

식이내의 단백질과 타우린 함량이 Cysteine 대사에 미치는 영향*

박 태 선

연세대학교 생활과학대학 식품영양학과

Effect of Dietary Protein and Taurine on Cysteine Catabolism in Cat Liver

Park, Taesun

Department of Food & Nutrition, Yonsei University, Seoul, Korea

ABSTRACT

Activities of hepatic cysteine desulfhydration was assessed in cats fed one of the following diets for 5 weeks : 20% protein, 0% taurine diet(LPOT) ; 20% protein, 0.15% taurine diet(LPNT) ; 60% protein, 0% taurine diet(HPOT) ; and 60% protein, 0.15% taurine diet(HPNT). Cats fed LPOT and HPOT had been maintained on a taurine-free diet for 6 weeks prior to the experiment in order to deplete body taurine.

Activities of cysteine desulfhydration were determined by measuring the production of $H_2^{35}S$ from ^{35}S -cysteine in the presence and absence of α -ketoglutarate(α -KG) in the incubation medium. The direct pathway via cysteine desulfhydrase appears to account for the major route of cysteine desulfhydration in the cat liver since the values obtained in the absence of α -KG were between 81 and 88% of those obtained in the presence of α -KG. Mean \pm SEM of the hepatic total desulfhydration activities($\mu\text{mol } H_2S \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kg body wt}^{-1}$) in cats fed LPOT, LPNT, HPOT and HPNT were 117 ± 6 , 135 ± 10 , 137 ± 10 , and 190 ± 9 , respectively. The capacity of hepatic cysteine desulfhydration(UA/kg body wt) was positively correlated not only with the dietary concentration of taurine but also with the concentration of protein. (Korean J Nutrition 29(7) : 729~737, 1996)

KEY WORDS : cysteine desulfhydrase · cysteine aminotransferase · β -mercaptopyruvate sulfurtransferase · cysteine metabolism · cat.

서 론

포유류의 조직에서 cysteine은 크게 두가지 경로로 이화되는데 cysteine sulfinic acid(CSA)를 거쳐 대사되는 경로(CSA-dependent pathway)와 CSA를 경유하지 않고 desulfhydration되는 경로(CSA-indepen-

dent pathway)가 그것이다(Fig. 1). 먼저 첫번째 경로에서 cysteine은 cysteine dioxygenase(EC 1.13.11.20)에 의해 CSA로 대사되며, CSA는 다시 hypotaurine으로 decarboxylate된 후 taurine으로 산화되거나^{1,3)}, 또는 β -sulfinylpyruvate으로 transamination된 후 pyruvate과 sulfite으로 전환되는 과정을 거치게 된다³⁾. 한편 cysteine은 CSA를 경유하지 않은 채 다음과 같은 두가지 경로로 desulfhydration된다 : 1) cysteine desulfhydrase(CDSH)(EC 4.4.1.1)의 촉매 작용에 의해 cysteine의 아미노기를 ammonium 이온으

채택일 : 1996년 8월 6일

*본 연구는 1995년도 연세 대학교 학술 연구비 지원에 의하여 이루어진 것임.

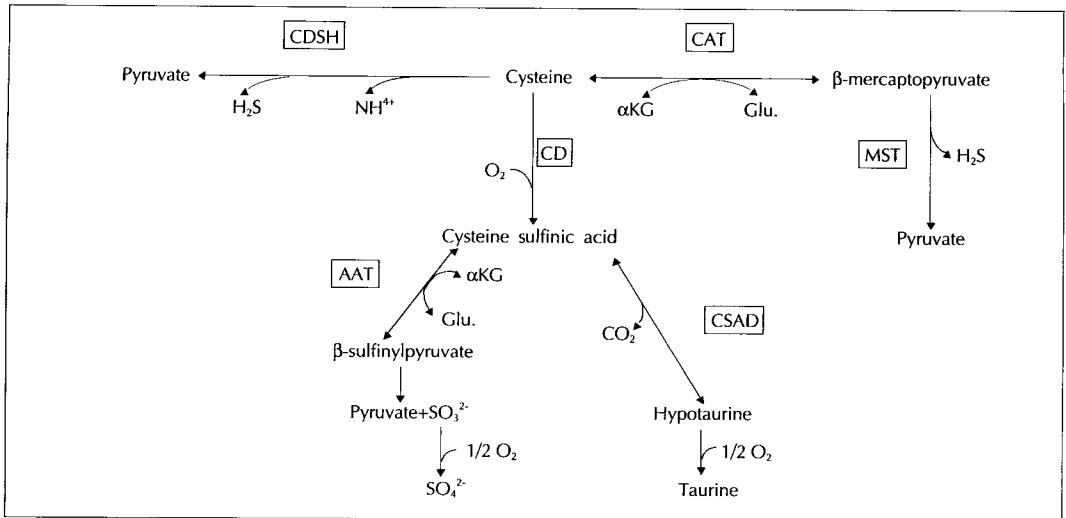


Fig. 1. Catabolic pathways of cysteine in mammalian tissue.

CDSH(cysteine desulfhydrase); CAT(cysteine aminotransferase); MST(β -mercaptopyruvate sulfurtransferase); CD(cysteine dioxygenase); AAT(aspartate aminotransferase); CSAD(cysteine sulfinic acid decarboxylase)

로 유리시키면서 pyruvate과 H_2S 를 형성 하거나⁴⁾⁵⁾, 또는 2) cysteine aminotransferase(CAT)(EC 2.6.1.3)의 촉매 작용에 의해 β -mercaptopyruvate으로 전환된 후 다시 β -mercaptopyruvate sulfurtransferase(MST)(EC 2.8.1.2)에 의해 pyruvate과 H_2S 로 transsulfuration되기도 한다⁶⁻¹⁰⁾.

