

# 갑상선 호르몬이 흰쥐 간세포내 엽산의 Polyglutamate 직쇄분포와 세포질 엽산 결합단백질의 결합성에 미치는 영향\*

민 혜 선

한남대학교 식품영양학과

## Effects of Thyroid Hormone on Pteroylpolyglutamate Chain Length and the Binding Activity of Folate Binding Protein in Rat Liver

Min, Hyesun

Department of Food and Nutrition, Hannam University, Taejeon 306-791, Korea

### ABSTRACT

Hyperthyroidism is known to alter the concentration of hepatic folate pools and the activity of a number of enzymes involved in the catabolism of histidine to CO<sub>2</sub>. 10-Formyltetrahydrofolate dehydrogenase(EC 1.5.1.6, 10-formyl-THF dehydrogenase) catalyzes the NADP-dependent conversion of 10-formyltetrahydrofolate to tetrahydrofolate and CO<sub>2</sub>. In previous studies, 10-formyl-THF dehydrogenase purified from rat and pig liver was coidentified with the cytosolic folate-binding protein. In this study, we investigated the effects of feeding thyroid powder(TP) and thiouracil(TU) on the folate-binding properties of 10-formyl-THF dehydrogenase, the uptake of an injected dose of [<sup>3</sup>H]folate, and the metabolism of labeled folate to pteroylpoly-γ glutamate in rat liver. The initial hepatic uptake(24hr) of the labeled folate dose was higher in TU-rats and slightly higher in TP-rats than in controls. With longer time periods, decreased hepatic uptake of labeled folate was observed in TP-animals compared to euthyroid animals, and high levels of hepatic uptake of labeled folate were maintained in TU-animals. This data shows that high levels of thyroid hormone decreased the retention of folate in rat liver. Folate polyglutamate chain length was shorter in TU-rats than controls, which suggests that thyroid states do not affect the ability of animals to synthesizc pteroylpolyglutamates and that folate polyglutamate might be modulated by altered folate pool size. The ability of 10-formyl-THF dehydrogenase to bind folate in rat liver was similar in both TP- and TU-rats although dehydrogenase activity was changed by thyroid states. (*Korean J Nutrition* 32(4) : 369~375, 1999)

**KEY WORDS** : folate · thyroid powder · thiouracil · hepatic uptake · folate binding protein · pteroylpolyglutamate.

### 서 론

엽산을 조효소로 이용하는 단일 탄소기 대사과정은 DNA와 메치오닌과 같은 생체내 주요물질들을 합성하는 대사과정에서 중요한 역할을 한다. 단일 탄소기 대사과정에서 작용하는 일부 주요 효소들과 엽산 조효소들이 갑상선 기능의 변화에 따라 크게 영향을 받는 것으로 알려져 있다.<sup>1,5)</sup> 실험동물에게 갑상선 호르몬을 투여하면 비타민 B<sub>12</sub>의 결핍증과 유사한 증세가 나타난다. 즉, 히스티딘의 중간 대사물질인 formiminoglutamate(Figlu)의 소변내 배설량이 증가되

고, 히스티딘 부하실험에서 히스티딘 분자의 ring-2-carbon이 CO<sub>2</sub>로 산화되는 속도가 저하된다.<sup>2,3)</sup> 이와 반대로, 실험동물의 갑상선을 제거하거나 갑상선기능 저해제를 투여하면 소변내 Figlu의 배설량이 저하되고 히스티딘의 산화속도는 증가되며, 5-methyltetrahydrofolate(5-methyl-THF)의 비율이 증가되는데 이는 5,10-methylenetetrahydrofolate(5,10-methylene-THF)를 5-methyl-THF로 전환시키는 비가역적 대사과정에 관여하는 효소인 5,10-methylene-THF reductase의 활성이 저하되기 때문인 것으로 보고되었다.<sup>2,5)</sup> 이때, 갑상선 호르몬 투여에 의해 5,10-Methylene-THF reductase의 활성이 증가되므로 엽산 조효소의 분포에 있어 THF와 같은 비메칠형 엽산이 감소되고 메칠형 엽산인 5-methyl-THF의 비율이 증가된다. 따라서, 비메칠형 엽산을 조효소로 이용하는 히스티딘 분자의 분해속도가 저하되며 소변내 Figlu의 배설량이 증가된다.<sup>1,5)</sup>

채택일 : 1999년 3월 24일

\*The autor wishes to acknowledge the financial support of the Korea Research Foundation made in the program year of 1997.

Schanlinske 등<sup>6)</sup>은 흰쥐에게 갑상선 호르몬을 투여하였을 때 간조직내의 히스티딘 분해효소들 가운데 histidase, urocanase, 10-formyl-THF dehydrogenase 및 10-formyl-THF hydrolase의 활성도가 저하되는 것으로 보고하였다. 10-Formyl-THF dehydrogenase는 히스티딘 대사 과정에서 생성된 10-formyl-THF를 CO<sub>2</sub>와 THF로 산화시키는 비가역적 반응에 관여하며, 이 효소 활성의 증가는 갑상선 기능부전인 쥐의 히스티딘 산화속도를 증가시키는 주요한 요인으로 작용하는 것으로 보고되었다.<sup>207-11)</sup>

생체내 대사과정에 있어서의 10-formyl-THF dehydrogenase의 생리적인 기능은 밝혀지지 않았으나, 환경오염, 약물 및 식품을 통해 섭취되거나 체내 생성된 formate를 산화시키는 과정에서의 중요한 역할은 잘 밝혀져 있다.<sup>12)13)</sup>

