

흰쥐 적혈구에 있는 Glutathione Peroxidase의 순화 및 성질과
간에서의 용작부위에 대한 조직화학적 연구

최 임 순 · 최 춘 근
(연세대학교 이과대학 생물학과)

Purification and Characterization of Glutathione Peroxidase Isolated from Rat Erythrocyte and Histochemical Study of its Localization in Liver of White Rat.

Choe, R.S. and C.K. Choi
(Department of Biology, Yonsei University)
(1986. 3. 31. 접수)

ABSTRACT

A glutathione peroxidase from white rat (Wistar strain) erythrocytes was partially purified and characterized. In addition, localization of this enzyme in the liver was studied by histochemical method.

A glutathione peroxidase was purified approximately 33.5-folds by ammonium sulfate precipitation, Sephadex filtration column and DEAE-Sephadex column chromatography. The optimum temperature of the crude glutathione peroxidase was 40°C, and the optimum pH was 7.5. This crude glutathione peroxidase was most stable at 30°C and the values of Km and Vmax were calculated to be 8.5 mM and 15.6 μ moles/min for glutathione, and 40 μ M and 10.5 μ moles/min for hydrogen peroxide, respectively. The molecular weight of this enzyme was estimated by Sephadex G-200 gel filtration to be approximately 90,000.

By electron microscopic examination, histochemical reaction products were microbodies that were prominent in the peripheral parts of the lobule.

The reaction products exhibited round shapes, the diameter of which varied 0.2~0.7 μ M and their boundary membranes were not distinct.

서 론

동물의 적혈구내에는 ascorbic acid와 hemoglobin이 존재하고 있으며 hemoglobin은 생리적

* 본 연구는 한국과학재단연구비로 이루어졌음.

조건 하에서 oxyhemoglobin의 상태로 ascorbic acid와 서로 반응하여 H_2O_2 를 생산하고 H_2O_2 는 hemoglobin의 tetrapyrrole 고리를 산화시켜 globin과 친을 제거함으로써 hemoglobin을 파괴시키고 있다(Mills, 1957; Mills Randall, 1958; Mills, 1959). 그러나 이러한 H_2O_2 에 의해 나타나는 hemoglobin의 파괴는 glutathione peroxidase라는 효소에 의해 효과적으로 방지되고 있다고 밝혀진 바 있다 (Mills, 1957). Glutathione peroxidase는 reduced glutathione을 기질로 사용하여 이것을 산화시켜 oxidized glutathione을 만들어 줌으로써 특성인 H_2O_2 를 제거해주는 역할을 한다고 보고된 이후(Cohen과 Hochstein, 1961, 1963; Mills와 Randall, 1958; Mills, 1959; Mills, 1960), 이 효소에 대한 연구는 매우 활발히 진행되어 왔다(Hill *et al.*, 1964; Hoekstra *et al.*, 1973; Oh *et al.*, 1974). 동물의 peroxidase는 기질에 대해 큰 특이성을 가지며 특히 glutathione peroxidase는 thiol group을 가지고 있는 glutathione 기질에 뛰어난 특이성(specificity)을 가지고 selenoenzym으로 보고되어 있다(Behne와 Wolters, 1979; Chow와 Tappel, 1974; Flohe *et al.*, 1974). 또한 이 효소는 ascorbic acid에 의해 형성되는 H_2O_2 뿐만 아니라 정상체내에 있는 호기성 탈수소 효소나 hydrogen superoxide dismutase 등 여러 효소의 작용이나 hydrogen donor 분자의 자동산화에 의해서 생성되는 H_2O_2 와 그밖의 organic hydroperoxide들도 환원하는 것으로 알려져 있다(Christoperson, 1968; Little과 Brien, 1968; Brien과 Little, 1969).

