

뱀 근육 Adenosine Triphosphate—
Creatine Phosphotransferase 에 관한 研究

朴 忠 雄

全北大學校 理科大學

Studies on Adenosine Triphosphate-Creatine
Phosphotransferase from Muscle of the Snake *Bungarus fasciatus*

Chung-ung Park

College of Natural Science
Jeon-bug National University

Abstracts

A detailed procedure was described for the isolation of cratine kinase (ATP-Creatine phosphotransferase, E. C. 2. 7. 3. 2.) from the muscle of the snake *Bungarus fasciatus*. The original isolation procedure of Kuby et al. for the rabbit muscle enzyme has been modified and extended to include a chromatographic step.

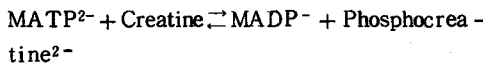
The properties of the enzyme have been investigated and kinetic constants for the reverse reactions determined as the followings:

- 1) A molecular weight of the enzyme was determined by gel filtration on Sephadex G-100 and by electrophoresis on SDS-polyacrylamide was 86,000.
- 2) Two reactive sulphhydryl groups were detected with dithiobis nitrobenzoic acid (DTNB).
- 3) The nucleotide substrate specificity in the reverse reaction was determined as $ADP \cdot 2' - dADP > GDP > XDP > UDP$ with magnesium as the activating metal ion.
- 4) The order of the metal specificity in the reverse reaction $Mg > Mn > Ca \sim Co$ was determined with ADP as substrate.
- 5) A detailed kinetic analysis was carried out in the reverse direction with $MgADP^-$ as the nucleotide substrate. Initial velocity and product inhibition studies ($MgATP^{2-}$ competitive with respect to $MgADP^-$ and noncompetitive with respect to N-phosphorylcreatine $^{2-}$; Creatine competitive with

respect to N-phosphorylcreatine²⁻ and noncompetitive with respect to Mg ADP⁻) indicated that the reaction obeyed a sequential mechanism of the rapid equilibrium random type.

I. 序 論

Creatine Kinase (Adenosine 5' - triphosphate - Creatine Phosphotransferase, E.C. 2.7.3.2) 는 다음의 可逆反應을 觸媒한다.



이 酵素는 여러 組織에 分布되어 있으며¹⁾ 特히 神經肌肉組織에 가장 높은 濃度로 分布되어 있다²⁾. 또한 이 酵素는 肌肉의 收縮作用 및 膜의 輸送過程과 關聯되어 있고 ATP를 再生成 하는 生理的 機能을 가지고 있으며 肌肉의 可溶性 sarcoplasm 蛋白質에 10~20% 정도 含有되어 있다고 報告되어 있다^{3, 4, 5, 6)}.

Creatine Kinase 는 最初로 토끼肌肉에서 分離精製되고 結晶化되었으며⁷⁾ 그 후 토끼肌肉을 中心으로 많은 研究가 遂行되었다. 그 후 이 酵素는 소, 사람, 원숭이, 닭, 자라, dogfish, 폐지의 心臟肌肉에서 分離精製되었으며^{8, 9, 10, 11, 12, 13)}, 이들 酵素의 大部分은 細胞속에 含有되어 있다고 한다¹⁴⁾. 또한 不可溶性 creatine kinase 는 여러 가지 組織의 미토콘드리아 속에 豊富하게 含有되어 있으며 全 酵素의 25~50% 를 차지하고 있다는 사실이 밝혀진 바 있다¹⁵⁾. Sarcoplasm 網狀質에 含有되어 있는 creatine kinase 의 性質은 可溶性酵素와 비슷하다고 밝혀져 있으며¹⁶⁾ 이 部分에 含有되어 있는 酵素는 肌肉에 存在하는 全 creatine kinase 의 약 1% 를 차지하고 있는 것으로 알려져 있다.

Creatine kinase 는 sarcomere의 中心에 있는 筋纖維의 構造를 이루는 部分인 骨格肌肉의 M線과 關聯되어 있으며, M-band의 機能은 sarcomere의 길이 가 줄어들 때 두꺼운 filament의 適切한 配列을 維持시켜 주는 役割을 하고 있다는 事實이 報告되어 있다¹⁷⁾.

M-線 蛋白質은 肌肉 creatine kinase 와 함께 myosin filament를 結合하고 있다는 사실이 밝혀져 있으나 creatine kinase가 構造의 役割을 갖느냐 하는 점에 대해서는 아직 밝혀져 있지 않지만 M-線 蛋白質과 myosin 사이의 物理的인 相互關係를 증진

시키는 바 있다^{18, 19, 20)}.

Noda 등은²¹⁾ 토끼肌肉 creatine kinase의 分子量을 81,000 이라고 밝힌 바 있으나 Olson과 Kuby는 82,600 이라고 發表한 바 있다²²⁾. 몇 가지 材料로부터 精製된 可溶性 細胞質 creatine kinase는 分子量이 같은 2개의 subunit로 이루어져 있음이 報告된 바 있다^{23, 24)}.

Creatine kinase의 各 subunit는 disulfide 다리가 없는 단일 폴리펩티드 사슬이다²⁵⁾. 일반적으로 肌肉型 creatine의 아미노酸 造成은 비슷하다²⁶⁾. Van Thoai에 의하면 대부분의 肌肉酵素는 다른 組織에서 분리된 酵素보다 많은 鹽基性 아미노酸을 含有하고 시스테인과 芳香性 아미노酸은 적은 比率로 含有되어 있다²⁷⁾.

다른 組織의 creatine kinase는 鹽基性 아미노酸 造成上的 差異가 있으며, 따라서 電氣泳動法으로 다음의 3가지 酵素로 구별된다²⁸⁾. 즉 그 세 가지 형태의 肌肉속에 存在하는 Isoenzyme (MM), 뇌에 存在하는 Isoenzyme (BB), 그리고 心臟肌肉에 많이 存在하는 混成型 Isoenzyme (MB)가 있으며, 이중 BB형의 酵素가 가장 큰 電氣泳動 移動도를 나타낸다²⁹⁾.

上記와 같이 이들 酵素는 比較的 分離精製가 容易하여 그동안 많은 關心을 갖게 되었고, 토끼肌肉을 비롯한 몇 가지 材料는 傳統的인 反應速度에 關한 研究實驗에 이상적이며 특히 SH 試藥을 제외한 여러 가지 阻害實驗, 陽性子 弛緩速度와 電磁氣共鳴을 測定하는 物理的인 方法에 의하여 많은 研究가 이루어졌다. 그러나 creatine kinase의 特異性, 構造的인 變化, subunit 相互作用, 陰이온效果 등과 같은 問題는 아직 밝혀져 있지 않은 興味있는 研究分野이다³⁰⁾.

以上에서 言及한 바와 같이 이 酵素는 대부분 溫血動物의 여러 組織에서 分離精製되어 많은 研究가 이루어졌으나 冷血動物에 關한 研究는 거의 이루어지지 않았고 단지 개구리와 자라의 肌肉 creatine kinase에 대한 약간의 研究가 遂行된 바 있을 뿐이다.

本論文에서는 뱀 肌肉으로부터 이 酵素를 分離精製하여 그 物理化學的 性質을 究明하고 이 酵素

에 의하여 촉매되는 반응의 반응속도에 관한 메카니즘을 밝히고자 하였다.

II. 實驗 材料 및 方法

1. 材料 및 試藥

뱀 (*Bungarus fasciatus*)의 껍질을 벗겨 筋肉을 分離하여 -20℃에 보관하였다가 實驗前 0℃에서 녹여 使用하였다.

