

## 양배추 포스포리파제 D 활성에 미치는 포스포리파제 A<sub>2</sub>의 영향

고 은 희\*  
덕성여자대학교 화학과  
(2008. 7. 8 접수)

### Effect of Phospholipase A<sub>2</sub> on the Activity of Cabbage Phospholipase D

Eun-Hie Koh\*  
Department of Chemistry, Duksung Woman's University, Seoul 132-714, Korea  
(Received July 8, 2008)

**요 약.** 세포에서 포스포리파제D(PLD)와 포스포리파제A<sub>2</sub>(PLA<sub>2</sub>)간의 상호작용 연구의 한 모델로 양배추 PLD의 활성에 미치는 PLA<sub>2</sub>의 영향을 포스포티딜콜린(PC) 작은 이중막 베시클(SUV)을 이용하여 연구하였다. PLA<sub>2</sub>의 존재하에서 PLD의 활성은 저해되었다. PLA<sub>2</sub>의 양을 증가시킴에 따라 PLD의 활성이 거의 모두 상실됨을 관찰할 수 있었다. 이러한 PLA<sub>2</sub>에 의한 저해 효과를 분석하기 위하여 그 생성물인 올리에이트(oleate)와 라이소포스파티딜콜린(LPC)을 SUV에 각각 처리하고 PLD활성을 검토하였다. 그 결과 PLD의 활성은 외부에서 더해진 올리에이트에 의해 증가되었고, LPC에 의해서는 저해되었다. 그러나 이들 생성물들은 동시에 처리할 경우 PLA<sub>2</sub>를 직접 처리한 결과와 같이 PLD활성이 저해되는 것으로 나타났다. 올리에이트의 PLD 활성화 효과는 포화된 다른 지방산 보다 더 좋았다. LPC의 저해 효과도 다른 라이소포스파티드와 비교하였다. 라이소포스파티드 산(LPA)을 제외하고 검토한 모든 라이소포스파티드는 PLD의 활성을 저해하는 것으로 나타났다. LPA는 PLD의 활성을 상당량 증가시켰다. PLD활성에 대한 PLA<sub>2</sub>생성 분자들의 효과를 더 조사하기 위해 Michaelis-Menten kinetics와 함께 베시클 이중막의 안정성과 베시클 크기의 변화를 검토하였다. 본 실험 결과는 조건에 따라 PLA<sub>2</sub>의 생성물이 세포내에서도 PLD의 활성을 조절할 수 있다는 가능성을 보여주었다고 사료된다.

**주제어:** 포스포리파아제 D, 포스포리파아제 A<sub>2</sub>, 작은 이중막 베시클 (SUV), 올리에이트, 라이소포스파티딜콜린

**ABSTRACT.** As a model study for in vivo interplay between phospholipase D(PLD) and phospholipase A<sub>2</sub>(PLA<sub>2</sub>), effect of PLA<sub>2</sub> on the activity of cabbage PLD was examined employing phosphatidylcholine(PC) small unilamellar vesicles(SUV). The PLD activity was inhibited in the presence of PLA<sub>2</sub>. Almost complete inhibition of PLD activity could be brought about with increasing amount of PLA<sub>2</sub>. In order to evaluate the inhibitory effect of PLA<sub>2</sub>, effects of its products LPC and oleate were examined by adding individually to the SUV. The exogenously added oleate enhanced the PLD activity, while the LPC inhibited the PLD activity. However, in combination of LPC and oleate, the PLD activity was inhibited as similarly to the PLA<sub>2</sub> added directly to the assay system. The oleate enhancement effect was greater than the other saturated fatty acids examined. The inhibitory effect of LPC was also extended to other lysophospholipids. Among the lysophospholipids tested here, all except LPA inhibited the PLD activity. LPA showed marked activational effect. The modulational effect of the molecules produced by PLA<sub>2</sub> on the PLD activity was further investigated by examining the stability of bilayer structure and the size of mixed vesicles in addition to carrying out the kinetics of Michaelis-Menten. The results presented here could show a possibility of in vivo clue for the modulation of PLD activity by the products of PLA<sub>2</sub> under the certain experimental conditions.

**Keywords:** Phospholipase D(PLD), Phospholipase A<sub>2</sub>(PLA<sub>2</sub>), Small Unilamellar Vesicles(SUV), Oleate, Lysophosphatidylcholine

