

Metabolic Adjustments of Lactate Dehydrogenase Isozymes to the Environmental Temperature in Bluegill (*Lepomis macrochirus*)

Bora Ku, Sung Kyu Cho* and Jung Joo Yum

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

Received April 22, 2016 / Revised August 2, 2016 / Accepted August 2, 2016

The aim of this study was to examine the metabolic adjustment of lactate dehydrogenase (EC 1.1.1.27, LDH) isozymes to the environmental temperature in bluegill (*Lepomis macrochirus*). This study included three groups of bluegill collected in April (group I), May (group II), and September (group III). The LDH activities of skeletal muscle, heart, and brain tissues were higher in group III than in groups I and II. The citrate synthase (EC 4.1.3.7, CS) activity was higher in skeletal muscle but lower in heart and brain tissues of group II as compared to group I. In contrast, the CS activity was lower in skeletal muscle and higher in heart and brain tissues in group III than in group II. Furthermore, the LDH/CS activity ratio was higher in the skeletal muscle and brain in group III than in groups I and II. Accordingly, anaerobic metabolism was increased in group III. LDH A₄, A₂B₂, and B₄ isozymes were expressed in skeletal muscle, heart, liver, and brain tissues. The LDH C hybrid was detected in brain tissue. The LDH A₄ isozyme was successfully purified by affinity chromatography. The molecular weight of the purified LDH A₄ isozyme was 136 kDa and its optimal pH for enzymatic activity was 8.0. The K_m^{PYR} values of LDH in skeletal muscle were 0.161-0.227 mM using pyruvate as a substrate. These kinetic properties of LDH in skeletal muscle are consistent with the fact that bluegill is a cold-adapted species. These results may be useful for predicting the habitat use of this fish.

Key words : Bluegill (*Lepomis macrochirus*), citrate synthase (CS), isozyme, lactate dehydrogenase (LDH)

서 론

젖산탈수소효소(EC 1.1.1.27, lactate dehydrogenase, LDH)는 NAD^+ -oxidoreductase 활성을 갖는 효소로서 피루브산과 젖산의 상호전환반응을 촉매하며[14], 독립적인 세 유전자 *Ldh-A*, *B*, *C*에 의하여 만들어지는 하부단위체 A, B 및 C로 구성된 분자량 140 kDa 정도의 사량체 동위효소이다[21]. LDH A₄ 동위효소는 골격근과 같이 혐기적 대사가 우세한 조직에서 발현되고 LDH B₄ 동위효소는 심장과 같이 호기적 대사가 우세한 조직에서 발현되었다[4, 20, 35]. LDH 동위효소는 종 및 조직에 따라 대사적으로 필요한 정도가 다르므로 진화를 통해 LDH 동위효소의 발현, 전하 및 역학적 특성이 최적화되어 있다[11, 21]. 따라서 LDH 동위효소들은 혐기적인 조건과 호기적인 조건에서 각각 다른 대사상의 특성을 보여주고 있으므로 LDH 동위효소의 연구는 대사 생리학적 수준에서 서식환경에 대한 적응 양상을 밝히는 좋은 수단이 되어 왔다 [1, 40]. 또한 LDH와 시트르산합성효소(EC. 4.1.3.7, citrate

synthase, CS)의 비율(LDH/CS)로서 조직 내의 혐기적/호기적 대사 비율도 확인 할 수 있다[34].

대부분의 어류는 외온동물이므로 온도의 영향을 받아 환경에 순응하게 되며 온도는 효소의 K_m 과 V_{max} 값에 영향을 미친다[12]. 또한 온도는 종의 분포와 생존에 극심한 영향을 주며 세포와 분자 체계에도 영향력 있는 효과를 준다고 할 수 있다 [13].

파랑볼우럭의 원산지는 북미의 남동지역으로 번식력이 강하고 작은 어류나 어류의 알을 섭식하며 1969년 수산청이 일본에서 도입한 이래 전국 각지에 퍼져서 우리나라의 담수생태계에 많은 피해를 주고 있는 외래종이다[16]. 본 연구는 파랑볼우럭이 서식환경의 온도변화에 따라 적응하는 과정에서 나타나는 LDH 동위효소에 대한 대사조절을 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

실험 재료

농어목 검정우럭과 파랑볼우럭(*Lepomis macrochirus*)은 10 ± 3 cm, 0.3 ± 0.12 kg 정도로 충청북도 진천군 덕산면 신척지 저수지에서 수온이 10°C인 4월, 20°C인 5월 및 30°C인 9월에 채집하여 각각 그룹 I, II 및 III으로 정하였다. 파랑볼우럭은 차량용 기포발생기(대화전자산업사 DH-10000)를 사용하여 살아있는 상태로 실험실로 운반하였다. 모든 실험에는 5마리(n=5)의 실험군을 사용하였고 실험과정은 청주대학교 동물실험윤

*Corresponding author

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

E-mail : skcho@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.

리위원회 승인(승인번호: CJUIACUC - B111009)을 받아 진행하였다. 실험에 사용된 모든 시약은 Sigma-Aldrich사에서 구입하였다.

조직 파쇄액의 준비

파랑불우럭의 골격근, 심장 및 뇌 조직을 적출 후 증류수로 씻어 혈액을 제거한 다음 4°C로 유지시킨 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 6.85)를 3배(v/w) 가한 후 얼음에 잠긴 Dounce homogenizer 및 Potter-Elvehjem homogenizer로 파쇄하여 조직 파쇄액을 얻었다. 이 파쇄액은 4°C, 20,000× g (Refrigerated centrifuge, Hanil 21R)에서 1시간 동안 2회 반복 원심분리한 뒤 상등액을 시료로 사용하였다.

