

## 소의 자궁 및 고환에서 Phospholipase C의 분리 및 뇌 Isozyme과의 비교 연구

영남대학교 의과대학 생화학교실  
김정희 · S. G. Rhee\* · 이기녕

### 서 론

Phosphoinositide의 대사는 1950년 Mabel 및 Hokin이 acetylcholine에 의해 phosphatidyl inositol(PI)과 phosphatidic acid가 증가한다는 것을 보고 하였고 PI turnover의 증가는 바로  $Ca^{2+}$ 의 농도 증가와 관계가 있다고 하였다.<sup>1,2)</sup>

세포내의 정보 전달은 호르몬, 성장인자나 신경 전달체등의 세포자극으로 세포막의 receptor가 전달 받아 phospholipase C(PLC)가 활성화되어 세포막의 inositol phospholipid가 가수분해되어 diacylglycerol(DG)과 inositol triphosphate( $IP_3$ )가 생성된다. Diacylglycerol은 protein kinase C를 활성화 시켜 세포 성장조절에 관여하며,  $IP_3$ 는 endoplasmic reticulum의 막에서  $Ca^{2+}$  channel을 열어 cytoplasmic  $Ca^{+}$ 의 양을 증가 시킴으로써 DG과  $IP_3$ 는 signal transduction 과정 중 second messenger로서의 역할을 하며 이들을 생성하는 PLC는 세포막 정보전달의 중요 효소라 할 수 있다.<sup>3-6)</sup>

Inositol phospholipid-specific phospholipase C는 대부분의 조직에 존재하며 각종 조직으로부터 정제가 되어 왔다. mammalian 조직에서도 특히 cytosol에 많은 것으로 알려져 있고 Lapetina와 Michell등은 PLC가 세포 표면의 receptor에 의해

활성화 되고 뇌에서 관찰되었다는 보고<sup>7)</sup>와 아울러 1981년 Takenawa와 Nagai<sup>8)</sup>는 쥐의 간으로부터 PI-specific PLC를 정제하였으며 분자량이 68,000과 70,000인 것으로 관찰 하였다. Hakata등은 소의 platelets에서 분자량이 143,000인 PLC를 정제 하였으며 여러 복합체들이 PLC에 미치는 영향등을 관찰 하였다.<sup>9)</sup> 한편 Hofmann 및 Majerus는 양의 seminal vesicular gland로부터 분자량 65,000 되는 PLC enzyme을 정제 하였으며 분자량 85,000 되는 다른 isozyme을 일부 정제하여 두 개의 효소가 서로 다르다는 것을 면역학적 검사로 밝혔고,<sup>10,11)</sup> Bennett 및 Crooke 역시 Guinea pig의 자궁에서 PI-specific PLC를 정제하여 분자량 62kdal이라는 것을 확인 하였다.<sup>12)</sup>

1986년 Ryu등이 소의 뇌에서 두 개의 cytosolic PLC I 과 II를 정제 하였으며 곧이어 같은 장기에서 III를 찾아내어 3개의 isozyme을 정제 및 확인하여 분자량 I : 150,000, II : 145,000 및 III가 85,000 이며 각각의 monoclonal antibody를 만들어 성질을 관찰 보고 하였다.<sup>13-15)</sup>

본 연구는 high performance liquid chromatography(HPLC)를 이용하여 소의 뇌, 고환 및 자궁에서 PLC를 분리 정제하고 그 fraction의 각 isozyme 과 소의 뇌 PLC의 monoclonal antibody(Mab)와

\* Present Address : National Institutes of Health, Bldg 3, Rm 203, 9000 Rockville pike, Bethesda, MD 20892, U. S. A.

\*\* 이 논문은 '87년도 국비해외파견 연구비에 의한 논문임.

결합 시켜 봄으로서 각 PLC fraction이 뇌의 PLC와 얼마나 homogeneity가 있는지 관찰 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험 재료

시료는 도살장에서 갓잡은 소의 뇌, 자궁 및 고환을 이용하였으며 시약중 PMSF (paramer-captosulfonyl fluoride), sodium deoxycholate (SDC), ethanolamine, dithiotherol (DTT), Hepes (N-2-hydroxyethyl piperazine-N-2-ethanesulfonic acid) 및 MOPS (3-IN-Morpholinopropanesulfonic acid) 등은 sigma에서 구입하였으며, Affigel 10 & 15 및 단백질 정시약은 Biorad에서 phosphoinositide(PI) 및 <sup>3</sup>HPI는 Amersham에서 구입하였다.

