KOREAN JOURNAL OF ZOOLOGY
Vol. 16, No. 3, 193~202(1973)

척추동물의 Isozyme에 관한 비교연구 IV.
한국산 개구리목의 Lactate 및 Malate Dehydrogenase Isozyme

고정식 · 조동현 · 박상윤
(성균관대 · 대학원)
(1973. 9. 15 수리)

Comparative Studies of Isozymes in Vertebrate IV.
Lactate and Malate Dehydrogenase Isozymes of Korean Anura

Jeong Sik Ko, Dong Hyun Cho and Sang Yoon Park
(Graduate School, Sung Kyun Kwan University)

SUMMARY

A cellulose acetate electrophoretic survey on Korean Anura has revealed the presence of diverse lactate and malate dehydrogenase isozymes. The LDH and MDH isozymes in the tissues of the brain, heart, stomach, skeletal muscle and liver of the six species of Anura examined show the species specific patterns which differ from those of mammals and birds. Two isozymic forms of LDH and MDH exist in both *Rana nigromaculata* and *Rana nigromaculata coreana*, respectively, with almost the same pattern. LDH of *Bombina orientalis* has five isozymic forms, and that of *Rana temporaria ornativentris* contains four isozymes. *Bufo* sp. has 3 to 5, and *Rana rugosa* has 3 to 4 isozymic bands according to the tissues.

MDH's of all animals have two isozymic forms with different spacing on the zymograms.

서 론

척추동물의 isozyme 가운데에서 가장 널리 연구된 것은 젖산수소이탈효소(LDH; lactate dehydrogenase)이다 (Markert, 1963; Kaplan, 1964; Wieland & Pfleiderer, 1963). 포유류와 조류의 LDH는 5개의 기본적인 isozyme으로 구성되어 있으나 어류, 양서류 및 파충류에서는 크게 다르다(Chen, 1968; Graninger & Kunz, 1966; Wieland *et al.*, 1959; Agrell and Kjellberg, 1965). 특히 hybridization test에서 bull frog의 LDH는 독특한 행동을 하는 점에서 닭이나 소의 LDH와 다르다(Kaplan, 1964).

말산수소이탈효소(MDH, malate dehydrogenase) isozyme은 LDH 보다 다양성이 적지만 종에 따른 특징을 볼 수 있다(Chen, 1968; Wieme, 1965; Wright and Subtelny, 1971; Agrell and Kjellberg, 1965).

이러한 isozyme의 다양성은 계통학적인 면에서 의의가 큰 것은 사실이나(Kaplan, 1970; Wilson *et al*, 1964), 아직까지 강이나 과의 범주에서 isozyme의 계통학적인 분석에 명확한 자료가 얻어진 것이 없다. 특히 우리나라의 양서류에 관한 isozyme의 계통학적인 연구는 개구리목의 뇌조직에 관한 것이 있을 뿐이다(박·홍·조, 1971; 박·조·고, 1972).

본 연구는 이러한 점을 감안하여 뇌조직을 포함한 각 기관의 LDH 및 MDH isozyme의 pattern을 비교함으로서 개구리목에 속한 종 상호간의 유연관계를 추궁하려고 시도했다.

재료 및 방법

실험동물은 서울근교와 연천, 용문리, 춘천 및 영월지역에서 채집한 개구리(*Rana nigromaculata*) 금개구리(*Rana nigromaculata coreana*), 옴개구리(*Rana rugosa*), 산개구리(*Rana temporaria ornativentris*), 물두꺼비(*Bufo* sp.) 및 무당개구리(*Bombina orientalis*)의 무미목 6종을 사용하였다.

실험동물은 단두 도살후 각 장기를 떼어 조직 : 증류수를 1 : 6(w/v) 정도로 하여 ice bath 속에서 수동식 glass homogenizer로 20분간 분쇄하여 얻은 조직액을 barbituric acid buffer(pH 8.6, 이온강도 0.075)에서 cellulose acetate strip 전기영동법으로 LDH(lactate dehydrogenase, L-lactate:NAD oxidoreductase. E.C., 1.1.1.27) 및 MDH (malate dehydrogenase, L-malate: NAD oxidoreductase, E.C., 1.1.1.37) isozyme을 분리 하였으며, 특별한 경우를 제외 하고는 폭 1cm당 0.75mA의 정전류로 60분간 실시하였다. 기타 방법은 박·홍·조(1971) 및 박·조(1972)의 방법에 따랐다. cellulose acetate strip Separax (Fuji Photo Co., Japan), Selecta (S. & S. Germany), Celotate (Millipore, U.S.A.)를 사용하였다.

