

개구리 網膜體와 水晶體의 Amino 酸 成分에 關한 研究

姜 成 浩

(梨花女子大學校·師大·化學科)

Studies on the Composition of Amino Acid
in Retina and Lens Body of the Frogs

KANG, Sung Ho

(Department of Chemistry, Ewha Womans University)

(4292年 12月 8日 接受)

SUMMARY

The retinae and the lens bodies of the frogs were hydrolyzed with 20% hydrochloric acid, and their amino acids were separated by paper chromatography. As a result of it the followings were confirmed:

(1) The retinae and the lens bodies were the same in composition, and aspartic acid, glutamic acid, serine, tyrosine, glycine, lysine arginine, threonine, alanine, histidine, proline, methionine, valine, phenylalanine, leucine, and two unknown substances were separated.

(2) The free amino acids in the retinae were extracted with 80% ethyl alcohol and then separated by paper chromatography. Though their separation was not so definite, serine, glutamic acid, and glycine were always separated regardless of the amount of the sample. When the amount of the sample was enough, β -alanine, γ -amino butyric acid and methionine + valine were also separated.

I 緒 論

動物 眼球의 網膜體와 水晶體는 主로 蛋白質로 되어 있는데 水晶體 成分에 關하여서는 Uyama¹ 等の 研究와 bovine lens protein의 amino酸을 paper chromatography에 依한 研究² 等이 있다. 그러나 網膜體에 關하여서는 그 視覺을 感覺케 하는 物質이 內包되어 있는 視細胞의 形態學의 研究^{3, 4, 5}가 많으며 그 amino酸 成分에 關하여서는 著者⁶가 가물치(*Ophocphalus argus*(CANTOR)의 網膜과 水晶體의 amino酸 成分을 報告한 것이 있다.

amino酸의 分析에 paper chromatography를 發 展시킨 것으로는 먼 처음이 Michael Tswett⁷의 研究였고 그후 現代의 發展을 갖어오게 한 여러 業績들이^{8, 9, 10, 11, 12, 13} 있다. 그런데 著者는 眼球의 水晶體와 網膜의 amino酸 成分이 動物種類에 따라 差異가 있는 것인지, 또 그 組織中의 amino酸과 遊離 amino酸의 成分을 比較하기 爲하여 實驗을 繼續하여 오는 중인데 網膜體內의 遊離 amino酸은 특히 視覺과 關係가 깊은 網膜內의 光作用과 關聯이 있으므로 깊은 關心을 갖이고 있는 바이다. 이번 참개구리의 水晶體와 網膜體

의 amino酸 成分을 paper chromatography에 依하여 分離한 結果를 報告하고자 한다.

II 實驗方法

1) 加水分解

참개구리 (*Rana nigromaculata*, 25-50 g.) 20個體를 普通 室內에 두었다가 斷頭하여 눈 40個를 뽑아서 眼球의 赤道部를 銳利한 가위로 切斷하여 前半部에서는 水晶體를 後半部에서는 網膜體를 各各 分離하여 網膜體와 水晶體를 各各 다른 round bottom flask에 넣고 20%鹽酸 15cc 석을 넣어 flask에 逆流冷却器를 各各 붙여서 oil bath위에서 110~125°C 로 約 24時間 加熱하여 protein을 分解 시켰다. 이 加水分解物을 濾過하고 그 濾液中의 鹽酸을 蒸發시키기 爲하여 water bath 위에서 加熱 濃縮시켰는데 그때 液이 濃縮되면 다시 10cc의 蒸溜水를 加하고 또다시 蒸發시키고 하여 7回 반복하여서 鹽酸을 全部 蒸發시킨 다음 그 液에 10% isopropyl alcohol을 網膜體 分解物에는 3cc, 水晶體 分解物에는 5cc를 各各 加하여 液이 黃色이 되는 程度로 하여서 paper chromatography의 sample 로 하였다.

