약학회지 제 53 권 제 2 호 74~77 (2009)
Yakhak Hoeji Vol. 53, No. 2

절식이 랫트 간의 황함유 아미노산 대사에 미치는 영향

김 상 겸#
충남대학교 약학대학, 충남대학교 형질전환 복제돼지 센터
(Received December 20, 2008; Revised January 20, 2009; Accepted February 15, 2009)

Effects of Fasting on Hepatic Metabolism of Sulfur Amino Acids in Rats

Sang Kyum Kim#
College of Pharmacy and Research Center for Transgenic Cloned Pigs, Chungnam National University, Daejeon 305-763, Korea

Abstract — Food deprivation decreases hepatic glutathione (GSH) levels, which is ascribed to alterations in availability of hepatic cysteine, a rate limiting factor for the GSH synthesis. The present study examines the effects of food deprivation on hepatic metabolism of sulfur amino acid in male rats. In rats fasted for 24 or 48 hours, hepatic GSH levels were decreased from 6.70±0.16 μmol/g liver to 4.02±0.20 or 4.06±0.07 μmol/g liver, respectively. Hepatic *S*-adenosylmethionine levels were also decreased in fasted rats, but *S*-adenosylhomocysteine levels were increased. Hepatic methionine levels were not changed by food deprivation for 48 hours. On the other hand, hepatic cysteine or taurine levels were increased from 106.2±4.1 to 130.0±2.7 nmol/g liver or from 2.45±0.43 to 5.07±0.78 μmol/g liver, respectively, in 48-hour fasted rats. Activity of cystathionine beta-synthase catalyzed homocysteine to cystathionine, was markedly decreased, but activity of betaine homocysteine methyltransferase was increased in fasted rats, indicating that methylation of homocysteine to methionine is activated. Also activity of cysteine dioxygenase, involved in taurine synthesis, was increased. These results suggested that hepatic methionine levels were maintained in rats fasted for 48 hours through increase in homocysteine methylation, and hepatic GSH may serve as a cysteine supplier reservoir in fasting state.

Keywords □ fasting, sulfur amino acid, hepatic metabolism, transsulfuration

간은 황함유 아미노산 대사의 중추로서 전체 methionine의 50% 이상이 간에서 대사된다.[1] Methionine은 transsulfuration 과정을 통하여 methionine의 황을 serine에 전달함으로써 cysteine으로 전환된다.[2,3] Methionine은 methionine adenosyltransferase(MAT)에 의해 *S*-adenoylmethionine(SAM)으로 전환되며 SAM은 methylation 반응의 methyl 공여체 또는 polyamine 합성의 전구체로 그리고 전체 황함유 아미노산 대사의 조절자로 기능한다.[4] SAM의 methylation 반응 후 생성되는 *S*-adenosylhomocysteine(SAH)은 가수분해되어 homocysteine으로 전환된다. Homocysteine은 betaine을 methyl 공여체로 이용하는 betaine homocysteine methyltransferase(BHMT)와 methyltetrahydrofolate를 methyl 공여체로 이용하는 methionine synthase에 의해 methionine으로 전환되거나 cystathionine beta-synthase (CBS)에 의해 cystathionine을 경유하여 cysteine으로 전환된다. 간에서 cysteine은 glutathione(GSH), taurine 또는 inorganic sulfate로 대사되며 일부 inorganic sulfate는 phase II 약물대사 반응에서 sulfation에 필요한 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate의 원료로 이용된다. 간은 cysteine의 농도를 조절하기 위해 cysteine의 유용성이 낮을 경우 주로 GSH의 형태로 저장하며 반대로 cysteine의 유용성이 증가할 경우 cysteine dioxygenase (CDO)를 이용하여 비가역적으로 hypotaurine을 거쳐 taurine으로 대사시킨다.[5]

황함유 아미노산 및 이들의 대사체는 세포의 생리적인 기능을 유지하기 위한 필수적인 역할을 수행하여 이들 물질의 대사에 이상이 발생할 경우 심각한 질환을 초래한다. 혈액에서 homocysteine의 농도가 증가하는 hyperhomocysteinemia 환자는 CBS의 유전적인 결함 등에 의해 발생하며 혈액에서 homocysteine의 증가는 심혈관계질환을 유발하는 중요한 인자로 확인되었다.[6] GSH는 산화적 손상에서 세포를 보호하며 cysteine의 수송체 또는 저장체로 기능한다.[5] SAM은 methylation 반응에서 methyl

#본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 042-821-5930 (팩스) 042-823-6566
(E-mail) sangkim@cnu.ac.kr

group의 공여체로 작용하며 최근 간세포의 기능을 조절하는 것으로 보고되었다.[4]

