

흰쥐 간에서의 카드뮴 결합 고분자량 단백질의 분리 및 정제(I)

천기정* · 김봉희*

*한국원자력연구소 기초과학실, 충남대학교 약학대학

(Received July 11, 1994)

Isolation and purification of Cd-binding high molecular weight protein in rat liver(I)

Ki-Jung Chun* and Bong-Hee Kim*

*Korea Atomic Energy Research Institute, College of Pharmacy, Chung Nam National University

Abstract—We isolated two Cd-binding high molecular weight proteins from intraperitoneally cadmium injected rat liver. Molecular weight of Cd-BP(I) purified from Sephacryl S-100 and DEAE Sepharose column chromatography and Cd-BP(II) purified from DEAE Sepharose column chromatography and Sulphonyl Sepharose column chromatography was 33,000 and 18,400, respectively. Alcohol dehydrogenase and alkaline phosphatase activities were not detected from two purified proteins.

Keywords □ Cd-binding high molecular weight proteins, Sephacryl S-100, DEAE Sepharose, Sulphonyl Sepharose, Column chromatography, Alcohol dehydrogenase, Alkaline phosphatase.

카드뮴은 지구상 mineral의 natural compound이므로 직접적으로나 food chain에 의해 living organism에 흡수되는 것을 피할 수 없다. 더욱이 이원소는 사람에게 있어 10~30년의 긴 생물학적 반감기를 갖고 있는 가장 독성이 높은 환경오염원으로 알려져 있으며¹⁾ accumulative cytotoxic heavy metal로 알려져 있다.²⁾ 특히 일본에서 1946년 Jintsu강으로부터 카드뮴을 경구섭취해서 Ita-Itai병을 일으키는 것이 처음 밝혀졌다.³⁾ 그러나 독성에 대한 기작은 아직도 모르며 주요한 카드뮴의 표적기관은 liver, kidney 및 testis이다.⁴⁾ Target organ에 흡수되거나 축적된 카드뮴은 대개 cysteine이 풍부한 low molecular weight heavy metal binding protein인 metallothionein (MT)와 결합되며 MT에 결합된 카드뮴은 이 단백질과 chelate⁵⁾ 되어 non-toxic form으로 된다고 알려져 있다.^{5,6)} 이와 같이 세포에서 MT와 결합되지 않은 카드뮴은 카드뮴의 독성형이라 설명할 수 있다. 간이나

다른 기관에서의 soluble fraction에서의 free 카드뮴 이온은 *in vitro*에서 아연을 함유한 MT가 존재하지 않던가 혹은 이미 카드뮴과 결합되었을 때 high molecular weight protein(HMWP)과 더 잘 결합되며, 고분자량의 단백질과 결합된 카드뮴은 또한 MT가 생성되기 전 카드뮴 이온을 주사한 후나 혹은 카드뮴의 biosynthetic capacity이상으로 축적된 후에는 *in vivo*에서도 관찰되었다.⁷⁻¹⁰⁾

MT와 결합되지 않은 카드뮴은 대개 HMWP fraction에서 발견되기 때문에 이 카드뮴은 때때로 unbound 또는 free라고 부른다. HMWP에 결합된 카드뮴은 또한 toxic 또는 active 카드뮴으로 부르는데 HMWP에 카드뮴이 결합되면 그들 고유의 기능이 억제되므로서 세포장애(cellular dysfunction)를 초래하여 독성이 나타난다고 보여진다. 이와 같이 HMWP에서 카드뮴은 독성학적으로 중요한 것처럼 보이며 카드뮴 독성을 이해하는데 중요한 형태일지도 모른다. 따라서 카드뮴 독성의 기작을 이해하기 위해서는 카드뮴에 대해 높은 친화력을 갖는 단백질의 동정이

