

쥐 뇌 미토콘드리아 분획에서 포스포리파제 D에 대한 스퍼민의 영향

高 恩 姬
덕성여자대학교 화학과
(2000. 7. 18 접수)

Effect of Spermine on Phospholipase D Activity in Rat Brain Mitochondrial Preparation

Eun-Hie Koh

Department of Chemistry, Duksung Women's University Seoul 132-714, Korea
(Received July 18, 2000)

요 약. 포스포리파제 D(PLD)는 인지질의 말단염기를 가수분해하여 phosphatidic acid(PA)와 염기로 분리시키는 효소이다. 본 연구는 쥐의 뇌에서 분리한 미토콘드리아 분획에서 PLD활성에 미치는 spermine의 영향을 조사하였다. 올레산 존재하에서 spermine이 PLD를 활성화시켰으며 Ca^{2+} , Mg^{2+} 그리고 Ba^{2+} 는 spermine의 영향을 더욱 강화시켜주는 것으로 나타났다. 다른 아민들은 별 효과가 없었으나 histamine 경우 높은 농도에서 PLD를 활성화시켰다. Polylysine들도 PLD를 활성화시켰으며 그 길이가 길수록 더욱 효과적으로 작용하였다. 기질 특이성에 있어서는 phosphatidylcholine(PC)과 phosphatidylethanolamine(PE) 사이에 큰 차이를 보이지는 않았다. 이 기질 특이성은 쥐 소장 미토콘드리아 PLD의 PE 특이성과 상이한 것으로 나타났다.

ABSTRACT. Phospholipase D (PLD) is the enzyme catalyzing the hydrolysis of the terminal phosphoester bond of phospholipid head group to produce phosphatidic acid and the corresponding base. The effect of spermine on the PLD activity of rat brain mitochondrial preparation was investigated. Spermine, in the presence of oleic acid, activates the rat brain mitochondrial PLD, whose effect was further enhanced by the presence of divalent cation, Ca^{2+} , Mg^{2+} , or Ba^{2+} . Among the various monoamines tested, only histamine at the high concentration was effective in activation the PLD. Polylysine increased the PLD activity, particularly, the longer chain of the molecule activated the PLD more effectively. There was no significant difference in the substrate specificity for the PLD activity between phosphatidylcholine (PC) and phosphatidylethanolamine (PE). This substrate specificity is different from the PE specificity reported for the intestinal mitochondrial PLD.

서 론

Phospholipase D(PLD)는 인지질의 염기 head group을 가수분해하여 phosphatidic acid(PA)와 free head group으로 분리시키는 효소이다. 이때 ethanol이나 propanol과 같은 일차 알콜이 존재하면 이 알콜과 염기 head group을 치환시키는 특징적인 transphosphatidylatation 반응을 일으킨다. 이렇게 해서 생기는 phosphatidylalcohol은 세포내의 효소들에 의해 쉽게

분해되지 않으므로 이 phosphatidylalcohol의 생성을 관찰함으로써 PLD의 활성을 쉽게 측정할 수 있다.¹ 광범위한 동물세포에서의 PLD 연구 결과 적어도 세 형태의 PLD가 존재하는 것으로 알려져 있다.² ARF 같은 작은 G 단백질에 의해 활성화되는 PLD1과 phosphatidylinositol bisphosphate(PIP_2)를 필요로 하는 PLD2가 보고되어 있다.³ 그 외 올레산에 의해 활성화되는 PLD가 오래전부터 알려져 있다.⁴ 최근에는 인간 hPLD1 유전자가 클로닝되어 동물 PLD 연구가 더욱

활발히 전개되고 있다.⁵ hPLD1의 효소 활성은 원형질 막, 골지막 그리고 핵막에서 검출되었고, 그 PLD의 생성물인 PA는 actin cytoskeleton을 조절하는 신호분자 중 하나인 것으로 알려져 세포생리 조절에 핵심 역할을 하는 것으로 보고되고 있다.^{2,3}