황함유 아미노산의 대사는 절식에 영향을 받는 것으로 보고되고 있다. 절식에 의해 간에서 GSH의 농도는 급격히 감소하나 GSH 합성에서 속도결정단계를 촉매하는 gamma-glutamylcysteine ligase(GCL)의 발현은 변화가 없는 것으로 보고되었다.[5] SAM의 농도 역시 절식에 의해 감소하나 SAM을 합성하는 MAT의 활성과 발현은 오히려 절식에 의해 증가하였다.[7] 이상의 시험은 정식상태에서 황함유 아미노산의 대사를 부분적으로 평가하여 얻어진 결과들이다. 따라서 본 연구에서는 절식상태의 랫트 간에서 황함유 아미노산의 대사변화를 대사체 정량과 대사과정에 관련된 효소들의 활성을 측정하여 평가함을 목표로 하였다. 본 연구에서는 methionine, SAM, SAH, cysteine, GSH와 taurine의 정량과 함께 MAT, CBS, BHMT, GCL과 CDO의 활성을 평가하였다.

실험 방법

실험동물

중앙 실험동물에서 몸무게가 200~220 g의 웅성 Sprague-Dawley 랫트를 구입하여 2주간 안정화시킨 후 실험에 사용하였다. 특별한 언급이 없는 한 실험동물은 자유롭게 사료와 물을 섭취하였다. 절식을 시킬 경우 사료를 제거하고 깔집과 배설물의 섭취를 막기위해 철망을 깔았다.

시약

SAM, SAH, amino acid 표준품, taurine, NADPH, GSH, 2-mercaptoethanol, ninhydrin과 *O*-phthalaldehyde는 Sigma Chemical Co.(St Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 그 외에 분석에 필요한 모든 시약은 reagent grade 또는 그 이상의 품질이었다.

Assays

유황함유 아미노산 및 대사체 측정을 위하여 랫트를 ether로 마취를 시키고 복대동맥에서 전혈을 취하고 간을 절취하였다. 간을 ice-cold 1 M perchloric acid 또는 1.15% KCl 용액에서 분쇄하였다. SAM, SAH, GSH와 cysteine은 perchloric acid를 처리하고 원심분리하여 얻은 상등액을 시료로 사용하였으며 methionine과 taurine은 1.15% KCl 조직분쇄액을 methanol로 재단백하고 원심분리하여 얻은 상등액을 시료로 사용하였다. 자세한 분석 방법은 이전 보고를 따랐다.[8,9]

Cysteine의 함량을 측정하기 위해 시료를 10분간 100°C에서 100 μ*l*의 산성 ninhydrin 용액, 100 μ*l*의 acetic acid와 100 μ*l*의 시료를 반응시킨 후 즉시 얼음물로 식혔다. 95%의 ethanol 0.67 m*l*을 가하여 안정화시키고 20~30분 후 560 nm에서 흡광도를 측정하였다.

GSH의 함량은 GSH reductase를 이용한 enzyme recycling 방법을 사용하였다. Eppendorf tubes에 0.3 mM NADPH 용액 0.7 m*l*, 6 mM 5,5-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid)(DTNB) 용액 0.1 m*l*, 검체 또는 GSH 표준액 0.2 m*l*을 가하여 잘 섞은 후 상온에서 4분간 방치하였다. 반응액에 12 units/m*l* 농도의 GSH reductase를 가하고 잘 섞은 후 412 nm에서 약 2분간 흡광도의 변화를 측정하여 linear한 1분간의 기울기 변화를 구하고 검량선으로부터 GSH 의 농도를 계산하였다.

SAM과 SAH은 1-heptanesulfonic acid sodium salt를 사용하여 ion pair시키고 역상 column(3.5 μm Symmetry C18 column; Waters, Milford, MA, USA)과 UV 검출기(UV-975 UV/VIS detector, Jasco Co., Tokyo, Japan)를 장착한 HPLC system에서 분리 및 정량하였다. 이동상은 18% methanol을 함유한 40 mM $NH_4H_2PO_4$와 8 mM 1-heptanesulfonic acid sodium salt의 용액을 사용하였으며 column oven을 이용하여 35°C에서 분석하였다.

Methionine과 taurine의 정량을 위해 *O*-phthaldialdehyde을 이용하여 유도체화하고 역상 column(3.5 μm Symmetry C18 column; Waters, Milford, MA, USA)과 fluorometric 검출기(RF-10A fluorescence detector, Shimadze, Tokyo. Japan)를 장착한 HPLC를 사용하였다. 0.1 M sodium acetic acid (pH=7.2)와 3%(v/v)의 tetrahydrofuran을 함유한 methanol을 이동상으로 사용하였으며 농도구배를 주기위해 2개의 pump(model LC-10AT, Shimadze, Tokyo, Japan)를 이용하였다.

