

초파리(*Drosophila melanogaster*)의 CdR  
Aminohydrolase에 관한 연구

姜 萬 植  
(서울대 자연대 동물학과)

A Study on the CdR Aminohydrolase in  
*Drosophila melanogaster*

Man-Sik Kang  
(Dept. of Zoology, College of Natural Sciences, SNU)  
(1977. 8. 2 접수)

SUMMARY

CdR aminohydrolase activity in varying developmental stages of *Drosophila melanogaster* was studied in an attempt to correlate with ageing. The results obtained are as follows:

1. The catabolic pathway of CdR in *Drosophila melanogaster* seemed to be CdR→UdR→U.
2. The enzyme activity was demonstrated in the adults and no activity was observable in both larva and pupa.
3. The enzyme activity of the adult was found to be higher in older flies than in younger ones.
4. The results were of suggestive of a possibility that enzyme activity might be correlated with ageing and/or developmental stages of *Drosophila melanogaster*.

序 論

근년에 관심을 모으고 있는 老化機構에 관한 연구는 Hayflick등(1961)이 사람에서 얻어낸 조직세포를 배양하여 有限의 繼代數를 경과하면 사멸한다는 사실을 밝힌 후, 많은 연구가 이루어지게 되었다. 연령층이 다른 여러 供與者로부터 얻은 조직세포의 *in vitro* 壽命은 이들의 연령에 반비례한다고 하며(Hayflick, 1965; Martin등, 1970; Schneider

등, 1976), 早老症 환자로부터 얻은 세포의 *in vitro* 수명은 같은 연령의 정상인의 세포에 비해 현저히 짧다는 사실도 알려졌다(Martin 등, 1970; Goldstein, 1969; Danes, 1971).

생쥐의 몇 가지 조직에서는 老化에 따라 DNA의 single break가 증가하고(Price 등, 1971), 연령에 따라 肝의 DNA의 크기가 감소된다(Ono 등, 1976). 이러한 결과들은 분열 후 세포에서 회복이 불가능한 DNA의 single break가 축적됨을 암시하는 것이다. 또한 Hart 등(1974)은 培養細胞의 壽命과 UV照射로 생긴 不定期 DNA合成能 사이에 상관관계가 있으며, 손상이 회복되지 못하고 축적되면 mRNA와 단백질合成의 정확성이 저하되어 壽命이 다하게 됨을 시사하고 있다. 이밖에 X線照射에 의해서 일어나는 不定期 DNA合成은 老化된 세포에서는 낮아진다고 한다(Hart 등, 1976).

한편, 효소에 관한 연구로는 태아의 허파로부터 유래한 세포의 繼代실험에서 glucose-6-phosphate dehydrogenase와 6-phosphogluconic acid dehydrogenase의 熱變性率이 50繼代 때부터 현저히 증가하고(Holliday 등, 1972), DNA polymerase의 DNA合成의 정확성도 老化에 따라 떨어진다고 한다(Linn 등, 1976).

본 연구에서는 DNA대사, 특히 이화에 관계가 큰 것으로 생각되며, 耐熱性이 큰 deoxycytidine aminohydrolase가 老化와 어떤 관련성이 있는지의 여부를 고찰하기 위해서 초파리(*Drosophila melanogaster*)를 재료로 하여 우선 발생단계 별로 효소능의 변화유무를 관찰하였다.

### 材料 및 方法

본 연구에서 사용한 실험재료는 본 대학 동물학과의 초파리 사육실에서 사육한 *Drosophila melanogaster*였다.

실험방법은 200~300마리의 초파리를 에테르로 마취한 다음, 칩으로 무게를 달아, 무게의 30배만큼의 tris buffer (0.05M, pH 8)를 가한 후 4°C로 유지하면서 Teflon homogenizer로 약 10분간 균질화하였다. 이 균질물을 International portable refrigerated centrifuge, Model PR-2의 작은 roter로 4°C에서 2500 rpm으로 20분간 원침시켰다.

