

Kinetic Properties of Lactate Dehydrogenase in Tissues from *Rana catesbeiana*

Jung Joo Yum* and Eun Sung Ha

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

Received December 2, 2013 / Revised January 13, 2014 / Accepted January 25, 2014

The kinetic properties and isozyme expression of lactate dehydrogenase (EC 1.1.1.27; LDH) in tissues from *Rana catesbeiana* I and II collected from February (I) and August (II) were studied. LDH activities, A₄ isozyme, and LDH/citrate synthase (EC 4.1.3.7; CS) were high in skeletal muscle from *R. catesbeiana* I, and LDH B₄ isozyme increased in several tissues of *R. catesbeiana* II. In particular, LDH activities were high in heart and brain tissues from *R. catesbeiana* II. LDH eye-specific C isozyme, detected by native polyacrylamide gel electrophoresis after immunoprecipitation, was expressed in eye tissue and was more similar to the B₄ than A₄ isozyme. LDH A₄ isozyme was purified by oxamate-linked affinity chromatography, and the molecular weight of subunit A was 32.0 kDa. In *R. catesbeiana* II, levels of K_m^{PYU} , V_{max}^{LAC} , and tolerance to lactate of LDH were high in all tissues, and V_{max}^{PYU} of LDH in heart and brain tissue was highly detected. Purified A₄ isozyme and LDH in eye tissue were highly tolerate compared to others. The K_m^{LAC} value was highly measured compared to K_m^{PYU} . The degree of inhibition by 10 mM of pyruvate on LDH activities in tissues from *R. catesbeiana* I and II was more pronounced as the ratio of subunit B increased. As a result, characteristic expression of LDH eye-specific C was found in *R. catesbeiana*. Anaerobic metabolism seemed to predominate as the LDH of skeletal muscle from I showed higher activity. It also appeared that *R. catesbeiana* II adapted well to incremental increases in LDH B, becoming tolerant to the lactate of LDH in tissues.

Key words : Citrate synthase, K_m , lactate dehydrogenase, LDH-eye-specific C isozyme, *Rana catesbeiana*

서 론

젖산탈수소효소(EC. 1.1.1.27, Lactate dehydrogenase, LDH)는 혐기적 대사에 관여하는 중요한 효소로 NAD^+ / $NADH$ 에 의해 피루브산과 젖산의 상호 전환 반응을 촉매 한다. LDH는 *Ldh-A*, *B*, *C* 유전자에 의해 만들어진 사랑체의 동위효소로 [44], 온도, pH 및 산소농도 등의 조건에 따라 종 및 조직 특이성을 나타낸다[11, 22]. *Ldh-A*는 혐기적 조직인 골격근 조직에서, *Ldh-B*는 호기적 조직인 심장 조직에서 주로 발현되고[2], *Ldh-C*는 포유류와 조류의 정소와 정자에서 주로 발현되는 LDH testis-specific C₄ [17], 경골어류 농어목의 눈조직에서 주로 발현되는 eye-specific C₄ 및 잉어목과 대구목의 간조직에서 발현되는 liver-specific C₄가 보고되었다[29, 34]. 그러나 용존산소를 급격히 증가시킨 경우 모래무지 골격근에서 LDH A₄가 증가되지만 심장조직에서 B₄가 증가되어[9], 산소 수요에 따른 LDH 동위효소의 발현에 대한 기존의 결과에 일치하지 않았다. 또한 고원 서양토끼의 경우 LDH testis-specific C가

정소는 물론 다른 조직들에서도 발현되어 LDH C₄ 기능에 대한 연구가 필요함이 제시되었다[43]. 그러나 포유류에서 박테리아에 이르는 LDH의 진화적 연관을 제시한 보고에서 양서류의 경우 *Xenopus* 난모세포에서만 LDH C가 확인되었고 testis-specific C로 확인되었을 뿐[40] 양서류의 LDH C에 대해서 보고된 바 없었다. 따라서 겨울에 동면하지 않고 환경에 적응력이 강하고 활동성이 큰 외래종 황소개구리의 LDH에 대해 상세하게 연구하고자 하였다.

외온 동물인 양서류의 경우 온도 변화 시 생화학적 반응율이 변화하여 동물의 기능에 영향을 미친다. 하지만 온도 변화에 대해 생리학적 한계가 있으므로 우세 체온을 유지하기 위해 행동학적 기작에 의존하게 된다. 겨울이 가장 문제로 첫째, 동면하거나[31] 대사효소의 활성을 하강 조절하거나[37] 동결에 대한 내성이 생기고[42], 행동학적으로 조절하여 불활성 상태로 유지한다[3]. 둘째, 일부 외온 동물은 추운 겨울에도 기능을 유지하도록 생화학적으로 순응하여 활성을 지니도록 유연성을 갖는다[38]. 서식지와 행동이 다른 양서류 *Rana perreti*와 *Bufo calamita* 심장 LDH의 K_m^{PYU} , K_m^{LAC} , V_{max} 를 측정 한 결과 온도가 증가함에 따라 활성이 증가되었으며[23], *Rana ridibunda* 경우 동면시 혈액의 산소분압의 저하로 산소소비가 저하되고, 대사가 저하되어 골격근과 심장의 LDH 활성이 감소되나, 1월말 이후 심장의 LDH 활성이 점차 증가되었으며 [24] *Rana perreti*의 간과 골격근의 LDH 활성이 겨울과 여름에 감소하고 간조직은 가을에 증가한다고 보고되었다[25]. 그리

*Corresponding author

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

E-mail : jjyum@cju.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

고 겨울의 저산소 수중에서 동면하는 개구리 경우 대사가 저하되어 골격근의 호기적 대사에 관련된 효소도 감소한다고 보고되었다[37]. *Rana nigromaculata*와 *Nyctalus noctula*의 휴면과 동면 중에 LDH B₄가 손실되고 LDH A₄와 혈액 내 포도당이 증가되는 등 에너지 대사 수준에 적응되어 생리적 상태의 차이를 나타냈다[21]. 그리고 수생 소형 도롱뇽은 계절적 변화에 생화학적으로 순응하여 1년 내내 활동적이므로 겨울에 골격근에서 산화적 대사의 지표인 시트르산 합성효소(citrate synthase, EC. 4.1.3.7, CS)는 활성이 높으나, LDH 활성은 계절적 차이를 나타내지 않았다[4] 등 양서류 LDH에 관한 연구가 있으나 LDH에 대한 연구 결과가 일치하지 않았다. 또한 일부 개구리는 침수하여 동면하며 저산소 상태에서 피부를 통해 호흡가스를 교환하며 견딜 수 있지만 황소개구리는 크기로 인해 여러 시간 견딜 수 없어 동면 기구가 발달되어 있지 않은 것으로 보고되었으며[18], 황소개구리의 연구는 혈액과 요의 여러 생리학적 요소 및 혈액 내 LDH 활성이 측정되었고[12] 황소개구리 골격근의 LDH 3을 정제한 결과 분자량이 35.3 kD와 37.6 kD의 두 개 하부단위체로 구성되었으며, K_m^{PYU} 1.242 mM로 보고되었으나[47], LDH 3으로 명시된 동위효소는 골격근 조직의 LDH A₄에 해당하는 효소로 생각되었다.

따라서 2월과 8월에 채집된 황소개구리 I, II의 대사를 비교하여 환경 변화에 적응하여 나타난 생리학적 현상을 알아보기 위해서 혐기적 대사의 지표인 LDH와 산화적 대사의 지표인 CS의 활성을 측정하여 LDH/CS로 대사를 확인하고, LDH 동위효소와 LDH C의 발현을 확인하였으며, 조직별로 피루브산과 젖산에 대한 역학적 특성을 확인하였다.