N-Phosphorylcreatine, Blue dextran, ATP, 2'-DADP, CDP, GDP, UDP, XDP의 Na염(Sigma) Dithiothreitol (DTT), [5, 5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)] (DTNB) [tris-(hydroxymethyl) amino methane] (Tris): (Calbiochem) α-Naphthol, Sodium dodecyl sulfate, Coomassie brilliant blue G 250:(Serva) (N-2 hydroxyethyl-piperazine -N'-2 ethane-sulphonic acid) (Hepes): (Hopkins) Sephadex G-100, DEAE Cellulose (DE 23) Creatine, Guanidine hydrochloride (Pharmacia)

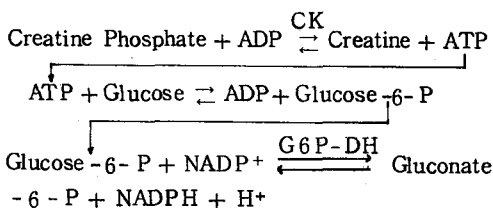
2. 實驗方法

酵素의 活性度 測定은 比色 分析과 分光光度法에 의하였다.

① 比色 分析:

酵素活性의 測定은 Morrison法에 준하였다³¹⁾. 酵素反應 混合物(50mM Hepes/KOH, pH 8.0, 10mM N-Phosphorylcreatine, 1mM ADP, 2mM MgCl₂, 0.1mM DTT, 0.05mM EDTA)을 30℃에서 5分間 preincubation 시킨 후 酵素液을 가하여 1 ml로 하여 各 反應時間 동안 incubation 한 후 0.3 ml NaOH (0.04M EDTA가 포함되어 있음)로 反應을 中止시키고 0.1 ml α-naphtholdiacetyl 試藥 (12.5g α-naphthol과 6.25 ml 1% aqueous diacetyl을 N-propanol 250 ml에 녹여 만든)을 가하고 蒸溜수로 3.0 ml로 만들어 生成된 色을 15分後에 Unicam SP Spectrophotometer를 利用하여 波長 534 nm에서 吸光度를 測定하였다.

② 分光光度法에 의한 酵素 分析:



위의 原理에 의하여 NADP⁺의 還元을 測定하여 分析하였다. 比色分析에서 記述하였던 酵素反應 混合物에 20mM D-Glucose, 2 IU Hexokinase, 1 IU Glucose 6- Phosphate dehydrogenase, 1 mM NADP⁺를 添加하고 30℃로 마춘 후 酵素液을 가하여 340nm에서 活性도를 測定하였다³²⁾.

蛋白質 定量은 Warburg와 Christian法에 依하였다³³⁾.

③ 뱀 筋肉으로부터 Creatine Kinase의 分離 精製:

Kuby 등에 의하여 記述된 過程에 DEAE cellulose 크로마토그래피 過程을 添加시켜 行하였다³⁴⁾. 모든 過程은 0℃에 行하였으며, β-mercaptoethanol 濃度を 2mM로 固定시켰다.

a) 組織 磨碎液 製造

뱀 筋肉 100g을 0℃에서 녹인 다음 組織磨碎機에 10mM KCl pH 7.5(2.5배)와 같이 2分 동안 磨碎한 다음 15分間 遠心分離(×10,000g)하였다. 그 相等液은 脂質을 제거하기 위하여 유리솜을 통하여 濾過하였다. 이것에 NH₄Cl을 천천히 가하여 最終濃도가 0.1M이 되도록 한 다음 5M NH₄OH를 가하여 pH를 9.0으로 맞추었다.

b) Alcohol 處理

上記 組織磨碎液을 30分 동안 저어 준 후 -20℃의 95% alcohol을 온도가 5℃ 이상 上昇하지 않게 서서히 가하여 最終 alcohol 濃도가 60%가 되도록 맞추었다. 溫度는 0℃로 내리고 溶液은 1시간 동안 저어 준 후 15分 동안 遠心 分離(×10,000g)하였다.

c) MgSO₄ 沈澱物의 MgAC₂ 抽出

Alcohol 沈澱에 의하여 分類된 相等液에 1.0M MgSO₄ 溶液의 濃度を 30mM이 되게 하였다. Alcohol를 添加하여 그 濃도를 60%로 維持하고 30分 동안 저어 준 다음 遠心 分離하여(×10,000g 30分間) 그 沈澱物을 모았다. 沈澱物은 처음에 얻은 組織磨碎液의 8%와 4%에 相當하는 體積의 MgAC₂ pH 9.0으로 再抽出하고 1시간 동안 저어 준 다음 遠心分離(×10,000g 15分間)하였다.

d) Alcohol에 의한 分別

위에서 모든 抽出物은 5M NH₄OH로써 pH 8.0으로 맞추었다. 그리고 -20℃의 95% alcohol를 加하여 60%의 alcohol 濃度を 마춘 후 1시간 동안 저어 준 다음 生成된 沈澱物을 遠心 分離(×10,000g, 30分間)하여 10mM Tris/HCl pH 8.2 10 ml에 녹였다. 이 溶液을 같은 緩衝溶液으로 5시

간마다 2 회 交換하여 透析하였고 不溶性 物質은 15 分間 遠心分離(× 10,000g) 하여 除去하였다.

e) DEAE Cellulose 크로마토 그래프³⁶⁾

약 100mg의 蛋白質 溶液을 미리 緩衝溶液으로 平衡을 이룬 2.5×30 cm DEAE cellulose 管에 注入하고 one bed volume의 緩衝溶液을 흘려 보냈다. 그 후 本酵素는 0~0.1M KCl로 linear gradient 溶出하였다. 管 溶出液내의 蛋白質量은 280nm에서 吸光度를 追跡하고 酵素活性은 creatine의 生成을 追跡하는 법을 이용하여 測定하였다. 溶離된 酵素는 活性度 피크가 큰 쪽을 택하여 150KPa 窒素壓力으로 限外濾過 cell로 濃縮하여 蛋白質濃도가 40mg/ml이 되도록 하였다.

④ Polyacrylamide 겔 電氣泳動에 의한 蛋白質 純度の 確認

5.6% Acrylamide 겔을 만들었다. 겔은 A 용액(36.6g Tris, 48 ml pH 8.9) 5分量, B 용액(28.0g Acrylamide, 0.735g Bis Per 100ml) 5分量, 0.28% ammonium persulphate 5分量, 증류수 22分量에 의하여 제조하였다. 蛋白質 試料 60μg을 5μl 0.01% bromophenol blue와 1~2방울의 글리세롤과 混合하여 겔 위에 加하였다. 電氣泳動은 電極槽용 緩衝溶液(6.0g Tris, 28.8g glycine per litre, pH 8.0)을 10배로 稀釋하여 사용하였으며 겔당 5mA의 電流로 電氣泳動을 하여 bromophenol blue 表示染料가 겔 끝에 到達할 때까지 進行시켰다. 겔을 취하여 3.5% perchloric acid를 包含하는 0.04% Coomassie brilliant blue G 250 용액으로 蛋白質을 着色시켰다³⁶⁾.

⑤ 뱀 筋肉 Creatine Kinase의 特性

a) 分子量 測定

SDS Polyacrylamide 겔 電氣泳動에 의한 Sub-unit의 分子量 測定:

濃도가 10%인 acrylamide를 이용하여 Weber 등의 方法으로 하였다. 겔의 製造는 다음과 같이 하였다³⁷⁾.

Phosphate 겔 緩衝溶液(0.2M pH 7.2, 7.8g NaH₂PO₄·H₂O, 38.6g Na₂HPO₄·7H₂O, 20g SDS Per liter) 15分量, Acrylamide stock solution(22.2g acrylamide, 0.6g Bis Per 100ml) 13.5分量, Ammonium persulphate(15mg/ml) 1.5分量, TEMED 0.015 分量을 混合하였다.

사용한 蛋白質은 最終濃도가 1% SDS와 1% β-mercaptoethanol을 含有하는 0.01M sodium

phosphate 로써 0.1~1.0mg/ml의 濃度範圍에서 稀釋하여 100℃로 2분간 加熱하였다.

