

Lactate Dehydrogenase and Monocarboxylate Transporters 1, 2, and 4 in Tissues of *Micropterus salmoides*

Jung Joo Yum* and Jun Hee Yeon

Department of Life Science, Cheongju University, Cheongju 360-764, Korea

Received November 17, 2011 / Revised December 27, 2011 / Accepted December 29, 2011

The properties of lactate dehydrogenase (EC 1.1.1.27, LDH) and expression of monocarboxylate transporters (MCTs) 1, 2, and 4 were studied in tissues from *Micropterus salmoides*. Native-PAGE revealed that the LDH A₄ isozyme was predominantly located in skeletal muscle. The LDH A₄, A₂B₂, and B₄ isozymes were detected in heart, liver, eye, and brain tissues, while eye-specific C₄ isozyme was detected in eye tissue. In September, strong LDH B₄ isozyme activity was detected in heart tissue. High A₄ isozyme activity was noted in all other tissues except heart tissue. However, in November, strong A₄ isozyme activity was detected in heart tissue. The LDH/CS (Citrate synthase, EC 4.1.3.7) ratio in skeletal muscle and heart tissues indicated that anaerobic metabolism was high in those tissues. Native-PAGE after immunoprecipitation showed that eye-specific C₄ isozyme was more similar to the A₄ than the B₄ isozyme. The LDH A₄ isozyme was purified by affinity chromatography. The molecular weight of subunit A was 37,200. The LDH activity in tissues was consistently 11.05~28.32% due to inhibition by 10 mM pyruvate. The K_m^{PYR} of LDH in eye tissue was very low. The optimum pH for LDH in tissues was pH 7.5~8.0. The LDH A₄ isozyme was detected in mitochondria of skeletal muscle, whereas the B₄ and A₂B₂ isozymes were detected in heart tissue mitochondria. Western blot analysis indicated that MCTs 1, 2, and 4 were located in the plasma membrane and mitochondria of skeletal muscle and heart tissues. The sizes of MCTs 1, 2, and 4 in skeletal muscle were 60, 54~38, and 63 kDa, while those in heart tissue were 57, 54~38, and 55.5 kDa, respectively. In conclusion, *M. salmoides* appears to use anaerobic metabolism predominantly when adapted to a hypoxic environment. In highly activated skeletal muscle and heart tissue, energy production is controlled by inward and outward flows of pyruvate and lactate through MCTs 1, 2, and 4 in the plasma membrane and mitochondria, with effective adjustment by LDH isozymes.

Key words : Largemouth bass (*Micropterus salmoides*), lactate dehydrogenase (LDH), K_m , monocarboxylate transporters (MCT) 1, 2, 4

서 론

어류는 수생환경의 환경조건에 따라 변화되는 산소농도에 직면하므로[43] 저산소와 다양한 조건에 견디기 위한 생리학적 전략이 진화되어있다[51]. 그러므로 저산소 조건에서 ATP를 보유하기 위해 대사를 감소시키거나[31] 혐기적 대사를 활성화하여 젖산탈수소효소(lactate dehydrogenase, EC 1.1.1.27, LDH)를 변화시켰다[3]. 그러나 대사가 감소되지 않을 경우 환경에서 산소를 최대한 얻기 위해 호기적 효소를 증가시켰다[28]. LDH 동위효소는 젖산과 피루브산의 상호 전환을 촉매하며 환경에 대한 조직의 대사적 요구에 따라 발현되는 정도가 다르고[1], 저산소에 노출되는 정도에 따라 LDH 동위효소의 양이 다르므로 LDH를 종의 적응 정도를 나타내는 표지자라 하였고, 이러한 효소의 가소성으로 인해 먹이와 생식 장소를 찾는 동안 환경의 낮은 산소에도 적응하는 것이라

고 보고하였다[1]. 또한 저산소 조건에서 어류의 대사에 관여하는 LDH 및 시트르산 합성효소(citrate synthase, EC 4.1.3.7, CS) 유전자와 함께 monocarboxylate 수송체(MCT)가 조직 특이적으로 전사 조절되므로 MCTs가 중요한 역할을 한다고 보고하였다[42].

Zebrafish 경우 저산소 조건에서 심장조직에서만 산화적 대사의 지표인 CS가 증가되어 호기적 유전자의 전사가 조절된다[28]. 또한 저산소에 단기간 적응시 골격근의 mRNA는 변화되지 않지만 뇌조직은 MCT 4와 LDH A mRNA가 증가하여 해당과정이 우세하였고, 심장조직은 MCT 1, 4 및 LDH A mRNA가 증가되고 CS mRNA도 조금 증가되어 젖산의 유입과 유출이 모두 일어난다고 보고되었지만[42], 저산소에 적응된 어류에서 MCTs의 역할은 불확실하다. 그리고 사람의 경우 강도 높은 저산소 운동시 골격근에서 CS mRNA가 증가되었고[67], 모래무지에서 급격하게 용존산소를 증가시킨 경우 골격근에서 LDH A₄가 증가되거나 심장조직에서 LDH B₄가 증가되었다[16]. 이와 같은 연구들은 *Ldh-A, B, C*에 의해 만들어지는 LDH 동위효소 중 LDH A는 혐기적 대사가 요구되는 골격

*Corresponding author

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

E-mail : jjyum@cju.ac.kr

근에서, LDH B는 호기적 대사가 요구되는 심장조직에서 우세하게 발현된다는 보고[22]를 바탕으로 고찰할 때 연구 대상이 되고 있다. LDH C는 포유류의 정소와 특정어류의 눈 또는 간조직에서 발현되므로, testis-specific C₄의 경우 정자형성과정[30,40], 난모세포[19] 및 종양세포에서 발현되며[53] LDH C가 ATP 항상성에 관련되어진다고 보도되었다[46]. 또한 liver-specific C₄는 잉어목 어류의 간조직에서만 발현되고 폐육 시슴에서 NADH/NAD⁺ 비율을 조절하며 지방대사에 관여하는 것으로 보고되었다[51]. 그리고 eye-specific C₄의 경우 농어목 어류의 눈과 뇌조직에서 주로 발현되고 기질에 대한 친화력이 A₄보다 빠른 것으로 확인되어[48] 생태환경, 먹이종류 및 행동양상에 따라 다른 것으로 보이지만 LDH C가 특정 종의 특정 조직에서만 발현되어 기능을 하는지에 대해서는 아직 확실하지 않다.

그리고 LDH의 기질인 젖산은 근육 운동시 생성되어 피로를 유발하고 간에서 포도당으로 재합성된다고 알려졌으나[11] 최근 들어 골격근 또는 심장조직에서 MCT에 의해 미토콘드리아로 수송되어 산화적 에너지 생성에 관여한다는 lactate shuttle로 설명되었다[9]. MCT는 젖산, 피루브산 등의 monocarboxylate를 수송하는 단백질로 Garcia 등(1994)에 의해 발견되어 14종류가 포유류에서 주로 보고되었으며, MCT 1, 2, 3, 4가 주로 연구되고 있다[24]. MCT 1은 산화조직에서 주로 발현되어 호기적 대사에서 연료로 사용하기 위해 세포 안에서 발생하는 젖산/피루브산을 미토콘드리아로 이동시켜 TCA 회로에서 산화시키고, MCT 4는 백색근 같은 혐기적조직에서 주로 발현되어 세포 내에서 생성되는 젖산을 세포 밖으로 배출하여 근육 세포 내의 pH를 조절하는 것으로 알려졌으나 근육 종류에 따라 분포가 다른 양상을 나타냈다[6,33]. 특히 흰쥐, 사람 및 햄스터 등의 포유류에서 MCT에 관한 연구가 주로 이루어졌고[6], 젖산이 MCT에 의해 신경원세포로 전달되어 장기기억에서 중요한 역할을 하며[58], 호기적 대사를 하는 중앙세포의 산화적 대사 연료로 사용되는 우세한 기질로 보고되었다[27,36]. 또한 피루브산도 뇌를 안정시키는 항산화제로서의 역할을 한다고 보고되어[61] 대부분의 연구가 포유류에서 이루어지고 있다. 어류에서도 대사기능을 조정하는 데 젖산의 이동이 중요하고 수송체에 의해 이루어진다고 제시되었고[62] 저산소 중에 다른 대사 유전자와 함께 조직에 특이적으로 MCTs를 이용한다고 보고되었으나[42] 어류의 경우 젖산대사와 관련된 LDH와 MCTs를 연관지어 고찰한 연구는 이루어져 있지 않다.

따라서 LDH 동위효소의 특성을 확인하고 LDH와 MCT 1, 2, 4를 연관하여 연구하고자 하였다. 환경에 적응하는 생리학적 전략이 발달되어 있는 어류 중 활동성이 크고 특히 공격력이 강한 열대산 광온성 외래어종인 농어목 큰입우럭 (*Micropterus salmoides*)을 선택하여 조직의 LDH 동위효소 및

LDH/CS로 대사를 고찰하고, 골격근과 심장조직에서 MCT 1, 2, 4의 발현을 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

실험 재료 및 조직 추출액의 준비

경골어류 농어목 검정우럭과 큰입우럭 (*Micropterus salmoides*, 30~40cm)은 9월 20일(I)에 충북 진천군 백곡저수지에서, 11월 20일(II)에 충북 보은군 대청호에서 채집한 후 얼음에 채워 운반하였다. 골격근, 심장, 간, 눈 및 뇌조직의 혈액을 충분히 제거한 다음 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 6.85, 4°C)를 3배(v/w) 가하여 4°C에서 glass homogenizer로 파쇄하였다. 조직 파쇄액은 4°C, 20,000× g에서 1시간씩 2회 원심분리(Mega 21R, Hanil) 하였으며, 상등액을 시료로 사용하였다.