* 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

절대 필요하다. 또한 카드뮴과 가장 높은 친화력을 갖는 단백질은 카드뮴 독성의 관점에서 볼때 조직에서 첫번째 target site일 수 있다. 본 연구는 흰쥐 간의 상층액에서 카드뮴과 잘 결합하는 HMWP들을 분리, 정제하고 나아가 생화학적 특성을 밝히고 이 단백질이 카드뮴에 의해 생성되는 것인지 아니면 간의 기존 단백질인지를 밝히고자 함을 연구의 목적으로 하였다. 우선 HMWP에 가장 카드뮴양이 높은 분획을 여러 가지 column을 통하여 얻고 SDS-PAGE를 통한 생화학적 특성과 Zn을 함유하는 효소, 즉 alcohol dehydrogenase 및 alkaline phosphatase에 대한 효소활성도를 검토하였다.

실험재료 및 방법

실험동물—체중 200 g 전후 수컷 Sprague Dawley를 계통엔지니어링에서 구입하여 실온에서 사육하면서 카드뮴 주사를 투여하였다.

카드뮴조제 및 투여—카드뮴은 CdCl₂·2H₂O를 사용하여 Cd 0.7, 3 및 3.5 mg/Kg body wt.으로 intra peritoneal 주사로 1일 1회, 연속 3일간 주사후 24시간 경과한 후에 간을 적출하였다. 간을 10 mM phosphate buffer(pH 7.0)으로 4°C에서 glass homogenizer로 균질화 시킨 후 2시간 동안 25,000 g에서 원심 분리한 후 그 상층액을 -20°C에서 냉동한 후 다시 17,000 g로 원심분리하여 그 상층액을 시료로 사용하였다.

Sephacryl S-100 column으로 부터 분리—시료를 10 mM phosphate buffer(pH 7.0)으로 평형시킨 Sephacryl S-100(3 cm×30 cm)에 흡착시켰다. 용출 buffer(10 mM phosphate buffer, pH 7.0)으로 용출시켜 단백질 분획을 280 nm에서 흡광도를 측정하고 atomic absorption spectrometer(AA-175, Varian)를 사용하여 카드뮴을 정량하였다.

DEAE-Sepharose column으로 부터의 분리—시료를 1M sodium acetate(pH 3.5)와 1M NaOH로 전처리하여 10 mM phosphate buffer(pH 7.0)로 평형시킨 DEAE-Sepharose column(2.5 cm×22 cm)에 흡착시켰다. 용출 buffer(10 mM phosphate buffer, pH 7.0)으로 용출시켜 DEAE에 흡착되지 않은 단백질 분획을 280 nm에서 흡광도를 측정하고 AA spectrophotometer를 사용하여 카드뮴을 측정하

였다.

Sulphonyl(S)-Sepharose column으로 부터의 분리—DEAE에 흡착되지 않은 시료를 10 mM phosphate buffer(pH 7.0)로 평형시킨 Sulphonyl(S)-Sepharose (1.5 cm×18 cm)에 흡착시켜 10~300 mM의 NaCl로 염농도 구배(salt linear gradient)로 용출한 후 단백질 분획을 280 nm에서 흡광도를 측정하고 AA spectrophotometer를 사용하여 카드뮴을 측정하였다.

전기영동(polyacrylamide gel electrophoresis)—카드뮴 결합 단백질을 분석하기 위하여 dissociated PAGE를 실시하였다. Acrylamide-bisacrylamide(30 g: 0.8 g/100 ml) 5.01 ml, Resolving gel buffer stock (2.0M Tris-HCl buffer, pH 8.8) 용액 3.75 ml, 1.5% ammonium persulfate 1.5 ml, N,N,N',N'-tetramethyl ethylenediamine(TEMED) 0.005 ml, 증류수 6.24 ml를 혼합하여 최종 resolving gel농도가 10% 되게 사용하였다. Running buffer로는 Tris-glycine (pH 8.3)을 사용하였다. 전기영동 후 염색은 45% methanol과 10% acetic acid 용액에 녹인 0.1% Coomassie brilliant blue로 60°C에서 2시간 동안 염색하여 10% acetic acid, 10% methanol용액으로 탈색시켰고 7% acetic acid로 고정하였다. SDS gel electrophoresis를 실시하기 전에 단백질 시료는 0.1% β-mercaptoethanol과 1% SDS를 섞어 100°C에서 5분간 가열한 후 사용하였다.

