

## 칠성장어 (*Lampetra japonica*) 조직내 젖산수소이탈효소 동위효소들의 이질성

조성규 · 염정주

청주대학교 이공대학 생물학과

칠성장어류를 제외한 모든 척추동물은 여러 유전자로 이루어진 젖산수소이탈효소(EC 1.1.1.27, Lactate dehydrogenase, LDH)를 지니고, 칠성장어류의 LDH는 cellulose acetate 및 starch gel 전기영동한 결과 단일 동위효소로 보고되어졌다.

그러나 본 실험에서 polyacrylamide gel 전기영동 방법에 의해서 칠성장어 (*Lampetra japonica*) 골격근, 심장 및 신장의 LDH는 3개의 동위효소, 간의 LDH는 2개의 동위효소로 분리되었다. Polyacrylamide gel isoelectric focusing (PAGE) 방법으로는 골격근과 심장의 LDH는 4개의 동위효소, 간의 LDH는 2개의 동위효소로 분리되었고, 골격근의 LDH는 chromatofocusing한 결과 4개의 LDH 동위효소로 분리되었다. 칠성장어 골격근 LDH 동위효소들은 Sphadex G-200 gel filtration 결과 분자량이 140,000 정도로 나타났다. 골격근, 심장 및 간조직 LDH 동위효소는 pyruvate에 의해 비슷한 정도로 저해되었으며 LDH A<sub>4</sub> 및 LDH B<sub>4</sub> 동위효소의 중간정도의 저해를 보여주었다. 그리고 심장, 간 및 골격근 LDH 동위효소는 열에 안정하였다. 상기의 결과들로부터 칠성장어 (*Lampetra japonica*)는 단일 동위효소가 아니라 동위효소들을 가지며 이 동위효소들을 이루는 각 하부단위체들의 구조는 유사하다고 사료된다.

**KEY WORDS: Lactate dehydrogenase, Lamprey (*Lampetra japonica*), Heterogeneity, PAGE, Chromatofocusing.**

척추동물의 젖산수소이탈효소(EC 1.1.1.27, Lactate dehydrogenase, LDH)의 *Ldh-A* 및 *Ldh-B* 두 유전자는 하부단위체 A 및 B로 이루어진 사차구조의 A<sub>4</sub>, A<sub>3</sub>B, A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>, AB<sub>3</sub> 및 B<sub>4</sub> 동위효소를 만들고(Cahn *et al.*, 1962; Markert, 1968), 이 동위효소들의 전기영동상은 뚜렷한 조직특이성을 나타낸다. 골격근같은 혐기적 조직에서는 A<sub>4</sub> 동위효소가 우세하게 존재하여 혐기적 조건에서 pyruvate가 lactate로 환원할 때 기능을 한다. 또한 심장과 뇌같은 호기적 조직에서는 B<sub>4</sub> 동위효소가 상대적으로 많이 존재하여 호기적 조건에서 lactate의 pyruvate로의 산화과정에 관여한다(Wilson *et*

*al.*, 1964). LDH 동위효소의 제3의 유전자인 *Ldh-C*의 경우 포유류 및 조류는 정소에서만 발현되고(Blanco and Zinkham, 1963; Goldberg, 1972), 경골어류는 망막과 뇌같은 신경조직(Whitt, 1970)과 간조직에서 발현되며(Sensabaugh and Kaplan, 1972; Whitt *et al.*, 1975; Frankel, 1980), 연골어류 철갑상어는 심장, 아가미, 간, 비장 및 생식소에서 발현되어(Whitt, 1970) 조직발현이 조절되지 않는 경우도 보고되었다(Kettler and Whitt, 1986; Kim and Yum, 1989). 척추동물 LDH 유전자의 진화에 관하여는 척추동물의 초기생명체에서 *Ldh-A*와 *Ldh-B*가 만들어졌고, 그 후 유전자복제에 의해 *Ldh-C*가 만들어졌다는 견해가 일반적이었다(Markert *et al.*, 1975; Whitt *et al.*, 1975). 그러나 이 견해

본 연구는 1990년도 한국학술진흥재단 자유공모과제 연구지원으로 이루어진것임.

는 최초로 만들어진 유전자가 *Ldh-C*이며 이 유전자가 복제되어 *Ldh-A* 및 *Ldh-B*가 만들어졌다는 연구가 제시되면서(Baldwin and Lake, 1987; Baldwin *et al.*, 1988) 의문이 제기되었다.

척추동물중 계통유전학적으로 가장 빠르게 분기된 원시무악어류인 칠성장어는 LDH 연구에 계통학상 중요한 위치를 차지한다. 현존하는 칠성장어 세가지 과의 LDH는 모든 조직에서 단일 LDH 동위효소를 지니는 유일한 척추동물이다. 칠성장어(*Petromyzon marinus*)의 LDH는 역학실험결과 LDH-A에 가장 유사하여 조상유전자로 보고되었으나(Wilson *et al.*, 1964), 칠성장어(*Lampetra planeri*)의 LDH는 *Ldh-A*, *Ldh-B* 두 개의 유전자중 한 개의 유전자가 불활성화되거나 상실되고 남은 한 개의 유전자에 의해 발현된 단일 동위효소로 affinity chromatography상에서 LDH-A의 성질과 유사하게 행동하고 기질에 대한 억제 정도는 LDH-B와 유사하여 척추동물 LDH A<sub>4</sub> 동위효소와 LDH B<sub>4</sub> 동위효소의 중간 특성을 나타내는 것으로 보고되었다(Dell'Agata *et al.*, 1988). 따라서 본 연구는 칠성장어(*Lampetra japonica*)의 LDH를 전기영동, isoelectric focusing, chromatofocusing, gel filtration, 열에 대한 안정성 및 정제된 LDH A<sub>4</sub>, B<sub>4</sub> 및 C<sub>4</sub> 동위효소들과의 기질의존성을 비교하여 칠성장어 LDH의 특성을 규명하고자 실시하였다.