원침후, 상등액을 회수하여 incubation media와 단백질 정량으로 사용하였는데, 단백질의 정량에는 modified Weichselbaum法을 이용했다. 상등액 0.5ml씩을 enzyme source로 시험관에 넣은 다음, 4mM deoxycytidine (CdR) 50 $\mu$ g를 섞어 효소의 기질로 하였다. incubation mixture는 37°C의 水槽에서 shaking하면서 0, 10, 30, 60, 90분간 배양한 다음, 끓는 수조에서 10분간 효소를 불활성화시켜 반응을 정지시켰다. 이 반응생성물이 든 반응액을 앞의 방법에 따라 30분간 원침시켜 상등액을 얻어서 냉장고에 보관하고 실험에 사용하였다.

반응물질이 들어있는 상등액 100 $\mu$ 씩을 whatman No. 1 거름종이에 spotting한 다음 展開劑(isopropanol : HCl : H<sub>2</sub>O=17 : 4.1 : 3.7)를 써서 30°C에서 11시간동안 전개하여 선풍기로 실온에서 말린후 UV lamp로 생성물질등을 확인하였다. 이렇게 하여 분리된 chromatogram을 multipurpose recording spectrophotometer, Shimadzu MPS-50L의 chromatogram scanner로 走査하여 scanning pattern을 얻은 다음, 각 spot를 오려내

어 4ml의 증류수가 든 시험관에 넣어 24시간 동안 용출시켜 分光光度法으로 정량하였다.

### 結果 및 論議

Deoxycytidine의 代謝經路를 보기 위해서 얻은 배양시간별 incubation mixture의 chromatogram scanning pattern은 그림 1과 같다. 이 scanning은 각 peak의 모양을

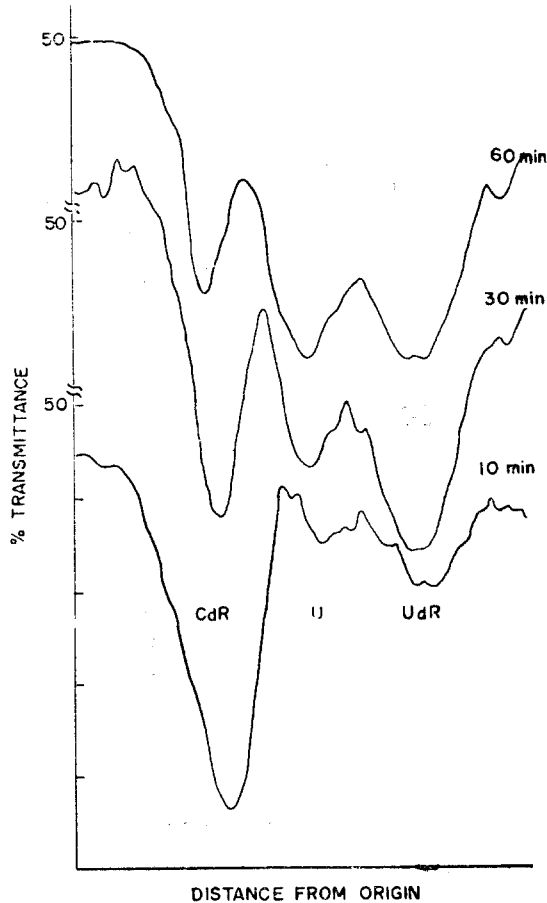


Fig. 1. Chromatographic scanning patterns of the reaction mixtures at varying incubation time.

sharp하게 볼 수 있도록 % transmittance로 나타내었다. 이 그림에서 배양시간이 경과함에 따라 CdR이 점차 감소되면서 그대신에 UdR과 U가 증가하는 추세를 알 수 있다. 계를 좀더 자세히 정량적으로 나타낸 것이 그림 2인데, 이 그림에서 먼저 UdR이 생성되고 뒤이어 U로 전환되는 관계를 알 수 있다. 이 결과, 즉 CdR→UdR→U의 반응은 쥐나 생쥐의 결과(Kang 등, 1975)와 같은 것이어서 초파리의 경우에도 대사경로는 유사한 것으로 보여진다.

발생단계에 따른 CdR aminohydrolase의 활성의 변화의 유무를 보기 위해서 유충, 번

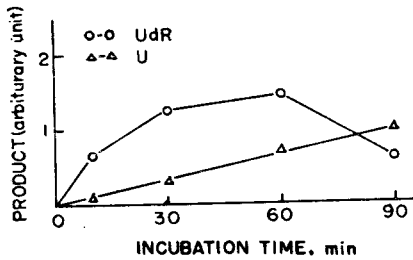


Fig. 2. Time course change in the appearance of deoxyuridine and uracil. The amounts of the products are expressed in arbitrary unit.