LDH와 CS 활성의 측정 및 단백질 정량

LDH의 활성은 Whitt의 방법[35]에 따라 측정하였다. 1.5 mM 피루브산과 0.14 mM NADH를 함유하는 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 6.85) 3 ml에 시료를 가한 후 NADH로부터 NAD⁺로 산화되는 정도를 분광광도계(Shimadzu UV-160A)를 사용하여 25°C, 340 nm에서 측정하였다. 효소활성 단위(unit)는 기질 1 μmole을 생성물로 전환시키는데 필요한 효소의 양을 millimolar extinction coefficient 6.22를 사용하여 전환율을 계산하였으며 units/g wet tissue로 나타내었다. CS의 활성은 Srere 등의 방법[32]에 따라 측정하였다. 0.2 mM acetyl-CoA, 0.5 mM oxaloacetic acid와 0.1 mM DTNB [5',5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid)]를 포함한 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 7.5) 3 ml에 시료를 가한 후 분광광도계로 25°C, 412 nm에서 DTNB의 전환율을 측정하였다. 효소활성 단위(unit)는 기질 1 μmole을 생성물로 전환시키는데 필요한 효소의 양을 millimolar extinction coefficient 13.6을 사용하여 전환율을 계산하였으며 units/g wet tissue로 나타내었다. 단백질은 Bradford의 방법[3]에 따라서 정량 하였다. Coomassie brilliant blue G-250 100 mg을 85% H₃PO₄ 100 ml에 넣고 자석 교반기로 섞은 후 95% 에탄올 50 ml를 가하고 4°C로 유지시킨 증류수로 최종 1 l를 만들고 여과하여 사용하였다. BSA를 표준단백질로 분광광도계를 사용하여 595 nm에서 표준곡선을 얻었으며 이를 이용하여 시료의 단백질을 정량 하였다.

Native-polyacrylamide gel 전기영동

Polyacrylamide gel은 Davis의 방법[8]에 의해 7.5%T, 2.67% C separation gel과 3%T, 2.67% C stacking gel을 만들고 vertical slab gel system (Hoefer SE 250)으로 thermostatic circulator (Rikakikai CA-1100)를 사용하여 4°C에서 전기영동 하였다. 시료에 50% sucrose와 0.01% BPB를 함유하는 0.0625 M Tris-HCl buffer (pH 6.8) 용액을 1:1(v/v)로 가하였고 5 mM Tris-glycine buffer (pH 8.3)를 사용하여 100 V에서 20분간 전

개시킨 후 200 V에서 2시간 10분간 전기영동하였다. LDH 염색은 Whitt의 방법[35]에 의해 DL-lactic acid, NBT, PMS 및 NAD⁺ 혼합용액에 gel을 넣어 37°C에서 20분간 염색한 후 증류수로 염색약을 씻어주고 15% 초산용액으로 고정하였다. LDH 동위효소의 분석 및 확인은 image analyzer (Viber Lourmat BIO-ID++)를 사용하였다.

Affinity chromatography를 이용한 LDH A₄ 동위효소의 정제

Oxamate gel의 준비와 affinity chromatography는 O'Carra와 Barry의 방법[24] 및 O'Carra 등의 방법[25]을 변형한 Kim과 Yum의 방법[18]에 따라 실시하였다. Oxamate column은 사용하기 전에 0.2 mM NADH를 함유한 column buffer (0.5 M KCl을 포함하는 0.05 M potassium phosphate buffer)로 평형 시킨 후 0.5 M KCl과 0.2 mM NADH를 첨가한 파랑불우럭 그룹 I, II 및 III의 골격근 조직 혼합파쇄액 5 ml를 가하였다. Column으로부터 단백질이 용출되지 않을 때까지 0.2 mM NADH를 함유한 column buffer로 씻어 준 후 1.6 mM NAD⁺를 함유한 column buffer와 column buffer를 차례로 유입시키며 용출액을 1.6 ml씩 분획하였다. 각 분획은 LDH 활성 측정 및 단백질 정량을 실시하여 elution profile을 작성하고 LDH A₄ 동위효소를 함유한 분획만 모아서 PM-10 막으로 농축시킨 후 실험의 시료로 사용하였다.

SDS-polyacrylamide gel 전기영동 및 분자량 측정

LDH A₄ 동위효소의 정제정도와 분자량의 측정은 SDS-PAGE를 이용하였다. 전기영동은 Laemmli의 방법[19]에 따라 12.5%T, 2.67% C separation gel과 5%T, 2.67% C stacking gel이 되도록 gel을 만들었다. 시료와 0.06 M Tris-HCl (pH 6.8), 25% glycerol, 2% SDS, 5% 2-mercaptoethanol, 0.1% BPB 용액을 4:1(v/v)로 섞어 100°C에서 10분간 가열한 후 1초 정도 원심분리 한 다음 상등액을 전기영동 시료로 사용하였다. 전기영동은 0.1% SDS를 포함하는 0.025 M Tris-glycine buffer (pH 8.3)를 사용하여 4°C, 100 V에서 2시간 동안 실시하였다. 단백질 염색은 45% 메탄올과 10% 초산에 녹인 0.1% coomassie brilliant blue R-250에서 25°C, 10분간 염색한 후 10% 메탄올, 10% 초산용액에서 탈색시켰다. 분자량 측정 시 표준단백질로는 bovine serum albumin (MW 66,000), ovalbumin (MW 45,000), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (MW 36,000), carbonic anhydrase (MW 29,000), trypsinogen (MW 24,000), trypsin inhibitor (MW 20,000) 및 α-lactalbumin (MW 14,200)을 사용하였다.

LDH의 최적 pH 측정

LDH 동위효소에 대한 최적 pH를 측정하기 위하여 파랑불우럭 골격근, 심장, 뇌 조직의 LDH 및 정제된 LDH A₄ 동위효

소를 1.5 mM pyruvate와 0.14 mM NADH를 함유하는 0.1 M 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, 9.0), 0.1 M sodium carbonate buffer (pH 9.5, 10.0) 3 ml에 넣고 LDH 활성을 측정하여 최적 pH를 확인하였다.

