

간질(*Fasciola hepatica*)의 Aspartate 및 Alanine Aminotransferase에 관하여

중앙대학교 의과대학 생화학교실
박선호 · 권변수 · 이희성

중앙대학교 문리과대학 생물학과
승 철 용

서 론

단백질을 구성하는 대부분의 아미노산은 간장에서 분해된다(Harper, 1975). Alanine 및 aspartate는 gluconic 아미노산으로 glucose의 생성을 위한 탄소공급원으로 알려져 있다. 즉 이들 아미노산은 아미노기 수용체인 α -ketoglutarate 존재하에 aminotransferase의 촉매작용으로 각 아미노산에 해당되는 pyruvate 및 oxaloacetate가 형성되고 mitochondria내에서 Krebs cycle의 중간 산물로 전환된 후 glucose합성 및 에너지 생산에 이용된다(Felig, 1975).

Glutamate-oxaloacetate aminotransferase (GOT: aspartate 2-oxoglutarate aminotransferase: EC 2.6.1.1) 및 glutamate-pyruvate aminotransferase(GPT: alanine 2-oxoglutarate aminotransferase: EC 2.6.1.2) 등은 동물 및 식물조직에 널리 분포되어 있으며 aspartate 및 alanine과 α -ketoglutarate 사이에서 아미노기 전달반응을 촉매함이 밝혀졌다(Agress, 1959; Reed and Hess, 1974). 또한 이들 효소는 세포질과 mitochondria 분획에 존재하며, 서로 다른 대사경로를 갖는 2개의 isozyme을 갖고 있으며, 이 중 하나는 세포질에 존재하고 다른 하나는 mitochondria에 존재한다(Delorenzo and Ruddle, 1970; Rees and Hess, 1975; Hopper and Segal, 1964; Swick *et al.*, 1965a; Fleisher *et al.*, 1960; Boyd, 1965; Nisselbaum and Kopelovich, 1975). 이들 GOT 및 GPT의 농도 및 활성도는 대사의 중간 산물 또는 어떤 다른 물질에 의하여 조절된다고 한다(Zuchlewski and Gaebler, 1957; Rosen *et al.*, 1959; Schimke, 1962).

Beaton *et al.* (1957)은 GPT의 활성도는 단백질대사와 직접적인 관계가 있다고 하였으며, Rosen *et al.* (1959)는 당신생과 관계가 있다고 하였다.

효소의 isozyme에 대한 연구가 발전함에 따라 GPT 및 GOT의 isozyme에 대하여도 많이 연구되었다. 즉 혈청과 심근 및 간장의 효소추출물로부터 column chro-

matography와 전기이동법에 의하여 2가지형의 GOT를 각각 분리하였다(Augustinsson and Erne, 1961; Delorenzo and Ruddle, 1970). 또 Reed and Hess(1975)는 식물의 잎에서 추출한 효소를 DEAE-cellulose column chromatography를 행하여 2종의 isozyme을 분리하였다. 2종의 isozyme은 세포질과 mitochondria에 존재하며, mitochondria에 있는 GOT는 양성으로 전기이동상에서 음극으로 움직이고 세포질에 존재하는 GOT는 양극으로 움직이는 GOT이다. 세포질의 GOT는 음이온으로 하전되어 있으므로 DEAE-cellulose에 쉽게 흡착되며 높은 ion 농도의 완충액으로 용출된다고 한다(Fleisher *et al.*, 1960; Morino *et al.*, 1963). 또한 GOT 및 GPT는 glutamate를 산화시키는 의의 있는 효소이다. 즉 glutamate가 α -keto산인 pyruvate 또는 oxaloacetate의 존재하에 이들 효소의 촉매작용으로 alanine 및 aspartate가 합성되며 나아가서 단백질 합성에 이용된다고 한다(Gutfreund *et al.*, 1961). DeRosa and Swick (1975)는 mitochondria에 있는 GPT isozyme은 alanine을 glucose로 전환시키는 당신생조직에만 존재하나 세포질에 있는 GPT isozyme은 해당 및 당신생조직에 모두 존재한다고 하였다.

간질(*Fasciola hepatica*)에서 탄수화물대사(Sturm *et al.*, 1972; Prichard and Schofield, 1968; Mansaur, 1959, 1962; Agatsuma and Suzak, 1980), respiratory metabolism (Moss, 1970), urea cycle (Janssens and Bryant, 1969) 등에 관여하는 효소에 대하여 많이 연구되어 있다. 그러나 transaminase에 관하여는 Daugherty (1952)의 보고만을 찾아 볼 수 있었다.

GOT 및 GPT에 대하여는 여러동물 및 식물을 대상으로 많이 연구되었지만 기생충에 대하여는 자세히 연구되어 있지 않다. 따라서 저자는 간질(*Fasciola hepatica*)에서 alanine 및 aspartate 대사의 양상을 밝히고자 우선 GOT 및 GPT의 분포와 isozyme pattern을 관찰하고자 본 실험을 행하였다.