MAT, CBS, BHMT, GCL과 CDO 활성의 평가를 위하여 약 4 g의 간을 절취하여 3배 부피의 homogenizing buffer(1 mM의 EDTA와 50 mM의 Tris-HCl을 포함하는 0.154 M KCl 용액, pH 7.4)에 가하고 테프론 페슬을 이용하여 분쇄하였다. 분쇄한 후 4°C, 10,000 g의 조건에서 high speed centrifuge(Model J2, Beckman Instruments Inc., California, USA)로 20분간 원심분리하고 상등액을 취하였다. 상등액을 4°C, 105,000 g에서 1시간 동안 ultracentrifuge(Model L80, Beckman Instruments Inc., California, USA)로 초원심분리하고 여기서 얻은 상등액을 시료로 사용하였다.

MAT의 활성은 SAM과 SAH, CBS는 cystathoinine, BHMT는 methionine, GCL은 gamma-glutamylcysteine 그리고 CDO는 cysteine sulfinic acid의 생성량을 정량하여 측정하였다. SAM과 SAH는 위에서 언급한 바와 같이 UV 검출기와 C18 column을 장착한 HPLC를 사용하여 분리 정량하였으며 methionine 역시 위에 언급한 바와 같이 *O*-phthaldialdehyde을 이용하여 유도체화하고 역상 column과 fluorometric 검출기를 장착한 HPLC로 분리 정량하였다. Cystathionine과 cysteine sulfinic acid 역시 *O*-phthaldialdehyde을 이용하여 유도체화하고 역상 column과

fluorometric 검출기를 장착한 HPLC로 분리 정량하였다. Gamma-glutamylcysteine은 monobromobimane을 이용하여 유도체화하고 역상 column과 fluorometric 검출기를 장착한 HPLC로 분리 정량하였다.

통계처리

실험군 사이의 통계적 차이는 ANOVA 후 Newman-Keuls test로 검사하였다. 모든 실험결과는 평균±표준오차로 표시하였다.

실험결과 및 고찰

24 또는 48시간 동안의 절식이 간에서 황함유 아미노산 및 이들의 대사체 함량에 미치는 영향을 실험하였다(Table I). 간에서 GSH와 SAM의 농도는 24시간의 절식에 의해 정상대조군에 비해 각각 60%와 76%로 감소하였으며 절식시간을 48시간으로 증가하였을 경우 더 이상의 감소는 발생하지 않았다. 반대로 SAM의 methylation 반응생성물인 SAH의 농도는 24시간 절식에 의해 24.5±1.8 nmol/g liver에서 32.6±1.6 nmol/g liver로 증가하였으며 절식시간을 48시간으로 연장할 경우 38.3±0.8 nmol/g liver로 더욱 크게 증가하였다. 결과적으로 methylation능을 반영하는 지표인 SAM/SAH의 비율은 절식에 의해 4.34에서 2.55와 1.97로 감소하였다. 이 결과는 SAM/SAH의 비율에 영향을 받지 않는 glycine methyltransferase를 제외한 대부분의 methylation 반응이 절식에 의해 억제됨을 시사한다.[10]

간에서 cysteine의 농도는 절식에 의해 유의적으로 증가하였으며 증가폭은 절식시간에 의존적이었다(Table I). 또한 cysteine의 비가역적인 대사체인 taurine의 농도 역시 48시간 절식에 의해 약 207%로 현격히 증가하였다. 이 결과는 반응성이 강한 sulfhydryl group을 가지고 있는 cysteine의 증가가 taurine의 합성 증가를 유발하였을 가능성을 시사한다. 반면 본 연구에서 측정된 모든 물질 중에서 methionine의 농도는 절식에 영향을 받지 않았다. 이 결과는 절식상태에서 필수 아미노산인 methionine의 농도를 유지하는 하기 위한 대사적 적응반응이 발생하였음을 시사한다.