LDH 동위효소의 피루브산에 대한 기질의존성 측정

0.14 mM NADH를 함유하는 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 6.85)에 피루브산 농도를 10 μM에서 10 mM까지 증가시키면서 골격근, 심장 및 뇌 조직 추출액의 LDH 활성 변화를 측정하였으며 Lineweaver-Burk plot에 의해 K_m^{PYR} 값을 구하였다.

통계처리

LDH와 CS 활성 및 단백질량의 변화는 Windows용 SPSS 18.0 프로그램을 이용하여 one-way ANOVA로 유의성을 검증 ($p < 0.05$)하였다.

결과 및 고찰

채집 시기 별 파랑볼우럭 조직의 LDH와 CS 활성 및 단백질 정량

파랑볼우럭 그룹 I 골격근, 심장 및 뇌 조직의 LDH 활성은 62.05, 18.71 및 7.91 units였고 파랑볼우럭 그룹 II 조직은 114.4, 104.9 및 12.7 units였으며 파랑볼우럭 그룹 III 조직은 144, 295.4 및 26.4 units로 나타났다(Table 1). 4월에서 5월, 5월에서 9월로 변화되면서 골격근, 심장 및 뇌조직의 LDH 활성은 모두 증가되었다. 9월에 특히 심장 조직의 활성이 가장 높았고 뇌 조직에서도 9월에 4월보다 3배 이상 증가되었다. Eye-specific C₄ 동위효소를 갖는 얼룩동사리의 골격근은 86.81 units [31], 가물치 골격근은 380.4 units [30], 쏘가리 골격근은 358.83 units [4]로 파랑볼우럭의 골격근은 얼룩동사리와 유사하였고

가물치와 쏘가리 보다는 낮게 나타났다. Liver-specific C₄ 동위효소를 갖는 붕어 골격근 조직의 LDH 활성은 228.93 units [37], 모래무지의 골격근 조직은 108.09 units [18]로 파랑볼우럭의 골격근은 모래무지와 유사하게 나타났다. 수온이 10℃인 파랑볼우럭 그룹 I 보다 수온이 20℃인 파랑볼우럭 그룹 II의 LDH 활성이 더 높게 나타났다. 모래무지는 20℃에 순응되었을 때 활성이 높게 나타나[17] 본 실험의 결과와 일치하였고 꺼지와 메기의 경우 10℃에 순응 되었을 때 LDH 활성이 더 높게 나타나[15] 본 실험과 상반된 결과를 나타냈다.

파랑볼우럭 그룹 I 골격근, 심장 및 뇌 조직의 LDH 비활성은 5.19, 3.27 및 2.57이고 파랑볼우럭 그룹 II 조직은 2.53, 4.68 및 1.55이며 파랑볼우럭 그룹 III 조직은 3.31, 8.14 및 1.13으로 나타났다(Table 1). 파랑볼우럭 골격근 조직의 LDH 비활성은 4월에 비해 5월에 감소하고 9월에 증가하였다. 심장조직은 4월에 비해 5월, 9월에 가장 많이 증가되었고 뇌 조직은 감소하였다. 파랑볼우럭 골격근 조직의 LDH 비활성은 가물치 골격근 25.88[30], 붕어 골격근 9.64[37], 얼룩동사리 골격근 21.28 [31], 쏘가리 골격근 11.46[4]에 비해 낮았고 심장 조직의 LDH 비활성은 가물치 심장 0.79[30]과 붕어 심장 1.04[37]보다 높았으며 얼룩동사리 심장 6.86[31], 쏘가리 심장 5.93[4]과 유사하게 나타났다. 뇌 조직의 LDH 비활성은 가물치 뇌 1.38[30], 쏘가리 뇌 1.36[4]과 유사하며 붕어 뇌 3.83[37], 얼룩동사리 뇌 25.22[31]보다는 낮게 나타났다.

호기적 조건에서 해당과정 생성물인 피루브산은 미토콘드리아로 들어가서 아세틸 CoA로 전화되고 아세틸 CoA와 옥살로아세트산은 CS의 촉매작용으로 시트르산을 생성한다[1, 23]. 따라서 CS는 시트르산회로의 첫 번째 반응을 촉매하는 효소로 조직의 미토콘드리아의 산화적대사지표로 사용된다. 파랑볼우럭 그룹 I 골격근, 심장 및 뇌 조직의 CS 활성은 0.44, 0.88 및 0.66 units이고 파랑볼우럭 그룹 II 조직은 1.53, 0.53 및 0.31 units이며 파랑볼우럭 그룹 III 조직은 0.84, 2.36 및 0.41 units로 나타났다(Table 1). CS 활성은 4월에 비해 5월에 골격근 조직에서 증가하였고 심장 및 뇌 조직에서는 감소하였다.

Table 1. LDH activity, CS activity and protein concentration in various tissues from bluegill (*L. macrochirus*) group I, II, III collected in April, May, and September

| Groups | 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 | 62.05±0.43 ^{bc} | 0.44±0.02 ^{bc} | 11.96±0.57 ^{bc} | 141.02 | 5.19 | 0.037 |
| | Heart | 18.71±0.38 ^{bc} | 0.88±0.06 ^{bc} | 5.73±0.34 ^{bc} | 21.26 | 3.27 | 0.154 |
| | Brain | 7.91±0.06 ^{bc} | 0.66±0.05 ^{bc} | 3.08±0.17 ^{bc} | 11.98 | 2.57 | 0.214 |
| II | Skeletal muscle | 114.40±1.34 ^{ac} | 1.53±0.08 ^{ac} | 45.22±0.65 ^{ac} | 74.77 | 2.53 | 0.034 |
| | Heart | 104.90±0.92 ^{ac} | 0.53±0.01 ^{ac} | 22.42±0.74 ^{ac} | 197.92 | 4.68 | 0.024 |
| | Brain | 12.70±0.09 ^{ac} | 0.31±0.01 ^{ac} | 8.21±0.45 ^{ac} | 40.97 | 1.55 | 0.038 |
| III | Skeletal muscle | 144.00±1.45 ^{ab} | 0.84±0.08 ^{ab} | 43.50±0.54 ^{ab} | 171.43 | 3.31 | 0.019 |
| | Heart | 295.40±3.69 ^{ab} | 2.36±0.10 ^{ab} | 36.30±1.2 ^{ab} | 125.17 | 8.14 | 0.065 |
| | Brain | 26.40±0.15 ^{ab} | 0.41±0.01 ^{ab} | 23.40±0.71 ^{ab} | 64.39 | 1.13 | 0.018 |

Data are mean ± SD, n = 5. ^a, $p < 0.05$ versus group I; ^b, $p < 0.05$ versus group II; ^c, $p < 0.05$ versus group III.