Lactate dehydrogenase와 citrate synthase의 활성 측정 및 단백질 정량

LDH의 활성은 1.50 mM 피루브산과 0.14 mM NADH를 포함한 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 6.85) 3 ml에 시료를 가한 다음 NADH로 부터 NAD⁺로 산화되는 정도를 분광광도계(UV-160A, Shimadzu)를 사용하여 25°C, 340 nm에서 측정하였다[63]. CS의 활성은 0.2 mM acetyl-CoA, 0.1 mM DTNB[5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)], 0.5 mM oxaloacetic acid를 포함한 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 7.5) 3 ml에 시료를 가한 후, DTNB가 전환되는 정도를 분광광도계로 25°C, 412 nm에서 측정하였다[60]. 활성의 단위(unit)는 1분 동안 기질 1 μM을 전환시키는 효소의 양으로 LDH는 millimolar extinction coefficient 6.22, CS는 millimolar extinction coefficient 13.6을 사용하여 계산하였고, LDH/CS로 대사 정도를 확인하였다. 단백질은 BSA를 표준단백질로 사용하여 분광광도계로 595 nm에서 Bradford의 방법에 따라 정량하였고[8], LDH의 비활성(units/mg)을 구하였다.

원형질막과 미토콘드리아 분리 및 LDH 추출

원형질막은 House 등의 방법[32]을 변형하여 분리하였다. 골격근, 심장, 간, 눈 및 뇌조직을 적출하여 혈액을 제거한 후 0.25 M sucrose를 함유한 50 mM potassium phosphate buffer (pH 6.85)를 3배(v/w) 가하고 Dounce homogenizer로 조심스럽게 파쇄하였다. 조직파쇄액은 4°C, 270× g에서 7분간 원심분리하였고, 상등액을 동일 조건에서 다시 원심분리하였다. 상등액을 1,500× g에서 10분간 원심분리하였으며, 침전물을 40 ml buffer에 녹이고 105,000× g에서 1시간 원심분리하여 원형질막 침전물을 얻었다. 원형질막의 분리 정도는 5'-nucleotidase (5'-nucleotide phosphohydrolase, EC 3.1.3.5)의 활성을 측정하여 확인하였다. 미토콘드리아 분리는 Cho의 방법[15]을 변형

하여 실시하였다. 원형질막을 분리하는 과정 중에 1,500× g에서 원심분리한 상등액을 10,000× g에서 1시간 동안 원심분리한 후 미토콘드리아 침전물을 얻었고, 상등액은 세포기질 LDH로 사용하였다. 미토콘드리아 분리 정도는 monoamine oxidase의 활성을 측정하여 확인하였으며, 분리된 미토콘드리아를 30초 간격으로 3분간 초음파로 파쇄한 후 LDH 활성 및 native-PAGE로 미토콘드리아 내 LDH 동위효소를 확인하였다.

5-nucleotidase의 활성은 Chen 등의 방법을 이용하여 측정하였다[12]. 10 mM AMP, 10 mM MgCl₂를 함유한 100 mM Tris-HCl buffer (pH 8.5) 0.3 ml에 시료를 37°C에서 20분간 방치시킨 후 반응을 멈추기 위해 0.42% ammonium molybdate를 함유한 1 N H₂SO₄ 0.7 ml를 넣어주고 45°C에서 20분간 방치시킨 다음 분광광도계로 820 nm에서 흡광도를 측정하였다. 활성의 단위는 1분 동안 1 μmole AMP를 분해하는 효소의 양이다.

Monoamine oxidase 활성은 Tabor 등의 방법[59]을 변형하여 측정하였다. 2.5 mM benzylamine을 함유하는 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.2) 3 ml에 시료를 가한 후 benzylamine이 감소되는 정도를 분광광도계로 37°C, 250 nm에서 측정하였다. 활성의 단위는 1분 동안 1 μmole benzylamine을 분해하는 효소의 양으로 millimolar extinction coefficient 13.8을 사용하여 계산하였다.

Native-polyacrylamide gel 전기영동(native-PAGE) 및 SDS-polyacrylamide gel 전기영동(SDS-PAGE)

Native-PAGE는 Davis의 방법에 따라 polyacrylamide vertical slab system (SE 250, Hoefer)으로 4°C에서 7.5% acrylamide separation gel 및 2.67% acrylamide stacking gel로 이루어졌다[21]. 시료에 sucrose와 bromophenol blue 용액을 1:1(v/v)로 섞어 가한 후 5 mM Tris-glycine buffer (pH 8.3)를 사용하여 100 V에서 20분간, 200 V에서 130분간 전기영동 하였다. LDH는 DL-lactate, NBT, PMS 및 NAD⁺를 혼합한 용액으로 37°C에서 염색한 후, 15% 초산용액으로 고정하였다[63].

SDS-PAGE는 Laemmli의 방법에 따라 10%T, 2.67%C acrylamide separation gel과 5%T, 2.67%C acrylamide stacking gel이 되도록 slab gel을 만들었다[36]. 시료는 sample buffer (25% Glycerol, 2% SDS, 5% 2-mercaptoethanol 및 0.1% bromophenol blue를 함유하는 0.0625 M Tris-HCl buffer, pH 6.8)와 1:4(v/v)로 섞어 100°C에서 5분간 가열한 후 well에 가하고 running buffer (0.1% sodium dodecyl sulfate와 0.192 M glycine을 함유하는 0.025 M Tris-HCl, pH 8.3)을 사용하여 200 V에서 1시간 전기영동하였다. 전기영동 후 gel은 0.1% coomassie brilliant blue R-250을 45% methanol과 10% acetic acid로 녹인 용액에 넣어 25°C에서 15분간 단백질을 염색하였고, 10% methanol과 10% acetic acid 혼합 용액으로 충분히 탈색시킨 후 확인하였다.

면역 침강반응

골격근, 심장 및 눈조직 추출물에 꺾지(*Coreoperca herzi*) LDH A₄(anti-LDH A₄), 소(*Bos taurus*) LDH B₄ (anti-LDH B₄) 및 조피볼락(*Sebastes schlegelii*) LDH eye-specific C₄ (anti-LDH C₄)에 대한 항체를 각각 1:0.5, 1:5, 1:0.5(v/v)로 가하고 25°C에서 1시간, 4°C에서 12시간 방치시킨 다음 4°C, 20,000× g에서 1시간 동안 원심분리 한 후 상등액을 전기영동하여 항원-항체 복합체를 이루지 않은 LDH 동위효소를 확인하였다.

Lactate dehydrogenase 및 monocarboxylate transporter의 Western blotting

조직 추출액을 native-PAGE 한 후 LDH를 확인하기 위해 Western blotting을 하였고, 1차 항체는 anti-LDH A₄ (1:1000), anti-LDH B₄ (1:200) 및 anti-LDH eye-specific C₄ (1:1,000)를 사용하였다. 그리고 골격근과 심장조직으로부터 분리한 원형질막과 미토콘드리아 분획 단백질을 SDS-PAGE한 후 MCT를 확인하기 위해 Western blotting하였고, MCT 1에 대한 항혈청(anti-MCT 1, 1:200), MCT 2에 대한 항혈청(anti-MCT 2, 1:200) 및 MCT 4에 대한 항혈청(anti-MCT 4, 1:200)을 사용하였다. 모든 1차 항체는 본 연구실에서 제작한 것을 사용하였다 [17,48,65]. Western blotting을 하기위해 native-PAGE와 SDS-PAGE후 gel은 semi-dry transfer (Trans-blot SD, Bio-Rad)에서 0.015 M Tris-glycine buffer (pH 8.3)를 사용하여 25 V에서 30분간 nitrocellulose 막에 전이시켰다. 막을 5% skim milk/TBS (0.01 M Tris buffered saline, pH 7.5) 용액에 넣고 25°C에서 1시간 반응 시킨 후 TBS용액으로 10분간 3회 세척하였다. 1% Skim milk/TBS를 사용하여 희석시킨 1차 항체 용액에 막을 넣고 25°C에서 1시간 반응시킨 후 TBS 용액으로 10분간 2회 세척하였다. 1% Skim milk/TBS를 사용하여 희석시킨 2차 항체(anti-rabbit IgG, 1:500~1:1000) 용액에서 1시간 반응시키고 TBS 용액으로 10분간 3회 세척하였다. 전개 용액(chloronaphtol, methanol, TBS, 30% H₂O₂)으로 반응시키고 증류수로 세척 후 밴드를 확인하였다.

Affinity chromatography에 의한 LDH A₄ 동위효소의 정제

Oxamate-linked Sepharose gel은 O'Carra의 방법[44,45]을 변형하여 준비하였고[34] affinity column (25×85 mm)은 0.5 M KCl을 함유한 0.05 M potassium phosphate buffer (pH 6.85, 이하 buffer)로 평형시켰다. Column에 0.2 mM NADH를 함유한 buffer 60 ml를 유입시키고, 0.5 M KCl과 0.2 mM NADH를 첨가한 골격근 조직액 10 ml, 0.2 mM NADH를 함유한 buffer 100 ml, 1.6 mM NAD⁺를 함유한 buffer 80 ml 및 buffer 100 ml를 차례로 유입시키며, 0.4 ml/min 속도로 용출액을 1.6 ml씩 분획하여 chromatography (Econo System, Bio-Rad)를 실시하였다. LDH 동위효소의 활성을 측정하고, 단백질을 정량하여 정제 그래프를 그렸다. LDH 활성이 확인

된 분획은 native-PAGE하였고, LDH A₄ 동위효소가 정제된 분획은 Amicon PM-10 막으로 농축하여 사용하였다.

