 MDH-s와 MDH-m이 혼합된 것에 속한다고 볼 수 있다. Wright and Subtelny(1971)는 *R. pipiens berlandieri*로부터 3개의 MDH-s isozyme과 느린속도로 이동하는 MDH-m isozyme을 보여 주었다.

Chen(1968)은 acrylamide gel 전기영동으로 *R. temporaria*의 뇌조직을 위시한 여러 조직에서 LDH isozyme이 2개의 band로 구성되었음을 밝혔는데, 일찍이 Grainger and Kunz(1966) 역시 *R. temporaria*에서 같은 결과를 얻었다. 비록 전기영동상의 isozyme 간격은 서로 다르지만 본 실험에서도 2개의 LDH isozyme이 *R. temporaria*, *R. nigromaculata* 및 *R. nigromaculata coreana*에서 나타났다. 특히 *R. nigromaculata nigromaculata* 와 *R. nigromaculata coreana*의 LDH isozyme 형이 근본적으로 같으며 MDH isozyme 형에 있어서도 같다. 따라서 LDH 와 MDH에 관한 한 계통상 매우 가까운 유연관계에 있음을 암시한다.

Bombina variegata 와 *Triturus alpestris*에서 3개의 LDH isozyme이 나타났으며 이들은 서로 전혀 다른 isozyme 사이의 간격을 보여 주었다(Chen, 1968). 그러나 본 실험에서는 *Bombina orientalis*에서 5개의 LDH isozyme이 확인되었으며, *Rana rugosa*에서 3개의 LDH isozyme이 나타났다. *Bufo vulgaris*는 2개의 LDH isozyme을 가지고 있다 하였는데 (Wielan1 et al., 1959), 본 실험에서는 *Bufo bufo*

*asiaticus*로부터 5개의 LDH isozyme을 볼수 있었다.

*R. catesbeiana*의 올챙이에서 3개의 LDH isozyme이 발견되었고(Kim et al., 1966), Adams and Finnegan(1965)에 의하여 *Ambystoma gracile*에서 8~12 isozyme이 증명되었다. 또한 agar 및 acrylamide gel 전기영동법을 써서 Kunz and Hearn(1967)은 7 또는 8개의 LDH isozyme을 *Xenopus laevis*에서 발견하였다. 또한 Wright and Moyer(1966)는 starch gel 전기 영동법으로 *R. pipiens sphenocephala* 및 *R. palustris*, *R. pipiens*에서 LDH-3, LDH-4, LDH-5 외에 LDH-1 위치에 3~5개 subband가 있음을 보였는데, 특히 LDH-2는 없었으나 뇌조직에서만 아주 빨리 LDH-2가 나타났다.

실제로 양서류의 LDH isozyme 영동상은 조류와 포유류와는 달리 커다란 다양성을 보여주고 있다. 따라서 양서류에서는 LDH isozyme이 subunit의 random aggregation 가설과 상반되는 것처럼 보인다(Wright, 1964). 이같은 현상을 Moyer et al.(1968)은 개구리과에 속하는 13종의 양서류로부터 LDH isozyme을 분리하여 비교검토한 결과 아래와 같이 설명하고 있다. 개구리과의 보편적인 LDH isozyme은 9개이다. 이들 isozyme의 subunit 조성은 LDH-1a=B'4; LDH-1b=B'3B; LDH-1c=B'2B2; LDH-1d=B'3B3; LDH-1e=B4; LDH-2=AB3; LDH-3=A2B2; LDH-4=A3B; LDH-5=A4인 것이다. 특히 전분·겔 전기영동에서 여섯개의 isozyme만이 나타나는데 이들은 LDH-1c, LDH-1d, LDH-1e, LDH-3, LDH-4 및 LDH-5이다. 이 현상은 아마도 두가지 B-형 subunit의 합성속도에 10배 정도의 차이가 있는 때문이겠는데, B-형 subunit는 B'-형 subunit보다 더 빠르게 합성되고 있다. 이외에 다른 한가지 이유는 LDH-2의 형성이 어떤 제한을 받는지 있다고 하였다.

결 론

지금까지 여러 연구자들의 실험결과 양서류의 LDH 및 MDH isozyme에서 커다란 다양성이 나타남을 볼 수 있었다. 심한 경우 18~25 LDH isozyme이 개구리류에서 발견되었다. 그러나 위와 같은 커다란 다양성을 cellulose acetate strip 전기영동에 관한 한 나타나지 않았다. 비록 전기영동법의 선택에 따라 어떤 효소의 isozyme 형이 크게 달라지기는 하여도 어느 방법을 쓰거나 대체적인 종에 따른 특징은 구별이 가능하다. 본실험에서도 LDH isozyme의 전기영동상으로부

터 개구리목 구성원들 사이의 특징을 잘 발견할 수 있었다. 다양성에 있어서는 LDH isozyme만 못하나 그 래도 종에 따른 특징을 MDH isozyme에서도 찾아볼 수 있었다. MDH isozyme에서 나타나는 많은 공통성과 LDH isozyme으로부터 발견되는 다양성은 개구리목의 유연관계를 설명하는데 있어서 좋은 자료를 제시하고 있다.

요 약

cellulose acetate 전기영동법으로 한국산 개구리목의 동물 6종에서 LDH 와 MDH isozyme을 조사하였다. 개구리목의 MDH 와 LDH isozyme은 종에 따른 특징을 잘 나타내고 있었으며 포유류나 포유화는 다른을 알 수 있었다.