## 서 론

포스포리파제 D(Phospholipase D(PLD); EC 3.1.4.4)는 인지질의 phosphodiester 결합의 끝부분을 끊는 효소로 생체 내에 광범위하게 분포되어 있으며,<sup>1</sup> 세포의 각종 신호전달 과정에 참여하는 것으로 알려져 있어 이 효소의 활성 조절연구에 많은 노력을 기울이고 있다.<sup>2</sup> PLD가 세포막 인지질의 주성분인 포스파티딜콜린(phosphatidylcholine(PC))을 가수분해하여 얻어진 포스파티드 산(phosphatidic acid(PA))은 신호전달 뿐 아니라 막합입(endocytosis)이나 분비 같은 베시클 생성 과정에 관여하는 것으로도 알려져 있다.<sup>3</sup> 식물에서의 PLD 역할은 광범위하여 신호전달 과정은 물론 외부 스트레스에 민감하게 관여하는 것으로 보고되어 있다.<sup>4</sup> 예를 들면 식물성장, 활성산소들(ROS)에 의한 손상, 노화현상 등에 관여하는 것으로 널리 인식되어져 있다.<sup>5</sup> 그리고 식물 PLD의 cDNA 복제와 발현은 Castor bean<sup>6</sup>을 필두로 하여 양배추,<sup>7</sup> 아기장대,<sup>8</sup> 딸기<sup>9</sup> 등에서 이루어져 PLD의 유전자 연구의 토대를 마련해 주고 있다. PLD의 이러한 중요성과 많은 연구에도 불구하고 PLD 활성의 조절 메커니즘에 대한 이해는 아직 초기 단계에 머무르고 있다.

세포막 인지질의 조성은 세포의 분화(differentiation), 증식(proliferation), 사멸(apoptosis) 등에 따라 변화되며, 이와 관련된 인지질 대사 효소들인 phospholipase A<sub>2</sub>(PLA<sub>2</sub>), phospholipase C(PLC), phospholipase D(PLD) 등의 활성 변화도 함께 수반되고 있음이 알려져 있다.<sup>10</sup> 이에 따라 이들 효소들에 의해 생성되는 각종 지질 조절자들(lipid mediators)과 그들 사이의 상호작용에 많은 관심이 집중되고 있다. 그 예로 LA-N-1 세포주를 사용한 세포분화실험에 PLA<sub>2</sub>, PLC, PLD가 서로 연계되어 있고, 이때 생성된 지질 조절자들이 신경세포의 성장과 신경전달물질(neurotransmitter) 방출에 큰 영향을 미침이 관찰되었다.<sup>11</sup> S9 세포주를 이용한 또 다른 실험에서는 PLC의 활성이 PLD의 생성물인 PA와 PLA<sub>2</sub>의 생성물인 유리된 지방산인 arachidonic acid에 의해 각각 8배와 50배씩 증가함을 보여 주었다.<sup>12</sup> 이런 인지질 관련 효소 사이의 상호소통(cross talk)은 세포 신호전달의 핵심이 되고 있다. 그러나 PLD 활성 조절에 대한 세포내 연구는 아직 이렇다 할 만한 진전이 없다. 한편 PLD 효소를 이용한 여러 인자들에 의한 PLD 활성 변화는 꾸준

히 보고되고 있다. PLD를 활성화시키는 화합물로는 calcium ion,<sup>13</sup> 몇 diacylglycerol들,<sup>14</sup> 그리고 폴리아민<sup>15</sup> 등이 있고, PLD를 저해시키는 것으로는 alkylphosphate ester와<sup>16</sup> lysophosphatidylethanolamine<sup>17</sup> 등이 알려져 있다.

PLD와 PLA<sub>2</sub> 간의 상호작용을 탐색하기 위해 본 실험에서는 PLD에 대한 PLA<sub>2</sub>의 영향을 세포막과 유사한 PC 베시클을 사용하여 검토하였다. 보통 PLD 활성 측정법은 유기용매에 녹인 인지질을 사용한 계면촉매(interfacial catalysis) 효과를 이용하거나, SDS 같은 계면활성제와 함께 인지질 미셀(micelle)을 만들어 사용한다.<sup>1</sup> 그러나 이들 유기 용매나 계면활성제의 사용은 모두 실제 세포막과는 동떨어진 상태로 PLA<sub>2</sub>의 효과를 관찰하는데 적합하지 않은 것으로 판단되어 PC만을 사용한 SUV를 이용하였다. 베시클을 이용한 측정법의 단점인 낮은 PLD 활성은 방사성 동위원소로 표지한 기질을 사용하여 극복하였다.

이런 조건하에서 PLA<sub>2</sub>는 PLD 활성을 저해시키는 것으로 나타났으며, 이 관찰을 PLA<sub>2</sub>의 생성물질인 LPC와 oleate를 각각 SUV에 넣어 더 검토하였다. LPC는 PLD 활성을 저해시켰으나 oleate는 활성을 증가시켰다. 이 결과를 기질 SUV 상태 변화에서 찾기 위해 베시클 이중막의 안정성, 베시클의 크기를 추정하고, Michaelis-Menten kinetics를 수행하였다. 이들 실험으로 PLD를 저해시키는 LPC는 그를 포함한 혼합 베시클의 크기가 줄어들었으며, PLD를 활성화시키는 oleate의 경우는 혼합 베시클의 크기가 증가하는 것으로 나타났다. 이 모델 실험을 통하여 양배추 PLD와 PLA<sub>2</sub> 사이의 상관 관계를 어느 정도 추정할 수 있는 기초 자료를 얻을 수 있었다.