결 과

무당개구리의 심근, 골격근, 간, 위 및 뇌조직에서 얻은 LDH isozyme은 5개의 band로 구성되어 있다. 그러나 옴개구리는 조직에 따라 3개 내지 4개, 개구리는 2개, 물두꺼비는 조직에 따라 3,4,5개로 구성되어 있으며 산개구리는 조직에 따라 3개 내지 4개로 구성되어 있다. 금개구리와 개구리는 2개로 구성되어 있다(Figs. 1—5).

개구리목 동물의 LDH isozyme은 포유류와는 달리 이동속도에 약간의 차이는 있으나. 뇌와 골격근에서의 pattern이 대단히 유사한 점이 특징이다(Figs. 3,4).

무당개구리 각조직의 LDH isozyme을 기준으로 하여 실험동물을 비교하면, 개구리는 LDH-3과 LDH-5를, 금개구리는 LDH-2와 LDH-5만을 갖고 있다. 산개구리의 심근, 위 및 뇌조직은 특이하여 양극쪽으로 치우쳐서 LDH-1a가 나타나며, 무당개구리의 LDH-1의 위치에 LDH-1이 나타났다(Figs. 4,5,6). 옴개구리는 무당개구리에 비하여 isozyme 사이의 간격이 조밀한데, 위, 간, 뇌 및 골격근에서는 LDH-2, LDH-4, LDH-5의 3개를, 심장은 LDH-2, LDH-3, LDH-4, LDH-5를 갖고 있다. 물두꺼비는 무당개구리에 비하여 isozyme의 이동속도가 빠르고 각 isozyme 사이의 간격이 조밀하게 나타났으며, 골격근, 뇌 및 위에서는 LDH-2, LDH-3, LDH-4, LDH-5, LDH-5a가 나타났고, 심장에서는 LDH-3, LDH-4, LDH-5, LDH-5a, 간에서는 LDH-4, LDH-5, LDH-5a가 각각 나타났다.

Figs. 1—5

1. *Bonbina orientalis*
2. *Rana nigromaculata*
3. *Rana nigromaculata coreana*
4. *Rana rugosa*
5. *Rana temporaia ornativentris*
6. *Befo* sp

Fig. 6

1. liver (*Bombina orientalis*)
2. stomach (*Rana nigrolmaculata*)
3. brain (*Rana nigromacuat coreana*)
4. stomach (*Rana rugosa*)
6. liver (*Bufo* sp.)

고 찰

Agrell and Kjellberg (1965)는 starch gel 전기영동법으로 *Rana temporaria*의 심근, 콩팥 및 알에서 LDH isozyme이 4개의 band로 구성되어 있음을 밝혔으며, Graninger and Kunz(1966)와 Chen(1968)은 acrylamide gel전기영동법으로 뇌를 비롯한 여러 조직의 LDH isozyme이 2개의 band로 구성되고 있다고 하였다. 그러나 본 실험에서는 *Rana temporaria ornativentris*에서 4개의 LDH isozyme이 확인되었다. 본 실험에서는 *Rana nigromaculata*와 *Rana nigromaculata coreana*에서 2개의 LDH isozyme이 서로 거의 같은 형으로 나타났으며, MDH isozyme도 같은 pattern을 보여 주었다. 따라서 이 2종은 LDH와 MDH isozyme에 관한 한 계통상 매우 가까운 유연관계에 있음을 암시한다.

*Triturus alpestris*에서는 3개의 LDH isozyme 형이, 그리고 *Bombina variegata*에서는 기관에 따라 1개 내지 3개의 isozyme이 나타난다고 보고되고 있다(Chen, 1968). 그러나 본 실험에서는 *Bombina orientalis*에서 5개의 LDH isozyme이 확인되었다.

*Bufo vulgaris*는 2개의 LDH isozyme을 갖고 있다고 보고 되어 있는데(Wieland *et al.*, 1959), 본 실험에서 *Bufo* sp.는 조직에 따른 변이가 있어 LDH isozyme이 3개에서 5개까지의 band로 나타났다.

Wright and Moyer(1966)는 *Rana pipiens, Rana pipiens sphenocephala, Rana palustris* 및 *Rana sylvatica*에서 LDH isozyme이 기관에 따라 3개에서 5개까지의 band로 나타난다고 하였으며, LDH-1의 위치에 3~5개의 subband가 있다고 하였다. 그러나 본 실험에서는 *Rana nigromaculata, Rana nigromaculata coreana, Rana rugosa, Rana temporaria ornativentris*에서 LDH isozyme이 2개에서 4개까지 나타났다.