## 재료 및 방법

### 실험재료

칠성장어(*Lampetra japonica*)는 강원도 인제군 오색에서 채집하였으며, acrylamide, N, N'-methylene-bis-acrylamide, nitro blue tetrazolium(NBT), phenazine methosulfate(PMS), nicotinamide adenine dinucleotide(NAD), NAD reduced form(NADH), bovine serum albumin(BSA),

pharmalyte는 Sigma 제품을, Sephadex G-200, polybuffer 74, polybuffer exchanger 94(PBE 94)는 Pharmacia 제품을 사용하였다.

### 전기영동

각 조직은 적출한 후 증류수로 여러번 씻어 혈액을 충분히 제거한 후 4°C로 유지시킨 0.1M potassium phosphate buffer(pH 6.85)를 3배(V/W) 가한 다음 얼음에 채운 glass homogenizer로 파쇄하였으며, 이 용액을 4°C, 20,000g refrigerated centrifuge(Hitachi 20 PR-52D)에서 1시간씩 2번 원심분리하여 얻은 상등액을 시료로 사용하였다.

Cellulose acetate 전기영동은 Park과 Cho(1972)의 방법에 의해 cellulose acetate gel(Millipore)상에서 barbital buffer(pH 8.6,  $\mu$  0.075)를 사용하여 100V 정전압 하에서 1시간 전기영동 후 Whitt(1970)의 방법을 사용하여 LDH 염색을 하고, 3% 초산용액에 고정시켰으며 laser densitometer(LKB 2202)를 사용하여 densitogram을 얻었다.

Polyacrylamide gel 전기영동은 Laemmli(1970)의 방법에 의해 thermostatic circulator(LKB 2219)를 사용하여 4°C로 유지시킨 polyacrylamide vertical slab system(LKB 2001)으로 실시하였다. 7.5% acrylamide separation gel과 2.5% acrylamide stacking gel이 되도록 slab gel을 만들고, 시료에는 50% sucrose와 0.05% bromophenol blue용액을 1:1(V/V)로 가하였다. Tris-glycine buffer(pH 8.3)를 사용하여 200V에서 30분간 전개시킨 후 300V에서 3시간 30분 동안 전기영동하였다. 효소 염색은 Whitt(1970)의 방법에 의해 DL-Lactate, NBT, PMS 및 NAD<sup>+</sup> 혼합 용액에 gel을 넣어 37°C에서 염색 한 후 15% 초산 용액내에서 고정시켰다.

### 동위효소의 활성측정 및 단백질 정량

LDH 동위효소의 활성은 1.50mM pyruvate

와 0.13mM NADH를 함유한 0.1M potassium phosphate buffer(pH 6.85) 3ml에 시료를 가한 다음 NADH로부터 NAD<sup>+</sup>로 전환되는 정도를 spectrophotometer (Hitachi 200-20)로 25°C, 340nm에서 측정하였다. 활성의 단위는 1분 동안 감소되는 optical density 1.0을 1 unit로 하였다.

단백질의 농도는 Lowry등(1951)의 방법에 따라 측정하였으며, 이 때 BSA를 표준단백질로 사용하여 500nm에서 흡광도를 측정하고 표준곡선을 작성하여 정량하였다.

#### Isoelectric focusing

Vertical polyacrylamide rod gel isoelectric focusing(PAGIEF)은 40% pharmalyte(pH 3-10, Sigma), 0.23% TEMED, 0.1% ammonium persulfate를 포함하는 4% acrylamide rod gel을 만들고 10% sucrose를 함유한 2% ampholine solution(overlay sol.)을 rod gel위에 가한 후, 40% sucrose를 함유한 칠성장어 골격근, 심장 및 간조직 시료를 gel 상부에 가하였다. 음극에는 0.04M NaOH 용액을 넣고, 양극에는 0.01M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 용액을 부어 2mA/tube의 정전류에서 40분간 460V에서 20시간 동안 전기영동을 실시하였다. PAGIEF 후 시료를 가한 rod gel만 LDH 염색을 실시하고 염색하지 않은 gel은 pH gradient를 측정하기 위하여 3mm 간격으로 pH를 측정한 후 이동거리에 대한 표준곡선을 만들었으며, PAGIEF 후 LDH 동위효소의 이동거리를 측정 표준곡선에 의하여 pI를 정하였다. 전기영동 후 효소염색은 polyacrylamide gel 전기영동과 동일하게 염색을 실시하였다.

