

비타민 C가 가용성 콜라겐의 성숙과정에서 Pyridinoline 생성 효소계에 미치는 영향

김 미 향

신라대학교 식품영양학과

The Effect of Ascorbic Acid on the Enzyme Reaction in Pyridinoline Formation during Soluble Collagen Maturation

Mi-Hyang Kim

Dept. of Food Science and Nutrition, Silla University, Pusan 617-736, Korea

Abstract

Normal tensile strength in collagen fibrils is due to intermolecular and intramolecular crosslinks which are known to be altered in aging. Pyridinoline, a mature crosslink which is stable and non-reducible, is derived from two hydroxyallysine and one hydroxylysine residues of collagen fibrils. The excess formation of pyridinoline in collagen is associated with making the tissue stiffer, less soluble and less digestible by enzymes. Lysyl oxidase is the enzyme that initiates the biosynthesis of crosslinks in collagen by catalyzing the oxidative deamination of the lysyl and hydroxylysyl residues in these molecules, and its activity is inhibited by β -aminopropionitrile(BAPN). Our previous work demonstrated that the pyridinoline content of bone collagen significantly was increased during incubation for 5 weeks at 37°C *in vitro*, but it was decreased by the addition of ascorbic acid(AsA). In this study, we clarified the specific action of AsA in aging process *in vitro* enzymatic reaction.

Key words: collagen, crosslink, pyridinoline, lysyl oxidase, AsA, BAPN

서 론

Collagen은 분자내 또는 분자간에 다수의 가교를 형성하여 collagen 섬유가 된다. Collagen중의 가교형성은 주로 성장과정에서 이루어지며, 특히 collagen 가교 변화는 불용화, 물리적·화학적 안정성의 증가를 초래한다고 알려져 있다(1-9). 그러므로, 가교증가에 의한 collagen 불용화는 조직경화를 일으킬 수 있는 가능성을 제시하고 있다. Pyridinoline은 collagen의 성숙가교 물질로서 hydroxylysine(Hyl) 1분자와 생체내에서 효소적 반응에 의해 생성되어진 hydroxyallysine 2분자가 결합하는 비효소적 반응에 의해 생성된다(10-13).

Lysyl oxidase는 collagen 분자내의 Hyl 및 Lys(lysine)잔기를 산화적으로 탈아미노화하여 hydroxyallysine 잔기 또는 allysine잔기의 형성을 촉매하는 효소이다. 또한 유리의 Hyl과 Lys에는 활성을 가지지 않으나, 세포외에서 fibril을 형성한 collagen 분자 중의 Lys 또는 Hyl에만 작용하며, 이 반응에 대한 특이한 저해인자로서 β -aminopropionitrile(BAPN)이 알려져 있다(14-19).

Siegel(20)은 pyridinoline을 포함하지 않는 태내병 아리 연골 중의 염가용성 collagen에 lysyl oxidase를 첨가하여 37°C에서 10일간 가온하였을 때 pyridinoline 생성을 확인하였고, 5주째의 pyridinoline 생성량은 0.144 mmol/mol hydroxyproline(Hyp)로서 lysyl oxidase 무첨가에 비해 확실히 증가되었음을 보고하였다. 즉, 반응 초기에 Hyl은 lysyl oxidase에 의하여 hydroxyallysine으로 변화하였고, 장시간의 가온에 의해 비효소적으로 pyridinoline이 생성되었음을 나타내고 있다. 앞서의 보고(21)에서 저자는 생체내에서의 lysyl oxidase에 의해 이미 생성된 hydroxyallysine을 포함하는 기질을 사용하여 pyridinoline 생성에 미치는 비타민 C(ascorbic acid; AsA)의 영향을 조사하였다. 그 결과, collagen 중의 pyridinoline은 *in vitro* aging에 있어서도 증가하며, 이러한 pyridinoline의 생성증가는 AsA 첨가에 의해 억제되었다. 이와 관련하여 본 연구에서는, pyridinoline 생성에 대한 AsA의 새로운 역할을 더욱 명확하게 하기 위해, hydroxyallysine 등의 collagen 가교를 포함하지 않는 염가용성 collagen을 시료로 사용하여 효소적, 비

효소적 반응시 생성되는 pyridinoline 함량과 pyridinoline 생성에 미치는 AsA의 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

재료 및 시약

D-Penicillamine hydrochloride 및 dehydroascorbic acid(DHA)는 Sigma Chemical Company(USA)로부터 구입하였고, ascorbate(AsA), erythorbate(ErA), catalase, glutathione(GSH), hydroquinone, sodium dodesyl sulfate(SDS), bromophenol blue(BPB) 및 *t*-methylene-diamine(TEMED)은 (주)和光純藥工業(Japan)에서, coomassie brilliant blue R-250는 (주)Nacalai Tesque(Japan), mercaptoethanol는 Merck Co.(USA)로부터 구입하였다. 소의 대동맥은 (주)東京芝浦臓器(Japan)에서 도살 직후의 신선한 것을 구입하였고, 200g 전후의 hartley계 수컷 guinea pig는 埼玉 실험동물공급소(Japan)에서 구입하였다. Diethylaminoethyl cellulose(DE52)는 Whatman으로 부터, 소혈청알부민은 (주)생화학공업(Japan)으로부터 구입하였다. Pyridinoline 표준물질은 Fujimoto와 Moriguchi(22)의 방법에 의해 추출하였다. 2,3-Diketo-L-gulonic acid(DKG)는 齋川과 龍口(23)의 방법에 의하여 합성하였다. 합성한 DKG는 dinitrophenylhydrazine법 및 HPLC에 의해 순도를 조사하여 98% 이상의 것을 사용하였다.