위에서 처리된 蛋白質 약 5μg을 tracking dye(0.01M sodium phosphate, 0.05% bromophenol blue pH 7.0) 5μl, glycerol 1방울, β-mercaptoethanol 5μl을 混合하여 겔 表面에 層이 形成되도록 注意하여 加하였다. 電氣泳動은 2배로 稀釋한 겔 緩衝溶液속에서 겔당 8mA의 電流를 통하여 進行시켰다. 電氣泳動이 完決된 후 겔을 分離하여 하루밤 동안 染色溶液(1.25g Coomassie brilliant blue G 250, 22ml methanol과 46ml glacial acetic acid)으로 着色시켰다. 그후 5% methanol과 7.5% glacial acid의 混合溶液으로 脫色시켰다.

標準蛋白質의 移動도를 分子量의 log 값에 대하여 각각 圖示하였다.

Gel filtration 크로마토 그래프에 의한 全分子量:

酵素的 分子量은 Andrew의 方法³⁸⁾에 따라 2mM β-mercaptoethanol을 包含하는 0.1M Tris-HCl pH 8.2 緩衝溶液을 사용하여 1.6×95cm Sephadex G 100 管으로 測定하였다. 標準蛋白質과 blue dextran을 각각 1mg씩 試料에 섞어 管에 重疊시켜 試料가 管속에 흐를 때 溶離를 시작하였고 管 溶離液중의 蛋白質은 230nm에서 濃度를 追跡하였다. 標準蛋白質의 溶離體積을 void volume으로 나누어 Andrew法에 따라 分子量을 log 값으로 圖示하였다³⁹⁾.

b) Creatine Kinase SH基의 定量

Ellman法⁴⁰⁾에 준하여 酵素를 10mM Hepes-KOH pH 8.0의 緩衝溶液으로 2회 투석한 후 10mM Hepes-KOH pH 8.0와 0.33 mM DTNB 溶液에서 測定하였다. 反應性 SH기의 還元에 의하여 生成된 5-thio-2-benzoate ion은 波長 412 nm($\epsilon_{412} = 13,600 \text{ liter mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)에서 測定되었고 全體 SH기는 6M guanidine hydrochloride의 存在下에서 위와 같이 행하였다.

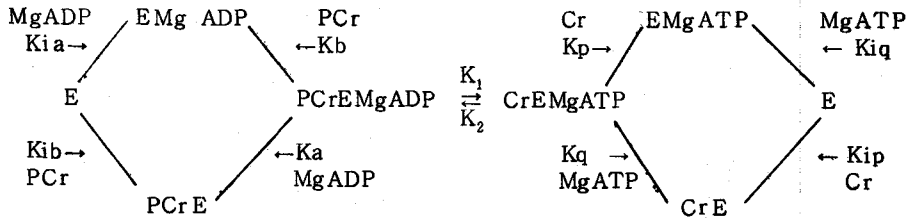
⑥ 反應速度에 관한 實驗結果 分析

뱀 creatine kinase의 具體적인 反應速度 實驗, 즉 逆反應의 初期速度, 生成物 阻害研究 등은 Morrison과 James 方法에 따랐다³¹⁾.

各 反應의 反應速度 研究로부터 얻은 여러 反應速度 常數를 比較하기 위하여 모든 實驗은 pH 8.0, 30℃에서 행하였다. 이 條件에서 ATP와 ADP는 公히 完全히 이온화된 狀態로 溶液속에 存在하기 때

문이다. Mg⁺의 존재에서 Mg-nucleotide 복합체는 Mg ATP²⁻와 Mg ADP⁻이고 이 복합체들이 creatine kinase의 기질로써 작용할 수 있으며 guanidine 기질은 복합체를 형성하지 않는다는 것이 밝혀졌다⁴¹⁾ 반응조건은 고정된 pH에서

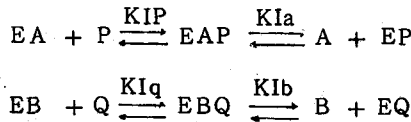
다음과 같이 2개의 반응물이 되도록 조정하였다. MgATP²⁻ + Creatine ⇌ Mg ADP⁻ + Phosphocreatine²⁻ 반응機構는 Scheme 1로써 나타낼 수 있고 이것은 실험결과에 의하여 입증되었다.



Scheme I

이 반응의 가장 느린 단계인 中心에 있는 복합체인 PCrEMg ADP와 CrEMg ATP의 相互轉換을 제외한 다른 모든 단계는 平衡狀態에 도달하고

더 나아가서 dead-end 복합체 PCrEMg ATP와 CrEMg ADP가 다음 반응에 의하여 形成될 수 있다고 假定한다.



KIa, Kib, Kip, KIq는 遊離酵素와 A, B, P, Q와의 反應에 대한 解離常數이다. 그리고 Michaelis 常數 Ka, Kb, Kp, Kq는 A, B, P, Q와 EB, EA, EQ, EP 각각에 대한 反應의 解離常數이다.

Kia, Kib, Kip, KIq는 A, B, P, Q와 다른 形態의 酵素, 즉 EP, EQ, EA, EB 각각에 대한 反應의 解離常數다. 위 反應에 대한 完全速度 方程式은 다음과 같이 쓸 수 있다⁴¹⁾.

$$V = \frac{V_1[A][B] - \frac{V_2[P][Q] Kiakb}{KpKiq}}{Kia Kb + Kb [A] + Ka [B] + [AB] + \frac{KiaKb [A][P]}{KipKia} + \frac{KiaKb [P]}{Kip} + \frac{KiaKb [Q]}{Kiq} + \frac{KiaKb [P][Q]}{KpKiq} + \frac{KiaKb [B][Q]}{KiqKib}}$$

V₂와 V₁은 正反應과 逆反應의 最大速度를 나타낸다. 이 假定된 不衡狀態에서 KiaKb = KaKib와 Kipkq = KpKiq를 따른다.

여기에서 얻은 常數가 Table 1에 나타나 있다.

Rapid-equilibrium random mechanism은 Scheme 1과 같이 나타낼 수 있다. 여기서 A, B, P, Q와 E는 Metal-ADP, N-Phosphorylcreatine, creatine, metal-ATP, 酵素를 各各 나타낸다. 反應速度 常數 Ka, Kb, Kp, Kq는 primary plot의 交叉點으로 이루어진다. 反面에 Kia, Kib, Kip, KIq의 遊離酵素로부터 각기질의 解離常數는 primary plot에서 사용된 固定된 基質의 1/농도에 대한 1/Vmax의 secondary plot으로부터 얻

같은 初期 速度 方程式을 가진 反應 速度機構는 하나의 反應 生成物의 存在時에 初期 速度 測定으로 區別할 수 있다.⁴²⁾ 2개의 dead-end 복합체인 Cr-E-Mg ADP와 PCr-E-MgATP가 있는 rapid equilibrium random mechanism은 正反應에 대해서는 MgATP하고는 競爭의이고 creatine에 대해서는 非競爭의이며, Phosphocreatine에 대하여는 競爭的이고 MgATP에는 非競爭的이다. 같은 경우가 逆反應에도 該當된다. 이것이 2개의 dead-end 복합체에 대한 證據이다.⁴¹⁾ 그리고 Cr-

E - MgADP dead - end 複合체가 chloride ion에 查 研究할 수 있을 것이다.
 의하여 安定化되므로 反應速度常數를 더욱 정확히 調

Table 1. Kinetic constants for rapid - equilibrium random sequential mechanism.