PLC I, II 및 III에 대한 monoclonal antibody는 NIH(NHLBI/LB)의 S. G. Rhee의 도움으로 사용되었으며 표준(Standard) PLC I, II 및 III enzyme 역시 NIH에서 미리 정제한 것을 표준으로 하였다.

### 2. 실험 방법

#### 1) phospholipase C의 추출

도살장에서 갓잡은 소의 장기 중 뇌, 자궁 및 고환으로부터 100g을 취하여 homogenate buffer (10mM Tris, pH 7.6, 0.1mM DTT, 1mM EGTA, 2mM PMSF, 10 $\mu$ g/ml leupeptin) 300ml에 분쇄 후 초원심(Beckman rotor 45Ti) 40,000rpm에서 1시간 원심 후 상층액을 단백질 측정 후 DEAE HPLC를 위하여 준비하였다.

#### 2) DEAE cellulose 및 phenyl HPLC

DEAE cellulose HPLC column(2 $\times$ 20cm, LKB)은 buffer A(50mM Tris, pH 7.6, 1mM EGTA, 0.1mM DTT)에 평형유지 하였으며 주입 단백질량은 250mg이 넘지 않게 하였고 시료를 주입 후 gradient로 buffer B(buffer A + 1M KCl)를 50분까지 25% 55분까지 90%로 linear gradient로 하였으며

각각 fraction을 회수하였다.

PLC assay후 농축하여 1ml 이하로 만들어 TSK-5PW(phenyl)HPLC column에 주입하였다. 주입 단백질량은 25mg 이하로 하였으며 평형 buffer a는 20mM Hepes, pH 7.0, 1mM EGTA, 0.1mM DTT & 3M KCl이며 buffer b는 3M KCl이 제외된 reverse phase의 linear gradient가 걸렸다. 50분간 column을 걸고 각 fraction을 회수하고 retention time을 측정하였다.

#### 3) 단백질의 측정

Biorad<sup>®</sup>의 단백질측정시약을 이용하여 Bradford 방법<sup>16)</sup>과 Spectrophotometer를 이용한 assay protein absorptivity  $A_{280}^{0.1\%} = 1.14$ 를 실시하였다.<sup>17)</sup>

#### 4) Phospholipase C의 측정

PLC 측정은 phosphoinositide(PI) hydrolyzing activity를 측정하였으며 <sup>3</sup>HPI를 20,000cpm 되게 하고 cold PI(48 $\mu$ g)를 methanol:chloroform = 1:2 되는 용액에 녹여 N<sub>2</sub> gas로 말린 후 50mM Hepes, pH 7.0, 2mg/ml SDC 용액에 녹여 sonication하여 균질용해(solubilization)시켜 기질로 하였으며 기질 100 $\mu$ l에 12mM Ca<sup>2+</sup> - 4mM EGTA 용액 50 $\mu$ l을 넣고 효소용액(0-50 $\mu$ l)을 가하여 37 $^{\circ}$ C, 5분 반응하여 반응정지액 chloroform: methanol:HCl = 100:100:0.6 용액 1ml을 가하고 0.3ml의 1M HCl-5mM EGTA를 가하여 진탕후 원심한 상층액은 10ml aquasol에 넣어 Schintillation counter에 측정한다. 대조로는 효소없는 buffer로 사용하였다.

#### 5) Affigel에 Mab의 결합(coupling)

Affigel 10과 15를 동량 혼합하여 증류수로 씻은 후 0.1M MOPS buffer, pH 7.5에 녹여 500 $\mu$ l affigel에 각종 Mab(PLC I, II, III) 20mg을 가하여 4 $^{\circ}$ C에서 4시간 진탕후 원심하여 상층액을 단백질 측정하여 결합(coupling)상태를 확인하고 1M ethanaloine HCl(pH 8)을 gel 1ml당 0.1ml 가하여 4시간 blocking 후 PBS로 씻었다.