재료 및 방법

실험 재료 및 조직 추출액의 준비

양서강 개구리목 개구리과 황소개구리(*Rana catesbeiana*, 140-170 g)는 2월 10일(I)과 8월 10일(II)에 충남 논산의 개구리 수산에서 구입하여 사용하였다. 골격근, 심장, 간, 눈 및 뇌조직을 적출하여 혈액을 충분히 제거한 후, 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 6.85, 4°C)를 3배(v/w) 가하여 4°C에서 glass and pestle homogenizer (NZ-1100, EYELA)로 파쇄하였고, 4°C, 20,000×g에서 1시간씩 2회 원심분리(Mega 21R, Hanil) 한 후 상등액을 시료로 사용하였다.

Lactate dehydrogenase와 citrate synthase의 활성 측정 및 단백질 정량

LDH의 활성은 분광광도계(UV-160A, Shimadzu)를 사용하여 25°C, 340 nm에서 1.50 mM 피루브산과 0.14 mM NADH를 포함한 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 6.85) 3 ml에 시료 10 ul를 가한 다음 NADH가 NAD⁺로 산화되는 정도를 측정 후 millimolar extinction coefficient 6.22를 사용하여

units/ml, 또는 units/g으로 산출하였다[44]. CS의 활성은 25°C, 412 nm에서 0.2 mM acetyl-CoA, 0.1 mM DTNB [5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid)] 및 0.5 mM oxaloacetic acid를 포함한 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 7.5) 3 ml에 시료를 가한 후, DTNB가 전환되는 정도를 측정 후 millimolar extinction coefficient 13.6을 사용하여 units/g으로 산출하였다[41]. 활성의 단위(unit)는 1분 동안 기질 1 μM을 전환시키는데 필요한 효소의 양으로 계산하였다. 단백질은 Bradford의 방법에 따라 분광광도계로 595 nm에서 측정하였고, 소 혈청알부민(BSA)을 사용한 표준곡선에 의해 정량하였으며[5], LDH/CS, LDH 및 CS의 비활성(units/mg)으로 대사를 확인하였다.

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

Native-PAGE는 Davis의 방법에 따라 7.5% acrylamide separation gel 및 2.67% acrylamide stacking gel을 만들어 4°C에서 polyacrylamide vertical slab system (SE 250, Hoefer)으로 시행하였다[14]. 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[44]. SDS-PAGE는 Laemmli의 방법에 따라 10%T, 2.67%C acrylamide separation gel과 5%T, 2.67%C acrylamide stacking gel이 되도록 slab gel을 만들어 시행하였다[20]. 시료는 25% Glycerol, 2% SDS, 5% 2-mercaptoethanol 및 0.1% bromophenol blue를 함유한 0.0625 M Tris-HCl buffer (pH 6.8)와 1:4(v/v)로 섞어 100°C에서 5분간 가열한 후 well에 가하고 0.1% sodium dodecyl sulfate와 0.192 M glycine을 함유한 0.025 M Tris-HCl (pH 8.3)을 사용하여 200 V에서 1시간 전기영동 하였다. 전기영동 후 gel은 45% methanol과 10% acetic acid로 만든 0.1% coomassie brilliant blue R-250 용액으로 25°C에서 15분간 단백질 염색을 실시하였고, 10% methanol과 10% acetic acid 혼합 용액으로 충분히 탈색시킨 후 확인하였다.

Lactate dehydrogenase의 면역 침강반응

눈조직 추출물에 본 실험실에서 제조한 꺾지(*Coreoperca herzi*) LDH A₄에 대한 항체(anti-LDH A₄)를 1:1, 1:2, 1:3(v/v), 소(*Bos taurus*) LDH B₄에 대한 항체(anti-LDH B₄)를 1:1, 1:2, 1:3(v/v), 그리고 고등어(*Scomber japonicus*) eye-specific C₄에 대한 항체(anti-LDH C₄)[8, 10]를 1:1, 1:2, 1:3(v/v)으로 각각 반응시킨 후 25°C에서 1시간, 4°C에서 12시간 방치시킨 다음 4°C, 20,000×g에서 1시간 동안 원심 분리하여 각각 LDH 항원-항체 복합체를 침전시키고 상등액을 polyacrylamide 전기영동 하여 항원-항체 복합체를 이루지 않은 LDH 동위효소를 확인하였다.

Affinity chromatography에 의한 LDH A₄ 동위효소의 정제

Oxamate-linked Sepharose gel은 O'Carra의 방법[27, 28]을 변형하여 준비하였고[19], affinity column (25×85 mm)에 0.2 mM NADH를 함유한 0.05 M potassium phosphate buffer (pH 6.85, buffer)를 서서히 가하였다. Column에 0.5 M KCl과 0.2 mM NADH를 첨가한 골격근 조직액 7 ml씩 유입시키고, 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 용출 액을 1.6 ml씩 분획하여 chromatography (Econo System, Bio-Rad)를 실시하였다. 각 분획의 용액을 cellulose acetate strip에 소량 점적한 후 LDH를 염색하였고, LDH가 확인된 분획은 LDH 활성을 측정하고 단백질을 정량하여 정제 그래프를 그렸다. LDH 활성이 확인된 분획은 native-PAGE하여 A₄ 동위효소가 정제된 분획을 모아 Amicon PM-10 막으로 농축하였고, SDS-PAGE로 정제된 것을 확인하였다.

LDH의 피루브산 및 젖산에 대한 기질의존성 측정

2월과 8월에 채집된 황소개구리 I, II의 골격근, 심장, 간, 눈 및 뇌조직 추출액의 LDH 활성과 정제된 LDH A₄ 동위효소의 활성은 피루브산 0.01에서 10 mM 및 젖산 0.1에서 60 mM 까지 농도별로 측정되었다. 최대 활성을 기준으로 농도 별로 측정된 활성의 정도(V/Vmax, %)를 계산하여 피루브산과 젖산의 농도에 따라 LDH 활성이 저해되는 정도를 확인하였으며 Lineweaver-Burk plot에 의해 Km^{PYR}, Km^{LAC}와 Vmax^{PYR}, Vmax^{LAC}를 구하였다.

결과 및 고찰

Native-PAGE, 면역침강반응에 의한 LDH 동위효소의 확인

황소개구리 눈조직을 면역침강 반응시킨 후 native-PAGE를 실시하여 LDH 동위효소를 확인하고 진화 정도를 확인하였다(Fig. 1B). Polyacrylamide 전기영동한 결과 눈조직에 anti-A₄를 가하여 면역침강 반응을 시킨 경우, 1:1, 1:2에서 음극 쪽 동위효소가 일부 반응하여 흐려졌고 1:3으로 반응시켰을 때 음극쪽 밴드는 나타나지 않아 A₄와 A₂B₂ 동위효소로 볼 수 있었고, 양극쪽 밴드가 남아있어 B₄로 볼 수 있었다. 눈조직에 anti-B₄를 가한 경우 A₄는 침전되지 않았고, 1:3에서 B₄가 없어지고, 양극쪽 밴드가 흐려졌다. 그리고 눈조직에 1:3으로 anti-LDH eye-specific C₄를 가한 경우 A₄, A₂B₂, B₄가 확인되나 양극쪽 밴드가 흐려져 B₃C로 확인되었다(Fig. 1B). 따라서 LDH A₄는 각기 LDH A₄에 대한 항체와 반응하여 침전되므로 B₄도 소 LDH B₄와 반응하여 침전되므로 유사하고 보존적이었으며, B₃C는 LDH B₄에 대한 항체에 의해서도 활성이 조금

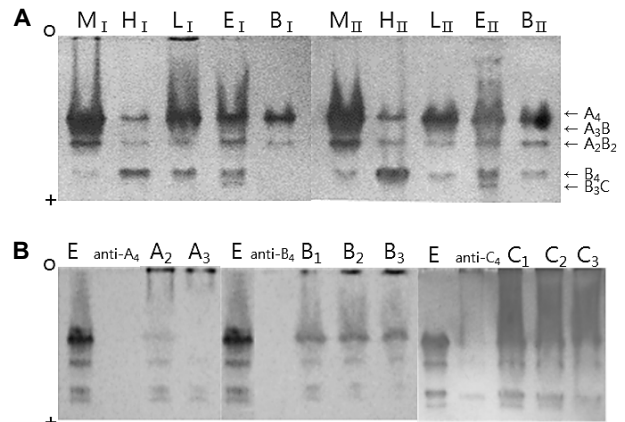


Fig. 1. (A) Native-polyacrylamide gel electrophoresis zymogram of LDH isozymes in various tissues from *Rana catesbeiana* I, II collected from Feb. (I) and Aug. (II). (B) LDH isozymes in various tissues from *Rana catesbeiana* after immunoprecipitation with *Coreoperca herzi* A₄ antiserum (anti-A₄), *Bos taurus* B₄ antiserum (anti-B₄), and *Scomber japonicus* eye-specific C₄ (anti-C₄). M_{I,II}, skeletal muscle; H_{I,II}, heart; L_{I,II}, liver; E_{I,II}, eye; B_{I,II}, brain; E, eye; A₁, E+anti-A₄ (1:1); A₂, E+anti-A₄ (1:2); A₃, E+anti-A₄ (1:3); B₁, E+anti-B₄ (1:1); B₂, E+anti-B₄ (1:2); B₃, E+anti-B₄ (1:3); C₁, E+anti-C₄ (1:1); C₂, E+anti-C₄ (1:2); C₃, E+anti-C₄ (1:3).

