

간질(*Fasciola hepatica*)의 Branched Chain 아미노산 Aminotransferase의 정제 및 성상

중앙대학교 의과대학 생화학교실
이중호 · 이동욱 · 이희성

중앙대학교 분리과학 생물학과
송 철 용

서 론

Ichihara and Koyama(1966) 및 Taylor and Jenkins (1966a) 등은 체지 삼장조직의 세포질에서 leucine aminotransferase (EC 2.6.1.6)를 처음으로 분리하였으며 이 효소는 기질인 leucine, valine 및 isoleucine과 α -ketoglutarate 사이에서 아미노기 전달반응을 촉매함을 밝혔다. 그 후 이 효소를 branched chain 아미노산 aminotransferase(EC 2.6.1.42)(=BCAT라 약함)라고 하였으며, BCAT는 세포질과 mitochondria분획에 존재하며 이들은 isozyme임이 밝혀졌다(Aki *et al.*, 1967).

Branched chain 아미노산인 leucine, valine 및 isoleucine은 간장 이외의 조직에서 분해되며, 이들 아미노산은 ketone body의 생성(leucine) 및 glucose와 에너지 생성(isoleucine 및 valine)을 위한 carbon source로 알려져 있다(Buse *et al.*, 1972; Odessey *et al.*, 1974; Ichihara 1975b; Harper, 1975; Goldberg and Chang, 1978). Branched chain 아미노산 대사의 첫단계에서는 아미노기 acceptor인 α -ketoglutarate의 존재하에 BCAT의 촉매작용으로 각 아미노산에 해당되는 α -keto산이 형성된 후 mitochondria에서 branched chain α -keto산 dehydrogenase complex에 의하여 산화적 탈탄산반응이 일어나 분해된다(Wohlhueter and Harper, 1970).

BCAT의 활성도는 동물의 종(species) 및 장기에 따라 확연하게 다르나 세포질과 mitochondria에 거의 동량이 분포되어 있다(Ichihara, 1975a). 또 절식하는 동물에 branched chain 아미노산인 leucine, isoleucine 및 valine 등의 혈중농도가 증가되며, 이때 간장조직에서도 BCAT의 활성도가 증가된다는 것이 밝혀졌다(Sherwin, 1978).

Aki *et al.*(1969)은 돼지 뇌조직에서 분리한 BCAT를 DEAE-cellulose column chromatography를 하여 인산염 완충액의 농도가 20mM과 200mM에서 각각 용출되는 Enzyme I 및 III을 분리하였다. 또 Aki *et al.*(1968)은 흰쥐의 간장조직에서 분리한 BCAT를 DEAE-

cellulose column chromatography를 하여 Enzyme I과 III 사이에서 인산염 완충액의 농도가 180mM에서 용출되는 Enzyme II를 분리하였고 이 효소는 leucine에만 반응함을 밝혔다. 그리고 Enzyme I, II 및 III을 isozyme이라고 하였으며, Enzyme I과 III은 성질이 유사하고 Enzyme II는 빨리 성장하는 간조직 또는 간조직의 종양을 부분 제거하였을 때 활성도가 증가된다고 하였다. 또 성숙한 간조직에서는 Enzyme I과 II가 존재하나 비숙한 간장조직에서는 단지 Enzyme I만이 존재한다고 Ichihara and Takahashi(1968)가 보고하였다. 또한 Ogawa *et al.*(1970) 및 Ogawa and Ichihara (1972) 등은 흰쥐의 여러 조직에서 BCAT의 isozyme의 pattern을 비교 관찰한 결과 Enzyme I은 모든 조직에서 Enzyme II는 간조직에서, Enzyme III은 뇌조직에서만 분리됨을 밝혔다.

이상의 같이 BCAT에 대하여는 여러 동물의 조직에서 많이 연구되었지만 기생충에 대하여는 전혀 찾아볼 수가 없었다. 다만 간질(*Fasciola hepatica*)의 homogenate에서 transaminase 활성도 관찰(Daugherty, 1952) 및 회충(*Ascaris lumbricoides*)에서 alanine-glutamate transaminase (Pollak, 1957) 등 약간의 보편을 찾아볼 수 있었다. 따라서 저자는 포유동물의 간에 기생하는 간질(*Fasciola hepatica*)의 branched chain 아미노산 대사의 양상을 밝히고자 우선 BCAT의 분포, 그 isozyme의 pattern 및 isozyme의 몇가지 이화학적 성질을 관찰하고자 본 실험을 행하였다.

실험 재료

1. 시 약

DEAE-cellulose, pyridoxal phosphate, leucine, isoleucine, valine 및 2-mercaptoethanol 등은 Sigma Chemical Co. St. Louis Missouri, U.S.A.제품 구입 사용하였으며, EDTA, TCA, potassium phosphate monobasic, potassium phosphate dibasic, sodium pyrophosphate, toluene, α -ketoglutarate, phenylhydrazine HCl, 2,4-dinitrophenylhydrazine, ammonium

sulfate 및 sodium hydroxide 등은 E. Merck제를 사용하였다. 다른 일반 시약들은 일급 또는 등급을 사용하였다.

2. 실험재료

본 실험에서 시료로 사용한 간질(*Fasciola hepatica*)은 서울특별시 구로구 독산동 침전도상장에서 소의 신선한 간으로 부니 캐쉬하이 -10°C에 보관하며 시료로 사용하였다.