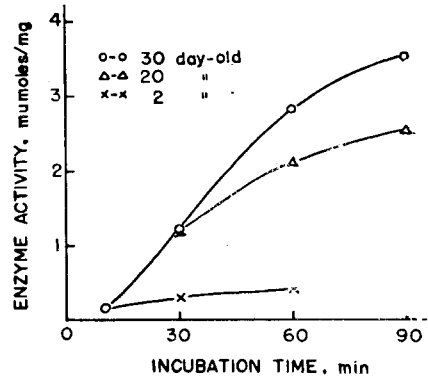


Fig. 3. Deoxycytidine aminohydrolase activity of 2, 20 and 30 day-old adult *Drosophila melanogaster* at varying incubation time. The enzyme activity is expressed in terms of  $m\mu$ moles of CdR converted per mg protein. Each point represents the mean of three determinations.

대기 및 성충(우화후, 2, 20, 30일의)의 효소활성을 본 바, 유충과 번데기에서는 본 실험방법으로는 검출이 불가능하였고, 성체의 경우에만 그림 3과 같은 결과를 얻었다. 비록 본 실험의 방법이 정교한 방법은 되지 못하지만 초파리의 발생단계에 따라 CdR aminohydrolase의 활성은 현저한 변화를 보임에는 틀림없다. 이 관계를 보다 면밀히 검토하기 위해서는 사람의 백혈구의 CdR-aminohydrolase활성을 측정 한 Teng등(1975)의 방법을 초파리에 적용할 수 있도록 개발

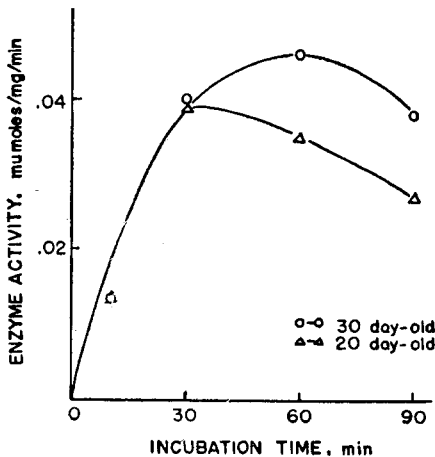


Fig. 4. Specific activity of deoxycytidine aminohydrolase of 20 and 30 day-old adult *Drosophila melanogaster* in terms of  $m\mu$ moles of CdR converted per mg protein per minutes. Each point represents the mean of three determinations.

하여야 할 것으로 생각된다. 그림 3에는 효소활성을 CdR이 감소한 양( $m\mu$ moles/mg/protein)으로 나타내었는데, 羽化후 2일째의 성충의 효소활성은 극히 미약하였는데, 이에 대해서 20일째와 30일째의 성충의 효소활성은 컸다. 두 성충의 경우, 배양시간 30분까지는 효소활성의 차이를 보이지 않았으나 그후에는 차이를 나타내어 30일째의 성충이 좀더 큰 효소활성을 나타냈다.

이러한 성충의 연령에 따른 효소활성의 차이를 좀더 명확히 관찰하기 위해서 효소의 활성을  $m\mu$ moles/mg/min, 즉 비활성도로 나타내 본 것이 그림 4이다. 그림 4에서 알 수 있는 바와 같이 비활성도도 배양시간 30분까지는 차이를 보이지 않으나, 그후에는 20일째와 30일째의 성충에서 차이를 나타내어 20일짜리는 배양후 30분에서 최대의 활성도를 나타내는데 반해서 30일짜리는 배양후 60분에서 최대의 활성도를 보인다.

이런 점으로 볼때 초파리의 나이가 많아짐에 따라 CdR aminohydrolase의 활성은 점차 증가하는 것으로 생각된다. 물론 2일짜리와 20일 또는 30일짜리의 사이에는 현저한 활성의 차이가 있으나, 20일짜리와 30일짜리 사이에는 효소활성의 초기반응에는 차이가 없다고 할 수 있다. 따라서 배양시간이 경과함에 따라 나타나는 활성도의 차이가 어떤 기작에 의해서 나타나게 되는지는 모르지만, 약간의 차이를 볼 수 있는 것은 움직일 수 없는 사실이다.