LDH의 피루브산에 대한 기질의존성 측정 및 최적 pH

조직추출액의 LDH 활성은 피루브산 0.01~10 mM에서 측정되었으며, 최대 활성을 기준으로 저해되는 정도(%)를 확인하였고, Lineweaver-Burk plot에 의해 K_m^{PYR}을 구하였다. 그리고 조직액을 4°C, 0.1 M sodium acetate buffer (pH 4.0, 4.5, 5.0), 0.1 M sodium citrate buffer (pH 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), 0.1 M Tris-glycine buffer (pH 9.0) 및 0.1 M sodium carbonate buffer (pH 9.5, 10.0, 10.5)에 12시간 반응시킨 후 LDH 활성을 측정하여 최적 pH를 확인하였다.

결과 및 고찰

Native-PAGE, 면역침강반응 및 Western blotting에 의한 LDH 동위효소의 확인

큰입우럭 I(9월)의 골격근, 심장 및 눈조직을 Western blotting하여 A₄, B₄ 및 eye-specific C₄ 동위효소를 확인하였고(Fig. 1a), 면역 침강 후 native-PAGE를 실시하여 LDH 동위효소를

확인하고 동위효소의 진화 정도를 확인하였다(Fig. 1b). 골격근과 눈조직에 anti-A₄를 반응시킨 경우, A₄와 A₂B₂ 동위효소가 없었고, A₄에서 양극 쪽으로 두 번째 밴드 A₃C가 없어졌으며, B₄와 양극 쪽의 C₄ 동위효소 및 이질사량체인 B₃C, B₂C₂ 및 BC₃가 나타났다. 심장 및 눈조직에 anti-B₄를 가한 경우 심장조직에서 A₄만 확인되었으므로 심장조직의 양극 쪽의 없어진 밴드가 B₃C로 확인되었고, 눈조직 경우 B₄ 동위효소는 없었고 A₄, A₂B₂, C₄ 및 양극 쪽에 A₂C₂, BC₃, AC₃를 볼 수 있었다. 이 세 밴드는 Western blotting 결과 anti-C₄와의 반응에서도 확인되었다. 그리고 눈조직에 anti-LDH eye-specific C₄를 가한 경우 B₄만 약하게 남았으므로 eye-specific C₄가 B₄보다 A₄에 더 유사한 것으로 확인되었다(Fig. 1b). 9월에 채집한 큰입우럭 I와 11월에 채집한 큰입우럭 II 조직의 LDH를 각각 native-PAGE한 결과(Fig. 2a,b) 큰입우럭 I의 골격근은 A₄ 동위효소만 강하게 나타났으나 II의 경우 A₄가 강하고 A₂B₂ 및 B₄도 확인되었다. I에서 심장조직은 A₂B₂, B₄ 및 B₃C가 나타나고 A₄는 흐리게 나타났지만, II에서 A₄ 동위효소의 활성이 강하게 확인되었다. 간조직은 I의 경우 A₄ 활성이 강하고 A₂B₂, B₄가 확인되나 II의 경우 A₄ 동위효소의 활성이 약해졌다. I에서 눈조직은 A₄와 C₄동위효소가 강하고 A₂B₂, B₄, AC 및 BC 이질사량체의 활성이 나타났으며 뇌조직에도 B₂C₂가 뚜렷이 나타났다. 눈과 뇌조직의 경우 I에서 A₄ 동위효소가 강하게 확인되었

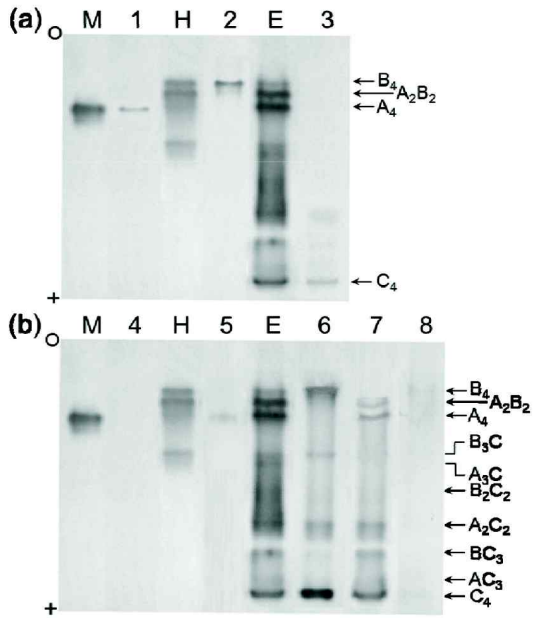


Fig. 1. The Western blot analysis (a) and immunoprecipitation (b) of LDH isozymes in tissues of *M. salmoides* using *Coreoperca herzi* LDH A₄ antiserum (anti-A₄), *Bos taurus* LDH B₄ antiserum (anti-B₄) and *Sebastes schlegeli* LDH eye-specific C₄ antiserum (anti-C₄). (a) M, skeletal muscle; 1, M+anti-A₄; H, heart; 2, H+anti-B₄; E, eye; 3, E+anti-C₄. (b) M, skeletal muscle; 4, M+anti-A₄(1:0.5); H, Heart; 5, H+anti-B₄(1:5); E, eye; 6, E+anti-A₄(1:0.5); 7, E+anti-B₄(1:4); 8, E+anti-C₄(1:0.5).

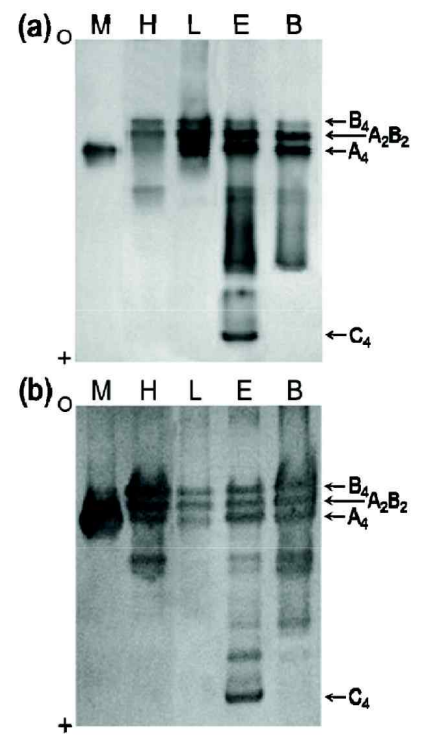


Fig. 2. Native-polyacrylamide gel electrophoresis zymograms of LDH isozymes in tissues from *M. salmoides*. (a) September, (b) November. M, skeletal muscle; H, heart; L, liver; E, eye; B, brain

고 II에서는 B₄가 증가되는 양상을 보였다. 따라서 모든 조직에서 A₃B와 AB₃가 확인되지 않았고, 9월에 온도가 높고 용존산소가 낮으므로 골격근, 간, 눈 및 뇌조직에서는 A₄가 강하고, 심장조직에서는 B₄가 강하고 A₄는 흐렸으나, II의 심장조직에서는 A₄ 동위효소가 뚜렷이 나타났다. 따라서 산소농도가 낮은 경우 모든 조직에서 LDH A₄가 증가될 것이라는 생각과 달리 심장조직에서는 B₄가 증가되었다. Zebrafish 경우 저산소 조건에서 심장조직의 LDH B mRNA가 증가되었고[42], 저산소 농도에 적응된 *Cichlasoma amazonarum*의 경우 골격근에서 A₄, 심장조직에서 B₄만 나타나고, 뇌조직에는 LDH-C가 우세하여 눈과 뇌조직에서 C hybrid가 확인되었으며 심장조직의 LDH 분포가 환경의 산소 유효도에 따라 다양하게 나타났으므로 이러한 가소성으로 인해 먹이와 생식 장소를 찾는 동안 환경의 낮은 산소농도에 적응한 것이라는 보고[1]와 유사하였다. 또한 쏘가리 심장조직에서 B₄ 활성이 강하고 A₂B₂가 흐리게 나타났지만 A₄는 확인되지 않았고, 뇌조직은 A₄와 A₂B₂는 강하고, B₄는 약하게 나타나[14] 큰입우럭 I과 유사하였다. 또한 가물치는 A₄, A₃B, A₂B₂, AB₃ 및 B₄ 등 5개 동위효소가 조직에서 모두 확인되었으므로 eye-specific C₄ 동위효소가 확인된 종들도 생태조건이나 행동양식에 따라 LDH 동위효소의 발현 양상이 다르게 나타났[48]. 저서성 어류에서 A₄와 B₄만 나타나고 이질사량체 동위효소가 나타나지 않았으며 A₄와 B₄ 동위효소의 이동거리도 가까이 분리되고 기능이 유사하게 진화되었다는 보고[18,66]와 비교하면 큰입우럭의 경우 이질사량체가 확인되지 않은 것은 유사하여 저산소에 적응된 것으로 보이지만 A₄와 B₄의 이동거리가 차이를 보이므로 완전히 저서생활을 하는 것은 아닌 것으로 생각된다.