실 험 방 법

1. 효소의 활성도 측정

Branched chain 아미노산 aminotransferase의 원형 또는 Ichihara and Koyama(1966)의 방법에 따라 다음과 같이 측정하였다. 즉 50 μ mole의 sodium pyrophosphate 완충액(pH 8.6), 10 μ mole의 L leucine, 0.1 μ mole의 pyridoxal phosphate 및 효소액 일정량을 screw-cap culture tube(15 \times 125mm)에 넣고 37°C에서 5분간 보온하였다. 보온이 끝난 시험관에 10 μ mole의 α -ketoglutarate를 가하여 최종 용량을 1.5ml로 한 후 37°C에서 10분간 보온하여 반응을 하였다. 반응이 끝난 시험관에 10% TCA (trichloroacetic acid)용액 1.5ml를 가하여 TCA의 농도가 5%되게 하여 반응을 정지시킨 후 원심분리하여 침전물을 제거하였다. 상층액 3ml를 취하여 25°C에서 5분간 보온한 후 2N HCl-0.5% 2,4-dinitrophenylhydrazine용액 2ml를 가하고 잘 혼합한 후 25°C에서 5분간 보온하였다. 이 시험관에 5ml의 toluene을 가하고 강하게 2분간 진탕한 후 원심분리하고 불용성 capillary pipet으로 제거하였다. 이 toluene층에 0.5N HCl 5ml를 가하고 1분간 강하게 진탕한 후 1분간 원심분리하여 toluene층에 있는 α ketoglutarate의 hydrazone을 제거하였다. Toluene층 2ml를 취하여 다른 시험관에 넣고 10% sodium carbonate용액 2ml를 가하여 강하게 진탕한 후 carbonate층 1.5ml를 취하였다. 이 carbonate 용액에 1.5N NaOH 1.5ml를 가하여 발색시켰으며 5분 후에 파장 440nm에서의 흡광도를 측정하여 효소의 활성도를 구하였다. L-isoleucine 및 L-valine에 대하여도 상기와 같은 방법에 의하여 측정하였으며 blank test는 거칠어진 α -ketoglutarate를 가하지 않은 조건하에서 상기와 같이 행하였다. 효소의 활성도는 37°C에서 10분당 1 μ mole의 α -ketocaproate를 형성하는 효소의 양을 1 unit로 표시하였으며 비활성도(specific activity)는 단백질 mg당 효소의 단위로 표시하였다.

2. 효소의 추출

신선한 간질(肝)을 취하여 미리 냉각시킨 0.9% NaCl 용액으로 세척하여 혈구와 장내용물을 제거하였으며 모든 조작은 0~4°C에서 하였다. 위와 같이 처리한 시료 30g을 취하여 Taylor and Jenkins(1966b, c)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-pestle homogenizer로 2분간 homogenize한 후 3겹의 gauze로 여과하고 여액을 700 \times g에서 10분간 원심분리 및 0.9% NaCl 용액으로 세척하여 액을 분리하였다. 상층액을 수집하여 10,000 \times g에서 30분간 원심분리 및 0.9% NaCl 용액으로 세척하여 mitochondria를 분리하였으며 그 상층액을 조효소로 사용하였다.

3. 효소의 정제

(1) Ammonium sulfate에 의한 단백질의 침전

상기의 같이 하여 추출한 조효소액을 Dixon(1953)의 방법에 의하여 단백질을 분리하였다. 즉 조효소액 100ml당 17.7g의 ammonium sulfate를 서서히 지어주며 소량씩 60분간 걸쳐 가하여 30%로 포화시켰다. Ammonium sulfate를 가한 후에도 0~4°C에서 2시간 서서히 작어주고 이때 생긴 단백질 침전은 12,000 \times g에서 30분간 원심분리하여 제거하였다. 상층액을 수집하고 상층액 100ml당 37.2g의 ammonium sulfate를 일에서와 같은 방법으로 가하여 80%로 포화시킨 후 12,000 \times g에서 30분간 원심분리하여 상층액을 제거하고 침전물을 취하였다(Ogawa et al., 1970). 상기와 같이 하여 얻은 ammonium sulfate 30% 및 80% 침전물은 각각 0.1M EDTA 및 1M 2-mercaptoethanol을 함유한 5mM 인산염 완충액(pH 7.8) 소량에 용해시킨 후 상기의 같은 완충액 2,000ml에 대하여 2시간 두기하고 불용성 물질은 원심분리하여 제거하였다.

(2) DEAE-cellulose column chromatography

DEAE-cellulose를 증류수에 3시간 헹구고 불용물을 제거한 후 0.1M EDTA 및 1M 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 40cm)에 충전시키고 다시 상기의 인산염 완충액으로 평형상태가 될 때까지 세척하였다. 이 column에 ammonium sulfate로 30~80%로 포화시켜 얻은 부피한 단백질용액을 흡착시킨 후 같은 인산염 완충액(pH 7.8) 약 50ml로 세척하였다.

이 column은 0.1M EDTA 및 1M 2-mercaptoethanol을 함유한 5mM 인산염 완충액(pH 7.8) 300ml를 mixing chamber에 넣고 0.1M EDTA 및 1M 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, mitochondria분획, 세포질분획

및 정제 과정에서 단백질은 Lowry *et al.* (1951)의 방법으로 정량하였다. 이때 표준단백질로는 bovine serum albumin을 사용하였다.