흰쥐의 간조직 세포질내에서 밝혀진 세 가지 엽산 결합단백질 가운데 가장 분자량이 큰 10-formyl-THF dehydrogenase는 두 개의 subunit으로 구성된 단백질(Mr=210,000)로서 H<sub>4</sub>PteGlu<sub>5</sub>를 주로 결합하고 있으며,<sup>11)</sup> 돼지의 간조직내 10-formyl-THF dehydrogenase는 H<sub>4</sub>PteGlu<sub>5</sub>를 주로 결합하고 있다.<sup>14)</sup> 10-Formyl-THF dehydrogenase에 의한 효소반응의 생성물인 H<sub>4</sub>PteGlu<sub>5</sub>는 10-formyl-THF dehydrogenase에 단단히 결합되어 있으며, 동시에 이 효소의 저해제(product inhibitor)로 작용한다.<sup>13)14)</sup> 10-Formyl-THF dehydrogenase가 반응의 생성물을 단단히 결합한다는 사실은 단일 탄소기의 산화과정이 THF와 10-formyl-THF의 상대적인 비율에 의해 조절되는 것임을 시사하는 것으로 제안되었다.<sup>14)</sup>

Monoglutamate 형태의 엽산은 세포막을 쉽게 통과하지만 polyglutamate 형태의 엽산은 세포막을 잘 통과하지 못하므로, 엽산의 polyglutamylation은 엽산의 세포내 보유과정에 필수적이며 polyglutamylation이 손상되면 세포내 엽산수준이 크게 저하되어 조직의 세포분열 속도를 제한한다.<sup>15-17)</sup> 갑상선 호르몬은 5,10-methylene-THF reductase 및 10-formyl-THF dehydrogenase의 효소 활성에 영향을 주므로, 이로 인해 엽산의 polyglutamylation에 변화를 가져옴으로써 엽산 대사에 영향을 줄 수 있을 것으로 보인다. 따라서, 본 연구에서는 갑상선 호르몬이 흰쥐의 간조직내 엽산의 직쇄 분포에 미치는 영향과 간조직의 세포질내 엽산 결합단백질인 10-formyl-THF dehydrogenase의 엽산 결합성 및 간조직으로의 엽산유입에 미치는 영향을 분석함으로써 갑상선 기능에 따른 엽산 대사의 변화를 조사하였다.

## 실험 재료 및 방법

### 1. 실험동물 및 식이

생후 3주된 Sprague-Dawley 숫쥐 18마리를 3군으로 나누어 대두 단백질을 단백질 급원으로하는 Basal diet(Table 1)를 먹인 대조군과 Basal diet에 thyroid powder(3g/kg 식이)를 첨가한 TP군 및 thiouracil(1g/kg 식이)을 첨가한 TU군으로 구분하여 사용하였다. 실험동물은 한 마리씩 각각 분리하여 실험식을 자유롭게 섭취하도록 하였다.

실험식으로 4주간 사육한 후 각 실험군에서 3마리씩 무작위로 선택하여 10 $\mu$ Ci의 [3', 5', 7', 9'-<sup>3</sup>H]folate(20 $\mu$ Ci/mmol, Amersham)(0.5 ml)를 복강내 주입한 후 24시간 후에 희생하였고, 각 실험군의 나머지 3마리에는 각각 25 $\mu$ Ci의 [<sup>3</sup>H]folate를 복강내에 주입한 후 6시간, 3일, 30일 후에 각각 1마리씩 희생하였다.

### 2. 실험방법

#### 1) 간조직의 엽산 유입(uptake) 및 보유율 분석

간조직의 엽산 유입량을 측정하기 위하여, [<sup>3</sup>H]Folate를 복강내 주입한 후 6시간, 24시간, 3일 및 30일 후에 각 실험군의 흰쥐를 희생하여 간조직을 적출하였다. 간조직의 일부를 2%(w/v) sodium ascorbate buffer(pH 4.3, 3vol.)로 분쇄한 후 상층액의 [<sup>3</sup>H]folate량을 scintillation counter로 측정하여 주입된 [<sup>3</sup>H]folate량에 대한 상대적인 비율(%)을 계산함으로써 엽산 유입량을 결정하였다.

#### 2) 엽산 결합단백질의 분리

흰쥐 간조직의 세포질내 엽산 결합단백질을 분리하기 위하여 Zamierowski와 Wagner<sup>18)</sup>의 방법을 사용하였다.

Table 1. Composition of the basal diet

Ingredients	Gram per kg diet
Soy assay protein	200
Mineral mix <sup>1)</sup>	35
Corn oil	40
Vitamin mix <sup>2)</sup>	10
Choline bitartrate	1
Glucose	714

1) Rat mineral mix provided : (in g/kg diet) CaCO<sub>3</sub>, 6.22 ; CaHPO<sub>4</sub>, 4.00 ; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2.00 ; KCl, 7.30 ; MgSO<sub>4</sub>, 0.46 ; MnSO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O, 0.05 ; CuSO<sub>4</sub>, 0.052 ; Ferric citrate, 0.025 ; ZnCO<sub>3</sub>, 0.012 ; KIO<sub>3</sub>, 0.0006.