#### Chromatofocusing

Chromatofocusing gel PBE 94 (Pharmacia)는 0.025M imidazole-HCl buffer(pH 7.4)를 사용하여 bed volume 15배로 column(10 × 300mm)에 채우고 느리게 평형시켰다. 칠성장어 LDH 30mg을 포함하는 평형 buffer 2ml를 가하고, 1:8로 희석한

polybuffer 74-HCl(0.0075mM, pH 4.0)을 9.5cm/h의 유속으로 bed volume의 14배 정도 계속 유입하여 pH 7-4의 구배를 형성하였다. 용출액은 1ml씩 분획하여 280nm에서 단백질 흡광도를 측정하고 효소활성 및 pH를 측정하여 elution profile을 작성하였다.

#### Sephadex G-200 gel filtration chromatography

칠성장어 골격근 추출액 0.5ml와 소 심장 추출액 0.5ml의 혼합용액을 0.1M potassium phosphate buffer(pH 6.85)로 평형시킨 Sephadex G-200 column(15 × 210mm)에 가한 후 0.1M potassium phosphate buffer(pH 6.85)를 계속 유입하였다. 용출액은 2ml씩 분획하여 전기영동 및 동위효소 활성을 측정하여 elution profile을 작성하였다.

#### LDH의 기질의존성 및 열안정성 측정

LDH 동위효소의 기질농도에 의한 효소활성 저해정도를 알아보기 위해 칠성장어 골격근, 심장 및 간조직 LDH 동위효소와 정제된 LDH A<sub>4</sub>, B<sub>4</sub> 및 C<sub>4</sub> 동위효소(Cho *et al.*, 1993)를 각각 pyruvate 농도 100 μM에서 10mM까지 증가시키면서 활성의 변화를 측정하였다.

칠성장어 골격근, 심장 및 간조직 추출액을 각각 50°C에서 5, 10, 20, 30, 40, 50 및 60분간 열처리한 후, 4°C에서 1시간 동안 방치하였다. 4°C, 20,000g에서 1시간 동안 원심분리한 후 얻은 상등액을 시료로 사용하여 LDH 활성을 측정하였다.

## 결과 및 고찰

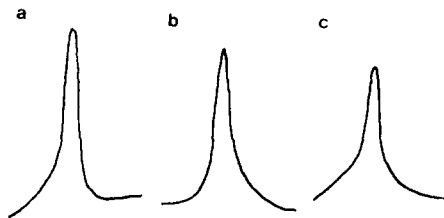
#### LDH 동위효소의 전기영동상

칠성장어류 *Petromyzon marinus*와 *Lampetra lamottei*의 LDH는 starch gel 전기영동 결과 한 가지 하부단위체로 구성된 한 개의 동위효소로 보고되었다(Markert *et al.*, 1975). *Petromyzon marinus*, *Mordacia*

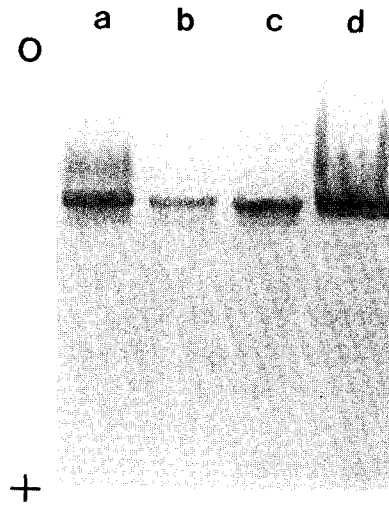
*mordax* 및 *Geotria australis*(Baldwin *et al.*, 1987)와 *Lampetra planeri*(Dell'Agata *et al.*, 1988)의 LDH 경우에도 cellulose acetate 전기영동상에서 한 개의 동위효소로 확인되었다. 본 실험에서 칠성장어(*Lampetra japonica*)의 골격근, 심장 및 간 조직에 존재하는 LDH는 cellulose acetate 전기영동한 결과 모든 조직에서 단일 동위효소가 나타나 Dell'Agata등(1988)의 결과와 일치하였다(Fig. 1). 그러나, polyacrylamide gel 전기영동한 결과 골격근, 심장 및 신장조직에서는 세 개, 간조직에서는 두 개의 동위효소가 나타났으며 음극쪽에 위치한 동위효소가 강한 활성을 보였다(Fig. 2).

칠성장어 골격근, 심장 및 간조직의 LDH 동위효소 활성을 측정된 결과 세 조직이 거의 유사함이 확인되었다(Table 1). 이 결과는 골격근조직의 효소 활성이 크게 나타나는 모래무지(Kim and Yum, 1989), 간조직의 효소활성이 가장 크고 심장, 골격근조직의 순서로 나타나는 연어(Gesser and Sundell, 1971) 및 간조직의 활성이 가장 크게 나타나는 척추동물(Scrutton and Utter, 1968)과 차이가 있었다.

칠성장어의 골격근, 심장 및 간조직의 LDH 동위효소를 분리하기 위해 vertical polyacrylamide rod gel isoelectric focusing을 실시하였다. 골격근조직에서는 음극쪽에서부터 pI 4.80, 4.85, 4.95, 5.05로 측정된 네 개의 동위효소가 확인되었고, 심장조직에서는 골격근조직과 마찬가지로 네 개의 동위효소가 나타났으나 pI 4.25, 4.32, 6.76, 6.85로 골격근과 다르게 확인되었으며 간조직에서는 pI 7.55, 7.63인 두



**Fig. 1.** Densitograms of LDH isozyme in tissue extracts of *Lampetra japonica* by cellulose acetate electrophoresis. a, skeletal muscle; b, heart; c, liver.