2) 遊離 amino 酸

暗順應된 網膜中の 遊離 amino 酸을 檢出하기 위하여 캄개구리 40마리를 glass 製 水槽(徑 35cm, 깊이 15cm)에 넣고 水槽 밑면에서 15cm 되는 곳에 115volt 200watt 電球를 커서 2時間 light adaptation 시킨 다음 暗室에서 1夜 dark adaptation 시킨 것을 微赤色光下(60mμ以上)에 斷頭하여 눈을 뽑아 眼球의 赤道附近을 銳利한 가위로 切斷하여 眼球後半部에서 網膜을 剝離하고 그것을 slide glass 위에서 磨碎하여 그 組織을 破壞하고 80% ethyl alcohol로 暗室에서 20時間 抽出하고 이것을 濾過하여 그 液을 白色光下에서 蛋白質을 完全히 除去하기 위하여 trichloroacetic acid를 加하여 白色 沈澱이 생기는 것을 除去하고 80°C의 water bath 위에서 濃縮시켰더니 다시 白色沈澱이 생기므로 다시 沈澱을 除去하고 殘液 2cc에 10% isopropyl alcohol 1cc를 加하여 paper chromatography의 sample로 하였다. 한편 明順應된 網膜中の 遊離 amino 酸을 檢出하기 위하여 개구리 40마리를 위와 같이 水槽中에서 2時間 light adaptation 시킨 다음 網膜中の rhodopsin 이 完全히 褪색한 것을 確認한 후 白色光下에 斷頭하여 위와 똑 같이 處理하여 sample로 하였다.

3) paper chromatography에 의한 amino 酸의 分離

Whatman No. 1 濾紙를 23×23cm의 크기로 切斷하여 그 一端에 2×2cm의 線을 鉛筆로 긋고 그 交點에 sample을 spot하였다. 이때 spot의 直徑이 0.4cm程度가 되게 하였다. 網膜組織體의 加水分解物은 14回, 水晶體는 4回, 網膜組織의 遊離 amino 酸은 20回 spot하였다. 展開用 溶媒로서는 모든 sample에 對하여 同一하게 하였는데 一次元 展開用으로는 phenol : 0.1% NH₄OH (8 : 2) 混合液을 使用하였으며 二次元 展開用으로는 butanol : acetic acid : H₂O (4 : 1 : 5)의 混合液을 separatory funnel에 넣어서 잘 흔든 다음 一夜 放置하였다가 그 上層液만을 展開用으로 使用하였다. 展開用 容器로서는 desiccator 및 生物標本瓶을 使用하여 室溫(20°C)에서 展開시켰으며 一次元 展開에는 約 9時間, 二次元 展開에는 6~7時間이 所要되었다. 二次元 展開가 끝난 濾紙는 室溫에서 風乾하여 이 濾紙에다 0.2% ninhydrin 溶液(ethanol에 溶解시킨 것)을 噴霧하여 70°C에서 約 5分間 乾燥시킨 다음 紫色의 amino acid spot가 나타난 것을 보아 그 Rf值를 測定하여서 標準 amino 酸의 Rf值와 比較하여 分離된

amino 酸을 確認하였다.

4) amino 酸의 確認反應

a) 坂口 Reagent

二次元 展開를 시킨 濾紙에 坂口 reagent를 噴霧하였더니 arginine의 位置에서 濾紙의 白色바탕에 분홍색 spot가 나타나는 것을 보아 arginine을 確認할 수 있었다.

b) Sulfanilic Reagent

一次元 展開를 시킨 濾紙에 sulfanilic reagent를 噴霧하였더니 histidine과 tyrosine位置에 연한 黃色바탕에 분홍색 spot가 나타나는 것을 보아 histidine과 tyrosine을 確認할 수가 있었다.