단백질 정량—단백질 농도의 정량은 Bradford방법¹¹⁾에 따라 측정하였다. Coomassie brilliant blue G 100 mg을 95% ethanol 50 ml와 85%(W/V) H₃PO₄ 100 ml를 섞어 완전히 녹인 다음 증류수로 1,000 ml로 희석시켜 사용하였으며 595 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준단백질 곡선은 bovine serum albumin을 사용하였다.

Alcohol dehydrogenase의 활성도 측정—조효소인 NAD의 환원으로 인한 340 nm에서 흡광도의 증가를 측정하였다. 반응혼합물에는 0.032M sodium pyrophosphate buffer(pH 8.8) 1.5 ml, 2M ethanol 0.5 ml, 0.025M NAD 1 ml를 혼합하여 3~4분 동안 25°C에서 incubation 시키고 난 후 단백질 용액을 첨가시켜 340 nm에서 3분간 흡광도의 변화를 측정하였다(ΔA₃₄₀/min).

Alkaline phosphatase의 활성도 측정—기질인 p-nitrophenol phosphate의 가수분해로 인한 p-nitro

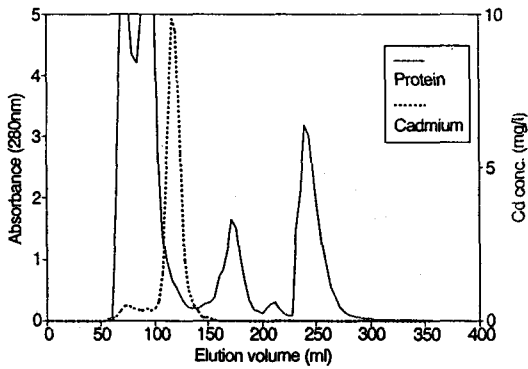


Fig. 1—Elution profile of protein and cadmium from Sephacryl S-100 gel filtration rat liver exposed to Cd.

phenol의 생성으로 인한 410 nm에서의 흡광도 증가를 측정하였다. 반응물로는 1.5M Tris-HCl buffer (pH 8.0) 2.0 ml와 0.003M *p*-nitrophenol phosphate 1.0 ml를 섞어 25°C에서 4~5분간 incubation시킨 다음 단백질 용액을 첨가시켜 410 nm에서 3~4분간 흡광도의 변화를 측정하였다.

실험결과

Cd-binding high molecular weight protein의 분리 및 정제—CdCl₂(3 mg/kg body wt.)을 3일간 ip injection시킨 후 흰쥐의 간을 적출하고 균질화하여 원심분리한 crude extract를 직접 Sephacryl S-100에 흡착시켜 10 mM phosphate buffer(pH 7.0)으로 용출시켰다. 용출된 fraction tube를 UV spectrometer로 흡광도를 측정하고 atomic absorption spectrophotometer로 카드뮴량을 측정하였다(Fig. 1). 여기에서 카드뮴량이 높은 분획을 모아서 ion exchange column chromatography(DEAE-Sephacryl)에 흡착시켜 염농도 구배로 chromatography를 실시하였다. DEAE-Sephacryl에 흡착되지 않은 pre-elution과 salt gradient를 실시하여 얻은 결과는 Fig. 2와 같다. Fig. 2에서와 같이 DEAE-Sephacryl에 흡착된 Cd-binding protein에서의 카드뮴량은 매우 높았다. 음이온 교환수지에서 흡착되지 않고 용출된 분획을 ultrafiltration으로 농축시킨 후 S-Sephacryl에 흡착시켜 염농도 구배로 chromatography를 실시한 결과는 Fig. 3와 같다. 따라서 비교적 고분자에 결합되어 있는 Cd-BP중 DEAE-Sephacryl 및 S-Sephacryl chro-

