

햄스터와 소의 젖산탈수소효소에 대한 미토콘드리아 inhibitor의 영향

조성규 · 이상학¹ · 염정주*

청주대학교 생명유전통계학부 생명과학전공, ¹고려대학교 대학원 체육학과

Received November 5, 2004 / Accepted February 1, 2005

Effect of Mitochondrial Inhibitor on Lactate Dehydrogenase of *Mesocricetus auratus* and *Bos taurus coreanae*. Sung Kyu Cho, Sang Hak Lee¹ and Jung Joo Yum*. Department of Life Science, Cheongju University, Cheongju 360-764, Korea, ¹Department of Physical Education, Korea University, Seoul 136-701, Korea - The lactate dehydrogenase (EC 1.1.1.27, LDH) inhibitors were isolated from the LDH-free crude mitochondrial fraction of skeletal muscle in Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*) and Korean native cattle (*Bos taurus coreanae*). The LDH inhibitor in skeletal muscle of *M. auratus* was successfully isolated by the treatment with 175 mM NaCl and ultrasonic. The LDH inhibitor in skeletal muscle of *B. taurus coreanae* was highly stable to heat and LDH A₄ isozyme was largely inhibited by the LDH inhibitor. The molecular weight of inhibitor was 22 kDa. Inhibitor played an important role in the binding of LDH with the mitochondria in tissues of skeletal muscle, kidney and liver except heart.

Key words – lactate dehydrogenase, inhibitor, mitochondria, *Mesocricetus auratus*, *Bos taurus coreanae*.

젖산탈수소효소(EC 1.1.1.27, lactate dehydrogenase, LDH)는 피루브산과 젖산의 상호전환반응을 촉매하는 효소로 NAD⁺-oxidoreductase 활성을 갖는 효소들 중의 하나이다[8]. LDH는 주로 세포기질에 존재하는 것으로 알려져 있으나 흰쥐 간의 핵[15], 마이크로솜분획과 미토콘드리아의 외막[1], 미토콘드리아의 막사이 공간[18] 및 뇌[19], yellow eel 골격근의 미토콘드리아[14], 사람 간조직의 미토콘드리아[9] 및 대구 간조직의 미토콘드리아[12]에서 발견되었다. 흰쥐 심장의 미토콘드리아에 LDH B₄ 동위효소가 많았고, 미토콘드리아, 세포기질 및 세포소기관들에서 A₄ 동위효소가 확인되었으며, 간조직의 미토콘드리아에 A₄ 동위효소가 많았고, 포유류 간 및 골격근 미토콘드리아 내의 LDH들은 젖산의 산화를 촉진시킨다고 보고 되었다[2].

세포의 용해성 분획에만 존재하는 것으로 알려진 해당과정에 관여하는 효소들은 세포소기관에 결합되거나, 분리되어 존재하여 결합형과 용해형으로 가역적인 전환을 보이므로 ambiquitous 효소로 불리며, 대사상태에 따라 전체 활성을 조절하는 것으로 보고 되었다[21]. 흰쥐 뇌조직의 미토콘드리아 외막의 외재성 단백질은 hexokinase 결합에 관여하고[22] hexokinase 결합단백질이 쥐간의 미토콘드리아로부터 밝혀진 미토콘드리아 porin으로 외막을 통한 ADP-ATP 교환통로를 형성한다고 보고 되었다[6]. 또한 적혈구막에 결합하는 해당과정의 효소들은 band 3 단백질에 의해 결합하고, *in vitro*에서 효소-band 3 복합물의 형성은 pH, 이온강도 및 대사물에 민감하게 반응하며 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase[10]와 aldolase도 반응이 유사하였다. 그러나 pho-

sphofructokinase-band 3 복합물은 band 3를 분리시 구조변형이 일어나 *in vitro*에서 형성되지 않았다[7]. LDH의 경우, 세포기질에 존재하는 용해형 LDH를 세포소기관분획에 결합시키는 실험과 결합형, 용해형 LDH의 역학적 특성에 관한 연구가 이루어졌다. 그 결과 막의 결합부위와 LDH의 상호작용은 정전기적인력에 의한 것으로 제안되었지만 효소가 결합하는 막부위의 구성물질에 관하여는 결정되지 않았으며, 다만 토끼 골격근 미토콘드리아에서 발견된 LDH inhibitor와 LDH사이에서 나타나는 결합방식과 같을 것이라고 보고 되었다[12,13]. LDH inhibitor는 미토콘드리아에서 결합형 LDH가 용해된 후에 방출되고, 용해형 LDH와 반응하며, 미토콘드리아에 LDH가 결합하면 inhibitor에 의해서 저해되지 않는다고 보고 되었다[13].