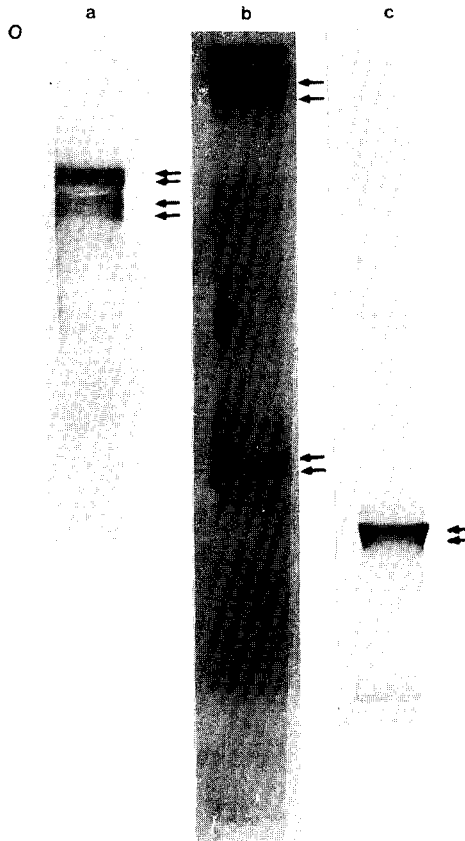
**Fig. 2.** Polyacrylamide gel electrophoresis of LDH isozymes in *Lampetra japonica*. a, skeletal muscle; b, heart; c, kidney; d, liver.

**Table 1.** LDH of tissue extracts in *Lampetra japonica*.

Tissue	Activity(unit)	Protein(mg)	Specific activity (unit/mg)
	Wet tissue(g)	Wet tissue(g)	
Skeletal muscle	480	84	5.71
Heart	465	112	4.15
Liver	465	135	3.44

개의 동위효소가 확인되었다(Fig. 3). 그러므로 *Mordacia mordax*, *Geotria australis*의 LDH를 pH 3.5-10에서 thin layer agarose gel isoelectric focusing 한 결과 한개의 동위효소라는 보고(Baldwin *et al.*, 1987)와 다르게 나타났다.

Polyacrylamide gel 전기영동한 결과 골격근, 심장, 및 간조직에서 세 개 및 두 개의 동위효소가 확인되어 조직특이성이 나타나지 않았으나 IEF결과 네 개의 동위효소가 확인되므로 조직간의 기능면에서의 차이를 나타내며, 한 개 이상의 유전자가 발현된 것으로 볼 수 있다. 그러나 유전자의 분화정도가 미약한 상태이므로 발현된 하부단위체가 서로 유사하여 polyacrylamide gel 전기영동에서 유사하게 나타난 것으로 사료된다.



**Fig. 3.** Lactate dehydrogenase isozymes in *Lampetra japonica* tissue extract separated by PAGIEF in a gradient of pH 3-10. a, skeletal muscle; b, heart; c, liver.

**Chromatofocusing**

칠성장어 골격근의 LDH 동위효소는 polybuffer exchanger 94 column으로 chromatofocusing을 실시하여 elution profile을 작성하였다. 칠성장어 골격근에 존재하는 LDH를 제외한 나머지 단백질들은 pH 7.0부터 pH 6.0사이의 용출액에 대부분 존재하였고, LDH 동위효소는 pH 5.2, 5.1, 5.0, 4.8의 분획에서 확인되었다(Fig. 4). 따라서 칠성장어 골격근에 존재하는 LDH 동위효소는 pI 5.2, 5.1, 5.0, 4.8을 지니는 네 개의 동위효소로 확인되었다. 그러므로 칠성장어 골격근에는 pI 5.05, 4.95, 4.85, 4.8인 네 개의 동위효소가 존재한다는 PAGIEF 결과와 유사하였다. 따

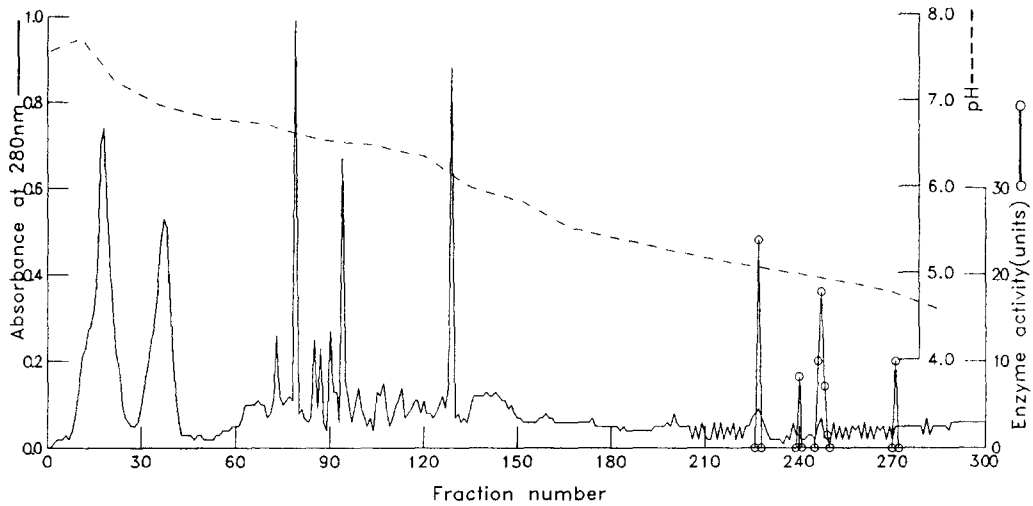
라서 칠성장어는 *Ldh-A*와 *Ldh-B*가 발현된다고 생각되어진다.