LDH와 CS 의 활성 및 단백질 정량

LDH 활성을 측정 한 결과 골격근 418.00, 심장 98.39, 간 3.90, 눈 11.70 및 뇌조직 16.72 units였다(Table 1). 골격근의 LDH 활성은 풀망둑 65.30 units 보다 월등히 높고 가물치 380.4, 쏘가리 358.83 units 보다도 높은 활성을 나타냈다. 심장 조직의 LDH 활성도 풀망둑 21.89, 가물치 13.4 units보다 월등히 높았다. 눈조직의 LDH 활성은 *Ldh-C*가 발현되는 종들과 비교하면 풀망둑 53.25 units보다 낮고, 가물치 3.5 units, 쏘가리 5.44 units에 비해 조금 높으므로 골격근의 LDH 활성이 높은 종에서 눈조직의 LDH 활성이 낮았다. 간조직의 LDH

활성은 *Ldh-C*가 발현된 모래무지 44.18 units보다 월등히 낮았다. 뇌조직은 풀망둑 28.79 units보다 낮았으나 가물치 5.4 units보다는 높게 나타나 가물치보다 혐기적 대사를 하는 것으로 확인되었다[14,47,66]. 큰입우럭의 골격근, 심장 및 눈조직의 LDH 활성이 가물치, 쏘가리보다 높게 나타났으므로 큰입우럭이 저산소 환경에 대한 적응력이 크고, 눈조직 LDH 활성으로 볼 때 먹이 탐색과 추적시 LDH C₄에 의한 에너지를 사용하고, 유영생활에는 골격근의 LDH A₄를 사용하며, 심장 조직의 LDH 활성이 높아 젖산이 에너지 공급에 기여하는 것으로 보인다.

CS활성은 골격근 0.68, 심장 1.94, 간 0.62, 눈 0.32 및 뇌조직 0.88 units이므로(Table 1) 심장조직에서만 나타나고 나머지 조직에서는 아주 낮게 확인되었다. 가물치 조직의 CS 활성은 골격근 2.2, 심장 2.07, 뇌 11.6 및 눈조직 10.9 units, 풀망둑 3.93, 심장 3.66 및 눈조직 8.35 units와 비교해[47,66] 모두 낮았으므로 호기적 대사 정도가 낮은 것으로 확인되었다. LDH/CS는 골격근 614.71, 심장 50.72, 간 6.29, 눈 36.56 및 뇌조직 19.00이었다(Table 1). 가물치 골격근 172.9보다 높아 혐기적 대사 비율이 특히 높았고, 가물치 심장조직 0.6과 뇌조직 0.47보다 높아 혐기적 대사를 하는 것으로 보인다[47]. 또한 Perciformes *Satanoperca aff. juirupari* 골격근과 심장조직의 LDH/CS 173.36과 6.1이고, CS활성은 1.3과 9.4 units로 심장조직이 단기간의 저산소에 직면하여 혐기적 대사를 한다는 보고 [13]와 비교해 큰입우럭의 골격근과 심장조직이 혐기적 대사 비율이 훨씬 높은 것으로 확인되었다.

단백질량은 골격근 48.77, 심장 28.40, 간 41.25, 눈 26.95 및 뇌조직 36.44 mg/g으로 측정되었다(Table 1). 골격근의 경우 쏘가리 31.30와 가물치 14.70 mg/g보다 높았다[14,47]. 따라서 다른 종에 비해 골격근의 LDH 활성이 높지만 단백질량도 많아 LDH 비활성이 8.57이므로, 가물치 25.88와 쏘가리 11.46 units/mg에 비해 낮게 나타났다[14,47]. 그러나 잉어 골격근 2.65 과 송어 골격근 3.95 units/mg에 비해서 높았다[60]. 큰입우럭의 크기가 증가할수록 골격근의 CS 활성은 감소하고 피루브산 키네이스(PK)는 증가하여 PK/CS가 증가되었다는 보고[20]와 일치하였다. 또한 큰입우럭II의 LDH활성은 골격근 109.32, 심장 13.54, 간 1.22, 눈 3.05 및 뇌조직 10.61 units (Table 2)로 큰입우럭I에 비해 심장조직의 LDH 활성이 -86%로 가장 많이 감소하였고 골격근과 눈조직이 -74%, 간조직이 -69%, 뇌

Table 1. LDH activity, CS activity, protein concentration and mitochondrial LDH activity in various tissues from *M. salmoides* I

Tissue	LDH activity (units/g)	CS activity (units/g)	Protein (mg/g)	LDH/CS	Specific activity	
					LDH units/mg	CS units/mg
Skeletal muscle	418.00	0.68	48.77	614.71	8.57	0.014
Heart	98.39	1.94	28.40	50.72	3.46	0.068
Liver	3.90	0.62	41.25	6.29	0.09	0.015
Eye	11.70	0.32	26.95	36.56	0.43	0.012
Brain	16.72	0.88	36.44	19.00	0.46	0.024

Table 2. LDH activity and protein concentration of various tissues in *M. salmoides* II

Tissue	LDH activity (units/g)	Protein (mg/g)	Specific activity (units/mg)
Skeletal muscle	109.32	45.12	2.42
Heart	13.54	27.40	0.49
Liver	1.22	37.68	0.03
Eye	3.05	24.88	0.12
Brain	10.61	34.96	0.30

Table 3. Apparent Michaelis-Menten constant values for LDH from *M. salmoides* I

Tissue	K_m^{PYR} (mM pyruvate)
Skeletal muscle	0.229
Heart	0.215
Liver	0.122
Eye	0.07
Brain	0.166

조직이 -36%로 가장 적게 감소하였다. 그러나 단백질량은 4~9% 감소하였으므로 비활성이 -35~86% 감소하였다. 온도가 낮아지면 활성성이 떨어지고 혐기적 대사가 크게 감소하나 단백질 양은 적게 감소하는 것으로 나타났으므로 활성성과 혐기적 대사가 직접적으로 관련되는 것으로 확인되었다.

Affinity chromatography에 의한 LDH A₄ 동위효소의 정제

LDH 동위효소들은 oxamate-linked Sepharose gel로 affinity chromatography를 실시할 경우 역학적 특성에 의해 NAD⁺ 및 피루브산과 abortive ternary complex를 형성하는 정도에 차이가 생기므로 동위효소에 따라 gel에 대한 결합력이 서로 다르다. 따라서 고등한 척추동물의 LDH A₄ 동위효소는 NAD⁺를 함유한 buffer (0.5 M KCl을 함유한 0.05 M potassium phosphate buffer, pH 6.85, 이하 buffer)를 유입시 용출되고 B₄ 동위효소는 평형 buffer 유입 시 용출된다[44,45]. 본 실험에서 0.5 M KCl과 NADH를 함유한 큰입우럭 골격근 추출액 10 ml를 가하고 0.2 mM NADH를 함유한 buffer를 유입시키면 LDH를 제외한 단백질이 모두 용출되고 NAD⁺ 유입 후 33번째 분획에서 LDH A₄ 동위효소들이 용출되기 시작해서 108~123번째 분획에서 용출되었다. 각 분획의 LDH 활성과 단백질 정량을 실시하여 elution profile를 작성하였으며(Fig. 3) 수득률은 60.36%였다. 큰입우럭 LDH A₄ 동위효소는 NAD⁺ 유입 후 52.8~76.8 ml에서 용출되나 고등어 A₄ 동위효소는 NAD⁺ 유입 후 40~56 ml[49], 풀망둑 A₄ 동위효소는 NAD⁺ 유입 후 54~96 ml[66], 꺾지 A₄ 동위효소는 NAD⁺ 유입 후 68~120 ml[17]에서 용출되었다. Affinity chromatography 상에서 LDH 동위효소의 용출 양상은 종특이성, 조직특이성[15]

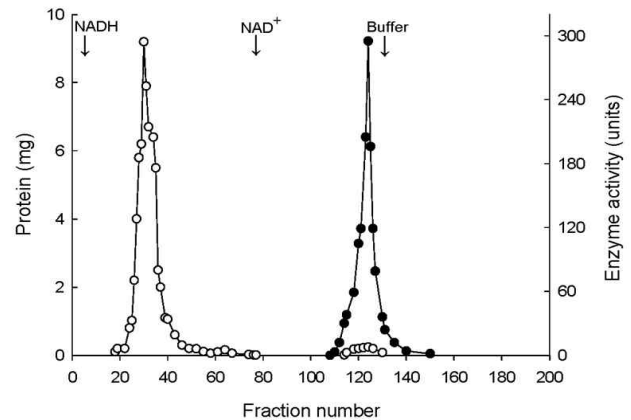


Fig. 3. Affinity chromatography of LDH isozymes in *M. salmoides* skeletal muscle on the Sepharose-linked oxamate gel (25×85 mm). Fractions of 1.6 ml were collected at a flow rate 0.4 ml/min and chromatography was performed at 4°C. LDH A₄ isozyme was found to be in the fraction numbers 108~148. ○, protein concentration; ●, enzyme activity.

을 나타내며 이러한 동위효소의 차이는 기질에 의해 억제되는 정도의 차이로 인해 생기는 것이므로 LDH 동위효소들 간의 분자구조를 비교할 수 있어 동위효소들의 진화적 유연관계를 고찰할 수 있다[34]. 따라서 큰입우럭 LDH는 고등어보다 진화 정도가 느리고 풀망둑과 유사하며 꺾지보다는 진화 정도가 빠른 것으로 확인되었다. LDH A₄ 동위효소를 SDS-PAGE한 결과 정제된 것으로 확인되었고, 하부단위체 A는 37.2 kDa로 확인되었으므로(Fig. 4) 쟁쟁어 LDH 하부단위체 A 38 kDa와 유사하였고[39], 쏘가리 하부단위체 A 35 kDa [14]과는 조금 차이가 나타나 LDH 하부단위체들의 분자량이 종에 따라 조금 차이가 있는 것으로 사료된다.