이와 같이 세포질뿐만 아니라 세포소기관에 LDH 동위효소가 존재하는 것이 확인되고, 미토콘드리아에서 단백질성 LDH inhibitor가 확인되었으나 화학적 inhibitor가 아닌 미토콘드리아내의 단백질성 inhibitor에 관한 연구는 Luis[13] 및 Cho 등[4]의 연구 외에는 알려져 있지 않다. 따라서 본 실험에서는 LDH 동위효소의 세포내 대사에 대해 LDH 동위효소의 유전적 분화가 잘 되어있는 햄스터 및 소를 선택하여 각 조직의 미토콘드리아에서 inhibitor를 분리하고, LDH와 미토콘드리아의 상호작용과 inhibitor의 특성을 연구하여 미토콘드리아 내 LDH 동위효소의 분포 및 LDH의 대사상에서의 역할에 관하여 연구하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료

햄스터(*Mesocricetus auratus*)는 청주대학교 생명과학과 사

*Corresponding author

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

E-mail : jjyum@cju.ac.kr

육실에서 분양 받았으며, 소(*Bos taurus coreanae*) 골격근 및 심장은 생체재료상에서 구입하여 시료로 사용하였다. Acrylamide, N,N'-methyl-bisacrylamide, DL-lactic acid, nitro blue tetrazolium (NBT), phenazine methosulfate (PMS), nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺), NAD reduced form (NADH) 및 pyruvic acid는 Sigma사의 제품을 사용하였고, 나머지 시약은 GR (guaranteed reagent)급 시약을 사용하였다.

세포기질 LDH 및 Inhibitor의 준비

햄스터 골격근, 소 골격근 및 심장조직을 작은 조각으로 자른 후 증류수에 담가 혈액을 완전히 제거하였다. 0.25 M sucrose를 포함하는 5 mM potassium phosphate buffer (pH 6.5)를 1:1(w/v)로 가한 후 autohomogenizer (Rikakikai GTR-1000)로 파쇄 하였다. 파쇄액은 1,000×g (Refrigerated centrifuge, Hitachi 20 PR-52D)에서 10분 동안 2회 원심분리하여 핵을 제거하고 10,000×g에서 10분 동안 원심분리하여 미토콘드리아를 얻었다. 상등액은 105,000×g (Ultracentrifuge, Hitachi CP 85β)에서 2시간 동안 원심분리하여 마이크로솜을 제거한 후 세포기질용액으로 사용하였다. 미토콘드리아는 재현탁 한 후 상등액에 LDH 활성이 나타나지 않을 때까지 반복하여 같은 조건으로 원심분리 하였다. 얻어진 미토콘드리아는 Lee 등[12]의 방법에 따라 최적 염농도인 175 mM NaCl을 포함하는 5 mM potassium phosphate buffer (pH 6.5)로 현탁시킨 후 30 kHz로 30초간 3분 간격, 7회 초음파처리(Ultrasonicator, IKA U50)하여 파쇄한 다음 150 mM NaCl을 포함하는 5 mM imidazole-HCl buffer (pH 6.0)로 20배 희석하여 현탁시키고 5 mM sodium phosphate buffer (pH 6.0)에서 투석시켰다. 투석한 용액은 100℃에서 5분간 열처리하여 원심분리 시킨 후 상등액을 inhibitor용액으로 사용하였다.

LDH의 활성측정

LDH 동위효소의 활성은 Whitt[20]의 방법에 따라 1.50 mM 피루브산과 0.14 mM NADH를 포함한 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 6.85) 3 ml에 시료를 가한 다음 NADH로부터 NAD⁺로 산화되는 정도를 spectrophotometer (Shimadzu UV-160A)로 25℃, 340 nm에서 측정하였다. 효소 활성의 단위는 1분 동안 흡광도 1.0을 감소시키는 효소의 양을 1 unit로 하였다.

Inhibitor 첨가 시 LDH의 기질의존성 측정

햄스터 골격근의 세포기질 LDH에 햄스터 골격근의 미토콘드리아로부터 각 단계별로 추출된 미토콘드리아 inhibitor를 가한 후 피루브산의 농도를 100 μM에서 10 mM까지 증가시키면서 효소활성의 변화를 측정하였다.