5. 정제된 효소의 이화학적 성상

(1) 기질특이성

부분정제된 효소의 기질특이성은 기질로서 L-leucine, L-isoleucine 및 L-valine 등을 사용하였으며 효소의 활성도 측정시의 같은 반응조건하에서 반응속도를 측정하였다.

(2) 반응속도의 영향

부분정제된 효소의 활성에 미치는 온도의 영향은 효소활성도의 측정때와 같은 조건하에서 반응속도를 25°C부터 70°C까지 변화시키면서 반응속도를 측정하였다.

(3) pH의 영향

효소의 활성에 미치는 pH의 영향은 효소의 활성도 측정때와 같은 조건하에서 pH를 6.0부터 9.5까지 변화시키면서 반응속도를 측정하였다.

(4) Km값의 결정

정제된 효소에 대한 기질농도의 영향은 37°C, pH 8.6에서 효소, 보조효소 및 α-ketoglutarate의 농도를 효소의 활성도 측정때와 같은 조건하에서 기질인 L-leucine, L-isoleucine 및 L-valine 등의 농도를 2.0 × 10⁻³M부터 2.0 × 10⁻²M까지 변화시키면서 초기 반응속도를 각각 측정하였다. 또 이와 같은 조건하에서 α-ketoglutarate의 농도를 1.67 × 10⁻⁴M부터 6.67 × 10⁻³M까지 변화시키면서 각각의 초기반응속도를 측정하였다. 보조효소인 pyridoxal phosphate의 농도의 변화에 따른 영향은 상기한 바와 같은 조건하에서 pyridoxal phosphate의 농도를 3.33 × 10⁻⁶M부터 13.33 × 10⁻⁶M까지 변화시키면서 각각의 초기 반응속도를 측정하였다.

결 과

간질에서의 branched chain 아미노산 aminotransferase (BCAT)의 분포와 이 효소의 isozyme의 몇 가지 이화학적 성상에 관한 실험 결과는 다음과 같다.

1. Branched chain 아미노산 aminotransferase의 분포

간질을 homogenize한 후 분별 원심분리하여 핵, mitochondria 및 세포질을 분리하고 기질로 L-leucine을 사용하여 각 분획의 효소활성도를 측정할 결과는 표 1과 같다. 간질의 homogenate에서 이 효소의 총 활성도는 12.69unit/g이며 단백질 함량은 95.55mg으로 비활성도는 0.13이었다. 이 homogenate를 원심분리하여 얻은 핵분획에는 총 효소활성도의 1.34%인 0.17 unit/g이 함유되어 있으며 비활성도는 0.02이었고, mitochondria 분획에는 총 활성도의 10.87%인 1.38 unit/g이 함유되어 있으며 비활성도는 0.07이었다. 세포질분획에는 총 활성도의 87.79%인 11.14unit/g이 함

유되어 있으며 비활성도는 0.18로 핵 및 mitochondria에 비하여 각각 약 9배 및 2.6배이었다. 즉 간질의 세포질분획에는 BCAT가 가장 많이 함유되어 있으며 비활성도도 가장 높음을 알 수 있었다.

2. 효소의 정제 및 isozyme의 분리

BCAT의 효소활성도가 가장 높은 세포질분획에서의 BCAT의 isozyme에 관한 실험 결과는 표 2 및 그림 1과 같다. 이 결과는 정제과정중에 기질로 L-leucine을 사용하여 효소의 활성도 및 isozyme의 활성도를 표시할 것으로, 표 2에서 보는 바와 같이 간질 30g의 homogenate의 BCAT활성도는 380.70unit이며 단백질함량은 2,867mg으로 비활성도는 0.13이었다.

Table 1. Distribution of branched chain amino acid aminotransferase in *Fasciola hepatica*

Fraction	Activity (units/g)	Protein (mg)	Specific activity	Ratio (%)
Homogenate	12.69	95.55	0.13	100
Cytosol	11.14	62.40	0.18	87.8
Mitochondria	1.38	19.67	0.07	10.9
Nuclei	0.17	8.74	0.02	1.3

Reaction mixture consisted of 50μmoles of sodium pyrophosphate buffer (pH 8.6), 10μmoles of L-leucine, 10μmoles of α-ketoglutarate, 0.1μmole of pyridoxal phosphate and enzyme in a total volume of 1.5ml. The activity was expressed as μmole of keto acid formed per 10 minutes.

이 homogenate를 10,000 × g에서 30분간 원심분리하여 얻은 세포질분획의 효소활성은 homogenate의 약 88%인 334.20unit였으며 단백질 함량은 1,872mg으로 비활성도는 0.18이었다. 세포질분획을 ammonium sulfate로 0~30% 포화시켜 분리한 단백질의 효소활성은 전체 효소활성도의 약 5%인 16.7unit이었다. 단백질을 분리한 상층액을 ammonium sulfate로 30~80% 포화시켜 분리한 단백질의 효소활성은 전체 효소활성의 약 71%인 269.08unit이었고 단백질함량은 748.8mg으로 비활성도는 0.36이었다. 그림 1은 어싱과 같이 하여 얻은 부분정제된 BCAT 효소단백질을 DEAE-cellulose column chromatography한 결과를 나타낼 것이다. 즉 그림 1에서 보는 바와 같이 용출 완충액의 농도의 증가에 따라 BCAT의 Enzyme I은 인산염 농도가 50~120mM에서 용출되었고 염의 농도가 180mM과 200mM에서 용출되는 Enzyme II 및 III은 검출되지 않았다. Enzyme I의 활성도는 약 194unit이며 단백질함량은 67.41mg으로 비활성도는 2.88이었으며 homogenate에 대하여 약 22배 정제되었다. 저자는 이 Enzyme I을 확인하기 위하여 기질로서 valine과 isoleucine을 각각 사용하여 활성도를 측정할 결과 이들 기질에 대하여 전부 활성을 나타낼을 확인하였으며,