c) Isatine Reagent

Acetic acid를 4% 含有한 acetone으로 0.2% isatine 溶液을 만들어 二次元 展開를 시켜서 乾燥한 濾紙에 噴霧하여 75°C에서 乾燥시켰더니 黃色바탕에 proline의 位置가 靑色으로 나타났으며 점차로 다른 amino 酸의 色이 나타났다. 卽 phenylalanine의 位置는 남색, serine의 位置는 밝은 褐色, valine, leucine, alanine, glycine의 位置는 분홍색의 spot가 나타났다. 그외의 amino 酸은 明確하지 않았다. 이것으로서 proline, phenylalanine, serine, valine, leucine, alanine, glycine等을 確認할 수가 있었다. 또한 未知物 2가지가 있었는데 이것도 모두 분홍색으로 나타났다.

d) Iodine Reagent

一次元 展開시킨 濾紙에 iodine蒸氣를 쪼였더니 tyrosine, histidine의 位置가 褐色으로 되었다. 그래서 histidine과 tyrosine을 確認할 수가 있었다.

III 結 果

a) 개구리 網膜의 加水分解物을 二次元 展開시켜서 ninhydrin溶液을 噴霧하였더니 다음 Fig. 1과 같은 位置에 amino 酸의 spot가 나타났다.

Fig. 1에 나타난 spot의 Rf值와 그 確認反應에 의하여서 개구리 網膜組織의 amino 酸의 種類는 Table 1과 같다. 또한 發色한 spot의 크기와 色의 濃度를 比較하여 그 比較含量도 決定하였다.

b) 개구리 水晶體 加水分解物을 二次元 展開시켜서 ninhydrin溶液을 噴霧하였더니 Fig. 2와 같은 位置에 amino 酸 spot가 나타났다.

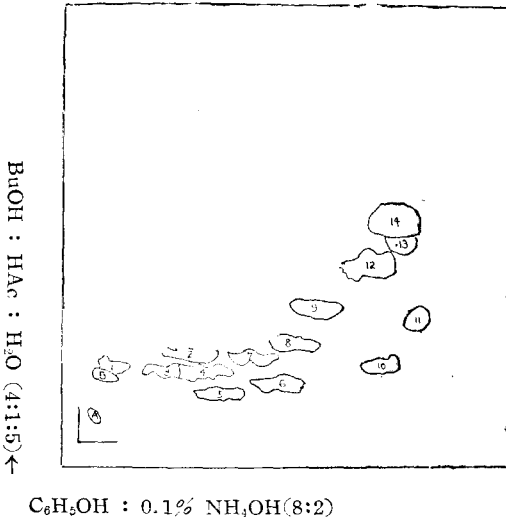


Fig. 1 Two-dimensional paper chromatography of hydrolyzed solution of frog retina.

Table 1. Amino acid composition of frog retina

number of spots	constituent	comparative content
1	Aspartic acid	++++
2	Glutamic acid	++++
3	Serine	+++
4	Glycine	++++
5	Lysine	+++
6	Arginine	+++
7	Threonine	+++
8	Alanine	++
9	Tyrosine	++
10	Histidine	+
11	Proline	+++
12	Methionine+Valine	++
13	Phenylalanine	+++
14	Leucin+Isoleucine	++++
A	Unknown	+
B	Unknown	+