Kinetic constant	Equilibrium
K_{iq}	$E + MATP \rightleftharpoons EMATP$
K_p	$Cr + EMATP \rightleftharpoons CrEMATP$
K_{ip}	$Cr + E \rightleftharpoons CrE$
K_q	$MATP + CrE \rightleftharpoons CrEMATP$
K_{ia}	$MATP + E \rightleftharpoons EMADP$
K_b	$PCr + EMADP \rightleftharpoons PCrEMADP$
K_{ib}	$PCr + E \rightleftharpoons PCrE$
K_a	$PCrE + MADP \rightleftharpoons PCrEMADP$

III. 結 果

(1) 鯊 筋肉으로부터의 Creatine Kinase의 分離精製
 Kuby 等⁴²⁾의 分離過程에 크로마토 過程을 添
 加하여 分離精製한 結果 KCl에 의하여 DEAE
 cellulose 管으로부터 流出되는 主酵素의 比活性度
 는 약 16.07 μ moles / min / mg protein 이었
 다. 生成된 creatine 測定法으로 活性度を 調査한
 結果 약 45% 回收率을 보았고 약 9.3배의 精製가
 이루어졌다 (Table 1). 精製過程에서 이 酵素는

熱에 대하여 不安定하여 0℃에서 모든 過程을 進行
 해야 回收率이 增加된다는 事實이 밝혀졌다. 그리고
 MgAC₂로 MgSO₄ 沈澱物을 抽出할 때 그 濃度를
 Kuby 等⁴⁾의 方法에 記述된 6%와 4%에서 8%
 와 4%로 變化시키고 抽出時間도 30分에서 1時間
 으로 延長하는 것이 더 效率的이었다. Alcohol 分
 別範圍도 36~50%에서 40~60%로 增加시키는
 것이 必要하다는 事實이 밝혀졌다 (Table 2). 8
 단계의 過程에 의하여 精製된 酵素는 polyacryla-
 mide 겔 電氣泳動 結果 하나의 띠를 나타내어 비교
 적 純粹한 酵素임을 알 수 있었다.

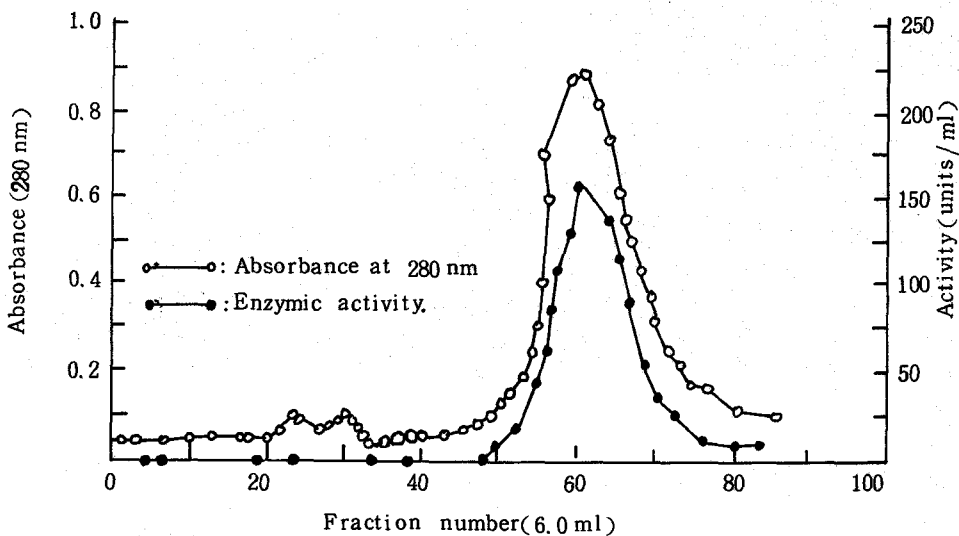


Fig. 1. Chromatography of Fraction II of ADP- creatine phosphotransferase on DEAE- cellulose DE 23.

Table 2. Purification of snake muscle creatine kinase by alcohol fractionation and ion exchange chromatography.

Fraction	Volume (ml)	Protein concentration (mg/ml)	Total protein (mg)	Total activity (units x 10 ³)	Specific activity (units/mg)	Overall purification	Yield (%)
1. Homogenate in 10 mM KCl	420	10.25	4.31	8.79	2.03	(1.00)	(100)
2. 60% (v/v 95%) alcohol, OC, 60 min.	962	2.04	1.96	8.20	4.18	2.1	72
3. MgAc ₂ extract of MgSO ₄ precipitate	62.8	28.9	1.81	7.91	4.36	2.14	69
4. 40~60% (v/v 95%) alcohol fractionate and dialysis	15.3	68.2	1.04	7.20	6.92	3.4	63
5. DEAE-cellulose chromatography and ultrafiltration	5.20	49.3	246	3.95	16.07	9.3	34

(2) 뱀 근육 Creatine Kinase의 특성

가. 분자량

Weber 등³⁷⁾의 방법에 따라 SDS Polyacrylamide gel 전기泳動의 결과 標準蛋白質인 cytochrome c, glyceraldehyde-3-Phosphate dehydrogenase, pyruvate kinase, bovine serum albumin의 移動度는 분자량을 log 값으로 나타내어 creatine kinase subunit의 분자량을 測定한

結果 43,500 이었다.⁴²⁾

뱀 근육 creatine kinase의 全分자량은 Andrew가 發表한 gel filtration 크로마토 그래프 방법에 따라 標準蛋白質인 uricase, hemoglobin, cytochrome c의 용리體積을 void volume으로 나타낸 값을 그들 분자량을 log 값으로 plot하여 本酵素의 분자량을 測定한 結果 86,000으로 推定되었다.⁴²⁾

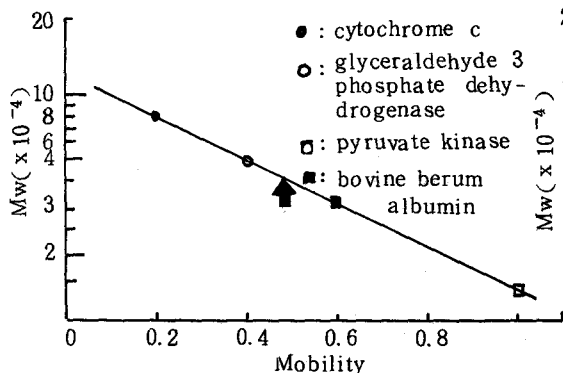


Fig. 2. Molecular weight determination of subunit of ATP-creatine phosphotransferase.

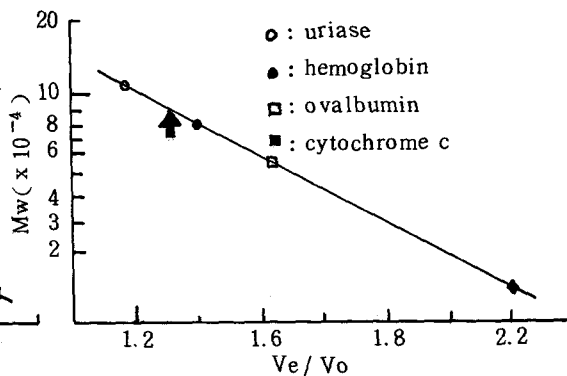


Fig. 3. Molecular weight determination of ATP-creatine phosphotransferase on Sephadex G 100. V_e/V_o of four standard proteins are plotted against their molecular weight.

나. Creatine Kinase 의 SH基의 含量

Ellman 法에 準하여 反應性 SH基의 酸化에 의하여 生成된 5 - thio - 2 - benzoate ion 을 波長 412 nm 에서 測定한 結果 SH基의 값은 1.85 였기 때문에 反應性 SH基는 2 개로 推定되었다.

그리고 全 SH基는 6 M guanidine hydrochloride 存在下에서 測定한 結果 6.06 이었다.

DDT 에 의한 TNB - creatine kinase 의 再活性化는 1mM DDT 로 處理하기 前에는 control 에 比較하여 3 % 이하의 活性도를 나타냈으나 1mM DDT 로 處理한 後는 97 %의 活性도를 되찾았다.

라. 金屬 ion 特異性

Creatine kinase 의 觸媒反應에서 Mg^{2+} ion 대 신 쓰여진 2價 活性化 金屬 ion 의 能力을 測定하기 위하여 여러가지 金屬 ADP - nucleotide 와의 酵素活性도를 MgADP⁻ 와 比較하였다. 金屬 ion 은 遊離 金屬 ion 의 濃도가 1.25 mM 이 되도록 충분히 加하고 Ba^{2+} , Sr^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} 의 金屬이온에 대해서는 最終濃도가 1mM 이 되도록 충분한 ADP³⁻ 를 加하여 酵素活性은 生成된 creatine 測定法으로 行하였다. apparent Michaelis constant 는 computer 分析으로 얻었다 (Table 3).