조직 LDH의 피루브산에 대한 저해

LDH 동위효소들은 역학적 특성의 차이에 의하여 피루브산에 의한 저해 정도가 다르게 나타나며 산소 유효성과 관련된 대사 체제를 조절하는데 중요하고 LDH 동위효소의 생리학적 역할이 다르다[54,56]. 또한 서식온도도 LDH의 K_m^{PYR} 에 영향을 미치는 것으로 나타났다[3]. 큰입우럭 조직의 LDH는 피루브산 10 mM에서 골격근 28.32, 심장 25, 간 11.05는 24.31 및 뇌조직 21.62%의 활성이 남았고, 정제된 LDH A₄ 동위효소는 24%의 활성이 남았으므로(Fig. 5) 저해정도가 거의 유사하였으며 간조직에서 가장 컸다. LDH가 최대 활성을 나타내는 피루브산의 농도는 골격근이 0.5 mM, 심장과 간조직이 0.4 mM, 눈 및 뇌조직이 0.3 mM였으며 저농도에서 골격근의 활성이 낮고 서서히 증가되다 0.1 mM~0.5 mM까지 급격히 증가되었다(Fig. 5). *Scombo japonicus* LDH A₄ 95%[63], *Pseudophycis barbata* LDH A₄ 87%[5], *Bos taurus* LDH B₄ 20%[17]와 같이

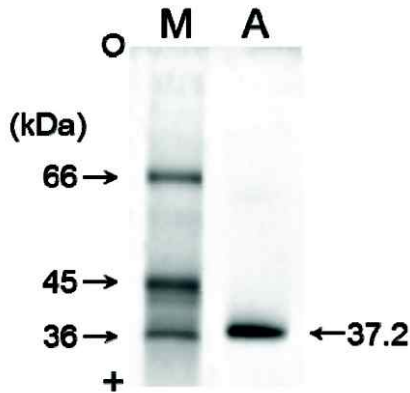


Fig. 4. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of purified LDH A₄ isozyme in *M. salmoides*. M, marker; A, purified LDH A₄ isozyme.

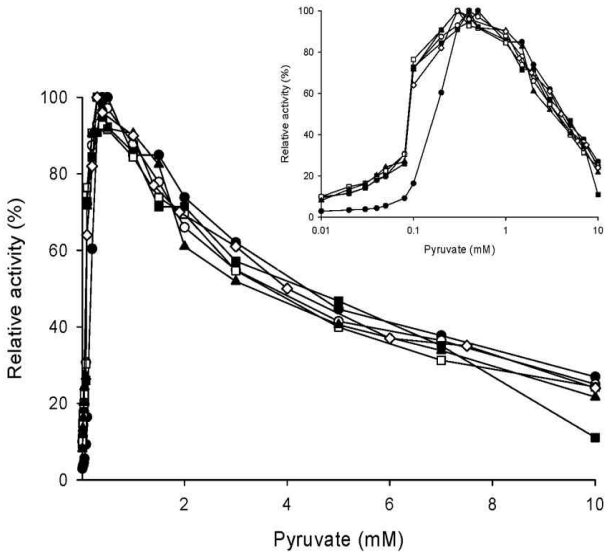


Fig. 5. Effect of pyruvate concentrations on the activity of LDH in tissues and LDH A₄ isozyme from *M. salmoides*. ●, skeletal muscle; ○, heart; ■, liver; □, eye; ▲, brain; ◇, purified LDH A₄

LDH A₄ 동위효소는 고농도의 피루브산에 의해 약간 저해되지만 B₄ 동위효소는 저농도의 피루브산에서도 크게 저해된다는 보고[63]와 비교해 큰입우럭 조직 LDH의 저해 정도는 높게 나타나 차이를 보였다. 또한 Perciformes *Satanoperca aff. juir-*

upari 골격근과 심장조직의 LDH가 피루브산 1 mM과 10 mM에서 저해되지 않는다는 보고[13]와도 다른 결과를 나타냈다. 큰입우럭 I 골격근의 LDH 활성이 특히 높으므로 혐기적 대사가 우세하게 이루어지나 피루브산 0.5 mM에서 LDH가 최대 활성을 나타내고 피루브산 농도가 증가되면 LDH 활성이 감소되므로 큰입우럭이 지속적으로 운동할 때 골격근내 젖산이 축적되지 않고 젖산의 대사가 이루어지도록 저산소 수생환경에 적응되어 진화된 것으로 볼 수 있다. 그러나 피루브산 10 mM에서 골격근 20%, 심장조직 17%[2]를 보인 아마존 어류 *Mylossoma duriventris*보다 저산소에 대해 적응정도가 낮은 것으로 보인다.

메기류 *Hypostomus plecostomus* LDH A₄ 29%[18], 쏘가리 (*Siniperca scherzeri*) LDH A₄ 29.55%[14]와 유사하지만, 풀망둑 LDH A₄ 43.47%[66], 가물치 LDH A₄ 39.98%[47]보다는 낮은 저산소 환경에 내성이 있는 종으로 확인되었다. 큰입우럭 골격근과 심장조직의 저해정도가 28.32%와 25%로 유사하므로 뱀어 골격근 65%, 심장조직 60%[30], 칠성장어 골격근 42%, 심장조직 40%[17]와 같이 저해정도가 유사한 종들과 비교해도 큰입우럭의 저해정도가 훨씬 크게 확인되었다. 그리고 LDH의 K_m^{PYR} 은 골격근 0.229, 심장 0.215, 간 0.122, 눈 0.07 및 뇌조직 0.166 mM이었다(Table 3). 눈조직의 K_m^{PYR} 이 가장 낮아 피루브산과 NADH에 대한 친화력이 가장 크고, 골격근의 친화력은 낮았다. 잉어 골격근 LDH 동위효소의 K_m^{PYR} 0.173, 송어 골격근 동위효소의 K_m^{PYR} 0.209, 풀망둑 골격근의 K_m^{PYR} 0.083[60,66]과 비교하였을 때 낮은 것으로 나타났다. 또한 큰입우럭 눈조직 LDH K_m^{PYR} 0.07이므로 다른 종에서 LDH C₄ 동위효소의 친화성이 가장 큰 것[47]과 동일한 결과가 나타났다. 효소에 대한 K_m 은 그 기질의 세포내 농도와 비슷한 경향이 있으므로, 세포 내에서 저농도 기질에 작용하는 효소는 고농도 기질에 작용하는 효소보다 대체적으로 K_m 이 낮다[41]. 따라서 골격근 LDH의 K_m^{PYR} 이 크므로 피루브산 농도가 높고, 눈조직은 K_m^{PYR} 이 가장 낮으므로 피루브산 농도도 낮은 것으로 보인다.

조직 LDH의 최적 pH

골격근, 간 및 뇌조직의 최적 pH는 7.5, 심장 및 눈조직의 최적 pH는 8.0으로 나타났다. 조직들에서 pH 6.5~8.7 범위에서 50% 이상의 활성을 나타냈고, pH 8.8부터 활성이 급격히

Table 4. Maker enzyme activity of plasma membrane and mitochondria in tissues from *M. salmoides* I

Tissue	Crude extract		Plasma membrane	Mitochondria	Yield (%)	
	5'-Nucleotidase (units/g)	Monoamine oxidase (units/g)	5'-Nucleotidase (units/g)	Monoamine oxidase (units/g)	5'-Nucleotidase (units/g)	Monoamine oxidase (units/g)
Skeletal muscle	51.28	1.74	47.44	1.04	92.51	59.77
Heart	23.82	0.87	18.67	0.61	77.45	70.11

감소하였다. 그러나 간조직은 pH 4.0~8.6에서 60% 이상의 활성을 나타내 산성과 중성에서 상당히 안정적이었으며, 뇌조직의 LDH는 산성 pH에서 활성이 급격히 감소되는 것이 특징적이었다. 골격근은 pH 5.0에서, 심장 및 눈조직 LDH는 pH 4.5~5.0에서 45% 정도의 활성을 보였다(Fig. 6). 쏘가리 A₄ 동위효소의 최적 pH는 7.5이고 pH 7.0~8.5에서 70% 이상 활성이 남았으며 pH 5.5~8.5에서 50% 이상의 활성이 유지되었다는 보고[14]와 유사하였다. 송어(*Salmo gairdneri*) 골격근 LDH의 최적 pH는 6.8이며 pH 6.3~7.6에서 50% 이상의 활성이 유지되었고, 잉어(*Cyprinus carpio*) 골격근 LDH의 최적 pH는 7.4이고 pH 6.0~7.5에서 50% 이상의 활성이 유지되었다는 보고[60]와 pH 6.5에서 최적 활성을 보이고 pH 5.0에서 안정하지만 염기성 pH에서 활성이 급격히 감소하는 풀망둑 골격근 및 심

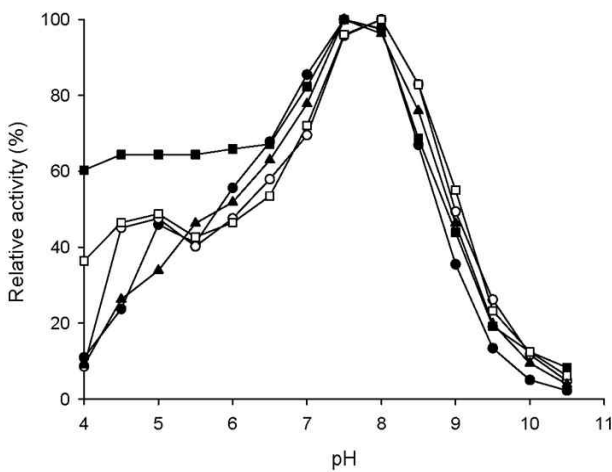


Fig. 6. Effect of pH on the activity of LDH in tissues from *M. salmoides*: ●, skeletal muscle; ○, heart; ■, liver; □, eye; ▲, brain.

