

Metabolism of Lactate Dehydrogenase in Tissues from *Ldh-C* Expressed Fish at Starved State

Jung Joo Yum* and Gyu Dong Kim

Department of Life Science, Cheongju University, Cheongju 28503, Korea

Received October 29, 2015 / Revised February 19, 2016 / Accepted February 20, 2016

Metabolism of lactate dehydrogenase (EC 1.1.1.27, LDH) was studied to identify the function of LDH-C. Tissues of LDH liver-specific *Ldh-C* expressed *Carassius auratus* and eye-specific *Ldh-C* expressed *Lepomis macrochirus* after starvation were studied. LDH activity in liver tissue from *C. auratus* was increased after starvation. And LDH specific activity (units/mg) and LDH/CS were increased in tissues. It means the anaerobic metabolism was taking place in *C. auratus* after starvation. LDH B₄ isozyme was decreased in skeletal muscle and increased in heart tissue. LDH C₄ isozymes those showed in eye and brain tissues were identified as liver-specific C₄ isozymes and disappeared after starvation. And C hybrid in eye, A₄ isozyme in brain, and both C hybrid and C₄ isozyme in liver tissue were increased, respectively. In *L. macrochirus*, the level of variation of LDH activities was low but greatly increased especially in eye tissue and LDH A₄ and AC hybrid were increased in brain tissue. The LDH activities in tissues from *C. auratus* and *L. macrochirus* remained 30.30-18.64% and 25-18.75%, respectively, as a result of the inhibition by 10 mM of pyruvate. The K_m^{PYR} values of LDH in *C. auratus* were increased. As a result, LDH liver-specific C₄ isozyme was expressed in liver, brain and eye tissues during starvation. It seems metabolism of lactate was predominant in brain tissue. After starvation, the liver-specific LDH-C was affected more than eye-specific LDH-C.

Key words : *Carassius auratus*, K_m^{PYR} , lactate dehydrogenase, *Lepomis macrochirus*, starvation

서 론

젖산탈수소효소(EC. 1.1.1.27, lactate dehydrogenase, LDH)는 NADH/NAD⁺의 존재하에 피루브산과 젖산을 상호 전환시키는 *Ldh-A, B, C*에 의해 사량체로 만들어진 동위효소이다[25]. LDH는 혐기적 대사에 관여하는 것으로 알려져 있으며 LDH A₄ 동위효소는 피루브산을 젖산으로, B₄ 동위효소는 젖산을 피루브산으로 전환시켜 생명체가 처한 환경에 따라 LDH 동위효소를 조절하고, 종·조직에 따라 특이성을 나타내므로 조직의 LDH 동위효소의 조성에 따라 대사를 확인할 수 있다[12]. 또한 LDH/CS (EC. 4.1.3.7, citrate synthase, CS)로서 조직내 혐기적대사/호기적대사 비율을 확인할 수 있다[42]. 젖산과 피루브산은 원형질막 또는 미토콘드리아막의 monocarboxylate transporter (MCT)에 의해 수송되어 산화적 에너지 생성에 관여된다는 lactate shuttle로써 설명되고[5] 종양세포의 산화적 대사 기질로도 사용되며[15, 24], 피루브산이 눈과 뇌조직에서 항산화제로서 기능을 하는 것으로 보고되어[46]

중요성이 대두되고 있다. 그리고 LDH C₄ 동위효소는 포유류와 조류의 특정 종의 정소에서만 발현되어 LDH testis-specific C₄라 하였고 정자에서 에너지 생성과정의 ATP 항상성에 관여되는 것이 밝혀졌으며, 난자에서도 확인 됨이 보고되었다[10, 19, 29]. 최근 저산소내성 토끼인 *Ochotona curzoniae*의 골격근에서도 확인되었고[44], 종양세포 형성 단계에서도 급격하게 발현되어 암 지표 유전자로 사용되는 것으로 보고되었다[23, 37]. 또한 어류 농어목의 눈조직에서 발현되는 LDH eye-specific C₄와 잉어목과 대구목의 간조직에서만 발현되는 LDH liver-specific C₄ 동위효소가 왜 특정 종의 특정조직에서만 발현되는지에 대해 연구 중이지만 에너지 생성과정에서의 LDH-C의 기능에 대해서는 미흡한 실정이다. LDH eye-specific C₄는 로돕신 재생성에 중요한 역할을 하고 NADH/NAD⁺ 전환에 작용하는 것으로 알려진 후[48] 농어목 얼룩동사리(*Odontobut isinterrupta*) 및 풀망둑(*Acanthogobius hasta*)의 눈과 뇌조직에서 LDH C₄ 활성이 높으나 가물치(*Channa argus*)에서 LDH 활성이 상대적으로 낮게 확인되어 서식 방법과 먹이 습득 행동 방식에 따라서 활성이 다른 것으로 보고되었다[32, 33, 50]. 또한 용존산소를 급격히 증가시킨 환경에 격지와 모래무지를 순응시킨 경우 골격근에서 LDH A₄가 증가되나, 심장조직에서 B₄가 증가되었고[8], 온도를 증가 시켰을 경우 *Ldh-C*가 발현된 간조직은 C₄를 증가시켜 조절하였으므로[21] 종과 조직의 산소수요와 관련된 LDH 동위효소의 발현에 대한 문제도 제기된 바 있다. 그리고 LDH liver-specific C₄ 동위효소는

*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.

잉어목과 대구목의 간조직에서만 나타나는 것으로 보고되었고[34], 온도에 따른 대구 백색근과 간조직 LDH의 특성[52] 및 붕어 간조직의 LDH 및 MCT 발현에 대한 연구에 의하면 LDH가 세포질은 물론 피육시중에서도 NADH/NAD⁺ 전환에 관여되는 것이 보고되어[49] 에너지 대사와의 관련성이 대두되었다. 따라서 본 실험에서 LDH-C의 기능을 확인하기 위해서 기아 조건에서 *Ldh-C*의 발현을 연구하고자 하였다.