2) Rat vitamin mix was prepared in glucose and provided : (in mg/kg diet) thiamin · HCl, 15 ; riboflavin, 15 ; pyridoxine · HCl, 15 ; folic acid 5 ; vitamin B<sub>12</sub> 0.05 ; Ca-pantothenate, 50 ; niacin · HCl, 50 ; biotin, 0.2 ; menadione, 10 ; vitamin A acetate, 15,000 IU ; vitamin D(calciferol), 2000 USP ; D,L- $\alpha$ -tocopherol acetate, 50.

[<sup>3</sup>H]Folate를 흰쥐의 복강내에 주입한 후, 6시간, 24시간, 3일 및 30일 후에 쥐의 간을 적출하여 그 일부를 4배 분량의 50mM potassium phosphate buffer(pH 7.0, 0.1M KCl, 1mM EDTA, 1mM 2-mercaptoethanol 함유)로 분쇄한 후, 원심분리(32000g, 4℃, 90분)하여 상층액(10ml)을 Sephacryl S-300 column(Phamacia, 80×2.5cm)을 이용하여 4℃에서 gel filtration 크로마토그래피를 수행하였다.

**3) 간조직내 10-Formyl-THF dehydrogenase 활성도 측정**

Dehydrogenase 활성도는 10-formyl-THF로부터 THF가 생성되는 속도를 300nm에서 측정하여 활성도를 측정하는 분광광도법<sup>7)</sup>에 의해 분석하였다.

**4) HPLC에 의한 엽산의 polyglutamate 직쇄분포의 분석**

간조직내 엽산의 polyglutamate 직쇄 분포는 엽산을 pterin과 p-aminobenzoyl polyglutamate(pABAGlu<sub>n</sub>)로 분해한 후 high performance liquid chromatography(HPLC)<sup>10)</sup>에 의해 분석하였다.

동물의 간을 3배 분량의 6.7% trichloroacetic acid (TCA)용액으로 분쇄한 다음 10000×g에서 20분간 원심분리하였다. 조직 상층액을 diethylether로 추출(3회×4 vol.)하여 TCA 성분을 제거한 다음 아연(Zn)가루를 부유시킨 5N HCl용액으로 처리하여 시료내의 엽산(PteGlu<sub>n</sub>)을 pterin과 pABAGlu<sub>n</sub>로 분해하였다. 엽산의 분해물인 pABAGlu<sub>n</sub> 유도체는 Partisil 10 SAX column(250×4.6mm, Whatman) 상에서 분리하여 UV detector를 이용해 280nm에서 분석하였다. 측정된 흡광도를 Chromatopac C-R 6A(Shimadzu사)로 기록, 정량하여 내생적 엽산의 직쇄분포를 분석하였다. HPLC로부터 얻은 eluent를 fraction collector로 수집하여, 각 fraction의 방사성량을 측정하므로써 투여된 [<sup>3</sup>H]Folate의 직쇄분포를 분석하였다.

**결과 및 고찰**

**1. 간조직내로의 엽산 유입 및 보유**

갑상선 호르몬이 간조직내로의 엽산 유입 및 보유에 미치는 영향을 분석하기 위하여 [<sup>3</sup>H]folate를 복강내 투여한 후 쥐의 간 추출물내의 [<sup>3</sup>H]folate량을 분석하여 간조직내로의 엽산유입량을 측정한 결과가 Table 2에 제시되었다. 방사성 엽산 투여 6시간 및 24시간 후 간조직내 엽산 초기유입량은 TU군, TP군 및 대조군 순으로 나타나 TU군이 가장 높았다. 모든 실험군에 있어 24시간 후의 엽산 유입 및 보유율이 가장 높게 조사되었다(Table 2). 방사성 엽산을

**Table 2.** Effect of hyper and hypothyroid states on hepatic uptake of [<sup>3</sup>H]folate in rats

Diet	% Hepatic uptake of [ <sup>3</sup> H]folate injected intraperitoneally			
	6 hr <sup>1)</sup>	24 hr	3 day	30 day
Basal <sup>2)</sup>	22.7	25.1	16.4	1.2
TP <sup>3)</sup>	24.1	28.7	11.8	0.2
TU <sup>4)</sup>	29.0	36.2	28.8	1.7

1) Time after [<sup>3</sup>H]folate injection      2) Basal diet  
3) Thyroid powder                              4) Thiouracil

투여한 후 3일째 TU군과 대조군의 간세포내 엽산보유율은 서서히 저하되었으나, TP군의 엽산보유율은 급격히 감소되었으며 이러한 경향은 30일까지 지속되었다(Table 2).

흰쥐의 복강내 투여된 [<sup>3</sup>H]folate가 간 세포내로 유입된 후 내생적 엽산과 동일한 polyglutamate 직쇄를 갖는 형태로 전환되는데 48시간이 소요되었다는 Shane 등<sup>20)</sup>의 결과로부터 볼때, 본 실험에서 측정된 3일 이후의 [<sup>3</sup>H]folate는 간조직내에서 대부분이 polyglutamate 직쇄형 엽산으로 전환되었을 것으로 보인다. TP군의 경우 방사성 엽산 투여 후 엽산의 초기 유입량(6시간 및 24시간)은 대조군보다 다소 높았으나, 3일 후부터 간조직내 [<sup>3</sup>H]folate 보유율이 저하된 것(Table 2)은 갑상선 호르몬 과다 상태에서 5,10-methylene-THF reductase의 활성증가로 인해 비메틸 형태의 엽산 비율이 증가되었기 때문인 것으로 사료된다. 따라서, 갑상선 호르몬이 과다한 상태에서는 간조직내로의 엽산의 초기 유입율(6시간 및 24시간)에는 변화가 없으나 24시간 이후의 엽산보유율이 저하되며, 이와같이 엽산보유의 저하는 저조한 체내 엽산영양과 관련이 있는 것으로 보인다.