그 외 미토콘드리아에서 새로운 형태의 PLD 존재 가능성이 몇 차례 보고되었다.^{6,7} 효모 미토콘드리아에서는 phosphatidylserine(PS)와 phosphatidylethanolamine(PE)를 기질로 하며 Ca^{2+} 에 의존하는 PLD가 알려져 있다. 이 PLD는 transphosphatidylation이 관찰되고 있지 않아서 기존의 PLD와는 다른 것으로 보여진다. Spermine 같은 polyamine cation들이 미토콘드리아 permeability transition을 저해하는 것으로 알려졌어,⁸ spermine에 의한 PLD 활성여부와 미토콘드리아의 전위 유지가 어떤 관계에 있는지 큰 의문을 남기고 있다. 특히 쥐 소장 미토콘드리아에서는 spermine 같은 polyamine을 처리했을 때 PA의 증가가 관찰되어 PLD 활성과 polyamine의 상관관계가 새로운 관심사로 대두되고 있다.⁹ 그러나 쥐 소장 미토콘드리아에는 phosphatidylcholine(PC)를 기질로 하는 일반적으로 알려진 transphosphatidylation이 가능한 PLD의 존재가 확인되고 있지 못하다.⁹ 즉 PLD 활성과 상관없이 spermine에 의해 PA가 생성된 것으로 간주할 수 있다. 따라서 본 연구는 전통적인 PLD 존재가 확인된 쥐 뇌의 미토콘드리아를 분리하여 *in vitro* 조건하에서 PLD 효소 활성에 미치는 spermine 같은 polyamine의 영향을 조사하였다.

실 험

시약 및 기기. 2-palmitoyl [³H]-phosphatidylcholine은 NEN으로부터 구입하였으며 phosphatidylethanolamine(PE)과 phosphatidylethanol(PEt)은 실험실에서 합성한 것을 사용하였다.¹⁰ Spermine 등 각종 아민들은 모두 Sigma로부터 구입하여 사용하였다. 유기용매와 일반시약은 특급시약을 구입하여 사용하였다.

미토콘드리아 분리. 쥐 뇌의 미토콘드리아는 sucrose density gradient 방법을 이용하여 분리하였다.¹¹ 뇌를 0.32 M sucrose에서 균질화시킨 파쇄용액을 먼저 1,000×g에서 10분 원심분리 하고 그 상층액을 15,000×g에서 15분 동안 원심 분리하여 crude mitochondria 분획을 얻었다. 다음에 0.32 M sucrose에

suspension 시킨 미토콘드리아 용액을 1.2 M sucrose 용액위에 얹히고 75,000×g에서 2시간 원심분리하여, myelin과 synaptosome을 제거하였다. 분리된 미토콘드리아는 50 mM HEPES(pH 7.0)에 약 10 mg/ml가 되게 묽혀서 사용하였다.

PLD 활성에세이. PLD 활성 측정은 이미 알려진 방사성 동위원소 PC를 사용하는 방법을 따랐다.¹² 최종적인 지질 농도는 PC 0.5 mM, PA 1.5 mM 그리고 oleate 5 mM 이며 방사능 표지된 PC는 시험관당 0.4 μCi씩 사용하였다. 준비된 지질들은 질소가스로 유기용매를 날린 뒤, 최종농도의 2.5배가 되도록 0.1 M HEPES(pH 7.0)로 채우고 세포파쇄기로 균질화시켰다. 각종 금속들과 폴리아민들은 각 실험조건에 따라 첨가한 뒤 미토콘드리아 효소원을 5 μl 혹은 7.5 μl씩 넣어 반응혼합액이 30 μl가 되게 하였다. 반응은 지질혼합체를 첨가하면서 시작하고 30°C에서 두 시간 뒤에 중지시켰다. 활성측정은 생성된 PE의 양으로 추정하며, 지질들을 chloroform:methanol:1 N HCl(100:50:3) 용액과 0.1 M KCl 각각 0.5 ml씩 사용하여 유기층으로 분리한 뒤 말려서 TLC위에 전개하였다. 전개용매는 ethylacetate: acetic acid: isooctane: H₂O(65:15:10:50)이며, authentic PE와 요오드 발색으로 PE의 위치를 확인한 뒤 굵어서 Liquid Scintillation Counter로 계측하였다. 모든 측정값들은 반복하여 얻었으며 평균값들을 취했다.