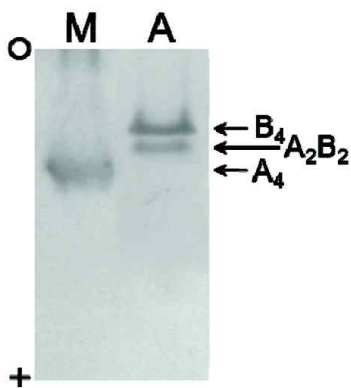


Fig. 7. Native-polyacrylamide electrophoresis zymogram of mitochondrial LDH in skeletal muscle and heart tissues from *M. salmoides*. M, mitochondrial LDH of skeletal muscle; H, mitochondrial LDH of heart.

장조직[66]과 비교하면 큰입우럭의 조직은 pH가 염기성일 때 더욱 안정적이었다.

원형질막 및 미토콘드리아의 LDH 및 MCT

원형질막과 미토콘드리아 분획을 분리하여 표지효소인 5'-nucleotidase와 monoamine oxidase를 측정된 결과 골격근과 심장조직추출물에 대한 원형질막 표지효소의 수득률이 92.51%와 77.45%였고, 미토콘드리아 표지효소의 수득률은 59.77%와 70.11%로 측정되어 분리된 것으로 확인되었다(Table 4). 미토콘드리아 분획에서 LDH를 확인한 결과 골격근은 LDH A₄ 동위효소, 심장조직에서는 B₄동위효소가 강하고 A₂B₂ 동위효소가 나타났다(Fig. 7). 미토콘드리아 분획의 LDH 활성은 골격근 12.50, 심장조직 14.74 units였고, 비활성은 골격근 3.28, 심장조직 3.82 units/mg로 나타났다(Table 5). 특히 세포기질의 LDH 활성에 대한 미토콘드리아의 LDH 활성의 비율이 다른 조직보다 심장조직에서 크게 확인되었고, LDH B₄가 발현된 것으로 보아 세포기질에서 젖산이 미토콘드리아 MCT를 통해 미토콘드리아 내부로 이동되고 LDH에 의해 젖산이 피루브산으로 전환되어 TCA회로에서 산화된다는 보고 [10]로 설명될 수 있다.

MCT 단백질이 종류에 따라 역학적 특성의 차이로 인해 서로 수송능력이 다르므로[23], 조직특이성이 나타나고, 동일 조직 내에서 동시에 발현된다고 보고되었으나[24] 본 실험에서는 골격근과 심장조직에서 각각 분리한 원형질막과 미토콘드리아 분획에서 Western blotting에 의해 MCT 1, 2, 4가 모두 확인되었다(Fig. 8). 따라서 MCT 1은 젖산 유입에 주로 관여하고, MCT 4는 젖산의 유출에 관여하며 흰쥐와 사람의 골격근에서 MCT 1과 4, 사람의 심장조직에서 MCT 4, 그리고 햄스터의 골격근과 심장조직에서 MCT 1과 2가 발현된다는 보고[6]와 약간의 차이를 나타냈다.

큰입우럭 골격근의 LDH 활성이 피루브산 0.5 mM에서 최대 활성을 나타내지만 고농도의 피루브산에서 저해되고, 피루브산에 대한 친화력도 비교적 낮으므로 세포질에 젖산의 농도가 제한되는 것으로 보인다. 따라서 피루브산과 젖산은 원형질막의 MCT 1과 2을 통해 유입되고 해당과정에서 생성되어 MCT 4에 의해 유출되거나 미토콘드리아로 MCT 1과 2를 통해 유입되어 산화적 대사를 한다. 그리고 미토콘드리아 LDH A₄에 의해 전환된 젖산이 MCT 4에 의해 유출되는 방식으로 이루어져 피루브산과 젖산의 농도를 조절하며 에너지를 생성

Table 5. Mitochondrial LDH activity in tissues from *M. salmoides* I

Tissue	LDH activity (units/g)	Protein (mg/g)	Specific activity (unit/mg)
Skeletal muscle	12.05	3.81	3.28
Heart	14.74	3.86	3.82

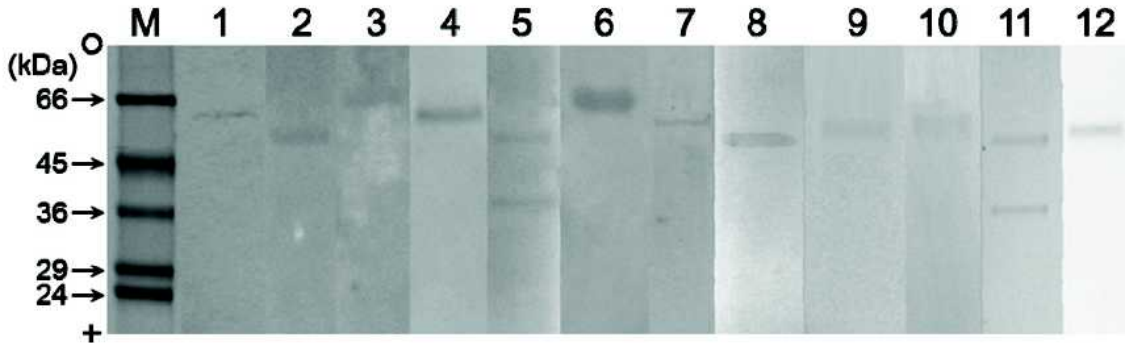


Fig. 8. The Western blot analysis of MCTs in plasma membrane and mitochondria from *M. salmoides* skeletal muscle and heart tissues using MCT 1, 2, 4 antiserum (anti-MCT 1, 2, 4, 1:200). M, marker; 1, plasma membrane of skeletal muscle + anti-MCT 1; 2, plasma membrane of skeletal muscle + anti-MCT 2; 3, plasma membrane of skeletal muscle + anti-MCT 4; 4, mitochondria of skeletal muscle + anti-MCT 1; 5, mitochondria of skeletal muscle + anti-MCT 2; 6, mitochondria of skeletal muscle + anti-MCT 4; 7, plasma membrane of heart + anti-MCT 1; 8, plasma membrane of heart + anti-MCT 2; 9, plasma membrane of heart + anti-MCT 4; 10, mitochondria of heart + anti-MCT 1; 11, mitochondria of heart + anti-MCT 2; 12, mitochondria of heart + anti-MCT 4.

하여 골격근의 지속적인 움직임을 발생할 수 있는 것으로 사료된다. 또한 심장조직은 젖산이 MCT 1, 2에 의해 유입되고 MCT 4에 의해 유출되며, 미토콘드리아로 MCT 1, 2에 의해 유입되어진 후 미토콘드리아 내 LDH B₄ 동위효소에 의해 피루브산으로 전환되어 대사 에너지의 생성을 조정하는 것으로 사료된다.

사람이 단기간 운동할 때 골격근에서 MCT 1이 증가되고 [7], 흰쥐도 운동 강도가 강할수록 골격근에서 MCT 1이 증가되었고, 심장조직으로 젖산의 유입이 크게 증가되었으며[4], 만성적으로 근육에 자극을 준 후 MCT 1이 증가하고, MCT 4는 변화가 없어 MCT 1과 MCT 4가 서로 독립적으로 조절되어지지만 젖산의 유입과 유출은 증가되었다[4,6]. 또한 유산소 운동 훈련시 MCT 1은 증가되나 MCT 4는 증가되지 않아[26] MCT 4의 발현은 혐기적 반응에 의해 유도되고, MCT 1의 발현은 운동시 근육에서 이루어지는 호기적 반응에 의해 유도된다고 보고하였다[6]. 그러나 심장조직에서 MCT 1만 발현되는 이유는 아직 분명하지 않지만 MCT 1과 MCT 4의 발현이 다른 요인에 의해 독립적으로 조절되어지므로 세포소기관에 분포되는 상황도 다른 것으로 보인다. 운동근육과 저산소 상태의 심장조직에서 순환하는 젖산이 산화될 뿐아니라 젖산을 유출하도록 하는 기능적 적응 반응으로 볼 수 있다. 그리고 흰쥐 골격근에서 MCT 1은 LDH A₄ 동위효소와는 관련이 없고 LDH B₄ 동위효소와 관련있는 것으로 보고되어[38], 큰입우럭 골격근에서 LDH A₄가 강하게 발현되고 MCT 1, 2, 4도 발현되므로 다른 결과가 나타났다. 그러나 흰쥐가 운동을 할 때 골격근에서 MCT 1, 4가 급격하게 증가된다는 보고[25,64]와 유사하였다. 따라서 본 실험의 큰입우럭의 활성이 큰 운동성으로 인해 MCT 1이 발현되고 MCT 4를 통해 유출되는 것을 뒷받침

하는 것으로 생각된다. MCT 단백질을 SDS-PAGE한 후 표준 단백질과 비교한 결과 골격근 MCT 1 60 kDa, MCT 2 54~38 kDa, MCT 4 63 kDa, 심장조직 MCT 1 57 kDa, MCT 2 54~38 kDa 및 MCT 4 55.5 kDa로 확인되었다(Fig. 8). 흰쥐 골격근의 MCT 1 55 kDa, MCT 2 40 kDa, 간조직 MCT 2 48 kDa[55], 적혈구 MCT 1 40 kDa[50], 소 부신 MCT 1 42 kDa, MCT 2 57 kDa, MCT 4 45 kDa[35]와 비교하여 흰쥐 근육의 MCT 1과 소부신 MCT 2와 분자량이 유사한 것으로 나타났다.