## 재료 및 방법

**재료.** 계란 phosphatidylcholine(PC), phospholipase A<sub>2</sub>(from *crotonal adamanteus* venom), oleate, palmitate, stearate, 및 1,4-piperazinediethanesulfonic acid (PIPES) 등은 Sigma 회사(St. Louis, MO, U.S.A.)로부터 구입하였다. 합성 lysophospholipid인 lysophosphatidylcholine(LPC, 18:1), lysophosphatidylserine(LPS, 18:1), lysophosphatidylglycerine(LPG, 18:1), lysophosphatidylethanolamine(LPE, 18:1), lysophosphatidic acid(LPA, 18:1)는 Avanti Polar Lipids(Alabaster, AL, U.S.A.)에

서 구입하였다. [9,10-<sup>3</sup>H]palmitate(5 mCi/mL)는 Dupont NEN (Wilmington, DEL, U.S.A.)에서 구입하였고, 이를 사용하여 [<sup>3</sup>H]palmitoyl PC를 Murakami 등의 방법에 따라 LPC로부터 합성하였다.<sup>15</sup> Octyl-sepharose CL-4B는 Pharmacia Biotech(Sweden) 제품이며, TLC 판(Kieselgel 60 F254)은 Merck 사(Damstadt, Germany) 제품을 사용하였다. 8-aminonaphthalene-1,3,6-trisulfonic acid(ANTS)와 p-xylenebis(pyridinium bromide)(DPX)는 Molecular Probes(Eugene, OR, U.S.A.)에서 구입하였다. 액체섬광계기(liquid scintillation counter)는 Wallac 1409(LKB, Mt. Waverley, Australia)를 사용하였고, 빛 산란장치(light scattering)는 BI-200SB goniometer(Brookhaven Instrument, Holtsville, NY, U.S.A.)를 이용하였다.

**양배추 포스파리피제 D정제.** 양배추는 야채시장에서 구입한 신선한 사보이(savoy) 품종을 사용하였다. 양배추의 아세톤 가루는 Jung 등에서 설명한 대로<sup>19</sup> 양배추 속의 노란 흰 잎 주스를 55 °C에서 열 처리한 후, 그 윗 말국을 드라이 아이스로 차게한 아세톤에 넣어 앙금을 얻고, 이를 냉동 건조시켜 만들었다. 이 아세톤 가루를 Ubrich-Hoffman 실험방법에<sup>14</sup> 따라 50 mM CaCl<sub>2</sub>를 포함하는 10 mM PIPES buffer(pH 6.2)로 평형시킨 octyl-sepharose CL-4B column에 넣고 Ca<sup>2+</sup>의 농도를 변화시키면서 용출시켰다. 이렇게 얻은 부분 정제된 PLD를 다시 20 mM MES buffer(pH 5.0)로 평형시킨 monoQ ion exchange column에 넣고 NaCl 농도를 2 M 까지 변화시키면서 용출시켰다. 이 정제된 PLD는 SDS-PAGE 상에서 89 kDa의 단일 띠로 나타났다.

**Small unilamellar vesicle(SUV) 제조.** SUV는 Lee와 Choi 방법에<sup>20</sup> 따라 인지질 혼합액을 초음파 파쇄기를 이용하여 제조하였다. [<sup>3</sup>H]palmitoyl PC를 포함하는 일정량의 달걀 PC를 cortex 유리판에 넣고 질소가스를 통과시켜 얇은 막으로 말렸다. 이 막은 인지질은 0.1 M KCl과 10 mM HEPES (pH 7.0) 완충용액 1 mL로 수화시킨 다음 votex로 세게 흔들어서 혼합액을 얻었다. 이 혼합액을 4 °C에서 1시간 동안 probe 형태 초음파 파쇄기로 처리하였다. 그래도 남아 있을 덜 부서진 지질 덩어리는 40,000 g에서 20분간 원심분리하여 제거한 후 균일한 SUV를 사용하였다.

**포스포리피제 D 활성 측정.** PLD 활동도 측정은 방사성 동위원소를 포함한 달걀 PC SUV를 이용하여

수행하였다. 반응 혼합액 10 μL에는 10 mM HEPES 완충용액(pH 7.0), 0.2 mM PC, 0.1 mCi [<sup>3</sup>H]palmitoyl PC, 100 ng PLD, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.1 mM KCl을 넣었다. 반응은 효소 첨가로부터 시작하였으며, 37 °C에서 10분간 반응시켰다. 반응은 750 μL chloroform/methanol/1 N HCl (100 : 50 : 3, v/v/v)를 넣어 종결시켰으며, 250 μL 0.1 M KCl을 첨가한 후 10,000 g에서 3분간 원심분리하여 유기층을 얻었다. 유기층을 말려 얻은 지질들은 TLC판에 전개하여 분리하였다. 전개용매 조성은 ethylacetate/isooctane/acetic acid/water (13 : 2 : 3 : 10, v/v/v/v)였다. 요오드 증기로 전개된 인지질을 식별하였고, 생성물질인 PA 부분은 굵어내 liquid scintillation counter (Wallac 1409)로 그 방사능을 측정하였다. 모든 측정값들은 반복하여 얻었으며 평균값을 결과로 취하였다.

