

NADPH의 산화반응과 아질산 생성반응에 의한 Metallothionein의 항산화적 기능 확인

김관천⁺ · 김준태 · 김희정^{*}

광주보건대학 환경행정과

^{*}조선대학교 화학과

Identification of the Antioxidative Function of Metallothionein by Oxidation of NADPH and Production of Nitrite

Kwan-Chun Kim⁺ · Joon-Tae Kim · Hee-Joung Kim^{*}

Dept. of Environmental Administration, Gwangju Health College

**Dept. of Chemistry, Chosun University*

Abstract

Metallothioneins(MTs) belong to the class of low molecular weight proteins. Recently, it has been suggested that MTs may play a direct role in cellular defense against oxidative stress by functioning as antioxidants. Oxidative damage to different cellular components makes a major contribution to many pathogeneses. Several studies have demonstrated that MT is able to quench a wide range of reactive oxygen species at a higher efficiency than other well known antioxidants such as superoxide dismutase(SOD).

The present study was designed to evaluate the effect of MT on the activities of the reactive oxygen species removal system. MT showed the scavenging of superoxide in the SOD assay system in the presence or absence of SOD. When MT was added to nicotinamide adenine dinucleotide phosphate(NADPH) oxidation system in presence of fixed amount of SOD increase the breakdown rate of superoxide. When MT was added to the system that form nitrite from hydroxylammonium chloride, the formation of nitrite was inhibit.

⁺Corresponding author E-mail : chitosan@sh.ac.kr

We concluded that the function of MT as antioxidant might have an effect on the level of superoxide scavenging.

Keywords : metallothionein(MT), antioxidants, superoxide dismutase(SOD),
nicotinamide adenine dinucleotide phosphate(NADPH)

I. 서론

메탈로티오네인(Metallothionein ; MT, Fig. 1.) 은 1957년에 말의 신장에서 Cd와 Zn을 함유하는 단백질로 최초로 발견되었다.¹⁾ 그 후, 이 단백질은 박테리아에서부터 사람에게 이르기까지 전체 생물에 걸쳐 폭넓게 발견되고 있으며, 진화론적 입장에서 보면 MT는 매우 오래된 단백질로서 그 조성은 오랜 시간에도 불구하고 거의 변화하지 않았다.

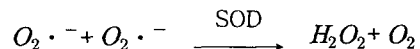
MT의 기능에 대하여 여러 가지 가설이 제안되었지만 아직 명확하게 밝혀진 것은 거의 없다.²⁾ MT가 금속 독성에 대한 생체방어의 중요한 수단으로 생각되고 있지만 MT의 생물학적 기능은 완전히 밝혀지지 않고 있다.

현재까지 제안된 MT의 생물학적 기능은 다음과 같이 몇 가지로 나누어 볼 수 있다.

첫째, 세포질 MT가 금속과 결합하는 능력은 배양 세포가 금속에 대한 저항성을 갖게 해 준다. 많은 세포 중에서 MT 수준의 상승은 구리와 카드뮴 같은 MT를 유발하고 결합할 수 있는 금속의 허용 농도와 관련되어 있다. 금속 저항성에 대한 가장 직접적인 증거는 구리 감수성에 대한 연구들 들 수 있다. 일련의 구리 저항성 간 세포주가 세포내의 Cu-MT 농도에 비례하여 구리에 대한 저항성이 높아진다고 보고되었다.³⁾

구리와 같은 비교적 덜 유해한 금속을 주입하여 간의 MT를 유발시켜 놓은 경우, 간에서 MT에 결합하는 구리의 양이 증가한다. 이 밖에도 백금, 수은, 납, 그리고 금과 같은 금속도 MT를 유발시킬 수 있다. 이는 MT가 반응성 중금속의 세포 내에서의 농도를 낮추어 비특이적인 보호 작용을 한다는 것이다.