조효소로 pyridoxal phosphate을 필요로 하는 CDSH 효소는 1933년 Tarr¹¹⁾에 의해 박테리아에서 처음 밝혀진 이래 여러 종류의 실험 동물⁴⁾⁵⁾에서 활성이 발견되었고, 1972년 Kredich¹²⁾에 의해 처음으로 분리 정제되면서 효소의 물리 화학적 특성이 연구되어졌다. Cysteine의 아미노기를 α -ketoglutarate(α -KG)에 전이시켜 β -mercaptopyruvate을 형성 하는 과정을 촉매 하는 CAT는 쥐와 돼지의 간에서 수차례 활성이 보고되었으며⁹⁾¹⁴⁾, 간 조직의 세포질과 미토콘드리아에서 성공적으로 분리정제되었다¹⁵⁾¹⁶⁾. 분리된 효소를 대상으로 기질 특이성, 효소 활성의 지해 및 물리 화학적 특성에 대한 일련의 실험을 실시한 결과 CAT는 aspartate aminotransferase(EC 2.6.1.1)와 동일한 효소이며, cysteine에 대한 Km은 22mM인 반면 aspartate에 대한 Km은 0.5~1.6mM로서 cysteine보다는 aspartate에 대하여 훨씬 높은 친화력을 지니는 것으로 밝혀졌다¹⁵⁾¹⁶⁾. Transamination과 transsulfuration의 연쇄 작용에 의한 cysteine desulfhydration 활성을 측정 한 연구에서 Ubuka⁹⁾은 첫 단계의 transamination 과정이 전체적인 H_2S 생성 반응의 rate-limiting step으로 작용하고 있음을 밝혔다.

Cysteine 대사에 관여하는 대부분의 효소는 식이내

단백질 및 함황 아미노산의 농도에 의해 영향을 받는 것으로 보고되고 있다. Cysteine을 CSA로 산화시키는데 관여하는 cysteine dioxygenase의 활성은 쥐를 대상으로 식이내 단백질 함량을 증가시킨 경우 함께 상승하였고¹²⁾¹⁷⁾, CSA를 taurine으로 전환시키는 과정을 촉매하는 효소인 cysteine sulfinic acid decarboxylase(CSAD)(EC 4.1.1.29)의 활성은 고단백 식이 또는 methionine 첨가 식이를 섭취시킨 결과 감소하였다²⁾¹⁸⁾¹⁹⁾. 한편 고양이²⁰⁾, 나 여우²¹⁾ 등의 동물을 대상으로 타우린 결핍 식이를 섭취시킨 결과 CSAD의 활성이 증가한 것으로 나타났다.

Cysteine 대사에 관여하는 각 경로의 상대적 중요성 및 전체적인 시스테인 대사에 대한 기여도에 관한 연구는 현재까지 활발하게 진행되어지지 못한 상태이며, 간헐적으로 발표된 연구 결과도 서로 상반되어 일치된 결론을 얻기에는 불충분하다. CSA를 경유 하는 경로가 쥐의 cysteine 대사에 주요 역할을 담당할 것이라는 일반적인 견해²²⁾와는 반대로 쥐에 있어서 상당량의 cysteine이 CSA를 경유하지 않고 desulfhydration되어 pyruvate과 H_2S 로 대사되어짐이 밝혀진 바 있다²³⁾²⁵⁾. 다른 포유류에 비해 cysteine dioxygenase와 cysteine sulfinate decarboxylase의 활성이 월등히 낮아 cysteine으로 부터의 타우린 생합성이 저조한 것으로 알려진 인간, 특히 영유아²⁶⁾와 고양이과 동물²⁷⁾에 있어서는 CSA 경로로 대사되는 cysteine의 양이 극히 제한되어 있고, 따라서 거의 대부분의 cysteine이 desulfhydration 과정에 의해 대사될 것으로 사료된다.

본 연구에서는 타우린 생합성이 활발하게 이루어지지

않는 고양이를 대상으로 하여 간에서의 cysteine desulfhydration에 관여하는 두가지 경로의 상대적 중요성을 평가하고, 식이내 단백질과 타우린 함량이 cysteine desulfhydration 활성에 미치는 영향을 살펴 보고자 하였다.

실험 재료 및 방법

1. 실험 동물 및 식이

생후 16~20주가 지난 암컷 고양이 24 마리를 체중에 따라 난괴법에 의하여 두 군으로 나누고, 체내의 타우린 함량을 정상 또는 결핍 상태로 만들기 위해 정상 타우린 식이(400g 단백질 & 1.5g 타우린/kg 식이) 또는 타우린 결핍 식이(400g 단백질 & 0g 타우린/kg 식이)로 6주간 예비 사육시켰다. 예비 사육이 끝난 시점에서 각 군의 실험 동물을 다시 식이의 단백질 함량에 따라 두 군으로 나누고, 정상 타우린 식이로 예비 사육시킨 고양이의 경우, 저단백/정상 타우린 식이(LPNT : 200g 단백질 & 1.5g 타우린/kg 식이) 또는 고단백/정상 타우린 식이(HPNT : 600g 단백질 & 1.5g 타우린/kg 식이)를, 타우린 결핍 식이로 예비 사육시킨 고양이의 경우, 저단백/타우린 결핍 식이(LPOT : 200g 단백질 & 0g 타우린/kg 식이) 또는 고단백/타우린 결핍 식이(HPOT : 600g 단백질 & 0g 타우린/kg 식이)를 각기 5주간 섭취시켰다. 각 실험 식이의 구성은 Table 1에 제시되어 있다.