**PLA2 활성 측정.** 반응 혼합액 500 μL는 10 mM HEPES 완충용액(pH 7.0)에 6 mM PC, 1 mCi [<sup>3</sup>H]palmitoyl PC, PLA<sub>2</sub>, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.1 mM KCl을 넣어 만들었다. 반응은 효소를 첨가하여 시작했으며 37 °C에서 1 시간 반응시켰다. 반응 후 20 μL를 채취하여 PLA<sub>2</sub> 활성측정에 사용하였고 나머지는 다음 실험에 사용하였다. 반응은 500 μL chloroform/methanol/1 N HCl (100 : 50 : 3, v/v/v)를 넣어 종결시켰으며, 250 μL 0.1 M KCl을 추가한 후 원심분리하여 유기층을 분리하였다. 유기층을 건조하여 얻은 지질은 30 μL chloroform에 녹여 TLC 판에서 전개하였다. 사용한 전개 용매 조성은 chloroform/methanol/4 N ammonia(65 : 35 : 5, v/v/v)이었다. 요오드 증기로 식별하여 생성된 palmitate를 굵어 내어 그 방사능을 측정하였다. 측정값들은 반복하여 얻었으며 평균값을 결과로 취하였다.

**베시클 새기(leakage) 측정.** SUV 이중막의 안정성을 검토하기 위해 베시클의 새기 측정 방법으로 알려진 Ellens 등에 의한 ANTS/DPX 염료 형광측정법을 이용하였다.<sup>21</sup> 두 염료를 내포시킨 SUV는 75 mM ANTS, 270 mM DPX, 0.1 M KCl 과 10 mM HEPES (pH 7.0)로 만들었다. SUV속에 포함되지 않은 외부의 염료들은 sephadex G-75 column chromatography를 사용하여 제거하였다. 이때 용출 용액으로는 0.1 M KCl을 포함한 10 mM HEPES(pH 7.0) 완충용액을 사용하였다. 형광측정의 기준은 ANTS와 DPX를 내포하고 있는 0.2 mM SUV를 0%로 정하고, 같은 양의 ANTS/DPX SUV를 계면 활성제 Triton X-100로 용

해시커 이클 100%로 삼아 %새기(leakage)로 그 결과를 나타내었다. 결과에 나타난 수치는 빈락 측정 후 평균값을 백하였다.

**베시클 빛 산란 실험.** 베시클 크기를 측정하기 위해 SUV에 의한 빛 산란을 BI-200SB goniometer를 사용하여 상온에서 측정하였다. 레이저 파장은 514 nm에 맞추었으며 시간에 따른 산란 새기의 변화를 기록하였다. 산란 실험에 사용한 SUV는 전체 부피 1.0 mL의 혼합액에 0.2 mM PC, 0.1 M KCl, 10 mM HEPES(pH7.0)와 0.1 mM의 oleate나 LPC를 넣어 만들었다.

**결과 및 고찰**

**PLD 활성에 미치는 PLA<sub>2</sub>의 영향.** 각종 인지질대사에 관여하는 PLA<sub>2</sub>, PLC, PLD 등은 세포내에서 세포 신호전달에 관여하는 것으로 알려져 있다. 본 실험에서는 세포내에서 PLD와 PLA<sub>2</sub>의 상호작용의 한 모델 실험으로 양배추 PLD 활성에 미치는 PLA<sub>2</sub>의 영향을 검토하였다. 날걀 PC에 미량의 방사성 [<sup>3</sup>H] palmitoyl PC를 넣어 만든 PC SUV를 먼저 PLA<sub>2</sub>로 처리한 후에 PLD 활성을 측정하였으며, 그 활성은 급격히 감소하였다(Fig. 1). PLA<sub>2</sub> 효소 증가에 따라

PLD 활성 저해현상은 반비례 양상을 띠었으며, PLA<sub>2</sub>가 베시클 PC를 10% 정도 분해하였을 때는 PLD 활성은 거의 완전히 소멸되었다. PLD 활성 측정에 PLA<sub>2</sub>가 직접 영향을 줄 가능성을 배제하기 위해 PLA<sub>2</sub>를 처리한 SUV는 Sephadex G-75 column을 이용하여 PLA<sub>2</sub>를 제거하였다. 이때 사용한 용출 용액은 0.1 M KCl을 포함한 10 mM HEPES(pH 7.0) 완충 용액이었다. Fig. 1은 PLA<sub>2</sub> 효소에 의한 베시클 인지질의 구성 변화가 PLD 활성에 큰 영향을 주고 있음을 극명하게 보여주고 있다.