실험 결과, 큰입우럭이 저산소 조건에 적응되어져 혐기적 대사가 우세하고, 활성이 큰 골격근과 심장조직에서 원형질막과 미토콘드리아 MCT 1, 2, 4를 통해 젖산과 피루브산이 유입되고 유출되어 LDH에 의해 에너지 생성을 효율적으로 조정하는 것으로 사료된다. 따라서 특정 조직의 에너지 필요에 따라 다른 종류의 MCT가 조절되는 것으로 볼 수 있으므로 MCT의 기능을 밝히기 위해서는 환경변화 실험을 통한 MCT 1, 2, 4와 LDH의 발현을 연관지워 고찰하거나 억제제를 사용하여 연구가 이루어져야 될 것으로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 2010~2011학년도 청주대학교 산업과학연구소가 지원한 학술연구조성비(특별연구과제)에 의해 연구되었음.

References

1. Almeida-Val, I. P. Farias, M. N. Paula-Silva, W. P. Duncan, and A. L. Val. 1995. Biochemical adjustments to hypoxia by Amazon cichlids. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **28**, 1257-1263.
2. Almeida-Val, V. M. F. and A. L. Val. 1993. Evolutionary

- trends of LDH isozymes in fishes. *Comp. Biochem. Physiol. B* **105**, 21-28.
3. Almeida-Val, V. M. F., M. N. Paula-Silva, W. P. Duncan, N. P. Lopes, A. L. Val, and S. Land. 1999. Increase of anaerobic potential during growth of an Amazonian cichlid, *Astronotus ocellatus*. survivorship and LDH regulation after hypoxia exposure. *Biology of Tropical Fishes. INPA, Manaus* 437-448.
 4. Baker, S. K., K. J. A. McCullagh, and A. Bonen. 1998. Training intensity dependent and tissue specific increases in lactate uptake and MCT 1 in heart and muscle. *J. Appl. Physiol.* **84**, 987-994.
 5. Baldwin, J., P. S. Lake, and T. W. Moon. 1987. Immunochemical evidence that the single lactate dehydrogenase of lampreys is more similar to LDH B₄ than to LDH A₄ of hagfish. *J. Exp. Zool.* **241**, 1-8.
 6. Bonen, A. 2001. Expression of lactate transporters (MCT 1, MCT 4) in heart and muscle. *Eur. J. Appl. Physiol.* **86**, 6-11.
 7. Bonen, A., K. J. A. McCullagh, C. T. Putman, E. Hultman, N. L. Jones, and G. J. F. Heigenhauser. 1998. Short-term training increases human muscle MCT 1 and femoral venous lactate in relation to muscle lactate. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **274**, 102-107.
 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.
 9. Brooks, G. A. 2009. Cell-cell and intracellular lactate shuttles. *J. Physiol.* **587**, 5591-600.
 10. Brooks, G. F. 2000. *The sticking and crystallisation of amorphous lactose* Masters thesis, Massey University, Palmerston North, New Zealand.
 11. Buchalter, S. E., M. R. Crain, and R. Kreisberg. 1989. Regulation of lactate metabolism *in vivo*. *Diabetes Metab. Rev.* **5**, 379-391.
 12. Chen, P. S., T. Y. Toribara, and H. Warner. 1956. Microdetermination of phosphorus. *Anal. Chem.* **28**, 1756-1758.
 13. Chippari-Gomes, A. R., M. A. B. Leitao, M. N. Paula-Silva, L. S. B. Mesquita-saad, and V. M. F. Almeida-Val. 2003. Metabolic adjustments in *Satanoperca aff. Jurupari* (Perciformes, Cichlidae). *J. Genet. Mol. Biol.* **26**, 27-32.
 14. Cho, S. K., B. Ku, H. An, E. M. Park, S. Y. Park, J. B. Kim and J. J. Yum. 2009. Purification and characterization of lactate dehydrogenase A₄ isoenzyme in mandarin fish (*Siniperca scherzeri*). *J. Life Sci.* **19**, 256-263.
 15. Cho, S. K. 2000. *Mitochondrial lactate dehydrogenase in tissues of vertebrate* 88pp., Ph. D. Thesis Cheongju Univ, Korea.
 16. Cho, S. K. and J. J. Yum. 1996. Adaptational phenotype of lactate dehydrogenase isozymes in *Pseudogobio esocinus* by the environmental variation. *J. Ind. Sci. Res., Cheongju Univ, Korea* **14**, 333-343.
 17. Cho, S. K. and J. J. Yum. 1993. Heterogeneity of lactate dehydrogenase isozymes in tissues of *Lampetra japonica*. *Korean J. Zool.* **36**, 319-328.
 18. Cho, S. K. and J. J. Yum. 2004. Lactate dehydrogenase isozyme of hypoxia tropical catfish (*Pangasius polyuranodon*, *Hypostomus plecostomus*). *J. Life Sci.* **14**, 702-707.
 19. Coonrod, S., A. Vitale, C. Duan, S. Bristol-Gould, J. Herr and E. Goldberg. 2006. Testis-specific lactate dehydrogenase (LDH-C₄; Ldh3) in murine oocytes and preimplantation embryos. *J. Androl.* **27**, 502-509.
 20. Davies, R. and C. D. Moyes. 2007. Allometric scaling in centrarchid fish: origins of intra- and inter-specific variation in oxidative and glycolytic enzyme levels in muscle. *J. Exp. Biol.* **210**, 3798-3804.
 21. Davis, B. J. 1964. Disc electrophoresis-II. Method and application to human serum proteins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **121**, 404-427.
 22. Dawson, D. M., T. L. Goodfriend, and N. O. Kaplan. 1964. Lactic dehydrogenases: functions of the two types rates of synthesis of the two major forms can be correlated with metabolic differentiation. *Science* **143**, 929-933.
 23. Dimmer, K. S., B. Friedrich, F. Lang, J. W. Deitmer, and S. Broer. 2000. The low-affinity monocarboxylate transporter MCT 4 is adapted to the export of lactate in highly glycolytic cells. *J. Biochem.* **350**, 219-227.
 24. Enerson, B. E. and L. R. Drewes. 2003. Molecular features, regulation and function of monocarboxylate transporters: implications for drug delivery. *J. Pharm. Sci.* **92**, 1531-1544.
 25. Enoki, T., Y. Yoshida, H. Hata, and A. Bonen. 2003. Exercise training alleviates MCT 1 and 4 reductions in heart and skeletal muscles of STZ-induced diabetic rats. *J. Appl. Physiol.* **94**, 2433-2438.
 26. Evertsen, F., J. Medbø, and A. Bonen. 2001. effect of training intensity on muscle lactate transporters and lactate threshold of cross-country skiers. *Acta Physiol. Scand* **173**, 195-205.
 27. Fantin, V. R. and P. Leder. 2006. Mitochondriotoxic compounds for cancer therapy. *Oncogene* **25**, 4787-4797.
 28. Farrell, A. P. 2007. Tribute to P. L. Lutz: a message from the heart-why hypoxic bradycardia in fishes? *J. Exp. Biol.* **210**, 1715-1725.
 29. Feller, G., J. P. Pauly, A. Smal, P. O'Carra, and C. Gerday. 1991. The lactate dehydrogenase of the icefish heart: biochemical adaptations to hypoxia tolerance. *Biochim. Biophys. Acta.* **1079**, 343-347.
 30. Goldberg, E., E. M. Eddy, C. Duan, and F. Odet. 2010. LDHC : The ultimate testis-specific gene. *J. Androl.* **1**, 86-94.
 31. Hochachka, P. W. and G. N. Somero. 2002. Biochemical adaptation: mechanism and process in physiological evolution. pp. 480, Oxford University Press, New York.
 32. House, P. D., P. Poulis, and M. J. Weidemann. 1972. Isolation of a plasma-membrane subfraction from rat liver containing an insulin-sensitive cyclic-AMP phosphodiesterase. *Eur. J. Biochem.* **24**, 429-437.
 33. Juel, C. and A. P. Halestrap. 1999. Lactate transport in skeletal muscle-role and regulation of monocarboxylate transporter. *J. Physiol.* **517**, 633-642.
 34. Kim, M. O. and J. J. Yum. 1989. Purification, kinetics and immunochemistry of two homotetrameric lactate dehydrogenase isozymes in *Pseudogobio esocinus* (Cypriniformes). *Korean J. Zool.* **32**, 420-428.