Table 2. Purification of branched chain amino acid aminotransferase from *Fasciola hepatica*

Purification steps	Activity(units)	Protein(mg)	Specific activity	Fold	Recovery(%)
Homogenate	380.70	2,866.50	0.13	1.00	100
Cytosol	334.20	1,872.00	0.18	1.38	87.8
30~80% amm. sulfate sat. ppt	269.08	748.80	0.36	2.77	70.7
DEAE-cellulose column chromatog.	194.38	67.41	2.88	22.18	51.1

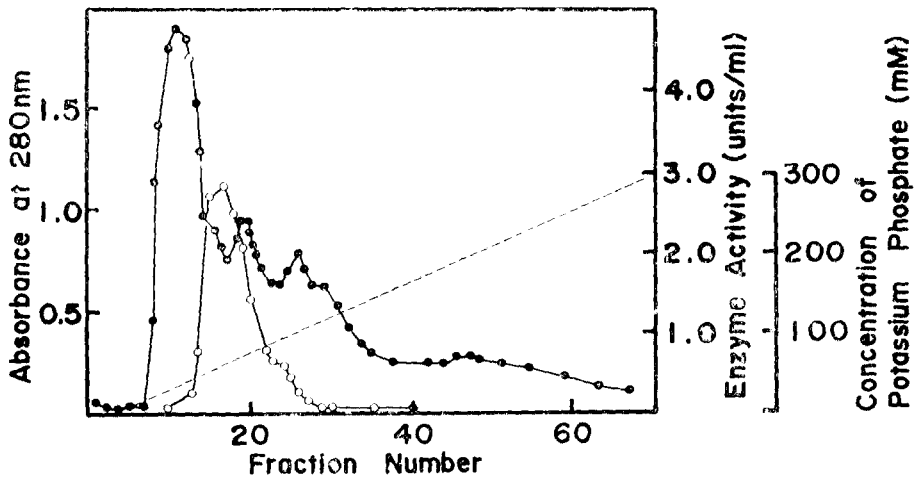


Fig. 1. Chromatography of BCAT on DEAE-cellulose. (●-●, protein; ○-○, enzyme activity; ----, concentration of buffer)

따라서 이 효소분획이 Enzyme I임을 알 수 있었다. 표 3에서 보는 바와 같이 기질로 leucine을 사용하였을 때 Enzyme I의 활성도는 194.38unit이었다. 따라서 감질에서는 BCAT isozyme인 Enzyme I만이 존재함을 알 수 있었다.

Table 3. Isozyme patterns of branched chain amino acid aminotransferase from *Fasciola hepatica*

Isozyme	Activity (units)	Protein (mg)	Specific activity (units/mg protein)
Enzyme I	194.38	67.41	2.88
Enzyme II	n.d.*	n.d.	n.d.
Enzyme III	n.d.	n.d.	n.d.

* n.d. : Not detected

3. 이화학적 성상

(1) 기질특이성

BCAT의 기질특이성에 관한 실험 결과는 표 4와 같다. 즉 기질로 leucine, isoleucine 및 valine을 사용하였을 때 효소액 1ml당 1.70unit, 2.19unit 및 1.47unit이었다. L-isoleucine에 대한 활성도를 100%로 하였을

때 L-leucine과 L-valine에 대한 효소활성은 각각 77.47% 및 66.87%로 L-valine을 기질로 사용하였을 때 효소활성이 가장 낮음을 알 수 있었다.

Table 4. Substrate specificities of branched chain amino acid aminotransferase from *Fasciola hepatica*

Substrate	Activity(units)	Relative activity (%)
L-Leucine	1.70	77.47
L-Isoleucine	2.19	100.00
L-Valine	1.47	66.87

(2) 반응온도의 영향

Enzyme I의 활성에 미치는 온도의 영향을 관찰한 결과는 그림 2와 같다. 이에서 보는 바와 같이 L-leucine을 기질로 사용하여 25°C로부터 70°C까지 반응온도를 변화시키면서 반응속도를 측정할 결과 25°C에서 효소활성도는 0.64unit/ml이었으나 온도가 높아짐에 따라 활성도는 급격히 증가하여 45°C에서 1.63 unit/ml로 효소의 활성이 가장 높았다. 그 이상의 온도에서는 급격한 감소를 보였으며 70°C에서는 0.39unit/

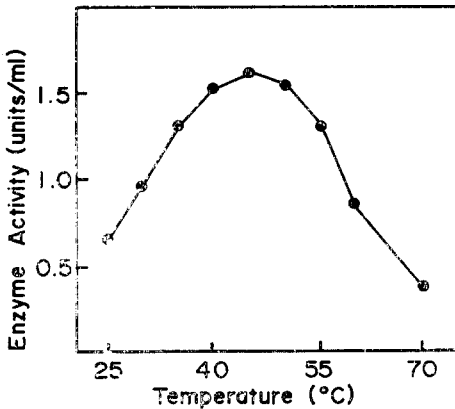


Fig. 2. Effect of temperature on activity of branched chain amino acid aminotransferase.

ml이었다. 이상과 같은 결과로 보아 간질의 BCAT의 isozyme인 Enzyme I의 최적온도는 45°C임을 알 수 있었다.