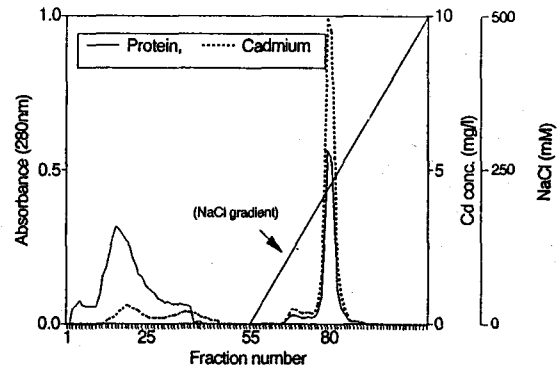


Fig. 2—DEAE-Sephacryl chromatography of Cd-containing fraction from Sephacryl S-100 gel filtration.

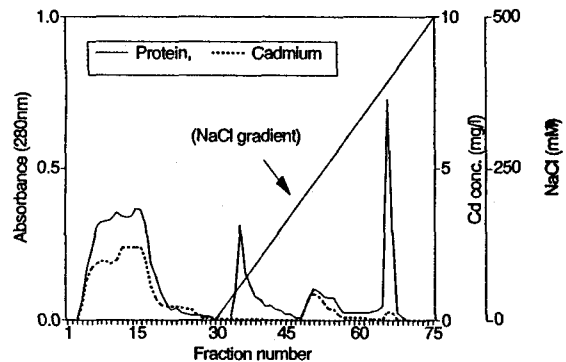


Fig. 3—Sulphonyl Sepharose chromatography of Cd-containing fraction from DEAE-Sephacryl pre-eluent.

matography에 의해 두 종류의 Cd-BP를 분리, 정제하였다.

분리정제된 Cd-binding protein의 전기영동 및 분자량—분리정제된 두 종류의 Cd-binding protein의 분자량을 측정하기 위하여 10% SDS-PAGE를 한 결과는 Fig. 4a와 같다. DEAE-Sephacryl에서 분리정제된 Cd-binding protein의 분자량은 33,000이었다(Fig. 4b). 분자량 측정의 marker 효소로는 lysozyme (M.W. 14,300), beta-lactoglobulin(M.W. 18,400), trypsinogen(M.W. 24,000), pepsin(M.W. 34,700), egg albumin(M.W. 45,000), bovine albumin(M.W. 66,000)을 사용하였다. S-Sephacryl에서 분리, 정제한 Cd-binding protein의 10% SDS-PAGE한 결과는 Fig. 5a와 같다. 이 Cd-binding protein의 분자량은 18,400이었다(Fig. 5b).

분리정제한 두 종류의 Cd-binding protein의 alco-

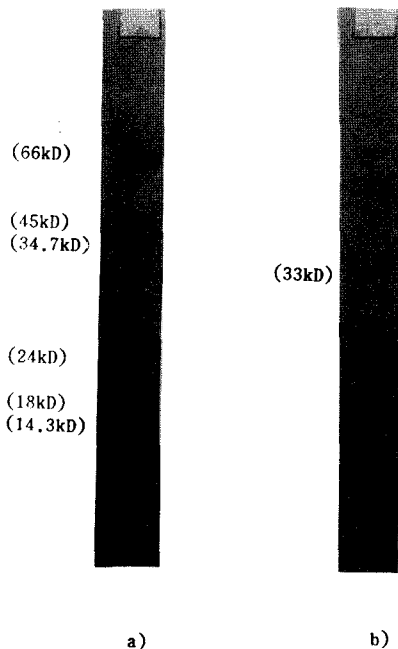


Fig. 4a—SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of Cd-BP(I) by DEAE Sepharose column chromatography.
a) Marker protein, b) Puried Cd-BP(I) (Protein was stained with Coomassie brilliant blue)