기아는 많은 어류가 자연환경에서 이동과 생식 중에 겪고, 견뎌내야 하는 상황이므로[20, 27], 기본과정을 유지하기 위한 에너지를 얻기 위해 저장 대사를 동원하며 종에 따른 대사적 변화를 필요로 하므로[45] 종의 섭식 습관이 먹이 부족에 대한 대사 반응에 영향을 미친다고 보고하였다[3]. 일부 어종에서, 먹이 고갈에 직면해 우선시되는 에너지원은 간 글리코젠이고[26], 이후 저장 지방, 근 단백질 순으로 사용된다[30]. 그러나 일부 종은 간 글리코젠을 보존하기 위해 지방 또는 단백질을 에너지 기질로서 동원하여 당신생성을 한다[18]. 따라서 기아 상태의 어류에서 케톤체가 중요한 에너지원이 아니라는 보고와[2] 케톤체가 중요 기관의 활성을 유지한다는 보고가[13, 40] 논쟁 중이다. 피루브산, 젖산 및 케톤체 같은 monocarboxylates는 탄수화물, 지방, 아미노산 대사에서 중심 역할을 하므로, 에너지 공급이 제한 될 때 모든 조직에 에너지를 공급하기 위해 중심이 되며[28], monocarboxylates는 세포의 원형질막, 미토콘드리아막 및 피육시중에서도 MCT에 의해 수송되어 LDH에 의해 에너지를 생성하는 것으로 확인되었다[6]. 기아와 재섭식이 농어(*Dicentrarchus labrax*)의 혈장내 대사물, LDH 및 CS에 영향을 미치고[7], 단식시킨 쥐에서 MCT를 조절하여 조직에 에너지를 공급한다는 보고[22] 및 오랜 기아 상태의 철갑상어와 송어에 대한 대사 효과가 보고되었지만[16], LDH 동위효소의 대사와 관련된 보고는 미흡한 실정이다.

따라서 LDH-C의 기능을 확인하는 연구의 일환으로 liver-specific *Ldh-C*가 발현되는 붕어와 eye-specific *Ldh-C*가 발현되는 파랑볼우럭을 기아상태로 일정기간 유지시키면서 *Ldh-C*가 발현되는 조직과 *Ldh-A, B*만 발현되는 조직에서 LDH 대사를 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

실험 재료, 환경 조건 및 조직 추출액 준비

경골어류 잉어목 붕어과 붕어(*Carassius auratus*, 20~25 cm)는 충청북도에 위치한 생체 시료상에서 구입하였고, 농어목 검정우럭과 파랑볼우럭(*Lepomis macrochirus*, 13~15 cm)은 충청북도 보은군 회남면 용호리 저수지에서 채집하여 기포발생기(DH-10000, 대화전자산업사)를 사용하여 살아있는 상태로 실험실 수조(90×30×45 cm)에 운반하였으며, 온도 20±1°C, pH 7±0.5, DO 6±1 ppm 조건에서 사육하였다. 붕어는 1월 28일부

터 6주간, 그리고 파랑볼우럭은 2월 1일부터 4주간 기아 상태로 순응 시킨 후 LDH의 변화를 확인하였다. 기아상태가 시작된 첫날을 대조군(이하 C, n=5), 마지막 날을 기아군(이하 S, n=5)으로 표기하였다.

붕어 및 파랑볼우럭 대조군과 기아군의 골격근, 심장, 간, 눈 및 뇌조직을 적출하고 혈액을 제거한 후 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. 본 실험은 청주대학교 동물실험윤리위원회의 승인(승인번호: CJUIACUC - B131008)을 받아 동물윤리 준칙에 의거하여 실험을 진행하였다.

Lactate dehydrogenase와 citrate synthase의 활성 측정 및 단백질 정량

LDH 활성은 Whitt의 방법을 변형하여 0.5 mM 피루브산과 0.14 mM NADH를 포함한 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 6.85) 3 ml에 시료를 가한 다음 NADH로부터 NAD⁺로 산화되는 정도를 분광광도계(UV-160A, Shimadzu)를 사용하여 25°C, 340 nm에서 측정하였다[47, 51]. CS 활성은 0.2 mM acetyl-CoA, 0.1 mM 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB), 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[41]. 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[4], LDH 및 CS의 비활성(units/mg)을 각각 구하여 대사를 확인하였다.

Native-polyacrylamide gel 전기영동

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[11]. 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[47].

Lactate dehydrogenase의 면역침강반응 및 Western blotting

붕어 간, 눈 및 뇌 조직 추출물에 대구(*Gadus macrocephalus*) LDH liver-specific C₄와 고등어(*Scomber japonicus*) LDH

eye-specific C₄ (anti-LDH liver-specific C₄, anti-LDH eye-specific C₄)에 대한 항혈청[7, 35]을 각각 1:0.5, 1:1(v/v)로 가하고 25°C에서 1시간, 4°C에서 12시간 방치시킨 후 4°C, 20,000× g에서 1시간 동안 원심분리 한 후 상등액을 전기영동하여 항원-항체 복합체를 이루지 않은 LDH 동위효소를 확인하였다. 붕어 눈조직 추출액을 native-PAGE 한 후 LDH를 확인하기 위해 Western blotting 하였고, 1차 항체는 본 연구실에서 제작한 LDH liver-specific C₄에 대한 항혈청(1:200)을 사용하였다[9]. Native-PAGE 후 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 TBS 용액으로 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, 1:500~1:1,000) 용액에서 1시간 반응시키고 TBS 용액으로 10분간 3회 세척하였다. 전개 용액(chloronaphthol, methanol, TBS, 30% H₂O₂)으로 반응시키고 증류수로 세척한 후 밴드를 확인하였다.

LDH의 피루브산에 대한 기질의존성 측정

피루브산 0.01~10 mM에서 붕어와 파랑볼우럭 대조군과 기아군의 골격근, 심장, 간, 눈 및 뇌조직 추출액의 LDH 활성을 측정하였고, 최대 활성을 기준으로 측정된 활성(V/Vmax, %)으로 피루브산에 대한 억제 정도를 확인 하였으며, Lineweaver-Burk plot에 의해 조직별 Km^{PYR}과 Vmax^{PYR}을 구하였다.

결과 및 고찰

기아상태 붕어의 lactate dehydrogenase와 citrate synthase 활성과 단백질 정량

LDH-C의 기능을 확인하기 위해서 LDH liver-specific C가 발현되는 붕어를 기아상태로 유지시킨 후 대조군과 기아군의 골격근, 심장, 간, 눈 및 뇌조직의 LDH 활성을 비교하였다 (Table 1). 기아군 골격근의 LDH 활성은 대조군과 거의 유사하였고, 눈과 뇌조직은 조금 증가되었으나, 심장은 126.17 units로 3.06배, 간조직은 243.08 units로 6.87배로 가장 크게 증가되었다. 따라서 DO가 급격히 증가 시 켜지의 뇌와 간조직 LDH 활성의 변화가 컸고, 모래무지 간조직에서도 LDH 활성이 증가되었다는 결과[8]와 유사하였다. 단백질양은 기아군에서 심장 37.94 mg, 간조직 35.29 mg으로 증가되었고, 골격근,

Table 1. LDH activity, CS activity and protein concentration in various tissues from *C. auratus* and *L. macrochirus* (C: control; S: starvation)