(3) pH변화가 효소활성에 미치는 영향

pH가 효소활성에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 인산염 완충액의 pH를 6.0부터 9.5까지 변화시키면서 효소의 활성도변화를 측정할 결과는 그림 3과 같다. pH 6.0에서 활성도는 0.35unit/ml이었으며 pH의 증가에 따라 활성도는 선서히 증가하여 pH 8.2에서 1.62unit/ml로 가장 높았다. 그 이상의 pH에서는 효소의 활성도가 감소하여 pH 9.5에서 0.30unit/ml이었다. 이상과 같은 결과로 보아 Enzyme I의 최적 pH는 8.2임을 알 수 있었다.

(4) Km값의 측정

효소의 농도 및 보조효소의 농도를 일정하게 하고 반응온도 37°C, pH 8.6에서 기질인 L-leucine의 농도를 변화시키면서 반응속도를 측정할 결과는 그림 4와 표 5와 같다. 또 같은 조건하에서 L-leucine을 기질

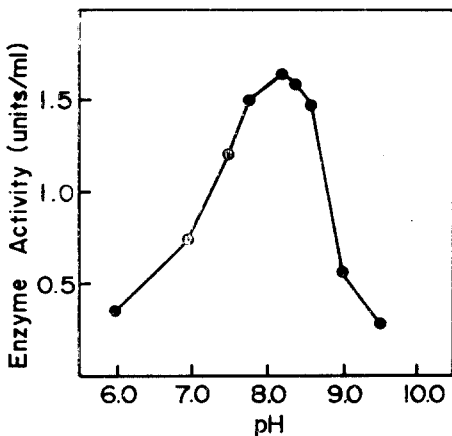


Fig. 3. Effect of pH on activity of branched chain amino acid aminotransferase.

Table 5. Km values of leucine for Enzyme I of *Fasciola hepatica*

Substrate	Km value (mM)
L-Leucine	4.17

Table 6. Km values of α -ketoglutarate and pyridoxal phosphate for Enzyme I of *Fasciola hepatica*

Substrate	Km value (mM)
α -Ketoglutarate	0.41
Pyridoxal phosphate	4.76×10^{-3}

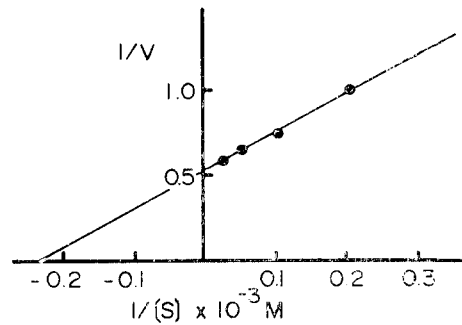


Fig. 4. Effect of substrate (leucine) concentration on activity of branched chain amino acid aminotransferase.

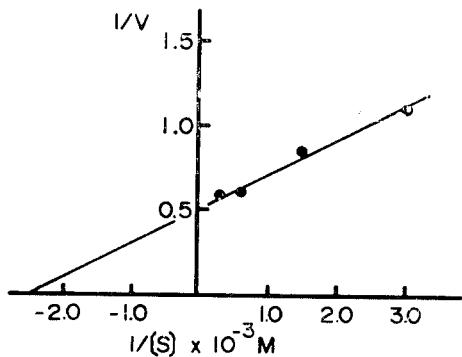


Fig. 5. Effect of α -ketoglutarate concentration on activity of branched chain amino acid aminotransferase.

로 사용하고 α -ketoglutarate와 pyridoxal phosphate의 농도를 변화시켰을 때의 반응속도는 그림 5, 6 및 표 6과 같다. 표 5에서 보는 바와 같이 기질인 L-leucine에 대한 Km 값은 4.17mM이었다. α -ketoglutarate 및 pyridoxal phosphate의 농도를 각각 0.167~6.667mM과 3.33 μ M~133.3 μ M에서 반응속도를 측정하였을 때

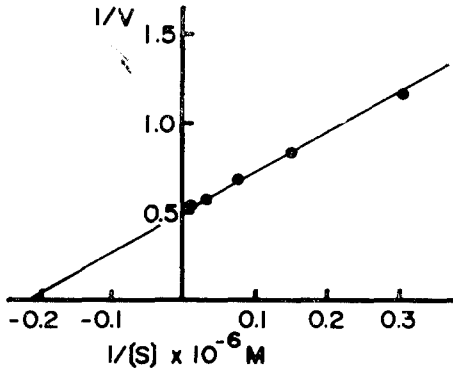


Fig. 6. Effect of pyridoxal phosphate concentration on activity of branched chain amino acid aminotransferase.

표 6에서 보는 바와 같이 Enzyme I에 대한 α -keto-glutarate의 K_m 값은 0.41mM이었으며 pyridoxal phosphate의 K_m 값은 4.76 μ M이었다.