**PLD 활성에 미치는 LPC와 oleate의 영향.** PLA<sub>2</sub>에 의해 날걀 PC SUV는 가수분해되어 lysophosphatidylcholine(LPC)과 유리된 지방산인 oleate를 주로 생성하기 때문에 이들 각각의 생성물질이 PLD 활성에 미치는 영향을 검토하였다. PC SUV를 만들 때 일정량의 PC에 LPC나 oleate를 추가로 넣어주었으며 실험 결과는 Fig. 2에 도시하였다. LPC는 PLD 활성을 저해하였으나 oleate는 PLD 활성을 오히려 증가시켰다. LPC와 oleate를 동시에 넣었을 때는 PLA<sub>2</sub>의 결과와 유사하게 PLD 활성이 저해되었다. 즉 LPC의 효과가 oleate의 영향을 압도하는 것으로 나타났다. LPC와 oleate의 상반된 결과는 분자 모양의 차이가 그 요인일 수도 있다는 가능성을 암시하고 있다.<sup>3</sup> 즉 LPC는 전하를 띤 머리 부분이 큰 inverted cone 모양이고, oleate는 꼬리 부분이 더 큰 cone 모양의 형태를 가지고 있어 이들은 각각 다른 양상으로 SUV의 이중막에 영향을 미칠 것으로 추정된다.

**지방산들과 포스포리피드들의 영향.** 앞의 LPC와 oleate 실험결과를 더 자세히 다루기 위해 우선 PLD

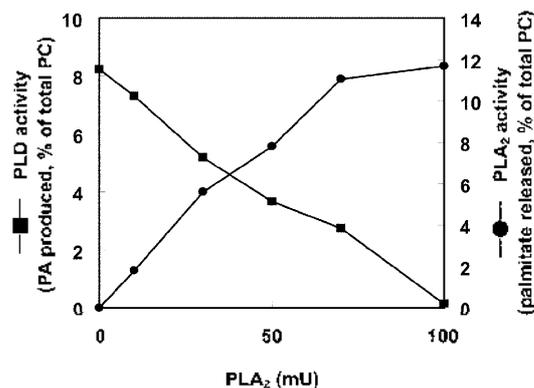


Fig. 1. Effect of PLA<sub>2</sub> on the cabbage PLD activity. The PLD activity was determined with PC SUV containing [<sup>3</sup>H] palmitoyl PC. The reaction was carried out in 10 mM HEPES buffer(pH7.0) for 10 min at 37 °C. The radioactive product PA was separated by TLC plate and the radioactivity was measured with a liquid scintillation counter. The PLA<sub>2</sub> activity was also determined with [<sup>3</sup>H] palmitoyl PC vesicles and the product [<sup>3</sup>H] palmitate was separated and counted. Data are expressed as means of duplicated experiments.

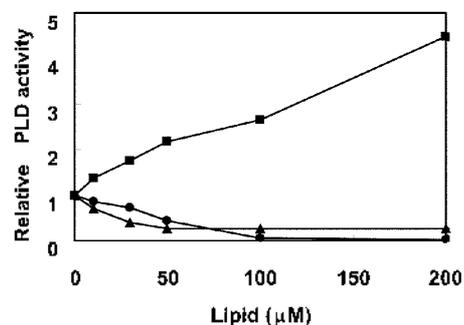


Fig. 2. Effects of PLA<sub>2</sub> products on the PLD activity. -▲-, effect of oleate and LPC; -■-, effect of oleate; ●-, effect of LPC. The PLD activity was determined as previously described.

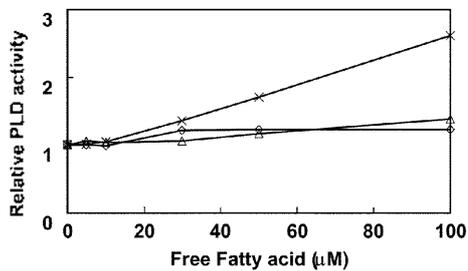


Fig. 3. Effects of free fatty acids on the PLD activity.  $\triangle$ , palmitate;  $\nabla$ , stearate;  $\times$ , oleate. The PLD activity was determined as previously described.

를 활성화시킨 oleate 이외의 다른 지방산들의 영향을 검토하였다(Fig. 3). 검토한 stearate와 palmitate도 PLD를 활성화시켰으나 불포화 지방산인 oleate보다는 그 활성화 효과가 훨씬 적었다. 이나도, 포화지방산인 stearate와 palmitate는 상대적으로 oleate보다 작은 크기의 꼬리를 갖고 있는 cone 모양일 것으로 추정된다. LPC에 의한 PLD 저해 효과가 다른 라이소포스포리피드에도 적용되는지를 확인하기 위하여 꼬리 부분은 모두 같으나(18:1) 머리 부분만 다른 라이소포스포리피드들과 비교하였다(Fig. 4). 검토한 라이소포스포리피드 중 lysophosphatidic acid(LPA)를 제외한 모든 라이소포스포리피드가 PLD 활성을 저해시켰다. Lysophosphatidylethanolamine(LPE), lysophosphatidylglycerol(LPG), lysophosphatidylserine(LPS)은 모두 LPC처럼 저해 효과를 보여 주었다. 그 중 LPE는 PLD 활성을 가장 많이 저해시키는 것으로 나타났다. 이 LPE의 저해 효과는 계면활성제 SDS를 이용한 PLD 활성 측정에서의 결과와 일치하였다.<sup>17</sup> 한편 LPA는 PLD 활성을 상당량 증가시켰다. LPA는