9월은 5월과 반대로 골격근 조직에서 감소하였고 심장 및 뇌 조직에서는 모두 증가하였다. 5월에 골격근 조직의 CS 활성이 높은 것으로 보아 호기적이며 9월로 갈수록 혐기적임을 알 수 있었다. 4월의 경우 심장 및 뇌 조직이 조금 더 호기적 대사를 하는 것으로 나타났다. 파랑볼우럭 그룹 I 골격근, 심장 및 뇌 조직의 LDH/CS는 141.02, 21.26 및 11.98이고 파랑볼우럭 그룹 II 조직은 74.77, 197.92 및 40.97이며 파랑볼우럭 그룹 III 조직은 171.43, 125.17 및 64.39로 나타났다. 4월에서 5월을 비교하면 LDH/CS는 골격근 조직만 감소되었고 5월에서 9월은 심장 조직만 감소되며 나머지 조직은 모두 증가되었다. 가물치의 골격근, 심장 및 뇌 조직의 CS는 2.2, 20.7 및 11.6이고 LDH/CS는 172.9, 0.6 및 0.47[30]로 파랑볼우럭의 CS가 낮게 나타났으며 LDH/CS의 경우 골격근 조직은 유사하였고 심장 및 뇌 조직은 파랑볼우럭이 더 높게 나타났다. LDH/CS로 조직의 혐기적 대사와 호기적 대사의 정도를 나타낼 수 있으며 [34], 높은 온도에서 대사율의 감소와 혐기적 대사가 증가하게 되므로 파랑볼우럭 그룹 III은 수온이 높아지고 용존산소량이 감소됨에 따라 혐기적인 대사가 증가되었다.

파랑볼우럭 그룹 I 골격근, 심장 및 뇌 조직의 단백질량은 11.96, 5.73 및 3.08 mg/g, 파랑볼우럭 그룹 II 조직의 단백질량은 45.22, 22.42 및 8.21 mg/g, 파랑볼우럭 그룹 III 조직의 단백질량은 43.5, 36.3 및 23.4 mg/g으로 확인되었다. 4월에서 5월, 5월에서 9월로 갈수록 단백질량은 전반적으로 증가되며 5월과 9월에 골격근 조직의 단백질량은 유사하였다. 파랑볼우럭은 수온이 높아지는 여름에 동물성 플랑크톤, 수서곤충 또는 수생식물을 섭식하는 활동을 활발하게 시작하여 무게를 6배 증가시키므로[10], 수온이 상승 할수록 LDH 동위효소의 활성은 증가하고 단백질량도 증가된다. 붕어 골격근 및 심장 조직의 단백질량 23.75 및 64.79 mg/g [37]과 비교하면 4월을 제외하고 파랑볼우럭 골격근의 단백질량이 많고 전반적으로 심장 조직 단백질량은 낮게 나타났다. Angelfish 골격근의 단백질량은 51 mg/g [2], 풀망둑 골격근은 5.91 mg/g [38]으로 파랑볼우럭은 열대성 어류인 angelfish 골격근의 단백질량과는 유사하였으나 풀망둑 보다는 단백질량이 많았다.

파랑볼우럭 조직 별 LDH 동위효소의 전기영동 상

파랑볼우럭은 Native-PAGE 상에서 *Ldh-A*와 *Ldh-B* 유전자가 발현되어 골격근, 심장, 간 및 뇌 조직에서는 공통적으로 A₄와 A₂B₂ 및 B₄ 동위효소가 존재하였다(Fig. 1). 골격근 조직에서는 A₄ 동위효소가 심장에서는 B₄ 동위효소의 활성이 강하게 나타났다. 뇌 조직의 경우 음극 쪽으로부터 B₄, A₂B₂, A₄ 및 C hybrid가 확인되었다. LDH A₄ 동위효소는 LDH B₄ 동위효소 보다 양극 쪽으로 이동도가 크며 LDH eye-specific C₄ 동위효소는 음전하를 띠어 LDH A₄ 동위효소보다 양극 쪽에 위치하므로[41] 농어목에서 eye-specific C₄ 동위효소는 음하전을 띠어 양극 쪽에서 나타난다[28, 35, 36]는 결과와 일치하

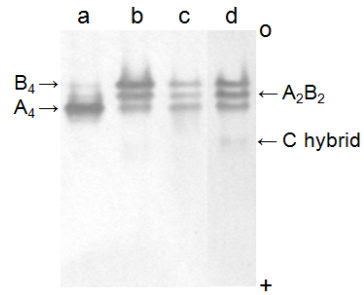


Fig. 1. Native-polyacrylamide gel electrophoresis zymograms of LDH isozymes in various tissues from bluegill (*L. macrochirus*). a, Skeletal muscle; b, heart; c, liver; d, brain; o, origin.

었다.