#### 6) Ag(PLC)와 Mab-labeled affigel의 결합능(binding capacity)

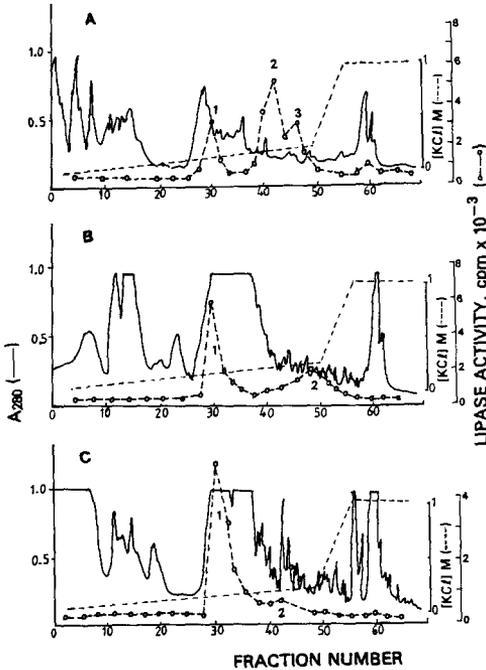
각종 Mab labeled affigel 100 $\mu$ l에 각종 분리한

PLC 분획을 1  $\mu$ g 되게 가하여 4°C에서 1시간 진탕 후 원침하여 상층액을 PLC assay 하였다.

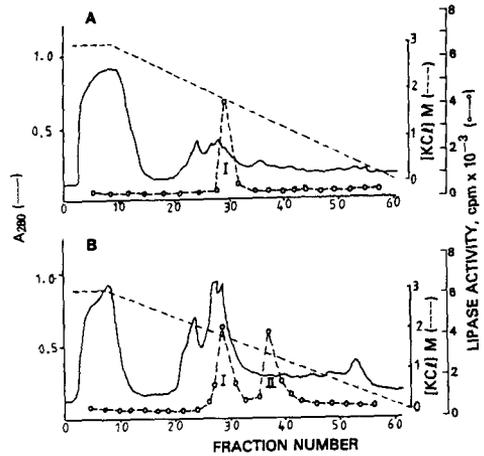
## 성 적

### 1. HPLC에 의한 PLC의 추출

phospholipase C(PLC)을 소의 뇌, 자궁 및 고환 으로부터 각각 분쇄하여 DEAE HPLC에 적용한 결과 Fig. 1과 Table 1을 얻었다. Fig. 1에서 A는 소



**Fig. 1.** HPLC on DEAE column. phospholipase C enzyme was assayed by bovine brain(A), uterus(B), and seminal vesicle(C).



**Fig. 2.** Reverse phase chromatography on TSK-5PW HPLC column. I(A) is 1 and I & II (B) is 2 from DEAE HPLC of bovine brain(Fig 1).

**Table 1.** Retention time of purified fraction of phospholipase C in DEAE-cellulose and TSK phenyl-5PW HPLC

Bovine	DEAE-cellulose		TSK phenyl	
	Fraction type	Retention time (min)	Fraction type	Retention time (min)
Brain	F - 1	30	F - 1 - I	30
	F - 2	42	F - 2 - I	30
			F - 2 - II	38
	F - 3	46	F	
Uterus	F - 1	30	F - 1 - I	32
	F - 2	48	F - 2 - I	28
Seminal vesicle	F - 1	30	F - 1 - I	30
	F - 2	44	F - 2 - I	28

의 뇌로부터 활성도가 측정되는 3개의 최고봉을 얻었고 F-1, F-2 및 F-3 라 하였다. F-1은 KCl 0.2M에서 F-2 및 F-3는 KCl 0.22M, 0.24M 에서 대개 나왔고 retention time은 F-1이 30분 F-2가 42분 F-3가 46분이었다 (Table 1).

자궁과 교환도 각기 2개의 peak F-1, F-2가 나왔으며 retention time은 F-1은 30분이며 F-2는 자궁이 48분 교환이 44분이었다.

Phenyl 5PW HPLC에서는 Fig. 2에서 나타내었으며 뇌의 DEAE F-1과 F-2를 나타낸 것이다. F-1은 F-1-I으로 나왔고 30분에서 더욱 순수한 곡선을 얻었으며 F-2와 F-3는 DEAE에서 완전히 갈라지지 않았으나 phenyl에서 F-2-I 및 F-2-II를 얻었고 retention time은 30분 38분이었다.

자궁은 F-1-I 32분, F-2-I 28분, 교환은 F-1-I 30분 F-2-I 28분으로 나타났다 (Table 1).