실 험 재 료

1. 시 약

2-Mercaptoethanol, DEAE-cellulose, pyridoxal phosphate, alanine, aspartic acid 및 α -ketoglutarate 등은 Sigma Chemical Co., St. Louis Missouri, U.S.A. 재를 구입 사용하였으며, potassium phosphate monobasic, potassium phosphate dibasic, EDTA, sodium hydroxide, 2,4-dinitrophenylhydrazine 및 ammonium sulfate 등은 E. Merck 재를 사용하였다. 다른 일반 시약들은 일급 또는 특급을 사용하였다.

2. 실험재료

본 실험에서 시료로 사용한 간질 (*Fasciola hepatica*) 은 서울특별시 구로구 독산동 협진도산장에서 소의 신선한 간으로 부터 채취하여 -10°C 에 보관하며 시료로 사용하였다.

실 험 방 법

1. 효소의 활성도 측정

1) Aspartate aminotransferase 활성도 측정

GOT의 활성도는 Reitman and Frankel(1974) 방법으로 측정하였다. 0.1M aspartate 및 2mM α -ketoglutarate를 함유한 0.1M 인산염 완충액 (pH 7.4) 1ml에 효소액 0.2ml를 가하여 잘 혼합한 후 37°C 의 물중탕에서 60분간 보온하였다. 이 시험관에 1mM 2,4-dinitrophenylhydrazine 용액 1ml를 가하여 반응을 정지시킨 후 20분간 실온에서 방치하고 여기에 0.4N NaOH 용액 10ml를 가하여 발색시켰다. 대조실험으로는 효소액 대신 증류수를 가하여 실험군과 같은 조작으로 발색시킨 후 파장 546nm에서 대조군에 대하여 흡광도를 측정하였다. 효소의 활성도는 흡광도로부터 표준곡선에 의하여 구하였으며, 비활성도 (specific activity)는 효소의 unit를 mg 단백질로 나눈 값으로 표시하였다.

2) Alanine aminotransferase 활성도 측정

GPT의 효소 활성도는 Reitman and Frankel(1974)의 방법에 의하여 측정하였다. 0.2M alanine 및 2mM α -ketoglutarate를 함유한 0.1M 인산염 완충액 (pH 7.4) 1ml에 효소액 0.2ml를 가하여 잘 혼합한 후 37°C 물중탕에서 30분간 보온하였다. 보온이 끝난 시험관에 1mM 2,4-dinitrophenylhydrazine 용액 1ml를 가한 후 실온에서 20분간 방치하고 0.4N NaOH 용액 10ml를 가하여 발색시켰다. 대조군은 효소대신에 증류수 0.2ml를 가한 후 시료군과 같은 방법으로 발색시켰다. 5분 후에 파장 546nm에서 대조군에 대하여 시료군의 흡광도를 측정하여 표준곡선에 의하여 효소의 활성도를 환산하였다.

2. 효소의 추출

신선한 간질(肝臟)을 취하여 미리 냉각시킨 0.9%

NaCl용액으로 세척하여 혈구와 불순물을 제거하였다. 위와 같이 처리한 시료 30g을 취하여 Taylor and Jenkins(1966)의 방법에 의하여 다음과 같이 조효소(crude enzyme)를 추출하였다. 즉 시료에 같은 부피의 0.05M 인산염 완충액 (pH 7.0)을 가하여 Waring blender로 최대속도에서 2분간 homogenize하였다. 이 homogenate는 다시 Teflon-pestle로 2분간 homogenize한 후 3겹의 gauze로 여과하고 여액을 $700\times\text{g}$ 에서 10분간 원심분리하여 mitochondria를 분리하였으며 그 상층액을 조효소로 사용하였다.

3. 효소의 정제

1) Ammonium sulfate에 의한 단백질의 침전

위와 같이 하여 추출한 조효소액을 Dixon(1953)의 방법에 의하여 단백질을 분리하였다. 즉 조효소액 100ml당 17.7g의 ammonium sulfate를 서서히 저어주며 소량씩 60분간에 걸쳐 가하여 30%로 포화시켰다. Ammonium sulfate를 가한 후에도 $0\sim 4^{\circ}\text{C}$ 에서 2시간 서서히 저어주고 이때 생긴 단백질 침전은 $12,000\times\text{g}$ 에서 30분간 원심분리하여 제거하였다. 상층액을 수집하고 상층액 100ml당 37.2g의 ammonium sulfate를 앞에서와 같은 방법으로 가하여 80%로 포화시킨 후 $12,000\times\text{g}$ 에서 30분간 원심분리하여 상층액을 제거하고 침전물을 취하였다(Ogawa *et al.*, 1970). 상기와 같이 하여 얻은 ammonium sulfate 30% 및 80% 침전물은 각각 0.1mM EDTA 및 1mM 2-mercaptoethanol을 함유한 5mM 인산염 완충액 (pH 7.8) 소량에 용해시킨 후 상기와 같은 완충액 2,000ml에 대하여 24시간 투석하고 불용성 물질을 원심분리하여 제거하였다.