이렇듯 과산화물을 환원하는 glutathione peroxidase는 적혈구 이외에도 심장, 허파, 신장 근육 등 여러 조직에 존재한다고 밝혀졌을 뿐만 아니라(Chow와 Tappel, 1972; Mills, 1957), 특히 간에서는 사염화탄소(CCl_4)와 같은 강한 산화물질이나 대사과정 중 생겨나는 lipid peroxide 등의 독성 물질로부터 세포내 물질과 세포막을 보호해 주는 효소인 것으로 보고되고 있다(Chow *et al.*, 1973; Christoperson, 1968, 1969; Folhe와 Zimmermann, 1970; Folhe *et al.*, 1971; Little과 O'Brien, 1968). 즉 생체가 O_3 에 노출되면 불포화 지방산에 peroxidation이 일어나 lipid peroxide가 생기고 이것은 세포막을 분해하여 세포에 손상을 주게 되는데 이러한 유독물질도 glutathione peroxidase가 기질로 이용 환원시키게 된다(Christoperson, 1969; Folhe와 Zimmermann, 1970; Little과 O'Brien, 1968).

이상에서 언급한 바와 같이 여러 조직에 존재하는 glutathione peroxidase는 hydrogen donor로서 glutathione을 이용하게 된다. 이러한 glutathione은 적혈구내에 고농도로 존재하며 간에서도 상당량이 있는 것으로 알려져 있다.(Jacob과 Sande, 1966).

이와 같은 glutathione peroxidase는 여러 조직에서 분리 순화되었고 그것들의 물리·화학적 성질이 규명되었으나 그 정확한 성질에 대해서는 아직까지 미흡한 실정이며 더구나 흰쥐의 간조직내의 glutathione peroxidase의 활성부위에 대한 세포화학적 연구는 그 결과가 미약하고 많은 연구가 없었다. 따라서 본 연구에서는 흰쥐의 적혈구에서 이 효소를 분리 순화시켜 그의 성질을 정확히 규명하고자 하였으며 흰쥐 간조직에서의 이 효소의 작용부위를 조직화학적으로 밝혀 보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

본 실험에서 사용된 동물은 Wistar개 흰쥐로서 2~3 달간 정상적인 사료로 자유급식에 의

해 사육된 쇠중 180 g 내외의 건강한 속컷을 사용하였다.

효소활성 측정시 반응 기질로는 reduced glutathione(Sigma)과 hydrogen peroxide(Hayashi)를 사용하였으며 glutathione의 정량을 위하여 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB, Sigma)를 사용하였다. 효소순화에는 Sephadex G-200(Pharmacia)과 DEAE-sephadex A-50 (Sigma)을 사용하였으며, 분자량측정시 표준단백질은 Sigma제품인 bovine serum albumin을 사용하였다. 간조직에서의 효소화학적 방법이용시 사용된 3,3'-diaminobenzidine tetrachloride 역시 Sigma 제품을 이용하였고, 그 외의 일반적인 시약은 시판중인 시약을 정제하여 사용하였다.

2. 실험방법

(1) Glutathione Peroxidase의 순화

흰쥐를 경추 도살하여 혈액을 채취한 후 응고를 방지하기 위하여 sodium citrate를 5 mg/ml를 가한 후 1,500×g에서 20분간 원심분리(Hitachi, Model 20PR-5 Automatic High Speed refrigerated centrifuge)하여 혈청을 제거하였다. 모아진 혈구들은 0.1 M, pH 7.0, sodium phosphate saline(Awashi *et al.*, 1979) 용액으로 2~3회 씻고 다시 1,500×g에서 20분간 원심분리하여 혈구들을 모은 다음 여기에 0.7 mM β -mercaptoethanol 용액을 넣어 혈구들을 파괴 시킨후 10,000×g에서 30분간 원심분리하여 용혈되지 않는 혈구들과 혈구막들을 제거하였다.

상등액에 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 를 25~65%로 포화시킨 후 15,000×g에서 30분간 원심분리하여 침전물을 얻어 소량의 20 mM, pH 7.2, sodium phosphate buffer로 녹인후 동일한 buffer에서 투석(dialysis)시켰다.

15,000×g에서 30분간 원심분리하여 불용성 물질을 제거하고 난 후 나머지 상등액을 crude glutathione peroxidase 용액으로 사용하였다.

Crude glutathione peroxidase 용액을 20 mM, pH 7.2, sodium phosphate buffer로 평형시킨 Sephadex G-200 column에 올려 투과액을 모은 다음, 이를 다시 10 mM, pH 7.0, sodium phosphate buffer로 평형된 DEAE-Sephadex A-50 column으로 10 mM~200 mM linear buffer gradient를 주어 chromatography한 후, 모아진 투과액을 50 mM, pH 7.0, sodium phosphate buffer로 완충시킨 Sephadex G-200 column에 걸어서 순화된 glutathione peroxidase 용액을 얻었다. (Flow diagram참조).