**Sephadex G-200 gel filtration chromatography**

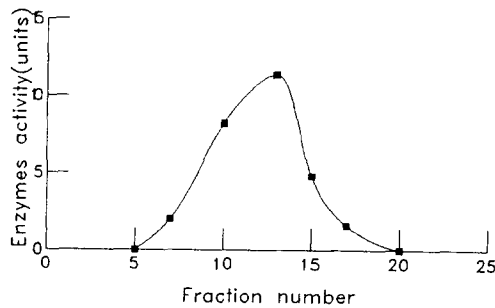
칠성장어 LDH 동위효소의 분자량을 측정하기 위하여 분자량이 140,000정도인 소 심장 LDH 동위효소(Pesce *et al.*, 1964)와 칠성장어 골격근 LDH 동위효소를 혼합한 다음 Sephadex G-200 chromatography하여 분획을 얻었다. 각 분획은 LDH 활성을 측정하여 elution profile을 작성하였으며(Fig. 5), LDH 활성이 크게 나타난 분획은 polyacrylamide gel 전기영동한 후 densitogram을 얻었다(Fig. 6). 칠성장어 골격근 LDH 동위효소는 소 심장 LDH 동위효소와 같은 분획에 용출됨이 확인되어 하부단위체 분자량이 약 35,000이고 사량체 분자량이 140,000정도임을 확인할 수 있으므로 대부분의 경골어류 LDH 동위효소 분자량과 유사하였다(Rehse and Davidson, 1986). 척추동물의 LDH 동위효소의 분자량은 종에 따라 약간의 차이는 있지만 140,000정도이고(Pesce *et al.*, 1967; Kim and Yum, 1989), 하등척추동물인 칠성장어도 분자량이 유사하므로 LDH는 진화상 분자량을 비교적 안정하게 유지하여 왔음을 나타낸다.

**LDH의 기질의존성**

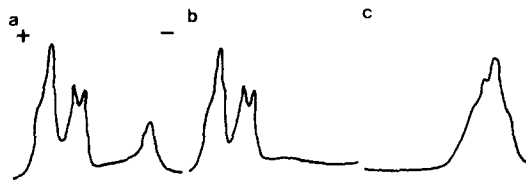
LDH 동위효소들의 생리화학적 역할이 다른 경우, 이는 역학적 특성의 차이에 의한 것으로(Heck, 1969) LDH 동위효소들은 pyruvate에 의한 저해반응이 서로 다르게 나타난다(Pesce *et al.*, 1964; Sidell and Beland, 1980). 근육 같은 혐기적 조직에 많이 존재하는 LDH A<sub>4</sub> 동위효소는 고농도의 pyruvate에 의해서 약간 저해되지만, 심장 및 뇌 같은 호기적 조직에 많은 LDH B<sub>4</sub> 동위효소는 저농도의 pyruvate에서도 저해되며 아주 낮은 기질농도에서 pyruvate를 lactate로 환원할 때 효과적이다(Markert and Ursprung, 1962; Kaplan and Goodfriend, 1964; Whitt,



**Fig. 4.** Chromatofocusing of LDH isozyme in *Lampetra japonica* skeletal muscle on a column of PBE 94. Column: 10 × 300mm. Sample: 2ml start buffer containing *Lampetra japonica* LDH(30mg). Elution conditions: start buffer 0.025M imidazole-HCl, pH 7.4; elution buffer 0.0075mmol/pH unit/ml polybuffer 74, pH 4.0. Flow rate: 9.5cm/h.



**Fig. 5.** Gel filtration of LDH isozymes in the mixture of *Lampetra japonica* skeletal muscle extract and bovine heart extract on a Sephadex G-200 column (15 × 210mm).



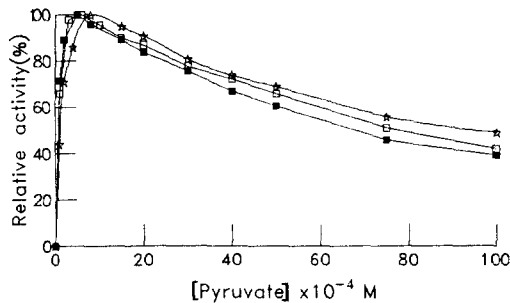
**Fig. 6.** Densitograms of LDH isozymes. a, fraction 13 after the gel filtration (Fig. 5); b, *Bos taurus* heart LDH isozymes; c, *Lampetra japonica* skeletal muscle LDH isozymes.

1970). LDH 동위효소의 조직특이성과 기질 농도에 따른 저해형과의 비교 연구는 산소 유효성과 관련된 대사적 체제를 조절하는데 중요한 역할을 한다(Sidell and Beland, 1980).