2) DEAE-cellulose column chromatography

DEAE-cellulose를 증류수에 3시간 헹구어 불용성을 제거한 후 0.1mM EDTA 및 1mM 2-mercaptoethanol을 함유한 5mM 인산염 완충액 (pH 7.8)으로 충분히 세척하였다. 세척한 DEAE-cellulose는 Ogawa *et al.*(1970) 및 Ogawa and Ichihara(1972) 등의 방법에 따라 column($2\times 40\text{cm}$)에 충전시키고 다시 상기한 인산염 완충액으로 평형상태가 될 때까지 세척하였다. 이 column에 ammonium sulfate로 30~80% 포화시켜 얻은 투석한 단백질용액을 흡착시킨 후 같은 인산염 완충액 (pH 7.8) 약 50ml로 세척하였다.

이 column은 0.1mM EDTA 및 1mM 2-mercaptoethanol을 함유한 5mM 인산염 완충액 (pH 7.8) 300ml를 mixing chamber에 넣고, 0.1mM EDTA 및 1mM 2-mercaptoethanol을 함유한 0.3M 인산염 완충액 (pH 7.8) 300ml를 reservoir chamber에 가하여 linear concentration gradient 조건하에서 효소를 용출하였다. 이때 유속은 0.6ml/min로 10ml씩 fraction collector로 약 60개의 분획을 얻었다. 각 분획은 파장 280nm에서 단백질의 흡광도를 측정하는 한편, 각 분획마다 효소의 활성도를 측정하였다.

4. 단백질 정량

Homogenate, 핵분획, 세포질분획, mitochondria 분획 및 정제과정중의 단백질은 Lowry *et al.* (1951)의 방법으로 정량하였다. 이때 표준 단백질로는 bovine serum albumin을 사용하였다.

결 과

간질(*Fasciola hepatica*)에서 GOT 및 GPT의 분포와 세포질에서 이 효소를 정제하여 isozyme의 존재유무를 관찰한 결과는 다음과 같다.

간질을 homogenize한 후 분별원심분리하여 핵분획, mitochondria분획 및 세포질분획을 분리하고 각 분획에서 GOT의 활성도를 측정한 결과는 표1과 같다. 간질의 homogenate에서 이 효소의 총 활성도는 약 0.55 unit/g이며 단백질 함량은 약 96mg으로 비활성도는 0.0058이었다. 이 homogenate를 원심분리하여 얻은 핵분획에는 총 효소활성도의 약 5.45%인 0.03unit/g이 함유되어 있으며 비활성도는 0.0034이었고, mitochondria분획에도 총 활성도의 약 23.64%인 0.13unit/g이 함유되어 있으며 비활성도는 0.0067이었다. 세포질분획에는 총 활성도의 약 70.91%인 0.39unit/g이 함유되어 있으며 비활성도는 0.0063로 핵분획보다는 약 1.85배 높았으나 mitochondria 분획과는 거의 같았다. 즉 간질의 세포질분획에는 GOT가 가장 많이 함유되어 있으나 비활성도는 mitochondria 분획과 유사함을 알 수 있었다.

간질의 GPT 분포는 표 2와 같다. 즉 간질의 homogenate에서 GPT의 총 활성도는 약 0.92unit/g이며 단백질 함량은 약 96mg으로 비활성도는 0.0096이었다. 이 homogenate를 원심분리 하여 얻은 핵분획에는 총 효소활성도의 약 11.96%인 0.11unit/g이 함유되어 있으며 비활성도는 0.0126이었고 mitochondria 분획에는 총활성도의 약 21.74%인 0.20unit/g이 함유되어 있으며 비활성도는 0.0104이었다. 세포질분획에는 총 활성도의 약 66.30%인 0.61unit/g이 함유되어 있으며 비활성도는 0.0096으로 핵 및 mitochondria 분획에 비하여 각각 약 1.43배 및 1.08배 낮았다. 즉 간질의 세포질 분획에는 GPT가 가장 많이 함유되어 있는 반면 비활성도는 가장 낮음을 알 수 있었다.

이상과 같이 GOT 및 GPT의 효소활성도가 가장 높은 세포질분획에서 이들 효소의 isozyme pattern에 관한 실험 결과는 표 3, 4 및 그림 1, 2와 같다. 표 4 및 그림 1은 GOT를 부분정제하여 얻은 결과이다. 즉 표 4에서 보는 바와 같이 간질 30g의 homogenate의 GOT 활성도는 약 16.56unit이며 단백질 함량은 약 2,866mg으로 비활성도는 0.0058이었다.

이 homogenate를 10,000×g에서 30분간 원심분리하여 얻은 세포질분획의 효소활성은 homogenate의 약 71%인 11.70unit였으며 단백질 함량은 1,872mg으로 비활성도는 1.09이었다. 세포질분획을 ammonium

Table 1. Distribution of aspartate aminotransferase (GOT) in *Fasciola hepatica*

	Activity (unit/g)	Protein (mg/g)	Specific activity	Distribution(%)
Homogenate	0.55	95.55	0.0058	100
Cytosol	0.39	62.40	0.0063	70.91
Mitochondria	0.13	19.17	0.0067	23.64
Nuclei	0.03	8.74	0.0034	5.45

Reaction mixture consisted of 80mM aspartate, 1.6mM 2-oxoglutarate, 80mM phosphate buffer(pH 7.4) and enzyme in a total volume of 1.2ml. The activity was expressed as Reitman and Frankel units.