물과 식이는 제한없이 먹게 하였고, 오전 6시에서 오후 10시까지를 낮주기로 조절하였으며 사육장의 온도는

24~26℃로 유지시켰다. 매일 일정한 시각(09:00~10:00)에 식이 섭취량을 측정하였고, 몸무게는 1주일에 한번 씩 측정하였다.

2. 시료의 채취 및 타우린 농도의 분석

실험 식이의 실시가 끝나는 시점에 heparin을 함유한 3ml 주사기를 사용하여 경정맥으로 부터 혈액을 채취하였다. 채취된 혈액의 일부는 혈장을 분리시키기 위해 3,000×g에서 10분간 원심 분리시키고, 전혈과 혈장은 타우린 분석 시까지 -20℃에 보관하였다.

혈액을 채취한 즉시, pentobarbital을 이용하여 실험 동물을 마취시킨 상태에서 간을 떼어내고 무게를 측정하였다. 간조직의 일부를 0.05M potassium phosphate buffer(pH 6.8)에서 homogenate시켜서 20%(w/v) 균질 용액을 형성하고, 4℃, 20,000×g에서 30분 간 원심분리한 후 상층액을 모아서 타우린 및 효소의 활성을 측정할 때까지 -70℃에 보관하였다.

전혈, 혈장 및 간균질 상층액에서의 타우린 농도는 sulfosalicylic acid를 사용하여 단백질을 침전시킨 후 ion-exchange chromatography를 이용한 자동화된 아미노산 분석기(Beckman Instrument, Model 121-MB)를 사용하여 분석하였다.

3. Cysteine desulfhydration의 활성 측정

간에서의 cysteine desulfhydration 활성은 방사성 동위원소를 사용한 Yamaguchi등²²⁾의 방법을 수정하여 L-[³⁵S]-cysteine으로 부터 H₂³⁵S의 생성율을 측정함으로써 평가되었다. 효소의 활성을 측정하기 위한 반응액은 총부피 2ml에 60mM L-cysteine, 1μCi L-[³⁵S]-

Table 1. Composition of experimental diets

	LPOT	HPOT	LPNT	HPNT
	g/kg diet			
Soyprotein	100	300	100	300
Casein	100	300	100	300
Animal tallow	100	100	100	100
Sucrose	150	150	150	150
Starch	486	86	484	84
Mineral mix ¹⁾	50	50	50	50
Vitamin mix ²⁾	10	10	10	10
70% choline · Cl	4.3	4.3	4.3	4.3
Taurine	-	-	1.5	1.5

1) The mineral mixture contained(g/100g) CaHPO₄ 39.0; K₂HPO₄ 9.0; CaCO₃ 11.0; MgSO₄ 4.5; KCl 10.0; KHCO₃ 10.0; NaHCO₃ 14.0; MnSO₄ · H₂O 0.384; ZnSO₄ · 7H₂O 0.445; CuSO₄ · 5H₂O 0.080; FeC₆H₅O₇ · 3H₂O 1.000; KI 0.003; SnCl₂ · 2H₂O 0.010; Na₂SeO₃ 0.003; (NH₄)₆Mo₇O₂₄ · 4H₂O 0.004; CrCl₃ · 6H₂O 0.026; NiCl₂ · 6H₂O 0.030; NaF 0.014; NH₄VO₃ · 4H₂O 0.002; NaCl 0.499

2) The vitamin mixture contained(g/kg) cobalamine 0.005; riboflavin 1.002; nicotinic acid 10.022; calcium d-pantothenic acid 2.004; menadione sodium bisulfite complex 1.353; folic acid 1.002; pyridoxine · HCl 1.000; thiamin mononitrate 2.436; myo-inositol 20.042; d-biotin 0.100; ascorbic acid 40.084; retinyl acetate 2,004,182 I.U./kg; cholecalciferol 200,418 I.U./kg; DL-alpha-tocopheryl acetate 16,034 I.U./kg

cysteine(New England Nuclear Co., Boston, MA, U.S.A.), 2mM pyridoxal 5'-phosphate, 5mM α -KG, 10mM dithiothreitol(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, U.S.A.), 100mM potassium phosphate buffer(pH 7.3)와 0.05ml의 간 균질 상층액을 포함하였다. 반응액이 담긴 시험관을 얼음 위에서 질소 가스로 20초동안 채운 즉시 고무 마개를 덮어 봉하였다. 이때 고무 마개 안쪽에 쇠고리를 연결시키고, 세접으로 접은 $0.7 \times 2.5 \text{cm}^2$ 의 여과지(Whatman No. 1)를 benzethonium hydroxide(Hyaminate hydroxide) 용액(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, U.S.A.)에 적셔서 고리에 매달아 둠으로써 효소 반응에 의해 생성된 H_2S 가스를 여과지에 고정시키도록 하였다. 효소 반응은 시험관을 얼음에서 37°C water bath로 옮기는 시점에서부터 시작되었으며, 1ml의 15% trichloroacetic acid를 첨가시킴으로써 종료되었다. 여과지에 고정된 H_2^{35}S 의 radioactivity를 liquid scintillation spectrometry(Packard Instrument Co., Downersgrove, IL, U.S.A.)에 의해 측정하였다.