둘째, MT가 산화성 스트레스에 대해 방어 작용을 한다는 것이다. 산화성 스트레스는 과산화 음이온 ($O_2 \cdot^-$), 과산화수소 (H_2O_2), 히드록시 라디칼 ($HO \cdot$)과 같은 반응성 산소종들(Reactive oxygen species ; ROS)에서 기인한다. 이러한 반응성 분자들은 호흡과 염증 반응 동안에 흔히 금속 촉매 반응에서 생성되며 산화성이 있어서 DNA, 단백질 및 막과 같은 세포 구성성분들에 손상을 준다.⁴⁾ 산화성 손상에 대한 생물학적 방어는 반응성 산소종들을 제거하는 단백질들, 금속이온을 격리시키는 분자들 및 손상된 세포 구성성분을 복구하는 효소들로 구성되어있다.⁵⁾ 그러한 단백질 중 하나인 초과산화물 불균등화 효소(Superoxide dismutase : SOD)는 초과산화 이온 ($O_2 \cdot^-$) 이 과산화수소와 산소로 전환되는 것을 촉매한다.⁶⁾



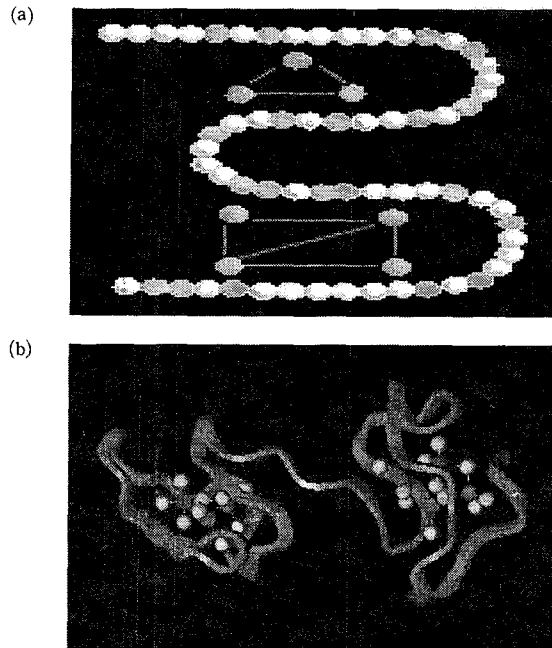


Fig. 1. The primary and tertiary structure of metallothionein

- (a) A general primary metallothionein structure. The serial circles mean general amino acids residues, and the circles aperted from serial circles mean metals.
- (b) The tertiary structure of metallothionein II from rat. The ribbon means amino acids sequence, circles in ribbon structure are -SH group of cysteines and metals.

MT가 산화성 스트레스에 대하여 방어 작용을 할 것이라는 것이 제안된 이후, 카드뮴과/또는 아연이 결합된 토끼 간에 있는 MT에 대한 시험관 내 스핀 트래핑 연구에서 MT가 매우 효과적인 히드록실 라디칼의 제거제이며 초과산화음이온을 감소시킬 수 있다는 것을 보여주었다. 또한 최근에 Tamai 등은 MT가 효소의 Cu, Zn-SOD의 기능을 대신할 수 있음을 발견하였다.⁷⁾ 이는 Cu(I)-MT의 항산화제 활성을 보여주는 생체 내에서의 시험관 연구의 상화관계를 직접 보여주며 MT 단백질이 산화성 스트

레스에 대한 세포반응에서 항산화제 역할을 한다는 것을 강력하게 암시한다.

셋째, MT I 과 MT II를 발현하지 못하게 만든 쥐는 비만이 되며 따라서 MT가 에너지 대사에도 관여되었을 것으로 추측된다.⁸⁾

본 연구에서는 MT가 초과산화물을 직접 제거하는 능력이 있는가를 확인하기 위한 방법으로 니코틴아미드 아데닌 디뉴클레오티드 인산염(NADPH)의 산화반응과 염화히드록실암모늄으로부터 파생되는 아질산염의 생성반응을 이용하였다. 이 반응을 수행하는 과정에서 MT가 SOD와 같이 독립적으로 초과산화물을 제거하는 효소의 활성에 어떤

영향을 미치는 가를 확인하기 위하여 SOD와 같이 혼합하여 그 결과를 비교해 보았다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

토끼의 간으로부터 추출한 MT, 소의 적혈구로부터 추출한 SOD, 잔틴, 버터우유에서 추출한 잔틴 산화효소, EDTA (ethylenediamine tetraacetic acid), NADPH, 트라이에탄올아민, 다이에탄올아민, $MnCl_2$, 2-메르캡토에탄올, 인산칼륨, 염화히드록실암모늄, 설파닐산, α -나프틸아민; HCl, NaOH 등이다.