약해지고 eye-specific C₄에 대한 항체에 의해서도 활성이 약해 지므로 일부가 유사한 것으로 볼 수 있었다. 따라서 양서류에서 LDH eye-specific C를 확인할 수 있었고, LDH B와 LDH C가 유사한 것으로 사료된다.

2월에 채집한 황소개구리 I과 8월에 채집한 황소개구리 II 조직의 LDH를 각각 native-PAGE한 결과(Fig. 1A) I, II의 골격근은 A₄, A₂B₂ 동위효소가 강하게 나타났으나 A₃B, B₄도 약하게 확인되었으며 II에서 B₄ 활성이 조금 강해졌다. I, II에서 심장은 B₄가 강하고 A₂B₂ 및 A₄는 흐리게 나타났지만, II에서 B₄ 동위효소의 활성이 더욱 강하게 확인되었다. 간조직은 I, II의 경우 A₄ 활성이 강하고 A₂B₂, B₄가 확인되나 II의 경우 A₄가 더 강하게 확인되었다. 눈조직은 A₄, A₂B₂, B₄ 및 B₃C 이질사량체의 활성이 나타났으나 II에서 B₄와 B₃C활성이 좀 더 강하게 나타났다. I의 뇌조직에서 A₄가 강하고 A₂B₂가 약하게 나타났으나, II의 경우 A₄가 강하고 A₂B₂와 B₄가 뚜렷이 나타났다. 따라서 A₄동위효소는 음극 쪽에 나타나고 B₄ 동위효소는 A₄와 이동거리가 뚜렷하게 떨어져 분리되어 양극 쪽에 나타났으며, 모든 조직에서 A₃B는 약하게 확인되고 AB₃는 확인되지 않았다(Fig. 1A). 척추동물 25종 조직의 LDH를 PAGE한 전기영동상을 비교한 결과 어류와 포유류에서 LDH C가 확인되었으나 양서류 *Bufo raddei*, *Hyla arborea immaculata*, *Rana nigromaculata* 및 *Rana amurensis*는 LDH C를 포함하지 않는 2-5개 동위효소가 확인되었고 LDH A₄가 활성이 가장 크므로 해당과정의 주된 대사 형이고, 종과 조직의 생리기능과 생활 습

성에 따라 동위효소를 지닌다고 보고되었다[6]. *R. nigromaculata*와 *R. amurensis* 심장에서도 LDH B₄가 우세하고 A₄보다 열과 요소에 더 안정하다고 보고되었고[6], *Rana nigromaculata*는 동면중에 LDH B₄가 없어지고 LDH A₄가 증가 되었으며[21] 동면하는 *Rana ridibunda*의 혈액에 산소 분압이 감소하고 대사율이 저하되어 산소 소비가 감소되며, 골격근의 LDH B₄가 감소하여 낮은 온도에 순응하고 충격을 보상하는 것이며, 심장조직의 해당능력이 낮아졌다는 보고[24]와 비교해 보면 본 실험 결과 황소개구리 I 골격근에서 LDH A₄ 동위효소가 증가하였고, 황소개구리 II의 조직에서 LDH B₄의 활성이 증가되어 유사하였으나 눈조직에서 LDH-C가 확인된 것이 특징적이었다.

LDH와 CS의 활성 및 단백질 정량

LDH 활성을 측정된 결과 황소개구리 I의 골격근 349.57, 심장 19.49, 간 62.60, 눈 22.19 및 뇌조직 11.78 units였고, 황소개구리 II는 골격근 227.39, 심장 68.36, 간 15.43, 눈 8.31 및 뇌조직 72.30 units였다(Table 1). I은 II보다 골격근, 간 및 눈조직의 LDH 활성이 컸고, II는 심장과 뇌조직의 LDH 활성이 특히 크게 확인되었다. 황소개구리 혈액의 LDH 활성이 99-135 units/L였고 혈액 내 효소, 단백질 및 세포성분에 대해 분석한 보고에서 LDH 활성이 겨울에 가장 크게 나타났으며[12], 외온동물의 경우 저온에 대한 적응현상으로 효소 활성이 증가하거나 기질 친화성이 감소된다고 보고되어[36] 황소개구리 I의 골격근, 간 및 눈조직의 LDH 활성이 증가된 것을 뒷받침할 수 있었다. 그러나 *Rana ridibunda* 경우 동면시 대사가 저하되어 골격근과 심장의 LDH 활성이 감소되나, 1월말 이후 심장의 LDH 활성이 점차 증가되었으며[24] *Rana perezi*의 간과 골격근의 LDH 활성이 겨울과 여름에 감소하고 간조직은 가을에 증가한다고 보고되어[25] 본 실험 결과와 차이를 나타냈으며, 이것은 동면하는 종과 동면하지 않는 종의 차이로 인해 나타난 결과로 사료된다. 황소개구리 I LDH의 활성을 어류와 비교

하면 골격근의 경우 가물치 380.4 units와 거의 유사하지만 풀망둑 65.30 units 보다 월등히 높게 나타났고. 심장조직의 LDH 활성은 I의 경우 풀망둑 21.89 units와 유사하고 가물치 13.4 units보다 높았다. 눈조직의 LDH 활성은 LDH eye-specific C가 발현되는 종들과 비교하면 풀망둑 53.25 units보다 낮고, 가물치 3.5 units에 비해 조금 높았다. 뇌조직은 I의 경우 풀망둑 28.79 units보다 낮았으나 가물치 5.4 units보다는 높고 II의 경우 훨씬 높게 나타나 혐기적 대사를 하는 것으로 확인되었다[29, 45]. 수생 호흡과 공기 호흡을 하는 풀망둑과 비교하면 양서류 황소개구리의 LDH 활성은 골격근에서 높지만 심장에서는 유사하고 눈과 뇌조직은 풀망둑보다 낮았다. 또한 African cichlid, *Pseudocrenilabrus multicolor victoriae*는 저산소시 LDH를 21% 감소하고, 뇌조직의 CS는 평균 7% 감소되었다[13]는 보고와도 차이를 보였다.

