

## 칠성장어(*Lampetra japonica*) 간조직 젖산탈수소효소와 대구(*Gadus macrocephalus*) liver-specific C<sub>4</sub> 동위효소의 특성 및 진화적 관계

박선영<sup>1</sup> · 조성규 · 염정주\*

청주대학교 생명유전통계학부 생명과학전공, <sup>1</sup>동신제약 중앙연구소

Received July 24, 2004 / Accepted August 19, 2004

**Characterization and Evolutionary Relationship of Lactate Dehydrogenase in Liver of *Lampetra japonica* and Liver-specific C<sub>4</sub> Isozyme in *Gadus macrocephalus*.** Seon Young Park<sup>1</sup>, Sung Kyu Cho and Jung Joo Yum\*, Department of Life Science, Cheongju University, Cheongju 360-764, Korea, <sup>1</sup>Central Research Center, Dongshin Pharmaceutical Co., Osan 447-320, Korea – The lactate dehydrogenase (EC 1.1.1.27, LDH) in liver of *Lampetra japonica* was purified in buffer of affinity chromatography. The liver-specific C<sub>4</sub> isozyme of *Gadus macrocephalus* was purified by heat treatment, affinity chromatography, and DEAE-Sephacel chromatography. The liver-specific C<sub>4</sub> isozyme was eluted in a buffer containing NAD<sup>+</sup> and was coeluted with B<sub>4</sub> isozyme in plain buffer of affinity chromatography. Liver-specific C<sub>4</sub> isozyme in *G. macrocephalus* was the most thermostable, and B<sub>4</sub> isozyme was more stable than A<sub>4</sub>. The LDH in the fraction of pH 7.45 purified from the liver of *L. japonica* by chromatofocusing was more inhibited by pyruvate than purified LDH. The optimum pH of the LDH isozyme in the liver of *L. japonica* was 7.5 and that of liver-specific C<sub>4</sub> isozyme was 8.5. The LDH in liver of *L. japonica* made complexes more with antibody against *Coreoperca herzi* A<sub>4</sub> and liver-specific C<sub>4</sub> than with that against eye-specific C<sub>4</sub>. Therefore, the structure of the LDH in liver of *L. japonica* might be similarly evolved to that of subunit A and liver-specific C<sub>4</sub> isozyme in liver tissue of *G. macrocephalus*. The evolution rate of subunit C is faster than that of subunit A. LDH in liver of *L. japonica* has not one isozyme but isozymes and it was also found out to have not only subunit A and B but also subunit C.

**Key words** – lactate dehydrogenase, *Lampetra japonica*, *Gadus macrocephalus*, liver-specific C<sub>4</sub> isozyme.

척추동물의 젖산탈수소효소(EC 1.1.1.27, lactate dehydrogenase; LDH)는 *Ldh-A*, *Ldh-B* 및 *Ldh-C* 유전자에 의해 만들어지는 하부단위체 A, B 및 C로 구성된 사량체의 동위효소로 A<sub>4</sub>, B<sub>4</sub>, A<sub>3</sub>B, A<sub>2</sub>B<sub>2</sub> 및 AB<sub>3</sub>를 만든다[15]. LDH A<sub>4</sub>는 골격근과 같은 혐기적조직에서 강한 활성을 보이고 피루브산을 젖산으로 환원시키며, B<sub>4</sub>는 심장과 같은 호기적조직에서 강한 활성을 보이고 젖산을 피루브산으로 산화시킨다[14]. C<sub>4</sub> 동위효소는 포유류 및 조류의 경우, 정소조직에서[23], 고등한 경골어류의 경우 간 및 눈조직에, 그리고 하등한 경골어류의 경우 여러 조직에 나타나지만 진화상의 일부 중간 어류군은 *Ldh-C* 유전자의 발현이 없는 것으로 보고되었다[15,18]. 그러나 척추동물중 계통유전학적으로 가장 빠르게 분기된 원시무악어류인 칠성장어류(*Petromyzon marinus*, *Lampetra lamottei*)의 조직에서 LDH는 한 개의 유전자로 이루어진 단일동위효소이며 척추동물의 A<sub>4</sub> 동위효소와 유사하였다. 따라서 *Ldh-A* 유전자가 복제되어 *Ldh-B*를 만들고, *Ldh-B* 유전자의 독립적인 복제에 의해 *Ldh-C* 유전자를 형성하였고, 칠성장어는 하부단위체 B를 상실한 것이다[15]. 다른 한 편으로 *Petromyzon marinus*의 LDH는 대구(*Pseudophycis barbata*) LDH B<sub>4</sub>보다 C<sub>4</sub>와 면역화

학적으로 유사하므로 하부단위체 C가 하부단위체 B보다 진화상 먼저 만들어졌고[2], 여러 종의 A<sub>4</sub>, B<sub>4</sub>, 및 C<sub>4</sub>동위효소의 아미노산 조성 및 서열의 분석에 의하면 LDH의 조상형이 하부단위체 A보다는 하부단위체 C에 더 유사하여 *Ldh-C* 유전자가 *Ldh-A* 및 *Ldh-B* 유전자를 만들었다고 보고하였다[2, 3,13,20]. 그러나 칠성장어(*Lampetra planeri*)의 LDH는 *Ldh-A*, *Ldh-B* 두 개의 유전자중 한 개의 유전자가 불활성화되거나 상실되고 남은 한 개의 유전자에 의해 발현된 단일 동위효소로 affinity chromatography상에서 LDH-A와 유사하게 행동하고 기질에 대한 억제정도는 LDH-B와 유사하여 LDH A<sub>4</sub>와 B<sub>4</sub>의 중간 특성을 나타내는 것으로 보고되었다[9]. 또한 피낭류와 다른 종들의 cDNA서열을 비교한 결과 *Ldh-C*가 먼저 분기했다는 주장을 부인하였다[25]. 이상과 같이 하등 척추동물의 LDH 하부단위체간의 진화관계는 여러 의견이 제시되었으므로 이를 확인하기위해 국내에서 서식하는 칠성장어(*Lampetra japonica*) 골격근 조직의 LDH를 정제한 후 항혈청을 조제하여 경골어류 및 포유류의 LDH와 비교한 결과 골격근 조직에서 전기영동상은 단일밴드로 나타나지만 *Ldh-A*와 *Ldh-B*가 발현되고 하부단위체 A의 구조가 하부단위체 B의 구조와 유사한 것으로 보고되었으나[6] *Ldh-C*와의 관련성은 연구되지 않았다.