DE52 이온 교환수지의 조제

DE52 이온 교환전조제 20g에 500ml의 증류수를 첨가하여 잘 저은 후 30~40분 정치 후 상등액을 폐기하는 과정을 여러번 반복하여 불순물인 미립자를 제거한 후 0.5N NaOH-물-0.5N HCl-물-0.5N NaOH-물의 순서로 세정하였다. 알칼리와 산으로 세정한 교환수지는 glass wool로 선단을 채운 glass column(3.0×20cm)에 충전하여 완충액A(6M urea/0.1M Tris-HCl buffer, pH 7.6)로 평형화하였다.

Lysyl oxidase의 부분정제

Lysyl oxidase의 조제법을 Fig. 1에 나타내었다. 지방을 제거한 소의 대동맥 20g에 완충액B(0.15M NaCl/0.1M sodium phosphate buffer, pH 7.8)를 40ml 가하여 균질화한 후 원심분리에 의하여 얻어진 침전물에 완충액A를 가하여 효소를 추출하였다. 얻어진 조효소액을 전처리한 DE52 column에 부하하여 완충액A 200ml를 혼합조에, 0.5M NaCl을 포함한 완충액A 200ml를 보급조에 넣고 직선적 농도기울기에 의해 용리하였다.

Bovine aorta(20g)

- Added 40ml of Buffer A¹⁾
- Homogenized at 4°C
- Centrifuged at 17,000g for 10min

Pellet

- Added 40ml of Buffer B²⁾
- Homogenized at 25°C
- Centrifuged at 40,000g for 60min

Supernatant

- Loaded on DEAE-52 cellulose column(30×20cm)
- Washed with Buffer B²⁾ until the absorbance of the eluate at 280nm was about 0.2
- Eluted with linear gradient(200ml of Buffer B²⁾ and 200ml of 0.5M NaCl/Buffer B²⁾)

Eluate

- Monitored at A₂₈₀

Fraction(No 16~38)

Lysyl oxidase

- ¹⁾Buffer A: 0.15M NaCl/0.1M Na₂HPO₄ buffer(pH 7.8)
²⁾Buffer B: 6M Urea/0.05M Tris-HCl buffer(pH 7.6)

Fig. 1. Purification of lysyl oxidase by DEAE-52 cellulose ion exchange column chromatography.

용출액은 fraction collector를 이용하여 9ml씩 분획하여 자외선 280nm에서 흡광도 0.2 이상을 나타내는 용출획분을 모아, 완충액B 중에서 2일간 투석하였다. 이상의 조작에 의해 얻어진 투석내액을 조효소액으로 하여 동결건조 후 -80°C에서 동결보존하였다. 효소단백질은 Lowry(24)법에 의해 측정하였다.

기질의 조제

Guinea pig의 늑골로부터 연골을 분리하여 전처리한 후 BAPN을 첨가하여 37°C에서 2시간 가온하여 내인성 효소를 불활성화하였다. 흡인여과에 의하여 BAPN을 함유한 용액을 제거하고 1M NaCl를 포함하는 완충액C(0.05M Tris-HCl buffer, pH 7.5)로 4°C에서 2시간 collagen을 추출하였다. 원심분리에 의해 얻어진 상등액에 NaCl을 첨가하여 최종 농도 20%로 조정된 후 4°C에서 하룻밤 교반하여 원심분리에 의해 상등액의 비collagen 성분을 제거하였다. 얻어진 침사는 완충액B를 사용하여 투석한 후 원심분리하여 상등액을 기질로 하였다. 연골 5g으로부터 약 35mg의 염가용성 collagen을 얻었다.

전기영동에 의한 단백질의 분리

Gel 조제

분리gel은 15%로 하여 acrylamide, 황산암모늄, TE-

MED의 순으로 혼합하여 gel화 할 때까지 1시간 실온에 방치하였다. 같은 방법으로 4.5% 농도의 농축겔을 만들었다.

시료의 조제

효소를 시료용 완충액에 용해하여 mercaptoethanol 첨가 후 100°C에서 3분간 가열처리하였다.

전기영동

20μl의 시료를 gel에 부하하여 완충액(0.025 M Tris, 0.192M glycine, 0.1% SDS, 0.1% SDS, 0.2% BPB)을 사용하여 15mA에서 30분간 전기영동한 후 30mA에서 160분간 전기영동하였다.

염색 및 탈색

전기영동 후 gel을 coomassie brilliant blue R-250용액으로 염색한 후 5% methanol/7.5% acetic acid용액으로 하룻밤 탈색하였다.