Table 3. Metal ion specificity of snake muscle creatine kinase

Metal Ion	activity (% of MgADP ⁻)	apparent michaelis constant (mM)
Mg ²⁺	100	0.144 ± 0.009
Mn ²⁺	86	0.123 ± 0.006
Co ²⁺	24	0.055 ± 0.009
Ca ²⁺	20	0.057 ± 0.018
Ba ²⁺	4	ND
Sr ²⁺	4	ND
Ni ²⁺	0	ND
Zn ²⁺	0	ND

ND : not determined

뱀 筋肉 酵素의 活性化에 대한 2價陽이온의 影響은 다음 順序로 活性化의 減少를 나타내었으며 Mg-ADP⁻ > MnADP⁻ > CaADP⁻ > CoADP⁻ > BaADP⁻ ~ SrADP⁻, NiADP⁻ 와 ZnADP⁻ 는 전혀 活性도가 없었다.

마. Nucleotide 特異性

Nucleotide diphosphates 와 triphosphates 는 pH 8.0 에서 完全이온화한 形態 NDP³⁻ 와 DTP⁴⁻ 로 存在할 것으로 看做하였다. 金屬이온의 濃도는 1.25 mM 로 維持시키고 MATP²⁻ 와 MADP⁻ 를 形成하는데 必要한 金屬 ion 의 濃도와 nucleotide 의 濃도는 Morrison 法²⁹⁾ 에 의하여 MgATP²⁻, Mg-ADP⁻, MnADP⁻ 의 apparent stability 常數를 70,000 M⁻¹, 40,000 M⁻¹, 25,000 M⁻¹ 로 정하여 計

算하였다. 여러가지 Mg nucleotide diphosphate, 즉 MgADP⁻, MgCDP⁻, MgGDP⁻, Mg-UDP⁻ MgXDP 에 대한 값은 MgADP⁻ 의 값과 같이 取級하였다.⁴¹⁾

初期 速度 研究를 통하여 creatine kinase 의 觸媒反應에서 MgADP⁻ 와 代치할 수 있는 여러가지 Mg - nucleotide 의 能力을 調査하였다. 이 때 Mg^{2+} 의 濃도는 1.25 mM 로 維持시켰다. 그 결과 nucleoside diphosphate 의 活性도는 다음 順序로 減少하였다. MgADP⁻ > Mg²⁺ - dADP⁻ > MgGDP⁻ > MgXDP⁻ ~ MgCDP⁻ > MgUDP⁻ (역반응에서) 여기서 apparent Michaelis constant 는 computer 分析에 의하여 나온 결과이다 (Table 4).

Table 4. Substrate specificity of snake muscle creatine kinase.

Substrate	Activity (% of MgADP ⁻)	Apparent Michaelis constant (mM)
ADP	100	0.14 ± 0.01
2' - dADP	51	0.18 ± 0.04
GDP	8	8.2 ± 1.0
XDP	6.5	4.4 ± 1.2
CDP	6	7.0 ± 0.43
UDP	3	3.5 ± 0.18

(3) 反應速度에 관한 實驗結果

Coupled spectrophotometric assay 法을 利用하여 活性化金屬 ion Mn²⁺와 生成物妨害劑 creatine 을 包含하는 境遇의 初期反應速度를 測定한 境遇를 제외하고는 모든 初期反應 速度研究에 α-naphthol diacetyl 反應을 利用하였다.

가. 初期 反應 速度

Fig. 4와 5에 나타낸 結果는 逆反應에서 double reciprocal plot 이 直線이며 가로座標 위에 共通交叉點을 나타낸다. Mg²⁺ 대신 Mn²⁺을 사용하였을 경우에도 double reciprocal plot (Fig. 6, 7)은 비슷한 모양을 나타냈다.

Table 5에는 逆反應의 初期反應 速度에 의하여 結定된 Mg²⁺과 Mn²⁺에 의하여 活性化된 creatine kinase 의 Michaelis 常數와 解離常數가 나타나 있다.

Cleland⁴⁷⁾의 SEQUEN program에 의하여 Fig. 4, 5, 6, 7의 data를 computer 分析으로 決定하였다. K_{ia}와 K_a는 metal ADP-enzyme 과 metal ADP-enzyme - N-phosphoryl creatine 으로부터 MgADP, 혹은 MnADP의 解離常數이고, K_{ib}와 K_b는 N-phosphorylcreatine - enzyme 과 N-phosphorylcreatine - enzyme - metal ADP의 解離常數이다.

나. 反應 生成物 存在下의 初期 反應速度

生成物 沮害劑로서 MgATP²⁻를 사용하여 調査한 結果 (Fig. 8, 9) MgATP²⁻는 MgADP⁻에 대하여 競爭的 沮害劑로 作用하였고 N-phosphoryl-creatine 에 대하여는 非競爭的 沮害劑로 作用함을 알 수 있었다.

이상의 結果는 Morrison 등이 逆反應의 沮害型을 豫見하기 위하여 完全速度 方程式을 다음과 같이

$$\frac{1}{V} = \frac{K_a}{V_1} \left\{ \left(1 + \frac{[Q]}{K_{iq}} \right) + \frac{K_{ib}}{[B]} \left(1 + \frac{[Q]}{K_{iq}} \right) \right\} \frac{1}{[A]} + \frac{1}{V_1} \left(1 + \frac{K_b}{[B]} \right)$$

$$\frac{1}{V} = \frac{K_b}{V_1} \left\{ \left(1 + \frac{[P]}{K_{ip}} \right) + \frac{K_{ia}}{[A]} \left(1 + \frac{[P]}{K_{ip}} \right) \right\} \frac{1}{[B]} + \frac{1}{V_1} \left(1 + \frac{K_a}{[A]} \right)$$

修正하였는데 이 式에 의하여 豫見된 사실과 일치하였다.

生成物 沮害劑로써 creatine 이 MgADP⁻에 대하여 非競爭的 沮害로 作用함이 spectrophotometric assay 法으로 觀察되었다 (Fig. 10, 11).

이상의 結果는 Morrison 등의 完全速度 方程式을 수정한 다음 式과 一致하였다.

$$\frac{1}{V} = \frac{K_a}{V_1} \left\{ 1 + \frac{K_{ib}}{[B]} \left(1 + \frac{[P]}{K_{ip}} \right) \right\} \frac{1}{[A]} + \frac{1}{V_1} \left\{ 1 + \frac{K_b}{[B]} \left(1 + \frac{[P]}{K_{ip}} \right) \right\}$$

Table 5는 逆反應의 生成物 沮害實驗으로부터 얻은 要約된 結果이다. K_{iq}와 K_{iq}의 값은 Fig. 8,

Table 5. Michaelis and dissociation constants for creatine kinase activated by Mg²⁺ and Mn²⁺ determined from the initial velocity of the reverse direction.

Kinetic Parameter	Value of constant (mM) in the Presence of	
	Mg ²⁺	Mn ²⁺
K _a	0.12 ± 0.02	0.016 ± 0.003
K _{ia}	0.26 ± 0.06	0.033 ± 0.007
K _b	2.3 ± 0.3	0.35 ± 0.07
K _{ib}	5.0 ± 1.3	0.72 ± 0.17

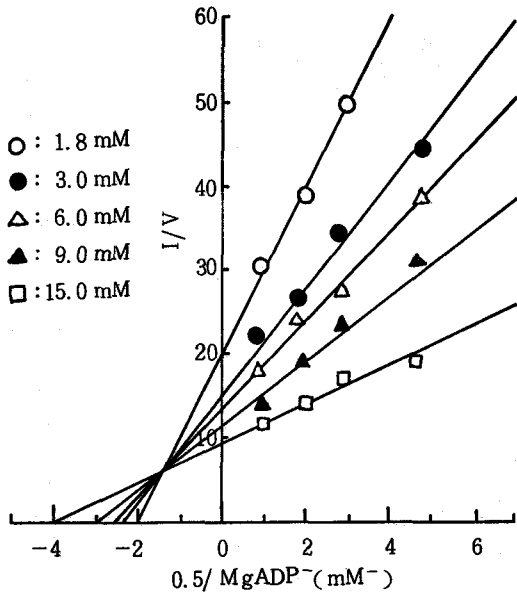


Fig. 4. Initial velocity pattern for the reverse reaction with MgADP^- as the variable substrate at different fixed concentrations of N-phosphorylcreatine.

