

꽃채다슬기의 에스테라제 아이소자임

이 준 상 · 김 선 균 · 조 동 현

강원대학교 자연과학대학 생물학과
대전실업전문대학*

= Abstract =

Esterase Isozyme of *Semisulcospira gottschei*

Jun-Sang Lee, Sun-Kyun Kim and Dong-Hyun Cho

Department of Biology, Kangweon National University, Chuncheon, 200 701, Korea
Taejeon Vocational Junior College*

Polyacrylamide gel electrophoresis was used to reveal the esterase isozyme patterns of a freshwater snail, *Semisulcospira gottschei*, in the lake Uiam. From the result with inhibitors, it is tentatively concluded that four types (arylesterase, carboxylesterase, acethylesterase, acetylcholinesterase) of esterase are present in adult tissues. The degree of esterase variations of the adult (means of allele per locus=1.16, %polymorphism=16.7, heterozygosity=0.082) was lower than the juveniles (\bar{A} =1.7, %P=16.7, H_D =0.2215).

서 론

꽃채다슬기(*Semisulcospira gottschei*)는 연체동물, 복족류의 일종으로 의암호를 비롯한 북한강 수계에 풍부히 분포하고 있으나, 이에 관한 생화학적인 연구는 Kim(1986)과 Kim(1995)에 의한 동위효소 변이에 대한 연구가 있을뿐이다. 특히, 복족류의 에스테라제 동위효소는 생물학적으로 다양하게 나타나지만(Coles, 1969; Morill & Norris, 1965; Norris & Morill, 1964; Wright *et al.*, 1966), 이 효소는 기질 특이성이 낮고 복잡한 다형현상 때문에 생화학적으로 구별하기 쉽지 않다(Augustinsson, 1958; Kirsch, 1971). 그럼에도 연

체동물의 에스테라제 동위효소에 관한 연구는 대부분 분류학(Wright & Awan, 1976)이나 집단유전(Wiem-Anderson, 1973)에 관한 것이고 따라서 이 연구는 꽃채다슬기(*Semisulcospira gottschei*)를 대상으로 각 에스테라제 기질 특이성을 확인하고 동위효소의 종내 변이를 성패와 유생 사이에서 살펴보았다.

재 료 및 방 법

1. 실험재료

실험에 사용된 꽃채다슬기는 북한강 상류의 의암호에서 2회에 걸쳐 총 150개체를 채집하여 실험재료로 사용하였다.

2. 분자량 측정

Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel

본 연구는 강원대학교 학술진흥재단 지원에 의한 것임

electrophoresis(SDS-PAGE) 방법으로 실험대상 종의 구성 단백질의 분자량 측정을 위하여 실험대상 종을 48시간 이상 굼겨 소화관을 비운 후 deep freezer (-80℃)에 보관하였다. 실험에 사용할 시료는 전체 조직과 증류수의 비율을 1:1(W/V)로 하여 4℃에서 glass-homogenizer로 조직을 파쇄 한 후 원심분리기(Sovall. RC-5C, USA)를 사용하여 15,000 rpm(27,000 x g)으로 30분간 저온(4℃) 원심분리 하여 지방층을 제거한 상등액을 얻어 시료로 사용하였다.

전기영동을 위한 겔은 4%의 stacking 겔과 12%의 separating 겔을 중합한 불연속 겔을 사용하였고 Laemmli(1970)의 방법에 따라 BIO-RAD(USA)의 protein II dual slab cell(USA)을 사용하여 180 V의 정전압 하에서 1시간 동안 실시하였다. 각 분획의 분자량을 알아보기 위한 지표단백질은 trypsin inhibitor(20,100), trypsinogen(24,000), carbonic anhydrase(29,000), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(36,000), chicken egg albumin(45,000), bovine serum albumin(66,000)을 사용하였다. 염색은 0.1% coomassie blue로 1시간 염색한 후 탈색 한 다음 각 밴드의 상대 이동 값을 구하여 분자량을 추정하였다.