*Rana catesbeina*의 올챙이에서는 3개의 LDH isozyme이 발견되었고(Kim *et al.*, 1966), Adams and Finnegan(1965)에 의하여 *Ambystoma gracile*에서 8~12개의 LDH isozyme이 증명되고 있다. 또한 agar 및 acrylamide gel 전기영동법을 사용하여 Kunz and Hearn(1967)은 *Xenopus laevis*에서 7 또는 8개의 LDH isozyme을 발견하였다. 이와같이 양서류의 LDH isozyme 영동상은 조류나 포유류와는 달리 커다란 다양성을 보여주고 있다. 따라서 양서류에 있어서는 LDH isozyme이 subunit의 random aggregation 가설과 상반되는 것 처럼 보인다(Wright, 1964). Moyer *et al.* (1968)은 개구리과에 속하는 13종의 양서류로부터 LDH isozyme을 분리하여 비교 검토한 결과 개구리과의 보편적인 LDH isozyme 형은 9개이고 이들 isozyme의 subunit 구성은 LDH-1a=B'4, LDH-1b=B'_3B_1, LDH-1c=B'_2B_2, LDH-1d=B'_1B_3, LDH−1e=B_4, LDH−2=A_1B_3, LDH-3

$=A_2B_2$, LDH-4$=A_3B_1$, LDH-5$=A_4$일 것이라 했다. 흔히 starch gel 전기영동법에서 6개의 isozyme이 나타나는데, 이들은 LDH-1c, LDH-1d, LDH-1e, LDH-3, LDH-4 및 LDH-5이다. B형 subunit는 B'형보다 더 빠르게 합성된다. 그러므로 이러한 현상은 아마도 2가지 B형 subunit의 합성속도에 10배정도의 차이가 있기 때문인것 같다. 이외에 또 한가지 다른이유는 LDH-2의 형성이 어떤 제한을 받는데 기인하는것 같다.

Chen(1968)은 acrylamide gel 전기영동법으로 *Bombina variegata*의 정소에서 MDH isozyme의 단일 band를, 심장에서 2개의 isozyme을 검출하였다. 한편 *Triturus alpestris*의 콩팥과 간장에서는 단일 MDH isozyme을, 골격근에서는 2개의 MDH isozyme 을 확인하였다. 그러나 *Rana temporaria*에서는 발생단계는 물론 성체에서 까지도 단 하나의 MDH isozyme만이 나타난다고 하였다. 본 실험에서는 대부분이 2개의 MDH isozyme 이 나타났는데, 이는 위의 사실과 어느정도 일치한다고 볼 수 있다.

본 실험을 종합하 보면 크게 2가지 형의 MDH isozyme으로 나눌 수 있다. 하나는 개구리와 금개구리의 경우와 같이 2개의 MDH isozyme band가 아주 가깝게 나타나는 것과 다른 종에서 처럼 2개의 isozyme이 비교적 먼 거리에 떨어져서 나타나는 것이다. 그러나 starch gel 전기영동법으로 실험한 Wright와 Subtelny (1971)의 결과는 *Rana pipiens pipiens*와 *Rana pipiens sphenocephala*에서 2개이상의 MDH isozyme이 있음을 확인하였다. 지금까지 대부분의 동물이나 고등식물에서 MDH는 2가지형이 알려져 있다. 이들 MDH isozyme의 하나는 mitochondria(MDH-m)에 있고, 다른하나는 상층액(MDH-s)에 존재하는데(Grimm and Doherty, 1961), 이들은 서로 다른 유전인자좌의 조절하에 있다고 한다(Shaw, 1969 a,b.). 또 이들 서로 다른 MDH-m과 MDH-s는 conformational isomer일 것이라는 주장도 있다(Kitto *et al.*, 1966). Wright와 subtelny(1971)는 *Rana pipiens berlandieri*에서 빠른 속도로 이동하는 3개의 MDH-s isozyme과 느린 속도로 이동하는 MDH-m isozyme이 있다고 했는데, 본 실험에서 검출된 MDH isozyme은 MDH-s와 MDH-m의 혼합형이라고 할수 있다.

적 요

Cellulose acetate strip 전기영동법으로 한국산 개구리목 동물 6종에서 각 장기별로 LDH와 MDH isozyme을 조사하였다. LDH isozyme은 포유류와 조류의 그것과는 달리 뇌와 골격근의 isozyme 형이 유사한것이 특징이다. 과에 따른 LDH isozyme의 특징은, 무당개구리는 5개의 isozyme이 모두 나타났으며, 두꺼비과의 물두꺼비는 5개의 isozyme이 나타났으나 무당개구리에 비하여 이동속도가 빠르고, isozyme사이의 간격이 조밀하다. 개구리과의 개구리, 금개구리, 옴개구리 및 산개구리 에서는 2개 내지 4개의 isozyme만이 나타났다. 개구리목의 LDH와 MDH isozyme은 종에 따른 특징을 잘 나타내고 있으며, 과 사이의 특징도 아울러 살필 수 있다.