Table 2. Distribution of GPT from *Fasciola hepatica*

Fraction	Activity (unit/g)	Protein (mg/g)	Specific activity	Distribution(%)
Homogenate	0.92	95.55	0.0096	100
Cytosol	0.61	62.40	0.0098	66.30
Mitochondria	0.20	19.17	0.0104	21.74
Nuclei	0.11	8.74	0.0126	11.96

Reaction mixture consisted of 0.166M alanine, 1.6mM 2-oxoglutarate, 80mM phosphate buffer (pH 7.4) and enzyme in a total volume of 1.2ml. The activity was expressed as Reitman and Frankel units.

Table 3. Isozyme patterns of aspartate aminotransferase from *Fasciola hepatica*

Isozyme	Activity (units)	Distribution of enzyme
Enzyme I	7.13	73.20
Enzyme II	2.61	26.80

sulfate로 30% 포화시켜 분리한 단백질의 효소활성은 전체 효소활성도의 0.79%인 0.13unit이었다. 단백질을 분리한 상층액을 ammonium sulfate로 30~80%되게 포화시켜 분리한 단백질분획의 효소활성은 전체 효소활성의 약 65%인 10.78unit였고, 단백질 함량은 748.8mg으로 비활성도는 2.61이었다. 그림 1은 이상과 같이 하여 얻은 부분정제한 GOT 효소단백질을 DEAE-cellulose column chromatography를 한 결과를 나타낸 것이다. 즉 GOT의 활성은 전체 효소활성의 약 59%인 9.74unit 함유되어 있으며 단백질 함량은 43.1mg으로 비활성도는 0.2259이었다. 그림 1 및 표 3에서 보는 바와 같이 2종의 GOT isozyme을 분리하였으며, 그 활성도는 각각 73.2% 및 26.8%로 분포되어 있다.

GPT의 경우 표 5에서 보는 바와 같이 homogenate

Table 4. Purification of aspartate aminotransferase from *Fasciola hepatica*

Purification steps	Activity(units)	Protein(mg)	Specific activity	Fold	Recovery (%)
Homogenate	16.56	2,866.5	0.0058	1	100
Cytosol	11.70	1,872.0	0.0063	1.09	70.65
30~80% amm. sulfate sat. ppt	10.78	748.8	0.0151	2.61	65.09
DEAE-cellulose column chromatog.	9.74	43.1	0.2259	38.96	58.82

에서 효소활성도는 27.6unit이며 단백질 함량은 약 2,867mg으로 비활성도는 0.0096이었다. 이 homogenate를 10,000×g로 30분간 원심분리하여 얻은 세포질 분획의 GPT 활성은 homogenate의 약 66%인 18.30 unit이며 단백질 함량은 1,872mg이었다. 이 세포질분획을 ammonium sulfate로 30% 포화시켜 얻은 침전물의 효소활성은 전체 효소활성도의 약 1.78%인 0.49

unit이었다. 단백질을 분리한 상층액을 ammonium sulfate로 30~80% 되게 포화시켜 분리한 단백질의 효소활성은 전체 효소활성의 약 60%인 16.62unit이며 단백질 함량은 748.8mg으로 비활성도는 0.0222이었다. 이상과 같이 부분정제한 GPT 효소를 DEAE-cellulose column chromatography를 행하여 그림 2와 같은 결과를 얻었다. 즉 GPT 활성도는 전체 효소활성의 약 55%

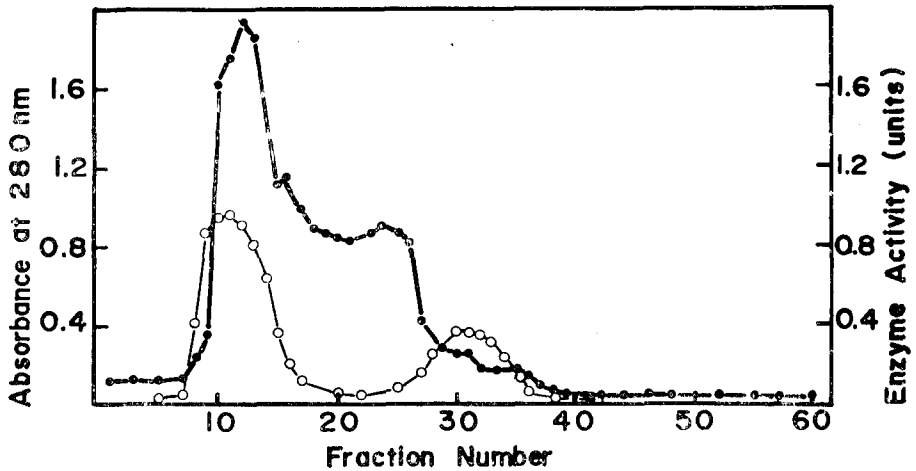


Fig. 1. Chromatography of GOT on DEAE-cellulose. (●—●, protein; ○—○, enzyme activity).