본 연구는 칠성장어 간조직 LDH와 대구의 liver-specific C<sub>4</sub> 동위효소를 정제하여 특성을 살펴보고 칠성장어 간조직

\*Corresponding author

Tel : +82-43-229-8527, Fax : +82-43-229-8525

E-mail : jjyum@cju.ac.kr

LDH와 경골어류 LDH 항혈청들의 항원-항체 반응을 실시하여 칠성장어 간조직 LDH 동위효소의 구성 및 liver-specific C<sub>4</sub> 동위효소와의 진화상의 관련 정도를 확인하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 조직 추출액의 준비

대구(*Gadus macrocephalus*)는 생체 재료상에서 구입하였고, 칠성장어(*Lampetra japonica*)는 강원도 인제군 오색에서 채집하여 동결된 상태를 유지시키며 실험실로 운반하였다. 칠성장어와 대구의 간조직을 적출하여 증류수로 세척한 후 4℃의 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 6.85)를 각 시료 조직의 3배(V/W) 가한 다음 얼음에 채운 glass homogenizer로 파쇄하였으며, 이 용액을 4℃, 20,000×g에서 1시간씩 2번 원심분리(Hitachi 20 PR-52D)하여 상등액을 시료로 사용하였다. 또한 칠성장어 간조직 일부는 chromatofocusing을 실시하기 위해 0.025 M Tris-CH<sub>3</sub>COOH buffer (pH 8.5)를 사용하여 파쇄하였다. 조직추출액은 0℃에서 차게한 후 glass wool을 채운 column에 2번 통과시켜 지방을 제거하였다.

### LDH의 활성측정 및 단백질 정량

LDH의 활성은 1.5 mM pyruvate와 0.14 mM NADH를 함유한 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 6.85) 3 ml에 시료를 가한 다음 NADH로부터 NAD<sup>+</sup>로 산화되는 정도를 spectrophotometer (Shimadzu UV-160A)를 사용하여 25℃, 340 nm에서 측정하였다. 활성단위는 1분 동안 감소되는 흡광도 1.0을 1 unit로 하였다. Affinity chromatography 과정 중 각 분획의 단백질은 Bradford의 방법[4]으로 595 nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였고, chromatofocusing 경우에는 280 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### Polyacrylamide gel 전기영동

LDH 동위효소의 정제도와 항원과 항체의 반응정도를 확인하기 위해 7.5% acrylamide separation gel과 2.5% acrylamide stacking gel을 만들어 polyacrylamide vertical slab system (Hoefer SE250)으로 실시하였다[8]. Tris-glycine buffer (pH 8.3)를 사용하여 100V에서 15분간 전개시킨 후 200V에서 2시간 15분 동안 thermostatic circulator (LKB 2219)를 사용 4℃로 유지시키면서 전기영동 하였으며 LDH를 염색하고 [26] 단백질은 silver nitrate로 염색하였다[27].

### LDH 동위효소의 열에 대한 안정성

대구 간조직을 thermostatic circulator를 사용하여 60℃를 유지시키면서 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50 및 60분간 열처리한 후 4℃에서 1시간 방치시킨 다음 4℃, 20,000×g에서 1시간 동안 원심분리하여 상등액을 얻은 후 효소활성을 측정하고 단백질을 정량하였으며, 전기영동을 실시한 후 densito-

gram을 얻어 하부단위체 A, B 및 C가 불활성화 되는 정도를 측정하였다.

### LDH 동위효소의 정제

#### 열처리 및 affinity chromatography

대구 간조직은 60℃에서 25분간 열처리하여 4℃에서 1시간 방치한 후, 원심분리 하여 변성된 단백질을 제거하고 상등액을 affinity chromatography 시료로 사용하였다. Oxamate gel의 준비는 O'Carra의 방법[16,17]을 변형하여 실시하였다 [12]. 0.5 M KCl과 0.2 mM NADH를 첨가한 칠성장어 간조직 및 대구 간조직은 0.2 mM NADH를 함유한 0.05 M potassium phosphate buffer (pH 6.85, 이하 buffer로 칭함)로 평형 시킨 oxamate column (25×85 mm)에 각각 가하였다. Column으로부터 단백질이 용출되지 않을 때까지 0.2 mM NADH를 함유한 buffer로 씻어 준 후, 1.6 mM NAD<sup>+</sup>를 함유한 buffer와 buffer를 차례로 유입시키면서 용출액을 2.5 ml씩 분획하였고, 각 분획은 LDH 동위효소의 활성을 측정하고 단백질을 정량하여 elution profile을 작성하였다. 칠성장어 LDH는 ultrafiltration에 의해 농축하여 정제용액으로 사용하였고, 대구의 liver-specific C<sub>4</sub> 동위효소를 함유한 분획들도 농축하고 0.05 M Tris-HCl buffer (pH 8.5)로 교환한 후 ion exchange chromatography의 시료로 사용하였다.

#### DEAE-Sephacel chromatography

열처리와 affinity chromatography에 의해 부분 정제된 대구 간조직의 LDH 동위효소를 0.05 M Tris-HCl buffer (pH 8.5, buffer로 칭함)로 평형 시킨 DEAE-Sephacel column (15×200 mm)에 가하였다. Buffer 10 ml를 유입시킨 후 대구의 LDH 동위효소는 0-0.3 M의 NaCl 농도구배를 형성한 buffer 140 ml를 유입시켰다. 용출액은 1 ml씩 분획하여 각 분획의 LDH 동위효소 활성을 측정한 다음 elution profile을 작성하였다. 전기영동 후 LDH C<sub>4</sub> 동위효소를 포함한 분획만을 모아 농축시킨 후 전기영동 하여 LDH 및 단백질을 염색하여 정제도를 확인하였고 항원 및 시료로 사용하였다.

#### Chromatofocusing

Chromatofocusing gel PBE 94 (Pharmacia) column (10×300 mm)의 상부에 Sephadex G-50을 2 cm 넣은 후 0.025 M Tris-CH<sub>3</sub>COOH buffer (pH 8.3)를 bed volume의 15배 정도를 서서히 가하여 평형 시킨 후 칠성장어 간조직 추출액을 가하였다. Polybuffer 96을 14배(1:13) 희석하여 만든 polybuffer 96-CH<sub>3</sub>COOH (0.0075 M, pH 6.0)를 7.8 cm/hr의 속도로 흘려주면서 pH 6.0-8.0의 구배를 형성하였다. 용출액은 1 ml씩 분획하여 280 nm에서 흡광도를 측정하고 LDH의 활성 및 pH를 측정하여 elution profile을 작성하였다.