세포기질 LDH와 미토콘드리아 inhibitor의 반응

앞에서 언급한 방법으로 만들어진 소 심장 및 골격근조직

에서 추출된 세포기질 LDH와 해당조직의 미토콘드리아 inhibitor를 1:9(v/v) 비율로 섞어 4℃에서 2, 4, 6, 8시간 동안 반응시킨 후 4℃, 20,000×g에서 10분간 원심분리 하였으며, 상등액의 효소활성을 측정하여 세포기질 LDH에 대한 미토콘드리아 inhibitor의 저해정도를 확인하였다.

LDH 동위효소에 대한 inhibitor의 저해

소 골격근 LDH 1.72 unit에 소 골격근에서 분리한 미토콘드리아 inhibitor 0, 30, 50, 70 및 90 μl를 가하여 2시간 동안 반응시킨 후, polyacrylamide gel 전기영동을 실시하여 LDH 동위효소에 대한 inhibitor의 저해 정도를 확인하였다. Polyacrylamide gel은 Davis[5]의 방법에 따라 7.5%T, 2.65%C acrylamide separation gel과 3%T, 2.65%C acrylamide stacking gel이 되도록 만들었다. Polyacrylamide vertical slab system (Hoefer SE250)으로 thermostatic circulator (Rikakikai CA-1100)를 사용하여 4℃로 유지시키면서 전기영동한 후 LDH 동위효소에 대한 inhibitor의 저해정도를 확인하였다. 시료에 50% sucrose, 0.05% bromophenol blue 용액을 1:1(v/v)로 가하였고, Tris-glycine buffer (pH 8.3)를 사용하여 100V에서 20분간 전개시킨 후 200V에서 2시간 10분 동안 전기영동 하였다. 전기영동 후 LDH 동위효소는 Whitt[20]의 방법에 의해 NAD⁺, DL-lactic acid, PMS, NBT의 혼합물을 첨가하여 37℃에서 염색하였으며, 염색된 gel은 15% acetic acid로 고정된 후 동위효소를 확인하였다. LDH 동위효소들의 활성 정도는 PAGE gel을 Bio-profile image analysis system (Vilber Lourmat)으로 영상을 찍은 후 BIO-1D++ 소프트웨어를 이용하여 분석하였다. 밀도계에 의해 정량한 동위효소들의 밀도 또는 양은 각 동위효소 밴드를 구성하는 모든 점들의 합, $V = \sum m_i$ 로 계산되었으며, 이를 기준으로 하여 각 동위효소의 상대농도(%)를 측정하였다.

전기영동(SDS-PAGE) 및 분자량 측정

Inhibitor의 분자량 측정은 SDS-PAGE로 이루어졌다. 전기영동은 Laemmli[11]의 방법에 따라 15%T, 2.67%C acrylamide separation gel과 5%T, 2.67%C acrylamide stacking gel이 되도록 slab gel을 만들었다. 전기영동 실시 전에 시료는 sample과 sample buffer (0.06 M Tris-HCl, pH 6.8, 25% Glycerol, 2% SDS, 5% 2-mercaptoethanol, 0.1% bromophenol blue)를 4:1(v/v)로 섞어 100℃에서 5분간 가열한 후 사용하였다. 분자량 측정시 표준 단백질로는 pepsin (MW 34,700), trypsinogen (MW 24,000) 및 lysozyme (MW 14,300)을 사용하였다. 단백질 염색은 Wray 등[23]의 방법에 따라 silver nitrate를 사용하여 실시하였다.

미토콘드리아, LDH 및 inhibitor의 결합

햄스터 골격근, 심장, 신장 및 간조직의 미토콘드리아를 분리하고, 175 mM NaCl을 포함한 5 mM imidazole-HCl

buffer (pH 6.0)를 사용하여 현탁시킨 후 침전물을 모아 LDH와 inhibitor가 제거된 미토콘드리아를 얻었다. 쏘가리(*Siniperca scherzeri*) 골격근에서 정제한 LDH A₄ 동위효소[3]와 소 골격근에서 추출한 inhibitor를 사용하였다. 첫째, 분리한 조직별 미토콘드리아에 inhibitor를 가한 후 LDH를 처리한 경우, 둘째, 조직별 미토콘드리아에 LDH를 가한 후 inhibitor를 처리한 경우, 셋째, 조직별 미토콘드리아에 inhibitor와 LDH를 함께 섞은 용액을 가한 경우로 나누어 실험하였고, 4°C에서 각각 2시간 동안 반응시킨 다음 원심분리 하여 미토콘드리아를 얻었으며, 175 mM NaCl로 씻은 후 추출된 LDH의 활성을 측정하였다.

자료처리방법

본 실험에서 얻은 자료는 IBM PC SAS package (version 8.0)를 이용하여 평균 및 표준편차를 산출한 후 집단간의 평균치 차이를 비교하기 위하여 one way-ANOVA (α=0.05)를 실시하였다.