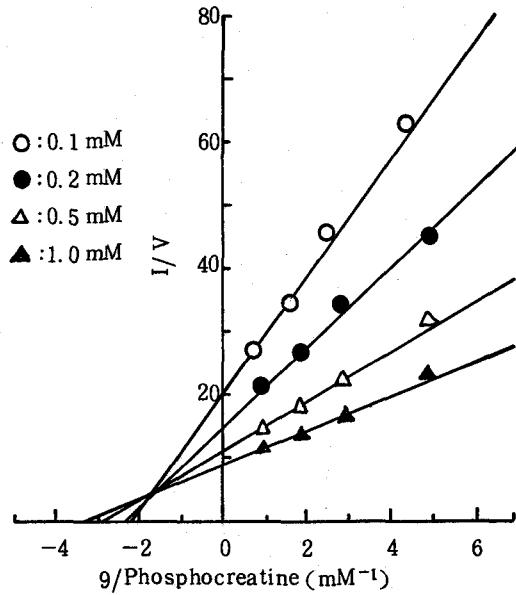


Fig. 5. Initial velocity pattern for the reverse reaction with phosphocreatine as the variable substrate at different fixed concentrations of MgADP^- .

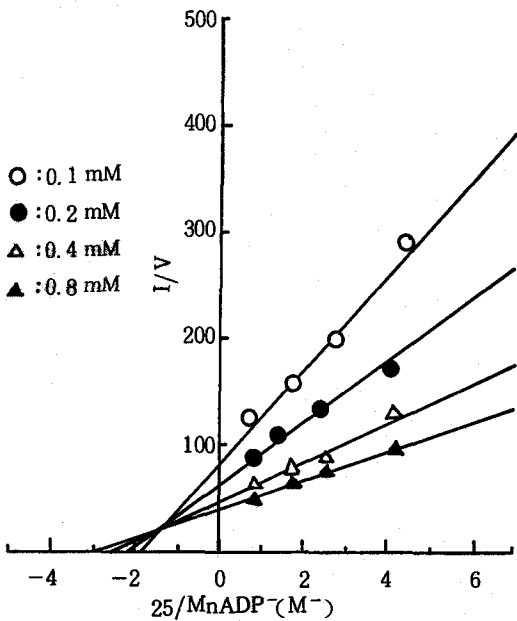


Fig. 6. Initial velocity pattern for the reverse reaction with MnADP^- as the variable substrate at different fixed concentrations of N-phosphorylcreatine.

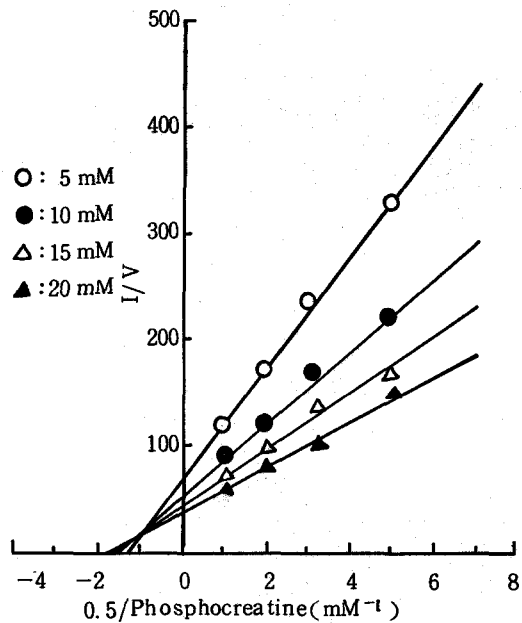


Fig. 7. Initial velocity pattern for the reverse reaction with phosphocreatine as the variable substrate at different fixed concentrations of MnADP^- .

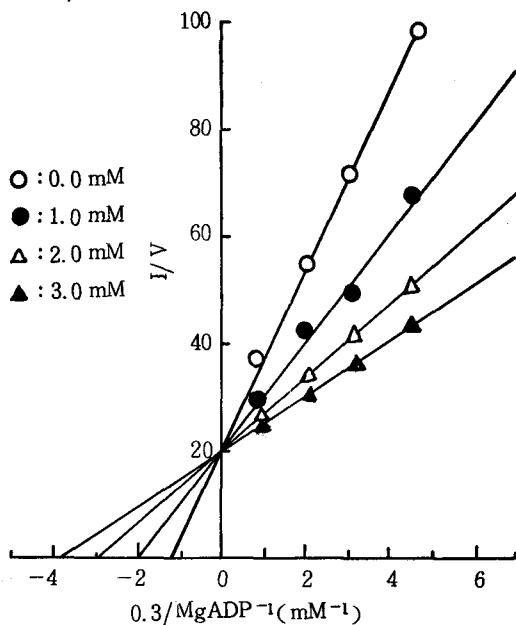


Fig. 8. Product inhibition of the reverse reaction by $MgATP^{2-}$ with $MgADP^-$ as the variable substrate. N-phosphorylcreatine was held constant at 5.0 mM.

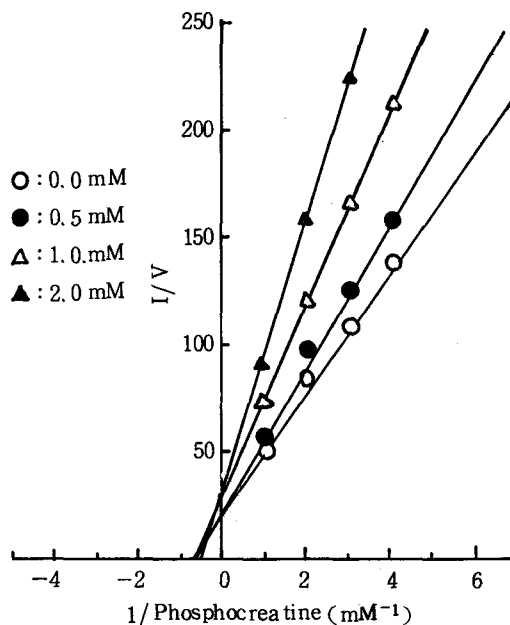


Fig. 9. Product inhibition of the reverse reaction by $MgATP^{2-}$ with phosphocreatine as the variable substrate. $MgADP^-$ was held constant at 0.2 mM.

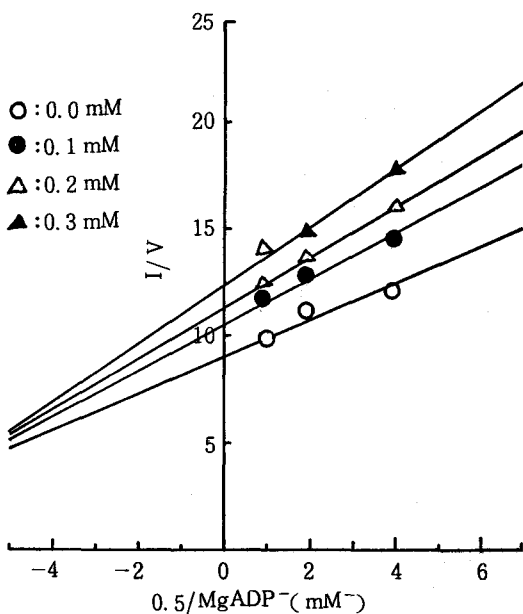


Fig. 10. Product inhibition of the reverse reaction by creatine with $MgADT^-$ as the variable substrate. N-phosphorylcreatine was held constant at 5.0 mM.