효소활성의 측정

효소반응조건을 Fig. 2에 나타내었다. 기질의 fibril 형성을 위하여 37°C에서 2시간 preincubation한 후 조효소액을 첨가하여 37°C에서 2~6시간 효소반응을 관찰하였다. 본 효소반응에 의해 생성된 과산화수소는 산소전극을 사용하여 과산화수소계(Olidador-Model 5, Oriental 전기주식회사, Japan)로 측정하였다.

반응조건

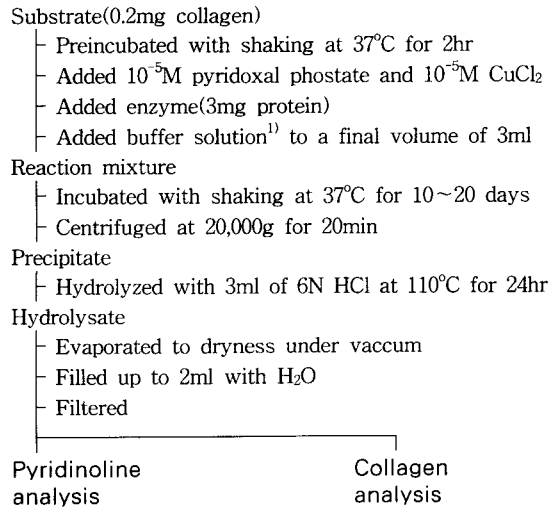
기질의 fibril형성 후 빙상에서 반응혼합액을 조제하여 조효소액 첨가와 동시에 37°C에서 10~20일간 반응하였다. 각 실험군에는 장시간 반응에 의한 세균번식을 막기 위해 2~3방울의 toluene을 표층에 가하였다. 또한 Pyr생성에 미치는 AsA의 영향을 조사하기 위해 37°C에서 14일간 반응을 실시하였다. AsA의 첨가에 의한

- Substrate(0.2mg collagen)
 - Preincubated with shaking at 37°C for 2hr
 - Added 10⁻⁵M pyridoxal phosphate and 10⁻⁵M CuCl₂
 - Added enzyme(3mg protein)
 - Added buffer solution¹⁾ to a final volume of 3ml
 - Incubated with shaking at 37°C for 2~6hr

Reaction mixture
 ↳ Determined H₂O₂ by O₂ electrode detector

¹⁾buffer solution: 0.15M NaCl/0.10M sodium phosphate buffer(pH 7.8)

Fig. 2. Enzymatic reaction for the determination of lysyl oxidase activity.



¹⁾buffer solution: 0.15M NaCl/0.10M sodium phosphate buffer(pH 7.8)

Fig. 3. Enzymatic and nonenzymatic reaction for the formation of pyridinoline.

radical 생성을 제어하기 위해 반응시작 전 catalase 0.1 mg/ml를 가하였다. 반응조건하에서 AsA의 경시적 변화를 검토하기 위해 효소를 포함하는 계와 포함하지 않는 계를 설정하여 37°C에서 24시간 반응시켜 관찰하였다(Fig. 3).

분석방법

반응종료 후 원심분리에 의해 상등액을 제거하고 침전물에 6N HCl을 첨가하여 24시간 가수분해한 후 가수분해물 중의 Pyr량과 Hyp량을 측정하였다(25,26). AsA 정량은 반응종료 후 4% HPO₃을 같은 양 첨가하여 단백질을 제거하고 원심분리에 의해 얻어진 상등액 중의 AsA를 HPLC를 이용하여 분석하였다(Table 1).

결과 및 고찰

효소의 조제법 및 활성측정법의 검토

Lysyl oxidase는 연골, 대동맥, 폐, 피부 등 여러 결합

Table 1. Chromatographic conditions for AsA analysis

Apparatus	: Shimadzu LC-5A or Hitachi 638
Detector	: UV detector(254nm)
Column	: 250×4mm id.
Packing material	: LiChrosorb-NH ₂ (Merck)
Eluent	: 0.01M H ₃ PO ₄ /0.01M Na ₂ HPO ₄ (pH 3.3)
Flow rate	: 0.7ml/min

조직 중에 존재하는 효소이며, 세포간 물질중의 collagen이나 elastin섬유에 강하게 결합하고 있으므로, 통상의 염용액에서는 거의 추출되지 않고 고농도의 요소를 사용해야만 추출할 수 있다. 또한, 효소추출 전에 0.15 M NaCl을 포함하는 0.1M 인산완충액(pH 7.8)으로 세정하면 효소의 비활성이 증대한다고 알려져 있다(27). 따라서 본 실험에서는 효소의 다량 추출 목적으로 소의 대동맥을 사용하였고, 인산완충액으로 2번 세정한 후 6M의 요소로 효소추출을 하였다. Lysyl oxidase는 glutamic acid, aspartic acid 등 산성 아미노산을 다수 포함하는 산성 단백질이다. Diethylaminoethyl(DEAE)기를 가지는 이온교환 cellulose는 산성 단백질과 강하게 결합하므로 위에서 얻어진 조효소액을 DE 52 cellulose column으로 부분정제한 후, UV 280nm에서 용출획분의 흡광도를 측정하였고 효소획분을 모아 투석하였다. 소의 대동맥에서 얻어진 부분정제 효소의 아미노산 조성 분석결과를 Table 2에 나타내었다. 부분정제효소는 Kagan 등(19)이 추출한 정제효소와 비교해서 aspartic acid, cystein 함량이 낮았고, lysine 함량은 높았다. 효소의 단백질 농도는 Lowry(24)법에 의하여 측정하였고, polyacrylamide gel 전기영동법으로 분자량을 추정하였다. Lysyl oxidase 분자량은 조직에 따라 다른 것으로 알려져 있으며, Kagan 등은 소의 대동맥으로부터 얻어진 정제효소의 분자량을 약 30,000에서 60,000으로 보고하고 있다(19). 본 실험에서도 표준단백질을 사용하여 부분정제효소의 분자량을 추정한 결과, 분자량 30,000과 60,000 부근에 짝은 band가 얻어졌다. 이효소는 전술