Species	Tissues		LDH activity (units/g)	CS activity (units/g)	Protein (mg/g)	LDH/CS	Specific activity		
							LDH (units/mg)	CS (units/mg)	
<i>C. auratus</i>	Skeletal muscle	C	147.58±0.58	2.30±0.11	42.34±0.92	64.17	3.49	0.054	
		S	151.64±0.13*	1.09±0.05*	28.18±0.96*	139.12	5.38	0.039	
	Heart	C	41.19±0.45	2.07±0.19	18.14±1.46	19.90	2.27	0.114	
		S	126.17±2.41*	1.32±0.06*	37.94±1.32*	95.58	3.33	0.035	
	Liver	C	35.40±1.09	0.89±0.01	25.94±0.73	39.78	1.36	0.034	
		S	243.08±2.52*	2.02±0.05*	35.29±0.68*	120.34	6.89	0.057	
	Eye	C	30.77±0.09	1.89±0.10	77.82±0.67	16.28	0.40	0.024	
		S	44.08±0.11*	0.75±0.02*	68.32±0.84*	58.77	0.65	0.011	
	Brain	C	109.96±5.79	2.62±0.40	27.37±1.12	41.97	4.02	0.096	
		S	119.51±1.87	2.12±0.12*	14.62±1.35*	56.37	8.17	0.145	
	<i>L. macrochirus</i>	Skeletal muscle	C	233.05±3.54	1.55±0.07	49.96±0.90	150.36	4.66	0.031
			S	202.57±3.06*	0.12±0.01*	47.51±0.63*	1688.08	4.26	0.003
Heart		C	199.67±1.93	2.78±0.11	120.45±1.74	71.82	1.66	0.023	
		S	84.28±1.81*	0.60±0.03*	45.13±1.50*	140.47	1.87	0.013	
Liver		C	5.95±0.01	0.76±0.06	47.61±0.61	7.83	0.13	0.016	
		S	5.07±0.03*	0.55±0.01*	43.36±0.78*	9.22	0.12	0.013	
Eye		C	20.28±0.71	1.24±0.07	61.88±0.52	16.36	0.33	0.020	
		S	23.38±0.28*	0.11±0.01*	60.59±0.51*	212.55	0.39	0.002	
Brain		C	58.69±0.35	0.86±0.08	83.85±1.34	68.24	0.70	0.010	
		S	42.54±0.71*	0.37±0.01*	10.37±0.55*	114.95	4.10	0.036	

Data are mean ± SD, n=5, *Significantly different from the corresponding control value using the Student's t-test, p<0.05.

눈 및 뇌조직의 단백질량은 감소되었지만 LDH 비활성(units/mg)은 골격근, 심장, 간, 눈, 및 뇌조직에서 모두 증가되었다. 특히 간조직이 6.89로 5.03배 증가되었고, 뇌조직이 8.17로 2.03배 증가되었다. CS 활성은 기아군 간조직만 2.02 units로 증가되었고, 다른 조직은 감소되었다. LDH/CS는 기아군의 심장이 95.58로 4.8배, 간조직이 120.34로 3.04배, 눈 58.77, 골격근 139.12, 뇌조직 56.37로 모두 증가되어 혐기적 대사 비율이 증가되었다. 송어는 먹이 섭취를 차단시킨 후 간조직의 LDH 활성이 5일부터 급격히 증가한 후 기아 기간 동안 일정하게 유지되어, 6주에 2,100 units/mg와 비교하면 붕어 간조직은 6,888 units/mg 이므로 LDH 활성이 큰 것으로 확인되었다. 그리고 송어 백색근 LDH 활성은 11 units/mg로 큰 변화를 나타내지 않았고, 기아 기간 중에 당신생 기질로 젖산을 우세하게 이용한다는 보고[16]와 비교시 붕어 골격근 5.38 units/mg이므로 낮게 확인되었다. 따라서 기아 기간 중에 종에 따라 생존 기구를 갖고 있으며, 골격근보다 간조직에서 종에 따라 현저하게 대사적 차이를 나타냈다는 보고[16,17]와 유사하였다. 그러나 기아군 붕어 뇌조직의 LDH 비활성이 8.17 units/mg 이므로 lung fish *Arapaima gigas* 뇌조직의 LDH 비활성 140 units/mg, *Protopterus aethiopicus* 뇌조직의 LDH 비활성 58 units/mg 및 얼룩동사리 뇌조직의 LDH 비활성 51.45 units/mg보다 상당히 낮게 나타났다[14, 33].

따라서 본 실험결과 간조직에서 LDH 활성이 증가된 것은 호모군 폐육시즘 내에서 LDH가 확인되었고, NADH를 재산화 하는 장소라는 보고[43], 전자현미경에 의해 간조직에서 세포질 뿐만아니라 폐육시즘에 LDH가 확인되었다는 보고[1]와 원형질막, 미토콘드리아 및 폐육시즘 막에서 MCT를 확인하여 폐육시즘의 산화환원균형에 대한 증명은 물론 지방 대사와의 관련성을 제시한 결과[49]로 뒷받침될 수 있다.

기아상태 파랑볼우리의 lactate dehydrogenase와 citrate synthase 활성과 단백질 정량

LDH eye-specific C₄가 발현되는 파랑볼우리의 경우 대조군과 기아군 조직의 LDH 활성을 측정하였다(Table 1). 기아군 골격근조직의 LDH 활성은 202.57 units, 심장 84.28 units, 간 5.07 units, 눈 23.38 units 및 뇌조직 42.54 units로, 대조군에 비해 눈조직만 조금 증가되었고 심장조직이 가장 크게 감소되었으며, 간조직도 감소되었다. 따라서 기아군 붕어 간조직 LDH 활성의 변화 폭이 큰 것에 반해 파랑볼우리는 변화 정도가 작았다. 따라서 DO 증가에 순응 시 LDH liver-specific C₄가 발현된 모래무지가 LDH eye-specific C₄가 발현된 꺾지에 비해 LDH 활성이 크게 증가되었고, 동위효소의 변화 정도도 크게 나타냈다는 보고[8]와 유사하였다. 단백질량은 기아 후 심장조직이 45.13 mg으로 크게 감소되었으나 LDH 비활성은 심장, 간 및 눈조직이 거의 유사하였고, 뇌조직은 10.37 mg으로 크게 감소되어 LDH 비활성이 4.10 units/mg으로 5.86배 증가된 것

이 특징적이었다. 붕어의 경우 뇌조직의 비활성이 대조군에 비해 2.03배 증가되었으나, 파랑볼우리 뇌조직에서 크게 증가되어 뇌조직에서의 LDH의 역할을 확인할 수 있었다. 그러나 LDH eye-specific C₄를 지닌 얼룩동사리 뇌조직의 LDH 비활성 25.22 units/mg [33]에 비해 상당히 낮았다.