CS활성은 황소개구리 I의 골격근 26.19, 심장 59.39, 간 21.39, 눈, 18.18 및 뇌조직 13.29 units이고, II의 골격근 28.73, 심장 55.68, 간 24.47, 눈 23.62 및 뇌 15.86 units이므로(Table 1) 심장조직의 활성이 가장 높아 가장 호기대사를 하고, 뇌조직이 가장 낮게 확인되었다. 황소개구리 I이 II보다 심장조직의 CS 활성은 높고 다른 조직의 활성은 낮았으며, I과 II의 CS 활성의 차이가 크지 않았지만, LDH 활성의 차이는 조직에 따라 크게 확인되었다. 그러나 겨울의 저산소 수중에서 동면하는 개구리 경우 대사가 저하되어 골격근의 호기적 대사에 관련된 효소도 감소한다고 보고되어[37] 결과가 유사하였다. 수생 소형 도롱뇽은 계절적 변화에 생화학적으로 순응하여 1년 내내 활동적이므로 겨울에 골격근에서 CS 활성이 높으나, LDH 활성은 계절적 차이를 나타내지 않는다는 보고[4]와 차이를 보였다. 큰입우렁 CS의 활성 0.32-1.94, 가물치 2.2-11.6, 풀망둑 3.93-8.35 units와 비교하면 황소개구리는 호기 대사 정도가 더욱 높은 것으로 확인되었다. LDH/CS는 황소개구리 I의 골격근 13.35, 심장 0.33, 간 2.93, 눈 1.22 및 뇌조직 0.89, II의 골격근 7.91, 심장 1.23 간 0.63, 눈 0.35 및 뇌조직 4.56이었

Table 1. Lactate dehydrogenase activity, citrate synthase activity and protein concentration in various tissues from *Rana catesbeiana* I,II collected from Feb. (I) and Aug. (II)

Species	Tissue	LDH activity (units/g)	CS activity (units/g)	Protein (mg/g)	LDH/CS	Specific activity	
						LDH (units/mg)	CS (units/mg)
I	Skeletal muscle	349.57	26.19	62.62	13.35	5.58	0.42
	Heart	19.49	59.39	32.05	0.33	0.61	1.85
	Liver	62.60	21.39	111.83	2.93	0.56	0.19
	Eye	22.19	18.18	93.66	1.22	0.24	0.19
	Brain	11.78	13.29	2.96	0.89	3.98	4.49
II	Skeletal muscle	227.39	28.73	68.02	7.91	3.34	0.42
	Heart	68.36	55.68	31.31	1.23	2.18	1.78
	Liver	15.43	24.47	59.85	0.63	0.26	0.41
	Eye	8.31	23.62	51.01	0.35	0.16	0.46
	Brain	72.30	15.86	26.76	4.56	2.70	0.59

다(Table 1). I의 골격근이 가장 혐기적 대사 비율이 컸으며 간과 눈조직도 혐기적 대사를 하는 것으로 확인되었다. II의 심장과 뇌조직이 I보다 높게 확인되었으며 혐기적 대사 정도가 높은 것으로 나타났다. Perciformes *Satanoperca aff. jui- upari* 골격근과 심장조직의 LDH/CS 173.36과 6.1이고, CS활성은 1.3과 9.4 units로 심장조직이 단기간의 저산소에 직면하여 혐기적 대사를 한다는 보고[7]와 비교해 황소개구리의 골격근과 심장이 혐기적 대사 비율이 훨씬 낮은 것으로 확인되었다. 단백질량은 I의 골격근 62.62, 심장 32.05, 간 111.83, 눈 93.66 및 뇌조직 2.96 mg/g이고, II의 경우 골격근 68.02, 심장 31.31, 간 59.85, 눈 51.01 및 뇌조직 26.76 mg/g으로 측정되었다(Table 1). I의 간 및 눈조직의 단백질량이 많고 뇌조직의 단백질량이 특히 적었으며, II의 뇌조직이 I에 비해 특히 많았다. 골격근의 경우 큰입우럭 골격근 48.77 mg/g 및 가물치 14.70 mg/g보다 높았다[29, 46]. LDH 비활성(specific activity)은 I의 골격근 5.58로 가장 높았고, 뇌 3.98 units/mg으로 특히 높았으며, II의 심장 2.18 units/mg으로 I보다 특히 높게 확인되었다(Table 1). 그러나 황소개구리 II의 뇌조직의 LDH 활성은 I의 활성보다 높았으나 단백질량이 26.76 mg으로 증가되어 LDH 비활성은 2.70으로 낮게 나타났다. CS 비활성은 I의 골격근 0.42, 심장 1.85, 간 0.191, 눈 0.194 및 뇌조직 4.49 units/mg 이고 II의 골격근 0.42, 심장 1.78, 간 0.41, 눈 0.46 및 뇌 0.59 units/mg이었다(Table 1). 따라서 I의 심장과 뇌조직이 특히 높고 II의 뇌조직이 낮게 확인되었다. 이것은 뇌조직 단백질량의 차이로 인해 상대적으로 I의 CS 비활성이 특히 높고 II에서 낮은 것으로 나타났다. 큰입우럭의 경우 온도가 낮아지면 활동성이 떨어지고 혐기적 대사율이 크게 감소하며, 단백질 양은 적게 감소하여 활동성과 혐기적 대사율이 직접적으로 관련된다고 보고되었으나[46], 황소개구리 I은 II에 비해 골격근의 단백질 양의 차이는 작았지만 혐기적 대사율은 높아 다른 결과를 얻었다.

Affinity chromatography에 의한 LDH A4 동위효소의 정제

LDH 동위효소들은 oxamate-linked Sepharose affinity chromatography를 실시할 경우 동위효소에 따라 NAD⁺ 및 피루브산과 abortive ternary complex를 형성하는 정도가 다르므로 gel에 대한 결합력이 다르다. 따라서 고등한 척추동물의 LDH는 NAD⁺를 함유한 buffer를 유입하면 A₄ 동위효소가 용출되고 buffer를 유입하면 B₄ 동위효소가 용출되었다[27,

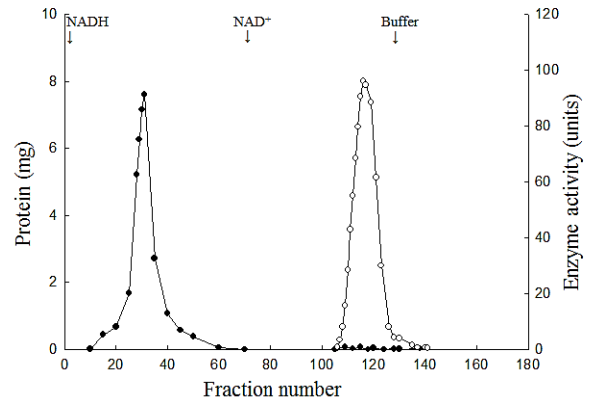


Fig. 2. Affinity chromatography of LDH isozymes in skeletal muscle from *Rana catesbeiana* I on column (25×90 mm) of oxamate-linked agarose gel. Fractions of 1.6 ml were collected at a flow rate 0.4 ml/min. LDH A₄ isozyme was purified in the fraction numbers 101-109 from elution with NAD⁺ containing buffer. ●, protein concentration; ○, enzyme activity.

28]. 본 실험에서 0.5 M KCl과 NADH를 함유한 황소개구리 골격근 추출액 7 ml씩 가하고 0.2 mM NADH를 함유한 buffer를 유입시키면 LDH 동위효소는 결합되고 그의 단백질은 모두 용출되었으며, NAD⁺를 함유한 buffer를 유입시킨 후 34번째 분획에서 LDH A₄ 동위효소들이 용출되기 시작하여 101~109번 분획에서 용출되었으며, 이 후 분획에서는 A₄, A₃B, A₂B₂ 동위효소가 함께 용출되었다. 그리고 buffer만 유입시켰을 때 A₂B₂와 B₄ 동위효소가 함께 용출되었다. 각 분획의 LDH 활성과 단백질 정량을 실시하여 정제 그래프를 작성하였으며(Fig. 2) A₄ 동위효소의 LDH에 대한 수득률은 16.14%였고(Table 2), LDH A₄ 동위효소는 NAD⁺ 유입 후 52.9-67.2 ml에서 용출되었다. 큰입우럭 LDH A₄ 동위효소는 NAD⁺ 유입 후 52.9~76.8 ml에서 용출되었고[46] 꺾지 A₄ 동위효소는 NAD⁺ 유입 후 68~120 ml [10]에서 용출되었다. 따라서 황소개구리 LDH A₄는 큰입우럭과 유사한 양상을 보였고, 꺾지보다는 진화 정도가 빠른 것으로 확인되었다. 정제된 LDH A₄ 동위효소는 SDS-PAGE한 결과 단일 밴드로 확인되어 정제되었음이 확인되었고, 하부단위체 A의 분자량은 32.0 kDa이었다(Fig. 3). 따라서 황소개구리 골격근의 LDH 3을 정제하여 35.3 kDa과 37.6 kDa으로 구성되었다는 보고와 차이를 나타냈다[47]. 큰입우럭 LDH A의 분자량 37.2 kDa [46]과 조금 다르게 나타나 LDH 하부단위체들의 분자량이 종에 따라 차이가 있는 것으로 사료된다.