3. 에스터라제 검출

에스터라제 검출을 위한 전기영동 겔은 Laemmli(1970)의 방법에 SDS가 첨가되지 않은 4% stacking 겔과 12% separating 겔을 중합한 불연속 poly-acrylamide 겔을 사용하였고, 전기영동 전개는 4℃의 냉장고에서 120V의 정전압으로 2시간 동안 실시하였다. 전개된 겔의 에스터라제 검출을 위하여 Gomori(1953)의 방법을 변형한 인산완충용액(0.05 M, pH 6.9)과 fast blue RR을 혼합시킨 후 acetone 용액에 용해시킨 2%의 α -naphthyl acetate, α -naphthyl propionate, β -naphthyl acetate, β -naphthyl propionate 4가지를 기질로 사용하여 암실에서 30분간 37℃로 향온 발색처리 하였다.

4. 저해제 처리

전기영동된 겔을 각각 phenylmethyl sulfonyl

fluoride(10^{-3} M), eserine(10^{-3} M), p-chloromercuribenzoate(10^{-3} M), acetylcholine iodide(10^{-3} M), urea(1 M)의 저해제 용액에 30분간 침적한 후 α -naphthyl acetate를 기질로 하여 에스터라제 검출과 동일한 방법으로 pH 6.9의 인산완충 용액에서 30분간 향온 발색처리 하였고, 열 저해를 위해 시료를 55℃에서 5분간 중탕 후 전기영동하여 동일한 방법으로 발색 처리하였다.

5. 성패의 에스터라제 아이소자임 변이

48시간 이상 굼겨 소화관을 비운 성패 15개체를 암수 구별없이 α -naphthyl acetate를 기질로 처리하여 종내 에스터라제 아이소자임 변이를 알아보았다.

6. 유패의 에스터라제 아이소자임 변이

50개체의 모패 유생낭에서 난황을 모두 소모하고 완전한 패각이 형성된 방출 직전의 유패를 대상으로 50개체의 모패에서 각각 14개체의 유패를 분리한 후 hole block을 이용하여 파쇄 시킨 다음 그 추출시료를 전기영동하여 모두 유패 700개체의 에스터라제 변이를 비교하였다.

결과 및 고찰

1. 분자량 측정

꽃채다슬기 성패에서는 분자량이 115,000에서 17,000 dalton까지 15개의 주요한 구성 단백질이 검출되었으며 이중 41,000, 33,500, 18,000, 25,000, 18,000 dalton의 단백질이 비교적 많았다(Fig. 1).

2. 에스터라제 검출

성패의 에스터라제 동위효소의 기질 특이성을 알아보기 위하여 α -naphthyl acetate, α -naphthyl propionate, β -naphthyl acetate, β -naphthyl propionate의 4가지 기질로 염색하였다. 그결과 α -naphthyl acetate는 6개의 유전자좌로 구성된 에스터라제 동위효소가 검출되었고 β -naphthyl acetate는 4개의 유전자좌로, α -naphthyl propionate와 β -naphthyl

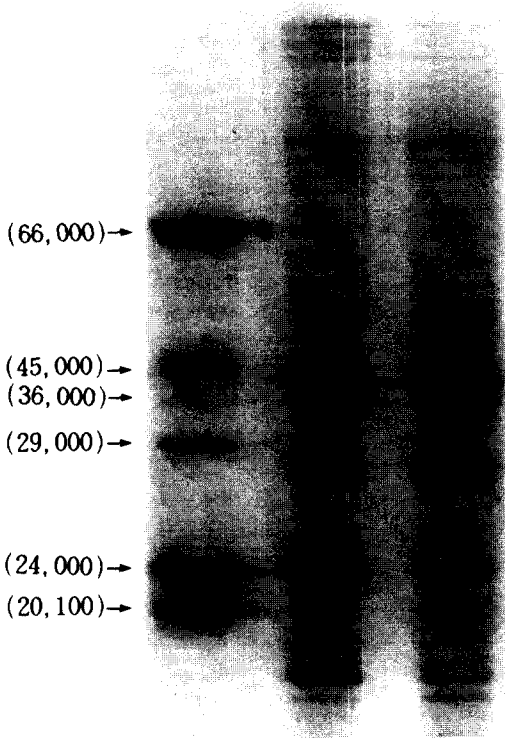


Fig. 1. SDS-PAGE pattern of water soluble proteins from *S. gottschei*.