과 마찬가지로 유리의 HyI에 직접 작용하는 것이 아니라 collagen섬유 중의 HyI잔기에 작용하므로, pyridinoline을 함유하지 않는 2주령의 guinea pig의 연골 collagen을 기질로 하고 부분정제효소를 사용하여 model 반응계를 설정하였다. 본 효소반응에 의해 생성되는 hydroxyallysine은 대단히 불안정한 물질이므로, 반응 중간생성물인 H₂O₂를 측정하여 효소활성의 지표로 하였다. Lysyl oxidase의 산화반응에 의한 collagen 기질의 과산화수소의 생성과정은 다음과 같다.

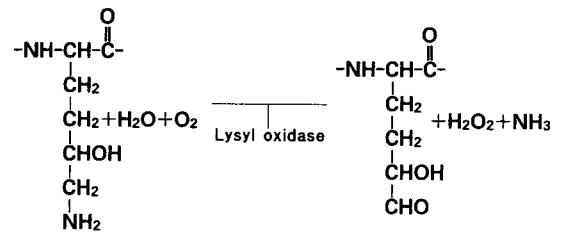


Fig. 4에 model계에서 사용한 효소량과 과산화수소의 생성량을 나타내었다. 기질의 collagen 농도 0.2mg/8mg protein에 대하여 효소량의 증가와 함께 과산화수소의 생성량은 직선적으로 증가하였다. 또한 효소에 의한 기질 collagen 중의 HyI 잔기의 산화를 확인하기 위해 6시간 동안 경시적으로 과산화수소량을 측정하였고 시간마다 반응액을 가수분해하여 HyI량의 변화를 조사하였다. 그 결과 HyI 잔기는 시간과 함께 감소하였고, 이것에 반하여 H₂O₂ 생성량은 증가하였다(Fig. 5). 이상의 결과로부터 본 실험에서 얻어진 lysyl oxidase

Table 2. Amino acid composition of semi-purified lysyl oxidase

Residue	Content(residues/1000 residues)	
	Experimental data	Reference data(19)
Aspartic acid	52.7	116.0
Threonine	60.5	53.7
Serine	62.6	103.8
Glutamic acid	134.1	127.1
Proline	51.5	52.8
Glycine	78.3	122.9
Alanine	83.2	80.0
Valine	57.5	36.9
Cysteine	7.8	20.9
Methionine	22.9	15.8
Isoleucine	46.0	29.1
Leucine	94.8	73.4
Tyrosine	37.7	23.9
Phenylalanine	40.0	27.1
Lysine	62.3	32.7
Histidine	18.6	28.5
Arginine	52.7	55.4

*Data of Kagan et al.(19)

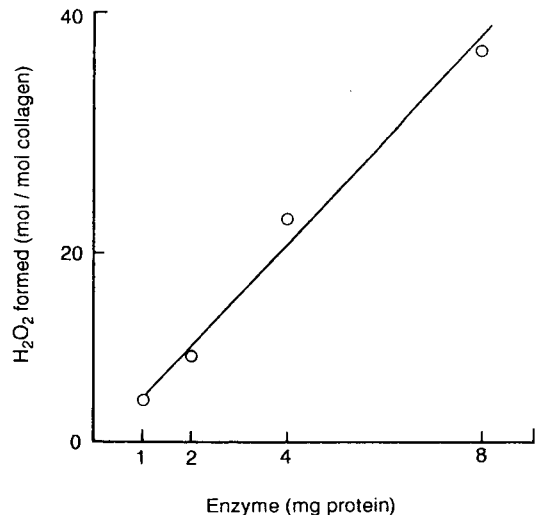


Fig. 4. The relationship between the amount of hydrogen peroxide formed and that of enzyme. Reaction solution was incubated at 37°C for 2hr.