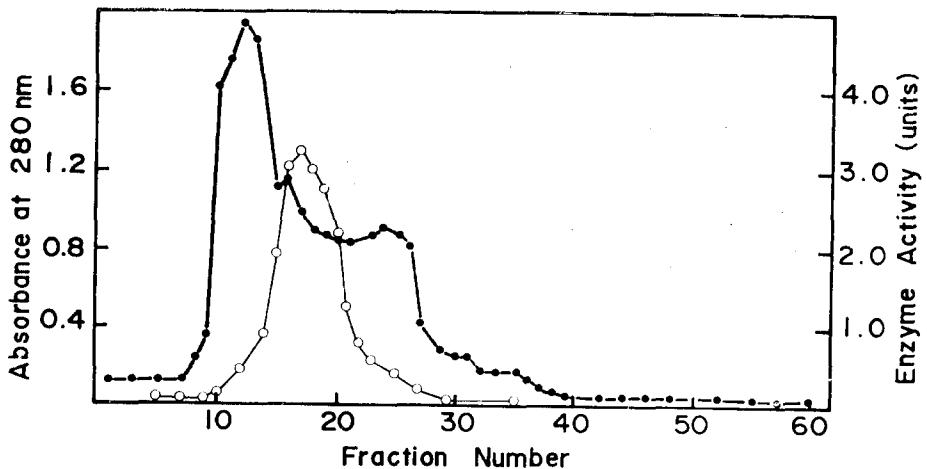


Fig. 2. Chromatography of GPT on DEAE-cellulose. (●—●, protein; ○—○, enzyme activity)

Table 5. Purification of alanine aminotransferase from *Fasciola hepatica*

Purification steps	Activity(units)	Protein(mg)	Specific activity	Fold	Recovery (%)
Homogenate	27.60	2,866.5	0.0096	1	100
Cytosol	18.30	1,872.0	0.0097	1.01	66.30
30~80% amm. sulfate sat. ppt	16.62	748.8	0.0222	2.31	60.22
DEAE-cellulose column chromatog.	15.28	64.2	0.2380	24.79	55.36

인 15.28unit이며 단백질 함량은 64.2mg으로 비활성도는 0.2380이었다. 이상과 같이 하여 GPT를 약 25배 정제하였으나 그림 2에서 보는 바와 같이 GPT의 isozyme을 분리할 수 없었다.

고 찰

동물 및 식물의 여러 조직에 널리 분포되어 있는 GOT 및 GPT는 세포질과 mitochondria에 각각 존재하는 2가지형의 isozyme으로 구성되어 있다. 즉 이들 효소는 세포질에 함유되어 있는 음이온의 isozyme과 mitochondria에 함유되어 있는 양이온의 isozyme으로 존재한다(Boyd, 1965; Kopelovich *et al.*, 1970, 1972; Reed and Hess, 1975; Nisselbaum and Kopelovich, 1975). 또 이들 효소들의 활성도는 동물 및 조직에 따라 많은 차이가 있으며 또한 세포질 및 mitochondria에 각각 함유되어 있는 이들 효소의 isozyme은 동물의 종(species) 및 장기에 따라 isozyme의 분포에도 많은 차이가 있다(Swick *et al.*, 1965a, 1965b; Saier and Jenkins, 1967; DeRosa and Swick, 1975).

Daugherty(1952)는 간질의 homogenate에서 여러 아미노산에 대한 transaminase의 활성도를 측정한 결과 GOT가 가장 높다고 하였다. 그러나 저자의 경우 GPT가 GOT보다 약 1.7배 높음을 알 수 있었다.

저자는 간질에서 GOT와 GPT의 총 활성도와 세포질 및 mitochondria에 함유되어 있는 이들 효소의 isozyme의 분포와 세포질에서 isozyme의 pattern을 관찰하였다. GOT의 경우 총활성도는 0.5unit/g이었으며 세포질과 mitochondria에 0.39unit/g 및 0.13unit/g으로 세포질에 3배 많이 함유되어 있었다. 그러나 효소의 비활성도로 비교하여 볼 때 세포질과 mitochondria가 거의 유사하였다. 이러한 점으로 보아 세포질과 mitochondria에서 aspartate의 대사는 거의 같은 속도로 이루어지는 것으로 생각된다. 또 GPT의 경우 총 활성도는 0.92unit/g이었으며, 세포질과 mitochondria에 각각 0.61unit/g 및 0.20unit/g이 함유되어 있었다. 그러나 비활성도는 mitochondria가 세포질보다 약 1.1배 높은 점으로 보아 alanine 대사는 mitochondria에서 더 활발히 일어나는 것으로 생각된다. 이상과 같이 간질에서 GOT와 GPT는 고등동물과 같이 음이온과 양이온의 isozyme이 각각 존재하나, 고등동물조직의 효소활성도

보다 낮으며 또 세포질과 mitochondria에 존재하는 isozyme의 비율도 차이가 있음을 알 수 있었다.