Cysteine desulphydration에 관여하는 두 가지 경로의 상대적 기여도는 반응액에 α -KG가 첨가된 경우와 첨가되지 않은 경우에 각각의 H_2S 생성률을 측정함으로써 산출되었다²⁸⁾²⁹⁾ α -KG는 transamination반응에서 필수적인 기질로 사용되지므로 α -KG가 첨가되지 않은 상태에서 생성된 H_2S 는 cysteine desulphydrase 경로에 의한 것이고, α -KG가 첨가된 상태에서 얻어지는 H_2S 는 transamination/transsulfuration 경로와 desulphydrase에 의해 촉매되는 경로의 합에 의한 것이라 할 수 있다. 한편 transamination/transsulfuration 경로의 활성은 총 desulphydration 활성(α -KG가 첨가된 상태에서 생성된 H_2S 의 양)에서 cysteine desulphydrase에 의한 H_2S 생성량(α -KG가 첨가되지 않은 상태에서 생성된 양)을 뺀 차이로 산출하였다.

4. 기타 생화학적 분석

간균질 상층액에서의 DNA 농도는 fluorometry를 사용한 Downs와 Wilfinger³⁰⁾의 방법을 수정하여 측정하

였으며, 단백질 농도는 Lowry등³¹⁾의 방법을 이용하여 측정하였다.

5. 통계처리

모든 실험 결과의 수치는 평균과 평균표준오차(mean \pm SEM)로 제시하였으며, 식이내 단백질과 타우린 함량이 간의 무게, DNA농도, 혈액 및 간의 타우린 농도, 그리고 cysteine desulphydration 활성에 미치는 효과에 관하여는 2×2 factorial analysis of variance (ANOVA)에 의해 $p < 0.05$, $p < 0.01$ 및 $p < 0.001$ 수준에서 유의성 여부를 검증하였다.

결과 및 고찰

1. 체중 및 간의 무게

실험 식이를 실시한 5주 간의 누적 체중의 변화가 Table 2에 제시되어 있다. 5주 간의 사육기간 동안 고단백식이군은 383~463g의 누적 체중 증가를 나타낸 반면, 저단백식이군의 경우 29~79g의 체중 감소를 보였다. 고단백과 저단백식이군 내에서 정상 타우린군은 타우린 결핍군에 비해 통계적으로 유의적이지는 않으나 더 높은 체중 증가를 보였다. 육식 동물에 속하는 고양이과 동물의 경우 성장과 유지를 위한 단백질의 최소 필요량이 잡식을 하는 다른 포유류에 비해 더 높아서 성장기 동물은 모든 필수 아미노산의 필요량이 충족된 상태에서, 식이의 18~20%를 단백질로 섭취하여야 한다³²⁾³³⁾. 실험 기간동안 저단백 식이군의 체중이 감소한 것으로 미루어 보아 본 실험에서 사용된 10% 카제인과 10% 대두 단백질의 혼합 식이는 성장기의 고양이에게 필요한 모든 필수 아미노산을 충분한 양 공급하지 못하였다고 하겠다. 일일 식이 섭취량에는 실험군 간에 유의적인 차이가 없었다.

식이내 단백질과 타우린 함량이 간의 크기와 세포수에 미치는 영향이 Table 3에 제시되어 있다. 고단백 식이는 저단백 식이에 비해 간의 무게 뿐 아니라 체중에 대한 간 무게의 비율에 유의적인 증가를 초래하였다($p < 0.001$). 저단백 식이군과 비교시, 고단백 식이군의 간 무

Table 2. Cumulative body weight gain over 5 week experimental period

	1st	2nd	Week		
			3rd	4th	5th
			(g)		
LPNT	58 \pm 25	43 \pm 31	23 \pm 46	- 38 \pm 52	- 79 \pm 59
HPNT	192 \pm 52	289 \pm 85	342 \pm 38	390 \pm 42	463 \pm 43
LPOT	46 \pm 44	8 \pm 56	- 10 \pm 58	- 13 \pm 76	- 29 \pm 78
HPOT	115 \pm 53	207 \pm 40	251 \pm 40	262 \pm 30	383 \pm 53

Each value represents mean \pm SEM of 6 animals

Table 3. Weight and DNA concentration of cat liver

	Diets				ANOVA	
	LPNT	HPNT	LPOT	HPOT	Tau	Prot
Liver wt(g)	59 ± 6	98 ± 4	64 ± 8	137 ± 10	**	***
Liver wt(g)/ Body wt(kg)	30 ± 3	39 ± 3	28 ± 4	48 ± 12	N.S.	***
DNA conc.(mg/g liver)	7.9 ± 0.05	6.9 ± 0.08	7.7 ± 0.09	6.0 ± 0.03	N.S.	N.S.

Each value is the mean ± SEM of 6 animals
N.S. ; not significant

p < 0.01 ; *p < 0.001

Table 4. Taurine concentrations in plasma, whole blood and liver of cats fed the experimental diets for 5 weeks

	Diets				ANOVA	
	LPNT	HPNT	LPOT	HPOT	Tau	Prot
Plasma(nmoles/ml)	137 ± 4.5	72 ± 5.2	1.02 ± 0.2	1.21 ± 0.2	***	***
Whole blood(nmoles/ml)	424 ± 34	602 ± 34	14.9 ± 1.4	33.8 ± 5.9	***	***
Liver(μmoles/g)	14.8 ± 0.8	24.0 ± 1.7	1.45 ± 0.3	4.31 ± 0.3	***	***

Each value is the mean ± SEM of 6 animals

***p < 0.001

게는 정상 타우린군에 있어서 67%, 타우린 결핍군에 있어서는 112%의 증가를 나타내었다. 한편 체중 대 간 무게의 비율은 HPNT군에서 LPNT군에 비해 30%의 증가를, HPOT군에서 LPOT군에 비해 71%의 증가를 보였다. 이와 같은 결과에 비추어 볼 때 간 무게는 고단백 식이에 의해 체중보다 더 민감하게 증가되었음을 알 수 있다. 간의 무게는 식이내 타우린 함량에 의해서도 유의적인 차이를 나타내어 타우린 결핍식이군에서 정상 타우린군에 비해 간이 더 비대해지는 결과가 초래 되었다(p < 0.01). 간의 DNA 함량은 식이내 단백질과 타우린 농도에 의해 영향을 받지 않았으며, 따라서 본 실험에서 나타난 간 무게의 증가는 세포수는 그대로 유지된 체 세포의 크기가 증가된 'hypertrophic growth'를 의미한다고 하겠다.