결과 및 고찰

LDH A₄ 동위효소가 세포소기관 분획에서 용해되는 정도는 매질의 pH, 이온강도 및 NADH와 세포소기관들의 농도에 의하고, 효소의 결합형 및 용해형의 가역적인 전환은 세포내 LDH의 농도를 조절하기 위해 필요하므로 환경조건에 따라 결합형과 용해형효소가 결합과 용해상태의 평형을 이루어 각각 다른 역학적 특성을 나타내고 있다[16,17].

막과 LDH의 결합은 정전기적 힘에 의하고 효소결합에 관여하는 막의 구성물질은 알려져 있지 않지만 토끼 골격근의 미토콘드리아에서 발견된 LDH inhibitor가 막과 LDH의 결합에 관여한다고 제안하였다[12,13]. LDH inhibitor는 결합형 LDH가 용해된 후에만 미토콘드리아에서 분리되어 용해형 LDH하고만 반응하므로 LDH가 미토콘드리아에 결합하면 inhibitor에 의한 저해가 일어나지 않는 것으로 알려져 있다[13].

Inhibitor 첨가시 기질의존성 측정

본 실험에서는 0.25 M sucrose를 포함하는 5 mM potassium phosphate buffer (pH 6.5)를 사용하여 미토콘드리아를 분리하였으며, 미토콘드리아 막에 결합되어 있는 LDH와 inhibitor를 175 mM NaCl을 포함하는 buffer로 추출하였다. 그 후 175 mM NaCl을 포함하는 buffer에서 초음파 처리하여 추출하였고 150 mM NaCl을 포함하는 5 mM imidazole-HCl buffer (pH 6.0)를 사용하여 다시 추출하였다. 또한 실험 결과 단계별로 추출된 inhibitor의 양에 따라 LDH 효소활성이 저해되는 정도를 역학실험에 의해 동시에 확인하여 저해 반응을 확인하였다(Fig. 1). 각각 다른 단계에서 분리된 햄스터 골격근 미토콘드리아의 inhibitor와 햄스터 골격근 세포기질 LDH를 반응시킨 후 활성을 측정한 결과, inhibitor는 초

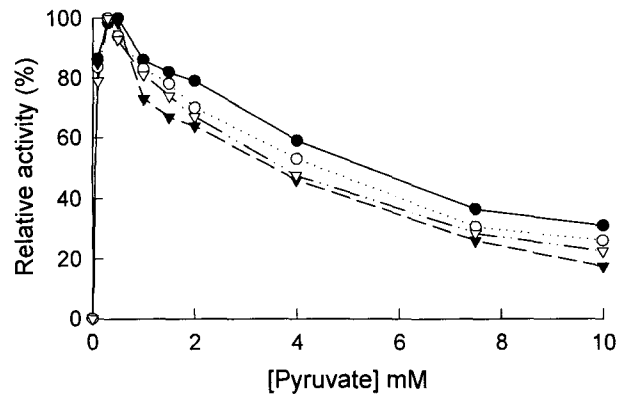


Fig. 1. Kinetic behavior of LDH inhibited by LDH inhibitor in skeletal muscle of *Mesocricetus auratus*. The final concentration of pyruvate varied from 100 μM to 10 mM. Each inhibitor was prepared as follows. All the buffers contained 0.25 M sucrose. Supernatant obtained by washing: the mitochondrial fraction with 5 mM potassium phosphate buffer, pH 6.5 (●); the mitochondrial fraction with 175 mM NaCl in 5 mM potassium phosphate buffer, pH 6.5 (○); sonicated the mitochondrial fraction with 175 mM NaCl in 5 mM potassium phosphate buffer, pH 6.5 (▼); sonicated the mitochondrial fraction with 150 mM NaCl in 5 mM imidazole-HCl buffer, pH 6.0 (▽)(in this case the supernatant was previously dialyzed against 5 mM sodium phosphate buffer, pH 6.0).

음파를 처리한 경우 가장 많이 추출되었고, 다음이 imidazole buffer에 의해 추출되었으며, NaCl에 의해서는 소량 추출된 것으로 확인되었다. 이러한 결과는 대구 간조직 미토콘드리아에서 LDH를 분리 하거나[12] 토끼 골격근에서 LDH 및 inhibitor를 분리할 경우[13]에서 사용된 최적 염농도, buffer 종류 및 물리적 조건과 유사하였다.