파랑볼우리의 CS 활성은 대조군의 심장조직이 2.78 unit로 가장 컸으며, 기아군 모든 조직에서 활성이 감소되었고, LDH/CS의 경우 모든 조직에서 증가되었다. 골격근이 150.36에서 1688로, 눈조직이 16.36에서 212.55로 크게 증가되어 혐기적 대사를 하는 것으로 확인되었으며, 심장 140.47, 뇌조직 114.95로 증가되어 혐기적 대사가 조금 더 우세하였으나, 간조직의 경우 9.22로 조금 증가되어 혐기적 대사 비율이 가장 낮고 변화 폭이 작았다. 따라서 LDH/CS 경우, LDH liver-specific C₄가 발현되는 붕어의 경우 기아 시 간조직에서 증가 폭이 컸으나 LDH eye-specific C₄를 지닌 파랑볼우리의 경우 골격근과 눈조직에서 증가 폭이 큰 것으로 확인되었다. 얼룩동사리 CS 비활성이 0.35-0.50 units/mg으로 낮다는 보고[33]와 비교해 파랑볼우리 CS 비활성은 0.01 units/mg으로 더욱 낮게 확인되었고, 가물치의 CS 활성 10.9~20.7 units와 비교하여도 파랑볼우리의 CS 활성이 낮았으며, LDH/CS도 가물치 간 0.09, 눈 10.9 및 뇌조직 11.6[32]과 비교해 파랑볼우리가 상당히 높아 혐기적 대사가 우세한 것으로 나타났다. 그러나 풀망둑의 LDH 활성 눈 53.25, 뇌 28.79 및 간조직 3.67 units에 비해 파랑볼우리 LDH 활성은 눈조직에서 낮았지만 뇌조직에서 높았으며, 풀망둑 눈조직의 LDH/CS 6.38[50]에 비해 특히 파랑볼우리 눈조직이 212.55로 높게 확인되어 혐기적 대사를 하며 눈조직에서 젖산 대사의 중요성이 확인되었다.

기아상태 붕어 LDH 동위효소의 native polyacrylamide gel electrophoresis, 면역침강반응 및 Western blot

잉어목과 대구목 종의 간조직에서만 LDH liver-specific C₄가 확인되는 것으로 보고되었으나[34, 35, 39], LDH-C₄가 간조직 뿐만 아니라 기아 대조군의 눈과 뇌조직에서 나타나므로 LDH liver-specific C₄와 LDH eye-specific C₄에 대한 항체를 사용하여 면역침전 및 Western blotting하여 확인하였다(Fig. 1). 붕어 간조직에 anti-LDH liver-specific C₄를 1:0.5와 1:1로 반응시 C₄ 동위효소가 없어졌지만, anti-LDH eye-specific C₄를 반응시킨 경우 모든 밴드가 확인되었다. 따라서 C₄ 밴드가 LDH liver-specific C₄로 확인되어(Fig. 1.1-3) Yeon의 결과[49]가 재확인되었다. 붕어 뇌와 눈 조직에 anti-LDH liver-specific C₄를 1:1로 반응시 뇌조직은 A₄, A₂B₂가 확인되었고, B₄, C hybrid, C₄ 밴드가 매우 흐려졌으며, 눈조직은 A₄만 남았고 다른 밴드는 없어졌다. 그러나 anti-LDH eye-specific C₄에 반응시키면 모든 밴드가 나타나므로 뇌와 눈조직의 C₄ 밴드도 liver-specific C₄인 것으로 확인되었다(Fig. 1.4-9). 그리고 눈조직에 anti-LDH liver-specific C₄를 사용하여 Western blotting

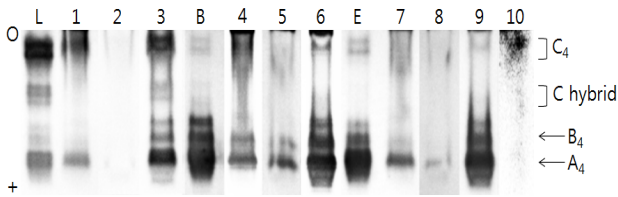


Fig. 1. Immunoprecipitation and Western blotting (W) of LDH isozymes in various tissues of *C. auratus* using antiserum from *Scomber japonicus* LDH eye-specific C₄ (anti-LDH eye-specific C₄) and *Gadus macrocephalus* LDH liver-specific C₄ (anti-LDH liver-specific C₄). L, liver; 1, L+anti-liver C₄ (1:0.5); 2, L+anti-eye C₄ (1:0.5); 3, L+anti-eye C₄ (1:0.5); B, brain; 4, B+anti-liver C₄ (1:0.5); 5, B+anti-liver C₄ (1:1); 6, B+anti-eye C₄ (1:0.5); E, eye; 7, E+anti-liver C₄ (1:0.5); 8, E+anti-liver C₄ (1:1); 9, E+anti-eye C₄ (1:0.5); 10, (W) E+anti-liver C₄.

한 결과 C hybrid가 흐리게 나타나고 C₄ 밴드가 확인되었다 (Fig.1.10). 따라서 간, 뇌 및 눈조직에서 나타나는 C₄ 동위효소는 LDH liver-specific C₄인 것으로 확인되었고, C₄ 동위효소가 A₄ 동위효소보다 B₄ 동위효소와 더 유사한 것으로 확인되었다. 기아 후에 골격근조직은 A₄가 강하고, A₃B₃가 약하게 나타나고 B₄와 A₂B₂ 동위효소는 감소되었다(Fig. 2M). 기아가 진행되면서 B₄ 활성이 낮아진 것으로 확인되었다. 심장조직은 A₄와 A₃B₃, A₂B₂가 나타나고 B₄가 증가되었다(Fig. 2H). 간조직은 A₄가 조금 감소하고, A₃B₃는 증가되나 B₄는 나타나지 않았고, C hybrid와 C₄ 활성이 증가되었다(Fig. 2L). 용존산소를 급격히 증가시킨 환경에 모래무지를 순응시 골격근은 A₄가 증가되고 다른 조직은 B₄가 증가되나 간조직은 liver-specific C₄가 증가되고 A₄가 감소되어 조절되었다는 보고[8]와 유사하였다. 눈조직은 기아 초기에 A₄, A₂B₂가 강하고, B₄와 C hybrid가 흐리고, C₄ 활성이 뚜렷이 나타났으므로 Yeon의 보고[49]에 비해 C hybrid와 C₄가 뚜렷하게 나타난 것이 특징적이었다. 기아 후 A₄, A₂B₂, B₄가 증가되었고, C hybrid가 조금 증가되나 C₄가 나타나지 않았다(Fig. 2E). 뇌조직도 A₄, A₃B₃, A₂B₂, B₄가 확인되었고 C₄ 밴드가 진하게 확인되었으나, 기아 후 A₄와 A₃B₃ 활성이 증가되었고, A₂B₂, A₃B₃, B₄가 조금 감소되고 C hy-

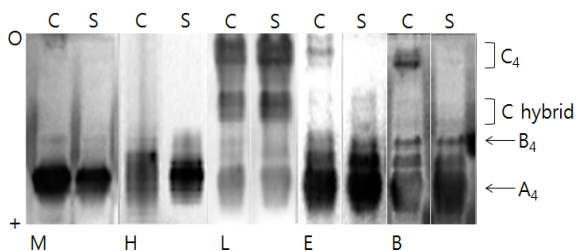


Fig. 2. Native-polyacrylamide gel electrophoresis zymograms of LDH isozymes in tissues from *C. auratus* (C: control; S: starvation). M, skeletal muscle; H, heart; L, liver; E, eye; B, brain.

brid가 약해지나, C₄ 밴드는 나타나지 않았다(Fig. 2B). 기아 초기 대조군 뇌조직에서 C₄가 확인되었지만, 시간이 길어지면 A₄가 증가되고 C₄ 동위효소가 나타나지 않으므로 젖산이 생성되는 방향으로 대사가 진행되는 것이 특징적이었다.