2. 혈액과 간조직의 타우린 농도

실험 식이를 5 주간 실시한 후 채취한 혈액과 간 조직의 타우린 농도는 식이내 타우린 함량 뿐 아니라 단백질 함량에 의해 유의적인 영향을 받는 것으로 나타났다(Table 4). 타우린 결핍군과 정상 타우린군의 혈장 타우린 농도는 각기 1.0~1.2nmoles/ml과 72~137nmoles/ml로서 이미 보고된 결과들³⁴⁾³⁵⁾과 비슷한 수치를 나타내었고, 예비 사육 기간을 포함한 총 11주 간의 타우린 결핍식이의 섭취로 인해 체내 타우린 pool이 현격히 고갈되었음을 알 수 있다. 혈장의 타우린 농도는 식이내 단백질 함량과 유의적인 음의 상관관계를 나타내어 HPNT군의 경우 LPNT군에 비해 혈장의 타우린 농도가 47% 낮게 나타났다(p < 0.001). 한편 전혈과 간 조직의 타우린 농도는 단백질 함량과 양의 상관 관계를 나타냈는데, HPNT군의 경우 LPNT군에 비해 전혈과 간의 타우린 농도가 각기 42%, 62% 증가하였고, HPOT군에서는

LPOT군에 비해 전혈과 간의 타우린 농도가 각기 127%, 197% 증가한 것으로 나타났다(p < 0.001). 이와 같이 식이내의 단백질 함량이 타우린 농도에 미치는 효과가 혈장과 전혈(또는 간)에서 서로 상반되게 나타나는 것은 본 연구실에서 거듭 관찰되고 있는 현상³⁶⁾으로서 이에 대한 이유는 아직까지 명확히 밝혀지지 않고 있다.

3. 간조직 내 Cysteine desulphydration의 활성화

쥐와 고양이에서 cysteine desulphydration 활성화의 조직 분포도를 조사한 연구들²²⁾²⁸⁾²⁹⁾에 의하면 간에서 활성이 가장 높았으며, 그 다음이 심장과 신장인 것으로 나타났다. 본 연구에서는 고양이의 간조직에서 cysteine desulphydration에 관여하는 두가지 경로의 상대적 중요성을 평가하고자 반응액에 α-KG를 첨가한 경우와 첨가하지 않은 경우에 각기 H₂S의 생성률을 측정하였다. Fig. 2에 제시된 바와 같이 단백질과 타우린 함량을 달리한 4가지의 실험식이군에서 α-KG가 첨가되지 않은 상태에서 얻어진 H₂S 생성률은 α-KG가 첨가된 상태에서 얻어진 값의 81~88%에 해당되었다. 따라서 고양이의 간에서 cysteine이 이화되는 주된 경로는 cysteine desulphydrase에 의해 촉매되는 직접적인 desulphydration 과정에 의한 것이라고 하겠다.

Stipanuk과 Beck²⁸⁾는 쥐의 간에서 cysteine desulphydration 활성을 측정할 결과 반응액에 α-KG가 함유되지 않은 경우, 함유된 경우에 비해 H₂S 생성률이 92%정도 감소되었음을 관찰함으로써 CAT와 MST의 연쇄 작용에 의한 경로가 cysteine desulphydration의 주된 경로임을 제시하였다. 반면 쥐의 간에서 분리한 hepatocyte을 이용한 Drake^등²³⁾의 연구에서는 cysteine이 transamination 반응의 유력한 기질이 되지

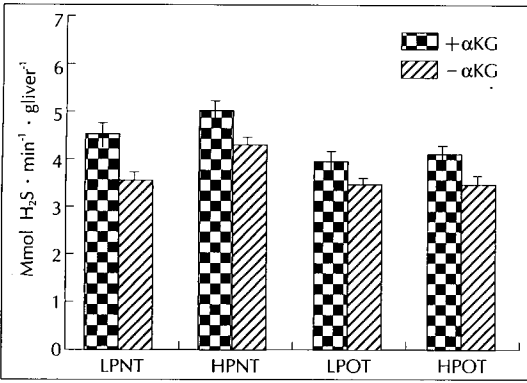


Fig. 2. Contribution of each pathway to cysteine desulfhydration in the cat liver. Each bar represents mean \pm SEM of 6 animals.

못하며, 극히 제한된 양의 cysteine만이 α -KG와 함께 transamination 반응을 일으킨다는 상반된 견해를 보였다.