결과 및 고찰

미토콘드리아 분획의 PLD와 각종 아민들의 영향. 미토콘드리아에서 PLD 효소활성은 처음 Kanfer 등에 의해 확인되었으며, 올레산 같은 불포화지방산이 그 효소 활성을 증가시킨다고 알려졌다.⁴ 본 실험에서는 올레산 존재하에서 spermine의 효소활성에 대한 영향을 조사하였다(Fig. 1). Spermine의 농도가 1 mM일 때 활성이 크게 증가함이 관찰되었으며, 올레산이 없을 때는 spermine에 의한 증가효과는 나타나지 않았다. Madesh등에 의하면 polyamine들 외에 histamine과 같은 monoamine들도 소장 미토콘드리아의 PA 생성을 증가시킨다고 보고하고 있어⁹ 본 실험에서도 histamine과 동시에 염기성 아미노산들의 효과를 조사하였다(Fig. 2). Spermine 외에 1 mM 농도에서는 어느 것도 PLD 활성을 증가시키지 못하였다. 그러나 농도를

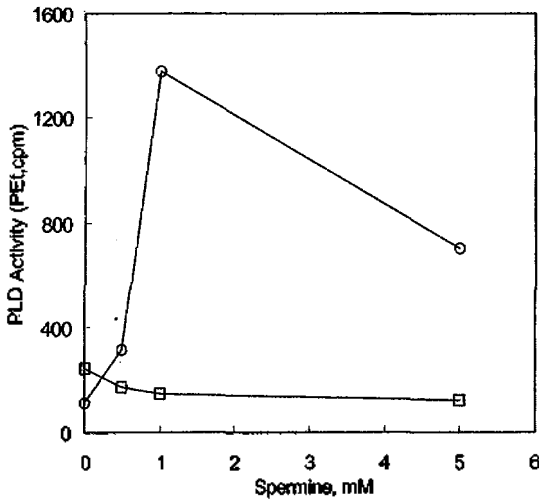


Fig. 1. Effect of spermine on PLD activity in brain mitochondrial preparation. The PLD activity was determined with (○) or without (□) 5 mM oleic acid.

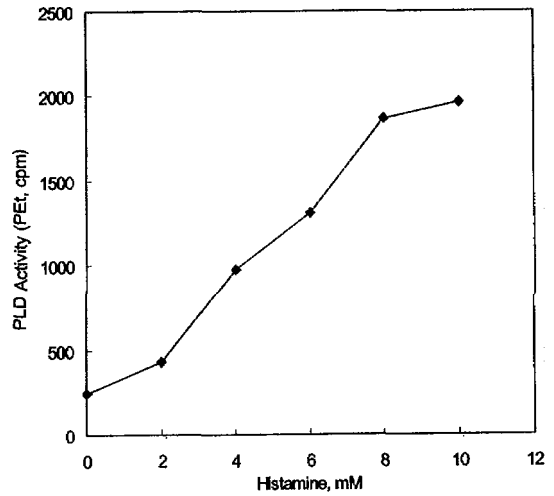


Fig. 3. Effect of histamine on PLD activity in the mitochondrial preparation.

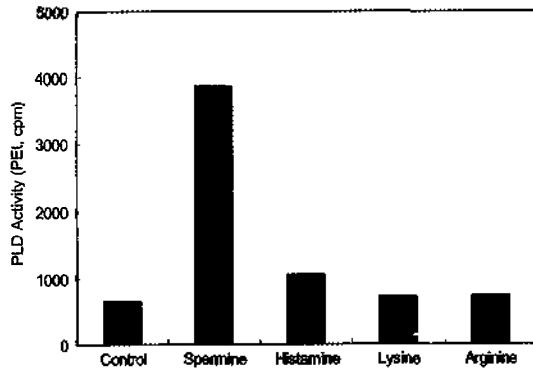


Fig. 2. Effects of various amines on PLD activity in the mitochondrial preparation. PLD activity was determined with 1 mM amines in the presence of 5 mM Ca^{2+} .

10 mM까지 증가시켜 보았을 때 histamine만은 활성증가를 보여 주었다(Fig. 3). Spermine과 비슷하게 염기성 아미노산들로 합성된 polycation 펩티드들도 미토콘드리아의 permeability transition을 저해한다고 보고되었다.¹³ 따라서 본 실험에서도 두 가지 분자량의 polylysine을 사용하여 PLD 효소활성에 미치는 영향을 측정하였다(Fig. 4). 평균 분자량 1,000과 7,000의 펩티드는 각각 0.5 mM과 0.035 mM에서 최적활성을 보였으며, 이때 증가폭은 약 2.3~2.7배로 나타났다.