조직에서 GOT isozyme들은 서로 다른 구획간에서 대사작용을 하지만 이들은 비당물질로 부터 glucose의 합성에 관여하는 것으로 알려져 있다(Shrago and Lardy, 1966). 또한 식물조직에서의 GOT isozyme과 malate dehydrogenase가 함께 작용하여 생성되는 환원당량(reducing equivalent)은 에너지의 공급에 이용된다고 한다(Rehfeld and Tolbert, 1972). 또 Kanfer and Pollak (1961)는 태생기의 흰쥐 간조직에서 alanine 및 aspartate aminotransferase의 활성도와 단백질 생합성과는 깊은 관계가 있다고 하였다.

DeRosa and Swick(1975)는 해당조직인 물적근육과 심장근육조직에서 세포질에 있는 GPT isozyme의 활성도가 mitochondria에 있는 isozyme 활성도 보다 상당히 높았으며, 흰쥐를 제외한 다른 동물에서 당신생조직인 간장과 신장에서는 세포질에 있는 GPT isozyme의 활성도가 mitochondria에 있는 효소활성도 보다 낮다고 하였다. 그러나 mitochondria에 있는 GPT isozyme은 다만 당신생조직인 흰쥐의 간장 및 돼지의 간장과 신장조직에만 존재한다고 하였다. 또한 세포질 및 mitochondria에 phosphoenolpyruvate carboxykinase가 존재하며, 따라서 alanine으로부터 생성된 pyruvate가 glucose 생성에 이용된다고 하였다. 그런데 간질에는 phosphoenolpyruvate carboxykinase의 활성도가 높다고 하였으며(Lee and Vasey, 1970), 이러한 점으로 보아 간질에서는 alanine으로부터 glucose의 생성이 활발히 일어난다고 생각된다.

이상과 같은 점으로 볼 때 간질에서 세포질의 GOT 및 GPT isozyme 활성도가 mitochondria의 isozyme보다 약 3배 높은 점으로 보아 세포질에서 당신생이 더 활발히 일어나는 것으로 생각된다. 또한 이들 효소들은 당신생, 단백질 합성 및 대사작용에 필요한 에너지의 공급과 밀접한 관계가 있는 것으로 생각된다.

GOT 및 GPT isozyme중 세포질에 존재하는 isozyme은 등전점이 낮기 때문에 중성 pH에서 음이온의 하전을 가지고 있으며, mitochondria에 존재하는 isozyme은 등전점이 비교적 높기 때문에 중성 pH에서 양이온의 하전을 가지고 있다.

이와 같은 성질을 이용하여 DEAE-cellulose column chromatography에 의하여 쉽게 isozyme을 분리할

수 있다(Fleisher *et al.*, 1960). 저자는 간질의 세포질분획에서 GOT 및 GPT 효소를 부분정제 하고 DEAE-cellulose column chromatography를 행하였으며, 이때 GOT효소에서 2종의 isozyme을 분리하였으나 GPT 효소에서는 isozyme을 분리하지 못 하였다. 그러나 Chen and Giblett(1971) 및 Ishimoto and Kuwata(1974) 등은 사람의 적혈구에서 GPT의 isozyme을 전기이동법으로 분리하였다. 이상과 같은 점으로 보아 간질의 세포질에는 GPT의 isozyme이 없는 것인지 또는 DEAE-cellulose로 분리가 되지 않는 것인지 좀더 연구하여야 할 점이라고 생각된다. 앞으로 GOT 및 GPT의 isozyme을 정제하여 이화학적성상과 생리적 역할에 대하여 더 연구하고자 한다.

결 론

간질(*Fasciola hepatica*)에서 aspartate aminotransferase(EC 2.6.1.1)와 alanine aminotransferase(EC 2.6.1.2)의 활성도, 분포 및 isozyme의 pattern을 관찰하였다. 효소의 활성도는 Reitman and Frankel 방법으로 측정하였다. 세포질의 isozyme pattern은 ammonium sulfate에 의한 단백질의 침전 및 DEAE-cellulose column chromatography에 의하여 분리하였다. 이상과 같이 하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 간질에서 aspartate 및 alanine aminotransferase의 활성도는 조직 1g당 약 0.55unit 및 0.92unit이었다.

2. 이 조직에서 aspartate 및 alanine aminotransferase의 활성도는 포유동물의 다른 조직에 비하여 상당히 낮았다.

3. Aspartate aminotransferase는 세포질, mitochondria 및 핵분획에 존재하며 세포질에 약 71%, mitochondria에 약 24% 및 핵분획에 약 5%가 분포되어 있었다.

4. Alanine aminotransferase는 세포질에 약 66%, mitochondria에 22% 및 핵분획에 약 12%가 각각 분포되어 있었다.

5. 세포질에 있는 aspartate aminotransferase를 부분정제하여 그 isozyme pattern을 DEAE-cellulose column chromatography법으로 조사한 결과 2종의 isozyme이 검출되었다. 그러나 alanine aminotransferase에서는 활성을 갖는 단일 peak를 얻었다.