참개구리와 금개구리에서는 LDH 나 MDH 모두 두 개의 isozyme으로 구성되어 있었고, 이 두 isozyme의 pattern 역시 거의 같다고 볼 수 있었다. 산개구리 전뇌의 LDH isozyme 역시 두개의 isozyme만을 보였으나 그 pattern은 참개구리나 금개구리와 근본적으로 달랐다. 두꺼비와 무당개구리는 다섯개의 LDH isozyme을 가지고 있으나 그 pattern은 전혀 달랐다. 한편 움개구리에서는 세개의 LDH isozyme을 볼 수 있었다.

모든 시험동물에서 두개의 MDH isozyme을 발견할 수 있었는데 참개구리의 후암과 소뇌 및 연수혼합물에서는 단 하나의 MDH isozyme만이 검출되었다.

문 헌

Adams, E. and C.V., Finnegan, 1965. An investigation of lactate dehydrogenase activity in early Amphibian development. *J. Exp. Zool.* **158** : 241—252.

Chen, P.S., 1968. Patterns of soluble proteins and multiple forms of dehydrogenases in Amphibian development. *J. Exp. Zool.* **168** : 337—350.

Goldberg, E. and T. Wuntch, 1967. Electrophoretic and kinetic properties of *Rana pipiens* lactate dehydrogenase isozymes. *J. Exp. Zool.* **163** : 215—230.

Grainger, J.N.R. and Y.W. Kunz, 1966. Changes in the isoenzymes of lactic and malic dehydrogenase during the development of the frog, *Rana temporaria*. *Helgol. wiss. Meeresuntersch.*

14 : 335—341.

Grimm, F. and D.G. Doherth, 1961. Properties of the two forms of malate dehydrogenase from beef heart. *J. Biol. Chem.* **236** : 1980—1985.

Kaplan, N.O., 1963. Multiple forms of enzymes. In Symposium of Multiple Forms of Enzymes and Control Mechanism. *Bacteriol. Rev.* **27** : 155—169.

Kaplan, N.O., 1964. Lactate dehydrogenase-structure and function. *Brookhaven Symp. Biol.* **17** : 131—153.

Kaplan, N.O., 1970. Evolution of pyridine nucleotide linked dehydrogenases. *Miami Winter Symposia*. **1** : 66—88.

Kim, H.C., A.D'Iorio and W.K. Paik, 1966. The activity of lactate dehydrogenase isozymes during thyroxine-induced tadpole metamorphosis. *Canad. J. Biochem.* **44** : 303 : —310.

Kitto, G.M., P.M. Wasserman and N.O. Kaplan, 1966. Enzymatically active conformers of mitochondrial malate dehydrogenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **56** : 578—585.

Markeri, C.L., 1963. Epigenetic control of specific protein synthesis in differentiating cells. In M. Locke(ed.) Cytodifferentiation and Macromolecular Synthesis. pp. 56—84. Academic Press, New York, N.Y.

Moyer, F.H., C.B. Speaker and D.A. Wright, 1968. Characteristics of lactate dehydrogenase isozymes in Amphibians. In E.S. Vesell (ed.) Multiple Molecular Forms of Enzymes. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **151**, Art. 1 : 650—669.

박상운, 홍사숙, 조동현, 1971. 척추동물의 isozyme에 관한 비교연구 I. 수중동물의 뇌조직내 lactate dehydrogenase에 관하여. 成大論文集 **16**.

박상운, 조동현, 1972. cellulose acetate 전기영동에 의한 수소이탈효소 isozyme의 분리. 동학지 **15** : 3.

Shaw, C.R., 1969a. Isozymes: Classification, frequency and significance. *Int. Rev. Cytol.* **25** : 297—332.

Shaw, C.R., 1969b. Molecular basis of isozymes. *Jap. J. Genet.* **44**, Suppl. 1 : 31—35.

Wieland, Th., G. Pfleiderer, I. Haupt and W.

- Wörner, 1959. Über die Verschiedenheit der Milchsäuredehydrogenasen IV. Quantitative Ermittlung einiger Enzymverteilungsmuster. *Biochem. Z.* **332** : 1—10.
- Wieland, Th. and G. Pfleiderer, 1963. Multiple Formen von Enzymen. *Adv. in Enz.* **25** : 329—368.
- Wieme, R.J., 1965. Agar Gel Electrophoresis. pp. 324—341. Elsevier Pub. Co., Amsterdam.
- Wilson, A.C., N.O. Kaplan, L. Levine, A. Pesce, M. Reichlin and W.S. Allison, 1964. Evolution of lactic dehydrogenases. *Fed. Proc.* **23** : 1258 —1266.
- Wright, D.A., 1964. Ontogeny of hybrid enzymes in *Rana pipiens* × *Rana palustris* crosses. *Am. Zool. Abstract*, **4** : 397.
- Wright, D.A. and F.H. Moyer, 1966. Parental influences on lactate dehydrogenase in the early development of hybrid frogs of the genus *Rana*. *J. Exp. Zool.* **163** : 215—230.
- Wright, D.A. and S. Subtelny, 1971. Nuclear and cytoplasmic contributions to dehydrogenase phenotypes in hybrid frog embryos. *Develop. Biol.* **24** : 119—140.