Eisenga 등<sup>21)</sup>에 의하면 엽산 결핍식으로 인해 신장, 지라, 고환, 폐 및 소장내 엽산 농도가 저하된 실험동물에게 [<sup>3</sup>H]folate를 투여하면, 24시간이 지난 후 이들 조직내의 엽산 유입율이 증가되며, 이와 대조적으로 간조직내로의 엽산 유입율은 저하되었다. 이는 엽산결핍시 간을 제외한 다른 조직으로의 [<sup>3</sup>H]folate 유입이 증가되기 때문인 것으로 보고하였다. 이 결과로부터 간조직의 내생적 엽산 농도가 낮을수록 [<sup>3</sup>H]folate 투여 후 24시간 경과후의 엽산 유입율이 낮아짐을 알 수 있었다. 본 연구에서 간조직으로의 엽산 유입율이 TU군에서 가장 높은 이유는 TU군의 조직내 내생적 엽산농도가 다른 실험군보다 높은 것도 주요한 요인으로 작용했을 것으로 사료된다.

**2. 엽산의 polyglutamate 직쇄 분포**

갑상선 호르몬 투여시(TP군) 간조직내 엽산보유율이(3일 및 30일 후) 저하된 원인이 엽산의 polyglutamyl-

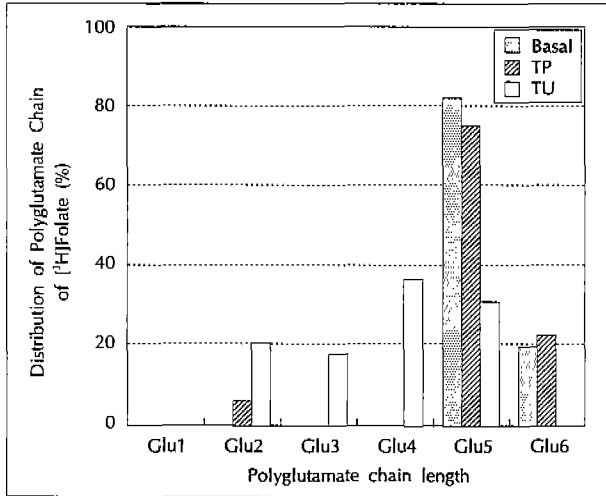


Fig. 1. Distribution of polyglutamate chain length of [3H]folate. Rat liver extract was prepared 24hr after administration of [3H]folate and polyglutamate chain length was analyzed by HPLC after reductive cleavage of folate to pterin and pABAGlu<sub>n</sub>.

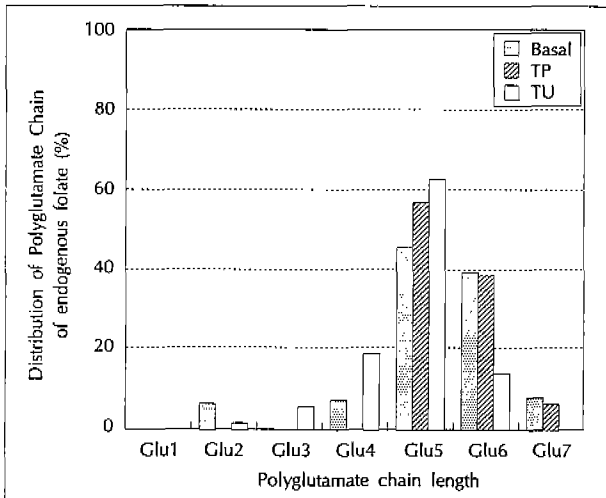


Fig. 2. Distribution of polyglutamate chain length of endogenous folate in rat liver. Folate in rat liver extract was cleaved to pterin and pABAGlu<sub>n</sub> and separated by HPLC. The content of pABAGlu<sub>n</sub> eluted by HPLC was detected spectrophotometrically at 280nm.

tion의 저하에 기인하는가를 조사하기 위하여, 복강내 투여된 방사성 엽산의 직쇄분포와 내생적 엽산의 직쇄분포를 조사하였다(Fig. 1, 2).

[3H]Folate를 투여한 후 24시간이 경과하였을 때 직쇄분포는 대조군과 TP군의 경우 Glu<sub>5</sub>형태가 주된 형태였고 약간량의 Glu<sub>6</sub>가 생성되어 TP군은 대조군과 유사한 직쇄분포를 보였으나, TU군의 경우 Glu<sub>2</sub>부터 Glu<sub>5</sub>에 걸쳐 고른 분포를 나타내어 투여된 엽산의 직쇄 길이가 가장 짧았다(Fig. 1). 갑상선 호르몬 투여에 따른 직쇄분포의 차이로부터 판단할 때 TP군의 polyglutamylatation 과정은 정상이었으며, TU군의 polyglutamylatation 과정이 오히려 비

정상적으로 낮음을 알 수 있었다. [3H]Folate를 투여한 후 3일째의 직쇄분포(본 논문에서 자료는 제시하지 않았음)도 이와 유사한 경향성을 나타냈다. 따라서, 갑상선 호르몬의 투여는 복강내 주입된 [3H]Folate의 polyglutamylatation을 저하시키지 않는 것으로 보인다.