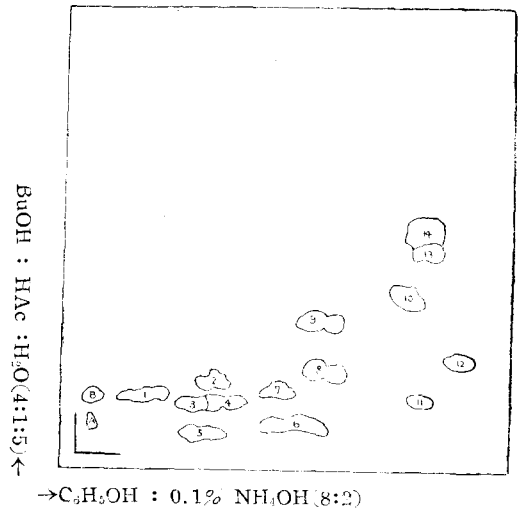


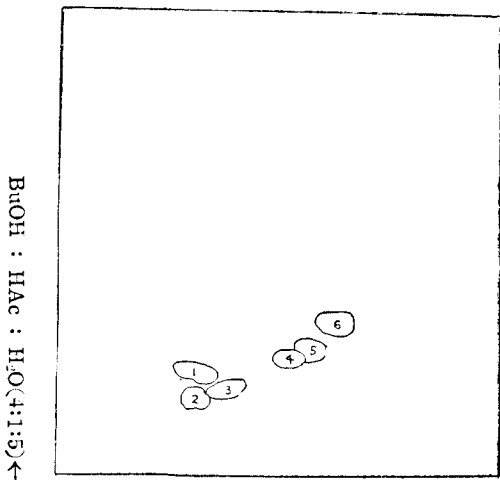
Fig. 2. Two-dimensional paper chromatography of hydrolyzed solution of frog lens body. Fig.2에 나타난 spot의 Rf値와 그 確認反應에 依하여서 개구리 水晶體組織의 amino酸의 種類과 그 比較含有量은 Table 2와 같다.

Table 2. Amino acid composition of frog lens body

number of spot	constituent	comparative content
1	Aspartic acid	++
2	Glutamic acid	++++
3	Serine	+++
4	Glycine	++
5	Lysine	++
6	Arginine	++
7	Threonine	+
8	Alanine	++
9	Tyrosine	++
10	Methionine+Valine	++
11	Histidine	+
12	Proline	+++
13	Phenylalanine	++
14	Leucine	+++
A	Unknown	++
B	Unknown	+

c) 網膜體의 遊離 amino酸

개구리 網膜體의 遊離 amino酸은 dark adaptation시킨 것과 light adaptation시킨 것이 모두 paper에 잘 나타나지 않았다. sample도 개구리 40마리를 使用하였으나 잘 나타나지 않았다. 著者⁶가 研究한 가물치 網膜中の 遊離 amino酸도 잘 나타나지 않았는데 개구리의 경우에서도 sample이 적을 때나 많을 때나 항상 나타나는 것은 serine, glycine, glutamic acid 세가지였으며, sample이 많으면 이 외에도 β -alanine, γ -amino-butyric acid, methionine, valine이 나타날 때가 있었다. 遊離 amino酸의 spot는 Fig. 3과 같으며 分離된 遊離 amino酸은 Table 3과 같다.



$\rightarrow C_6H_5OH : 0.1\% NH_4OH (8:2)$

Fig 3. Two-dimensional paper chromatography of free amino acids in the frog retina

Table 3. Free amino acid composition of frog retina

number of spots	constituent	number of spots	constituent
1	Glutamic acid	4	β -Alanine
2	Serine	5	γ -Amino butyric acid
3	Glycine	6	Methionine + Valine

IV 考 察

개구리 網膜體와 水晶體에서 똑같이 두가지식의 未知物이 나타났는데 究明하지 못하였다. 그리고 그 網膜體와 水晶體의 amino酸의 種類는 同一하게 14種이었다. 著者⁶가 報告한 가물치 網膜의 amino酸 種類와 개구리 網膜에서의 amino酸 種類는 同一하며 또한

水晶體는 가물치에 cysteic acid가 한가지 더 많았다. 또한 bovine lens protein의 amino酸 成分²은 가물치 水晶體와 같았는데 이런 것으로 보아 水晶體나 網膜의 組織蛋白을 構成하는 amino酸의 種類는 거의 同一한 것 같았다.