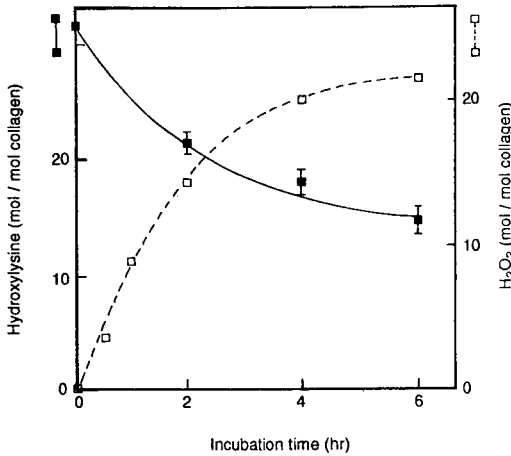


Fig. 5. The degradation of hydroxylysine and the formation of H₂O₂ in enzymatic reaction.

의 부분정제효소는 Hyl의 산화반응을 일으키는데 필요한 충분한 활성을 가지고 있는 것으로, 본 연구에서 사용할 수 있음이 확인되었다.

효소적 반응 및 비효소적 반응에서의 pyridinoline 생성

김(21)의 연구에서 fibril화가 어느정도 진행된 collagen용액을 37°C에서 4~5주간 가온하였을 때 시험관 내에서 가교물질인 pyridinoline이 생성되었음을 보고하였다. 이 반응은 *in vivo*에서 collagen 중의 Hyl이 산화되어 hydroxyallysine이 된 후의 반응이며 AsA은 pyridinoline 생성에 대해 억제작용을 하는 것으로 나타났다. 이와 관련하여 본 연구에서는 collagen 가교를 포함하지 않는 열가용성 collagen 기질에 소의 대동맥으로부터 부분정제한 lysyl oxidase를 첨가하여 효소적 및 비효소적 반응계를 포함하는 일련의 과정에서 pyridinoline 생성량에 대하여 검토하였다.

Pyridinoline 생성에 필요한 반응시간을 설정하기 위해 collagen 기질에 lysyl oxidase를 첨가하여 10일간

및 20일간 반응시켰고 그 결과를 Table 3에 나타내었다. 반응 초기 pyridinoline은 기질 collagen 중에 검출되지 않았으나(0.01mmol/mol Hyp 이하), 10일간 가온하였을 때 pyridinoline 생성량은 0.111mmol/mol Hyp로 증가하였다. 같은 조건에서 BAPN을 첨가하였을 때의 0.034mmol과 비교하였을 때 3배 이상의 생성율을 나타내었다. 20일간 가온하였을 때는 10일간의 가온과 비교하여 약 1.5배 증가하였다. 이러한 제반결과로부터 이하의 실험에서 pyridinoline 생성에 필요한 반응시간을 2주일로 설정하였다. 한편, lysyl oxidase는 구리를 포함하는 금속효소이며, 보조효인 pyridoxal-5'-phosphate의 첨가에 의해 BAPN의 효소활성 저해도 어느정도 억제 가능하다는 보고도 있으므로(28,29), 이 반응계에 구리이온 및 pyridoxal-5'-phosphate를 첨가하였다. 그 결과, pyridinoline 생성은 lysyl oxidase에 의한 효소적 반응에 의존하고 있음이 확인되었다(Table 4).

효소적 · 비효소적 반응에서 pyridinoline 생성에 미치는 AsA 및 AsA 산화물의 영향

Pyridinoline 생성에 대한 AsA, DHA 및 DKG의 영향을 효소적 · 비효소적인 일련의 반응계에서 검토하였다(Table 5). AsA 0.1mM 첨가군에서 pyridinoline 생성 억제는 크지 않았으나, 1.0mM 이상의 첨가에서 pyridinoline은 대조군의 약 60%까지 감소하였다. DKG 첨가군에 있어서도 pyridinoline은 AsA 첨가군에 비해 다소 낮은듯 하나 거의 비슷한 경향이였다. 그러나, DHA를 첨가한 경우, 0.1mM의 낮은 농도에서의 pyridinoline 생성량은 대조군의 약 70%였고 1.0mM 이상에서는 40%였다. AsA는 일반적으로 중성용액 중에서 불안정하여, 쉽게 산화되어 DHA로 되고 나아가 DKG로 변한다. 이 반응계에서 AsA은 pH 7.8의 완충액과 2가 구리이온이 포함되어 있고 호기적인 조건이므로 대단히 산화되기 쉽다. 그러므로, 효소반응 초기에 AsA 변화를 조사하기 위해 24시간 경시적으로 관찰하였다(Fig. 6). 그 결과, 효소 무첨가에 비하여 효소를 첨가한 계에서 AsA

Table 3. The influence of incubation time and BAPN on the pyridinoline formation

Incubation time(day)	Incubation condition	Pyridinoline concentration (mmol/mol Hyp)
10	Control	0.111
	control+BAPN	0.034
20	Control	0.173
	control+BAPN	0.014

Control: Enzyme+Substrate

Table 4. The influence of cofactor on the pyridinoline formation

Incubation condition	Incubation time(day)	Pyridinoline concentration (mmol/mol Hyp)
Initial contents	0	ND
Control	14	0.130
Control Cofactor	14	0.183

Collagen solution was incubated at 37°C for 14 days.
Control: Enzyme+Substrate
Cofactor: CuCl₂, Pyridoxal Phosphate

Table 5. The effect of AsA, DHA, and DKG concentration on pyridinoline formation of soluble collagen *in vitro*