갑상선 호르몬 및 thiouracil 투여에 따른 내생적 엽산의 직쇄분포는 Fig. 2와 같았으며, 모든 실험군에 있어 Glu<sub>5</sub>가 주된 엽산의 polyglutamate 형태였다. 대조군과 TP군에는 Glu<sub>6</sub>도 다량 분포되어 있었으며 소량의 Glu<sub>7</sub>도 분포되어 있었으나, Glu<sub>4</sub>이하의 엽산은 매우 적었다(Fig. 2). 그러나, TU군의 경우 대조군보다 Glu<sub>6</sub>의 비율이 크게 낮았고 Glu<sub>5</sub>보다 짧은 직쇄의 비율이 상당히 높았다. 따라서, TU군의 내생적 엽산이 대조군 및 TP군과 비교할 때 비교적 짧은 직쇄분포를 나타냈다.

이와같이, 복강내 투여된 [3H]folate가 간세포로 유입된 후 24시간이 경과되었을 때 나타내는 직쇄분포는 내생적 직쇄분포보다 짧은 직쇄의 분포 비율이 다소 높기는 했지만(Fig. 1), 내생적 직쇄분포에 있어서도 TP군의 직쇄분포가 TU군 보다 길게 나타나(Fig. 2) 내생적 엽산의 polyglutamylatation도 갑상선 호르몬에 의해 직접적으로 영향받지 않는 것으로 보인다. 따라서, TP군의 간조직내 엽산 보유율이 낮은 원인이 저조한 polyglutamylatation에 기인하지 않는 것으로 사료된다.

장기간동안 엽산 결핍식을 공급받은 흰쥐의 간, 신장, 지라, 부신, 소장점막 및 골수조직의 엽산 함량이 저하되며, 이들 조직에서의 직쇄분포가 길어져 조직내 엽산 함량과 직쇄분포사이에 역관계가 성립되는 것으로 보고되었다.<sup>22-25)</sup> 본 연구에서 TP 투여시 엽산의 직쇄가 길어진 원인은 간조직내 엽산 농도가 저하되었기 때문이며, TU 투여시 간조직내 엽산농도가 증가되어 짧은 직쇄가 많이 분포된 것으로 보인다.

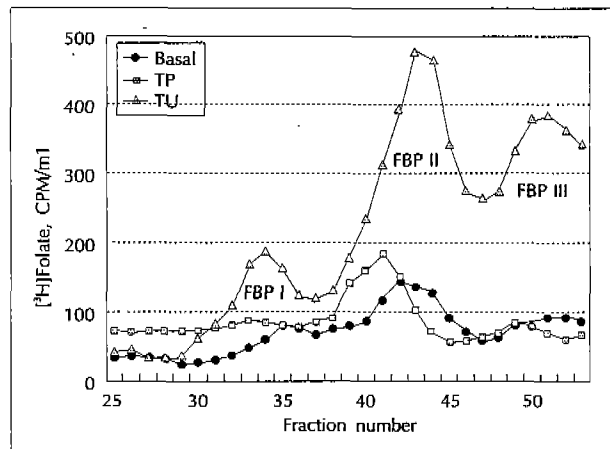
### 3. 10-Formyl-THF dehydrogenase의 효소 활성도의 엽산 결합 성질

갑상선 호르몬을 투여한 TP군의 간조직내 10-formyl-THF dehydrogenase 활성은 대조군의 54% 수준으로 저하되었고, TU군의 10-formyl-THF dehydrogenase 활성은 대조군보다 83% 높았다(Table 3). 10-Formyl-THF dehydrogenase는 간조직 세포질내에서 THF를 결합하고 있는 엽산 결합단백질로서, 히스티딘 대사과정의 최종 반응인 10-formyl-THF를 THF와 CO<sub>2</sub>로 분해하는 반응에 관여하는 효소이다. 갑상선 호르몬이 10-formyl-THF dehydrogenase의 효소활성에 미치는 영향이 엽산 결합성질에

**Table 3.** Effect of hyper and hypothyroid states on hepatic levels of 10-formyl-THF dehydrogenase in the rat

Diet	Body wt.(g) (# Animals)	10-formyl-THF dehydrogenase ( $\mu\text{mol/hr/g}$ )
Basal <sup>4)</sup>	192 $\pm$ 7 <sup>1)</sup> (6)	100 $\pm$ 11 <sup>2)</sup> (16.35) <sup>3)</sup>
TP <sup>5)</sup>	165 $\pm$ 9 (6)	54 $\pm$ 6
TU <sup>6)</sup>	106 $\pm$ 5 (6)	183 $\pm$ 19

1) Values  $\pm$  standard error of the mean (SEM)  
 2) Relative Values : Intact Control=100  
 3) Absolute enzyme levels in intact controls, enzyme activity per gram of wet tissue  
 4) Basal diet 5) Thyroid powder 6) Thiouracil



**Fig. 3.** Sephacryl S-300 chromatography of cytosolic folate binding protein(FBP) I, II, III in rat liver. Cytosolic extract(20ml), prepared from rat liver 24hr after administration of [<sup>3</sup>H]folate, was applied to Sephacryl S-300 column(80 $\times$ 2.5cm) equilibrated with 50mM phosphate buffer, pH 7, 0.1M KCl, and 10mM 2-mercaptoethanol. The column was eluted with the same buffer and each fraction(5.5ml) was collected.