35. Kirat, D., K. Sallam, H. Hayashi, T. Miyasho, and S. Kato, 2009. Presence of ten isoforms of monocarboxylate transporter (MCT) family in the bovine adrenal gland. *J. Mol. and Cell. Endocrinol.* **298**, 89-100.
36. Koukourakis, M. I., A. Giatromanolaki, A. L. Harris, and E. Sivridis. 2006. Comparison of metabolic pathways between cancer cells and stromal cells in colorectal carcinomas: a metabolic survival role for tumor-associated stroma. *Cancer Res.* **66**, 632-637.
37. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
38. McCullagh, K. J. A., R. C. Poole, A. P. Halestrap, M. O'Brien, and A. Bonen. 1996. Role of the lactate transporter (MCT1) in skeletal muscles. *J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **271**, 143-150.
39. Moon, G. H. 2006. *Respiratory metabolism and antioxidant activities of tissues in Boleophthalmus pectinirostris*. pp. 87, M.S. Thesis Cheongju Univ., Korea.
40. Mukai, C and M. Okuno. 2004. Glycolysis plays a major role for adenosine triphosphate supplementation in mouse sperm flagellar movement. *Biol. Reprod.* **71**, 540-547.
41. Nelson, D. L. and M. M. Cox. 2008. Principle of Biochemistry, pp. 183-233 5th eds., W. H. Freeman and Company, New York.
42. Ngan, A. K. and Y. S. Wang. 2009. Tissue-specific transcriptional regulation of monocarboxylate transporters (MCTs) during short-term hypoxia in zebrafish (*Danio rerio*). *Comp. Biochem. Physiol. B* **154**, 396-405.
43. Nikinmaa, M. and B. B. Rees. 2004. Oxygen-dependent gene expression in fishes. *Am. J. Physiol.* **288**, 1079-1090.
44. 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 Lett.* **21**, 281-285.
45. 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 Lett.* **43**, 163-168.
46. Odet, F., S. A. Gabel, J. Williams, R. E. London, E. Goldberg, and E. M. Eddy. 2011. Lactate dehydrogenase C (LDHC) and energy metabolism in mouse sperm. *Biol. Reprod.* **85**, 556-564.
47. Park, E. M. and J. J. Yum. 2010. Purification and characterization of lactate dehydrogenase isozymes in *Channa argus*. *J. Life Sci.* **20**, 260-268.
48. Park, E. M. 2010. *Expression of lactate dehydrogenase and monocarboxylate transporter (MCT 1, 4) of tissues in Odontobutis interrupta*. 76pp, M.S. Thesis Cheongju Univ., Korea.
49. Park, S. Y. and J. J. Yum. 1997. Purification and characterization of lactate dehydrogenase eye- and testis-specific C₄ isozyme. *J. Ind. Sci., Cheongju Univ. Korea* **15**, 263-268.
50. Poole, R. C., C. E. Sansom, and A. P. Halestrap. 1996. Studies of the membrane topology of the rat erythrocyte H⁺/lactate cotransporter (MCT 1). *J. Biochem.* **320**, 817-824.
51. Richards, J. G., Y. S. Wang, C. J. Brauner, R. J. Gonzalez, M. L. Patrick, P. M. Schulte, A. R. Choppari-Gomes, V. M. Almeida-Val, and A. L. Val. 2007. Metabolic and ionoregulatory responses of the amazonian cichlid, *Astronotus ocellatus*, to severe hypoxia. *J. Comp. Physiol. B.* **177**, 361-374.
52. Roermund, C. W. V., Y. Elgersma, N. Singh, R. J. Wanders, and H. F. Tabak. 1995. The membrane of peroxisomes in *Saccharomyces cerevisiae* is impermeable to NAD(H) and acetyl-CoA under *in vivo* conditions. *EMBO J.* **14**, 3480-3486.
53. Scanlan, M. J., A. J. Simpson, and L. J. Old. 2004. The cancer/testis genes: Review, standardization, and commentary. *Cancer Immun.* **23**, 1-15.
54. Sensabaugh, G. F. and N. O. Kaplan. 1972. A lactate dehydrogenase specific to the liver of gadoid fish. *J. Biol. Chem.* **247**, 585-593.
55. Sepponen, K., N. Koho, E. Puolanne, M. Ruusunen, and A. R. Poso. 2003. Distribution of monocarboxylate transporter isoforms MCT 1, MCT 2 and MCT 4 in porcine muscles. *Acta Physiol. Scand.* **177**, 79-86.
56. Sidell, B. D. and K. F. Beland. 1980. Lactate dehydrogenases of atlantic hagfish: Physiological and evolutionary implications of a primitive heart isozyme. *Science* **207**, 769-770.
57. Srere, P. A., H. Brazil, and L. Gonen. 1963. Citrate condensing enzyme of pigeon breast muscle and moth flight muscle. *Acta Chem. Scand.* **17**, 129-134.
58. Suzuki, A., S. A. Stern, O. Bozdagi, G. W. Huntley, R. H. Walker, P. J. Magistretti and C. M. Alberini. 2011. Astrocyte-neuron lactate transport is required for long-term memory formation. *Cell* **144**, 810-823.
59. Tabor, C. W., H. Tabor and S. M. Rosenthal. 1954. Purification of amine oxidase from beef plasma. *J. Biol. Chem.* **208**, 645-661.
60. Tylicki, A., D. Masztaleruk, and S. Strumilo. 2006. Differences in some properties of lactate dehydrogenase from muscles of the carp *Cyprinus carpio* and trout *Salmo gairdneri*. *Comp. Onto. Biochem.* **42**, 143-147.
61. Wang, X., E. Perez, R. Liu, L. J. Yan, R. T. Mallet, and S. H. Yang. 2007. Pyruvate protects mitochondria from oxidative stress in human neuroblastoma SK-N-SH cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 2886-2891.
62. Wang, Y., P. M. Wright, G. J. Heigenhauser, and C. M. Wood. 1997. Lactate transport by rainbow trout white muscle: kinetic characteristics and sensitivity to inhibitors. *Am. J. Physiol.* **272**, 1577-1587.
63. Whitt, G. S. 1970. Developmental genetics of the lactate dehydrogenase isoenzymes of fish. *J. Exp. Zool.* **175**, 1-35.
64. Wilson, M. C., V. N. Jackson, C. Hedle, N. T. Price, H. Pilegaard, and C. Juel. 1998. Lactic acid efflux from white skeletal muscle is catalyzed by the monocarboxylate transporter MCT 3. *J. Biol. Chem.* **273**, 15920-15926.
65. Yeon, J. H. 2011. *Characterization of lactate dehydrogenase and expression of monocarboxylate transporters (MCT) 1, 2, 4 in liver from Carassius auratus*. pp. 87, M. S. Thesis Cheongju Univ., Korea.
66. Yum, J. J. 2008. Characterization of lactate dehydrogenase in *Acanthogobius hasta*. *J. Life Sci.* **18**, 264-272.
67. Zoll, J., E. Ponsot, S. Dufour, S. Doutreleau, R. Ventura-

Clapier, M. Vogt, H. Hoppeler, R. Richard, and M. Flück. 2006. Exercise training in normobaric hypoxia in endurance

runners. III. Muscular adjustments of selected gene transcripts. *J. Appl. Physiol.* **100**, 1258-1266.

초록 : 큰입우럭(*Micropterus salmoides*) 조직의 젖산탈수소효소 및 Monocarboxylate 수송체 (MCT) 1, 2, 4

염정주* · 연준희

(청주대학교 자연과학부 생명과학전공)

큰입우럭(*Micropterus salmoides*) 조직의 젖산탈수소효소(EC 1.1.1.27, LDH)의 특성 및 골격근과 심장조직의 monocarboxylate 수송체 1, 2, 4의 발현을 연구하였다. Native-PAGE 결과골격근에서 LDH A₄, 심장, 간, 눈 및 뇌조직에서 A₄, A₂B₂, B₄, 눈조직에서 eye-specific C₄ 동위효소가 발현되었다. 9월에 심장조직에서 LDH B₄ 동위효소의 활성이 강하고 다른 조직에서는 A₄의 활성이 강했으나, 11월에 심장조직에서 A₄ 동위효소의 활성이 강하게 확인되었다. 골격근과 심장조직에서 LDH/CS로 조직의 혐기적 대사 비율이 높게 확인되었으며, 면역 침강 후 native-PAGE에 의해 LDH eye-specific C₄ 동위효소가 B₄보다 A₄ 동위효소에 더 유사한 것으로 확인되었다. LDH A₄ 동위효소가 affinity chromatography에 의해 정제되었고, 하부단위체 A의 분자량은 37.200이었다. 피루브산 10 mM에서 조직 LDH의 활성이 11.05-28.32% 남아 저해 정도가 컸고, 눈조직 LDH의 K_m^{PYR} 이 낮았으며, 조직의 최적 pH는 7.5~8.0이었다. 골격근 미토콘드리아에서 LDH A₄ 동위효소, 심장조직의 미토콘드리아에서 B₄와 A₂B₂ 동위효소가 확인되었고, 골격근과 심장조직의 원형질막과 미토콘드리아에서 MCT 1, 2, 4가 확인되었다. 골격근 MCT 1, 2, 4 골격근 MCT 1 60 kDa, MCT 2 54~38 kDa, MCT 4 63 kDa, 심장조직 MCT 1 57 kDa, MCT 2 54~38 kDa 및 MCT 4 55.5 kDa이었다. 실험 결과, 큰입우럭이 저산소 조건에 적응되어져 혐기적 대사가 우세하고, 활성이 큰 골격근과 심장조직에서 원형질막과 미토콘드리아 MCT 1, 2, 4를 통해 젖산과 피루브산이 유입되고 유출되며 LDH에 의해 에너지 생성을 효율적으로 조정하는 것으로 사료된다.