그런데 網膜體의 遊離 amino酸은 가물치의 경우와 같이 잘 나타나지 않았으나 다만 注目할 것은 가물치나 개구리의 網膜에서 그 sample의 量이 적었을 때나 많았을 때나 serine이 나타나는 것으로 보아 網膜體의 遊離 amino酸中에는 serine이 가장 많이 存在하는 것으로 보인다. 著者¹⁴와 Hosoya¹⁵ 등의 研究에 依하면 網膜中の rhodopsin 再生에 methionine, choline, betaine 등의 labile methyl group이 關與하는 것으로 보이는데 網膜中에 遊離 amino acid로서 serine이 가장 많이 存在함을 注目할 事實이다. 即 Arnstein¹⁶은 labile methyl group의 precursor에 對하여 研究한 結果 serine의 hydroxymethyl group이 가장 重要한 precursor이며 다음에 formate 그 다음에는 glycine의 L位炭素이며 vitamin B₁₂는 이들의 precursor에서 methyl group 生成을 賦活한다고 하였다. 이와같이 生體內에서 methionine, choline의 precursor로 가장 重要한 것이 serine이라 함을 생각할때 網膜體內에서의 serine이 labile methyl group의 生成에 關係가 있지 않나 생각되는 바이다.

V 結 論

참개구리 (*Rana nigromaculata*) 眼球의 網膜과 水晶體를 20%鹽酸으로 加水分解하여서 그 蛋白質의 構成 amino酸을 paper chromatography에 依하여 分離한 結果 다음과 같은 것이 確認되었다.

1) 網膜體와 水晶體는 同一한 成分이었는데 ① Aspartic acid ② Glutamic acid ③ Serine ④ Glycine ⑤ Lysine ⑥ Arginine ⑦ Threonine ⑧ Alanine ⑨ Tyrosine ⑩ Histidine ⑪ Proline ⑫ Methionine + Valine ⑬ Phenylalanine ⑭ Leucine 그 外에 未知物質 2種을 分離하였다.

2) 개구리 網膜體中の 遊離 amino酸을 抽出하여 paper chromatography에 依하여 分離하였던 바 sample의 量이 적은 탓인지 잘 分離되지 않았다. 다만 sample의 量이 많을때나 적을때나 serine, glutamic acid, glycine이 항상 分離되었으며 sample이 많았을 때는 이 外에 β -alanine, γ -amino butyric acid, methionine + valine 등이 分離되었다.

本研究를 積極的으로 指導해 주신 韓相準博士와 李春寧博士에게 甚深한 謝意를 表합니다.

文 獻

- (1) Y. Uyama, S. Okino, T. Watanabe, J. Ichihara, and Y. Mimura; 1956, Med. J. Osaka Univ. 7, 429.
- (2) Francis Heed Adler, 1953, Physiology of the eye, p. 201.
- (3) Schemidt, W. T., 1938, Kolloid Zschr., 165, 137.
- (4) Sjostrand, F. S., 1948, J. Cell. & Comp. Physiol., 33, 383.
- (5) Sjostrand, F. S., 1953, *ibid.* 42, 15.
- (6) 姜成浩, 朱宰江 (梨花女子大學校 韓國文化研究院 學術論文集, 發刊中)
- (7) L. Zechmeister, 1948, Ann. N. Y. Acad. Sci., 49, 145.
- (8) A. T. P. Martin, 1948, *ibid.* 49, 249.
- (9) R. J. Williams and H. Kirby, 1948, Science, 107 481.
- (10) H. G. Kunkel and A. Tiselius, 1951, J. Gen. Physiol., 35, 89.
- (11) W. H. Stein and S. Moore, 1948, J. Biol. Chem., 176, 337.
- (12) W. H. Stein and S. Moore, 1949, *ibid.* 178, 79.
- (13) W. H. Stein and S. Moore, 1951, *ibid.* 192, 663.
- (14) 姜成浩 (梨花女子大學校 韓國文化研究院 學術論文集, 發刊中)
- (15) 細谷雄二, 1957, 日本生理誌, 19, 277.
- (16) Arnstein. H. R. V. *et al.*, 1953, Biochem. J., 55, 259.