기아상태 파랑볼우럭 LDH 동위효소의 native polyacrylamide gel electrophoresis

파랑볼우럭 조직을 전기영동한 결과(Fig. 3), 기아 시 대조군에 비해 골격근은 A₄가 증가되나 A₂B₂와 B₄ 동위효소는 감소되어 흐리게 확인되었다. 심장은 A₄와 B₄가 조금 감소되었고, 간조직은 A₄가 나타나고 A₂B₂는 증가되고 B₄ 동위효소는 감소되었다. 눈은 B₄ 동위효소가 감소되었고, A₄는 유사하였으며, A₂B₂는 증가되었고, C hybrid와 C₄는 감소되었다. 뇌조직은 A₄ 및 AC hybrid가 조금 증가되는 것이 특징적이었다. 기아 시에 파랑볼우럭 LDH eye-specific C₄ 동위효소가 붕어의 LDH liver-specific C₄보다 영향을 적게 받는 것으로 확인되었다. 격지 골격근에서 A₄가 증가되고 하부단위체 C를 포함하는 동위효소가 감소되나, 눈조직은 eye-specific C₄와 C hybrid가 감소되어 조절된다는 보고[8]와 유사한 결과를 얻었다.

기아상태 붕어와 파랑볼우럭 조직의 LDH 기질 의존성 측정 및 피루브산 저해

기질에 대한 LDH의 역학적 실험은 하부단위체의 구조와 대사 및 조직 간의 진화를 이해하고[38] 환경에 대한 종과 조직의 적응을 이해하는데 유용하다[31]. 피루브산 0.01-10 mM 까지 농도별로 LDH 활성을 측정하여 피루브산에 대한 기질 의존성을 측정하였다(Fig. 4). 피루브산 0.01 mM에서 기아 후 붕어는 심장>간>눈>뇌>골격근 순으로 대조군에 비해 간조직의 LDH 활성이 23.15에서 28.08%로 증가되었고, 피루브산 0.2-0.6 mM 사이에서 조직들의 LDH가 최대 활성을 나타내므로 LDH 활성 측정시 Whitt의 방법[47]에 따른 피루브산 1.5 mM에서 측정하지 않고, 피루브산 0.5 mM에서 측정하였다. 피루브산 10 mM에서 30.30-18.64%의 LDH 활성이 남았고, 골격근조직만 31.13%에서 30.30%로 조금 더 억제되었고, 나머지

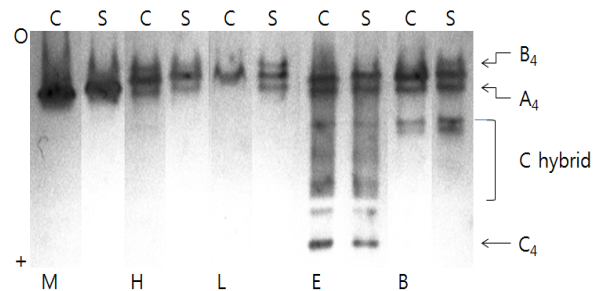


Fig. 3. Native-polyacrylamide gel electrophoresis zymograms of LDH isozymes in tissues from *L. macrochirus* (C: control; S: starvation). M, skeletal muscle; H, heart; L, liver; E, eye; B, brain.

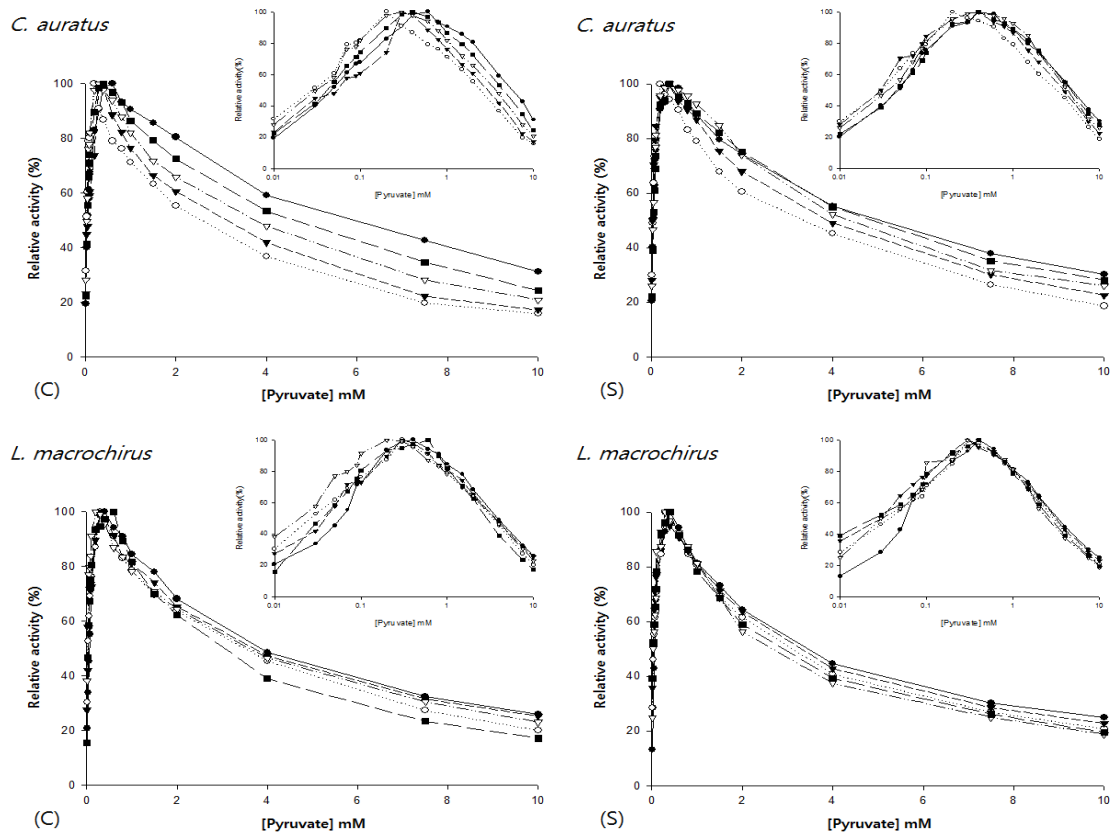


Fig. 4. Effect of pyruvate concentrations on the activity of LDH isozymes in various tissues from *C. auratus* and *L. macrochirus* (C: control; S: starvation). ●, skeletal muscle; ○, heart; ▼, liver; ▽, eye; ■, brain.