Spermine 역할과 2가 금속물. 소장 미토콘드리아의 유사 PLD 활성에서 여러 가지 2가 금속 이온(Ca^{2+} ,

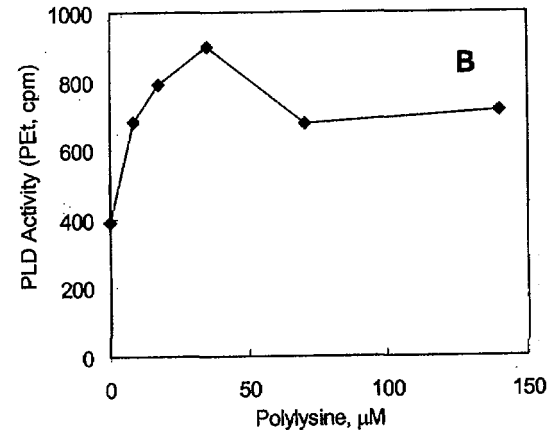
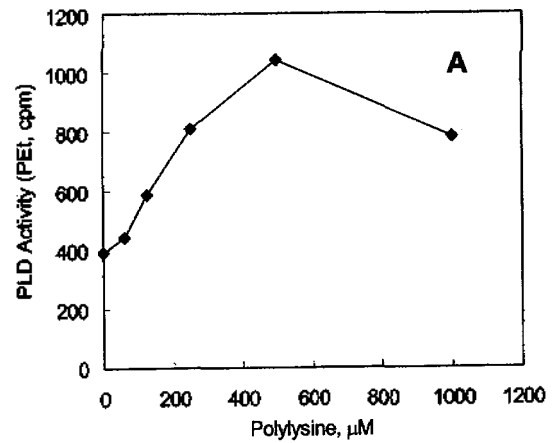


Fig. 4. Effects of polylysine on PLD activity in the mitochondrial preparation. A, polylysine (Av. Mol. Wt. 1,000); B, polylysine (Av. Mol. Wt. 7,000).

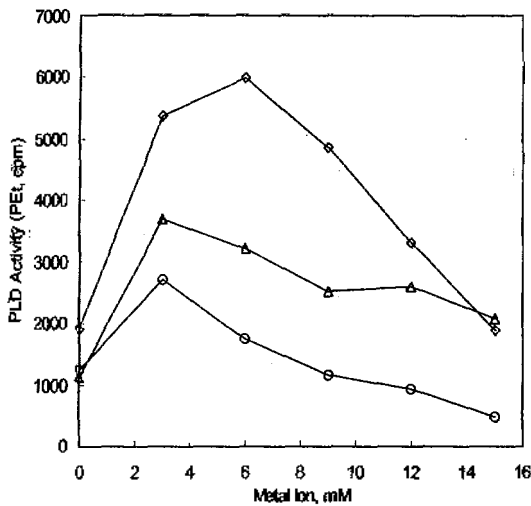


Fig. 5. Effects of divalent metal ions on the spermine-activated PLD in the mitochondrial preparation. PLD activity was determined at different concentrations of metal ions in the presence of 1 mM spermine. ○, Ca²⁺; △, Mg²⁺; ◇, Ba²⁺.

Mg²⁺, Co²⁺, Ba²⁺)들이 PA양을 증가시켰으며, 또한 Ca²⁺의 영향이 spermine에 의한 PA 증가를 더욱 강화시켜주는 것으로 보고되었다. 본 실험조건에서도 spermine에 의한 활성화에 Ca²⁺이온이 필요한 것으로 나타났다(Fig. 5). 검토한 2가 금속중 spermine에 의한 활성증가는 Ba²⁺이 가장 크게 나타났다. 결과적으로 spermine의 존재하에서의 Ca²⁺, Mg²⁺, Ba²⁺들은 각각 3 mM, 3 mM, 6 mM 있을 때 2~3배 정도 PLD 활성을 더 증가시켰다.

기질 특이성. Madesh 등에 의하면 소장 미토콘드리아의 유사 PLD는 PE를 기질로 사용한다고 주장하였다.^{7,9} 본 실험조건에서는 PC를 기질로 사용하여 모든 PLD 활성을 측정하였기 때문에 기질 특이성의 차이가 있는지를 알아 볼 필요가 있었다. 방사능 표지가 부착된 PE를 기질로 사용하여 PC와의 차이를 측정해보았다(Table 1). Histamine을 제외한 폴리아민들에 의한

활성화에서는 PE를 기질로 사용했을 때의 PLD 활성도가 PC의 경우에 비교해 약 20% 내외의 차이를 보여 주었다. 이는 소장 미토콘드리아 결과와 상이한 것으로 뇌 미토콘드리아의 PLD는 상대적으로 기질 특이성이 떨어지는 것으로 여겨진다.