어떠한 영향을 미치는지를 조사하기 위하여, [<sup>3</sup>H]folate를 복강내 투여한 다음 24시간 후 쥐의 간조직을 분쇄하여 그 상청액을 이용하여 gel filtration 크로마토그래피(Sephacryl S-300 column)를 수행하여 엽산 결합단백질을 분리하였다(Fig. 3).

간조직 세포질내 엽산 결합단백질은 세 개의 peak으로 (FBP-I, II, III) 분리되었으며(Fig. 3), 각 엽산 결합단백질에 결합된 엽산의 비율을 Table 4에 제시하였다.

10-Formyl-THF dehydrogenase는 흰쥐의 간조직 세포질내 엽산결합단백질 가운데 가장 분자량이 큰 FBP-I으로서 H<sub>4</sub>PteGlu<sub>5</sub>를 결합하고 있는 것으로 알려져 있다.<sup>13)</sup> 본 실험에서 [<sup>3</sup>H]folate를 투여한 다음 6시간 후에는 투여된 엽산의 2.1~3.5%, 24시간 후에는 6.6~9.4%만이 FBP에 결합되는 것으로 나타나, 복강내 투여된 엽산의 10% 이하가 간조직의 세포질내 엽산 결합단백질(FBP-I, II, III)에 결합되어 있었다(Table 4).

**Table 4.** Effect of hyper and hypothyroid states on distribution of [<sup>3</sup>H]folate bound to cytosolic folate binding protein in rat liver

Diet	Time(hr)	Distribution of [ <sup>3</sup> H]folate on FBP(% bound folate) <sup>1)</sup>			
		FBP-I	FBP-II	FBP-III	Total
Basal <sup>2)</sup>	6 hr	0.4	2.2	0.9	3.5
	24 hr	2.2	5.1	2.1	9.4
TP <sup>3)</sup>	6 hr	0.5	2.3	0.4	3.2
	24 hr	1.5	3.4	1.7	6.6
TU <sup>4)</sup>	6 hr	0.3	1.3	0.5	2.1
	24 hr	1.2	4.3	2.3	7.8

1) Distribution of [<sup>3</sup>H]folate bound on folate binding protein after 3 days and 30 days was not analyzed due to the lower level of counts than detection limits.  
 2) Basal diet 3) Thyroid powder 4) Thiouracil

10-Formyl-THF dehydrogenase의 활성이 갑상선 호르몬에 의해 크게 영향을 받음에도 불구하고, 10-formyl-THF dehydrogenase 효소활성을 갖는 FBP-I의 엽산 결합성은 TP군과 TU군이 큰 차이가 없었으므로(Table 4), 10-formyl-THF dehydrogenase의 효소활성과 엽산결합성간에는 관련성이 없는 것으로 보인다(Table 3, 4). 또한, 간 세포내 FBP-I, II, III가 결합하는 총엽산량도 갑상선 호르몬에 따른 일정한 영향을 받지 않는 것으로 나타났으며, TP군과 TU군의 엽산결합성이 대조군 보다 낮은 것으로 조사되었다(Table 4). 따라서, 본 연구와 종전의 연구들<sup>13,16)</sup>의 결과로부터 판단할 때 갑상선 호르몬이 엽산대사에 미치는 영향은 5,10-methylene-THF reductase 활성 증가에 의한 "methyl trap" 효과와 10-formyl-THF dehydrogenase 활성 저하가 단일탄소기 대사의 저하 및 엽산대사 저하의 주된 요인으로 보인다.

세포내 엽산 결합단백질은 대사상 중요한 기능이 있는 것으로 제안되었다.<sup>16)</sup> 간 세포내 대부분의 엽산 결합단백질은 환원형의 folate polyglutamate에 대하여 결합 특이성이 큰 것이 특징이다. 흰쥐 간조직의 세포질내에 있는 엽산 결합단백질인 glycine N-methyltransferase는 이 효소에 결합되어 있는 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>PteGlu<sub>5</sub>에 의해 allosteric 저해를 받으며,<sup>17)</sup> 돼지 간의 세포질내 엽산 결합단백질인 10-formyl-THF dehydrogenase는 이 효소에 결합되어 있는 H<sub>4</sub>PteGlu<sub>5</sub>에 의해 활성이 저해되므로,<sup>14)</sup> 세포내 엽산 결합단백질은 엽산유도체 결합을 통해 효소 작용을 조절함으로써 단일 탄소기의 대사를 조절하는 기능도 있는 것으로 제안되었다. 엽산 결합단백질인 glycine N-methyltransferase에 결합된 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>PteGlu<sub>5</sub>는 이 효소의 allosteric 저해제로 작용하므로써 S-adenosylmethionine과 S-adenosylhomocysteine의 상대적인 양을 조절하는 것으로 보고되었다.<sup>26)27)</sup> 10-Formyl-THF가 CO<sub>2</sub>와 THF로 산화되는

반응에 관여하는 10-formyl-THF dehydrogenase는 간조 직내에서 이 효소반응의 생성물인 동시에 강력한 저해제로 작용하는 엽산 유도체인 H<sub>4</sub>PteGlu<sub>5</sub>를 주로 결합하고 있으며,<sup>14)</sup> 이 효소 반응의 생성물인 H<sub>4</sub>PteGlu<sub>5</sub>가 10-formyl-THF dehydrogenase에 단단히 결합되어 있다는 사실은 단일 탄소기의 산화과정이 THF와 10-formyl-THF의 상대적인 비율에 의해 조절되는 것임을 시사하는 것으로 제안되었다.