Table 2. Purification of LDH A₄ isozyme in skeletal muscle from *Rana catesbeiana* I collected from Feb.

Step	Total activity (units)	Total protein (mg)	Specific activity (units/mg)	Purification (fold)	Yield (%)
Crude extract	1631.33	292.23	5.58	1.00	100.00
Affinity chromatography	263.34	1.38	190.82	34.20	16.14

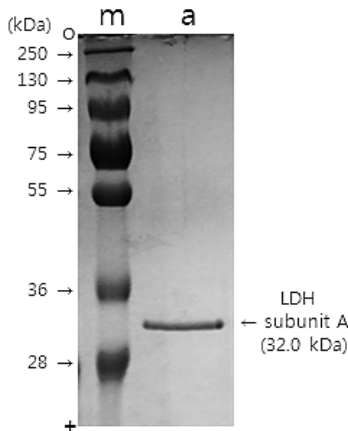


Fig. 3. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of purified LDH A₄ isozyme in *Rana catesbeiana*. m, Marker; a, purified LDH A₄ isozyme. The molecular weight of the purified LDH A₄ isozyme was 128 kDa.

피루브산 및 젖산에 대한 LDH의 역학적 특성

LDH 동위효소들은 피루브산과 젖산에 의해 역학적 특성이 차이를 나타내 생리학적 역할이 다르므로 산소 유용성과 관련된 대사를 조절하는데 중요하다[35]. 온도는 동물의 생리현상에 매우 중요하므로 외온 동물인 양서류 경우 온도 변화 시 생화학적 반응율이 변화하여 동물의 기능에 영향을 미친다[38]. 황소개구리 I의 LDH는 피루브산 농도가 증가됨에 따라 심장의 LDH 활성이 가장 빨리 증가되었고 심장과 골격근 조직이 피루브산 0.2 mM에서 최대 활성을 나타냈으며, 간, 눈 및 뇌조직은 0.6 mM에서 최대 활성을 나타낸 후 감소되었다. 피루브산 10 mM에서 LDH는 뇌, 골격근, 간, 눈, A₄ 및 심장조직의 순서로 38.62, 32.59, 28.95, 26.08, 13.92 및 8.27%이므로 억제되는 정도가 컸고, 심장조직의 LDH 활성이 가장 크게 억제되었다(Fig. 4). 황소개구리 II는 눈조직의 LDH 활성이 가장 빨리 증가되어 피루브산 0.08 mM에서 최대 활성을 나타내고 가장 빠르고 크게 활성이 감소되었다. 심장은 조금 느리게 증가하였고 0.2 mM에서 최대 활성을 나타냈으며 간, 눈 및 뇌조직은 0.6 mM에서 최대 활성을 보였다. 피루브산 10 mM에서 LDH는 간, 골격근, 뇌, 눈 및 심장조직의 순서로 18.62, 15.18, 11.33, 9.42 및 9.22%를 나타내므로 크게 억제되었다(Fig. 5). 피루브산에 의해 저해되는 정도는 polyacrylamide gel 전기영동상(Fig. 1)에서 조직의 LDH 동위효소에 대해 하부단위체 B의 비율이 증가됨에 따라 커지는 것을 확인할 수 있었다. *Scombo japonicus* LDH A₄ 95%[44], *Bos taurus* LDH B₄ 20%[10]와 같이 LDH A₄ 동위효소는 고농도의 피루브산에 의해 저해되는 정도가 낮고 B₄ 동위효소는 저농도의 피루브산에서도 저해 정도가 크다는 보고[44]와 비교해 황소개구리 조직 LDH의 저해 정도는 크게 나타나 차이를 보였다. 황소개구리 I, II 골격근 LDH 경우 풀망둑 LDH A₄ 43.47%[45], 가물치 LDH A₄ 39.98%[29]보다 저해 정도가 크므로 저 산소 환경에 내성이

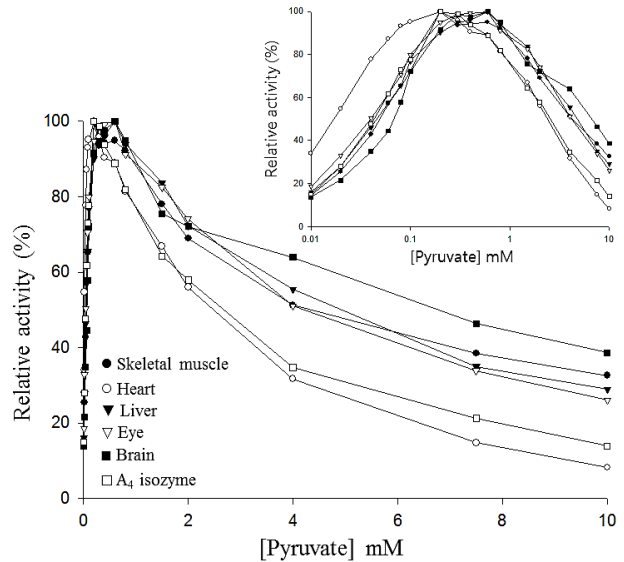


Fig. 4. Effect of pyruvate concentrations on the activity of purified LDH A₄ isozymes and LDH isozyme in skeletal muscle, heart, liver, eye and brain in *Rana catesbeiana* I collected from Feb. LDH activity was measured at 0.1 M potassium phosphate buffer containing 0.14 mM NADH (pH 6.85) and 25°C.

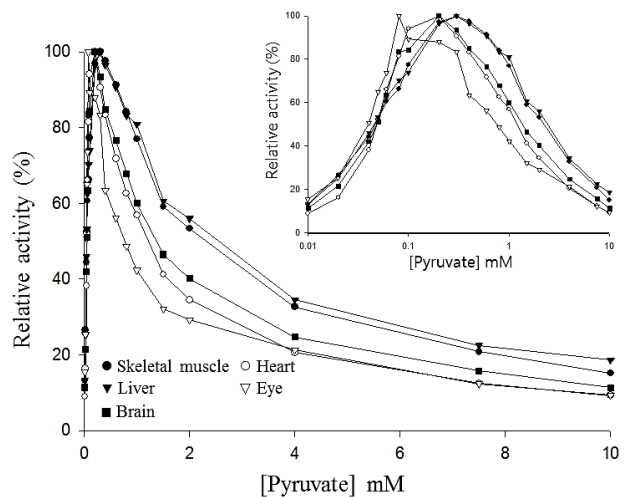


Fig. 5. Effect of pyruvate concentrations on the activity of LDH isozymes in skeletal muscle, heart, liver, eye and brain in *Rana catesbeiana* II collected from Aug. LDH activity was measured at 0.1 M potassium phosphate buffer containing 0.14 mM NADH (pH 6.85) and 25°C.

있는 종으로 확인되었다. 황소개구리 I 골격근의 LDH 활성이 특히 높으므로 혐기적 대사가 우세하게 이루어지나 피루브산 0.2 mM에서 LDH가 최대 활성을 나타내고 피루브산 농도가 증가되면 LDH 활성이 감소되므로 지속적으로 활동할 때 골격근 내 젖산이 축적되지 않고 젖산의 대사가 이루어지도록 적응되어 진화된 것으로 사료된다.