### LDH 동위효소의 기질의존성 측정 및 최적 pH

정제된 칠성장어 간조직 LDH 동위효소와 chromatofo-

cusing에 의해 정제된 pH 7.45 LDH 분획의 기질농도에 대한 효소 활성 저해정도를 알아보기 위해 100 μM에서 10 mM 까지 pyruvate 농도를 증가시키면서 효소 활성의 변화를 측정하였다.

정제된 칠성장어 간조직 LDH 동위효소와 대구 liver-specific C<sub>4</sub> 동위효소를 4°C로 유지시킨 0.1 M acetate buffer (pH 4.0, 4.5, 5.0, 5.5), 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 6.0, 6.5, 7.0), 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 7.5, 8.0, 8.5, 9.0) 및 0.1 M sodium carbonate buffer (pH 9.5, 10.0, 10.5)에서 반응시킨 후 활성을 측정하여 최적 pH를 확인하였다.

**항혈청 조제 및 항원-항체 반응**

정제한 liver-specific C<sub>4</sub> 동위효소는 0.06, 0.1, 0.13 mg을 0.1 M potassium phosphate buffer에 녹여 동량의 Freund's complete adjuvant에 완전히 유화시킨 후, 뉴질랜드 화이트 순종 토끼의 thigh muscle과 dorsal muscle에 8일 간격으로 3회 주사하였다. 최종 면역주사 4일 후 항응고제를 사용하지 않고 심장 천공법으로 채혈하였으며 혈액은 37°C에서 1시간, 4°C에서 1시간 방치 후 혈병을 제거하고 4°C에서 12시간 방치한 후, 1,000×g에서 20분간 원심분리하여 얻은 상등액을 20,000×g에서 30분간 원심분리한 후 상등액을 항혈청으로 사용하였다. 항혈청은 정제하여 사용하였다[6]. Eye-specific C<sub>4</sub>와 격지 A<sub>4</sub>에 대한 항혈청은 제조된 것을 사용하였다[6]. 칠성장어 간조직 추출액과 chromatofocusing에 의해 정제된 pH 7.45의 분획의 동위효소 1 unit에 대해 liver-specific C<sub>4</sub>, eye-specific C<sub>4</sub> 및 격지 LDH A<sub>4</sub>에 대한 항혈청을 25, 50, 100, 200 μl를 가한 후 25°C에서 1시간, 4°C에서 12시간 방치시킨 다음 4°C, 20,000×g에서 원심분리하였으며 복합체를 형성하지 않고 상등액에 남아 있는 효소의 활성을 측정하였다.

**결과 및 고찰**

**LDH 동위효소의 열에 대한 안정성**

대구 간조직 추출액을 60°C에서 30분간 열처리하면 LDH 활성이 급격하게 감소하기 시작했고, 50분간 열처리하면 LDH 활성은 50.5%가 남았으며, 단백질은 10분간 열처리하면 급격히 변성되어 35.3%가 남았다(Fig. 1). 또한 동위효소가 불활성화되는 정도를 확인하기 위해 60°C에서 25분간 열처리한 후 liver-specific C<sub>4</sub> 동위효소는 87.3%의 활성이 남아 A<sub>4</sub> 및 B<sub>4</sub> 동위효소보다 열에 안정하였고, B<sub>4</sub> 동위효소는 A<sub>4</sub>보다 안정하였으므로 C<sub>4</sub>>B<sub>4</sub>>A<sub>4</sub>의 순서로 나타났다(Fig. 2). 따라서 liver-specific C<sub>4</sub> 동위효소를 열처리하여 정제하였다.

대구목 *Melanogrammus aeglefinus*의 LDH의 열에 대한 안정성은 간>심장>골격근조직으로 나타났고[22], 농어목 *Geophagus brasiliensis*의 LDH는 눈>심장>골격근조직의 순서로 열에 안정하였다[18]. 따라서 본 실험의 결과인 LDH C<sub>4</sub>>B<sub>4</sub>>

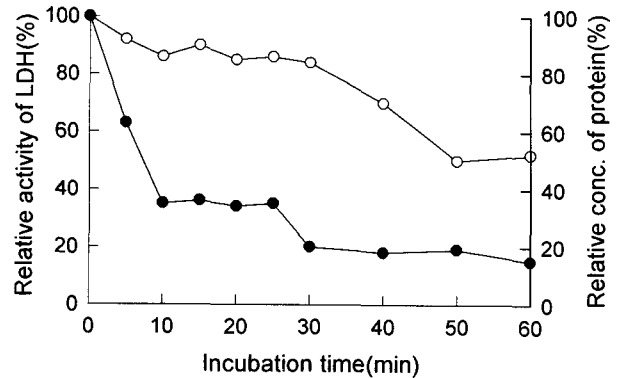


Fig. 1. Thermal inactivation of liver extract in *Gadus macrocephalus* at 60°C. ○, Activity of LDH; ●, concentration of protein.

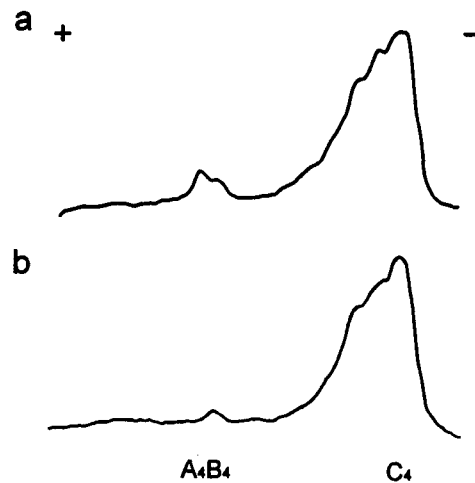


Fig. 2. Densitograms showing thermal inactivation of LDH isozymes after heat treatment for 25 min at 60°C. a, *Gadus macrocephalus* liver extract; b, *Gadus macrocephalus* liver extract after heat treatment.