파랑볼우럭 골격근 조직 내 LDH A₄ 동위효소의 정제

Oxamate gel은 LDH 친화력에 기반을 둔 피루브산 유사체 oxamate가 결합된 gel로 LDH의 분리와 정제에서 매우 효과적이다. NADH를 첨가한 완충액을 유입시키면 LDH 동위효소들은 gel에 결합하게 되고 NAD⁺를 포함한 완충액을 유입시키면 동위효소들에 따라 결합력의 차이가 있으므로 다르게 용출된다[24, 25]. 또한 LDH 동위효소들 간의 4차 구조를 비교할 수 있어 동위효소들의 진화적 유연관계를 고찰할 수 있다. Oxamate column에 파랑볼우럭 골격근 조직 추출액 5 ml를 가하고 0.2 mM NADH를 함유한 column buffer로 씻어 줄 경우 oxamate에 LDH와 NADH가 결합하므로 단백질만 용출되었다(Fig. 2). NAD⁺를 함유한 column buffer를 유입할 때는 135-167 분획에서 LDH A₄ 동위효소가 용출되었다. 용출된

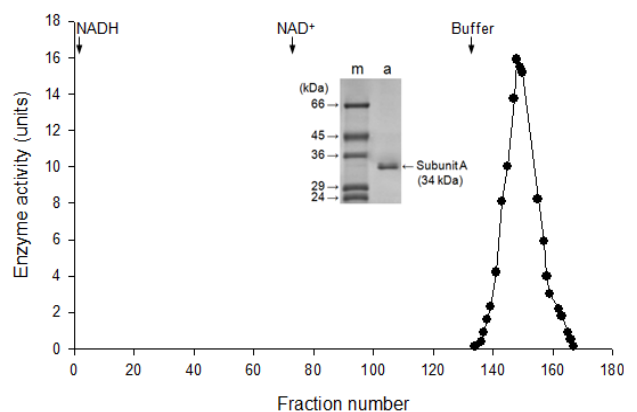


Fig. 2. Affinity chromatography to purify LDH isozymes in skeletal muscle from bluegill (*L. macrochirus*) on a column (25×85 mm) of oxamate-linked agarose gel. Fractions of 1.6 ml were collected at a flow rate 0.4 ml/min and chromatography were performed at 4°C. Enzyme activity was found to be in the fraction numbers 135-167. SDS-PAGE of purified LDH A₄ isozyme in bluegill. m, Marker; a, purified LDH A₄ isozyme.

LDH A₄ 동위효소 분획을 PM-10 membrane으로 농축하여 A₄ 동위효소를 얻었다. LDH A₄ 동위효소의 정제도 및 분자량을 측정하기 위해 SDS-PAGE를 실시한 결과 A₄ 동위효소가 단일 단백질로 나타나 순수하게 정제되었음을 확인하였고 하부단위체 A의 분자량은 34 kDa으로 확인되어 A₄ 동위효소의 분자량은 136 kDa이라고 추정되었다(Fig. 2). 파랑볼우럭 하부단위체 A는 폴망둑과 얼룩동사리 하부단위체 A와 유사한 것으로 확인되었다[27, 38]. 시료의 LDH 114.4 units로부터 LDH A₄ 95.19 units를 얻었다. 파랑볼우럭의 LDH A₄ 동위효소는 NAD⁺ 유입후 65-70 ml에서 용출되나 얼룩동사리 LDH A₄ 동위효소는 51-67 ml [27], 꺾지 LDH A₄ 동위효소는 68-120 ml [5], 고등어 A₄ 동위효소는 40-55 ml [29], 폴망둑 A₄ 동위효소는 53-96 ml [38]에서 용출되었다. 따라서 파랑볼우럭은 꺾지, 얼룩동사리 및 폴망둑과 진화 정도가 유사하였다.

정제된 파랑볼우럭 LDH A₄ 동위효소의 최적 pH

Affinity chromatography를 통해 정제된 LDH A₄ 동위효소는 pH 8.0에서 최대 활성을 나타냈다(Fig. 3). pH 5.5에서 40%, pH 6.5에서 42%로 나타났으며 pH 7.0에서 74%, pH 8.0에서 100%로 안정적인 활성을 보였다. 또한 LDH 활성이 pH 8.5에서부터 급격히 떨어져 중성과 약한 염기성에서 안정하며 산성과 강한 염기성에서 활성이 낮게 나타났다(Fig 3). 모래무지와 얼룩동사리 LDH A₄ 동위효소의 경우 pH 6.5에서 LDH 활성이 높게 나타났다[27, 39]. 짱뚱어 및 쏘가리 LDH A₄ 동위효소의 최적 pH는 7.0 및 7.5[4, 22]로 파랑볼우럭과 유사하였으며 쏘가리 A₄ 동위효소의 경우 pH 7.0-8.5에서 70% 이상 활성이 유지되었다는 보고[4]와 일치하였다.

파랑볼우럭 골격근, 심장 및 뇌 조직 LDH 동위효소들의 최적 pH

파랑볼우럭의 골격근, 심장 및 뇌 조직 LDH 동위효소의 최적 pH를 1.5 mM 피루브산에서 측정한 결과 pH 8.0에서

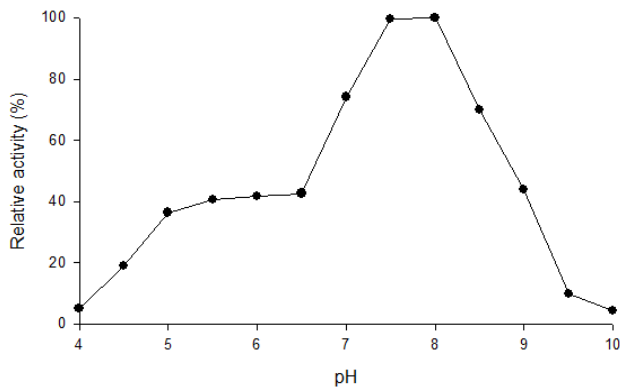


Fig. 3. Effect of pH on purified LDH A₄ isozyme in bluegill (*L. macrochirus*). The optimum pH for the LDH A₄ isozyme was pH 8.0.

가장 높은 활성이 나타났고 pH 7.5에서 90% 이상의 활성을 유지하여 중성과 약염기성의 좁은 범위에서 안정한 것으로 확인되었다(Fig. 4). pH 4.0-5.0와 pH 9.5-10.0에서 25% 이하의 매우 낮은 활성이 나타났고 pH 5.0-6.5에는 43% 활성을 나타냈다. pH 8.5에서 뇌 조직은 70% 이하의 활성을 나타냈으며 염기성인 pH 9.0에서 모든 조직이 50% 이하의 활성을 나타냈다. 이는 최적 pH가 7.5이고 pH 7.0-8.0에서 70% 이상의 활성이 나타나 중성과 약염기성의 좁은 범위에서 안정한 것으로 알려진 붕어의 골격근, 심장 및 간 조직 LDH의 경우[37]와 유사하였다.