Compounds	Amount added(mM)	Pyridinoline (mol/mol)	formed (%)
AsA	0.1	0.023	92.0
	1.0	0.016	64.0
	10.0	0.015	60.0
DHA	0.1	0.018	72.0
	1.0	0.010	40.0
	10.0	0.007	28.0
DKG	0.1	0.021	84.0
	1.0	0.017	68.0
	10.0	0.011	44.0
Control	initial	0.000	0.0
	Final	0.025	100

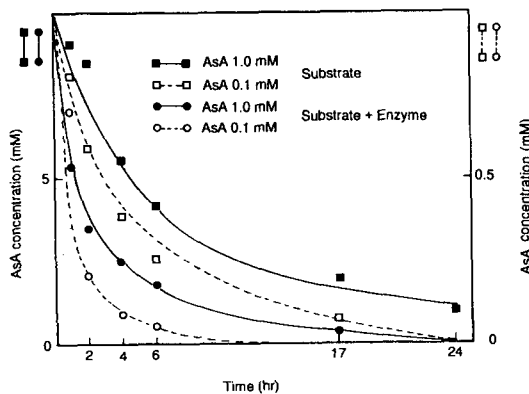


Fig. 6. The degradation of ascorbic acid(AsA) during enzymatic reaction.

의 소비율이 빠른 것으로 나타났다. Lysyl oxidase는 한분자내에 한원자의 구리를 포함하는 금속효소로서 가교반응에 필요한 구리의 농도는 2~25 μ M이라고 알려져 있다(30). 또한, 활성을 상실한 효소에 구리를 첨가하면 효소활성이 회복되는 것도 보고되어 있다. 본 실험에 사용한 효소의 구리 함량을 측정하였을 때 단백질 1g에 대하여 0.2mg 포함되어 있었으며 반응액 중의 구리 농도는 1 μ M이었다. 이러한 부분정제효소 중의 2가 구리이온을 반응 지지 농도와 비슷하게 유지하기 위해 반응시 구리를 10 μ M 되도록 첨가하였다. AsA은 구리이온을 1가로 환원하면서 산화되어지는 것으로 알려져 있고(31), 효소를 포함하는 계에서 AsA의 빠른 감소는 구리이온의 관여가 큰 것으로 추정되어진다. 이러한 결과는 AsA은 효소적 반응계에서도 초기단계에서 최종 생성물인 pyridinoline의 생성을 억제하고 있음을 시사하고 있다. 또한 AsA 보다 오히려 AsA 산화물질인 DHA가 pyridinoline 생성을 억제하는 것으로 나타났다. 본

반응계는 효소적·비효소적 반응을 포함하는 *in vitro* 계이므로 DHA가 어느 단계에서 작용하는가의 판단은 어렵다. 그러나, 앞서의 보고결과, DHA의 경우 1mM 이상의 고농도에서 pyridinoline량은 비효소적 반응만으로 대조군의 약 80%였으나(21), 효소적 반응을 포함하는 본 반응계에서는 대조군의 약 40%에 지나지 않았다. 이러한 결과는 DHA는 비효소적 반응보다 효소적 반응에 있어서 pyridinoline 생성에 강하게 작용하는 것을 암시하고 있다. Lysyl oxidase의 활성부위는 Lys 잔기이며 보조소인 pyridoxal-5'-phosphate는 효소의 Lys 잔기와 반응하여 Schiff염기를 형성한다. 기질을 첨가하였을 때 pyridoxal-5'-phosphate는 기질의 ϵ -amino기에 반응하고, 기질은 일종의 활성화 상태가 되어 이후의 일련의 반응을 유발한다는 보고도 있다(32). DHA는 α -dicarbonyl화합물이며, 반응성이 높은 효소중의 Lys 잔기의 ϵ -amino기와 결합하여 amino-carbonyl반응에 의해 효소반응을 억제할 수 있고 또는 기질 collagen 중의 Hyl 잔기의 ϵ -amino기와 반응하여 pyridinoline 생성을 억제할 가능성도 있다. 따라서 pyridinoline 이외의 다른 가교 형성에도 관여할 가능성은 충분하나, 이러한 현상이 생체내에 있어서 어떠한 의미를 가질지는 앞으로의 연구과제이다.