2. 방법

2.1. NADPH의 산화반응

100mM TDB(Triethanolamine-diethylamine-HCl buffer, pH 7.4) 800 μ l, 갓 만든 7.5 mM NADPH 40 μ l, 100 mM/ 50 mM EDTA- $MnCl_2$ 25 μ l, 그리고 SOD와/나 MT 용액 100 μ l를 가하여 혼합한 다음, 340 nm에서 5분간 배양하였다.

배양한 혼합물에 10 mM 2-메르캡토에탄올 100 μ l를 가하여 혼합한 다음, UV-spectrophotometer를 이용하여 340 nm에서 20분간 흡광도 변화를 관찰하였다.⁹⁾

2.2. 아질산염의 생성반응

60 mM 인산칼륨 완충용액, pH 7.8, 1.49 ml, 1.5 mM 잔틴/ 25% 수산화나트륨 용액 0.1 ml, 20 mM 염화히드록실암모늄 0.1 ml, SOD와/나 MT 용액 0.01 ml, 그리고 마지막으로 잔틴 산화효소용액 0.3 ml를

가하였다. 이 혼합용액을 섞어준 다음, 25 °C에서 20분간 배양하였다.

배양된 용액 중 0.5 ml를 분취하여 용기에 담은 다음, 0.03 mM 설파닐산 용액 0.5 ml를 가하여 섞어주고 5분간 배양하였다. 이렇게 혼합-배양된 시료에 0.03 M α -나프틸아민 용액 0.5 ml를 가하여 섞어준 다음 530 nm에서 180분간 흡광도의 변화를 관찰하였다.¹⁰⁾

그리고, 반응 혼합물에는 0.96×10^{-5} , 4.8×10^{-5} , 24×10^{-5} , 120×10^{-5} , 600×10^{-5} , 1200×10^{-5} , 6000×10^{-5} , 그리고 60000×10^{-5} mg의 MT를 가하여 그 효과를 확인하고자 하였다.

III. 결과 및 고찰

NADPH의 산화반응을 UV-분광기를 이용하여 340 nm에서 20분간 흡광도 변화를 관찰하면 NADPH가 산화-분해되면서 그 값이 감소한다. 그 결과 반응 시작 후 10분 동안 흡광도 값이 직선에 가까운 변화를 나타내므로 그 차이 값을 이용하여 흡광도 변화를 구하였다. MT나 SOD를 넣지 않은 반응 혼합물을 기준으로 하여 SOD와 MT가 NADPH 산화반응을 억제하는 효과를 비교할 수 있었다. (Fig. 2.)

MT의 양이 24×10^{-5} mg이하인 경우에는 MT 단독으로 첨가하거나 또는 0.3 unit의 SOD와 함께 첨가해도 NADPH의 산화반응을 억제하는 효과가 거의 나타나지 않았다. 그러나 반응 혼합물에 MT를 단독으로 120×10^{-5} mg 이상을 첨가했을 때에는 초과산화물을 제거하는 효과가 크게 증가하는 것을 관찰할 수 있다.

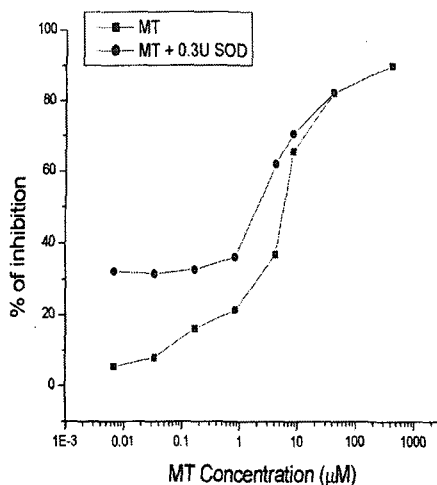


Fig. 2. The effect of metallothionein on oxidation of NADPH.

또한 MT를 3000×10^{-5} mg 이상 단독으로 첨가해 주었을 때에는 오히려 0.3 unit의 SOD와 같이 첨가했을 때 보다 초과산화물을 제거하는 효과가 더 크게 나타났다.

잔틴이 잔틴 산화효소의 촉매로 요산으로 분해되면서 방출하는 초초과산화물이 히드록실아민과 반응하여 생성되는 아질산염이 다시 술폰산과 반응하여 디아조늄이온을 생성하게 되고, 생성된 디아조늄 이온이 α -나프틸아민과 반응하여 아조화합물을 생성하는 반응을 UV-분광기를 통해 530 nm에서 1시간동안 흡광도 변화를 관찰하였다. 이 반응은 최종적으로 생성되는 아조화합물의 양을 검출하는 것이므로 흡광도가 증가하게 된다. 이 반응 또한 MT나 SOD를 넣지 않은 반응 화합물을 기준으로 하여 MT와 SOD가 아조화합물 생성을 억제하는 효과를 확인하였다. (Fig. 3.)