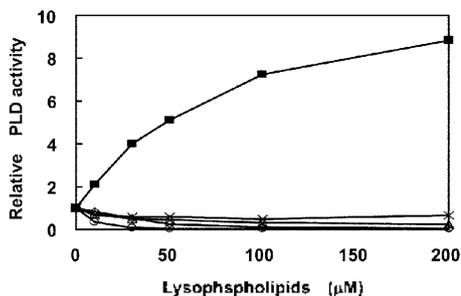


Fig. 4. Effects of lysophospholipids on the PLD activity.  $\circ$ , 18:1 LPC;  $\square$ , 18:1 LPE;  $\triangle$ , 18:1 LPS;  $\times$ , 18:1 LPG;  $\blacksquare$ , 18:1 LPA. The PLD activity was determined as previously described.

다른 라이소포스포리피드와 달리 머리 부분이 없으며 유전하를 띄고 있다. LPA는 식물의 여러 세포 기능에 관여하는 것으로 보고되어 있으며, 특히 동물 세포에서는 호르몬이나 growth factor와 유사한 생리 기능을 갖는 것으로 알려져 있다.<sup>22</sup>

PC 베시클 새기(leakage)에 미치는  $PLA_2$ , LPC, oleate의 영향. PLD 활성이 지방산에 의해 증가되고 LPC에 의해 저해되는 현상을 더 규명하기 위해 이들 혼합 베시클의 안정성을 검토하였다. 베시클에 내포된 염료의 형광을 이용한 베시클 새기(leakage)는 ANTS를 이용하여 실시하였다. ANTS의 형광은 DPX와의 거리에 민감하여 고농도에서는 형광이 나타나지 않으나(quench) 베시클 밖으로 나오면 붉어져서 ANTS의 형광이 나타난다. 이를 이용한 베시클 새기 측정법은 Smolarsky 등에 의해 효과적으로 검토되었다.<sup>23</sup> 베시클에  $PLA_2$ 를 37°C에서 반응시키고 베시클 새기 측정은 0°C에서 시행하였다(Fig. 5A). 실험 결과  $PLA_2$ 에 의한 palmitate 생성과 PC SUV의 새기, 즉 이중막의 불안정성의 증가는 거의 평행한 것으로

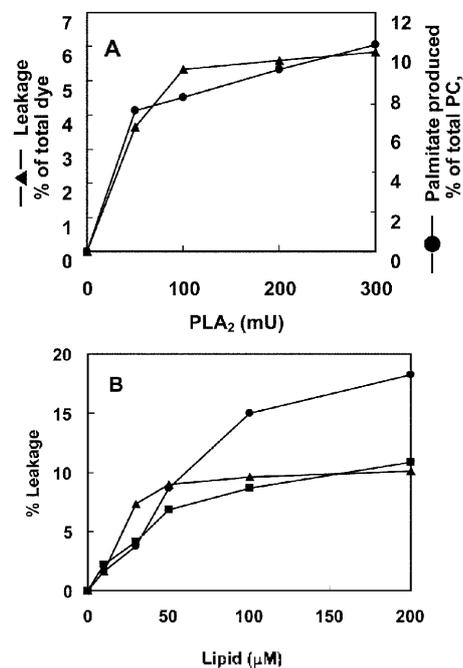


Fig. 5. Effects of  $PLA_2$  and its products on the leakage of PC vesicles. The leakage was determined by using ANTS/DPX system as described in Experimental section. (A) effect of  $PLA_2$ ; (B) effect of its products;  $\blacksquare$ , oleate;  $\bullet$ , LPC;  $\triangle$ , oleate and PLC.

나타났다. 이는 이미 보고된 원자 현미경으로 관찰한 PLA<sub>2</sub>에 의한 인지질 이중막 파괴 현상과 일치한다.<sup>24</sup> Oleate와 LPC를 각각 넣어 만든 혼합 베시클도 그 농도가 증가함에 따라 베시클의 안정성이 크게 감소함을 보여주었다(Fig. 5B). 특히 LPC만을 포함한 혼합 베시클은 더 쉽게 염료가 섰다. 그러나 PLD를 활성화시키는 oleate도 베시클의 이중막을 파괴시키는 것으로 나타나 PLD의 활성 변화와 베시클의 안정성과는 별로 상관 관계가 있음을 보여 주었다.

**PC SUV 크기에 미치는 oleate와 LPC의 영향.** Oleate와 LPC에 의한 PLD 활성 조절에 대한 또 다른 검증을 위해 혼합 베시클의 크기를 빛 산란 방법으로 측정하였다. 514 nm 레이저로 측정된 각 베시클의 크기는 PC SUV의 경우 12.02 nm로 나타났으며, oleate를 넣은 경우 14.43 nm, LPC의 경우 10.02 nm로 나타났다(Fig. 6). 즉 oleate에 의해 베시클의 크기가 증가하였고 LPC에 의해 축소되었음을 보여주었다. Oleate와 LPC를 함께 넣은 베시클은 그 크기가 크게 변하지 않았다. 이 결과는 SUV의 크기를 증가시킨 oleate는 PLD를 활성화시키고, SUV의 크기를 축소시킨 LPC는 PLD 활성을 저해시키는 것으로 해석할 수 있다.