소 골격근과 심장 세포기질 LDH에 대한 미토콘드리아 LDH inhibitor의 영향

소 심장 및 골격근조직에서 미토콘드리아를 분리한 후 추출한 inhibitor 용액은 마지막 과정에 100°C에서 열처리하여 대부분의 다른 단백질을 제거시켜 사용하였고, 대조군은 같은 방법으로 추출하여 열처리만 하지 않고 사용하였다. LDH와 inhibitor의 반응은 소 심장 및 골격근조직의 미토콘드리아에서 분리된 inhibitor와 소 심장과 골격근 세포기질의 LDH를 각각 반응시켜 시간별로 확인하였다. 심장조직에서 분리된 LDH와 inhibitor 반응 시, inhibitor를 열처리하여 사용한 경우와 열처리 하지 않고 사용한 경우 모두 4시간까지는 거의 변화가 없었으나 8시간 경과 후 조금 저해되어 거의 저해작용이 일어나지 않았고, 두 경우 간에 유의하지 않았다 (Fig. 2, P<0.2039). 골격근에서 분리된 LDH와 inhibitor 반응 시에는 inhibitor를 열처리하여 사용한 경우와 열처리 하지 않고 사용한 경우 모두 저해작용이 강하게 나타났으며, 두 경

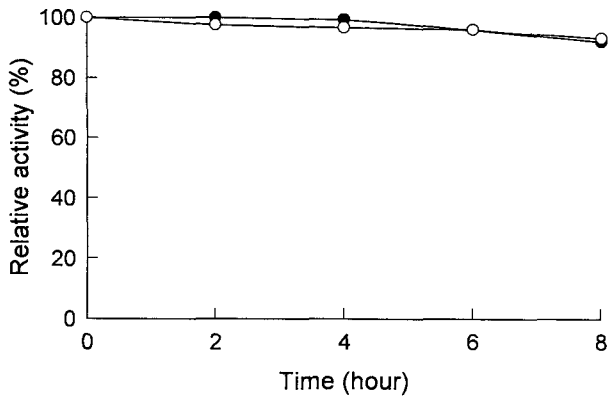


Fig. 2. Effect of mitochondrial LDH inhibitor from heart on the LDH in heart of *Bos taurus coreanae*. ●, Inhibitor with heat treatment; ○, inhibitor without any treatment. ($P < 0.2039$, $\alpha = 0.05$)

우 간에 유의한 차이가 나타났다(Fig. 3, $P < 0.0001$). 골격근에서 추출된 inhibitor는 열에 강하여 열처리한 후에 더 많은 저해기능을 나타내는 것을 알 수 있었으며 이는 토끼 골격근 미토콘드리아 분획으로부터 추출한 LDH inhibitor가 끓는 물 속에서 5분간 열처리한 경우 최고 60~70% 저해효과를 나타내는 결과[13]와 유사하였다. Fig. 4의 결과에 비추어 보면 심장조직의 LDH는 B₄ 동위효소로 주로 구성되어 있으므로 inhibitor에 의한 저해정도가 낮은 것으로 생각되며, 이는 햄스터의 LDH inhibitor가 골격근의 미토콘드리아에서 주로 많은 역할을 하며, 미토콘드리아에 약하게 결합하고 있는 A₄ 동위효소와 주로 연관되어 기능을 한다는 결과[4]와 유사하다고 생각된다. 그리고 Fig. 3에서 열처리한 inhibitor가 열처리하지 않은 inhibitor 보다 저해기능이 더 크게 나타난 것은 열처리에 의해 추출액속에 있는 다른 단백질이 변성되어 제거되어 나타난 현상으로 볼 수 있으므로 저해작용이 다른 단백질에 의해 방해받는 것으로 생각할 수 있다. 또한 토끼 골

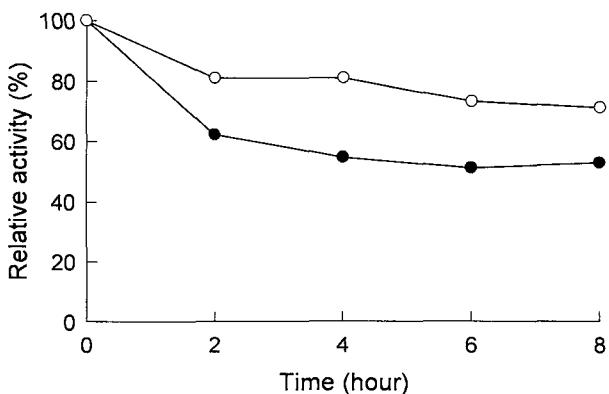


Fig. 3. Effect of mitochondrial LDH inhibitor from skeletal muscle on the LDH in skeletal muscle of *Bos taurus coreanae*. ●, Inhibitor with heat treatment; ○, Inhibitor without any treatment. ($P < 0.0001$, $\alpha = 0.05$)