A<sub>4</sub>의 순서와 일치하였다. 칠성장어 골격근, 심장 및 간조직을 50°C에서 60분간 열처리한 결과 80% 이상의 활성이 남아 있었으나 심장과 간조직이 유사하고 열에 대하여 안정하였다[5]. 칠성장어 LDH 동위효소의 열에 대한 안정성은 조직에 존재하는 동위효소의 구성 비율에 따라 약간의 차이가 있는 것으로 보이며 대구 LDH와 비교하면 하부단위체의 분화 정도가 낮은 것으로 생각된다.

**LDH 동위효소의 정제**

**열처리 및 affinity chromatography**

칠성장어 간조직은 affinity chromatography를 실시하여 LDH를 정제하였고, 대구 간조직 추출액은 60°C에서 15분간 열처리한 후 단백질은 36% 남았고 LDH는 90%가 남아 있어 affinity chromatography와 DEAE-Sephacel chromatography 과정에 의해 LDH를 정제하였다.

LDH는 oxamate-linked sepharose gel에서 abortive ternary complex (LDH-NAD<sup>+</sup>-pyruvate)를 형성하는 결합력이 동위효소에 따라 다르므로 NAD<sup>+</sup>를 함유한 buffer 유입시 A<sub>4</sub> 동위효소가 용출되기 시작하고 평형 buffer 유입시 B<sub>4</sub> 동위효소가 용출된다[16,17]. 그러나 진화상에서 하부단위체 A, B 및 C의 분화 정도에 따라 역학적 특성의 차이가 있어 affinity chromatography 상에서 다양한 양상을 보이므로 elution profile에서 LDH 동위효소들 간의 진화적 유연관계를 고찰할 수 있다.

Oxamate-linked sepharose gel에 칠성장어 간조직 추출액을 가한 후 LDH는 NAD<sup>+</sup>를 함유한 buffer 유입시 용출되지 않고 평형 buffer 유입 후 13번째 분획에서 용출되었다(Fig. 3). 그러나 대구 간조직의 LDH 동위효소는 NAD<sup>+</sup>를 함유한 buffer 유입 후 26번째 분획부터 용출되기 시작하여 평형 buffer 유입 후 57번째 분획까지 용출되었다(Fig. 4). C<sub>4</sub> 동위효소는 LDH가 확인된 모든 분획에 존재하였고 B<sub>4</sub> 동위효소는 평형 buffer 유입 후 21번째 분획에서 용출되었다. C<sub>4</sub> 동위효소가 포함된 분획들을 ultrafiltration에 의해 농축시킨 후 DEAE-Sephacel chromatography의 시료로 사용하였다. 칠성장어 간조직 LDH는 대구 LDH 동위효소보다 약간 늦게 용출되기 시작하지만 동위효소들이 분화가 덜되어 서로 분자구조가 유사해서 함께 용출되었으며 대구 LDH와 유사하였다. 대구의 LDH는 여러 개의 peak로 나타나지만 C<sub>4</sub> 동위효소가 모든 분획에서 확인되고 다른 동위효소들이 함께 용출되었다. 그러나 고등어 LDH의 하부단위체 A는 NAD<sup>+</sup>를 함유한 buffer 유입시 16번째 분획에서 하부단위체 B, C와 완전히 분리되어 나왔으므로[19] 대구 LDH의 하부단위체 A, B, C는 고등어 LDH의 하부단위체들 보다 분화가 덜 된 것으로 볼 수 있다. 또한 *Ldh-C* 유전자가 간과 눈조직에서 동시에

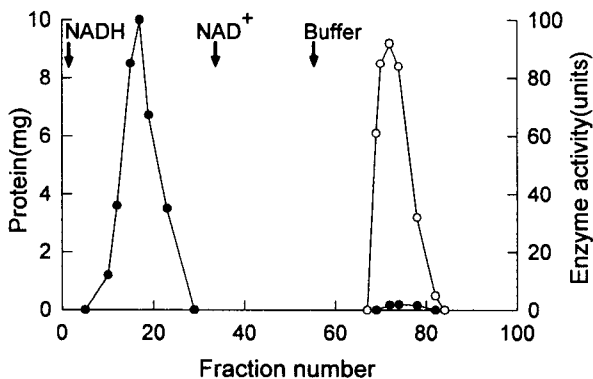


Fig. 3. Affinity chromatography of LDH isozymes in *Lampetra japonica* liver on the oxamate-linked sepharose gel (25 × 85 mm). Fraction of 2.5 ml was collected at a flow rate 0.4 ml/min. LDH isozymes were found to be in the fractions of the column buffer. ●, Protein concentration; ○, enzyme activity.

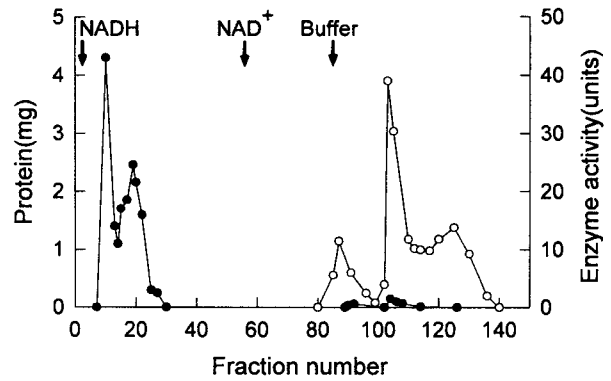


Fig. 4. Affinity chromatography of LDH isozymes in *Gadus macrocephalus* liver on the oxamate-linked sepharose gel (25 × 85 mm). Fraction of 2.5 ml was collected at a flow rate 0.4 ml/min. LDH isozymes containing C subunit were found to be in the fraction numbers 80-140. ●, Protein concentration; ○, enzyme activity.

발현되는 *Acaronia nassa* LDH 동위효소의 경우 oxamate sepharose affinity column에서 liver-specific C<sub>4</sub> 동위효소는 하부단위체 A, eye-specific C<sub>4</sub> 동위효소는 하부단위체 B와 유사하게 용출되었으므로 liver-specific C<sub>4</sub>와 eye-specific C<sub>4</sub>의 분자 구조에 차이가 있음이 보고되었다[11]. 모래무지의 LDH A<sub>4</sub> 동위효소는 NAD<sup>+</sup>를 함유한 buffer 유입시 용출되지 않고 평형 buffer 유입 후 22번째 분획부터 용출되었다[12]. 꺾지의 LDH A<sub>4</sub>는 NAD<sup>+</sup>를 함유한 buffer 유입 후 34번째 분획부터 용출되기 시작하여 평형 buffer 유입 후 27번째 분획까지 용출되었고, 칠성장어 골격근의 LDH 동위효소는 평형 buffer 유입 후 23-28번째 분획에서 모두 용출되었다[5]. 따라서 affinity chromatography 상에서 대구 LDH는 꺾지와 비슷한 양상을 나타내고 모래무지와 칠성장어 LDH보다는 진화된 것으로 보인다.