고 찰

Branched chain 아미노산 대사의 생리적 의의는 매우 흥미있는 것으로 branched chain 아미노산들은 α -ketoglutarate와 아미노기 전달반응에 의하여 각각의 고유한 α -keto산을 형성한다. 즉 leucine은 α -ketoisocaproate로 전환된 후 ketone체를 형성하는 ketogenic 아미노산이며, valine과 isoleucine은 각각 α -ketoisovalerate 및 α -keto- β -methylvalerate로 전환된 후 acetate와 propionyl CoA를 형성함으로써 glucogenic 및 ketogenic 아미노산이다. 이상과 같이 이들 아미노산 대사의 첫단계에 관여하는 aminotransferase의 활성도는 동물의 종과 장기에 따라 다르며, 또 고등동물의 경우 세포질과 mitochondria에는 거의 동량의 BCAT가 분포되어 있다(Ichihara, 1975a, 1975b; Schinnick and Harper, 1976). 또 Ichihara *et al.* (1975a)은 윗 췌장에서 이 효소의 활성은 신장 및 심장조직에서 보다 활성이 더 높음을 보고하였다. 저자의 실험결과에 의하면 간질에서 BCAT의 총 활성도는 고등동물의 위 및 췌장보다는 낮으나 다른 조직에 비하여 높았다. 또 세포질과 mitochondria에 87.8% 및 10.9%가 각각 함유되어 있어 고등 동물의 여러 조직의 BCAT 분포와 큰 차이가 있었다. Daugherty(1952)는 *Fasciola hepatica*의 homogenate에서 여러 아미노산에 대한 transaminase의 활성도를 측정할 결과 aspartic acid, isoleucine, leucine 및 valine의 순으로 활성도가 낮다고 하였다. 이상과 같은 결과는 표 1에서 보는 바와 같이 효소의 활성도가 isoleucine, leucine 및 valine의 순으로 나타난 것과 같은 결과이었다. BCAT의 활성도가 근육조직에서는 높고 간장조직에서는 낮으며(Schinnick and Harper, 1976; Hutson *et al.*, 1978), branched

chain α -keto산 dehydrogenase의 활성도는 반대로 간장에서는 높고 근육조직에서는 낮다고 한다(Wohlhueter and Harper, 1970). 이상과 같은 결과는 근육조직에서의 branched chain 아미노산 대사에서 일차적인 역할을 하는 것은 aminotransferase이고, 간장에서는 branched chain 아미노산에 해당하는 α -keto산 dehydrogenase가 일차적인 역할을 하기 때문이라고 밝혔다(Wohlhueter and Harper, 1970; Patel *et al.*, 1981). 이상과 같은 점으로 비추어 볼 때 간질의 BCAT의 활성도가 높다는 것은 근육조직의 경우처럼 branched chain 아미노산 대사에서 aminotransferase가 일차적인 역할을 하기 때문인 것으로 추측된다.

지방조직조직에서는 leucine 자신이 branched chain α -keto산 dehydrogenase의 활성도를 증가시키며 이러한 촉매작용은 leucine의 탄소골격이 지방산으로 전환되는 과정을 조절하는 것으로 밝혀졌다(Frick *et al.*, 1981). 근육조직에서 leucine의 산화는 에너지의 생성 및 glucose의 산화를 저하시키는 반면 valine과 isoleucine의 산화는 Krebs cycle의 중간생물의 공급과 glutamine 합성에 필요한 탄소골격을 공급한다(Chang and Goldberg, 1978a, b, c). 간질에서는 glucose의 대사과정중 생성되는 α -keto산이 아미노산 및 단백질로 전환됨이 밝혀졌으며(Pérez-Giménez *et al.*, 1976; Thorsell *et al.*, 1968), 또 간질은 속주의 혈액에서 glucose를 주로 이용하나 glucose의 양적 저하시에는 아미노산을 이용한다고 한다(Moss, 1970). 간질의 BCAT의 기질에 대한 특이성을 검토한 결과 isoleucine에 대한 활성도를 100%로 하였을 때 leucine에 대하여는 약 77%이었으며 valine에 대하여는 약 67%이었다. 이와 같은 결과는 간질에서 branched chain 아미노산 중 isoleucine 대사가 가장 활발히 일어나는 것으로 생각되며 또한 앞에서 언급한 바와 같이 leucine에 의한 지방산 합성보다는 isoleucine 및 valine에 의한 에너지생성 및 glucose 생성이 이루어지는 것이라고 결론지을 수 있는 것이다.

DEAE-cellulose column chromatography에 의하여 분리되는 광범위하게 서로 다른 3종의 BCAT 가운데 인산염의 낮은 농도에서 용출되는 Enzyme I은 동물의 모든 조직에 있고 뇌조직과 간암세포에는 Enzyme III만이 있으며 Enzyme II는 설치류의 간조직에만 존재하며 사람을 포함한 다른 동물의 장기에는 존재하지 않는다(Aki *et al.*, 1968; Ogawa and Ichihara, 1972; Ichihara *et al.*, 1975b; Goto *et al.*, 1977). 이결과 같이 동물의 종과 장기에 따라 BCAT의 활성도 및 isozyme의 pattern에 차이가 있음이 증명되었지만 그 의의는 아직까지 밝혀지지 않고 있다. 저자는 간질에서 고등동물의 모든 조직에서 분리되는 Enzyme I만을 분리 확인하였으며 뇌조직에서 분리되는 Enzyme III을 검출하지 못하였다. 저자는 간질에서 분리한 Enzyme I의 이외의 효소를 다른 고등동물에서 분리한 것과 비교 검토하여 볼 때 큰 차이가 없음을 알 수 있었다(Aki

et al., 1968, 1969; Ogawa *et al.*, 1970; Ichihara and Koyama, 1966).