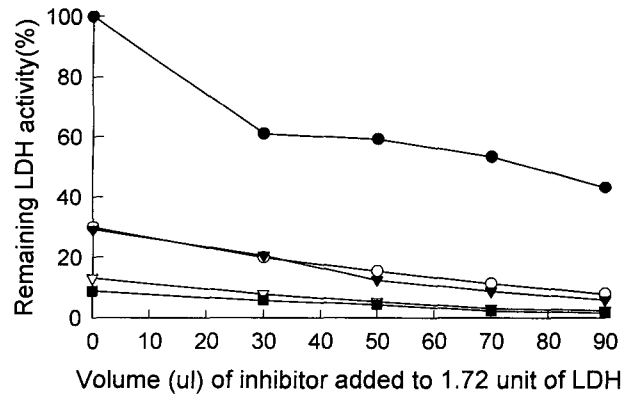


Fig. 4. Effect of mitochondrial LDH inhibitor on LDH isozymes in skeletal muscle of *Bos taurus coreanae*. ●, A₄ isozyme; ○, A₃B isozyme; ▼, A₂B₂ isozyme; ▽, AB₃ isozyme; ■, B₄ isozyme.

격근 조직에서 발견된 inhibitor[13]와 비교해 볼 때 inhibitor가 미토콘드리아에 결합된 효소를 제거한 후 얻어 본 논문의 결과와 유사한 것으로 나타났으며, 포유류의 경우 골격근 조직에 inhibitor가 많을 것으로 예상된다.

소 골격근에서 LDH 동위효소에 대한 inhibitor의 저해

소의 골격근에서 저해작용이 강하게 나타났으므로(Fig. 3), 골격근조직에서 분리된 inhibitor의 농도를 증가시켜 반응시킨 후 전기영동 하여 LDH 동위효소별 활성을 측정하고 상대적으로 비교하였다(Fig. 4). 결과는 A₄ 동위효소가 inhibitor에 의해 저해되는 것이 보였고, 다른 동위효소들은 골격근 자체에 매우 적게 존재하므로 비교가 어려웠다. 그러나 A₄ 동위효소의 경우 일단 저해가 일어나면 inhibitor의 양을 계속 증가시켜도 저해작용이 inhibitor양에 비례하여 증가되지 않고 느리게 일어나는 것을 알 수 있었다.

LDH inhibitor의 분자량 측정

LDH inhibitor의 분자량을 확인하기 위해 부분 정제된 inhibitor 용액을 SDS-PAGE 한 후, silver nitrate로 염색하여 band들을 비교군과 비교하여 확인하였고, 정제된 LDH A₄ 동위효소와 inhibitor를 반응시킨 다음 사라진 band를 LDH와 반응한 inhibitor로 확인하였다. 따라서 inhibitor는 단백질이며, 이 단백질의 분자량은 표준단백질의 분자량과 비교하여 측정한 결과 22 kDa으로 확인되었고(Fig. 5) 질소압력하에 분자량 10,000 이상인 SM12136 membrane에 의해 보유되고, 분자량 70,000인 SM1173305 membrane에 의해 보유되지 않으므로 inhibitor의 분자량이 10,000~70,000 사이라고 추정된 Luis[13]의 결과와 일치되었다.

미토콘드리아와 LDH의 결합 시 inhibitor의 역할

LDH가 미토콘드리아에 결합할 때 미토콘드리아 막에서

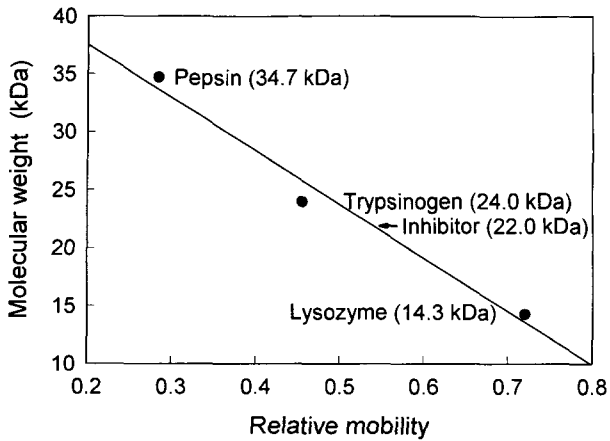


Fig. 5. The molecular weight of LDH inhibitor in skeletal muscle of *Bos taurus coreanae* by SDS-PAGE.