**DEAE-Sephacel chromatography**

DEAE-Sephacel chromatography 결과 대구 간조직 LDH는 20-80번째 분획까지 확인되었으며 liver-specific C<sub>4</sub>는 21-28번째 분획에서 확인되었다(Fig. 5). Liver-specific C<sub>4</sub> 동위효소는 양하전을 띠어 음극쪽에 위치하였고 순수하게 정제된 것으로 확인되었으며, 칠성장어 간조직 LDH도 정제된 것으로 확인되었다(Fig. 6, Table 1). 정제된 liver-specific C<sub>4</sub> 동위효소를 ultrafiltration에 의해 농축하여 항원 및 시료로 사용하였다.

**Chromatofocusing**

칠성장어는 LDH 동위효소의 진화에서 중요한 위치를 차지하는 어류군으로 조상 유전자인 *Ldh-A*에 의한 단일 동위효소 band를 보유하고 있는 것으로 보고 되었으나[24], polyacrylamide gel isoelectric focusing (PAGE) 결과 칠성장어

Table 1. Purification of LDH liver-specific C<sub>4</sub> isozyme from *Gadus macrocephalus* liver

Step	Total activity (units)	Specific activity (units/mg)	Total protein (mg)	Purification (fold)	Yield (%)
<i>G. macrocephalus</i> liver					
Crude extract	5360.0	22.1	242.2	1	100
Heat treatment	4840.1	55.5	87.2	2.6	90.3
Affinity chromatography	4539.9	1899.6	2.4	85.8	84.7
DEAE-Sephacel chromatography	953.0	1906.0	0.5	86.1	17.8

어 간조직의 LDH 동위효소는 pI 7.55, 7.63, 골격근의 LDH 동위효소는 pI 4.85, 4.80, 4.95, 5.05, 심장의 LDH 동위효소는 pI 4.25, 4.32로 나타나 2개 이상의 동위효소 band를 가지고 있는 것으로 보고 되었다[5].

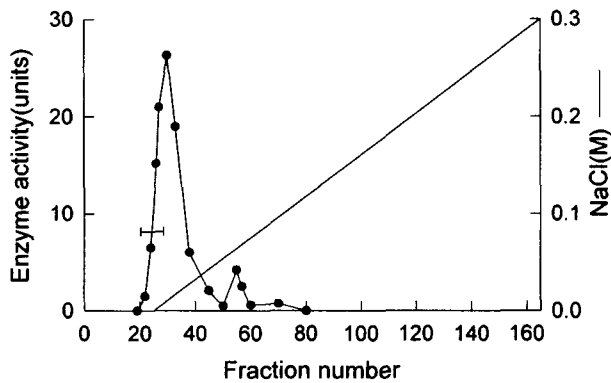


Fig. 5. DEAE-Sephacel chromatography of *Gadus macrocephalus* liver LDH fractions (Nos.80-140) pooled after affinity chromatography (Fig. 4).

Unbound LDH isozymes were eluted with 0.05 M Tris-HCl (pH 8.5), and bound LDH isozymes were eluted with a gradient of 0 M to 0.3 M NaCl in the same buffer. Fraction of 1 ml was collected at a flow rate 0.4 ml/min.  $\bullet$ , Pure C<sub>4</sub> isozyme fractions.

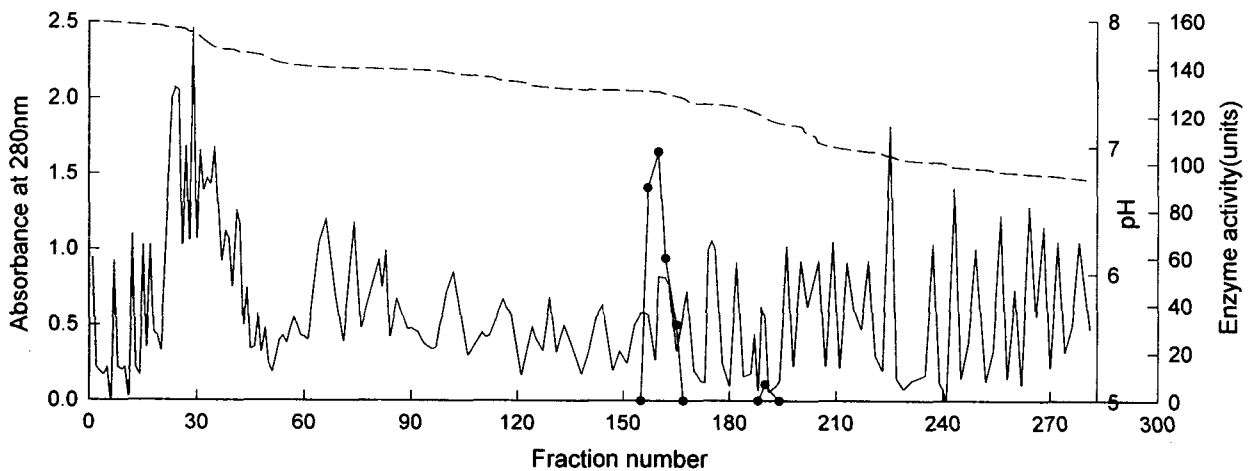


Fig. 7. Chromatofocusing of LDH isozymes in *Lampetra japonica* liver on a column (10×300 mm) of PBE 94. Condition: start buffer, 0.025 M Tris-CH<sub>3</sub>COOH (pH 8.3); elution buffer, 0.0075 mmol/pH unit/ml Polybuffer (6.0); flow rate, 7.8 cm/hr. —, Absorbance at 280 nm; ----, pH; ●, enzyme activity.