효소적·비효소적 반응에서 pyridinoline 생성에 미치는 각종 환원제의 영향

이상에서 효소적 반응을 포함하는 계에서는 DHA의 기여율이 높은 것으로 나타났으나, 반응 초기의 환원형 AsA 영향의 유무에 관해 명확한 결과를 얻기위해 각종 환원제의 영향을 조사하였다. 그 결과를 Table 6에 나타내었다. ErA는 AsA의 5번째 탄소원자에 결합하는 수산기의 위치가 다른 입체이성체이며 AsA와 거의 비슷한 화학적 성질을 가지며 강한 환원성을 나타낸다고 알려져 있다. ErA를 첨가한 경우의 pyridinoline 생성량은 대조군에 비해 약 70%로 AsA와 같은 억제효과를 나타냈다. GSH를 첨가하였을 때 1.0mM 이상의 농도에서 pyridinoline 생성량은 대조군의 반정도에 불과하였다. 이것은 DTT를 첨가하였을 때와 같은 결과였다. Lysyl oxidase 중에는 cysteine이 아미노산 1,000 잔기에 대해 약 30잔기 존재하고 이 disulfide 결합에 의해 효소가 안정화된다고 알려져있다(27). GSH 및 DTT와 같은 thiol 화합물은 cysteine 측쇄개열시약으로서 사용되어 지나, 본 반응계에 있어서도 lysyl oxidase의 disulfide를 절단하는 것에 의해 효소적 반응을 억제하는 것으로 추정된다. 한편, hydroquinone을 첨가하였을 때 pyridinoline 생성량은 가장 낮았으며, 작용기작은 hydroxy-

Table 6. Effect of various reducing agents on pyridinoline formation of soluble collagen *in vitro*

Compounds	Amount added(mM)	Pyridinoline (mol/mol)	formed (%)
AsA	0.1	0.023	92.0
	1.0	0.016	64.0
	10.0	0.015	60.0
ErA	0.1	0.019	76.0
	1.0	0.017	68.0
	10.0	0.017	68.0
GSH	0.1	0.018	72.0
	1.0	0.012	48.0
	10.0	0.012	48.0
DTT	0.1	0.019	76.0
	1.0	0.012	48.0
	10.0	0.010	40.0
Hydroquinone	0.1	0.012	48.0
	1.0	0.007	28.0
	10.0	0.005	20.0
Control	Initial	0	0
	Final	0.025	100

allysine의 aldehyde기의 환원 또는 반응 중간체인 dehydrohydroxylysino-norleusine의 환원 및 직접적인 lysyl oxidase 활성 저해의 가능성도 들 수 있다. Dehydrohydroxylysino-norleusine은 *in vitro*에서 환원되어지거나 생체내에서도 환원제에 의해 같은 반응이 일어나 dihydroxylysino-norleusine으로 되거나 더욱 분해한다고 알려져 있다(33). 본 반응조건하에서 사용한 환원제가 중간체의 환원에 어느 정도 관여 하는지는 불명확하나 설명 가능한 인자의 하나로서 산화 환원 전위가 있다. 가장 강한 환원성을 나타내는 hydroquinone의 산화 환원 전위는 pH 7.4, 25~30°C에서 0.69v이며, AsA의 0.058v보다 높은 것으로 알려져 있으므로(34), hydroquinone은 AsA보다 강한 환원력을 나타낸 것으로 추정된다.

이상의 결과로부터, thiol화합물인 GSH 및 DTT는 lysyl oxidase의 disulfide 결합을 절단하는 것에 의해 효소의 활성을 저해하고, pyridinoline 생성에 대하여 억제효과를 나타내는 것으로 사료된다. 또한 강력한 환원제인 hydroquinone이 AsA보다 현저하게 억제효과를 나타내었으나 pyridinoline 생성의 불안정한 반응중간 생성물이 hydroquinone에 의해 환원되어 pyridinoline 생성을 억제한 것으로도 생각할 수 있다. 따라서 AsA은 환원형으로도 pyridinoline 생성억제에 관여할 가능성도 배제할 수는 없을 것이다.

요 약

In vitro 실험에서 pyridinoline 생성에 대한 AsA의

영향을 조사한 결과, 효소적 반응에 있어서는 환원형 AsA보다 산화형 AsA으로서, 비효소적 반응에 있어서는 산화형으로 작용하였고 일부 환원형으로도 작용하여 pyridinoline 생성을 억제한 것으로 나타났다. 즉, 생체내에서의 AsA은 주로 산화형 AsA로서 pyridinoline 생성을 억제하였으며, 이것은 특히 collagen 생합성의 활발한 조직에서 collagen 생합성을 위해 AsA이 소비되고 그 결과 생성되어지는 DHA가 조직 중에 pyridinoline이 과도하게 축적되어지지 않도록 조절할 가능성을 가지고 있다. Guinea pig의 연골은 산화형 AsA 함량이 높고 더구나 다른 조직보다 pyridinoline 함량이 높은 것도 이러한 가설을 뒷받침하는 것으로 사료된다. 산화형 AsA이 pyridinoline 양을 조절하는 가능성이 시사되었으나 이것은 DHA의 새로운 역할로서 주목할 부분이며, AsA은 결합조직, 특히 연골에서 pyridinoline 생성을 조절하고 노화를 지연시키는 역할을 하는 것으로 기대된다.