현재 老化의 원인으로는 두가지 가능성이 제시되고 있는데, 하나는 DNA의 손상의 축적과 이를 회복시킬 DNA회복능의 저하가 老化를 초래케 된다는 견해이고(Price등, 1971; Wheeler등, 1974; Hart등, 1974; Brown등, 1976), 다른 하나는 DNA→mRNA→단백질의 경로에서 巨大分子합성에 착오가 일어나 異常蛋白質이 합성되어 축적되므로 老化에 이르게 된다는 생각이다(Orgel, 1963; 1973; Linn등, 1976; Galdstein등, 1975). 이 두가지 가설의 요점은 DNA손상의 누적으로 집약될 수 있는데, 이 관점에서 본 실험의 몇가지 결과를 고찰해 보면 CdR aminohydrolase는 DNA의 손상을 일으키는 한가지 원인이 된다고 보다는 오히려 DNA의 분해에 의해 생겨나는 DNA 유도물질인 CdR을 신속히 처리하는, 이른바 이화작용으로 분해산물을 다시 분해시키는 scavenger의 구실이 주된 작용이 아닌가 추정되며, 이러한 역할을 위해서 노쇠한 세포에서 효소활성의 증가가 일어난다고 보아야 할 것이다. 이러한 생각은 쥐나 생쥐에서 얻은 결과와도 어느 정도 일치된다(Kang등, 1974).

## 要 約

CdR aminohydrolase의 활성을 老化와의 관련하에서 보기 위해서 초파리(*Drosophila melanogaster*)의 이 효소의 활성을 발생단계별로 측정하여 다음의 결과를 얻었다.

1. 초파리에서 CdR이 분해되는 과정은 쥐나 생쥐와 마찬가지로 CdR→UdR→U임을 알 수 있었다.
2. CdR-aminohydrolase의 활성은 유충과 번데기에서는 검출이 불가능하였고 성체에서만 검출되었다.
3. 성체의 효소활성은 젊은 개체에 비해서 늙은 개체에서 증가를 보였다.
4. 실험의 결과는 CdR-aminohydrolase의 활성이 초파리의 老化 또는 발생단계와 관련성이 있음을 시사하였다.

## REFERENCES

- Brown, W.T., J. Epstein and J.B. Little, 1976. *Exptl. Cell Res.* **97** : 291.  
 Danes, B.S., 1971. *J. Clin. Invest.* **50** : 2000.  
 Goldstein, S., 1969. *Lancet* **1** : 424.  
 Goldstein, S. and E.J. Moerman, 1975. *Nature* **255** : 159.  
 Hart, R.W. and R.B. Setlow, 1974. *Proc. Nat. Acad. Sci., USA* **71** : 2169.  
 Hayflick, L. and P. S. Moorhead, 1961. *Exptl. Cell Res.* **25** : 585.  
 Hayflick, L. and P.S. Moorhead, 1965. *Exptl. Cell Res.* **37** : 614.

- Holliday, R. and G.M. Tarrant, 1972. *Nature* **238** : 26.
- Kang, M.S., J.G. Rhee and J.M. Cho, 1974. *Korean J. Zool.* **17** : 107.
- Kang, M.S., J.G. Rhee and J.M. Cho, 1975. *Korean J. Zool.* **18** : 163.
- Linn, S., M. Kairis and P. Bornstein, 1976. *Proc. Nat. Acad. Sci., USA* **73** : 2818.
- Martin, G.M., C.A. Sprague and C.J. Epstein, 1970. *Lab. Invest.* **23** : 86.
- Ono, T. and S. Okada, 1976. *Exptl. Geront.* **11** : 127.
- Orgel, L.E., 1963. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **49** : 517.
- Orgel, L.E., 1973. *Nature* **234** : 441.
- Price, G.B., S.P. Modak and T. Makinodan, 1971. *Science* **171** : 917.
- Schneider, E.L. and Y. Mitui, 1976. *Proc. Nat. Acad. Sci., USA* **73** : 3584.
- Teng, Y-S, J.E. Anderson and E.R. Gibley, 1975. *Am. J. Hum. Genet.* **27** : 492.
- Wheeler, K.T. and J.T. Lett, 1974. *Proc. Nat. Acad. Sci., USA* **71** : 1862.