LDH 동위효소의 기질의존성 측정

척추동물의 골격근 조직에 많은 LDH A₄ 동위효소는 고농도의 피루브산에 저해되는 정도가 낮고 심장과 뇌 조직에 많은 LDH B₄ 동위효소는 저농도의 피루브산에서도 저해되며 고농도의 피루브산에서 저해되는 정도가 높다[6, 35]. 또한 어류의 서식온도는 LDH의 K_m값에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다[7]. 따라서 LDH의 기질에 대한 역학실험으로 조직 내 LDH 동위효소들의 조성추정 및 서식온도에 대한 조직 별 대사의 적응양상을 알 수 있다. 파랑볼우럭 그룹 I 골격근, 심장 및 뇌 조직의 LDH 동위효소(Fig. 5)와 파랑볼우럭 그룹 III 골격근, 심장 및 뇌 조직의 LDH 동위효소를 피루브산 농도를 증가시키며 LDH 활성을 측정하였다(Fig. 6).

파랑볼우럭 그룹 I 골격근과 심장조직 LDH는 각각 피루브산 0.4 및 0.5 mM에서 최대 활성을 나타냈고 뇌 조직의 LDH는 피루브산 0.3 mM에서 최대 활성을 나타냈다. 파랑볼우럭 그룹 I 골격근, 심장 및 뇌 조직 LDH 활성은 피루브산 0.1 mM에서 각각 73.4, 91.3 및 74.9%로 급격하게 증가되었다. 피루브산 1.5 mM에서는 골격근, 심장 및 뇌 조직 LDH 활성은 각각 75.4, 65.8 및 76.4%로 골격근과 뇌 조직의 저해정도가 심장 조직보다 낮게 나타났다. 피루브산 3 mM에서 LDH 활성은 골격근, 심장 및 뇌 조직에서 48.4, 43.5 및 53.2%로 모든

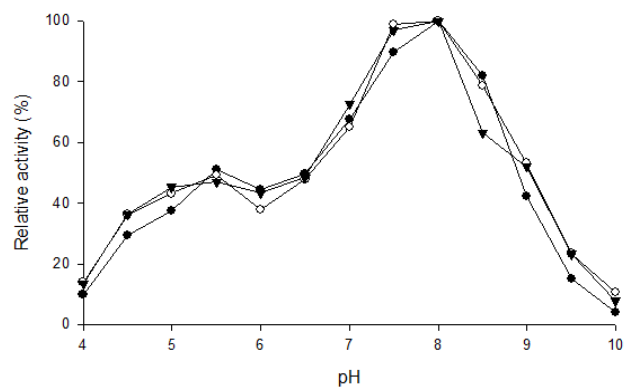


Fig. 4. Effect of pH on the activities of LDH isozymes in skeletal muscle, heart, and brain in bluegill (*L. macrochirus*). ●, Skeletal muscle; ○, heart; ▼, brain.

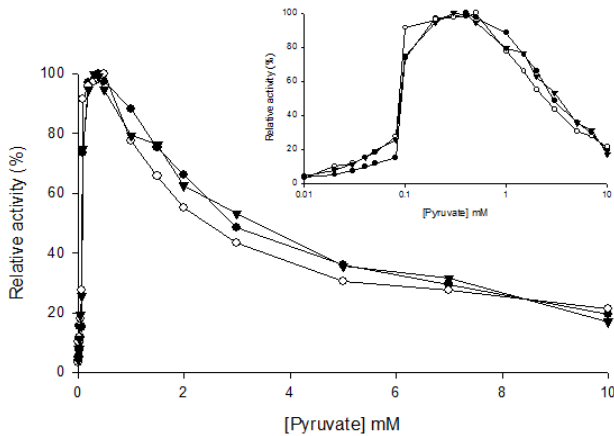


Fig. 5. Effect of pyruvate concentrations on the LDH activities in skeletal muscle, heart, and brain from bluegill (*L. macrochirus*) collected in April. ●, Skeletal muscle; ○, heart; ▼, brain.

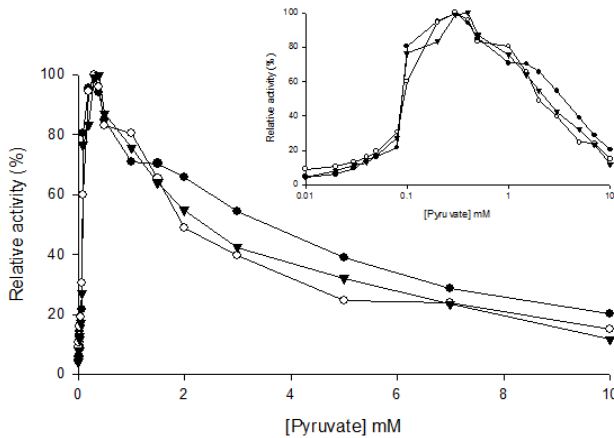


Fig. 6. Effect of pyruvate concentration on the LDH activities in skeletal muscle, heart and brain from bluegill (*L. macrochirus*) collected in September. ●, skeletal muscle; ○, heart; ▼, brain.

조직에서 55% 이하로 급격하게 저해되는 반응이 나타났으며 피루브산 10 mM에서는 골격근, 심장 및 뇌 조직의 LDH 활성이 19.5, 21.4 및 17.0%가 남아 저해정도가 높았다.