propionate는 모두 2개의 유전자좌로 구성된 에스테라

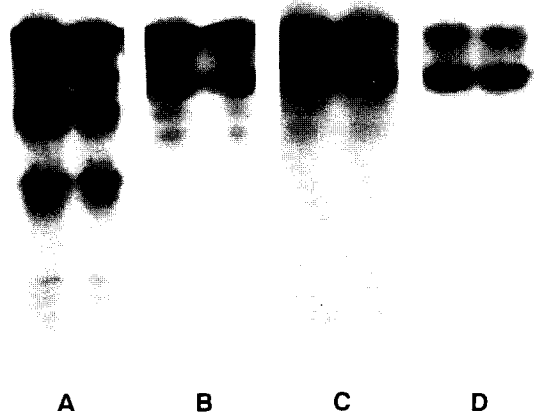


Fig. 2. Substrate profile of esterase in *S. gottschei*.

A: α -Naphthyl acetate, C: α -Naphthyl propionate
B: β -Naphthyl acetate, D: β -Naphthyl propionate

제 동위효소를 보였다. 전반적으로 propionate 보다 acetate에 대한 활성도가 높은 것으로 보아 기질의 치환기 위치보다는 기질이 지니는 탄소수의 차이에 따라 활성의 차이가 있었고 이 결과는 Choi(1990)의 논문우렁이를 대상으로 한 연구 결과와도 일치하였다(Fig. 2).

3. 저해제 처리

11개의 에스테라제 동위효소 밴드가 확인된 α



Fig. 3. Inhibition patterns of *S. gottschei*.

A: control, B: eserine (10^{-3} M), C: p-chloromercuri benzonate (10^{-3} M),
D: acetylcholineiodide (10^{-3} M), E: urea(1 M), F: heating (55°C)

Table 1. Allele frequencies of esterase in adult

allele	loci					
	Est-1	Est-2	Est-3	Est-4	Est-5	Est-6
a	1.00	1.00	0.57	1.00	1.00	1.00
b	-	-	0.43	-	-	-

-naphthyl acetate를 기질로하여 phenylmethyl sulfonyl fluoride(10^{-3} M), eserine(10^{-3} M), p-chloro mercuribenzoate(10^{-3} M), acetylcholine iodide (10^{-3} M), urea(1 M)의 저해제와 55°C 열처리 등으로 에스터라제를 저해한 결과(Fig. 3) 콧체다슬기의 에스터라제 동위효소는 acetylcholinesterase, carboxyl esterase, acethyl esterase, arylesterase로 구성 되어 있었다.

Fig. 3의 대조구상에 나타난 에스터라제는 모두 11개의 밴드로 구성되어 있었고 이 밴드중 1, 2, 5, 8번

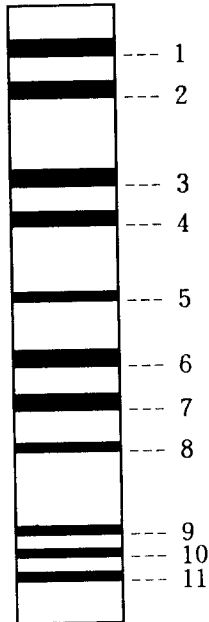


Fig. 4. Esterase isozyme of adult *S. gottschei*.
 Aryl esterase:1, 2, 5, 8
 Acethyl esterase: 6, 7
 Acethylcholine esterase: 9, 10, 11
 Carboxyl esterase: 3, 4