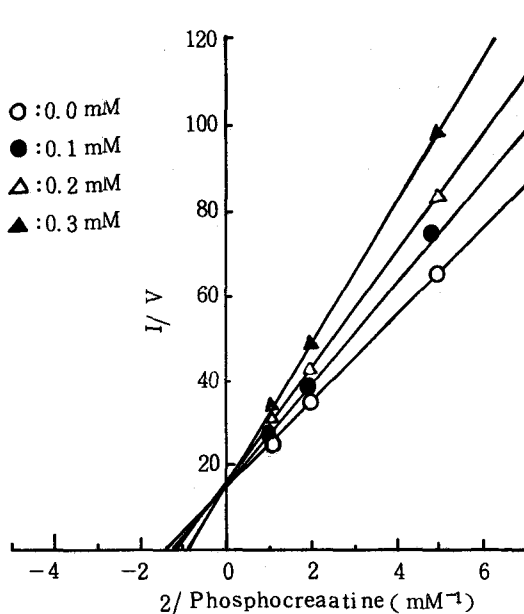


Fig. 11. Product inhibition of the reverse reaction by creatine with phosphocreatine as the variable substrate. $MgADP^-$ was held constant at 0.2 mM.

Table 6. Inhibition constants of the reverse reaction of snake creatine kinase *

Product inhibitor	Variable substrate	Type of inhibition	Apparent inhibition constants		True inhibition constants		Concentration of constant substrate	
			K_{iq} (mM)	K_{iq} (mM)	K_{iq} (mM)	K_{iq} (mM)	(mM)	(mM)
MgATP ²⁻	MgADP ⁻	competitive	2.14 ± 0.17 (0.87 ± 0.03)		2.03 (0.68)		PC	5.0
MgATP ²⁻	PC	noncompetitive	7.97 ± 1.61 (2.94 ± 0.31)	23.38 ± 17.59 (15.90 ± 3.70)	4.48 (1.35)	8.71 (3.18)	MgADP ⁻	0.2
Creatione	MgADP ⁻	"	48.76 ± 9.03 (36 ± 5)	66.09 ± 5.19 (20 ± 1)	24.4 (23)	20.8 (7.3)	PC	5.0
Creatione	PC	competitive	50.75 ± 3.13 (8.6 ± 0.5)		107.0		MgADP ⁻	0.2

* The values in parenthesis are values reported by Morrison and James (41) for the rabbit muscle enzyme.

9, 10, 11의 결과를 Cleland⁴⁷⁾ COMP와 NONCOM computer program으로 분석하여 얻은 결과이다. true inhibition constant K_{ia} 와 K_{iq} 값은 Morrison과 James에 의하여發表된 apparent와 real

inhibition常數의 相互關係 方程式에 의하여 計算되었다. 抑制樣相 등의 實驗結果로부터 本 酵素反應機構는 rapid equilibrium random mechanism으로豫想되는 性質과 一致함을 알 수 있었다.(Table 7).

Table 7. Expected pattern of product inhibition results on the basis of a rapid equilibrium random reaction mechanism for the reverse reaction catalysed by creatine kinase.

Product Creatine	Variable substrate	
	MgADP ⁻	PC
MgATP	Competitive	Noncompetitive
Creatine	Noncompetitive	Competitive

IV. 考 察

Kuby 등의 alcohol 分別過程에 DEAE-cellulose 크로마토 그래피를 添加하여 뱀 筋肉 creatine kinase를 純粹하게 精製하였다. 冷血動物인 뱀 筋肉에는 creatine kinase가 高濃度の 可溶性 蛋白質로 存在하지만 그 比活性도는 지금까지 보고된 溫血動物의 것에 비하면 相當히 낮음을 알 수 있었다.

1% β-mercaptoethanol의 存在下에서 SDS polyacrylamide電氣泳動으로 얻은 subunit 分子量(43,500)은 dogfish 筋肉酵素的 subunit 分子量(41,500)과 토끼 筋肉 酵素 subunit 分子量(42,700)과

비슷한 값을 알 수 있었다.

本 뱀 筋肉 creatine kinase의 反應性 SH基와 全 SH基를 測定한 結果 溫血動物 筋肉 creatine kinase와 一致하여 6~8개의 SH기가 있으며 그 중 反應性 SH基는 2개 있었다. Simonarson 등은⁷⁾ dogfish 筋肉에서 分子당 4개의 反應性 SH基의 存在를 확인했다. 그러나 이중 2개의 SH基가 酵素活性에 더 本質的이라는 事實을 5, 5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)와의 滴定實驗으로 밝혀졌다.

뱀 筋肉 creatine kinase를 5, 5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)로 處理하면 酵素活性이 完全히 없어져 SH基가 酵素活性部位에 參與함을 나타내

주고 있다. 이와 같이 酵素活性이 喪失된 酵素에 DTT를 添加함으로써 酵素活性이 다시 小變되었다.

뱀 筋肉 酵素의 金屬 ion 特異성은 O' Sullivan 등과 Uhr⁴²⁾가 토끼 筋肉 酵素에 대하여 報告한 바와 비슷하였다. Vmax는 非水化 金屬 ion의 반치름이 增加하는 順序, 즉 MgADP > MnADP > CaADP로 減少하였다.

金屬이 酵素에 結合할 때는 非水化된 狀態이며 enzyme-phosphocreatine 複合體에 metal-ADP의 親和力은 非水化된 金屬 ion의 크기가 增加함에 따라 增加한다는 사실이 밝혀졌다⁷⁾. PCr-E-MADP 複合體에서 金屬 ion의 機能은 transphosphorylation 反應에서 phosphocreatine의 N-P 結合을 遍極시키는 것이라고 밝혀졌다³⁰⁾.

豫想한 대로 ADP는 다른 purine nucleotides 특히 活性도가 ADP의 51, 8, 6.5%를 각각 나타낸 dADP, GDP, XDP와 비교하여 酵素에 가장 좋은 基質이라 確信된다. 위에 든 purine nucleotide는 2개의 pyrimidine nucleotide인 CDP 혹은 UDP의 어느 것보다도 ADP에 의하여 쉽게 置換될 수 있었다. 그렇지만 逆反應에서 ADP와 置換될 CDP의 能力은 가장 낮은 活性를 보인 purine nucleotide인 XDP와 거의 같았다.

生成物이 存在하지 않을 때 뱀 筋肉 creatine kinase의 初期 反應速度에 관한 研究結果는, 처음 基質에 대한 Michaelis 常數가 두번째 基質 濃度の 函數라는 것을 밝혔다. 固定된 基質의 濃도가 減少함에 따라서 觀察된 Michaelis constant는 增加되었다. Double reciprocal plot는 生成物이 生成하기 前, 두 基質이 活性化 金屬 ion과 같이 酵素에 反應하는 機構는 sequential하다는 事實을 가르킨다. 生成物이 存在할 때 Mg²⁺과의 初期速度 研究는 ordered sequential mechanism은 아니라고 推定할 수 있으나 이것으로써 rapid-equilibrium random mechanism인가 혹은 Theorell-Chance mechanism인가를 區別하는 것은 불충분하다. 이 두 機構를 分明히 區別하기 위한 實驗은 할 수 없었지만 生成物 沮害 實驗結果의 secondary plot에 의하여 Theorell-Chance mechanism의 適用與否를 檢討할 수 있었다. 즉 Fig. 10, 11으로부터 水直交點과 기울기의 secon-

dary plot으로부터 推定할 수 있었다. 이들 結果로부터 이 뱀 筋肉 creatine kinase의 酵素反應 機構도 rapid-equilibrium random mechanism에 따르며, Theorell-Chance mechanism은 apparent inhibition constant가 고정된 基質의 濃도에 따라 변하지 않기 때문에 適用되지 않는다. Morrison과 James는 토끼 筋肉 creatine kinase의 反應機構의 모든 段階가 中心複合體의 相互變換을 제외하고는 rapid-equilibrium random mechanism이라는 사실을 밝혔다^{4D, 4B)}.