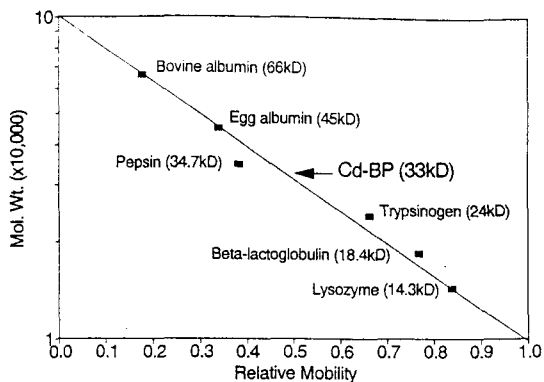


Fig. 4b—Molecular weight determination of Cd-binding protein by DEAE-Sepharose column chromatography in SDS-PAGE.

hol dehydrogenase의 효소활성도를 측정된 결과는 Table I과 같다. Table I에서 보는 바와 같이 분리정제된 두 종류의 Cd-BP에서는 전혀 효소활성도가 없었으나 Sephacryl S-100에서의 Peak I은 160 units, peak II는 140 units를 나타내었으며 crude extract

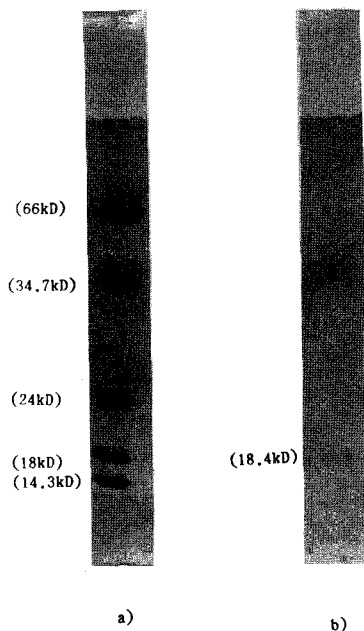


Fig. 5a—SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of Cd-BP(II) by Sulphonyl Sepharose column chromatography.
a) Marker protein, b) Puried Cd-BP(II) (Protein was stained with Coomassie brilliant blue)

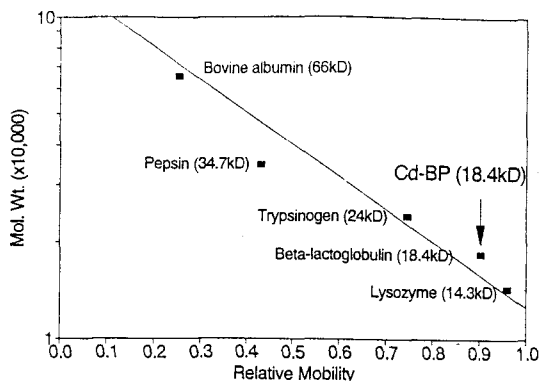


Fig. 5b—Molecular weight determination of Cd-binding protein by Sulphonyl Sepharose column chromatography in SDS-PAGE.

에서는 320 units를 나타내었다. 또한 alkaline phosphatase의 효소활성도에서도 Table II와 같이 분리정제된 두 종류의 Cd-BP에서는 전혀 효소활성도가 없었으나 Sephacryl S-100에서의 Peak I은 80 units, Peak II는 120 units를 나타내었으며 crude extract에서는 260 units를 나타내었다.