밴드는 요소와 열처리에 저해가 잘되었고, acethylcholine iodide에 저해되지 않은 것으로 보아 aryl-esterase로 볼 수 있었으며 3, 4번 밴드는 urea에 저해되고 acethylcholine iodide와 열처리에는 저해되지 않았으므로 carboxyl esterase로 생각되며 6, 7번 밴드는 모든 저해제에 저해되지 않아 acethyl esterase로 보이며 9, 10, 11번 밴드는 모든 저해제에 저해되므로 acethyl cholin esterase로 볼 수 있었다(Fig. 4).

따라서 콧체다슬기의 11개 esterase band는 4개의 aryl esterase와 2개의 carboxyl esterase, 2개의 acethyl esterase, 3개의 acethylcholine esterase로 구성되어 있었다.

4. 성패의 에스터라제 동위효소 변이

15개체의 성패에서 나타난 에스터라제는 모두 6개의 유전자좌로 나타났다(Fig. 5). 이중 Est-3의 유전자좌만이 polymorphic한 양상을 보였고 나머지 유전자좌는 모두 monomorphic한 상태로 나타났고(Table 1), 유전자좌당 대립형질은 1.16개, 다형형의 빈도는 16.7%, 이형접합자의 빈도는 0.0082로 낮은 유전적 변이를 나타내었다(Table 2).

5. 유패의 에스터라제 동위효소 변이

유패 700개체를 α -naphthyl acetate로 기질 처리하

Table 2. Mean of allele per locus(A), % polymorphism(P) and heterozygosity(H_D) of esterase in adult

allele per locus(\bar{A})	% polymorphism (P)	heterozygosity (\bar{H}_D)
1.16	16.7	0.082

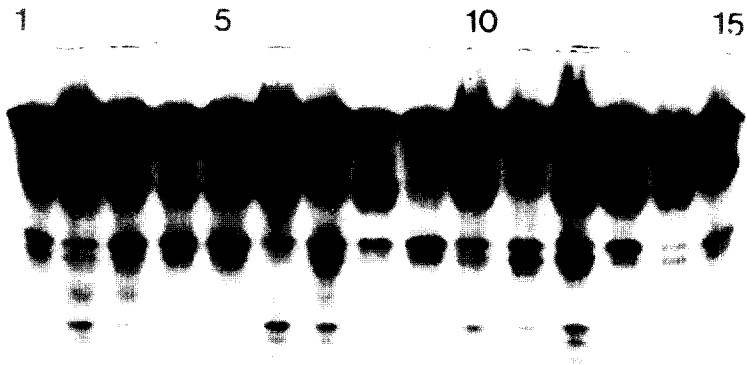


Fig. 5. Esterase isozyme pattern of adults.

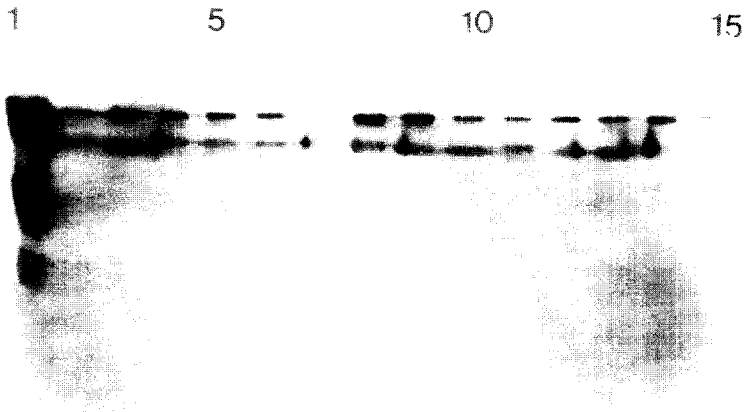


Fig. 6. Esterase isozyme patterns of juvenile *S. gottschei*.