황함유 아미노산 및 관련 대사체의 변화를 유발한 기전을 규명하기 위해 methionine의 transsulfuration 과정을 매개하는 효소의 활성을 측정하였다(Table II). Methionine 대사의 첫 단계를 촉매하여 SAM을 합성하는 MAT의 활성은 48시간 절식에 의해 유의적으로 증가하였다. 이 결과는 절식에 의해 MAT의 mRNA, 단백질 및 활성이 증가하나 MAT의 생성물인 SAM의 농도는 감소한다는 Sakata 등의[7] 결과와 일치한다. 현재의 연구결과로 MAT의 활성증가에도 불구하고 SAM의 농도가 감소한 기전은 불분명하다. 본 연구결과는 SAM이 CBS의 allosteric activator인 점을 고려할 때 SAM의 감소가 homocysteine으로부터 cystathionine의 합성을 억제하여 methionine의 농도 유지에 기여할 수 있음을 시사한다.[10]

CBS의 활성은 24시간과 48시간의 절식에 의해 각각 정상대조군의 65%와 55%로 감소하였다. 반면 homocysteine의 methylation을 촉매하여 methionine으로 전환시키는 BHMT의 활성은 절식에 의해 현격하게 증가하였으며 증가폭은 절식시간에 의존적이었다. 이 결과는 절식상태에서 methionine의 농도를 유지하기 위해 비가역적인 과정인 homocysteine에서 cystathionine

Table I – Effect of fasting on concentrations of hepatic sulfur-containing amino acids and their metabolites in rats

	Fed control	24-hour fasted group	48-hour fasted group
GSH (μmol/g)	6.70±0.16[a]	4.02±0.20[b]	4.06±0.07[b]
SAM (nmol/g)	108.1±3.8[a]	82.5±2.5[b]	75.7±1.8[b]
SAH (nmol/g)	25.4±1.8[a]	32.6±1.6[b]	38.3±0.8[c]
SAM/SAH (%)	434±27[a]	255±18[b]	197±2[b]
Cysteine (nmol/g)	106.2±4.1[a]	119.4±0.9[b]	139.0±2.7[c]
Taurine (μmol/g)	2.45±0.43[a]	2.92±0.67[a]	5.07±0.78[b]
Methionine (nmol/g)	64.2±1.5[a]	61.6±0.8[a]	67.5±2.4[a]

Rats were fasted for 24 or 48 hours. Each value represents the mean±S.E.M. for 4~6 rats. Values with different letters (a, b, c) are significantly different one from another (one-way ANOVA followed by Newman-Keuls multiple range test, $P<0.05$).

Table II – Effect of fasting on activities of hepatic enzymes involved in transsulfuration pathways

	Fed control	24-hour fasted group	48-hour fasted group
MAT (nmol/min/mg protein)	0.10±0.01[a]	0.13±0.01[a]	0.15±0.02[b]
CBS (nmol/min/mg protein)	17.2±1.3[a]	11.2±0.7[b]	9.4±1.3[b]
BHMT (nmol/min/mg protein)	2.5±0.2[a]	4.3±0.2[b]	6.2±0.4[c]
GCL (nmol/min/mg protein)	7.3±0.3[a]	6.9±0.4[a]	7.1±0.3[a]
CDO (nmol/min/mg protein)	0.56±0.12[a]	0.68±0.10[a]	1.12±0.13[b]

Rats were fasted for 24 or 48 hours. Each value represents the mean±S.E.M. for 4~6 rats. Values with different letters (a, b, c) are significantly different one from another (one-way ANOVA followed by Newman-Keuls multiple range test, $P<0.05$).

으로의 전환을 억제하고 methionine의 재 생산과정인 homocysteine의 methylation 반응이 활성화되었음을 보인다. 본 연구결과는 BHMT가 methionine의 농도를 유지에 중요한 역할을 수행한다는 Finkelsteine 등의[11] 연구결과를 지지한다.

간에서 GSH 합성의 속도결정단계를 촉매하는 GCL의 활성은 절식상태에서 영향을 받지 않았다. 이 결과는 절식상태에서 간의 GSH 농도는 감소한 반면 GCL의 발현에는 변화가 없다는 Lu 등의[5] 보고와 일치한다. 본 연구에서 GSH의 농도는 감소한 반면 제한 기질인 cysteine은 오히려 증가하였다. 이상의 연구결과는 절식 상태에서 GSH의 감소가 합성의 감소와는 무관함을 시사한다. 간에서 합성된 GSH의 대부분은 혈액을 통하여 유리되거나 일부는 담즙으로 분비된다.[5] 간에서 유리된 GSH는 다른 장기로 흡수되어 cysteine의 공급원 등으로 사용되며 필요에 따라 GSH로 재합성되거나 단백질 등의 합성에 사용된다.[12] 결과적으로 간은 GSH를 통하여 다른 장기에 필요한 cysteine을 공급한다. 따라서 절식상태에서 요구되는 cysteine의 공급을 위하여 간에서 GSH의 형태로 cysteine을 다른 장기로 수송하는 과정이 활성화될 가능성이 있다. 실제로 절식상태에서 증가하는 glucagon은 간에서 GSH의 배출을 증가시키는 것으로 보고되었다.[13]