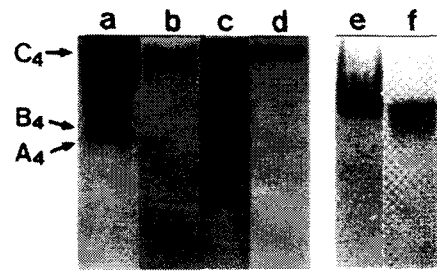


Fig. 6. Polyacrylamide gel electrophoresis of LDH isozymes. a, LDH isozymes of *Gadus macrocephalus* liver; b, the purified LDH isozymes after the affinity chromatography; c, the purified LDH isozymes after the affinity chromatography stained with silver nitrate; d, the purified LDH C<sub>4</sub> isozyme after the DEAE-Sephacel chromatography; e, LDH isozymes of *Lampetra japonica* liver; f, the purified LDH isozymes after the affinity chromatography stained with silver nitrate.

본 실험에서 칠성장어 간조직 LDH의 특성 및 liver-specific C<sub>4</sub> 동위효소와의 진화적 관련성을 살펴보기 위하여 간조직의 LDH를 chromatofocusing에 의해 분리하였다(Fig. 7). 많은 수의 단백질이 확인되었지만 LDH는 pH 7.45 분획에서 활성이 크고 pH 7.25분획에서 활성이 낮게 용출되는 2개의 peak를 확인하여 2개의 동위효소를 보유하고 있는 것

으로 볼 수 있다. 따라서 칠성장어 간조직의 LDH는 한 개 이상의 유전자에 의해 만들어진 동위효소들이라 할 수 있다. 골격근 조직은 chromatofocusing하여 pH 5.2, 5.1, 5.0, 4.8의 분획이 LDH인 것으로 보고 되었으므로[5] 두 조직의 LDH 동위효소는 차이가 있음을 확인 할 수 있었다. 따라서 간조직을 chromatofocusing한 결과 활성이 높은 pH 7.45분획만 농축하여 시료로 사용하였다.

**LDH 동위효소의 기질의존성**

피루브산에 대한 역학적 실험은 하부단위체의 분자적 구조를 이해하는데 유용하다[22]. LDH A<sub>4</sub> 동위효소는 고농도의 피루브산에 의해서도 저해정도가 낮고 B<sub>4</sub> 동위효소는 저농도의 피루브산에 대해서 저해 정도가 크게 나타난다[26]. 피루브산 10 mM에서 칠성장어 간조직의 정제된 LDH는 41.3%, chromatofocusing에 의해 정제된 pH 7.45 분획의 LDH 동위효소는 29.5%의 활성이 남아있었다(Fig. 8). 피루브산 10 mM에서 *Coreopera herzi*의 LDH A<sub>4</sub> 동위효소는 72%, *Bos taurus*의 B<sub>4</sub>는 22%의 활성이 남았고, 대구의 liver-specific C<sub>4</sub> 동위효소는 50%의 활성이 남아 있어 A<sub>4</sub>와 B<sub>4</sub>의 중간저해형으로 나타났다[5]. 따라서 본 실험에서 칠성장어 간조직 추출액의 LDH 동위효소의 피루브산에 의한 저해는 대구 C<sub>4</sub>의 저해정도와 유사하였고 정제된 pH 7.45 분획의 LDH 동위효소는 A<sub>4</sub>보다 B<sub>4</sub> 동위효소에 더 유사하였다. *Gadus morhua*의 하부단위체 C는 기질에 대한 저해정도가 하부단위체 B와 유사하며, Km과 최적 기질농도는 하부단위체 A와 유사하여 [20] 본 실험 결과와 일치하였다.

**LDH 동위효소의 최적 pH**

Liver-specific C<sub>4</sub> 동위효소의 활성은 산성에서 급격히 감소하고 염기성에서 높은 활성을 보이며 최적 pH는 8.5로 나타났다(Fig. 9). Eye-specific C<sub>4</sub>의 최적 pH는 8.5, testis C<sub>4</sub>는

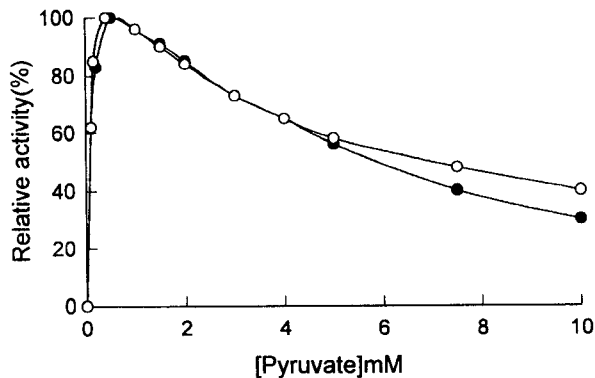


Fig. 8. Effect of pyruvate concentrations on the activity of LDH isozymes in *Lampetra japonica* liver.

●, Purified fraction after affinity chromatography; ○, purified fraction (pH 7.45) after the chromatofocusing.

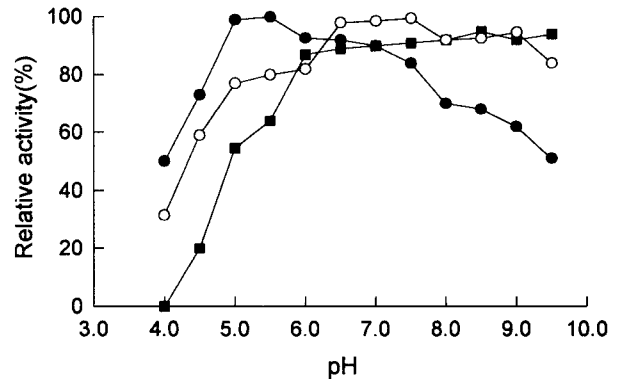


Fig. 9. Effect of pH on the LDH isozymes.

○, Purified LDH isozyme in liver from *Lampetra japonica*; ●, skeletal muscle from *Lampetra japonica*; ■, liver-specific C<sub>4</sub> isozyme from *Gadus macrocephalus*.

pH 9.0 [19]으로 본 논문의 결과와 유사하였고, *Gadus morhua* C<sub>4</sub> 동위효소의 최적 pH는 7.1 [20], 청어 정자의 A<sub>4</sub>, A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>, B<sub>4</sub>의 최적 pH는 7.1, 7.25, 7.6 [10]으로 본 논문의 결과와 약간의 차이를 보이나 pH 6.5-9.0에서 안정하므로 큰 차이는 볼 수 없었다. 칠성장어 간조직 LDH 동위효소의 최적 pH는 7.5이며 중성과 염기성에서 높은 활성을 나타냈으나 칠성장어 골격근 LDH 동위효소의 최적 pH는 5.5이고 염기성으로 갈수록 활성이 감소하였으며(Fig. 9), PAGIEF에서의 pI 값과 유사하였다[5]. 따라서 liver-specific C<sub>4</sub> 동위효소와 칠성장어 간조직 LDH는 염기성에서 안정하였고, 칠성장어 간조직 LDH는 골격근 LDH와 차이가 있는 것으로 사료된다.