1: adult, 2-14: juveniles

여 에스테라제 동위효소 변이를 알아 본 결과는 다음과 같다.

한 암컷에서 분리된 유패 14개체를 하나의 집단으로 하여 50개의 집단, 모두 700개체의 에스테라제 동위효소를 살펴 본 결과 꽃채다슬기 유패는 성패의 2번과 3번의 에스테라제 밴드 위치에 해당하는 2개의 유전자좌(EST-1과 EST-2)로 분리되어 나타났고(Fig. 5), 이 유전자좌 이외에 나타난 밴드는 분명치 않아 대상에서 제외하였다. 이 위치에서의 유패 에스테라제

는 성패의 aryl esterase와 carboxyl esterase에 해당하였고 이것은 발생도중 계속 나타나는 기본적인 세포기능에 필요한 효소로 생각된다(O'Melia, 1972). 전체적으로 EST-1 보다는 EST-2가 높은 이형접합자의 빈도를 나타내었고(Table 3), 유패 에스테라제의 유전자좌당 평균 대립형질의 수는 1.7개, 다형성의 빈도는 39.3%, 이형접합자의 빈도는 0.2215로 나타나 성패(Table 2)에 비해 높은 유전적 변이 현상을 나타내었다(Table 4). 유패의 이러한 유전적 변이는 대부분의

Table 3. Allele and heterozygosity frequencies of the esterases in juveniles

No	allele loci	Est-1		Est-2		H _D
		a	b	a	b	
1		1.00	-	0.86	0.14	0.12
2		0.89	0.11	0.61	0.39	0.33
3		1.00	-	0.14	0.86	0.12
4		1.00	-	1.00	-	0
5		1.00	-	0.11	0.89	0.10
6		0.79	0.21	0.14	0.86	0.29
7		1.00	-	0.07	0.93	0.07
8		0.46	0.54	0.86	0.14	0.37
9		1.00	-	0.89	0.11	0.10
10		1.00	-	0.86	0.14	0.12
11		0.79	0.21	0.43	0.57	0.41
12		0.50	0.50	0.82	0.18	0.40
13		0.96	0.04	0.25	0.75	0.22
14		0.82	0.18	0.93	0.07	0.21
15		1.00	-	0.07	0.93	0.07
16		1.00	-	0.36	0.64	0.23
17		1.00	-	0.14	0.86	0.12
18		0.46	0.54	0.07	0.93	0.31
19		1.00	-	0.14	0.86	0.12
20		0.61	0.39	0.18	0.82	0.38
21		0.82	0.18	1.00	-	0.15
22		0.68	0.32	0.39	0.61	0.45
23		1.00	-	0.07	0.93	0.07
24		1.00	-	0.21	0.79	0.17
25		0.71	0.29	0.25	0.75	0.39

No	allele loci	Est-1		Est-2		H _D
		a	b	a	b	
26		0.71	0.29	0.36	0.64	0.44
27		1.00	-	0.11	0.89	0.10
28		1.00	-	1.00	-	0
29		1.00	-	0.33	0.67	0.22
30		0.75	-	0.93	0.07	0.25
31		0.79	0.21	1.00	-	0.17
32		1.00	-	0.21	0.79	0.17
33		1.00	-	0.50	0.50	0.25
34		0.97	0.03	0.21	0.79	0.23
35		1.00	-	0.57	0.43	0.25
36		0.96	0.04	0.32	0.68	0.25
37		0.86	0.14	0.61	0.39	0.36
38		0.96	0.04	0.50	0.50	0.29
39		1.00	-	0.03	0.97	0.07
40		1.00	-	0.86	0.14	0.12
41		0.93	0.07	0.03	0.97	0.13
42		0.93	0.07	0.07	0.93	0.13
43		1.00	-	0.36	0.64	0.23
44		0.71	0.29	1.00	-	0.21
45		0.89	0.11	0.32	0.68	0.31
46		0.57	0.43	0.46	0.54	0.49
47		0.89	0.11	0.57	0.43	0.34
48		0.89	0.11	1.00	-	0.10
49		0.86	0.14	0.43	0.57	0.37
50		0.64	0.36	0.54	0.46	0.48