참 고 문 헌

Adams, E. and C. V. Finnegan, 1965. An investigation of lactate dehydrogenase acitivity in early amphibian development. *J. Exp. Zool.* **158**: 241—252.

Agrell, I. and B. Kjellberg, 1965. A comparative analysis of the isozyme pattern of dehydrogenase. *Comp. Biochem. Physiol.* **16**: 515—521.

Chen, P. S., 1968. Patterns of soluble proteins and multiple forms of dehydrogenase in amphibian development. *J. Exp. Zool.* **168**: 337—350.

Graninger, J. N. R. and Y. W. Kunz, 1966. Changes in the isoenzymes of lactic and malic dehydrogenases during the development of the frog, *Rana temporaria*. *Helgel. wiss. Meeresunterschg.* **14**: 335—341.

Grimm, F. C. and D. G. Doherty, 1961. Properties of the two forms of malate dehydrogenase from beef heart. *J. Biol. Chem.* **236**: 1980—1985.

Kaplan, N. O., 1963. Multiple forms of enzymes. (*In:* Symposium of Multiple Forms of Enzymes and Control Mechanism). *Bacteriol Rev.* **27**: 155—169.

Kaplan, N. O., 1964. Lactate dehydrogenase structure and function. *Brookhaven Symp. Biol.* **17**: 131—153.

Kaplan, N. O., 1970. Evolution of pyridine nucleotide linked dehydrogenase. *Miami Winter Symposia* **1**: 66—88.

Kim, H. C., A. D'Iorio and W. K. Paik, 1966. The activity of lactate dehydrogenase isozymes during thyroxine-induced tadpole metamorphosis. *Canad. J. Biochem.* **44**: 303—310.

Kitto, G. M., P. M. Wasserman and N. O. Kaplan, 1966. Enzymatically active conformers of mitochondrial malate dehydrogenase. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, U. S.A. **56**: 578—585.

Kunz, Y. W. and J. Hearn, 1967. Heterogeneity of lactate dehydrogenase in the developing and adult *Xenopus laevis*. *Experientia* **23**: 683—686.

Markert, C. L., 1963. Epigenetic control of specific protein synthesis in differentiating cells. *In:* Cytodifferentiation and Macromolecular Synthesis. (edited by M. Locke) Academic Press, New York. pp. 56—84.

Moyer, F. H., C. B. Speaker and D. A. Wright, 1968. Characteristics of lactate dehydrogenase isozymes in amphibians. *In:* Multiple Molecular Forms of Enzymes, (edited by E.S. Vesell) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **151**(1), 1:650—669.

박상윤, 홍사욱, 조동현, 1971. 척추동물의 isozyme에 대한 비교 연구 I. 수종동물의 뇌조직내 lactate dehydrogenase에 관하여. 성대논문집 **16**: (인쇄중)

박상윤, 조동현, 1972. Cellulose 전기영동에 의한 수소이탈효소 isozyme의 분리. 동학지 **15**: 101—104.

박상윤, 조동현, 고정식, 1972. 척추동물의 Isozyme에 관한 비교 연구 II. 개구리목 뇌조직의 lactate 및 malate dehydrogenase isozyme. 동학지 **15**:105—110.

Shaw, C. R., 1969a. Isozymes classification frequency and significance. *Int. Rev. Cytol.* **25**: 297—332.

Shaw, C. R., 1969b. Molecular basis of isozymes. *Jap. J. Genet.* 44, Suppl. **1**: 31—35.

Wieland, Th., G. Pfleiderer, I. Haupt and W. Wörner, 1959. Über die Verschiedenheit der Milchsäuredehydrogenasen IV. Quantitative Ermittlung einiger Enzymverteilungsmuster. *Biochem. Z.* **332**: 1—10.

Wieland, Th and G. Pfleiderer, 1963. Multiple Formen von Enzymen. *Adv. in*

Enz. **25**: 329–368.

Wieme, R. J., 1965. Agar Gel Electrophoresis. Elsevier Pub. Co., Amsterdam. pp. 324—341.

Wilson, A. C., N. O. Kaplan, L. Levine, A. Pesce, M. Reichlin and W. S. Allison, 1964. Evolution of lactic dehydrogenases. *Fed. Proc.* **23**: 1258—1266.