파랑볼우럭 그룹Ⅲ 골격근, 심장 조직의 LDH는 피루브산 0.3 mM에서 최대 활성을 나타냈으며 뇌 조직은 0.4 mM에서 최대 활성을 나타냈다(Fig. 6). 파랑볼우럭 그룹Ⅲ의 경우 피루브산 0.1 mM에서 골격근, 심장 및 뇌 조직의 LDH는 80.5, 60.0 및 76.5%로 60% 이상의 활성을 보이며 급격하게 활성이 증가되었다. 피루브산 1.5 mM에서 파랑볼우럭 그룹Ⅲ 골격근, 심장 및 뇌 조직 LDH는 70.3, 65.5 및 64.1%의 활성이 나타나 저해정도가 큰 차이를 보이지 않아서 붕어의 경우[37]와 유사하였다. 심장과 뇌 조직의 LDH활성은 피루브산 2 mM에서 49.0 및 54.8%로 급격히 저해되었고 골격근 조직 LDH는 피루브산 3 mM에서 54.4%로 급격히 저해되었다. 피루브산

Table 2. Apparent Michaelis-Menten constant values for LDH from bluegill (*L. macrochirus*) group I, III collected in April and September

| Groups | Tissue | K_m^{PYR} (mM) |
|--------|-----------------|------------------|
| I | Skeletal muscle | 0.161 |
| | Heart | 0.224 |
| | Brain | 0.530 |
| III | Skeletal muscle | 0.227 |
| | Heart | 0.387 |
| | Brain | 0.602 |

10 mM에서는 20.3, 15.0, 19.8 및 11.8%로 골격근, 심장 및 뇌 조직 순으로 LDH 저해정도가 높았다.

9월에 채집한 파랑볼우럭 LDH의 피루브산에 대한 저해정도는 심장 및 뇌가 골격근보다 크게 나타났으므로 LDH A₄ 동위효소는 고농도의 피루브산에 의해 약간 저해되지만 B₄ 동위효소는 저농도의 피루브산에 대해서도 저해 정도가 크게 나타난다는 보고[6, 35]와 일치하였다.

본 실험에서 Lineweaver-Burk 식에 의해 K_m^{PYR} 값을 측정된 결과 파랑볼우럭 그룹 I 골격근, 심장 및 뇌 조직 LDH의 K_m^{PYR} 값은 각각 0.161, 0.224 및 0.530 mM로 확인되었고 파랑볼우럭 그룹Ⅲ 골격근, 심장 및 뇌조직 LDH의 K_m^{PYR} 값은 각각 0.227, 0.387 및 0.602 mM로 확인되었다(Table 2). 골격근에 많이 존재하는 LDH A₄ 동위효소의 K_m^{PYR} 값은 서식지의 온도가 감소할수록 증가된다[4, 9, 13]. 온수성 어종인 쏘가리 LDH A₄ 동위효소의 K_m^{PYR} 값은 0.0486 mM이고[4, 26] 냉수성 어종인 송어 A₄ 동위효소의 K_m^{PYR} 값은 0.209 mM이다[26, 33]. 본 실험 결과 파랑볼우럭 골격근 LDH의 K_m^{PYR} 값은 0.161-0.227 mM로 나타나서 저온에 잘 적응한 종으로 볼 수 있다. 따라서 파랑볼우럭은 열대어종이 서식하기에 부적합하고 냉, 온수성 어종이 서식하기에 적합한 우리나라의 환경에 잘 적응하여 살 것으로 생각되며 그 유해성으로 인하여 앞으로 파랑볼우럭의 생존 조건에 대한 더욱 면밀한 관찰이 필요하다고 사료된다.

References

- Almeida-Val, V. M. F. and Val, A. L. 1993. Evolutionary trends of LDH isozymes in fishes. *Comp. Biochem. Physiol. B* **105**, 21-28.
- An, C. S., Cho, S. K. and Yum, J. J. 2010. Variation of lactate dehydrogenase isozymes in angelfish (*Pterophyllum scalare*) according to acute environmental change. *J. Life Sci.* **20**, 416-423.
- 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.
- Cho, S. K., Ku, B., An, H., Park, E. M., Park, S. Y., Kim,