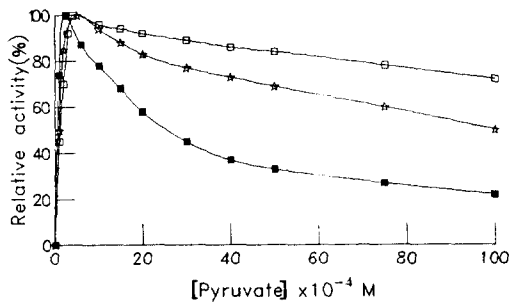
본 실험에서 칠성장어 골격근, 심장 및 간조직의 LDH 동위효소는 기질의존성을 측정 한 결과, 10mM pyruvate에서 칠성장어 골격근은 42%, 심장은 40%, 간조직은 48%의 활성이 남아 있는 결과를 얻었다(Fig. 7). Affinity chromatography 및 DEAE-Sephacel chromatography에 의해 정제된 LDH A<sub>4</sub>, B<sub>4</sub> 및 C<sub>4</sub> 동위효소의 기질의존성을 측정 한 결과 10mM pyruvate에서 LDH A<sub>4</sub>는 72%, LDH C<sub>4</sub>는 50%, LDH B<sub>4</sub>는 22%의 활성이 남아 있었다. 따라서 LDH A<sub>4</sub>는 pyruvate에 의한 저해정도가 가장 낮으며, LDH B<sub>4</sub>는 저해정도가 가장 높아서 저농도의 pyruvate에서도 저해됨을 보여 주었고, LDH C<sub>4</sub>의 저해정도는 LDH A<sub>4</sub>와 LDH B<sub>4</sub>의 중간 정도로 나타났다(Fig. 8). 또한 Pyruvate 10mM에서 *Pseudophycis barbata*의 LDH A<sub>4</sub>는 87%, LDH C<sub>4</sub>는 66%, LDH B<sub>4</sub>는 55%의 활성을 나타내어 (Baldwin *et al.*, 1988) 본 실험 결과와 동위효소에 대한 기질 저해형은 유사하지만 활성의

저해정도가 다르게 나타났다. 칠성장어류를 비교할 경우 *Petromyzon marinus*의 골격근 LDH 동위효소는 97%, *Geotria australis*의 골격근 LDH 동위효소는 75%, *Mordacia mordax*의 골격근 LDH 동위효소는 70%의 활성이 나타났고(Baldwin *et al.*, 1987), *Lampetra planeri*의 골격근 LDH 동위효소는 7mM pyruvate에서 55%로 토끼의 하부단위체 A 보다는 하부단위체 B와 같이 행동하는 것으로 보고되었다(Dell'Agata *et al.*, 1988). 또한 대서양산 먹장어(*Myxine glutinosa*)는 10mM pyruvate에서 LDH A<sub>4</sub>는 81%, LDH B<sub>4</sub>는 48%의 활성이 남아있어 저산소 환경에 적

응되어 골격근과 심장의 기능이 분화가 되지않은 때문이라 보고 하였으며(Sidell and Beland, 1980), *Eptatretus cirrhatus*는 LDH A<sub>4</sub> 100%, LDH B<sub>4</sub> 81%의 활성을 나타내었다(Baldwin *et al.*, 1989). 그리고, 뱀어(*Channichthys rhinoceratus*)의 골격근과 심장의 LDH는 전기영동 결과 이동거리가 동일한 한 개의 동위효소이며, 10mM pyruvate에서 골격근이 65%, 심장이 60%의 활성으로 저해정도가 유사하였다. 이는 송어의 골격근 70%, 심장 40%의 활성과 비교할 때 골격근과 유사한 결과로써 하등척추동물의 심장이 저산소 환경에 적응됨으로써 나타난 결과라고 보고된 바 있다(Feller *et al.*, 1991). 본 실험의 칠성장어 골격근, 심장 및 간조직의 LDH 동위효소는 40-48%로 칠성장어류인 *P. marinus*, *M. mordax* 및 *G. australis* 세 종의 LDH 동위효소와는 다르게 저해정도가 크지만 조직특이성은 크게 나타나지 않았다. 이러한 결과는 칠성장어 LDH 동위효소들이 분화가 덜 이루어져 있으며, LDH A<sub>4</sub>와 B<sub>4</sub> 동위효소 저해형의 중간형을 보임으로써 *Ldh-A*와 *Ldh-B*가 모두 발현된 것으로 사료된다.



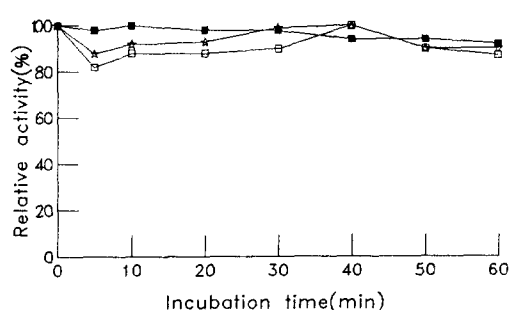
**Fig. 7.** Effect of pyruvate concentrations on the activity of the LDH isozyme of *Lampetra japonica*. Liver extract ★-★, Skeletal muscle extract □-□, Heart extract ■-■.



**Fig. 8.** Effect of pyruvate concentrations on the activity of the LDH isozymes. *Coreoperca herzi* LDH A<sub>4</sub> □-□; *Bos taurus* LDH B<sub>4</sub> ■-■; *Gadus macrocephalus* LDH C<sub>4</sub> ★-★.