Table I—Alcohol dehydrogenase activity of Cd-binding protein by purification step from rat liver exposed to Cd

Step	Total protein(mg)	Total volume(ml)	Activity(100 μ l)	Total activity	Unit
Crude extract	488	28	0.032	8.96	320
Sephacryl S-100					
1) Peak I	67.52	20	0.016	3.2	160
2) Peak II	60.73	40	0.014	5.6	140
DEAE Sepharose	17.61	32	0	0	0
S-Sepharose	3.84	40	0	0	0

* one unit: Change of optical density(ΔA) of 0.001 per min per ml sample

Table II—Alkaline phosphatase activity of Cd-binding protein by purification step from rat liver exposed to Cd

Step	Total protein(mg)	Total volume(ml)	Activity(100 μ l)	Total activity	Unit
Crude extract	488	28	0.026	7.28	260
Sephacryl S-100					
1) Peak I	67.52	20	0.008	1.6	80
2) Peak II	60.73	40	0.012	4.8	120
DEAE Sepharose	17.61	32	0	0	0
S-Sepharose	3.84	40	0	0	0

* one unit: Change of optical density(ΔA) of 0.001 per min per ml sample

고 찰

Cd-binding high molecular weight protein의 특성—현재까지 알려진 바로는 카드뮴은 cytotoxic heavy metal로 체내에 흡수되어 생체내에서의 target organ은 간, 콩팥 및 고환으로 알려져 있다. 그러나 카드뮴독성은 Metallothionein(MT)에 의해 생체내에서 억제될 수 있는데 이 MT는 분자량이 낮고 cysteine이 풍부한 Cd-BP로서 간에서 유도할 수 있다고 보고되어 있다. 카드뮴을 주사하면 즉시 간에서 독성을 보이긴 하지만 독성은 MT induction에 의해서 적게할 수 있다. 그러므로 injection한 후 즉시의 카드뮴독성은 MT synthesis가 유도되기 전에 존재하는 카드뮴이온의 독성으로 설명할 수 있다.¹²⁾ 카드뮴독성은 카드뮴이 target molecule과 결합하므로써 설명될 수 있는데 이것은 MT 이외의 카드뮴과 높은 친화력을 갖는 단백질이나 생물학적 성분이 독성을 유발하는 target molecule일 가능성이 있다. 이러한 목적으로 column chromatography를 통해서 Cd-BP를 분리하는 것이 중요하다. 현재까지 Cd-BP는 *in vivo* 상태에서 분리, 정제하여 생화학적 특성을 보고한 예는 없으며 *in vitro*에서 카드뮴을 Western blotting하여 친화력이 높은 Cd-binding protein 3종류를 발

표하였는데 분자량이 40K, 29K, 24K로서¹³⁾ 이중 40K Cd-BP는 ornithyl carbamoyltransferase와 생화학적 특성이 유사함을 보고하였다.¹⁴⁾ 또한 흰쥐 혈청에서 77K의 Cd-BP를 분리하였는데 이는 mercaptoalbumin으로 보고하였다.¹⁵⁾ 그밖에 흰쥐간에서 Cd-BP를 분리하였는데 이는 Zn을 함유하는 단백질로서 여러 가지 화학적 특성에 의해 alcohol dehydrogenase로 보고하고 있다.¹⁰⁾ 본 실험에서는 *in vivo* 상태에서 두 종류의 Cd-BP를 분리하였는데 DEAE-Sepharose chromatography에서는 분자량이 33,000, S-Sepharose에서는 분자량이 18,400인 Cd-binding protein을 분리정제하였다. 이들은 상기 Aoki 등¹³⁾에 의해 *in vitro* 상에서 분리한 단백질과는 분자량이 다르므로 서로 다른 단백질로 추정된다. 또한 본 연구에서 분리정제된 두 종류의 Cd-BP에 대해 alcohol dehydrogenase의 효소 활성도를 측정한 결과 모두 이 효소가 아닌 것으로 증명되었다. Alcohol dehydrogenase 효소는 흰쥐간에 존재하며 이는 Zn을 갖는 단백질로 분자량은 8만으로 4만짜리 2개의 subunit로 구성되며 분자량 4개의 Zn이나 subunit당 2개의 Zn을 갖는 cathodic ADH군으로 알려져 있다.¹⁶⁾ 또한 고분자량으로 Zn을 함유하는 대표적인 효소인 alkaline phosphatase에 대한 이들의 효소활성도에서도 전혀

효소활성도를 나타내지 않았으므로 본 연구에서 분리된 카드뮴 결합고분자 단백질은 alcohol dehydrogenase 및 alkaline phosphatase가 아님을 알 수 있었다.