간질에 BCAT가 존재한다는 것은 거기서 이들 아미노산의 대사가 활발히 진행된다는 것을 의미하며 특히 간질에서 분리한 BCAT의 isozyme인 Enzyme I의 활성이 isoleucine에 대하여 가장 높은 점으로 보아 간질에서는 지방산 합성보다는 glucose의 신합성과 에너지 생성이 더 활발히 일어나는 것으로 생각된다.

앞으로 간질에서 BCAT의 isozyme인 Enzyme I의 생리적 의의에 대하여 좀 더 연구하고자 한다.

결 론

간질(*Fasciola hepatica*)의 homogenate에서 세포질, mitochondria 및 핵분획을 분리하여 branched chain 아미노산 aminotransferase(EC 2.6.1.42)의 분포 및 isozyme의 pattern을 조사하였다. 효소의 활성도는 Ichihara and Koyama의 방법으로 측정하였으며 isozyme은 ammonium sulfate에 의한 침전 및 DEAE-cellulose column chromatography에 의하여 분리하였다. 실험 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 간질의 branched chain 아미노산 aminotransferase의 활성도는 12.69unit/g으로 고등 동물의 여러 조직에 비하여 높았다.
2. 간질의 branched chain 아미노산 aminotransferase는 세포질, mitochondria 및 핵분획에 존재하며 세포질에 87.7%, mitochondria에 10.9% 및 핵분획에 1.3%가 분포되어 있었다.
3. 세포질에 있는 이 효소를 부분 정제하여 그 isozyme의 pattern을 DEAE-cellulose column chromatography법으로 조사한 결과 Enzyme I만이 검출되었다.
4. 이 효소의 기질(leucine, isoleucine 및 valine)에 대한 활성도는 L-isoleucine이 가장 높았다.
5. 간질의 branched chain 아미노산 aminotransferase의 isozyme인 Enzyme I의 반응 최적온도는 45°C, 최적 pH는 8.2이었다.
6. Enzyme I의 L-leucine에 대한 Km 값은 4.17mM이었다.
7. Enzyme I의 α -ketoglutarate와 pyridoxal phosphate에 대한 Km 값은 0.41mM 및 4.76 μ M이었다.

인 용 문 헌

- Aki, K., Shirai, A., and Ichihara, A. (1967) Transaminase of branched chain amino acids. III. Purification and properties of the mitochondrial enzyme from hog heart and comparison with the supernatant enzyme. *J. Biochem.*, **62**:610-617.
- Aki, K., Ogawa, K., and Ichihara, A. (1968) Transaminase of branched chain amino acids. IV. Purification and properties of two enzymes from rat liver. *Biochim. Biophys. Acta*, **159**:276-284.
- Aki, K., Yokojima, A., and Ichihara, A. (1969) Transaminase of branched chain amino acids. VI. Purification and properties of the hog brain enzyme. *J. Biochem.*, **65**:539-544.
- Buse, M.G., Biggers, J.F., Friderrici, K.H., and Buse, J.F. (1972) Oxidation of branched chain amino acids by isolated hearts and diaphragms of the rat. The effect of fatty acids, glucose and pyruvate respiration. *J. Biol. Chem.*, **247**:8085-8096.
- Change, T.W., and Goldberg, A.L. (1978a) The origin of alanine produced in skeletal muscle. *J. Biol. Chem.*, **253**:3677-3684.
- Chang, T.W., and Goldberg, A.L. (1978b) The metabolic fates of amino acids and the formation of glutamine in skeletal muscle. *J. Biol. Chem.*, **253**:3685-3695.
- Chang, T.W., and Goldberg, A.L. (1978c) Leucine inhibits oxidation of glucose and pyruvate in skeletal muscle during fasting. *J. Biol. Chem.*, **253**:3696-3701.
- Daugherty, J.W. (1952) Intermediary protein metabolism in helminths. I. Transaminase reactions in *Fasciola hepatica*. *Exp. Parasitol.*, **1**:331-338.
- Dixon, M.A. (1953) A monogram for ammonium sulfate solution. *Biochem. J.*, **54**:457-463.
- Frick, G.P., Tai, L.R., Blinder, L., and Goodman, H.M. (1981) L-leucine activates branched chain α -keto acid dehydrogenase in rat adipose tissue. *J. Biol. Chem.*, **256**:2618-2620.
- Goldberg, A.L., and Chang, T.W. (1978) Regulation and significance of amino acid metabolism in skeletal muscle. *Fed. Proc.*, **37**:2301-2307.
- Goto, M., Shinno, H., and Ichihara, A. (1977) Isozyme patterns of branched chain amino acid transaminase in human tissues and tumors. *Gann*, **68**:663-667.
- Harper, H.A. (1975) Review of physiological chemistry, 15th ed., Lange Medical Publication, Los Altos, p.349.
- Hutson, S.M., Cree, T.G., and Harper, A.E. (1978) Regulation of leucine and α -ketoisocaproate metabolism in skeletal muscle. *J. Biol. Chem.*, **253**:8126-8133.
- Ichihara, A. (1975a) Isozyme patterns of branched chain amino acids transaminase during cellular differentiation and carcinogenesis. *Ann. New York Acad. Sci.*, **223**:347-354.