쥐 뇌의 미토콘드리아 PLD 활성화에 올레산이 필요함에 반해 Madesh 등의 소장 PLD에는 올레산을 필요로 하지 않았으며, 또한 transphosphatidylation 반응이 일어나지 않는다고 보고하였다.⁷ 더구나 polyamine 같이 permeability transition을 유발하는 조건에서 미토콘드리아 PLD가 활성화된다는 보고와 함께, permeability transition을 특이적으로 막는 cyclosporin A에 의한 PLD 활성결과를 보고하고 있어¹⁴ spermine의 작용이 서로 모순됨을 보여주고 있다. 현재로서는 미토콘드리아에 존재하는 PLD의 분리가 이루어지지 않은 상태이기 때문에 미토콘드리아에 성질이 다른 PLD들의 존재 가능성을 배제할 수 없다. 이와 함께 생성물인 PA의 작용도 더 세밀한 연구가 필요하겠다.

결론적으로 본 실험에서 *in vitro* 조건하에서 쥐 뇌 미토콘드리아 분획의 PLD가 spermine에 의해 활성화됨을 보여 주었다. 이 결과는 소장 미토콘드리아에서 얻어진 실험 결과와 다음 사안에서 틀리다. 쥐 뇌 미토콘드리아의 PLD에 대한 spermine 효과는 oleate가 필요하였으며 기질특이성은 낮아 PC나 PE 모두 거의 비슷하게 작용하였다. 현 실험 결과는 아직 미토콘드리아 permeability transition과 PLD와의 상관관계를 밝히지는 못하고 있다.

본 연구는 덕성여자대학교 자연과학연구소 연구지원비에 의하여 이루어졌으며 실험은 이혜주의 학사 논문의 일환으로 수행되었다. 쥐 미토콘드리아 분획 준비와 방사성 동위 원소사용등은 서울대학교 신경화학연구소의 도움을 받았으며, 실험방법을 지도해준 홍성택에게 감사한다.

Table 1. Substrate specificity of various amine effects on the PLD activity in mitochondrial preparation

		PE	PC	PE/PC
		Activities (cpm)	Activities (cpm)	Activity Ratio (%)
Spermine	1 mM	1761	2232	78.9
Histamine	10 mM	1749	1487	117.6
Polylysine	0.5 mM	2044	2350	87.0

인용문헌

1. Pai, J. -K.; Siegel, M. I.; Egan, R. W.; Billah, M. J. *Biol. Chem.* **1988**, *263*, 12472.
 2. Exton, J. H. *J. Biol. Chem.* **1997**, *270*, 15579.
 3. Hammond, S. M.; Altshuller, Y. M.; Sung, T. -C.; Rudge, S. A.; Rose, K.; Engebrecht, J.; Morris, A. J.; Frohman, M. A. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 29640.
 4. Lee, S. Y.; Yeo, E. -J.; Choi, M. -U. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1998**, *244*, 825.
 5. Meier, K. E.; Gibbs, T. C.; Knoepp, S. M.; Ella, K. M. *Biochem. Biophys. Acta* **1999**, *1439*, 199.
 6. Mayr, J. A.; Kohlwein, S. D.; Paltauf, F. *FEBS Letter* **1996**, *393*, 236.
 7. Madesh, M.; Balasubramanian, K. A. *Lipids* **1997**, *32*, 471.
 8. Lapidus, R. G.; Sokolove, P. M. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 18931.
 9. Madesh, M.; Balasubramanian, K. A. *Biochem. Biophys. Acta* **1997**, *1348*, 324.
 10. Jung, K.; Koh, E.; Choi, M.-U. *Bull. Korean Chem. Soc.* **1989**, *10*, 585.
 11. Choi, M. -U.; Abramoon, M. B. *Biochem. Biophys. Acta* **1978**, *540*, 337.
 12. Kim, B. S.; Hong, S.; Choi, M. -U. *Bull. Korean Chem. Soc.* **1998**, *19*, 375.
 13. Rigobello, M. P.; Barzon, E.; Marin, O.; Bindoli, A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1995**, *217*, 144.
 14. Madesh, M.; Balasubramanian, K. A. *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, *1389*, 206.
-