## 2. PLC와 Mab labeled affigel의 결합능 검사

소의 뇌 PLC에 대한 각 Mab을 affigel 10+15에

결합시키고 결합된 affigel column에 이미 정제된 (NIH) PLC enzyme을 결합시켜 그 column의 기능을 관찰하였다 (Table 2). PLC에 대한 Mab I, II 및 III을 각각 Mab labeled affigel에 적용하여 table. 2와 같은 결과를 얻었다. 대조군으로는 다른 isozyme의 Mab labeled된 column을 사용하였다. PLC I·Ab labeled Mab는 대조군의 결합능의 상태는 12%에 비해 K 82-3-2-4는 89.9%, N 68-5-3-8은 91.5%를 나타내었고 II·Mab는 대조가 8%인데 B-2-5-3에선 97.9% B 6-4-2에선 97.8%로 아주 높은 민감도를 보였다. III에선 대조가 11.2%인데 비해 III Mab에선 73.8%~97.8%이다. 이중 73.8%인 R 32-1은 native form이므로 낮은 결합능을 보였다.

## 3. HPLC fraction의 Mab-binding test 결과

각 HPLC fraction들이 brain의 PLC-Mab와 얼마나 결합하느냐를 관찰한 결과 자궁의 DEAE F-1은 PLC III가 88.7%로 가장 높았으며 DEAE F-2는 PLC II가 81.7%였다. Phenyl F-1-I 역시

**Table 2.** Binding capacity of phospholipase C (PLC) about each PLC monoclonal antibody (Mab) labeled affigel (10+15)

PLC-Mab/50ul Affigel	PLC	Nonbinding CPM (Total 7426)	Binding Capacity (%)
I - control	lug	6535	12.0
I - Mab K 82 - 3 - 2 - 4	PLC I	750	89.9
I - Mab N 68 - 5 - 3 - 8		631	91.5
II - control	lug	6832	8.9
II - Mab B 2 - 5 - 3	PLC II	156	97.9
II - Mab B 6 - 4 - 2		163	97.8
III - control	lug	6594	11.2
III - Mab R 29 - 1	PLC III	163	97.8
III - Mab R 32 - 1		1946	73.8
III - Mab S 11 - 2 - 4		1106	85.1
III - Mab Z 78 - 5		304	95.9

I - control : II Ab labeled Affigel

II - control : III Ab labeled Affigel

III - control : I Ab labeled Affigel

**Table 3.** Binding test for PLC-Mab affigel and purified PLC of each fraction from HPLC (total activity assay of PLC:8000 cpm, 5 ul 10min)

Bovine tissue HPLC fraction	Mab-labeled Affigel	Nobinding cpm	Binding cpm	Binding %
<b>Uterus</b>				
DEAE F - 1	control	1152	75	20.9
	PLC I	911	150	20.9
	PLC II	1084	142	5.9
	PLC 3	130	824	88.7
DEAE F - 2	control	1006	86	
	PLC I	848	255	15.7
	PLC II	184	549	81.7
	PLC III	809	242	19.5
Phenyl F 1 - 1	control	1277	145	
	PLC I	890	240	30.3
	PLC II	737	194	42.3
	PLC III	164	773	87.2
Phenyl F 2 - 1	control	1480	175	
	PLC I	460	170	68.9
	PLC II	552	340	62.7
	PLC III	1144	247	22.7
<b>Seminal vesicle</b>				
DEAE F - 1	control	1359	115	10.6
	PLC I	1214	163	4.4
	PLC II	1299	270	76.1
	PLC III	325	910	
DEAE F - 2	control	1193	57	56.1
	PLC I	481	250	82.9
	PLC II	204	686	17.8
	PLC III	981	182	
Phenyl F 1 - 1	control	1380	180	
	PLC I	1188	227	13.9
	PLC II	1280	186	7.2
	PLC III	197	1064	85.7
Phenyl F 2 - 1	control	1390	85	
	PLC I	862	237	38.0
	PLC II	264	611	81.0
	PLC III	1112	326	20.0

PLC III가 87.2%이나 DEAE보다 낮게 나왔고 phenyl F-2-I은 I과 II가 비슷하게 나왔다. 교환에선 DEAE F-1이 PLC III Ab와 76.1% binding 하였으며 DEAE F-2는 PLC II Ab에 82.9%, I이 56.1% 결합되었고 phenyl F-1-I은 역시 III Ab가 85.7%로 DEAE F-1보다 높았으며 phenyl F-2-I에선 PLC I 38%, PLC II가 81%로 결합되었다.