Morrison의 理論을 本研究의 뱀 筋肉 酵素에 적용하면 이 酵素는 2개의 dead-end 複合體 creatine-enzyme MgADP와 N-phosphoryl creatine-enzyme MgATP를 形成하기 때문에 nucleotide와 guanidine substrate에 뚜렷한 結合部位를 갖고 있음을 示唆해 준다.

V. 結 論

뱀 筋肉으로부터 creatine kinase를 分離精製하여 그 性質을 調査하고 反應速度에 관한 實驗을 통하여 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. 뱀 筋肉 creatine kinase의 分子量은 SDS-poly acrylamide 電氣泳動과 Sephadex G 100 gel filtration에 의하여 測定한 結果 86,000였다.

2. 이 酵素에는 2개의 反應性 Sulfhydryl基가 存在한다는 것이 dithiobisnitrobenzoic acid (DTNB)에 의하여 밝혀졌다.

3. Nucleotide 基質特異성은 逆反應의 活性化 金屬으로 Mg를 使用하여 調査한 結果 다음과 같은 結果를 얻었다.

ADP > 2'-dADP > GDP > XDP > UDP

4. 基質으로써 ADP를 使用하여 金屬 活性도를 調査한 結果 다음과 같은 順序였다.

Mg > Mn > Ca

5. Mg-ADP를 nucleotide 基質로 使用하여 逆反應의 反應速度에 관한 實驗, 즉 初期 反應速度 및 沮害 實驗을 통하여 調査한 結果 이 酵素 反應機構는 rapid-equilibrium random mechanism을 따른다는 사실을 밝혔다.

Reference

1. Richterich, R., U. Wiesmann, and B. Cantz: In "Homologous Enzymes and Biochemical Evolution" (N. Van Thoai and J. Roche, eds.), p. 243. Gordon & Breach, New York, 1968.
2. Dawson, D. M. and I. H. Fine(1967): Arch, Neurol. (16) 175~177
3. Warren, W. A. (1973): Prep. Biochem. (3) 199~208.
4. Kuby, S. A. L. Noda, and H. A. Lardy (1955): Methods in Enzymology(Colowick, S. P. and N. O. Kaplan, eds.) (2)605~610, Academic Press, New York.
5. Czok, R. and T. Buecher(1960): Advan. Protein Chem. (15)315.
6. Gosselin-Rey, C. and C. Gerday(1970): Biochem. Biophys. Acta(221) 241~254.
7. Simonarson, B(1971): Ph. D thesis of University of London.
8. Thomson, A. R., J. W. Eveleigh, and B. J. Miles(1964): Nature(203)267~269.
9. Kumudavalli, I., B. H. Moreland, and D. C. Watts (1970): Biochem. J (117) 513~523.
10. Roy, B.P., J. F. Laws. and A. R. Thomson (1970): Biochem. J. (120) 177~185.
11. Keto, A. I. and M'D. Doherty (1968): BBA (151) 721.
12. Simonarson, B. A. and D.C. Watts (1972): Biochem. J. (128) 1241~1253.
13. Eppenberge, H. H., D. M. Dawson, and N. O. Kaplan (1967) : JBC, 242, 204.
14. Kulbertus, H. and A. Disteche (1961): Arch, Int, Physiol, Biochim. (70) 264~258.
15. Jacob, H., H' W. Heldt, and M. Klingenberg (1964): BBRC (16) 516.
16. Baskin, R. J. and D. W. Deamer (1970) : J. Biol. Chem. (245) 1345~1347.
17. Turner, D. C., T. Walliman, and H. M. Eppenberger (1973) : Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. A. (70) 702~705.
18. Yagi, K. and R. Mase (1962) : J. Biol, Chem. (237) 397~403.
19. Houk, T.W. and S. V. Putnam (1973): Biochem. Biophys. Res Commun. (62) 241~245.
20. Mani, R. S. and C. M. Kay (1976) : Biochem. Biophys. Acta. (453) 391~399.
21. Nada, L., S. A. Kuby, and H. A. Lardy (1954): J. Biol. Chem. (209) 203~210.
22. Olson, O. E. and S.A. Kuby (1964) : J. Biol, Chem. (239) 460~467.
23. Dawson, D. M., H. M. Eppenberger, N. O. Kaplan (1965) : Biochem. Biophys. Res. Commun. (21) 346~353.
24. Yue, R. H., H. K. Jacobs, K. Okabe, H. J. Keutel, and S. A. Kuby (1968) : Biochemistry, (7) 4291~4298.
25. Bayley, P. M. and A. R. Thomson (1967) : Biochem. J. (104) 33c~35c.
26. Thomson, A. R., J. W. Eveleigh, J. W. Eveleigh, J. F. Laws, and B. J. Miles (1968) in "Homologues Enzymes and Biochemical Evolution" (N. Van Thoai and J. Roche, eds.) p. 255. Gordon and Breach, N. Y.
27. Van Thoai, N. (1968) : Homologues Enzymes and Biochemical Evolution (Van Thoai, N. and J. Roche, eds.) pp. 190~229, Gordon and Breach, N. Y.
28. Burger, A., H. Eppenberger, and U. Wiesmann (1963) : Helv. Physiol. Acta. (21) 6~10.
29. Morrison, J. F., W. J. O, Sullivan, and A. G. Oqston (1961) : Biochem, Biophys. Acta. (52) 82~96.
30. Watts, D. C. (1973) : The Enzymes, (3/e) (Boyer, P. D. ed.).

31. Morrison, J. F. and E. James. (1965) : *Biochem. J.* (97) 37~52.
32. Forster, G., E. Bernt, and H.U. Bergmeyer (1974) : *Methods of Enzymatic Analysis* (Bergmeyer, H. U. ed.) (2) 798~793, Academic Press, N. Y. and London.
33. Warburg, O. and Christian, W. (1941) : *Biochemische Zeitschrift.* (310) 384~412.
34. Kuby, S. A. and E. A. Noltman (1962) : *The Enzymes* (2/e) (6) 515, Academic Press, N. Y.
35. Lee, C. S., G. A. Nichoson, and W. J. O'Sullivan (1977) : *Aust. J. Biol. Sci.*, (30) 507~517.
36. Reisner, R. H., P. Nemes, and C. Bucholtz (1975) : *Anal. Biochem.* (64) 509~516.
37. Weber, K., J. R. Pringle, and M. Osborn (1972) : *Methods in Enzymology* (Hirs, C. H. W. and S. N. Timasheff, eds.) (26) 3~27, Academic Press, N. Y. and London.
38. Andrews, P. (1970) : *Methods of Biochemical Analysis* (Glicck, D., eds.) (18) 1~53, John Wiley and Sons, N. Y., London, Sydney, and Toronto.
39. Moreland, B., D. C. Watts, and R. Virden (1967) : *Nature* (London) (214) 458.
40. Ellman, G. L. (1959) : *Arch. Biochem Biophys.* (82) 70~77.
41. Morrison, J. F. and E. James: *BBA*, (128) 327, 1966.
42. Morrison, J. F. and M. L. Uhr (1966) : *Biochem. Biophys. Acata.* (122) 57~74.
43. O'Sullivan, W. J. and D. D. Perrin (1964) : *Biochemistry* (3) 18~26.
44. Mahowald, T. A., E. A. Noltmann, and S. A. Kuby(1962) : *J. Biol, Chem.* (237) 1535~1548.
45. Dance, N. and D. C. Watts (1962) : *Biochem. J.* (84) 114~115.
46. Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady State Enzyme Systems, J. W.
47. Cleland, W. W. (1963) : *Nature*, (198) 463~465.