모든 순화과정은 4°C에서 행하였으며, 효소 활성을 유지시키기 위하여 0.7 mM β -mercaptoethanol을 상기의 동일 sodium phosphate buffer에 첨가하였다.

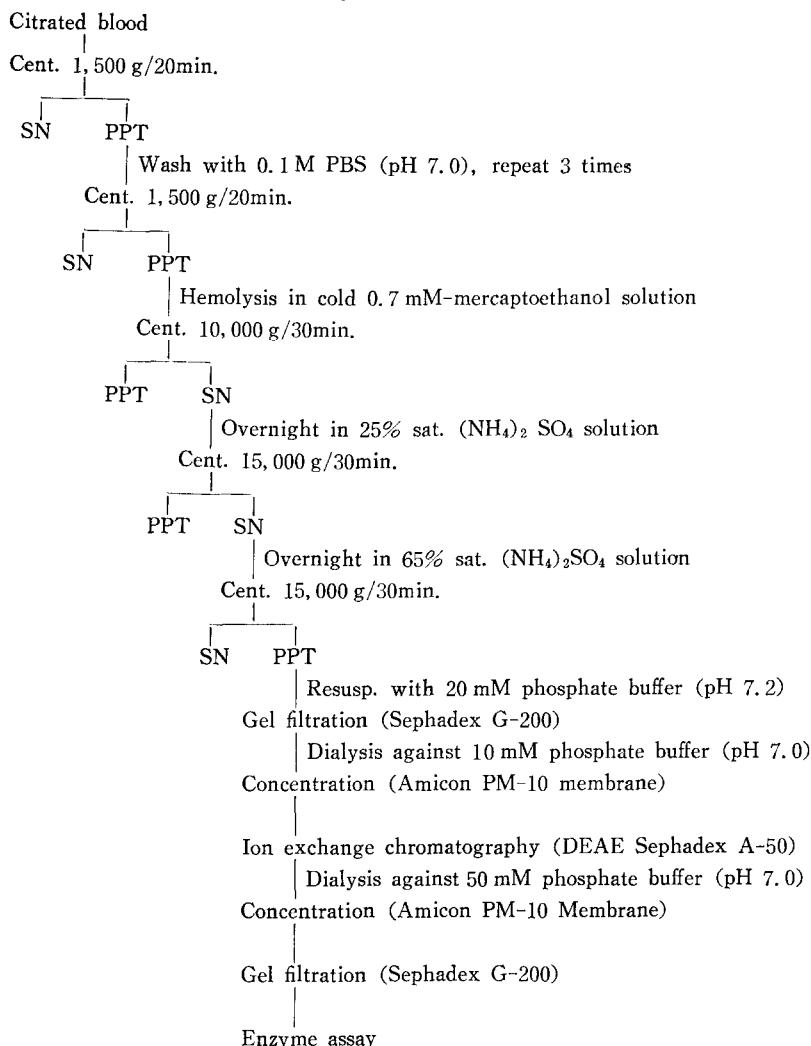
(2). Glutathione Peroxidase의 성질

1) 효소활성 측정

효소용액의 활성도 측정은 Mills' procedure(1959)의 방법을 이용하여 20 μl 의 효소액과 2 mM의 glutathione 용액 0.2 ml에 1.25 mM H_2O_2 용액 0.2 ml을 섞은 기질용액을 37°C에서 10분간 반응시킨후 효소 활성에 의해 사용되고 남은 glutathione의 양을 DTNB (5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid)를 이용하여 비색측정하였다(Sedlak과 Lindsay, 1968).

Spectronic 20 spectrophotometer (Bausch & Lomb)를 사용하여 410 nm에서의 흡광도를 측정하여 효소활성을 비교하는데 사용하였다. 이때 효소활성에 의하지 않고 이루어진 glutathione의 자동 산화양을 효소반응 후 측정된 glutathione의 양에서 감하였다. 효소활성도의 1

A flow diagram of purification of glutathione peroxidase.