## 고 찰

Phosphoinositide에 specific phospholipase C (PLC)의 중요 역할은 diacylglycerol(DG)와 Inositol triphosphate(IP<sub>3</sub>)의 second messenger molecule을 만드는데 surface receptor에 전도된 signal을 전해주는 유도체역을 한다.<sup>3-5)</sup> PLC의 정제는 여러 장기로부터 생화학적 기술등의 이용으로 몇 종류의 곡선들을 찾았으나<sup>8,9)</sup> isozyme의 확인은 쉬운 일이 아니었다.

PLC는 Ca<sup>2+</sup>에 의해서도 활성화되며 PLC에 의해 생성된 산물중 IP<sub>3</sub>는 cytosol내의 Ca<sup>++</sup>을 상승시키고 아울러 PLC의 활성화는 불포화 지방산의 첨가시도 역시 상승되며 그중 arachidonic acid는 가장 강한 activator로 보고 되었다.<sup>18,19)</sup> 한편 Dawson 등은 8개 이상의 carbon을 가진 acyl chain의 saturated phosphatidylcholine은 PLC를 강하게 억제한다는 보고도 하였다. C<sub>6</sub> acyl을 가진 phosphatidyl choline은 활성도를 증가시킨다는 보고이다.<sup>20)</sup> Iravin<sup>21)</sup> 등은 phosphatidic acid는 PLC의 매우 중요한 activator라 하였다. 그러므로 불포화 지방산이 많은 phosphatidic acid가 PLC의 활성도에 중요한 역할을 한다고 할 수 있다.

Hofman과 Majerus<sup>10)</sup>는 양의 고환에서 두개의 서로 다른 PLC를 찾았으나 한 가지 형만 정제함으로써 직접적인 비교는 못하였고 Takenawa와 Nagai<sup>8)</sup>는 쥐의 간에서, Hakata<sup>9)</sup> 등은 소의 platelet, Bonnette 및 Crooke<sup>12)</sup>은 Guinea pig의 자궁에서 각기 PLC를 정제하였다.

1987년 Ryu 등은 소의 뇌에서 PLC I, II, III의 3개의 isozyme을 정제하였고 각각의 monoclonal

antibody를 만들어 세 가지 isozyme에 대한 비교와 함께 DNA sequencing까지 관찰 보고 하였다.<sup>14-22)</sup>

본 논문에서는 소의 자궁과 고환을 각각 분쇄하여 HPLC로 분리 정제하였다. 소의 뇌도 함께 HPLC로 비교 분리하였으며 역시 3개의 fraction I, II 및 III를 얻었고 retention time이 30분, 42분, 46분이었다. 자궁에선 F-1, F-2로 2개의 fraction이 30분, 48분에서 나왔고 고환도 30분, 44분에서 두개가 분리되었다. 또 다음 단계의 TSK 5PW HPLC에서도 더욱 정제된 1개의 분획들을 자기 얻었다. 그러나 뇌의 DEAE의 3개의 isozyme은 F-1이 Ryu 등이 정제한 PLC III에 해당하며 F-2는 PLC I과 II의 혼합형이란 걸 알 수 있다. 그것은 phenyl column에서 F-2는 F-2-I과 F-2-II로 분리 되었다.

자궁과 고환의 분리된 HPLC fraction은 각각 두개의 isozyme이 분리 되었으며 retention time은 F-1끼리는 동일 위치, F-2는 자궁에서 더욱 늦게 나왔다. 이들이 뇌의 PLC I, II 및 III와 homogeneity를 관찰하기 위하여 뇌의 PLC I, II 및 III의 Mab와 결합을 시킨 결과 Ab가 없는 대조에선 PLC가 affigel에 결합되는 정도가 8~12%였고 Ab 존재하에선 I, II는 90% 이상, III는 R-32-1이 73.8%로 약간 낮았으나 나머지는 모두 높은 결합능을 나타내었으며 Mab R 32-1은 native form이었기 때문이다. Mab-labeled affigel을 혼합하여 I, II, III 각각의 affigel column에서 각 fraction의 결합능으로 homogeneity의 관찰에선 자궁에서 DEAE F-1은 PLC III가 88.7%로 대부분이 III form이었고 DEAE F-2는 PLC II가 81.7%로 대부분이 II form이었다. Phenyl F-1-I에서 역시 III가 87.2%로 비슷하나 phenyl F-2-I에선 I, II의 비율이 비슷한 것으로 나타났다. 여기서 PLC I이 II보다 적게 결합한 것은 Ryu 등에 의한 I은 세포막에 결합된 형이 많으므로 homogeneity 정도가 낮은 것으로 사료된다. 아울러 고환에서도 DEAE F-1과 phenyl F-1-I은 PLC III의 homogeneity가 높으며 DEAE F-2와 phenyl F-2-I 역시 PLC II이 주이며 I은 소량 존재하는 것으로 생각된다. 이러한 연구는 자궁과 고환의 각 곡선에 대한 monoclonal Ab를 만들