고양이를 대상으로 한 연구²⁹⁾에서는 두가지 경로의 상대적 공헌도가 반응액 내의 cysteine 농도에 의해 크게 영향을 받고 있음이 밝혀졌다. 즉, 세포 내의 생리적 농도에 가까운 2mM의 cysteine 농도에서는 α -KG가 첨가되지 않은 상태에서의 H₂S 생성률이 α -KG가 첨가된 경우 얻어진 값의 54%에 해당되었으나, 효소 활성의 포화 현상이 나타나는 240mM의 cysteine 농도에서는 α -KG가 첨가되지 않은 상태에서 H₂S의 생성이 거의 중단되었음이 보고되었다. 따라서 세포 내 cysteine이 과량으로 축적되면 거의 대부분의 cysteine이 transamination 과정을 거치는 반면, 정상 상태에서는 약 50% 정도만이 transamination 경로에 의해 이화됨이 제시되었다. 한편, 본 연구에서는 60mM cysteine 농도에서 80% 이상의 cysteine이 CDSH에 의해 이화되며, 나머지 20% 미만이 transamination/transsulfuration 경로에 의해 대사되는 것으로 나타나 CDSH에 의한 직접적인 desulfhydration 경로의 중요성이 강조되고 있다. 이와 같이 transamination/transsulfuration 경로로 대사되는 cysteine의 양이 선행 연구 결과²⁹⁾에 비해 낮게 평가된 이유 중의 하나로 본 연구에서는 효소 활성의 측정을 위해 세포질을 대표하는 간 균질 상층액을

을 사용하였으나 Stipanuk과 King²⁹⁾의 연구에서는 세포질과 미토콘드리아를 모두 포함하는 간 균질액을 효소 시료로 사용하였다는 점을 들 수 있겠다. 간 균질액을 사용할 경우 균질 상층액을 사용할 때보다 CAT 활성이 더 높게 나타났다는 그들의 보고에 미루어 볼 때 본 연구에서 균질 상층액을 효소 시료로 사용한 것이 CAT에 의해 대사되는 cysteine의 양이 다소 낮게 평가되는 직접적인 원인이 되었을 것으로 사려된다.

Cystine을 기질로 하여 H₂S를 생성하는 γ -cystathionase(EC 4.2.1.13)의 활성이 포유류의 간에서 보고된 바 있는데^{37,38)}, 본 실험에서는 반응액에 dithiothreitol을 환원제로 첨가하였으므로 γ -cystathionase의 주된 기질인 cystine으로 전환되는 cysteine의 양은 무시될 수 있을 정도의 소량일 것으로 추산된다.

식이내 단백질과 타우린 함량이 간에서의 총 cysteine desulfhydration 활성에 미치는 영향이 Table 5에 제시되어 있다. 식이내 타우린의 함량은 간 전체 단위로 활성이 제시된 경우(UA/whole liver)를 제외하고는 cysteine desulfhydration 활성에 유의적인 영향을 미쳐서 타우린이 결핍된 경우 활성이 유의적으로 감소하였다. 이러한 적응 현상은 타우린 결핍 시 더 많은 양의 cysteine이 타우린 생합성을 위해 CSA경로를 통해 대사됨을 반영해 주는 것으로서 고갈된 체내의 타우린 pool을 보충해 준다는 측면에서 볼 때 매우 다행스러운 현상이라고 하겠다. 식이내 단백질 함량이 cysteine desulfhydration에 미치는 영향은 효소의 활성을 나타내는 방법에 따라 차이가 있어서 효소의 활성이 UA/g liver 단위로 표시된 경우 유의적인 차이를 보이지 못했으나, UA/kg body wt 또는 UA/whole liver 단위로 표현된 경우 고단백 식이는 저단백 식이에 비해 cysteine desulfhydration 활성을 $p < 0.001$ 수준에서 유의적으로 증가시켰으며, UA/g protein 단위로 표현된 경우에는 $p < 0.05$ 수준에서 유의적인 증가를 나타내었다. 이와 같이 효소의 활성이 kg 체중 단위로 표현된 경우 식이내 타우린 함량은 물론 단백질 함량에 의해 가장 유의적인 차이를 나타낸 이유는 5주 간의 고단백 식이 섭취가 체중 대 간 무게의 비율을 증가시킴으로써 개체

Table 5. Activity of total hepatic cysteine desulfhydration in the cat

	Diets				ANOVA	
	LPNT	HPNT	LPOT	HPOT	Tau	Prot
UA/g liver	4.4 \pm 0.2	5.0 \pm 0.3	4.0 \pm 0.2	3.9 \pm 0.2	**	N.S.
UA/whole liver	259 \pm 32	490 \pm 20	256 \pm 17	534 \pm 29	N.S.	***
UA/g protein	37.2 \pm 2.1	32.6 \pm 1.4	31.9 \pm 1.6	29.9 \pm 0.4	*	*
UA/kg body wt	135 \pm 10	190 \pm 9	117 \pm 6	137 \pm 10	***	***

Each value represents mean \pm SEM of 6 animals

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

UA(unit activity)is expressed as μ mol H₂S/min

N.S.; not significant

의 cysteine desulphydration 능력을 향상시킨 때문인 것으로 사료된다.

본 연구의 결과에서 CDSH 활성이 UA/g liver로 표현된 경우 고단백 식이에 의해 증가되는 경향은 보였으나 통계적으로 유의적인 차이를 나타내지 못한 것과는 달리, 타우린의 생합성이 활발한 다른 실험 동물에서는 식이내 단백질 함량에 의해 CDSH의 활성이 훨씬 더 민감하게 반응하는 것으로 나타났다. 닭을 대상으로 한 Goswami등⁴⁾의 연구에 의하면 저단백 식이군(3% casein + 1.3% gelatin)과 단백질질을 전혀 함유하지 않은 식이를 섭취한 군의 간조직 내 CDSH 활성(UA/g liver)은 정상 식이군(18% casein + 10% gelatin)에서 보고된 값의 75%와 58% 정도로 낮게 나타났다. 이와 비슷하게 Simpson과 Freedland⁵⁾도 90% 단백질이 함유된 식이를 쥐에게 섭취시킨 경우 일반 고형 사료를 섭취하는 쥐에 비해 CDSH 활성(UA/g liver)이 2배 정도 증가함을 관찰하였다.