MT를 단독으로 반응 혼합물에 첨가했을 때에는 NADPH의 산화반응에서와 마찬가지로

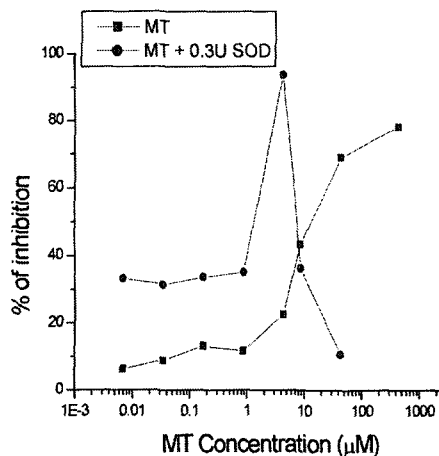


Fig. 3. The effect of metallothionein on formation of nitrite.

지로 120×10^{-5} mg까지는 거의 변화를 나타내지 않다가 그 이상의 양을 첨가하면 아조화합물의 생성이 현저히 감소한다는 것을 확인하였다. 그러나 0.3 unit의 SOD와 같이 첨가했을 때에는 600×10^{-5} mg의 MT가 SOD의 활성을 증가시켜 아조화합물이 생성되는 것을 거의 완벽하게 방어하지만, 그 이상의 양이 첨가되었을 때에는 오히려 아조화합물의 생성을 방어하지 못하는 것으로 나타났다. 따라서 MT가 생성되는 초과산화물을 제거하는 능력이 크다는 것을 확인할 수 있었다.

IV. 결론

NADPH의 산화반응을 UV-분광기를 이용하여 340 nm에서 흡광도 변화를 관찰한 결과, MT의 양이 24×10^{-5} mg이하인 경우에는 MT를 단독으로 첨가하거나 0.3

unit의 SOD와 함께 첨가해도 NADPH의 산화반응을 억제하는 효과가 거의 나타나지 않았으나, 120×10^{-5} mg 이상을 첨가했을 때에는 초과산화물을 제거하는 효과가 크게 증가하는 것을 관찰할 수 있었다.

디아조늄 이온이 α -나프틸아민과 반응하여 아조화합물을 생성하는 반응을 UV-분광기를 통해 530 nm에서 흡광도 변화를 관찰한 결과, MT를 단독으로 반응 혼합물에 첨가했을 때에는 NADPH의 산화반응에서와 마찬가지로 120×10^{-5} mg까지는 거의 변화를 나타내지 않다가 그 이상의 양을 첨가하면 아조화합물의 생성이 현저히 감소한다는 것을 확인하였고, 0.3 unit의 SOD와 같이 첨가했을 때에는 600×10^{-5} mg 이상의 양이 첨가되었을 때에는 오히려 아조화합물의 생성을 방어하지 못하는 것으로 나타났다.

참 고 문 헌

- Margoshes, M. and Vallee, B. L. *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 4813, 1957.
- Palmitier, R. D. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **95**, 8428, 1998.
- Freedman, J. H. and Peisach, J. *Biochim. Biophys. Acta*, **992**, 145, 1989.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C. *Biochemical J.*, **219**, 1, 1984.
- Storz, G., Tartaglia, L. A., Farr, S. B. and Ames, B. N. *Trends in Genetics*, **6**, 363, 1990.
- McCord, J. M. and Fridovich, I. *J. Biol. Chem.*, **244**, 6049, 1969.
- Tamai, K. T., Gralla, E. B., Ellerby, L. M., Valentine, J. S. and Thiele, D. N. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **90**, 8013, 1993.
- Beattie, J. H., Wood, A. M., Brenner, I., Choo, K. H. A., Michalska, A. E., Duncan, J. S. and Trayhurn, P. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **95**, 358, 1998.
- Paoletti, F. and Mocali, A. *Methods Enzymol.*, **186**, 18, 1990.
- Pattichis, K., Louca, L. L., and Glover, V. *Anal. Biochem.*, **49**, 474, 1972.