Taurine 합성을 매개하는 CDO의 활성은 48시간 절식에 의해 정상대조군에 비하여 약 2배로 증가하였다. CDO의 활성은 cysteine의 농도에 의존적인 것으로 보고되었다.[2] 즉, cysteine의 증가는 CDO의 활성을 증가시키며 결과적으로 세포에서 cysteine의 축적을 억제하고 황함유 아미노산의 최종 배설체인 taurine의 합성을 촉진한다. 본 연구에서 cysteine의 농도는 절식에 의하여 증가하였으며 증가폭은 절식시간에 의존적이었다. 이 결과는 cysteine의 증가가 CDO의 발현을 조절한다는 Stipanuk의[2] 연구결과를 지지한다.

결 론

본 연구에서 절식은 황함유 아미노산 및 이들의 대사체 함량과 methionine의 transulfuration을 매개하는 효소의 활성에 현격한 변화를 유발하였다. 특징적으로 BHMT의 활성 증가와 CBS의 활성 감소는 homocysteine의 methylation 반응을 촉진하여 절식상태에서 methionine 함량의 유지에 기여하였다. 절식상태에서 GSH의 감소는 합성과 무관한 간에서의 배출증가 등 다른 기전을 통하여 유발되었으며 cysteine의 증가는 CDO의 유도를 통하여 taurine의 합성을 증가시킨 것으로 보인다. 절식상태에서 MAT의 활성은 증가하였음에도 불구하고 SAM의 농도는 감소하였다. 이 결과는 절식상태에서 SAM의 농도가 감소한 기전을 규명하기 위한 추가적인 연구가 필요함을 시사한다.

감사의 말씀

본 연구는 한국과학재단 형질전환복제돼지 ERC 프로그램(grant R11-2002-100-00000-0)의 지원을 받았음.

참고문헌

1) Mudd, S. H. and Poole, J. R. : Labile methyl balances for normal humans on various dietary regimens. *Metabolism* **24**, 721 (1975).
2) Stipanuk, M. H. : Sulfur amino acid metabolism: pathways for production and removal of homocysteine and cysteine. *Annu. Rev. Nutr.* **24**, 539 (2004).
3) Mato, J. M., Martínez-Chantar, M. L. and Lu, S. C. : Methionine metabolism and liver disease. *Annu. Rev. Nutr.* **28**, 273 (2008).
4) Mato, J. M. and Lu, S. C. : Role of S-adenosyl-L-methionine in liver health and injury. *Hepatology* **45**, 1306 (2007).
5) Lu, S. C. : Regulation of hepatic glutathione synthesis: current concepts and controversies. *FASEB J.* **13**, 1169 (1999).
6) McNulty, H., Pentieva, K., Hoey, L. and Ward, M. : Homocysteine, B-vitamins and CVD. *Proc. Nutr. Soc*. **67**, 232 (2008).
7) Sakata, S. F., Okumura, S., Matsuda, K., Horikawa, Y., Maeda, M., Kawasaki, K., Chou, J. Y. and Tamaki, N. : Effect of fasting on methionine adenosyltransferase expression and the methionine cycle in the mouse liver. *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)* **51**, 118 (2005).
8) Kim, S. K., Choi, K. H. and Kim, Y. C. : Effect of acute betaine administration on hepatic metabolism of S-amino acids in rats and mice. *Biochem. Pharmacol.* **65**, 1565 (2003).
9) Kim, S. K. and Kim, Y. C. : Effects of betaine supplementation on hepatic metabolism of sulfur-containing amino acids in mice. *J. Hepatol.* **42**, 907 (2005).
10) Finkelstein, J. D. : Metabolic regulatory properties of S-adenosylmethionine and S-adenosylhomocysteine. *Clin. Chem. Lab. Med.* **45**, 1694 (2007).
11) Finkelstein, J. D., Harris, B. J., Martin, J. J. and Kyle, W. E. : Regulation of hepatic betaine-homocysteine methyltransferase by dietary methionine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **108**, 344 (1982).
12) Ookhtens, M. and Kaplowitz, N. : Role of the liver in interorgan homeostasis of glutathione and cyst(e)ine. *Semin. Liver Dis*. **18**, 313 (1998).
13) Lu, S. C., Garcia-Ruiz, C., Kuhlenkamp, J., Ookhtens, M., Salas-Prato, M. and Kaplowitz, N. : Hormonal regulation of glutathione efflux. *J. Biol. Chem.* **265**, 16088 (1990).