생체내에서 10-formyl-THF dehydrogenase의 생리적 기능 가운데 체내 생성된 formate를 산화시키는 과정에서의 중요한 역할이 잘 밝혀져 있다.<sup>12)13)</sup> 인체 및 원숭이는 다른 동물들과 달리 메탄을 대사과정에서 생성되는 formate를 빠른 속도로 산화시키지 못하기 때문에 formate acidosis를 나타내며 이로 인해 메탄을 중독증세를 나타내는데, 이는 원인류의 간조직내 10-formyl-THF dehydrogenase의 활성이 매우 낮기 때문인 것으로 보고되었다.<sup>12)13)</sup> 또한, 10-formyl-THF dehydrogenase가 결여된 돌연변이 생쥐의 간조직내 엽산량은 매우 낮았으며, 간조직내에서 이 효소의 기질로 작용하는 10-formyl-THF의 함량은 크게 증가된 반면 생성물인 THF는 크게 저하된 것으로 보고되었다.<sup>28)</sup> 간조직내 THF 및 총엽산 수준이 감소되면 formate의 산화속도가 저하되므로, 10-formyl-THF dehydrogenase 활성이 손실되었을 때 THF를 조효소로 필요로 하는 대사과정인 히스티딘, formate 및 메탄올의 산화적 대사과정이 크게 손상되는 것으로 조사되었다.<sup>12)13)28-30)</sup> Champion 등<sup>28)</sup>은 돌연변이로 인해 10-formyl-THF dehydrogenase가 결여된 암쥐와 숫쥐를 교배시켰을 때 생식능력이 크게 저하되는 것으로 보고하였으며, 돌연변이된 암, 숫쥐의 생식능력 저하된 원인은 불임때문이 아니라 엽산부족으로 인한 태아의 발육부진으로 자연유산율이 증가되었기 때문인 것으로 제안하였으므로,<sup>28)</sup> 10-formyl-THF dehydrogenase는 태아의 생육과정에서도 매우 중요함을 알 수 있다.

## 요약 및 결론

갑상선 기능항진은 간조직내 엽산 풀(pool)의 농도를 저하시키며, 히스티딘 대사과정에 관여하는 여러 효소들의 활성을 저하시키는 것으로 알려져 있다. 10-Formyl-THF dehydrogenase는 히스티딘 대사의 최종단계에 관여하는 효소로서 갑상선 기능항진시 활성도가 저하되며, 또한 간조직의 세포질내에서 엽산을 결합하고 있는 주요 엽산 결합단백질로 밝혀졌다. 본 연구는 흰쥐를 대상으로 갑상선 호르몬

(thyroid powder, TP) 또는 갑상선 호르몬 저해제(thiouracil, TU)를 투여한 후 간조직내 엽산의 polyglutamate 직쇄분포와 세포질 엽산 결합단백질의 엽산결합성을 분석하므로써 갑상선 호르몬에 의한 엽산대사 변화를 설명하고자 시도하였다.

복강내로 [<sup>3</sup>H]folate를 주입한 후 6시간, 24시간, 3일, 30일후의 엽산 유입 및 보유율을 측정된 결과, 갑상선 호르몬 투여군의 초기 엽산 유입속도는 저하되지 않았으나, 그 이후의 엽산 보유율이 저하되어 갑상선 기능항진은 엽산의 초기 유입율에는 영향을 주지 않으나 장기간에 걸친 엽산 보유에 영향을 주는 것으로 보인다.

TP 투여시 간조직내 엽산 보유율이 저하되는 원인을 조사하기 위해 복강내 투여된 방사성 엽산 및 내생적 엽산의 직쇄분포를 분석하였다. TP 투여군의 엽산 직쇄분포가 TU 투여군 보다 길게 나타나, 엽산의 polyglutamylation은 갑상선 호르몬에 의해 직접적으로 영향을 받기보다는 간조직내 엽산 pool의 크기에 의해 영향 받는 것으로 보인다. 따라서, 본 연구에서 갑상선 호르몬의 과다급여가 엽산의 polyglutamylation에 이상을 초래하지 않는 것으로 조사되었다.

갑상선 호르몬의 투여시 나타나는 10-formyl-THF dehydrogenase의 활성저하가 엽산 결합성에 미치는 영향을 조사한 결과, TP 투여군의 10-formyl-THF dehydrogenase의 엽산 결합성은 TU 투여군과 차이가 없었다. 따라서, 10-formyl-THF dehydrogenase의 효소활성과 엽산 결합성간에는 관련성이 없는 것으로 보인다.

## Literature cited

- 1) Chan MM-S, Stokstad ELR. Metabolic responses of folic acid and related compounds to thyroxine in rats. *Biochim Biophys Acta* 632 : 244-253, 1980
- 2) Min H. The effect of thyroxine status on hepatic levels of 10-formyl-tetrahydrofolate dehydrogenase. *Kor J Nutr* 24(4) : 350-355, 1991
- 3) Stokstad ELR, Chan MM-S, Watson JE, Brody T. Nutritional interaction of vitamin B12, folic acid, and thyroxine. *Ann N Y Acad Sci* 355 : 119-129, 1980
- 4) Bartra KK, Watson JE, Stokstad ELR. Effect of dietary thyroid powder on urinary excretion of formiminoglutamic acid and methylmalonic acid. *Proc Soc Exp Biol Med* 161 : 589-593, 1979
- 5) Stokstad ELR, Chan MM-S, Watson JE, Urban G. Role of thyroxine in regulation of folic acid metabolism. In: *Biochemical and Clinical Aspects of Pteridines*, Vol 2, pp.341-350, Walter de Gruyter, Berlin, 1983
- 6) Schalinske KL, Steele RD. Quantification of the carbon flow through the folate-dependent one-carbon pool using radiolabeled histidine : Effect of altered thyroid and folate status. *Arch Biochem Biophys* 328 : 93-100, 1996
- 7) Kutzbach C, Stokstad ELR. 10-Formyltetrahydrofolate : NADP oxidoreductase. *Methods Enzymol* 18B : 793-798, 1971