고 단백질 및 DNA sequences를 해야 각 PLC의 구조 및 그 성질을 밝힐 수 있는 것으로 생각된다.

## 요 약

Phospholipase C는 second messenger로서 세포 밖의 signal transduction에 중요한 효소이다. 본 연구에서 소의 뇌, 자궁 및 고환에서 high performance liquid chromatography(HPLC)를 이용하여 phospholipase C(PLC)를 추출하였으며 뇌에서 3개의 isozyme(F-1, F-2, F-3), 자궁과 고환에서 각각 2개의 isozyme을 얻었고 HPLC에서의 retention time을 구하였다.

Homogeneity 검사를 위하여 소 brain의 각 isozyme I, II 및 III에 대한 PLC-monoclonal antibody(Mab)를 affigel에 label 시켰고 결합능(binding capacity)는 73.8~97.5%였다. PLC-Mab와 자궁 및 고환의 PLC isozyme과의 homogeneity 검사에서 binding capacity는 자궁의 F-1은 PLC III가 주이며 F-2는 DEAE column에서는 II가 주이나 phenyl column에선 I과 II가 주이고 고환에선 F-1은 PLC III가 주이고 F-2에서는 PLC II가 주인 것으로 나타났다.

## 참 고 문 헌

1. Banga, H. S., Walker, R. K., Winberry, L. K., and Rittenhouse, S. E.: Platelet adenylate cyclase and PLC are affected differentially by ADP-ribosylation. *Biochem. J.*, 252: 297-300, 1988.
2. Wang, P., Toyoshima, S., and Osawa, T.: Physical and functional association of cytosolic inositol-phospholipid-specific PLC of calf thymocytes with a GTP-binding protein. *J. Biochem.* 102: 1275-1287, 1987.
3. Chaudhry, A., Laychock, S. G., and Rubin, R. P.: The effects of fatty acids on phosphoinositide synthesis and myo-inositol accumulation in exocrine pancreas. *J. Biol. Chem.*, 262: 17426-17431, 1987.
4. Hawthorne, J. N.: Does receptor-linked phosphoinositide metabolism provide messengers mobilizing calcium in nervous tissue? *International Rev. Neurobiol.*, 28: 241-273, 1986.
5. Hofmann, S. L., and Majerus, P. W.: Modulation of phosphatidyl-inositol-specific phospholipase C activity by phospholipid interactions, diglycerides, and calcium ions. *J. Biol. Chem.*, 257: 14359-14364, 1982.
6. Rebecchi, M. J., and Rosen, O. M.: Purification of a PI-specific phospholipase C from bovine brain. *J. Biol. Chem.*, 262: 12526-12532, 1987.
7. Lapetina, E. G., and Reep, B. R.: Specific binding of [ $\alpha$ - $^{32}$ P] GTP to cytosolic and membrane-bound proteins of human platelets correlates with the activation of phospholipase C. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 84: 2261-2265, 1987.
8. Homma, Y., Imaki, J., Nakanishi, O., and Takenawa, T.: Isolation and characterization of two different forms of inositol phospholipid-specific phospholipase C from rat brain. *J. Biol. Chem.*, 263: 6592-6598, 1988.
9. Hakata, R. T., Kikawa, U., and Nishizuka, Y.: Inositol phospholipid turnover and protein kinase C in stimulus-response coupling. *Biochem. Society Transactions*, 15: 124-125, 1987.
10. Hofmann, S. L., and Majerus, P. W.: Identification and properties of two distinct phosphatidylinositol-specific phospholipase C enzymes from sheep seminal vesicular glands. *J. Biol. Chem.*, 257: 6461-6469, 1982.
11. Wilson, D. B., Bross, T. E., Hofmann, S. L., and Majerus, P. W.: Hydrolysis of polyphosphoinositides by purified sheep seminal vesicle phospholipase C enzymes. *J. Biol. Chem.*,