inhibitor가 어떠한 역할을 하는가를 알아보기 위해 NaCl 및 imidazole을 사용하여 LDH 및 inhibitor를 제거한 햄스터 각 조직의 미토콘드리아에 LDH와 inhibitor를 가하는 방법에 따라 첫째, 소 골격근에서 분리한 inhibitor를 가한 후 쏘가리 골격근에서 정제한 LDH A₄ 동위효소를 가한 경우, 둘째, A₄ 동위효소를 미토콘드리아에 가하여 결합시킨 후 inhibitor를 가한 경우, 셋째, A₄ 동위효소와 inhibitor를 동시에 섞은 용액을 미토콘드리아에 결합시킨 경우로 나누어 실험하였으며 미토콘드리아에 결합한 A₄ 동위효소의 활성을 측정하여 가한 A₄ 동위효소 활성과 비교하였다(Fig. 6). 그 결과 첫째, 미토콘드리아에 inhibitor를 가한 후 A₄ 동위효소를 가했을 때

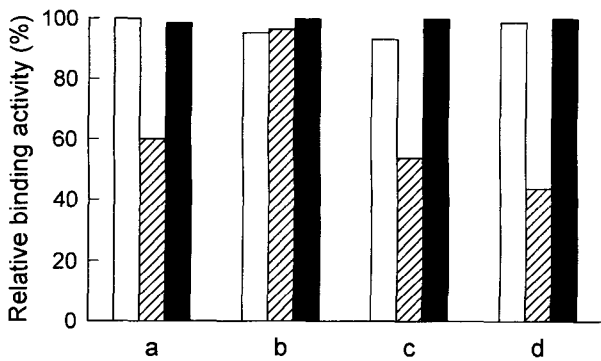


Fig. 6. Effect of inhibitor on the binding of LDH isozymes with the mitochondrial fraction. The inhibitors from skeletal muscle in *Bos taurus coreanae*, the A₄ isozyme from *Siniperca scherzeri* and the LDH-free mitochondrial fraction from tissues in *Mesocricetus auratus* were used. The inhibitor and the LDH were successively added on the mitochondrial fraction as follows. □, The LDH was added after the inhibitor added; ▨, the inhibitor added after the LDH added; ■, the LDH and the inhibitor were added at the same time. a, skeletal muscle; b, heart; c, kidney; d, liver.

조직별로 골격근 100%, 심장 95.2%, 신장 93.08% 및 간조직 98.6%의 LDH 활성이 나타나 LDH의 결합이 잘되는 것으로 나타났다. 둘째, 미토콘드리아에 A₄ 동위효소를 가한 후 inhibitor를 가한 경우는 골격근 60.15%, 심장 96.31%, 신장 53.85% 및 간조직 43.72%의 LDH 활성이 나타나 심장조직의 미토콘드리아를 제외한 조직들에서 LDH의 결합력이 다른 두 실험 조건에서보다 약하게 나타났다. 셋째, A₄ 동위효소와 inhibitor를 동시에 먼저 결합시킨 후 미토콘드리아에 넣어준 경우에는 골격근 98.5%, 심장 100%, 신장 100% 및 간조직 100%로 나타나 LDH 결합이 가장 잘 일어난다고 볼 수 있다. 따라서 심장을 제외한 골격근, 신장 및 간조직의 미토콘드리아에서 inhibitor가 LDH 결합 시 중요하게 관여하고 있는 것으로 확인되었고, 심장조직에서 inhibitor와 관계없이 미토콘드리아에 결합되는 것은 LDH 동위효소의 조성이 다른 조직과 다르기 때문인 것으로 생각되며 이 후 연구되어야 할 것이다. 미토콘드리아로부터 분리된 inhibitor는 효소결합에 반응하여 LDH와 막분획 사이의 특이한 상호작용을 위한 신호인지를 하여 LDH 대사를 조절하는 것으로 사료된다.

요 약

젖산탈수소효소(EC 1.1.1.27, lactate dehydrogenase, LDH) inhibitor는 햄스터와 소 골격근 미토콘드리아에서 분리하였다. 햄스터 골격근조직의 LDH inhibitor는 175 mM NaCl과 초음파로 분리하였다. 소 골격근조직의 미토콘드리아에서 분리된 inhibitor는 열에 강한 특성을 보였고, A₄ 동위효소에 대한 저해정도가 높았으며, 분자량은 22,000 kDa으로 나타났다. Inhibitor는 심장조직을 제외한 골격근, 신장 및 간조직의 미토콘드리아에서 LDH 결합시 중요하게 관여하고 있었다.