조직은 억제 정도가 조금 낮게 확인되었다(Fig. 4S). 그리고 피루브산에 의해 LDH가 억제되는 정도가 심장>간>눈>뇌>골격근 조직의 순으로 확인되므로 LDH 하부단위체의 억제는 B>C>A로 하부단위체 B가 가장 크게 억제된 것으로 확인되었다.

피루브산 농도에 따라 LDH eye-specific C를 지닌 파랑볼우럭의 LDH 활성을 측정된 결과, 피루브산 0.01 mM에서 눈 조직의 LDH 활성이 컸으나 기아 후 뇌조직에서 39.22%로 피루브산에 대한 친화력이 증가되었고, 0.4 mM에서 최대 활성에 빠르게 도달되었다. 또한 눈조직은 피루브산 0.2 mM에서 가장 빠르게 최대 활성에 이르고, 기아 후 0.3 mM로 조금 느려졌으나, 다른 조직은 기아가 진행되어도 동일하였다. 피루브산 10 mM에서 25.97-17.12%였으나 기아 후 25.00-18.75%로, 골격근과 심장조직은 유사하였고, 뇌조직은 17.12에서 19.61%로 억제되는 정도가 감소되는 것을 확인할 수 있었으나 간과 눈조직은 억제되는 정도가 증가되었다(Fig. 4). 파랑볼우럭 뇌조직이 피루브산 0.01 mM에서 친화력이 크고 10 mM에서 억제 정도가 조금 감소된 것이 특징적이었다. 따라서 뇌조직에서 젖산이 노폐물로 제거되는 것은 일부뿐이고 대부분의 젖산이 에너지원으로 사용된다는 가설을 뒷받침하였다[36]. 붕어 뇌조직에서 기아 후 억제 정도가 감소되므로 젖산이 필요한 것

으로 확인되었다. 피루브산 10 mM에서 저산소 환경에 적응되어져 폴망둑의 조직이 35.22-40.76% 활성이 남아 조직 간에 유사하게 진화되어졌으며[50], 소(*Bos taurus*) B₄는 22% 및 꺼지(*Coreoperca herzi*) A₄는 72% 활성이 남아 있다는 보고[9]와 비교시 붕어 심장의 12.82, 21.20%, 파랑볼우럭 심장 20.00, 20.77%이므로 소 B₄ 동위효소 보다 억제 정도가 컸으며 골격근과 심장조직의 억제되는 정도의 차이가 작으므로 저산소 상태에 순응된 것으로 나타났다. 심장 같은 호기적 조직에서 피루브산 농도가 높은 경우 B₄ 동위효소가 A₄ 동위효소보다 억제되는 정도가 크므로 A₄ 동위효소에 의해 젖산이 축적되게 되므로[12] LDH 동위효소의 기능적인 특성이 환경에 대해 종, 조직이 순응하는 과정에서 중요한 역할을 한다. 기아 후 붕어와 파랑볼우럭 조직의 Km^{PYR} 및 Vmax^{PYR}을 측정하였다(Table 2). 붕어 기아군 조직의 Km^{PYR}은 대조군에 비해 모두 조금 크게 측정되어 친화력이 감소되었음을 알 수 있었다. 간조직 Km^{PYR} 0.032, 0.035 mM, Vmax^{PYR} 86.00에서 111.74 units/g으로 다른 조직에 비해 피루브산과 NADH에 대해 친화력이 가장 크지만, 기아 후 친화력이 조금 낮아졌고, Vmax^{PYR}은 증가된 것으로 확인되었다. 파랑볼우럭 심장 및 눈조직은 Km^{PYR} 0.028, 0.029 mM로 다른 조직에 비해 피루브산에 대한 친화력이 컸으나, 기아 후 친화력이 낮아졌다. 기아 후 골격근 Km^{PYR}

Table 2. Apparent Michaelis-Menten constant values for LDH in tissues from *C. auratus* and *L. macrochirus* (C: control; S: starvation)

Tissues	<i>C. auratus</i>		<i>L. macrochirus</i>		
	C	S	C	S	
Km ^{PYR} (mM)	Skeletal muscle	0.050	0.057	0.086	0.118
	Heart	0.039	0.040	0.028	0.036
	Liver	0.032	0.035	0.052	0.035
	Eye	0.041	0.045	0.029	0.035
	Brain	0.052	0.059	0.040	0.031
Vmax ^{PYR} (units/g)	Skeletal muscle	105.33	115.00	129.13	146.34
	Heart	116.27	114.70	99.60	97.41
	Liver	86.00	111.74	116.10	107.79
	Eye	114.43	113.55	114.74	102.16
	Brain	113.54	115.04	108.38	103.38

0.118 mM로 친화력이 가장 낮은 것으로 확인되었고, 눈조직도 친화력이 조금 낮아졌으며 간조직과 뇌조직도 각각 0.035 mM, 0.031 mM로 감소되어 친화력이 증가되었다. 기아 후 골격근을 제외한 나머지 조직은 피루브산에 대한 친화력이 폴망둑 조직의 Km^{PYR} 0.080-0.089 mM[50]에 비해 큰 것으로 확인되었고, 잉어 골격근 A₄의 Km^{PYR} 0.173 mM, 송어 골격근 A₄의 Km^{PYR} 0.209 mM[18]보다 친화력이 크므로 저산소 환경에 적응되어 피루브산에 대한 반응이 상당히 빠른 것으로 확인되었다.

따라서 기아 시 LDH liver-specific C가 발현되는 붕어가 LDH eye-specific C가 발현되는 파랑볼우럭 LDH보다 영향을 더 크게 받았으며, LDH 활성이 증가되어 혐기적 대사가 증가된 것으로 확인되었다. 또한 간조직에서만 나타나던 LDH-C가 눈과 뇌조직에서도 발현되었으며, *Ldh-A, B, C*가 발현되는 경우 간조직에서는 C hybrid와 C₄, 눈조직은 기아 초기에는 C₄가 확인되었으나 기아가 진행되면서 C hybrid가 확인되었고, 뇌조직은 A₄ 동위효소 활성이 증가되었다. 피루브산에 의한 Km^{PYR}도 증가되며 피루브산에 의한 억제정도도 감소되어 젖산에 의해 대사가 이루어지는 것으로 보이므로 뇌조직에서의 LDH 대사에 대한 연구가 이루어져야 할 것으로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 2014~2015학년도 청주대학교 산업과학연구소가 지원한 학술연구조성비(특별연구과제) 및 청주대학교 연구장학 지원에 의해 연구되었음.