- 259 : 11718-11724, 1984.
12. Bennett, C. F., and Crooke, S. T. : Purification and characterization of a phosphoinositide-specific phospholipase C from guinea pig uterus. *J. Biol. Chem.*, 262 : 13789-13797, 1987.
  13. Rebecchi, M. J., and Rosen, O. M. : Purification of a phosphoinositide-specific phospholipase C from bovine brain. *J. Biol. Chem.*, 262 : 12526-12532, 1987.
  14. Lee, K. Y., Ryu, S. H., Suh, P. G., Choi, W. C., and Rhee, S. G. : Phospholipase C associated with particulate fractions of bovine brain. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 84 : 5540-5544, 1987.
  15. Ryu, S. H., Suh, P. G., Cho, K. S., Lee, K. Y., and Rhee, S. G. : Bovine brain cytosol contains three immunologically distinct forms of inositolphospholipid-specific phospholipase C. *J. Biol. Chem.*, 84 : 6649-6653, 1987.
  16. Bradford, M. M. : A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 49 : 248-254, 1976.
  17. Ryu, S. H., Cho, K. S., Lee, K. Y., Suh, P. G., and Rhee, S. G. : Two forms of phosphoinositide-specific phospholipase C from bovine brain. *Biophys. Biochem. Res. Comm.*, 141 : 137-144, 1986.
  18. Blackmore, P. F., Bocckino, S. B., Waynick, L. E., and Exton, J. H. : Role of a guanine nucleotide-binding regulatory protein in the hydrolysis of hepatocyte phosphoinositide 4, 5-biphosphate by calcium-mobilizing hormones and the control of cell calcium. *J. Biol. Chem.*, 260 : 14477-14483, 1985.
  19. Straub, R. E., and Gershengorn, M. C. : Thyrotropin-releasing hormone and guanosine triphosphate activate inositol triphosphate formation in membranes isolated from rat pituitary cells. *J. Biol. Chem.*, 261 : 2712-2717, 1986.
  20. Dawson, R. M. C., Freinkel, N., Jungalwala, F. B., and Clarke, N. : The enzymatic formation of myoinositol 1:2-cyclic phosphate from phosphatidylinositol. *Biochem. J.* 122 : 605-607, 1971.
  21. Banno, Y., Nakashima, S., and Nozawa, Y. : Partial purification of phosphoinositide-phospholipase C from human platelet cytosol : Characterization of its three forms. *Biophys. Biochem. Res. Comm.*, 136 : 713-721, 1986.
  22. Bennett, C. F., Mong, S., Liwu, H., Clark, M. A., Wheeler, L., and Crooke, S. T. : Inhibition of phosphoinositide-specific phospholipase C by manoalide. *Molecular Pharm.* 32 : 587 - 593. 1987.

— Abstract —

## Homogeneity of Phospholipase C of Bovine Uterus and Seminal Vesicle Compared with Brain Isozymes

Jung Hye .Kim and Ki Yung Lee

*Department of Biochemistry  
College of Medicine, Yeungnam University  
Taegu, Korea*

Sue Goo Rhee

*Department of Biochemistry  
National Institute of Health, Bldg. 3, Rm 203,  
Bethesda, MD 20892, U. S. A.*

Phosphoinositide-specific phospholipase C(PI-PLC) is a second messenger of signal transducer on cell membrane. In the previous study, PLC of bovine brain has been purified three isozymes. In this paper, uterus and seminal vesicle have been purified. Two peaks of PI-PLC activity were resolved when bovine uterus and seminal vesicle proteins were chromatographed on a DEAE and phenyl TSK 5PW HPLC column. Each two peak was compared with PI-PLC I, II and III from bovine brain and we got the retention time on HPLC.

The peak fractions with PLC activity were tested homogeneity with brain PLC monoclonal antibodies(Mab). Mab-labeled affigels were bounded in the range of 73.8%~97.5% with PLC I, II and III.

Homogeneity of fractions were revealed that DEAE F-1 and phenyl F-1· I were highest level of PLC III in uterus and seminal vesicle and DEAE F-2 and phenyl F-2· I were mixed PLC I and II.