참 고 문 헌

1. Brdiczka, D., W. Krebs and P. Kloock. 1973. Localization of enzymes by means protease. *Biochim. Biophys. Acta* **297**, 203-212.
2. Brooks, G. A., H. Dubouchaud, M. Brown, J. P. Sicurello and C. E. Butz. 1999. Role of mitochondrial lactate dehydrogenase and lactate oxidation in the intracellular lactate shuttle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 1129-1134.
3. Cho, S. K. 2000. Mitochondrial lactate dehydrogenase in tissues of vertebrate. Ph.D. Thesis Cheongju Univ., Korea 88pp.
4. Cho, S. K., J. Y. Ha and J. J. Yum. 2001. Mitochondrial lactate dehydrogenase and mitochondrial inhibitor in *Mesocricetus auratus*. *J. Ind. Sci. Cheongju Univ.* **19(1)**, 49-54.
5. Davis, B. J. 1964. Disc electrophoresis- II. Method and application to human serum proteins. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **121**, 404-427.
6. Fiek, C., R. Benz, N. Roos and D. Brdiczka. 1982. Evidence for identity between the hexokinase-binding protein and

- the mitochondrial porin in the outer membrane of rat liver mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* **688**, 429-440.
7. Higashi, T., C. S. Richards and K. Uyeda. 1979. The interaction of phosphofructokinase with erythrocyte membrane. *J. Biol. Chem.* **254**, 9542-9550.
 8. Holbrook, J. J., A. Liljas, S. J. Steindel and M. G. Rossmann. 1975. Lactate Dehydrogenase, pp. 191-292, *In* Boyer P. D. (eds.), *The Enzymes*, Academic Press Inc., New York.
 9. Ketchum, C. H., C. A. Robinson, L. M. Hall and W. E. Grizzle. 1988. Lactate dehydrogenase isolated from human liver mitochondria: Its purification and partial biochemical characterization. *Clin. Biochem.* **21**, 231-237.
 10. Kliman, H. J. and T. L. Steck, 1980. Association of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase with the human red blood cell membrane. *J. Biol. Chem.* **255**, 6314-6321.
 11. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature* **227**, 680-685.
 12. Lee, S. H., S. K. Cho and J. J. Yum. 1997. Isolation and association of mitochondrial lactate dehydrogenase in *Gadus macrocephalus* liver. *J. Ind. Sci., Cheongju Univ., Korea*, **15(2)**, 389-397.
 13. Lluís, C. 1984. Lactate dehydrogenase associated with the mitochondrial fraction and with a mitochondrial inhibitor-Π. Enzyme interaction with a mitochondrial inhibitor. *Int. J. Biochem.* **16**, 1005-1013.
 14. Mattisson, A. G. M., R. G. Johansson and S. L. Bostrom. 1972. Cellular localization of lactate dehydrogenase in skeletal muscle of the eel (*Anguilla anguilla*). *Comp. Biochem. Physiol.* **41B**, 474-482.
 15. Price, N. C. and L. Stevens. 1989. *Fundamentals of Enzymology*. 526pp., 2nd eds., Oxford University Press, New York.
 16. Ratner, J. H. and P. Nitsewojo, S. Hirway and H. O. Hultin. 1974. A study of some factors involved in the interaction between lactate dehydrogenase isozymes and particulate fractions of muscle. *Int. J. Biochem.* **5**, 525-533.
 17. Ross, R. E. and H. O. Hultin. 1980. A study binding-solubilization of some glycolytic enzymes in striated muscle *in situ*. *J. Cell. Physiol.* **105**, 409-416.
 18. Skilleter, D. N. and E. Kun. 1972. The oxidation of L-lactate by liver mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.* **152**, 92-104.
 19. Vdovichenko, L. M. 1978. Some properties of lactate dehydrogenase of brain mitochondria. *Ukr. Biochem. Zh.* **50**, 489-493.
 20. Whitt, G. S. 1970. Developmental genetics of the lactate dehydrogenase isozymes of fish. *J. Exp. Zool.* **175**, 1-36.
 21. Wilson, J. E. 1978. Ambiquitous enzymes: variations in intracellular distribution as a regulatory mechanism. *Trends Biochem. Sci.* **3**, 124-125.
 22. Wilson, J. E. 1982. Ambiquitous behavior of brain hexokinase. *Biophys. J.* **37**, 18-19.
 23. Wray, W., T. Beulihias, V. P. Wray and R. Hancock, 1981. Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* **118**, 197-203.