고양이과 동물의 경우 타우린 생합성 능력이 다른 포유 동물에 비해 월등히 낮아 인간에서의 cysteine 대사를 연구할 수 있는 좋은 model이 되고 있으나 결과를 인간에게 그대로 적용하는 데는 문제점이 여전히 남아 있다. 따라서 인간에 있어서 cysteine 대사 경로 및 각 경로의 상대적 중요성을 밝히기 위해서는 앞으로 Hep G2 세포와 같이 인간의 간에서부터 유래된 세포 배양 system을 이용하여 in vitro에서 cysteine 대사에 관여하는 각 효소의 활성이 측정되어야 할 것으로 사료되며, 이러한 연구는 영유아에 있어서 필수성이 대두되고 있는 타우린의 생합성률과 이에 영향을 미치는 내적·외적 요인들을 규명하는데 크게 기여할 수 있을 것으로 기대된다.

요약 및 결론

본 연구에서는 식이내 단백질과 타우린 함량이 cysteine 대사에 미치는 영향을 평가하기 위해 인간에서와 마찬가지로 cysteine으로 부터의 타우린 생합성이 저조한 고양이를 대상으로 하여 다음과 같은 4가지의 실험 식이를 5주 간 섭취시켰다 : 20% 단백질, 0% 타우린 식이(LPOT) ; 20% 단백질, 0.15% 타우린 식이(LPNT) ; 60% 단백질, 0% 타우린 식이(HPOT) ; 그리고 60% 단백질, 0.15% 타우린 식이(HPNT). 타우린 결핍 식이군은 체내 타우린을 고갈시키기 위해 실험 식이를 실시하기 전 타우린 결핍 식이로 6주 간 예비 사육시켰다. 본 연구의 결과를 요약하면 다음과 같다.

1) 고단백 식이(HPOT & HPNT)는 저단백 식이

(LPOT & LPNT)에 비해 간의 무게 뿐 아니라 체중 대 간 무게의 비율에 유의적인 증가를 초래하였으나 ($p < 0.001$), 간의 세포 수에는 영향을 미치지 못하였다.

2) 전혈 및 간의 타우린 농도는 식이내 타우린의 함량 뿐 아니라 단백질 함량과 유의적인 양의 상관 관계를 보였으며 ($p < 0.001$), 총 11주 동안의 타우린 결핍식이의 섭취로 인해 체내 타우린 pool이 현격히 고갈되었다.

3) 고양이의 간 조직에서 80% 이상의 cysteine이 cysteine desulphydrase에 의해 이화되며, 나머지 20% 미만이 transamination/transsulphydration 경로에 의해 대사되는 것으로 나타났다.

4) 간에서의 총 cysteine desulphydration 활성($\mu\text{mol H}_2\text{S} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kg body wt}^{-1}$)은 LPOT, LPNT, HPOT와 HPNT군에서 각기 117 ± 6 , 135 ± 10 , 137 ± 10 , 그리고 190 ± 9 로 나타났다.

5) 간에서의 총 cysteine desulphydration 활성(UA / g liver)은 타우린 결핍 식이에 의해 유의적으로 감소한 반면 ($p < 0.01$), 식이내 단백질 함량에 의해서는 증가하는 경향을 보였으나 유의적인 차이를 나타내지 못하였다. 한편 cysteine desulphydration 활성이 UA/kg body wt으로 표현된 경우에는 식이내 타우린 뿐만 아니라 단백질 함량과 유의적인 양의 상관 관계를 나타내어 ($p < 0.001$) 타우린 첨가 식이와 고단백 식이에 의해 개체의 cysteine 대사 능력이 크게 향상되었음을 알 수 있다.

Literature Cited

- 1) Bagley PJ, Stipanuk MH. Rats fed a low protein diet supplemented with sulfur amino acids have increased cysteine dioxygenase activity and increased taurine production in hepatocytes. *J Nutr* 125 : 933-940, 1995
- 2) Stipanuk MH, Bagley PJ, Hou YC, Bella DL, Banks MF, Hirschberger LL. Hepatic regulation of cysteine utilization for taurine synthesis. *Adv Expt Med & Biol* 359 : 79-89, 1994
- 3) Griffith OW. Cysteinesulfinate metabolism. *J Biol Chem* 258 : 1591-1598, 1983
- 4) Goswami MND, Robblee AR, Mc Elroy LW. Further observations on factors affecting L-cysteine desulphydrase activity in the chicken liver. *J Nutr* 68 : 671-682, 1959
- 5) Simpson RC, Freedland RA. Factors affecting the rate of gluconeogenesis from L-cysteine in the perfused rat liver. *J Nutr* 106 : 1272-1278, 1976
- 6) Wlodek L, Wrobel M, Czubak J. Transamination and transsulphuration of L-cysteine in Ehrlich ascites tumor cells and mouse liver. The nonenzymatic reaction of L-cysteine with pyruvate. *Int J Biochem* 25(1) : 107-112, 1993