**항원-항체 반응**

칠성장어 간조직 LDH의 동위효소 구성 및 진화상에서의 위치를 확인하고자 칠성장어 간조직의 정제된 LDH와 chromatofocusing에 의해 정제된 pH 7.45 분획의 LDH 동위효소에 대해 liver-specific C<sub>4</sub>에 대한 항혈청과 eye-specific C<sub>4</sub>와 A<sub>4</sub>에 대한 항혈청[6]을 사용하여 항원-항체 반응을 실시하였다.

칠성장어 간조직 정제액과 정제된 pH 7.45 분획의 LDH 동위효소는 LDH A<sub>4</sub>에 대한 항혈청 25 μl를 가했을 때 모두 복합체를 형성하였고, liver-specific C<sub>4</sub>와 eye-specific C<sub>4</sub>에 대한 항혈청과는 복합물을 형성하였지만 eye-specific C<sub>4</sub>에 대한 항혈청과는 복합물을 매우 적게 형성하였다(Fig. 10).

칠성장어 LDH와 hagfish B<sub>4</sub> 동위효소는 대구(*Pseudophycis barbata*)의 LDH B<sub>4</sub>보다 C<sub>4</sub> 동위효소에 유사하므로[2] C<sub>4</sub> 동위효소를 LDH 동위효소의 조상유전자로 보고하였고[2,13,20] 본 실험결과의 대구 간조직 LDH가 liver-specific C<sub>4</sub> 동위효소와 유사한 것으로 나타난 결과와 일치하였다. 칠성장어 간조직의 LDH 동위효소는 eye-specific C<sub>4</sub>보다 liver-specific C<sub>4</sub> 동위효소에 대한 항혈청과 더 많은 복합물을 형성하므로 eye-specific C<sub>4</sub> 동위효소가 liver-specific C<sub>4</sub> 동위효소보다 더

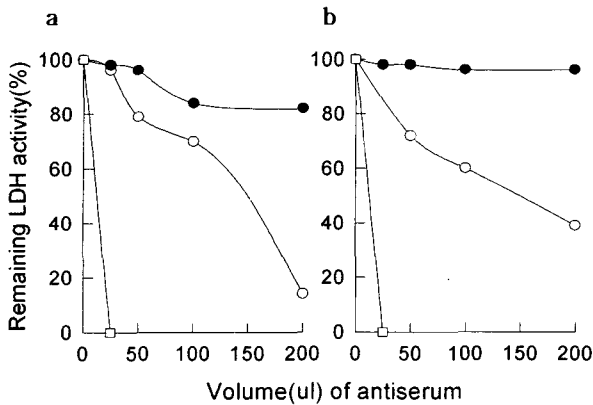


Fig. 10. Immunochemical titration of LDH isozymes from *Lampetra japonica* liver with antisera. a, purified liver LDH; b, pH 7.45 of fraction on chromatofocusing. □, *Coreoperca herzi* A<sub>4</sub> antiserum; ●, *Scomber japonicus* eye-specific C<sub>4</sub> antiserum; ○, *Gadus macrocephalus* liver-specific C<sub>4</sub> antiserum.

빠르게 진화되었고, 꺾지 A<sub>4</sub>에 대한 항혈청과 복합물을 형성하므로 *Ldh-A*는 보존적인 것으로 확인되었다. Liver-specific C<sub>4</sub> 동위효소는 하부단위체 A의 구조와 유사하게 진화된 것으로 보이며 칠성장어 간조직의 LDH 동위효소는 단일 밴드로 나타나지만 하부단위체 A, B뿐 아니라 하부단위체 C도 포함하는 것으로 사료 된다.

LDH 동위효소의 각 유전자들은 생리적 기능에 따라 진화가 이루어지므로 하부단위체들의 분자적 구조를 연구[1,7]하는데 있어서 비교군으로 어떤 종을 선택할 것인지가 중요하다[28]. LDH 동위효소의 진화적 유연관계가 최근에 이르기까지 논란이 되고 있는 것은 일부 비교군 선택에 한정되었기 때문이라고 생각된다.

요 약

칠성장어(*Lampetra japonica*) 간조직 젖산탈수소효소(EC 1.1.1.27, lactate dehydrogenase, LDH) 동위효소는 affinity chromatography에서 buffer를 유입한 후 용출된 분획에서 정제되었다. 대구(*Gadus macrocephalus*)의 liver-specific C<sub>4</sub> 동위효소는 열처리한 후 affinity chromatography하여 NAD<sup>+</sup>를 함유한 buffer에서 용출되기 시작하여 buffer를 유입한 후 B<sub>4</sub> 동위효소와 함께 용출되어, DEAE-Sephacel chromatography에 의해 정제되었다. 대구 간조직에서 열에 대한 안정성은 C<sub>4</sub>>B<sub>4</sub>>A<sub>4</sub> 동위효소의 순서로 나타났다. Chromatofocusing에 의해 정제된 칠성장어 간조직의 pH 7.45 분획의 LDH 동위효소는 정제된 간조직 LDH보다 피루브산에 의한 기질저해도가 컸다. 칠성장어 간조직 LDH의 최적 pH는 7.5, liver-specific C<sub>4</sub> 동위효소는 pH 8.5였다. 칠성장어 간조직 LDH는 항원-항체반응에서 꺾지 A<sub>4</sub> 항체와 liver-specific C<sub>4</sub>

항체의 순서로 반응하였고 eye-specific C<sub>4</sub> 항체와는 반응 정도가 낮았다.

따라서 칠성장어 간조직 LDH는 하부단위체 A와 liver-specific C<sub>4</sub>의 구조와 유사하게 진화되었으며, 하부단위체 C는 진화속도가 매우 빠른 것으로 확인되었다. 칠성장어 간조직의 LDH는 단일 동위효소가 아니라, 하부단위체 A, B 및 C로 구성된 동위효소들이므로 사료된다.