- Ichihara, A. (1975b) Physiological chemistry of branched chain amino acids. *Seikagaku*, **47**:927-945.
- Ichihara, A., and Koyama, E. (1966) Transaminase of branched chain amino acids. I. Branched chain amino acid α -ketoglutarate transaminase. *J. Biol. Chem.*, **59**:160-169.
- Ichihara, A., and Takahashi, H. (1968) Transaminase of branched chain amino acids. *Biochim. Biophys. Acta*, **167**:271-279.
- Ichihara, A., Noda, C., and Goto, M. (1975a) Transaminase of branched chain amino acids. X. High activity in stomach and pancreas. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **67**:1313-1318.
- Ichihara, A., Yamasaki, Y., Masuji, H., and Sato, J. (1975b) "Isozymes", ed. by Markert, C.L., Academic Press, New York, Vol. III, p.875.
- 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.
- Moss, G.D. (1970) The excretory metabolism of the endoparasitic digenean *Fasciola hepatica* and its relationship to its respiratory metabolism. *Parasitology*, **60**:1-19.
- Odessey, R., Khairallah, E.A., and Goldberg, A.L. (1974) Origin and possible significance of alanine production by skeletal muscle. *J. Biol. Chem.*, **249**:7623-7629.
- 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. Biol. Chem.*, **68**:901-911.
- Patel, T.W., DeBuysere, M.S., Barron, L.L., and Olsen, M.S. (1981) Studies on the regulation of the branched chain α -keto acid dehydrogenase in the perfused rat liver. *J. Biol. Chem.*, **256**:9009-9015.
- Pérez-Giménez, M.E., Giménez, A., and Gaede, K. (1967) *Exp. Parasitol.*, **21**:215-223. Cited from Biochemistry of Parasites, von Brand, T. (1973) 2nd ed., Academic Press, p.89-156.
- Pollak, J.K. (1957) *Aust. J. Biol. Sci.*, **10**:465-474. Cited from Biochemistry of Parasites, ed. von Brand, T. (1973) 2nd ed., Academic Press, p.253.
- Sherwin, R.S. (1978). Effect of starvation on the turnover and metabolic response to leucine. *J. Clin. Invest.*, **61**:1471-1481.
- Shinnick, L., and Harper, A.E. (1976) Branched chain amino acid oxidation by isolated rat tissue preparations. *Biochim. Biophys. Acta*, **437**:477-486.
- Taylor, R.T., and Jenkins, W.T. (1966a) Leucine aminotransferase. I. Colorimetric assays. *J. Biol. Chem.*, **241**:4361-4368.
- Taylor, R.T., and Jenkins, W.T. (1966b) Leucine aminotransferase. II. Purification and characterization. *J. Biol. Chem.*, **241**:4369-4405.
- Taylor, R.T., and Jenkins, W.T. (1966c) Leucine aminotransferase. III. Activation by 2-mercaptoethanol. *J. Biol. Chem.*, **241**:4406-4410.
- Thorsell, W., Appelgren, L.E., and Kippar, M. (1968) *Z. Parasitenkd.*, **31**:113-121. Cited from Biochemistry of Parasites, ed. von Brand, T. (1973) 2nd ed., Academic Press, p.89-156.
- Wohlhueter, R.M., and Harper, A.E. (1970) Coincidence of rat liver branched chain α -keto acid dehydrogenase activities. *J. Biol. Chem.*, **245**:2391-2401.

==Abstract==

**Purification and Properties of Branched Chain Amino Acid
Aminotransferase from *Fasciola hepatica***

Jung Ho Lee, Dong Wook Lee 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 distribution and properties of branched chain amino acid aminotransferase (EC 2.6.1.42) was investigated in adult *Fasciola hepatica*. *Fasciola hepatica* was fractionated by differential centrifugation into nuclear, mitochondrial and cytosolic fractions.

The activity of branched chain amino acid aminotransferase was measured by the method of Ichihara and Koyama (1966). Isozyme patterns of this enzyme was also examined by DEAE-cellulose column chromatography. The results obtained were as follows;

1. The activity in homogenate was found to be 12.69 units/g wet tissue. The activity of this enzyme was relatively high compared with those in rat tissues.
2. The distribution of branched chain amino acid aminotransferase in the subcellular organelles showed that 87.8% of the activity was in cytosolic, 10.9% in mitochondrial and 1.3% was in nuclear fraction.
3. Cytosolic fraction of *Fasciola hepatica* contained Enzyme I, but not Enzyme II and III, of branched chain amino acid aminotransferase. Enzyme I was eluted by 50mM phosphate buffer from DEAE-cellulose column and catalyzed the transamination of all three branched chain amino acids.
4. The Enzyme I was purified about 22-folds increase in specific activity after chromatography on DEAE-cellulose.
5. The best substrate among three amino acids (leucine, isoleucine and valine) was L-isoleucine.
6. The optimal temperature of Enzyme I was 45°C and the optimal pH was 8.2.
7. The Km value for leucine of Enzyme I was 1.17 mM.
8. The Km values for α -ketoglutarate and pyridoxal phosphate of Enzyme I were 0.41mM and 4.76×10^{-3} mM, respectively.