**LDH의 열안정성**

열에 대한 안정성은 LDH 동위효소를 비교하는 요소로써 대부분의 척추동물에서 LDH B<sub>4</sub> 동위효소는 LDH A<sub>4</sub> 동위효소 보다 열에 더욱 안정하다(Shaklee *et al.*, 1973; Coppes *et al.*, 1987; Kim and Yum, 1989). 본 실험은 칠성장어 골격근, 심장 및 간조직을 50°C에서 각각 5, 10, 20, 30, 40, 50 및 60분간 열처리한 후 LDH 활성을 측정하였다. 그 결과 조직에 따라 큰 차이가 없이 세조직 모두 열에 안정하였다(Fig. 9). 민어과에 속하는 세 종의 어류를 50°C에서 열처리 시간을 2분에서 60분까지 변화시켜 LDH 활성을 측정한 결과 *Cynoscion striatus* 골격근은 30분간 열처리한 경우 LDH 활성이 완전히 없어졌고, 심장과 눈조직은 60분간 열처리 해도 50% 이상 활성이 남아있고 심장이 눈 보다 더 높은 활성을 나타내



**Fig. 9.** Thermal inactivation of LDH isozymes from *Lampetra japonica* skeletal muscle, heart and liver extracts at 50°C in 0.1M potassium phosphate buffer, pH 6.85. Skeletal muscle □-□; Liver ★-★; Heart ■-■.

었다. *Micropogonias furnieri*와 *Macrodon ancylodon*의 경우도 심장이 가장 안정하였고, 눈 및 골격근의 순서로 열에 안정하였는데 (Coppes *et al.*, 1987), 이는 본 실험 결과 세 조직 모두 열에 안정하지만 미소한 차이를 나타낸 조직별 순서와 일치하였다. 따라서 칠성장어 LDH 동위효소는 Polyacrylamide gel 전기영동 결과 (Fig. 2)처럼 조직특이성이 크게 나타나지 않지만 조직에 따라 동위효소의 구성비율이 약간 차이가 있으므로 열에 대한 안정성의 정도가 약간의 차이를 나타낸 것으로 생각되며, 그 하부단위체들의 열에 대한 성질이 유사하다고 생각된다.

이러한 결과들은 칠성장어 LDH가 단일 동위효소가 아니고 동위효소들로 이루어졌으며, 그 하부단위체들의 구조는 고등동물에 비해 분화가 덜되어 생화학적 특성이 유사하게 나타난 것으로 사료된다.

### 인용문헌

- Baldwin, J. and P.S. Lake, 1987. Lactate dehydrogenase homopolymer of hagfish heart and the single lactate dehydrogenase of lampreys display greater immunochemical similarity to LDH C<sub>4</sub> than to LDH B<sub>4</sub> of teleost fish. *J. Exp. Zool.* **242**: 99-102.
- Baldwin, J., P.S. Lake and T.W. Moon, 1987. Immunochemical evidence that the single lactate dehydrogenase of lampreys is more similar to LDH B<sub>4</sub> than LDH A<sub>4</sub> of hagfish. *J. Exp. Zool.* **241**: 1-8.
- Baldwin, J., W. Davison and M.E. Forster, 1989. Properties of the muscle and heart lactate dehydrogenase of the New Zealand hagfish. *Eptatretus cirrhatus*: Functional and evolutionary implication. *J. Exp. Zool.* **250**: 135-139.
- Baldwin, J., K. Mortimer and A. Patak, 1988. Do ascidians possess the ancestral subunit type of vertebrate lactate dehydrogenase? *J. Exp. Zool.* **246**: 109-114.
- Blanco, A. and W.H. Zinkham, 1963. Lactate dehydrogenase in human testes. *Science* **139**: 601-602.
- Cahn, R.P., N.O. Kaplan, L. Levine and E. Zwilling, 1962. Nature and development of lactate dehydrogenase. *Science* **136**: 962-969.
- Cho, S.K., S.Y. Park and J.J. Yum, 1993. Purification and immunochemistry of lactate dehydrogenase in *Lampetra japonica*. *in preparation*.
- Coppes Z.L., M.L.B. Schwantes and A.R. Schwantes, 1987. Adaptive features of enzymes from family Sciaenidae-. Studies on lactate dehydrogenase (LDH) of fishes from the south coast of Uruguay. *Comp. Biochem. Physiol.* **88B**: 1005-1012.
- Dell'Agata, M.G. Pannunzio, A. Teichner and A. Ferracin, 1988. Lactate dehydrogenase from *Lampetra planeri* is composed of chains of unique type which show intermediate properties between the heart and the muscle isozymes of vertebrates. *Comp. Biochem. Physiol.* **89B**: 323-327.
- Feller, G., J.-P. Pauly, A. Smal, P. O'Carra and C. Gerday, 1991. The lactate dehydrogenase of the icefish heart: biochemical adaptations to hypoxia tolerance. *Biochem. Biophys. Acta.* **1079**: 343-347.
- Frankel, J.S., 1980. Lactate dehydrogenase isozymes of the leopard danis, *Brachydanio nigrofasciatus*: their characterization and ontogeny. *Comp. Biochem. Physiol.* **67B**: 133-137.
- Gesser, H. and L.-E. Sundell, 1971. Functional aspects of lactate dehydrogenase isozymes of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Int. J. Biochem.* **2**: 462-472.
- Goldberg, E., 1972. Amino acid composition and properties of crystalline lactate dehydrogenase X from mouse testes. *J. Biol. Chem.* **247**: 2044-2048.
- Heck, H. d'A., 1969. Porcine heart lactate dehydrogenase. Optical rotatory dispersion, thermodynamics, and kinetics of binding reactions. *J. Biol. Chem.* **244**: 4375-4381.
- Kaplan, N.O. and T.L. Goodfriend, 1964. Role of the two types of lactic dehydrogenase. *Advan. Enzyme Regulation* **2**: 203-212.