문 헌

1. 藤本大三郎 : コラーゲン分子の變化とエンシング- 老化をくいとめる方法はみつかるか. 現代化學, **8**, 10(1982)
2. Fujimoto, D. : Aging and cross-linking in human aorta. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **109**, 1264(1982)
3. Simon, P. R. and Allen, J. B. : The chemistry of the collagen cross-links. *Biochem. J.*, **163**, 339(1977)
4. Simon, P. R. : Turnover and cross-linking of collagen. *Collagen in Health and Disease*, Churchill Livingstone, Edinlourgh London Melbourne and New Yorks p.160 (1982)
5. Yamauchi, M., Woodley, D. T. and Mechanic, G. L. : Aging and cross-linking of skin collagen. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **152**, 898(1988)
6. Kuboki, Y. and Mechanic, G. L. : Comparative molecular distribution of cross-links in bone and dentin collagen. *Calcif. Tissue Int.*, **34**, 306(1982)
7. Siegel, R. C. : Collagen cross-linking effect of D- penicillamine on cross-linking *in vitro*. *J. Biologic. Chem.*, **252**, 254(1977)
8. Eyre, D. R., Dickson, I. R. and Ness, K. V. : Collagen cross-linking in human bone and articular cartilage. *Biochem. J.*, **252**, 495(1988)
9. Kim, M., Otsuka, M. and Arakawa, N. : Age-related changes in the pyridinoline content of guinea pigs cartilage and achilles tendon collagen. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **40**, 95(1994)
10. Fujimoto, D. and Moriguchi, T. : Pyridinoline, a non-reducible crosslink of collagen. *J. Biochem.*, **83**, 863 (1978)
11. Fujimoto, D., Moriguchi, T. and Hayashi, H. : The structure of pyridinoline, a collagen crosslink. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **84**, 52(1978)
12. Barber, M., Bordoli, R., Elliott, G. J., Fujimoto, D. and

- Scott, S. E. : The structures of pyridinoline. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **109**, 1041(1982)
13. Tsuda, M., Ono, T., Ogawa, T. and Kawamishi, Y. : Pyridinoline is a real moiety of collagen. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **104**, 1407 (1982)
 14. Pinnell, S. R. and Martin, G. R. : The cross-linking of collagen and elastin: enzymatic conversion of lysine in peptide linkage to α -amino adipic- δ -semialdehyde(all-lysine) by an extract from bone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **61**, 708(1968)
 15. Layman, D. L., Narayanan, A. S. and Martin, G. R. : The production of lysyl oxidase by human fibroblasts in culture. *Arch. Biochem. Biophys.* **149**, 97(1972)
 16. Narayanan, A. S., Siegel, R. C. and Martin, G. R. : Stability and purification of lysyl oxidase. *Arch. Biochem. Biophys.*, **162**, 231(1974)
 17. Hayakawa, T., Hino, M., Fuyamada, H., Nagatsu, T., Aoyama, H. and Izawa, Y. : Lysyl oxidase activity in human normal skins and postburn scars. *Cinica. Chimica. Acta*, **71**, 245(1976)
 18. Siegel, R. C. and Fu, J. C. C. : Collagen cross-linking. *J. Biol. Chem.*, **251**, 5779(1976)
 19. Kagan, H. M., Sullivan, K. A., Olsson, T. A. and Cronlund, A. L. : Purification and properties of four species of lysyl oxidase from bovine aorta. *Biochem. J.*, **177**, 203(1979)
 20. Siegel, R. C., Fu, J. C. C., Uto, N., Horiuchi, K. and Fujimoto, D. : Collagen cross-linking : Lysyl oxidase dependent synthesis of pyridinoline *in vitro*: confirmation that pyridinoline is derived from collagen. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **108**, 1546(1982)
 21. 김미향 : *In vitro* aging에 있어서 콜라겐 성숙가교의 변화에 대한 비타민 C의 영향. 한국식품영양과학회지, **26**, 501(1997)
 22. Fujimoto, D. and Moriguchi, T. : Pyridinoline, a non-reducible crosslink of collagen. *J. Biochem.*, **83**, 863 (1978)
 23. 香川靖雄, 龍口 久 : 2,3-Diketo-L-gulonic acid의 합성 방법. 酵素科學シンポジウム, **16**, 107(1962)
 24. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. : Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265(1951)
 25. Arakawa, N., Kim, M. H. and Otsuka, M. : An improved high performance liquid chromatographic assay for the determination of pyridinoline in connective tissues. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **38**, 375(1992)
 26. Woessner, J. F. : The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this imino acid. *Arch. Biochem. Biophys.*, **93**, 440 (1961)
 27. Siegel, R. C. : Lysyl oxidase. *Inter. Rev. Connec. Tissue Res.*, **8**, 73(1979)
 28. Murray, J. C. and Levene, C. I. : Evidence for the role of vitamin B₆ as a cofactor of lysyl oxidase. *Biochem. J.*, **167**, 463(1977)
 29. Bird, T. A. and Levene, C. I. : Lysyl oxidase: evidence that pyridoxal phosphate is a cofactor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **108**, 1172(1982)
 30. Shieh, J. J. and Yasunobu, K. T. : Purification and properties of lung lysyl oxidase, a copper-enzyme. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **48**, 267(1974)
 31. 高分子錯体研究会編 : 生體と金屬イオン. 學會出版センター, p.86(1991)
 32. 日本學會編 : 水溶性ビタミン. 化學同人, p.41(1981)
 33. 永井 裕, 藤本大三郎 : コラーゲン代謝と疾患. 講談社, p.69(1982)
 34. Lewin, S. : *Vitamin C: its molecular biology and medical potential*. Academic Press, London, p.5(1976)

(1997년 12월 9일 접수)