Table 4. Mean of allele per locus(A), % polymorphism(P) and heterozygosity(H_D) of juveniles

allele per locus(\bar{A})	% polymorphism (P)	heterozygosity (\bar{H}_D)
1.70	39.3	0.2215

북쪽류에서 일어나는 에스터라제의 다형현상(Norris and Morrill, 1964; Morrill and Norris, 1965; Wright *et al.*, 1966)과 유사한 양상을 보인다.

결론

의암호에 서식하는 꽃체다슬기를 대상으로 에스터라제 아이소자임을 연구한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

꽃체다슬기 에스터라제는 α -naphthyl acetate에서 가장 높은 활성도를 나타내었다.

α -naphthyl acetate기질에 대한 저해제의 반응 결과 4개의 aryl esterase, 2개의 carboxyl esterase, 2개의 acethyl esterase, 3개의 acethylcholine esterase를 확인하였다.

성패의 에스테라제 변이는 유전좌낭 대립형질이 1. 16개, 다형형의 빈도가 16.7%, 이형접합자의 빈도가 0.082의 낮은 유전적 변이를 보였다.

유패의 에스테라제 변이는 유전좌낭 대립형질이 1. 7개, 다형형의 빈도가 39.3%, 이형접합자의 빈도가 0.2215의 비교적 높은 유전적 변이를 보였다.

참 고 문 헌

- Augustinsson, K.B. (1958) Electrophoretic separation and classification of blood plasma esterase. *Nature, Lond.* **181**: 1786-1789.
- Choi, Y.S. (1990) Developmental changes in the esterase of the freshwater snail, *Cipango paludina chinensis*. *J. of Science & Technology* **29**: 18-24.
- Coles, G.C. (1969) Isoenzymes of snail liver - 1. Hydrolysing enzymes and peroxydase. *Comp. Biochem. Physiol.*, **29**: 403-411.
- Gomori, G. (1955) Histochemistry of human esterases. *J. Histochem. Cytochem.* **3**: 479-484.
- Kim, C.H. (1986) Electrophoretic study of *S. gottschei* in Korea. *Kor. J. Malacology*, **2**(1): 30-34.
- Kim, J.J. (1995) Isozyme variations of the genus *Semisulcospira* (Pleuroceridae: Gastropoda) in Korea. *Kor. J. Malacology*, **11**(2): 171-179.
- Krisch, K. (1971) Carboxylic ester hydrolases. *In: The enzymes V.* (ed. by Boyer, P.D.), pp. 43-69. *Academic Press, New York*
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. **227**: 680-685.
- Morill, J.B. and Norris, E. (1965) Electrophoretic analysis of hydrolytic enzymes in the *Hyanassa* embryo. *Acta. Embryol. Exp.* **8**: 232-238.
- Norris, E. and Morill, J.B. (1964) An eletrophoretic analysis of hydrolytic enzymes in adult organ and developing embryo of *Lymnaea palustris*. *Acta. Embryol. Exp.* **7**: 29-41.
- O'Melia, A.F. (1972) Change in esterase and cholinesterase isoenzymes in normally developing embryo : Animalized and radialized embryo of *Arbacia punctulate*. *Exp. Cell Res.*, **73**: 469-474.
- Wiem-Anderson, G. (1973) Electrophoretic studies on esterases of some African *Biomphalaria* spp. *Malacologia*. **12**: 115-122.
- Wright, C.A., File, S.K. and Ross, G.C. (1966) Studies on the enzyme system of planorbid snail. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, **60**: 522-525.
- Wright, D.J. and Awan, F.A. (1976) Acetylcholinesterase activity in the region of the nematode nerve ring : Improved histochemical specificity using ultrasonic pretreatment. *Nematologica* **22**: 326-331.