인 용 문 헌

Agatsuma, T., and Suzuki, N. (1980) Electrophoretic studies on enzymes in the Japanese common liver fluke, *Fasciola sp.* I. Enzyme variations in the natural population. *Japan. J. Med. Sci. Biol.*, **33**: 249-254.

Agress, C.M. (1959) Evolution of the transaminase. *Am. J. Cardiol.*, **3**:74-82.

Augustinsonn, K.B., and Erne, K. (1961) The heterogeneity of serum glutamic-oxaloacetic transaminase of certain mammalian species. *Experientia*, **17**:394-401.

Beaton, G.H., Curry, D.M., and Veen, M.J. (1957) Alanine-glutamic transaminase activity and protein metabolism. *Arch. Biochem. Biophys.*, **70**:288-290.

Boyd, J.W. (1965) The extraction and purification of two isozymes of L-aspartate: 2-oxoglutarate aminotransferase. *Biochim. Biophys. Acta*, **113**:302-311.

Chen, S.H., and Giblett, E.R. (1971) Polymorphism of soluble glutamate-pyruvate transaminase: a new genetic marker in man. *Science*, **173**:148-150.

Delorenzo, R.J., and Ruddle, F.H. (1970) Glutamate-oxaloacetate transaminase. Genetic in *Mus musculus*: linkage, polymorphism and phenotypes of the GOT-2 and GOT-2 loci. *Biochem. Genetics*, **4**:259-268.

Daugherty, J.W. (1952) Intermediary protein metabolism in helminths. I. Transaminase reactions in *Fasciola hepatica*. *Exp. Parasitol.*, **1**:331-338.

DeRosa, G., and Swick, R.W. (1975) Metabolic implications of the distribution of the alanine aminotransferase isozymes. *J. Biol. Chem.*, **250**:7661-7667.

Dixon, M.A. (1953) A monogram of ammonium sulfate solution. *Biochem. J.*, **54**:457-463.

Felig, P. (1975) Amino acid metabolism in man. *Ann. Rev. Biochem.*, **44**:933.

Fleisher, G.A., Potter, C.S., and Wakim, K.G. (1960) Separation of 2-glutamic oxaloacetic transaminase by paper electrophoresis. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **103**:229-231.

Gutfreund, M., Ebner, K.E., and Mendiola, L. (1961) Transamination and the control of mitochondrial pathways. *Nature*, **192**:820-822.

Haper, H.A. (1975) Review of physiological chemistry, 15th ed., Lange Medical Publication, Los Altos, p. 349.

Hopper, S., and Segal, H.L. (1964) Comparative properties of glutamine-alanine transaminase from several sources. *Arch. Biochem. Biophys.*, **105**:501-505.

Ishimoto, G., and Kuwata, M. (1974) Red cell glutamic-pyruvic transaminase in Japanese population. *Jap. Hum. Genet.*, **18**:373-381.

Janssens, P.A., and Bryant, C. (1969) The ornithine-urea cycle in some parasitic helminths. *Comp.*