젖산의 농도가 증가됨에 따라 LDH의 활성을 측정한 결과 (Fig. 6, Fig. 7) 황소개구리 I의 심장조직 LDH는 9 mM에서 최대 활성을 나타내고 서서히 감소되었고, 간조직과 정제된 A₄ 동위효소는 20 mM, 골격근과 뇌조직은 30 mM, 눈조직은 40 mM에서 최대 활성을 나타냈다. 간조직은 30 mM에서 45% 정도로 감소되었으나, 다른 조직은 젖산 50 mM까지 서서히 최대 25% 정도 감소되었고, A₄ 동위효소는 50 mM까지 90% 이상의 활성을 나타냈다. 황소개구리 II의 경우 뇌와 심장조직의 LDH가 빠르게 증가되어 뇌조직이 11 mM, 심장조직이 20 mM에서 최대 활성을 나타내고 서서히 감소되었다. 간조직이

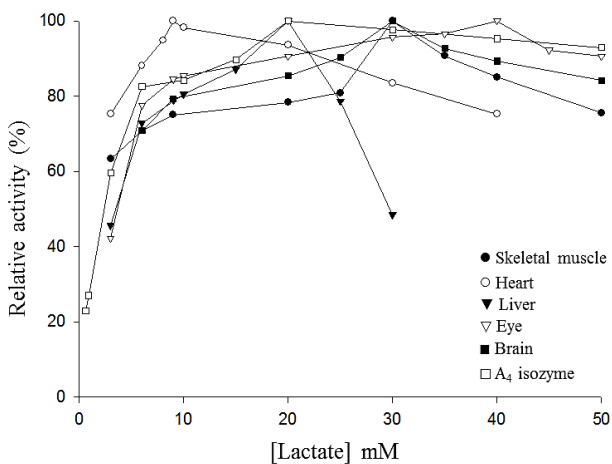


Fig. 6. Effect of lactate concentrations on the activity of purified LDH A₄ isozyme and LDH isozymes in skeletal muscle, heart, liver, eye and brain in *Rana catesbeiana* I collected from Feb. LDH activity was measured at 0.1 M potassium phosphate buffer containing 0.91 mM NAD⁺ (pH 6.85) and 25°C.

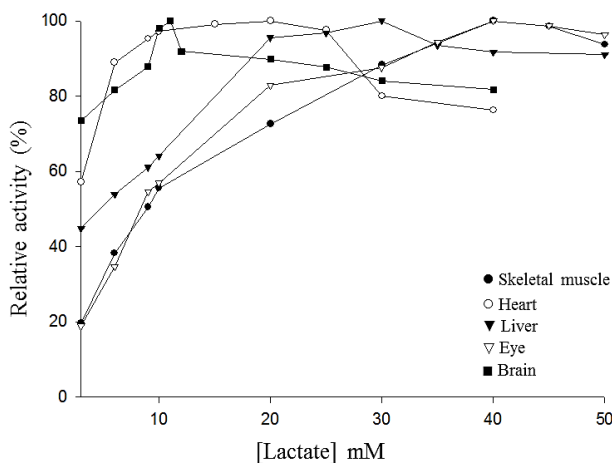


Fig. 7. Effect of lactate concentrations on the activity of LDH isozymes in skeletal muscle, heart, liver, eye and brain in *Rana catesbeiana* II collected from Aug. LDH activity was measured at 0.1 M potassium phosphate buffer containing 0.91 mM NAD⁺ (pH 6.85) and 25°C.

30 mM, 눈과 골격근 조직은 서서히 활성이 증가되어 40 mM에서 최대 활성을 나타내고 이후에도 90% 이상을 나타내므로 젖산에 대한 내성이 큰 것을 확인할 수 있었다. 황소개구리 I과 II에서 정제된 A₄와 눈조직의 LDH가 젖산에 대한 내성이 가장 크게 확인되었고, 황소개구리 II의 LDH가 I에 비해 젖산에 대한 내성이 큰 것을 알 수 있었다.

황소개구리 I의 골격근, 심장, 간, 눈 및 뇌조직에서 LDH의 K_m^{PYU} 가 0.08, 0.03, 0.06, 0.05, 0.07 mM, II의 경우 0.13, 1.37, 0.13, 0.10, 0.24 mM로 측정되었다. V_{max}^{PYU} 은 I의 골격근, 간 및 눈조직에서 컸지만, II의 심장과 뇌조직에서 훨씬 크게 확인되었다(Table 3). 따라서 환경의 온도가 낮은 경우 LDH는 K_m^{PYU} 이 낮아 피루브산에 대한 친화력이 컸고, 특히 심장에서 친화력이 가장 컸으며, II의 심장과 뇌조직은 LDH 활성이 크게 증가되고 LDH B₄ 동위효소가 크게 증가되어 피루브산에 대한 친화력이 특히 낮고 V_{max}^{PYU} 값도 크게 증가하였다. 황소개구리 I, II LDH의 K_m^{PYU} 값과 A₄ 동위효소의 K_m^{PYU} 0.09 mM이므로 토끼 0.35, 흰쥐 0.17-0.27[15, 39], 소 1.0, 닭 3.2 Mm [30]보다 낮았고, B₄ 동위효소의 경우 토끼 0.1, 소 0.14 mM이므로[30, 39], 황소개구리 I 심장의 K_m^{PYU} 값보다 크고, II 심장의 K_m^{PYU} 값보다 낮았다. 그리고 LDH B₄ 동위효소는 피루브산 0.2 mM 이상에서 민감하게 억제되지만 A₄는 5 mM에서도 피루브산에 의해 영향을 받지 않았다는 보고[32, 39]는 본 실험에서 심장조직이 0.2 mM 이상에서 민감하게 억제되는 것은 유사했으나 LDH A₄ 및 LDH A를 지닌 조직도 피루브산 0.3-0.6 mM 이상부터 억제되기 시작되므로 다른 결과를 나타냈다. 또한 LDH의 K_m^{LAC} 는 I의 경우 골격근이 0.93 mM로 가장 낮고, 심장이 1.48, 눈과 뇌조직이 2.04, 2.65 mM이며 간조직이 4.86 mM로 가장 높고, 정제한 LDH A₄는 2.27 mM로 확인되었다. II의 경우 I보다 골격근과 눈조직이 19.03, 25.60 mM로 크게 증가되었고, 심장조직도 3.47 mM로 증가되었다. 그러나 간조직과 뇌조직은 4.20, 1.27 mM로 감소되었다(Table 3). 따라서 K_m^{LAC} 가 K_m^{PYU} 보다 더 크게 확인되었다. V_{max}^{LAC} 는 II의 경우 103.27-183.51 units로 I에 비해 모두 크게 증가되었다(Table 3). II의 심장조직의 LDH는 젖산에 대한 친화력이 낮아졌지만 최대 활성은 27배로 증가되었고, 골격근과 눈조직의 LDH는 최대 활성이 골격근이 2배로 증가되어 증가폭이 가장 낮았고 눈조직은 최대 활성이 40배 크게 증가되었다. 간조직의 LDH는 8월에 젖산에 대한 친화력이 조금 커지고 최대 활성은 9배정도 증가되어 다른 조직에 비해 증가폭이 적었다. 뇌조직의 경우 젖산에 대한 친화력도 8월에 가장 크고 최대 활성도 43배로 가장 크게 증가된 것이 특징적이었다. 조직들 LDH의 B₄ 동위효소 비율이 커지면서 젖산에 대한 친화력이 커졌다. 8월에 뇌조직의 LDH 활성이 가장 크게 증가되어 상대적으로 B₄ 동위효소가 가장 크게 증가되었고, 젖산에 대한 친화력도 커지고 최대 활성도 크게 증가되었으며, 피루브산에 대한 친화력은 낮아졌지만 최대 활성은 증가되었다. 황소개구

Table 3. Kinetic parameters of LDH in various tissues from *Rana catesbeiana* I, II collected from Feb. (I) and Aug. (II)

Tissue	K_m^{PYR} (mM)		V_{max}^{PYR} (units/g)		K_m^{LAC} (mM)		V_{max}^{LAC} (units/g)	
	I	II	I	II	I	II	I	II
Skeletal muscle	0.08	0.13	588.42	504.74	0.93	19.03	76.56	145.77
Heart	0.03	0.19	39.75	269.77	1.48	3.47	4.70	127.39
Liver	0.06	0.12	81.25	40.00	4.86	4.20	12.05	103.49
Eye	0.05	0.10	29.99	19.46	2.04	25.60	4.62	183.51
Brain	0.07	0.24	11.45	161.02	2.65	1.27	2.42	103.27
A ₄	0.09		358.07		2.27		47.81	