**양배추 PLD의 Michaelis-Menten kinetics.** PLD 활성에 대한 oleate와 LPC의 상반된 영향을 Michaelis-Menten kinetic을 수행하여 검토하였다. PC SUV 농도 변화에 따른 PLD 활성을 측정하여 double-reciprocal plot을 얻었다(Fig. 7). 그 결과 oleate나 LPC가 있는

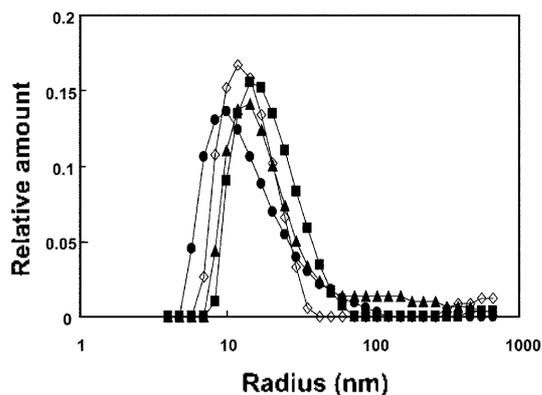


Fig. 6. Effects of the PLA<sub>2</sub> products on the radius of PC SUV. The PC vesicle radius was estimated by light scattering method as described in Experimental section. ○, PC; ■, PC+oleate; ●, PC+l.PC; ▲, PC-oleate+l.PC.

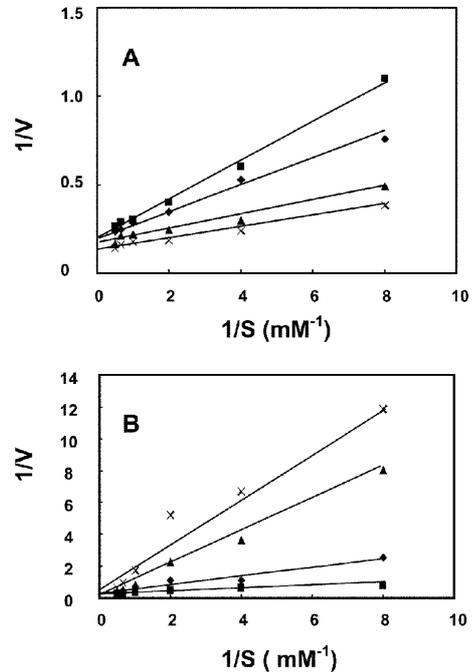


Fig. 7. Effects of oleate and LPC on the Michaelis-Menten kinetics of cabbage PLD. (A) Double-reciprocal plots of the PLD activity in the presence of oleate: ■, 0  $\mu$ M; ◆, 5  $\mu$ M; ▲, 50  $\mu$ M; ×, 100  $\mu$ M. (B) Double-reciprocal plots of the PLD activity in the presence of LPC: ■, 0  $\mu$ M; ◆, 5  $\mu$ M; ▲, 10  $\mu$ M; ×, 20  $\mu$ M.

PC SUV의 경우 PLD의  $V_{max}$ 는 5.13 nmole/min/ng protein으로 나타났으며, 기질에 대한  $K_m$  값은 0.57 mM이었다. Oleate 존재하에서  $V_{max}$  값은 앞 실험(Fig. 2와 3)에서와 같이 증가하였으나  $K_m$  값은 oleate 농도가 증가할수록 감소하였다. 즉 30, 50, 100  $\mu$ M의 oleate 존재하에서  $K_m$ 은 각각 0.34, 0.24, 0.21 mM로 나타났다(Fig. 7A). 이는 PLD가 순수한 PC SUV보다 상대적으로 음전하를 띤 oleate-PC 혼합 SUV에 더 잘 결합한다는 것을 의미한다. LPC의 존재하에서  $V_{max}$  값은 감소하였으며, LPC가 5, 10, 20  $\mu$ M 일 때  $K_m$ 은 각각 0.91, 1.67, 2.63 mM로 증가하는 것으로 나타났다(Fig. 7B). 이 결과는 예상한대로 PLD가 양전하가 많이진 LPC-PC 혼합 SUV와 잘 결합하지 못함을 보여주고 있어 oleate-PC 혼합 SUV와 대조적이다. Oleate와 LPC의 이런 상반된 효과는 이들 지질들의 전하와 모양의 차이 등에서 기인한다고 추정할 수 있다. 그러나 양배추  $\alpha$  type PLD의 3차원 구조가 아직 밝혀지지 않은 상태라<sup>25</sup> PLD와 이들 지질들과

의 결합 양상을 분자 수준에서 논하는 것은 아직 무리인 듯하다.