References

1. Baumgart, E., Fahimi, H. D., Stich, A. and Völkl, A. 1996. L-lactate dehydrogenase A-and AB isoforms are bona fide peroxisomal enzymes in rat liver evidence for involvement in intraperoxisomal NADH reoxidation. *J. Biol. Chem.* **271**,

- 3846-3855.
2. Black, D. and Love, R. M. 1986. The sequential mobilisation and restoration of energy reserves in tissues of Atlantic cod during starvation and refeeding. *J. Comp. Physiol. B.* **156**, 469-479.
3. Bond, C. E. 1996. Nervous and endocrine systems. pp. 241-258. In Bond, C. E. (eds.), *Biology of fishes*. Saunders College Publishing, FortWorth.
4. Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
5. Brooks, G. A. 2009. Cell-cell and intracellular lactate shuttles. *J. Physiol.* **587**, 5591-5600.
6. Brooks, G. A., Brown, M. A., Butz, C. E., Sicurello, J. P. and Dubouchaud, H. 1999. Cardiac and skeletal muscle mitochondria have a monocarboxylate transporter MCT1. *J. Appl. Physiol.* **87**, 1713-1718.
7. Chatzifotis, S., Papadaki, M., Despoti, S., Roufidou, C. and Antonopoulou, E. 2011. Effect of starvation and re-feeding on reproductive indices, body weight, plasma metabolites and oxidative enzymes of sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture* **316**, 53-59.
8. 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.
9. Cho, S. K., Park, S. Y. and Yum, J. J. 1993. Purification and immunochemistry of lactate dehydrogenase in *Lampetra japonica*. *Kor. J. Zool.* **36**, 505-513.
10. Coonrod, S., Vitale, A., Duan, C., Bristol-Gould, S., Herr, J. and Goldberg, E. 2006. Testis-Specific Lactate dehydrogenase (LDH-C₄; Ldh3) in murine oocytes and preimplantation embryos. *J. Androl.* **27**, 502-509.
11. Davis, B. J. 1964. Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. *Ann. NY Acad. Sci.* **121**, 404-427.
12. de Almeida-Val, V. M. F. and Val, A. L. 1993. Evolutionary trends of LDH isozymes in fishes. *Comp. Biochem. Physiol. B.* **105**, 21-28.

13. De Roos, R. 1994. Plasma ketone, glucose, lactate, and alanine levels in the vascular supply to and from the brain of the spiny dogfish shark (*Squalus acanthias*). *J. Exp. Zool.* **268**, 354-363.
14. Dunn, J. F., Hochachka, P. W., Davison, W. and Guppy, M. 1983. Metabolic adjustments to diving and recovery in the African lungfish. *Amer. J. Physiol.* **245**, 651-657.
15. Fantin, V. R. and Leder, P. 2006. Mitochondriotoxic compounds for cancer therapy. *Oncogene* **25**, 4787-4797.
16. Furné, M., Morales, A. E., Trenzado, C. E., García-Gallego, M., Hidalgo, M. C., Domezain, A. and Rus, A. S. 2012. The metabolic effects of prolonged starvation and refeeding in sturgeon and rainbow trout. *J. Comp. Physiol. B.* **182**, 63-76.
17. Furné, M., Sanz, A., García-Gallego, M., Hidalgo, M. C., Domezain, A., Domezain, J. and Morales, A. E. 2009. Metabolic organization of the sturgeon *acipenser naccarii*: a comparative study with rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture* **289**, 161-166.
18. Gillis, T. E. and Ballantyne, J. S. 1996. The effects of starvation on plasma free amino acid and glucose concentrations in lake sturgeon. *J. Fish Biol.* **49**, 1306-1316.
19. Goldberg, E., Eddy, E. M., Duan, C. and Odet, F. 2010. LDH C: The ultimate testis-specific gene. *J. Androl.* **31**, 86-94.
20. Hinch, S. G., Cooke, S. J., Healey, M. C. and Farrell, A. T. 2005. Behavioural physiology of fish migrations: salmon as a model approach. *Fish Physiol.* **24**, 239-295.
21. Kim, J. B., Cho, S. K. and Yum, J. J. 2004. Changes of activities and isozymes of lactate dehydrogenase in *Coreoperca herzi* acclimated to acute increase of temperature for short-term period. *J. Ind. Sci.* 43-50.
22. Koehler-Stec, E. M., Simpson, I. A., Vannucci, S. J., Landschulz, K. T. and Landschulz, W. H. 1998. Monocarboxylate transporter expression in mouse brain. *Amer. J. Physiol.* **275**, 516-524.
23. Koslowski, M., Türeci, Ö., Bell, C., Krause, P., Lehr, H. A., Brunner, J. and Sahin, U. 2002. Multiple splice variants of lactate dehydrogenase C selectively expressed in human cancer. *Cancer Res.* **62**, 6750-6755.
24. Koukourakis, M. I., Giatromanolaki, A., Harris, A. L. and Sivridis, E. 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.
25. Markert, C. L., Shaklee, J. B. and Whitt, G. S. 1975. Evolution of a gene. Multiple genes for LDH isozymes provide a model of the evolution of gene structure, function and regulation. *Science* **189**, 102-114.
26. Metón, I., Fernández, F. and Baanante, I. V. 2003. Short-and long-term effects of refeeding on key enzyme activities in glycolysis-gluconeogenesis in the liver of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* **225**, 99-107.
27. Miller, K. M., Schulze, A. D., Ginther, N., Li, S., Patterson, D. A., Farrell, A. P. and Hinch, S. G. 2009. Salmon spawning migration: metabolic shifts and environmental triggers. *Comp. Biochem. Physiol. D.* **4**, 75-89.
28. Moyes, C. D., Buck, L. T., Hochachka, P. W. and Suarez, R. K. 1989. Oxidative properties of carp red and white muscle. *J. Exp. Biol.* **143**, 321-331.
29. Mukai, C. and Okuno, M. 2004. Glycolysis plays a major role for adenosine triphosphate supplementation in mouse sperm flagellar movement. *Biol. Reprod.* **71**, 540-547.
30. Navarro, I., and Gutierrez, J. 1995. Fasting and starvation. pp 393-434. vol 4. In: Hochachka, P. W. and Mommsen, T. P. (eds.), *Biochemistry and molecular biology of fishes metabolic biochem.* Elsevier. Amsterdam.
31. O'Brien, J., Kla, K. M., Hopkins, I. B., Malecki, E. A. and McKenna, M. C. 2007. Kinetic parameters and lactate dehydrogenase isozyme activities support possible lactate utilization by neurons. *Neurochem. Res.* **32**, 597-607.
32. Park, E. M. and Yum, J. J. 2010. Purification and characterization of lactate dehydrogenase isozymes in *Channa argus*. *J. Life Sci.* **20**, 260-268.
33. Park, E. M. and Yum, J. J. 2011. Activities of lactate dehydrogenase and ratios of lactate dehydrogenase/citrate synthase in tissue of *Odontobutis interrupta*. *J. Ind. Sci. Cheongju Univ. Korea.* **28**, 15-24.
34. Park, S. Y. and Yum, J. J. 1993. Lactate dehydrogenase isozymes of Cypriniform and Perciform fishes: Expression of the *Ldh-C* gene. *J. Ind. Sci.* 265-277.
35. Park, S. Y., Cho, S. K. and Yum, J. J. 2004. Characterization and evolutionary relationship of lactate dehydrogenase in liver of *Lampetra japonica* and liver-specific C₄ isozyme in *Gadus macrocephalus*. *J. Life Sci.* **14**, 708-715.
36. Quistorff, B., Secher, N. H. and Van Lieshout, J. J. 2008. Lactate fuels the human brain during exercise. *FASEB J.* **22**, 3443-3449.
37. Scanlan, M. J., Simpson, A. J. and Old, L. J. 2004. The cancer/testis genes: review, standardization, and commentary. *Cancer Immun.* **4**, 1.
38. Sensabaugh, G. F. and Kaplan, N. O. 1972. A lactate dehydrogenase specific to the liver of gadoid fish. *J. Biol. Chem.* **247**, 585-593.
39. Shaklee, J. B., Kepes, K. L. and Whitt, G. S. 1973. Specialized lactate dehydrogenase isozymes: the molecular and genetic basis for the unique eye and liver LDHs of teleost fishes. *J. Exp. Zool.* **185**, 217-240.
40. Soengas, J. L., Strong, E. F., Fuentes, J., Veira, J. A. R. and Andrés, M. D. 1996. Food deprivation and refeeding in Atlantic salmon, *Salmo salar*: effects on brain and liver carbohydrate and ketone bodies metabolism. *Fish Physiol. Biochem.* **15**, 491-511.
41. Tylicki, A., Masztaleruk, D. and Strumilo, S. 2006. Differences in some properties of lactate dehydrogenase from muscles of the carp *Cyprinus carpio* and trout *Salmo gairdneri*. *J. Evol. Biochem. Physiol.* **42**, 143-147.
42. Val, A. L. and de Almeida-Val, V. M. F. 1995. pp. 224. Aerobic versus anaerobic pathways. *Fishes of the amazon and environment: physiological and biochemical aspect.* Springer. New York.
43. Van Roermund, C. W., Elgersma, Y., Singh, N., Wanders, R. J. and Tabak, H. F. 1995. The membrane of peroxisomes in *Saccharomyces cerevisiae* is impermeable to NAD(H) and