단위(unit)는 주어진 상태에서 1분간 1 μmole 의 GSH를 GSSG로 산화시키는 효소의 활성으로 정하였다.

Specific activity는 효소 용액내에 있는 단백질량에 대한 효소활성도(units/mg of protein in enzyme solution)로 하였다.

2) 단백질 정량

효소액 중 단백질 함량의 측정은 Lowry(1951) 등의 방법을 이용하였고, column chromatography 분획물의 단백질량 측정은 Beckman spectrophotometer DB-G를 사용하여 280 nm에서 측정하였다.

3) 효소활성에 미치는 온도의 영향 측정

Crude glutathione peroxidase 용액을 기질 용액과 함께 pH 7.0에서 20°C부터 50°C까지

여러 온도에서 10분간 반응시킨후 효소활성을 측정법에 의하여 효소 활성을 측정하여 비교하였다.

4) 효소의 열에 대한 안전성 측정

Crude glutathione peroxidase 용액 0.5 ml을 각기 다른 온도에서 10분간 가열시킨후 pH 7.5, 40°C에서 효소 활성측정 방법에 의하여 효소활성을 측정한 다음 비교하였다.

5) 효소활성에 미치는 pH의 영향 측정

Crude glutathione peroxidase용액을 기질 용액과 함께 pH 5.0, pH 8.5까지 다양하게 변화시킨 완충액을 사용하여 40°C에서 10분간 반응시킨 후 효소 활성측정법에 의하여 효소활성을 측정 비교하였다.

6) Glutathione에 대한 효소역학

Crude glutathione peroxidase용액을 H₂O₂ 용액의 농도를 고정시키고 glutathione용액의 농도만 변화시킨 기질용액과 최적조건(40°C pH 7.5)에서 10분간 반응시킨후 효소활성을 측정법에 의하여 효소활성을 측정하였다. 이것은 Lineweaver-Burk plot에 의해 Michaelis constant (K_m) 최대 반응속도(V_{max})를 측정하였다(Lawrence와 Burk, 1934).

7) H₂O₂에 대한 효소역학

Crude glutathione peroxidase 용액을 glutathion용액의 농도는 고정시키고 H₂O₂용액의 농도만 달리한 기질용액과 최적조건에서 반응시킨 후 효소활성을 측정하여 Lineweaver Burk plot에 의해 K_m과 최대반응 속도를 측정하였다.

8) 효소의 분자량 측정

Sephadex G-200 column chromatography에 의해 순환된 효소용액을 모아 농축시킨후 (Amicon PM 10 membrane) 이 농축액으로 효소의 분자량을 측정하였다.

Gel filtration에 사용된 Sephadex G-200 column(2.5×70 cm) 50 mM, pH 7.0, sodium phosphate buffer로 평형시켜 각 tube에 4 ml씩 받았으며 이때 흐름속도는 16 ml/hour로 하였다.

이들 분획에서 효소 활성을 측정한후 다음 식에 의하여 partition coefficient(K_{av})를 계산하였다.

$$K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o}$$

V_e : elution volume of sample

V_o : void volume of the column

V_t : total volume of gel bed

Void volume(V_o)의 측정을 위해 blue dextran을 사용하였으며 elution volume(V_e)은 효소의 활성이나 각 표준단백질이 280 nm에서 흡광도가 최대를 보이는 분획가지의 투과액함께로 결정하였다. Cytochrome c(horse, M.W. 12,400), bovine albumin(68,000), γ -globulin(160,000)등이 표준단백질로 사용되었다.

효소의 분자량은 각 표준단백질의 log molecular weight에 대한 K_{av}를 plot하여 측정하였다.