- 7) Taniguchi M, Hosaki Y, Ubuka T. Transaminative metabolism of L-cysteine in guinea pig liver and kidney. *Acta Med Okayama* 38(4) : 375-380, 1984
- 8) Ubuka T, Ishimoto Y, Akagi R. Transaminative metabolism of L-cysteine in rat tissues. *J Inher Metab Dis* 4 : 65-66, 1981
- 9) Ubuka T, Yuasa S, Ishimoto Y, Shimomura M. Desulfuration of L-cysteine through transamination and transsulfuration in rat liver. *Physiol Chem & Physics* 9 : 241-246, 1977
- 10) Kun E, Fanshier DW. Isolation and properties of a β -mercaptopyruvate cleaving copper enzyme. *Biochim Biophys Acta* 32 : 338-348, 1959
- 11) Tarr HLA. The enzymic formation of hydrogen sulphide by certain heterotrophic bacteria. *Biochem J* 27 : 1869-1874, 1933
- 12) Kredich NM, Keenan BS, Foote LJ. The purification and subunit structure of cysteine desulfhydrase from *Salmonella typhimurium*. *J Biol Chem* 247(22) : 7157-7162, 1972
- 13) Kredich NM, Foote LJ, Keenan BS. The stoichiometry and kinetics of the inducible cysteine desulfhydrase from *Salmonella typhimurium*. *J Biol Chem* 248(17) : 6187-6196, 1973
- 14) Taniguchi M, Hosaki Y, Ubuka T. Transaminative metabolism of L-cysteine in guinea pig liver and kidney. *Acta Med Okayama* 38(4) : 375-380, 1984
- 15) Akagi R. Purification and characterization of cysteine aminotransferase from rat liver cytosol. *Acta Med Okayama* 36(3) : 187-197, 1982
- 16) Ubuka T, Umemura S, Yuasa S, Kinuta M, Watanabe K. Purification and characterization of mitochondrial cysteine aminotransferase from rat liver. *Physiol Chem & Physics* 10 : 483-500, 1978
- 17) Yamaguchi K, Hosokawa Y, Niizeki S, Tojo H, Sato I. Nutritional significance of cysteine dioxygenase on the biological evaluation of dietary protein in growing rats. *Prog Clin Biol Res* 179 : 23-32, 1985
- 18) Jerkins AA, Bobroff LE, Steele RD. Hepatic cysteine sulfinic acid decarboxylase activity in rats fed various levels of dietary casein. *J Nutr* 119 : 1593-1597, 1989
- 19) Jerkins AA, Steele RD. Quantification of cysteine sulfinic acid decarboxylase in male and female rats : Effect of adrenalectomy and methionine. *Arch Biochem & Biophys* 294(2) : 534-538, 1992
- 20) Rentschler LA, Hirschberger LL, Stipanuk MK. Response of the kitten to dietary taurine depletion : Effects of renal reabsorption, bile acid conjugation and activities of enzymes involved in taurine synthesis. *Comp Biochem Physiol* 84B : 319-325, 1986
- 21) Moise NS, Pacioretty LM, Kalfelz FA, Stipanuk MH, King JM, Gilmour RF Jr. Dietary taurine deficiency and dilated cardiomyopathy in the fox. *Am Heart J* 121(2) : 541-547, 1991
- 22) Yamaguchi K, Sakakibara S, Asamizu J, Ueda I. Induction and activation of cysteine oxidase of rat liver II. The measurement of cysteine metabolism in vivo and the activation of in vivo activity of cysteine oxidase. *Biochem Biophysics Acta* 297 : 48-59, 1973
- 23) Drake MR, De La Rosa J, Stipanuk MH. Metabolism of cysteine in rat hepatocytes. Evidence for cysteine sulphinate-independent pathways. *Biochem J* 244 : 279-286, 1987
- 24) Stipanuk MH, Bagley PJ, Coloso RM, Banks MF. Metabolism of cysteine to taurine by rat hepatocytes. *Adv Expt Med & Biol* 315 : 413-421, 1992
- 25) Coloso RM, Stipanuk MH. Metabolism of cyst(e)ine in rat enterocytes. *J Nutr* 119 : 1914-1924, 1989
- 26) Rigo J, Senterre J. Is taurine essential for the neonates? *Biol Neonate* 32 : 73-76, 1977
- 27) De La Rosa J, Drake MR, Stipanuk MH. Metabolism of cysteine and cysteine sulfinic acid in the rat and cat hepatocytes. *J Nutr* 117 : 549-558, 1987
- 28) Stipanuk MH, Beck PW. Characterization of the enzyme capacity for cysteine desulfhydration in liver and kidney of the rat. *Biochem J* 206 : 267-277, 1982
- 29) Stipanuk MH, King KM. Characteristics of the enzymatic capacity for cysteine desulfhydration in cat tissues. *Comp Biochem Physiol* 73B(3) : 595-601, 1982
- 30) Downs TR, Wilfinger WW. Fluorometric quantification of DNA in cells and tissues. *Anal Biochem* 131 : 538-547, 1983
- 31) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193 : 265-275, 1951
- 32) Rogers QR, Morris JG. Why does the cat require a high protein diet? In : Anderson RS ed. Nutrition of the Dog and Cat, pp45-66, Pergamon Press, New York, 1980
- 33) National Research Council. Taurine Requirement of the Cat, pp. 1-4, National Academy Press, Washington D.C., 1981
- 34) Park TS, Rogers QR, Morris JG, Chesney RW. Effect of dietary taurine on renal taurine transport by proximal tubule brush border membrane vesicles in the kitten. *J Nutr* 119 : 1452-1989
- 35) Sturman JA, Messing JM. Dietary taurine content and feline reproduction and outcome. *J Nutr* 121(8) : 1195-1203, 1991
- 36) Park TS, Rogers QR. Changes in blood and tissue free amino acid concentrations in cats adapted to low- and

- high-protein diets. *Korean J Nutr* 28(10) : 976-985, 1995
- 37) Yao K, Kinuta M, Akagi R. Cat liver cystathionase. *Physiol Chem Phys* 11 : 257-260, 1979
- 38) Uren JR, Ragin R, Chaykovsky M. Modulation of cysteine metabolism in mice-Effects of propargylglycine and L-cysteine-degrading enzymes. *Biochem Pharmacol* 27 : 2807-2814, 1978