- J. B. and Yum, J. J. 2009. Purification and characterization of lactate dehydrogenase A₄ isozyme in mandarin fish (*Siniperca scherzeri*). *J. Life Sci.* **19**, 256-263.
5. 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.
 6. Cho, S. K. and Yum, J. J. 1993. Heterogeneity of lactate dehydrogenase isozymes in tissues of *Lampetra japonica*. *Kor. J. Zool.* **36**, 319-328.
 7. Coppes, Z. L. and Somero, G. N. 1990. Temperature adaptive differences between the M₄ lactate dehydrogenases of stenothermal and eurythermal sciaenid fishes. *J. Exp. Zool.* **254**, 127-131.
 8. Davis, B. J. 1964. Disc electrophoresis-II. Method and application to human serum proteins. *Ann. NY. Acad. Sci.* **121**, 404-427.
 9. Fields, P. A. 2001. Protein function at thermal extremes: balancing stability and flexibility. *Comp. Biochem. Physiol. A* **129**, 417-431.
 10. Gerking, S. D. 1962. Production and food utilization in a population of bluegill sunfish. *Ecol. Monogr.* **32**, 31-78.
 11. Henry, T. and Ferguson, A. 1985. Kinetic studies on the lactate dehydrogenase (LDH-5) isozymes of brown trout, *Salmo trutta* L. *Comp. Biochem. Physiol. B* **82**, 95-98.
 12. Hochachka, P. W. and Somero, G. N. 1984. *Biochemical adaptation*. 537 pp., Princeton Univ. Press, Princeton.
 13. Hochachka, P. W. and Somero, G. N. 2002. *Biochemical adaptation: mechanism and process in physiological evolution*. 466 pp., Oxford Univ. Press, New York.
 14. Holbrook, J. J., Liljas, A., Steindel, S. J. and Rossmann, M. G. 1975. Lactate dehydrogenase, pp. 191-192, In Boyer, P. D. (ed.), *The Enzymes*, 3rd eds., Vol. XI. Academic Press Inc., New York.
 15. 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.* **22**, 43-50.
 16. Kim, I. S. and Kang, E. J. 1993. *Coloured Fishes of Korea*. 477pp., Academy Publishing Co., Korea.
 17. Kim, J. B., Kim, S. K. and Yum, J. J. 2003. Changes of activities and isozymes of lactate dehydrogenase in *Pseudogobio esocinus* acclimated to acute change of temperature. *J. Ind. Sci.* **21**, 37-44.
 18. Kim, M. O. and Yum, J. J. 1989. Purification, kinetics and immunochemistry of two homotetrameric lactate dehydrogenase isozymes in *Pseudogobio esocinus* (Cypriniformes). *Kor. J. Zool.* **32**, 420-428.
 19. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature* **227**, 680-685.
 20. Markert, C. L. 1984. Biochemistry and function of lactate dehydrogenase. *Cell Biochem. Funct.* **2**, 131-134.
 21. 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.
 22. Moon, J. H. 2006. Respiratory metabolism and antioxidant activities of tissues in *Boleithalmus pectinirostris*. M.S. Thesis Cheongju Univ. Korea. 87pp.
 23. Moyes, C. D., Mathieu-Costello, O. A., Brill R. W. and Hochachka, P. W. 1992. Mitochondrial metabolism of cardiac and skeletal muscle from a fast (*Katsuwonus pelamis*) and a slow (*Cyprinus carpio*) fish. *Can. J. Zool.* **70**, 1246-1253.
 24. 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.
 25. 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.
 26. Park, H. Y., et al. 1995. *Fish Biology*. 478 pp., Jungmunkag Co., Korea.
 27. Park, E. M. 2010. Expression of lactate dehydrogenase and monocarboxylate transporter (MCT1, 4) of tissues in *Odontobutis interrupta*. M.S. Thesis Cheongju Univ., Korea 76pp.
 28. 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.* **11**, 265-277.
 29. Park, S. Y. and Yum, J. J. 1997. Purification and characterization of lactate dehydrogenase eye- and testis-specific C₄ isozyme. *J. Ind. Sci.* **15**, 263-270.
 30. Park, E. M. and Yum, J. J. 2010. Purification and characterization of lactate dehydrogenase isozymes in *Channa argus*. *J. Life Sci.* **20**, 260-268.
 31. 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.
 32. Srere, P. A., Brazil, H. and Gonen, L. 1963. Citrate condensing enzyme of pigeon breast muscle and moth flight muscle. *Acta Chem. Scand.* **17**, S129-134.
 33. 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*. *Comp. Onto. Biochem.* **42**, 143-147.
 34. 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.
 35. Whitt, G. S. 1970. Developmental genetics of the lactate dehydrogenase isozymes of fish. *J. Exp. Zool.* **175**, 1-35.
 36. Whitt, G. S., Millet, E. T. and Shaklee, J. B. 1973. Developmental and biochemical genetics of lactate dehydrogenase isozymes in fishes. pp. 243-276. In J. H. Schroder (eds.), *Genetics and Mutagenesis in Fish..* Springer Verlag, Berlin.
 37. Yeon, J. H. 2011. Characterization of lactate dehydrogenase and expression of monocarboxylate transporters (MCT) 1, 2, 4 in liver from *Carassius auratus*. MS Thesis Cheongju Univ, Korea.
 38. Yum, J. J. 2008. Characterization of lactate dehydrogenase

- in *Acanthogobius hasta*. *J. Life Sci.* **18**, 264-272.
39. Yum, J. J. and Kim, M. O. 1989. Biochemical properties of lactate dehydrogenase isozymes in *Pseudogobio esocinus*. *J. Ind. Sci.* **7**, 151-162.
40. Yum, J. J. and Kim, G. D. 2016. Metabolism of lactate dehydrogenase in tissues from *Ldh-C* expressed fish at starved state. *J. Life Sci.* **26**, 155-163.
41. 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.

초록 : 환경온도에 대한 파랑볼우럭(*Lepomis macrochirus*) 젖산탈수소효소 동위효소들의 대사조절

구보라 · 조성규* · 염정주

(청주대학교 생명과학과)

농어목(Perciformes) 검정우럭과(Centrachidae) 파랑볼우럭(*Lepomis macrochirus*)을 대상으로 환경온도에 대한 젖산탈수소효소(EC 1.1.1.27, Lactate dehydrogenase, LDH) 동위효소들의 대사조절을 연구하였다. 파랑볼우럭은 4월(그룹 I), 5월(그룹 II) 및 9월(그룹 III)에 채집하여 사용하였다. 파랑볼우럭 골격근, 심장 및 뇌 조직의 LDH 활성은 파랑볼우럭 그룹 I 및 II보다 파랑볼우럭 그룹 III의 LDH 활성이 더 높게 나타났다. 시트르산합성효소(EC 4.1.3.7, citrate synthase, CS)의 활성은 파랑볼우럭 그룹 I에 비해 파랑볼우럭 그룹 II의 골격근 조직에서 높았고 심장 및 뇌 조직에서는 낮았다. 그에 반하여 파랑볼우럭 그룹 III 골격근의 CS 활성은 파랑볼우럭 그룹 II에 비해 낮았고 심장 및 뇌 조직에서는 높았다. LDH/CS는 그룹 III의 골격근 및 뇌 조직에서 높게 나타났다. 따라서 혐기적 대사는 파랑볼우럭 그룹 III에서 증가되었다. 골격근, 심장, 간 및 뇌 조직에서는 LDH A₄, A₂B₂ 및 B₄ 동위효소가 나타났다. LDH C hybrid는 뇌조직에서 확인되었다. LDH A₄ 동위효소는 affinity chromatography로 정제되었다. 정제된 LDH A₄ 동위효소의 분자량은 136 kDa이고 최적 pH는 8.0이었다. 골격근 LDH의 K_m^{PYR}값은 0.161-0.227 mM로 나타났다. 골격근 LDH의 역학특성들은 파랑볼우럭이 저온에 잘 적응한 종이라는 것을 보여준다. 이 결과들은 파랑볼우럭의 서식지 예측에 유용할 것으로 예상된다.