세포막 인지질 대사에 작용하는 각종 포스파티딜 리파제들 사이의 상호작용은 세포 신호전달은 물론 세포의 여러 기능과 연계되어 있다. 본 실험에서는 양배추 PLD를 가지고  $PLA_2$ 의 영향을 PC SUV 시스템에서 관찰하였다.  $PLA_2$ 에 의한 PLD의 저해 효과는 SUV 수준에서 검토하여  $PLA_2$ 의 한 생성물인 oleate에 의해서는 PLD가 활성화되었으나, 또 다른 생성물인 LPC에 의해서는 PLD 활성이 저해됨을 관찰하였다. 더 나아가 각종 유리된 지방산에 의해 PLD가 활성화 됨을 보여 주었고, LPA를 제외한 리소포스포리피드들은 PLD를 저해시킴을 밝힐 수 있었다. 이들 모델 실험에서는 새로운 정보로 음전하를 띤 oleate에 의해 SUV의 크기가 증가한 것이 관찰되었고, 이와 상반되게 꼬리 부분이 작은 LPC에 의해서는 SUV의 크기가 감소하는 것으로 나타났다. 이들 결과들을 세포내에서의 현상으로 받아들이기에는 매우 제한적이나, PLD 활성 조절의 기초 자료로는 그 유용성이 적지 않다고 판단된다.

본 연구는 2007년도 덕성여자대학교 자연과학연구소 연구지원비에 의하여 이루어졌으며 방사선 동위원소 실험은 서울대학교 화학과 실험실에서 수행하였다. 실험을 수행해 준 손광민에게 감사한다.

### 인용문헌

- Heller, M. *Adv. Lipid Res.* **1978**, *16*, 267.
- Jenkins, G. M.; Frohman, M. A. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.* **2005**, *62*, 2305.
- Cazzolli, R.; Scheman, A. N.; Fang, M. Q.; Hughes, W. E. *IUBMB Life* **2006**, *58*, 457.
- Bargmann, B. O. R.; Munnik, T. *Current Opinion in Plant Biology* **2006**, *9*, 515.
- Wang, X. *Plant Physiol.* **2005**, *139*, 566.
- Wang, X.; Xu, L.; Zheng, L. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 20312.
- Kim, D. U.; Roh, T.; Lee, J.; Noh, J. Y.; Jang, Y. J.; Hoe, K. L.; Yoo, H. S.; Choi, M. -U. *Biochim. Biophys. Acta.* **1999**, *1437*, 409.
- Qin, C.; Wang, X. *Plant Physiol.* **2002**, *128*, 1057.
- Yuan, H.; Chen, L.; Paliyath, G.; Sullivan, A.; Murr, D. P. *Plant Physiol. Biochem.* **2005**, *43*, 535.
- Farooqui, A. A.; Horrocks, L. A.; Farooqui, T. *Chem. Phys. Lipids* **2000**, *106*, 1.
- Farooqui, A. A.; Horrocks, L. A. *Reprod. Nutr. Dev.* **2005**, *44*, 613.
- Prasanna, S. N.; Chung, P. H.; Lin, L.; Lomasney, J. W. *Biochemistry* **2006**, *45*, 10987.
- Yamamoto, I.; Kanto, A.; Handa, T.; Miyajima, K. *Biochim. Biophys. Acta* **1995**, *1233*, 21.
- Dittrich, N.; Hastendorf, R.; Ulbrich-Hofmann, R. *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, *1391*, 265.
- Koh, E. *J. Korean Chem. Soc.* **2003**, *47*, 466.
- Dittrich, N.; Nossner, G.; Kutscher, B.; Ulbrich-Hofmann, R. *Enzyme Inhib.* **1996**, *11*, 67.
- Ryu, S. B.; Karlsson, B. H.; Ozgen, M.; Palta, J. P. *Pro. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 12717.
- Murakami, M.; Kudo, I.; Umeda, M.; Matsuzawa, A.; Takeda, M.; Komada, M.; Fujimori, Y.; Takahashi, K.; Inoue, K. *J. Biochem.(Tokyo)* **1992**, *111*, 175.
- Jung, K. Y.; Koh, E.; Choi, M. *Bull. Korean Chem. Soc.* **1989**, *10*, 595.
- Lee, C. H.; Choi, M.; *Bull. Korean Chem. Soc.* **1984**, *5*, 154.
- Ellens, H.; Bentz, J.; Szoka, F. C. *Biochemistry* **1985**, *24*, 3099.
- Van Corven, E. J.; Van Rijswijk, A.; Janlink, K.; Van der Bend, R. L.; Van Blitterswijk, W. J.; Moolenaar, W. H. *Biochem. J.* **1992**, *281*, 163.
- Smolarsky, M.; Teitelbaum, T. W. *Nature* **1980**, *284*, 344.
- Grandbois, M.; Clausen-Schaumann, H.; Gaub, H. *Biophys.* **1998**, *74*, 2398.
- Stumpe, S.; König, S.; Ulbrich-Hofmann, R. *FEBS J.* **2007**, *274*, 2630.