- Biochem. Physiol.*, **30**:261-272.
- Kanfer, E., and Pollak, J.K. (1961) Amino acid metabolism of growing tissue. II. Alanine glutamic acid transaminase activity of embryonic rat liver. *Exptl. Cell Res.*, **22**:120-126.
- Kopelovich, L., Sweetman, L., and Nisselbaum, J.S. (1970) Time-dependent inhibition of aspartate aminotransferase isozymes by DL-glyceraldehyde 3-phosphate. *J. Biol. Chem.*, **245**:2011-2017.
- Kopelovich, L., and Nisselbaum, J.S. (1972) Regulation of aspartate aminotransferase isozymes by D-erythrose 4-phosphate and glyceraldehyde phosphate, the naturally occurring homologues of D-glyceraldehyde 3-phosphate. *J. Biol. Chem.*, **247**:3262-3268.
- Lee, R.M., and Vasey, H.M. (1970) *Int. J. Biochem.*, **1**:274-280. Cited from von Brand, T. (1973) *Biochemistry of Parasites*, 2nd ed., p.137, Academic Press.
- Lowry, O.H., Rosenbrough, J., Farr, A.L., and Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**:265-277.
- Mansour, T.E. (1962) Effect of serotonin on glycolysis in homogenates from the liver fluke *Fasciola hepatica*. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **135**:94-101.
- Mansour, T.E. (1959) The effect of serotonin and related compounds on the carbohydrate metabolism of the liver fluke, *Fasciola hepatica*. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **126**:212-216.
- Morino, Y., Itoh, H., and Wada, H. (1963) Crystallization of 2-oxoglutarate L-aspartate transaminase from mitochondrial and soluble of beef liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **13**:348-352.
- Moss, G.D. (1970) The excretory metabolism of the endoparasitic digenean *Fasciola hepatica* and its respiratory metabolism. *Parasitology*, **60**:1-19.
- Nisselbaum, J.S., and Kopelovich, L. (1975) The synthesis and regulation of aspartate aminotransferase isozymes. Isozymes III. Developmental biology (Markert, C.L., ed.). Academic Press, 159-167.
- Ogawa, K., and Ichihara, A. (1972) Isozyme patterns of branched chain amino acid transaminase in various hepatoma. *Cancer Res.*, **32**:1257-1263.
- Ogawa, K., Yokojima, A., and Ichihara, A. (1970) Transaminase of branched chain amino acids. VII. Comparative studies on isozymes of ascites hepatoma and various normal tissues of rat. *J. Biochem.*, **68**:901-911.
- Prichard, R.K., and Schofield, P.J. (1968) A comparative study of the tricarboxylic acid cycle enzymes in *Fasciola hepatica* and rat liver. *Comp. Biochem. Physiol.*, **25**:1005-1019.
- Reed, R.E., and Hess, J.L. (1975) Partial purification and characterization of aspartate aminotransferase from seedling oat leaves. *J. Biol. Chem.*, **250**:4456-4462.
- Rehfeld, D.W., and Tolbert, N.E. (1972) Aminotransferase in peroxisomes from spinach leaves. *J. Biol. Chem.*, **247**:4803-4811.
- Reitman, S., and Frankel, S. (1975) *Methods of Enzymatic Analysis* (Bergmeyer, H.U., ed.), Vol. 2, Academic Press, New York, 760-763.
- Rosen, F., Roberts, N.R., and Nichol, C.A. (1959) Glucocorticosteroids and transaminase activity. I. Increased activity of glutamic-pyruvic transaminase in four conditions associated with gluconeogenesis. *J. Biol. Chem.*, **234**:476-480.
- Saier, M.H., Jr., and Jenkins, W.T. (1967) Alanine aminotransferase. I. Purification and properties. *J. Biol. Chem.*, **242**:91-100.
- Schimke, R.T. (1962). Adaptive characteristics of urea cycle enzymes in the rat. *J. Biol. Chem.*, **237**:459-468.
- Shrago, E., and Lardy, H.A. (1966) Paths of carbon in gluconeogenesis and lipogenesis. II. Conversion of precursors to phosphoenolpyruvate in liver cytosol. *J. Biol. Chem.*, **241**:663-668.
- Strum, G., Hirschauer, C., and Zilliken, F. (1972) Vergleichende Bestimmung von Enzymaktivitäten in *Dicrocoelium dendriticum*, Wirtsleber (Rind) and *Fasciola hepatica*. *Z. Parasitenkd.*, **38**:45-47.
- Swick, R.W., Barnstein, P.L., and Stange, J.L. (1965a) The metabolism of mitochondrial proteins. I. Distribution and characterization of the isozymes of alanine aminotransferase in rat liver. *J. Biol. Chem.*, **240**:3334-3340.
- Swick, R.W., Barnstein, P.L., and Stange, J.L. (1965b) The metabolism of mitochondrial proteins. II. The response of the isozymes of alanine aminotransferase to diet and hormones. *J. Biol. Chem.*, **240**:3341-3345.
- Taylor, R.T., and Jenkins, W.T. (1966) Leucine aminotransferase. II. Purification and characterization. *J. Biol. Chem.*, **241**:4396-4409.
- Zuchlewski, A.C., and Gaebler, O.H. (1957) Changes in the activity of transaminases and L-glutamate dehydrogenase induced by growth hormone. *Arch. Biochem. Biophys.*, **66**:463-473.

=Abstract=

Aspartate and Alanine Aminotransferase in *Fasciola hepatica*

Sun Hyo Park, Nyon Soo Kwon and Hi Sung Lee

Department of Biochemistry, College of Medicine, Chung-Ang University

Chul Yong Song

Department of Biology, College of Liberal Arts and Sciences, Chung-Ang University

The activity and distribution of aspartate aminotransferase (EC 2.6.1.1) and alanine aminotransferase (EC 2.6.1.2) in adult *Fasciola hepatica* have been studied. *Fasciola hepatica* was fractionated by differential centrifugation into nuclear, mitochondrial and cytosolic fractions. The activity of GOT and GPT was measured by the method of Reitman and Frankel. Isozyme patterns of those enzyme were also examined by DEAE-cellulose column chromatography. The results obtained were as follows;

1. The activity of aspartate and alanine aminotransferase was about 0.55 unit and 0.92 unit per 1g of *Fasciola hepatica*, respectively.
2. The activity of those enzymes was relatively low compared with those in mammalian tissues.
3. The distribution of aspartate aminotransferase in the subcellular organelles showed that 71% of the activity was in cytosolic, 24% in mitochondrial and 5% was in nuclear fraction.
4. About 22% of the total alanine aminotransferase activity was found in the mitochondrial fraction, about 66% in the cytosolic fraction.
5. Aspartate aminotransferase from cytosolic fraction was separated into two types of isozymes, whereas alanine aminotransferase from cytosolic fraction gave only one active peak on DEAE-cellulose column chromatography.