- 8) Rios-Orlani EM, Zarkadas CG, MacKenzie RE. Formyltetrahydrofolate dehydrogenase-hydrolase from pig liver : simultaneous assay of the activities. *Biochim Biophys Acta* 871 : 24-35, 1986
- 9) Scrutton MC, Beis I. Inhibitory effects of Histidine and their reversal. The roles of pyruvate carboxylase and N<sup>10</sup>-formyltetrahydrofolate dehydrogenase. *Biochem J* 177 : 833-846, 1979
- 10) Krebs HE, Hems R, Tyler B. The regulation of folate and methionine metabolism. *Biochem J* 158 : 341-353, 1976
- 11) Kim DW, Huang T, Schirch D, Schirch V. Properties of tetrahydropteroylpentaglutamate bound to 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase. *Biochemistry* 35 : 15772-15783, 1996
- 12) Johlin FC, Fortman CS, Nghiem DD, Tephly TR. Studies on the role of folic acid and folate-dependent enzymes in human methanol poisoning. *Mol Pharmacol* 31 : 557-561, 1987
- 13) Johlin FC, Swain E, Smith C, Tephly TR. Studies on the mechanism of methanol poisoning : purification and comparison of rat and human liver 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase. *Mol Pharmacol* 35 : 745-750, 1989
- 14) Min H, Shane B, Stokstad ELR. Identification of 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase-hydrolase as a major folate binding protein in liver cytosol. *Biochim Biophys Acta* 967 : 348-353, 1988
- 15) McGuire JJ, Hsieh H, Coward JK, Bertino JR. Enzymatic synthesis of folylpolyglutamates. Characterization of the reaction and its products. *J Biol Chem* 255 : 5776-5788, 1980
- 16) Taylor RT, Hanna ML. Folate-dependent enzymes in cultured chinese hamster cells : Folylpolyglutamate synthetase and its absence in mutants auxotrophic for glycine + adenosine + thymidine. *Arch Biochim Biophys* 181 : 331-344, 1977
- 17) Cichowicz DJ, Foo SK, Shane B. Folylpolyglutamate synthesis by bacteria and mammalian cells. *Mol Cell Biochem* 39 : 209-228, 1981
- 18) Zamierowski M, Wagner C. Identification of folate binding protein binding proteins of rat liver. *J Biol Chem* 252 : 933-938, 1977
- 19) Shane B. High performance liquid chromatography of folates. *Am J Clin Nutr* 35 : 599-608, 1982
- 20) Shane B, Watson JE, Stokstad ELR. Uptake and metabolism of [<sup>3</sup>H] folate by normal and by vitamin B-12 and methionine-deficient rats. *Biochim Biophys Acta* 497 : 241-252, 1977
- 21) Eisenga B, Collins TD, McMartin. Incorporation of of <sup>3</sup>H-label from folic acid is tissue-dependent in folate-deficient rats. *J Nutr* 122 : 977-985, 1992
- 22) Varela-Moreiras, Selhub J. Long-term folate deficiency alters folate content and distribution differentially in rat tissues. *J Nutr* 122 : 986-991, 1992
- 23) Richardson RE, Healy MJ, Nixon PF. Foliates of rat tissue. Bioassay of tissue folylpolyglutamates and relationship of liver folylpolyglutamates to nutritional folate sufficiency. *Biochim Biophys Acta* 585 : 128-133, 1979
- 24) Cassady IA, Budge MM, Healy MJ, Nixon PF. An inverse relationship of rat liver folate polyglutamate chain length to nutritional folate deficiency. *Biochim Biophys Acta* 633 : 258-268, 1980
- 25) Ward GJ, Nixon PF. Modulation of pteroylpolylglutamate concentration and length in response to altered folate nutrition in a comprehensive range of rat tissues. *J Nutr* 120 : 476-484, 1990
- 26) Wagner C. Cellular folate binding proteins : Function and significance. *Ann Res Nutr* 2 : 229-248, 1982
- 27) Cook RJ, Wagner C. Inhibition of glycine N-methyltransferase by folate derivatives : Implication for regulation of methyl group metabolism. *Biochem Biophys Res Commun* 127 : 746-755, 1985
- 28) Champion KM, Cook RJ, Tollaksen SL, Giometti CS. Identification of a heritable deficiency of the folate-dependent enzyme 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 91 : 11338-11342, 1994
- 29) Palese M, Tephly TR. Metabolism of formate in the rat. *J Toxicol Environ Health* 1 : 13-24, 1975
- 30) Black KA, Eells JT, Noker PE, Hawtrey CA, Tephly TR. Role of hepatic tetrahydrofolate in the species difference in methanol toxicity. *Proc Natl Acad Sci* 82 : 3854-3858, 1985