참 고 문 헌

- Almeida-Val, V. M. F. and A. L. Val. 1993. Evolutionary trends of LDH isozymes in fishes. *Comp. Biochem. Physiol.* **105B**, 21-28.
- Baldwin, J. and P. S. Lake. 1987. Lactate dehydrogenase homopolymer of hagfish heart and the single lactate dehydrogenase of lampreys display greater immunochemical similarity to LDH C<sub>4</sub> than to LDH B<sub>4</sub> of teleost fish. *J. Exp. Zool.* **242**, 99-102.
- Baldwin, J., P.S. Lake and T. W. Moon. 1987. Immunochemical evidence that the single lactate dehydrogenase of lampreys is more similar to LDH B<sub>4</sub> than LDH A<sub>4</sub> of hagfish. *J. Exp. Zool.* **241**, 1-8.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Cho, S. K. and J. J. Yum. 1993. Heterogeneity of lactate dehydrogenase isozymes in tissues of *Lampetra japonica*. *Korean J. Zool.* **36**, 319-328.
- Cho, S. K., S. Y. Park and J. J. Yum. 1993. Purification and immunochemistry of lactate dehydrogenase in *Lampetra japonica*. *Korean J. Zool.* **36**, 505-513.
- Coppes, Z. 1992. Lactate dehydrogenase in teleosts: the role of LDH-C<sub>4</sub> isozyme. *Comp. Biochem. Physiol.* **102B**, 673-677.
- Davis, B. J. 1964. Disc electrophoresis-II. Method and application to human serum proteins. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **121**, 404-427.
- Dell'Agata, M., G. Pannunzio, A. Teichner and A. Ferracin. 1988. Lactate dehydrogenase from *Lampetra planeri* is composed of chains of unique type which show intermediate properties between the heart and the muscle isozymes of vertebrates. *Comp. Biochem. Physiol.* **89B**, 323-327.
- Gronczewska, J., M. S. Zietara, A. Biegniewska, E. F. Skorkowski. 2003. Enzyme activities in fish spermatozoa with focus on lactate dehydrogenase isoenzymes from herring *Clupea harengus*. *Comp. Biochem. Physiol.* **134B**, 399-406.
- Holt, R. W. and W. S. Leibel. 1987. Coexpression of distinct eye- and liver-specific LDH isozymes in Cichlid fish. *J. Exp. Zool.* **224**, 337-343.
- Kim, M. O. and J. J. Yum. 1989. Purification, kinetics and immunochemistry of two homotetrameric lactate dehydro-

- genase isozymes in *Pseudogobio esocinus* (Cypriniformes). *Korean J. Zool.* **32**, 420-428.
13. Li, S. S-L., W. M. Fitch, Y-C. E. Pan and F. S. Sharief. 1983. Evolutionary relationships of vertebrate lactate dehydrogenase isozymes A<sub>4</sub> (muscle), B<sub>4</sub> (heart), and C<sub>4</sub> (testis). *J. Biol. Chem.* **258**, 7029-7032.
  14. Markert, C. L. 1984. Biochemistry and function of lactate dehydrogenase. *Cell Biochem. Funct.* **2**, 131-134.
  15. Markert, C. L., J. B. Shaklee and G. S. Whitt. 1975. Evolution of a gene. *Science* **189**, 102-114.
  16. O'Carra, P. and S. Barry. 1972. Affinity chromatography of lactate dehydrogenase: model studies demonstrating the potential of the technique in the mechanistic investigation as well as in the purification of multi-substrate enzymes. *FEBS Letters* **21**, 281-285.
  17. O'Carra, P., S. Barry and E. Corcoran. 1974. Affinity chromatographic differentiation of lactate dehydrogenase isoenzymes on the basis of differential abortive complex formation. *FEBS Letters* **43**, 163-168.
  18. Panepucci, L. L. L., M. L. Schwantes and A. R. Schwantes. 1984. Loci that encode the lactate dehydrogenase in 23 species of fish belonging to the orders Cypriniformes, Siluriformes and Perciformes: adaptative features. *Comp. Biochem. Physiol.* **77B**, 867-876.
  19. Park, S. Y. and J. J. Yum. 1997. Purification and characterization of lactate dehydrogenase eye- and testis-specific C<sub>4</sub> isozyme. *J. Ind. Sci., Cheongju Univ., Korea* **15**, 263-270.
  20. Rehse, P. H. and W. S. Davidson. 1986a. Purification and properties of a C-type isozyme of lactate dehydrogenase from the liver of the Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Comp. Biochem. Physiol.* **84B**, 145-150.
  21. Rehse, P. H. and W. S. Davidson. 1986b. The evolutionary relationship of a fish C type lactate dehydrogenase to other vertebrate lactate dehydrogenase isozymes. *Can. J. Fish. Aquatic Sci.* **43**, 1045-1051.
  22. Sensabaugh, G. F. and N. O. Kaplan. 1972. A lactate dehydrogenase specific to the liver of gadoid fish. *J. Biol. Chem.* **247**, 585-593.
  23. Skidmore, A. and T. J. C. Beebee. 1991. Changes in testicular lactate dehydrogenase of the rat (*Rattus norvegicus*) during growth and development. *Comp. Biochem. Physiol.* **98B**, 279-282.
  24. Stock, D. W. and G. S. Whitt. 1992. Evolutionary implications of the cDNA sequence of the single lactate dehydrogenase of a lamprey. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 1799-1803.
  25. Stock, D. W., J. M. Quattro, G. S. Whitt, and D. A. Powers. 1997. Lactate dehydrogenase (LDH) gene duplication during chordate evolution: the cDNA sequence of the LDH of the tunicate *Styela plicata*. *Mol. Biol. Evol.* **14(12)**, 1273-1284.
  26. Whitt, G. S. 1970. Developmental genetics of the lactate dehydrogenase isozymes of fish. *J. Exp. Zool.* **175**, 1-36.
  27. Wray, W., T. Beulihias, V. P. Wray and R. Hancock. 1981. Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* **118**, 197-203.
  28. Wright L. L. and J. H. Swofford. 1984. Mouse lactate dehydrogenase (LDH) C<sub>4</sub> (testis) is immunochemically cross-reactive with LDH A<sub>4</sub> (muscle) and LDH B<sub>4</sub> (heart). *Scand. J. Immunol.* **19**, 247-254.