리 II 골격근의 K_m^{LAC} 는 흰쥐 골격근 K_m^{LAC} 15-17 mM [15]과 유사하지만 토끼 근 23 mM [39]보다 낮게 측정되었고, 황소개구리 I, II 심장의 K_m^{LAC} 는 토끼 심장 9.34 mM [39]보다 훨씬 낮아 포유류에 비해 심장조직 LDH의 젖산에 대한 친화력이 크게 나타났다. *Rana sylvatica* LDH A₄는 온도가 증가하면 K_m^{PYR} , K_m^{LAC} 값이 증가하여 친화성이 감소되므로 환경 변화에 대해 적응하는 조절과정에서 효소가 역할을 하는 것으로 보고되었다[1]. 황소개구리 I과 II를 비교했을 때 K_m^{PYR} 결과는 유사하였으나 K_m^{LAC} 는 간 및 뇌조직에서 온도가 증가하면 친화력이 증가되므로 다른 결과를 보였다. *Rana perzi* 경우 10°C에서 심장조직의 K_m^{PYR} 0.027 mM이었고, 30°C로 증가시 K_m^{PYR} 0.061 mM로 증가된 보고[23]와 황소개구리 I의 K_m^{PYR} 값은 유사하였으나 황소개구리 II의 K_m^{PYR} 값은 더 크게 증가되는 것으로 확인되었다. *Rana pipiens*의 심장 LDH가 골격근 LDH보다 낮은 농도의 기질에서 억제되었고 젖산보다 피루브산에 대한 K_m 값이 낮게 측정되어[16] 본 실험의 결과와 유사하였다. LDH B₄ 동위효소는 젖산 20-40 mM 이상에서 억제되지만 A₄는 높은 젖산 농도에서도 억제정도가 낮았다. LDH B가 우세한 동위효소가 A가 우세한 동위효소보다 피루브산과 젖산에 대한 K_m 값이 낮았다고 보고하였으나[39] 황소개구리 II의 경우 B가 우세한 심장조직이 A가 우세한 골격근보다 K_m 값이 더 크게 나타나고, I의 경우 골격근의 K_m^{LAC} 이 심장보다 더 낮게 나타나 다른 결과를 나타냈다. 뇌조직에서 정신적인 활동이나 신체 움직임이 시작될 때 혐기적 대사가 커질 수 있다는 보고[33]와 같이, 황소개구리 뇌조직 LDH도 젖산에 대한 내성이 크게 나타났고, II의 LDH 활성도 높게 나타나 혐기적 대사 비율이 높게 확인되었다. 황소개구리 I의 심장조직과 II의 눈조직의 K_m^{PYR} 이 가장 낮아 피루브산과 NADH에 대한 친화력이 가장 크고, 황소개구리 I, II 눈조직의 LDH K_m^{PYR} 값은 가물치 LDH eye-specific C₄ 동위효소 K_m^{PYR} 0.13 mM [29]과 유사하므로 눈조직에서 LDH eye-specific C의 발현과 역할을 뒷받침하였다. 효소에 대한 K_m 은 그 기질의 세포 내 농도와 비슷한 경향이 있으므로, 세포 내에서 저 농도 기질에 작용하는 효소는 고농도 기질에 작용하는 효소보다 대체적으로 K_m 이 낮다[26]. 따라서 황소개구리 I의 LDH의 K_m^{PYR} 이 비교적 작고, 눈조직은 K_m^{PYR} 이 낮으므로 피루브산 농도도 낮은 것으로 보이지만, 젖산에 대한 내성이 크게 나타나므로

특정 조직의 에너지 필요에 따라 젖산과 monocarboxylate 수송체(MCT)를 연관하여 연구가 이루어져야 할 것으로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 2012~2013학년도 청주대학교 산업과학연구소가 지원한 학술연구조성비(특별연구과제)에 의해 연구되었음.

References

1. Abboud, J. and Storey, K. B. 2013. Novel control of lactate dehydrogenase from the freeze tolerant wood frog: role of posttranslational modifications. *Peer J* doi: 10. 7717/peerj.12.
2. Almeida-val, V. M. F. and Val, A. L. 1993. Evolutionary trends of LDH isozymes in fishes. *Com Biochem Physiol* **105**, 21-28.
3. Bartholomew, G. A. 1982. Physiological control of body temperature. pp. 167-211. In: Glans, C. and Pough, F. H. (eds.), *Biology of the Reptilia*, vol. 12. Academic Press.
4. Berner, N. J. and Bessay, E. P. 2006. Correlation of seasonal acclimatization in metabolic enzyme activity with preferred body temperature in the Eastern red spotted newt (*Notophthalmus viridescens viridescens*). *Comp Biochem Physiol* **144**, 429-436.
5. 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.
6. Chen, F., Zeng, K., Pan, S. and Yang, M. 1991. A comparative research of zymograms of lactate dehydrogenase in different tissues of 25 species of vertebrates. *J Northsea For Univ* **2**, 56-64.
7. Chippari-Gomes, A. R., Leitao, M. A. B., Paula-Silva, M. N., Mesquita-Saad, L. S. B. and Almeida-Val, V. M. F. 2003. Metabolic adjustments in *Satanoperca aff. Jurupari* (Perciformes, Cichlidae). *J Genet Mol Biol* **26**, 27-32.
8. Cho, S. K. 2000. Mitochondrial lactate dehydrogenase in tissues of vertebrate. pp. 88. Ph D. Thesis Cheongju Univ. Korea.
9. Cho, S. K. and Yum, J. J. 1996. Adaptational phenotype of lactate dehydrogenase isozymes in *Pseudogobio esocinus* by