Wright, D. A., 1964. Ontogeny of hybrid enzymes in *Rana pipiens* x *Rana palustris* crosses. *Am. Zool.* **4**: 397. Abstract.

Wright, D. A. and F. H. Moyer, 1966. Parental influenses on lactate dehydrogenase in the early development of hybrid frogs of the genus Rana. *J. Exp. Zool.* **163**: 215—230.

Wright, D. A. and S. Subtelny, 1971. Nuclear and cytoplasmic contributions to dehydrogenase phenotypes in hybrid frog embryos. *Develop. Biol.* **24**: 119—140.

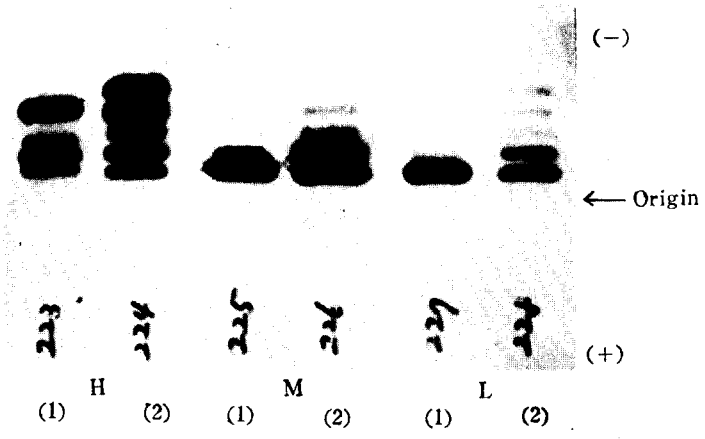

Plate 1. Species specific patterns of lactate dehydrogenase isozymes in the frogs, *Rana rugosa* (1) and *Bombina orientalis* (2) H; heart, M; muscle, L; liver.

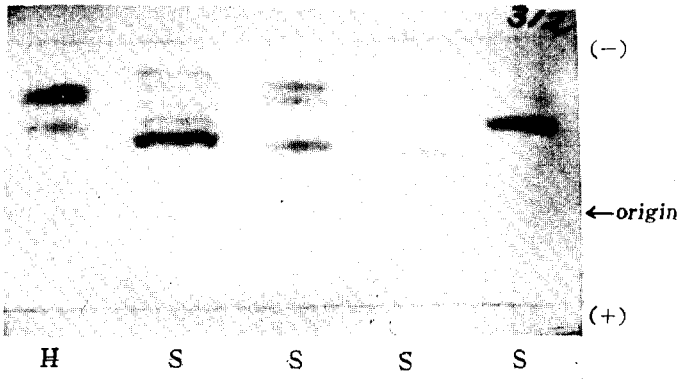

Plate 2. Lactate dehydrogenase isozymes of heart (H) and stomach (S) homogenates in Korean Anuran; Left to right, *Rana nigromaculata*, *Bufo* sp., *Rana rugosa*, *Bombina orientalis* and *Rana nigromaculata*.

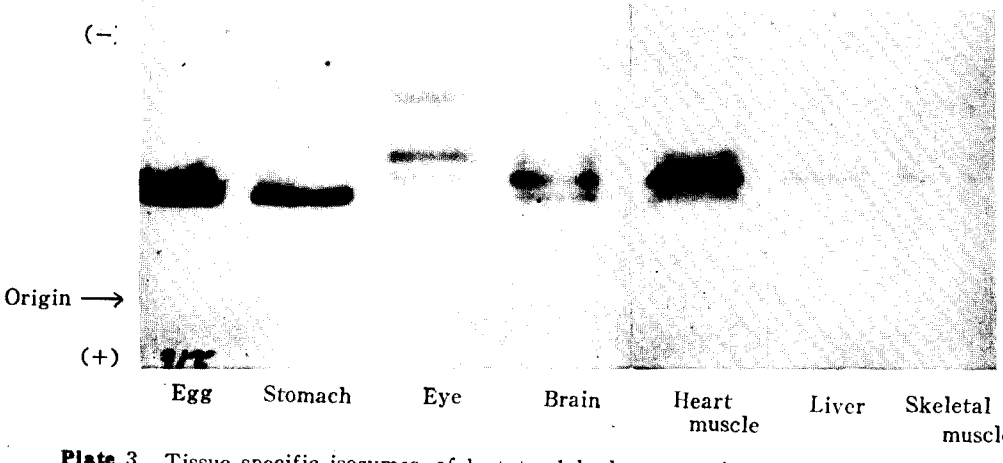

Plate 3. Tissue specific isozymes of lactate dehydrogenase in *Rena temporaria ornativentris*.