- Kettler, M.K. and G.S. Whitt, 1986. An apparent progressive and recurrent evolutionary restriction in tissue expression of a gene, the lactate dehydrogenase-C gene, within a family of bony fish (Salmoniformes: Umbridae). *J. Mol. Evol.* **23**: 95-107.
- Kim, M.O. and J.J. Yum, 1989. Purification, kinetics and immunochemistry of two homotetrameric lactate dehydrogenase isozymes in *Pseudogobio esocinus* (Cypriniformes). *Korean J. Zool.* **32**: 420-428.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T<sub>4</sub>. *Nature* **227**: 680-685.
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall, 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
- Markert, C.L., 1968. The molecular basis for isozymes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **151**: 14-40.
- Markert, C.L., J.B. Shaklee and G.S. Whitt, 1975. Evolution of a gene. *Science* **189**: 102-114.
- Markert, C.L. and H. Ursprung, 1962. The ontogeny of isozyme patterns of lactate dehydrogenase in the mouse. *Dev. Biol.* **5**: 363-381.
- Park, S.Y. and D.H. Cho, 1972. Separation of dehydrogenase isozymes by cellulose acetate electrophoresis. *Korean J. Zool.* **15**: 101-104.
- Pesce, A., T.P. Fondy, F. Stolzenbach, F. Castillo and N. O. Kaplan, 1967. The comparative enzymology of lactic dehydrogenase. III Properties of the H<sub>4</sub> and M<sub>4</sub> enzymes from a number of vertebrates. *J. Biol. Chem.* **242**: 2151-2167.
- Pesce, A., R.H. McKay, F. Stolzenbach, R.D. Cahn and N.O. Kaplan, 1964. The comparative enzymology of lactate dehydrogenase. I. Properties of the crystalline beef and chickens enzymes. *J. Biol. Chem.* **239**: 1753-1761.
- Rehse, P.H. and W.S. Davison, 1986. Evolutionary relationship of a fish C type lactate dehydrogenase to other vertebrate lactate dehydrogenase isozymes. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **43**: 1041-1051.
- Scrutton, M.C. and M.F. Utter, 1968. The regulation of glycolysis and gluconeogenesis in animal tissues. *Rev. Biochem.* **37**: 249-302.
- Sensabaugh, G.F. and N.O. Kaplan, 1972. A lactate dehydrogenase specific to the liver of gadoid fish. *J. Biol. Chem.* **247**: 585-593.
- Shaklee, J. B., K.L. Kepes and G.S. Whitt, 1973. Specialized lactate dehydrogenase isozymes: the molecular and genetic basis for the unique eye and liver LDHs of teleost fishes. *J. Exp. Zool.* **185**: 217-240.
- Sidell, B.D. and K.F. Beland, 1980. Lactate dehydrogenase of Atlantic Hagfish : physiological and evolutionary implication of a primitive heart isozyme. *Science* **207**: 769-770.
- Whitt, G.S., 1970. Developmental genetics of the lactate dehydrogenase isozymes of fish. *J. Exp. Zool.* **175**: 1-36.
- Whitt, G.S., J.B. Shaklee and C.L. Markert, 1975. Evolution of the lactate dehydrogenase isozymes of fishes. In: *Isozymes: Genetics and Evolution* (Edited by Markert C.L.), *Academic Press. N.Y.* 381-400.
- Wilson, A.C., N.O. Kaplan, L. Levine, A. Pesce, M. Reichlin and W.S. Allison, 1964. Evolution of lactic dehydrogenase. *Fed. Proc.* **23**: 1258-1265.

(Accepted April 20, 1993)

---

**Heterogeneity of Lactate Dehydrogenase Isozymes in tissues of *Lampetra japonica***

Sung Kyu Cho and Jung Joo Yum (Department of Biology, Chongju University, Chongju 360-764, Korea)

All vertebrates other than lampreys exhibit multiple loci encoding lactate dehydrogenase (EC 1.1.1.27, LDH). From the result shown by cellulose acetate and starch gel electrophoresis, the lampreys were reported to have only one isozyme.

However in our results the LDH of skeletal muscle, heart and kidney in *Lampetra japonica* were separated into three isozymes and that of liver was separated into two isozymes by polyacrylamide gel electrophoresis.

The LDH of skeletal muscle and heart were separated into four isozymes and that of liver was separated into two isozymes by polyacrylamide gel isoelectric focusing (PAGE). The LDH of skeletal muscle were separated into four isozymes through the chromatofocusing. The molecular weight of LDH isozymes in skeletal muscle was approximately estimated to be 140,000 by Sephadex G-200 gel filtration. The LDH isozymes of skeletal muscle, heart and liver were inhibited by pyruvate to the nearly similar degree. And the degree of inhibition by pyruvate showed the value between LDH A<sub>4</sub> and LDH B<sub>4</sub> isozyme. And the LDH isozymes in heart, liver and skeletal muscle were thermostable.

The results mentioned above indicate that the LDH isozyme in lamprey (*Lampetra japonica*) has not one isozyme but isozymes. And it is also found out that the two structures of their subunits are similar each others.