(3) glutathione peroxidase의 작용부위에 관한 조직화학적 방법

실험동물들은 조직화학적 과정과 포매과정에서 방해기작을 가질 수 있는 간조직내의

glycogen의 함량을 측정하기 위하여 실험 전 24시간동안 굽어서 이용하였다. (Fahimi와 Karmovsky, 1968). 가벼운 ether마취 상태 하에서 쥐의 간을 perfusion하였다. Perfusion-용액으로는 0.15 M phosphate buffer(pH 7.2)에 1.25%의 glutaraldehyde를 포함하는 용액으로 18~20 ml/min의 유출속도를 이용하여 약 10분간 perfusion하였다(Fahimi, 1969). 출혈방법(exsanguination)으로 쥐를 죽이고 간조직을 빨리 절제하여 고정액 속에 넣은 후 약 0.5 mm두께로 절단하였다. 고정액으로는 0.1 M cacodylate buffer(pH 7.2)에 paraformaldehyde를 용해시켜 만든 4% formaldehyde와 1.25%의 glutaraldehyde를 혼합시킨 용액을 사용하였으며, 잘게 떼어낸 간조직 절편을 실온에서 3시간정도 전고정하였다(Kanovsky, 1965). 전고정된 조직을 같은 cacodylate buffer로 세척한 다음 가능한 한 더욱 작게 세절하고 이 조직을 37°C에서 1시간동안 배양하였다. 기질은 10ml의 0.1 M Tris-HCl buffer(pH 7.6)에 5mg의 3,3'-diaminobenzidine tetrachloride(Sigma)와 8 mM glutathione(Sigma) 및 0.02% H₂O₂을 포함하였다. 배양시킨 조직을 상기의 Tris-HCl buffer로 2~3회 세척한 후 0.2 M collidine buffer(pH 7.2)로 조정된 1% OsO₄ 고정액으로 2시간동안 후고정하였다. 고정된 재료를 알코올 농도 성승순으로 무수알코올까지 달수한 후 propylene oxide로 최종 치환한 다음 epoxy resin에 포매하였다(Luft, 1961).

Sorvall MT-2B형 ultramicrotome으로 초박절편을 만든 후 glutathione peroxidase의 관찰을 위하여 전자염색을 하지 않았으며 세포내 organelles을 관찰하기 위하여 uranyl acetate와 lead citrate로 2중 전자염색을 한 후(Reynold, 1963), Hitachi HU-11E 및 H-500형 전자현미경으로 관찰하였다.

결 과

1. Glutathione Peroxidase의 순화

(1) Sephadex G-200 column chromatography

Crude glutathione peroxidase 용액을 20 mM, pH 7.2, sodium phosphate buffer로 평형시킨 Sephadex G-200 column에 올려 chromatography하였다(Fig. 1). 12 ml/hour의 흐름속도로 한 tube에 3.3 ml씩 받았다.

Fig. 1에서 보는 바와 같이 완전히 분리되지 못한 3개의 단백질 peak가 나타났으며 효소활성을 조사한 결과 410 nm에서 측정한 hemoglobin peak보다 앞쪽 분획에서 나온 것을

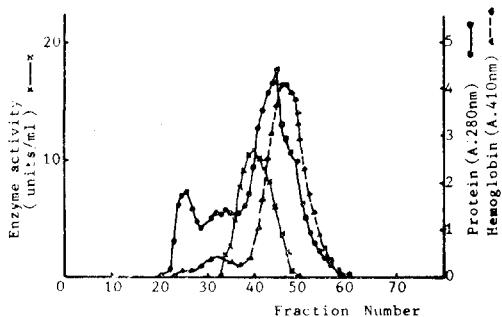


Fig. 1. Chromatogram of glutathione peroxidase on Sephadex G-200 column. The crude enzyme solution was applied to the column(2.5×70cm) of Sephadex G-200 equilibrated with 20mM sodium phosphate buffer (pH 7.2). The flow rate was 12ml/hour and the 3.3ml each of eluate was collected in a tube.