문 헌

- 1) Friberg, L., Kjellstron, T., Nordberg, G. F., and Piscator, M.: *Handbook on the Toxicology of Metals*, Biomedical Press, Elsevier, North Holland, Amsterdam-New York-Oxford. p. 355 (1979).
- 2) Vallee, B. L. and Ulmer, D. D.: Biochemical effects on mercury, cadmium and lead. *Ann. Rev. Biochem.* **41**, 91-128 (1972).
- 3) Tsuchiya, K.: Causation of Ouch-Ouch disease(Ita-Itai Byo), an introductory review. *Keio. J. Med.* **18**, 181-194 (1969).
- 4) Lucis, O., Link, M. E., and Rucis, R.: Turnover of cadmium 109 in rats. *Arch. Environ. Health.* **18**, 307-310 (1969).
- 5) Frazier, J. M.: The role of Metallothionein in the systemic distribution of cadmium. In Foulkes, E. C.(ed.) *Biological Roles of Metallothionein*, Elsevier/North-Holland, New York, pp. 141-153 (1982).
- 6) Webb, M.: Toxicological significance of metallothionein. In Kagi, J.H.R. and Kojma, Y. (eds.). *Metallothionein II*, Birkhauser Verlag, Basel, pp. 109-134 (1987).
- 7) Nomiyama, K. and Nomiyama, H.: Critical concentration of "unbound" cadmium in the rabbit renal cortex. *Experientia.* **42**, 149 (1982).
- 8) Sato, M. and Nagai, Y.: Mode of existence of cadmium in rat liver and kidney after prolonged subcutaneous administration. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **54**, 90-99 (1980).
- 9) Suzuki, K. T., Yamamura, M., Yanada, Y. K. and Shimizu, F.: Distribution of cadmium in heavily cadmium-accumulated rat liver cytosols: metallothionein and related cadmium-binding proteins. *Toxicol. Lett.* **8**, 105-114 (1981).
- 10) Suzuki, K. T., Sunaga, H., Yamane, Y. and Aoki, Y.: Binding of cadmium to alcohol dehydrogenase in the liver before induction of metallothionein. *Research communications in chemical pathology and pharmacology.* **74**, 223-236 (1991).
- 11) 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.* **72**, 248-254 (1976).
- 12) Frazier, J. M.: *Biological Roles of Metallothionein* Foulkes, E. C., ed., Elsevier/North-Holland, New York, pp. 141-153 (1982).
- 13) Aoki, Y., Kunimoto M., Shibata Y., and Suzuki, K. T.: Detection of Metallothionein on Nitrocellulose Membrane Using Western Blotting Technique and its Application to Identification of Cadmium-Binding Proteins. *Anal. Biochem.* **157**, 117-122 (1986).
- 14) Aoki Y., Sunaga H., and Suzuki, K. T.: A Cadmium-binding protein in rat liver identified as ornithine carbamolytransferase. *Biochem. J.* **250**, 735-742 (1988).
- 15) Suzuki, K. T., Sunaga H., Kobayashi, E., and Shimojo, N.: Mercaptoalbumin as a selective cadmium-binding protein in rat serum. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **86**, 466-473 (1986).
- 16) Lad, P. J., Leffert, H. L.: Rat liver alcohol dehydrogenase. *Anal. Biochem.* **133**, 350-361 (1983).