- acetyl-CoA under *in vivo* conditions. *EMBO J.* **14**, 3480.
44. Wang, Y., Wei, L., Wei, D., Li, X., Xu, L. and Wei, L. 2015. Testis-specific lactate dehydrogenase (LDH-C4) in skeletal muscle enhances apika's sprint-running capacity in hypoxic environment. *Int. J. Environm. Res.* **12**, 9218-9236.
45. Wang, T., Hung, C. C. and Randall, D. J. 2006. The comparative physiology of food deprivation: from feast to famine. *Annu. Rev. Physiol.* **68**, 223-251.
46. Wang, X., Perez, E., Liu, R., Yan, L. J., Mallet, R. T. and Yang, S. H. 2007. Pyruvate protects mitochondria from oxidative stress in human neuroblastoma SK-N-SH cells. *Brain Res.* **1132**, 1-9.
47. Whitt, G. S. 1970. Developmental genetics of the lactate dehydrogenase isozymes of fish. *J. Exp. Zool.* **175**, 1-35.
48. Whitt, G. S. and Booth, G. M. 1970. Localization of lactate dehydrogenase activity in the cells of the fish (*Xiphophorus helleri*) eye. *J. Exp. Zool.* **174**, 215-224.
49. Yeon, J. H. 2011. Charaterization of lactate dehydrogenase and expression of monocarboxylate transporters (MCT) 1, 2, 4 in liver from *Carassius auratus*. Doctoral dissertation. MS Thesis Cheongju Univ., Korea.
50. Yum, J. J. 2008. Characterization of lactate dehydrogenase in *Acanthogobius hasta*. *J. Life Sci.* **18**, 264-272.
51. Yum, J. J. and Ku, B. 2012. Biochemical properties of lactate dehydrogenase eye-specific C₄ isozyme: *Lepomis macrochirus* and *Micropterus salmoides*. *J. Life Sci.* **22**, 209-219.
52. Zakhartsev, M., Johansen, T., Pörtner, H. O. and Blust, R. 2004. Effects of temperature acclimation on lactate dehydrogenase of cod (*Gadus morhua*): genetic, kinetic and thermodynamic aspects. *J. Exp. Biol.* **207**, 95-112.

초록 : 기아상태에서 *Ldh-C*가 발현된 어류 조직의 젖산탈수소효소의 대사

염정주* · 김규동

(청주대학교 생명과학과)

젖산탈수소효소(Lactate dehydrogenase, EC 1.1.1.27, LDH) LDH-C의 기능을 확인하기 위해 liver-specific *Ldh-C*가 발현된 붕어(*Carassius auratus*)와 eye-specific *Ldh-C*가 발현된 파랑볼우럭(*Lepomis macrochirus*)을 기아 상태로 유지시킨 후(S) 조직들의 LDH 대사를 연구하였다. 기아 후 붕어 간조직의 LDH 활성이 크게 증가되었으며 LDH 비활성(units/mg)과 LDH/CS는 조직들에서 증가되어 혐기적 대사가 이루어짐을 확인하였다. 기아 후 LDH B₄ 동위효소가 골격근조직에서 감소되었고 심장조직에서 증가되었다. 눈과 뇌조직에 나타났던 LDH C₄ 동위효소는 liver-specific C₄로 확인되었으며 기아 후에 없어지고, 눈조직은 C hybrid, 뇌조직은 A₄, 간조직은 C hybrid와 C₄ 동위효소가 각각 증가되었다. 그러나 파랑볼우럭 조직에서 LDH 활성의 변화는 작았으나 눈조직에서 가장 크게 증가되었으며, 뇌조직은 LDH A₄와 AC hybrid가 증가되었다. 피루브산 10 mM에 의해 기아 후 붕어 조직의 LDH 활성은 30.30-18.64%, 파랑볼우럭 조직의 LDH는 25-18.75% 남았으며, 붕어는 Km^{PYR} 값이 증가되었다. 실험 결과 LDH liver-specific C 동위효소가 기아 중에 간, 뇌 및 눈조직에서 발현되었고, 기아 후 뇌조직에서 젖산의 대사가 우세하고, 붕어 LDH liver-specific C가 파랑볼우럭 LDH eye-specific C보다 영향을 더 받는 것으로 사료 된다.