- the environmental variation. *J Ind Sci Res Cheongju Univ Korea* **14**, 333-343.
10. Cho, S. K., Park, S. Y. and Yum, J. J. 1993. Purification and immunochemistry of lactate dehydrogenase in *Lampetra japonica*. *Korean J Zool* **36**, 505-513.
 11. Cho, S. K. and Yum, J. J. 2005. Changes of activities and isozymes of lactate dehydrogenase in *Coreoperca herzi* and *Pseudogobio esocinus* acclimated to rapid increase of dissolved oxygen. *J Life Sci* **15**, 71-79.
 12. Coppo, J. A., Mussart, N. B. and Fioranell, S. A. 2005. Blood and urine physiological values in farm-cultured *Rana cat-esbeiana* (Anura: Ranidae) in Argentina. *Rev Biol Trop* **53**, 545-559.
 13. Crocker, C. D., Chapman, L. J. and Martinez, M. L. 2013. Hypoxia-induced plasticity in the metabolic response of a widespread cichlid. *Comp Biochem Physiol* **166**, 141-147.
 14. Davis, B. J. 1964. Disc electrophoresis-II. Method and application to human serum proteins. *Ann N Y Acad Sci* **121**, 404-427.
 15. Favero, T. G., Stavianeas, S. and Klug, G. A. 1999. Training-induced alterations in lactate dehydrogenase reaction kinetics in rats: A re-examination. *Exp Physiol* **84**, 989-998.
 16. Goldberg, E. and Wantch, T. 1967. Electrophoretic and kinetic properties of *Rana pipiens* lactate dehydrogenase isozymes. *J Exp Zool* **165**, 101-110.
 17. Goldberg, E., Eddy, E. M., Duan, C. and Odet, F. 2010. LDH C : The ultimate testis-specific gene. *J Androl* **1**, 86-94.
 18. Hill, R. W. 1980. *Fisiologia animal comparada*. 610p. Reverte, Barcelona.
 19. Kim, M. O. and Yum, J. J. 1989. Purification, kinetics and immunochemistry of two homotetrameric lactate dehydrogenase isozymes in *Pseudogobio esocinus* (Cypriniformes). *Korean J Zool* **32**, 420-428.
 20. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
 21. Li, D. J. 1994. Seasonal changes of lactate dehydrogenase isozymes and blood glucose concentration in *Nyctus noctula* and *Rana nigromaculata*. *Sheng Li Xue Bao* **46**, 267-272.
 22. Martinez, G., Behres, P. and Coppes, Z. 1994. pH and temperature influences on the K_m values of LDH A_4 from white muscles of two eurythermal sciaenid fishes. *Comp Biochem Physiol* **107**, 645-648.
 23. Mendiola, P. and De Costa, J. 1991. The effects of temperature and pH on the kinetic properties of heart muscle lactate dehydrogenase from anuran amphibians. *Comp Biochem Physiol* **98**, 529-534.
 24. Michaelidis, B., Kyriakopoulou-Sklavounou, P., Staikou, A., Papanthasiou, I. and Konstantinou, K. 2008. Glycolytic adjustments in tissues of frog *Rana ridibunda* and land snail *Helix lucorum* during seasonal hibernation. *Comp Biochem Physiol* **151**, 582-589.
 25. Molina, R., Mendiola, P. and De Costa, J. 1987. Seasonal changes in the activities of glycolytic enzymes from liver and skeletal muscle of *Rana perizi*. *Rev Esp Fisiol* **43**, 497-502.
 26. Nelson, D. L. and Cox, M. M. 2008. *Principle of Biochemistry*, pp. 183-233. 5th eds., W. H. Freeman and Company, New York.
 27. O'Carra, P. and Barry, S. 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.
 28. O'Carra, P., Barry, S. and Corcoran, E. 1974. Affinity chromatographic differentiation of lactate dehydrogenase isoenzymes on the basis of differential abortive complex formation. *FEBS Lett* **43**, 163-168.
 29. Park, E. M. and Yum, J. J. 2010. Purification and characterization of lactate dehydrogenase Isozymes in *Channa argus*. *J Life Sci* **20**, 260-268.
 30. Pesce, A. R., McKay, H., Stolzenbarch, F., Cahn, R. and Kaplan, N. O. 1964. The comparative enzymology of lactic dehydrogenases. I. Properties of the crystalline beef and chicken enzyme. *J Biol Chem* **239**, 2753-1761.
 31. Pinder, A. W., Storey, K. B. and Ultsch, G. R. 1992. Estivation and hibernation. pp. 250-274. In: Feder, M. E. and Burggren, W. W. (eds.), *Environmental Physiology of the amphibians*. University of Chicago Press, Chicago.
 32. Plagemann, P. G. W., Gregory, K. F. and Wroblewski, F. 1960. The electrophoretically distinct forms of mammalian lactic dehydrogenase. II. Properties and interrelationships of rabbit and humal lactic dehydrogenase isozymes. *J Biol Chem* **235**, 2288-2293.
 33. Quistorff, B., Secher, N. H. and Van Lieshout, J. J. 2008. Lactate fuels the human brain during exercise. *FASEB J* **22**, 3443-3449.
 34. Shaklee, J. B. and Whitt, G. S. 1981. Lactate dehydrogenase isozymes of Gadiform fishes divergent patterns of gene expression indicate a heterogeneous taxon. *Copeia* **3**, 567-578.
 35. Sidell, B. D. and Beland, K. F. 1980. Lactate dehydrogenases of atlantic hagfish: Physiological and evolutionary implications of a primitive heart isozyme. *Science* **207**, 769-770.
 36. Somero, G. N. and Hochachka, P. W. 1971. Biochemical adaptation to the environment. *Amer Zool* **1**, 159-167.
 37. St. Pierre, J. and Boutilier, R. G. 2001. Aerobic capacity of frog skeletal muscle during hibernation. *Physiol Biochem Zool* **74**, 390-397.
 38. St. Pierre, J., Charest, P. and Guderley, H. 1998. Relative contribution of quantitative and qualitative changes in mitochondria to metabolic compensation during seasonal acclimatization of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *J Exp Biol* **201**, 2961-2970.
 39. Stambaugh, R. and Post, D. 1966. Substrate and product inhibition of rabbit muscle lactic dehydrogenase heart(H₄) and muscle(M₄) isozymes. *J Biol Chem* **241**, 1462-1467.
 40. Tsuju, S., Qureshi, M. A., Hou, E. W., Fitch, W. M. and Li, S. S. 1994. Evolutionary relationships of lactate dehydrogenases(LDHs) from mammals, birds, an amphibian, fish, barley, and bacteria: LDH cDNA sequences from *Xenopus*, pig, and rat. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**, 9392-9396.
 41. Tylicki, A., Masztaletuk, D. and Strumilo, S. 2006. Differences in some properties of lactate dehydrogenase from muscle

- of the carp *cyprinus carpio* and *salmo gairdneri*. *Comp Onto Biochem* **42**, 143-147.
42. Voiruron, Y., Storey, J. M., Grenot, C. and Storey, K. B. 2002. Freezing survival, body ice content and blood composition of the freeze-tolerant European common lizard *Lacerta vivipara*. *J Comp Physiol B* **172**, 71-76.
43. Wang, D., Wei, L., Wei, D., Rao, X., Qi, X., Wang, X. and Ma, B. 2013. Testis-specific lactate dehydrogenase is expressed in somatic tissues of plateau pikas. *FEBS Open Bio* **3**, 118-123.
44. Whitt, G. S. 1970. Developmental genetics of the lactate dehydrogenase isoenzymes of fish. *J Exp Zool* **175**, 1-35.
45. Yum, J. J. 2008. Characterization of lactate dehydrogenase in *Acanthogobius hasta*. *J Life Sci* **18**, 264-272.
46. Yum, J. J. and Yeon, J. H. 2012. Lactate dehydrogenase and monocarboxylate transporters 1, 2, and 4 in tissues of *Micropterus salmoides*. *J Life Sci* **22**, 98-109.
47. Zhou, J., Zheng, Y. and Jin, S. 2006. Purification and characterizations of lactate dehydrogenase isozyme of Bullfrog. *J Zool* **25**, 244-246.

초록 : 황소개구리(*Rana catesbeiana*) 조직의 젖산탈수소효소의 역학적 특성

염정주* · 하은성

(청주대학교 생명과학과)

황소개구리(*Rana catesbeiana*) I (2월)과 II (8월) 조직의 젖산탈수소효소(EC. 1.1.1.27, lactate dehydrogenase, LDH) 동위효소의 발현 및 역학적 특성을 확인하였다. I의 골격근에서 LDH 활성, A₄ 동위효소 및 LDH/CS (EC 4.1.3.7, citrate synthase)가 높게 측정되었고, II의 여러 조직에서 LDH B₄ 동위효소의 활성이 증가되었으며, 특히 심장과 뇌조직에서 LDH 활성이 크게 확인되었다. 면역침강반응 후 native-PAGE에 의해 눈조직에서 LDH eye-specific C 동위효소가 확인되었고, LDH C가 LDH B에 유사한 것으로 확인되었다. LDH A₄ 동위효소를 oxamate-linked affinity chromatography로 정제하였고, 하부단위체 A의 분자량은 32.0 kDa이었다. II의 LDH는 K_m^{PYU} 이 높았고, 심장과 뇌조직의 V_{max}^{PYU} 이 높았으며, 조직들의 V_{max}^{LAC} 도 높고, 젖산에 대한 내성이 큰 것으로 확인되었다. 그리고 정제한 A₄ 동위효소와 눈조직 LDH가 젖산에 대한 내성이 가장 크게 확인되었다. K_m^{LAC} 가 K_m^{PYU} 보다 컸다. 피루브산 10 mM에 의해 I, II 조직 LDH의 하부단위체 B의 비가 증가함에 따라 LDH 활성의 억제정도가 높았다. 실험 결과, 황소개구리에서 LDH eye-specific C가 확인된 것이 특징적이었고, 황소개구리 I의 골격근 LDH의 활성이 높아 혐기적 대사가 우세하였으며, 황소개구리 II의 경우 LDH B가 증가되고 젖산에 대한 내성이 커져 잘 적응되어진 것으로 사료된다.