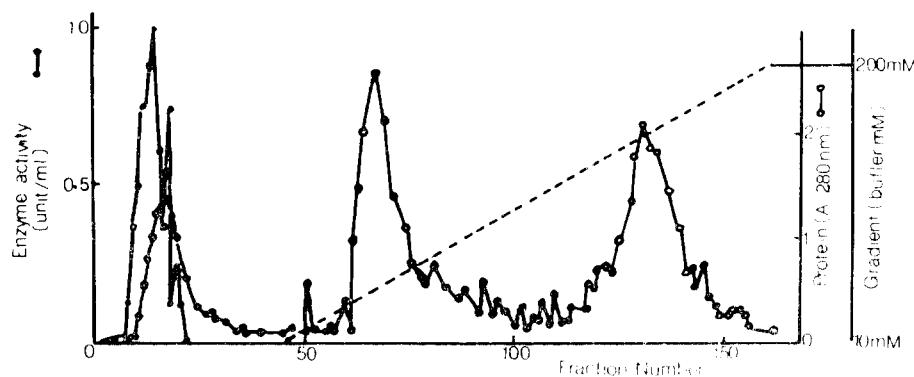


Fig. 2. Chromatogram of glutathione peroxidase on DEAE-Sephadex A-50 column. The pooled and concentrated sample from the Sephadex G-200 column was applied to the column (2.5×18 cm) of DEAE-Sephadex A-50 equilibrated with 10mM sodium phosphate buffer (pH 7.0). The column was eluted with a linear buffer gradient 10 to 200mM sodium phosphate buffer, pH 7.0 at a flow rate of 20ml/hour and 3.3ml each of fraction was collected.

알 수 있다.

(2) DEAE-Sephadex A-50 column chromatography

Sephadex G-200 column chromatography에 의하여 glutathione peroxidase 활성이 있는 분획들만 모아 10 mM pH 7.0, sodium phosphate buffer로 1일동안 투석시킨 후 Amicon PM 10 membrane을 사용하여 동축시킨 다음 동일한 buffer로 평형시킨 DEAE-sephadex A-50 column (2.5×18 cm)에 올려 chromatography하였다. 이때 처음에는 동일한 buffer로 투과시켜 결합하지 않은 단백질들을 모음다음 10 mM에서 200 mM의 linear gradient를 투과하였다. 이때 흐름속도는 20 ml/hour가 되게 하였으며 각 tube에 3.3 ml씩 모았다.

Fig. 2에서 보는바와 같이 효소활성을 가지는 분획들이 10 mM, pH 7.0 buffer로 투과한 곳에서 일어졌고 buffer gradient로 투과한 곳에서는 전혀 효소활성이 나타나지 않았다.

(3) Sephadex G-200 column chromatography

DEAE-Sephadex A-50 column chromatography에 의해 얻어진 효소용액을 50 mM, pH 7.0, sodium phosphate buffer로 투석시킨 후 동축하여 동일한 buffer로 평형된 Sephadex G-200 column (2.5×70 cm)으로 chromatography하였다. 이때 16 ml/hour의 흐름 속도로 한 tube에 4 ml씩 빙았다.

Fig. 3에서 보는 바와 같이 하나의 단백질 peak를 얻었으며 효소활성을 조사한 결과 단

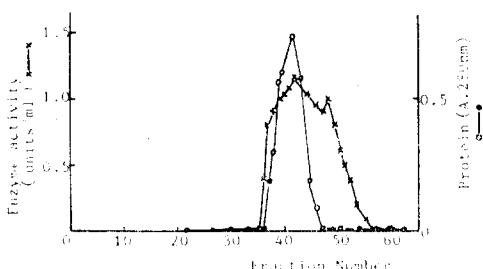


Fig. 3. Chromatogram of glutathione peroxidase on Sephadex G-200 column. After elution from the DEAE-Sephadex A-50 column, the active fractions were pooled, concentrated, and applied to a column (2.5×70 cm) of Sephadex G-200 equilibrated with 50mM sodium phosphate buffer pH 7.0. The flow rate was 16ml/hour and 4ml each of elute was collected in a tube.

Table 1. Purification of glutathione peroxidase isolated from rat erythrocytes.

Step	Total protein (mg)	Total activity (units)	Specific activity (units/mg protein)	Recovery of activity (%)	Purification (fold)
Hemolysate	7768.02	2351.97	0.30	100	1.00
(NH ₄) ₂ SO ₄ (25~65%)	686.01	870.63	1.27	34.4	4.19
Sephadex G-200	103.94	252.12	2.43	10.7	8.01
DEAE-Sephadex-A-50	21.70	125.78	5.80	5.3	19.14
Sephadex G-200	4.57	44.82	9.81	1.9	32.39

One unit of enzyme brings about oxidation of 1 μmol of GSH to GSSG per min at 37°C.

백질 peak의 최대분획과 효소활성의 최대분획이 일치하였다. 이것으로 완전히 순화되었음을 알 수 있다.

Table 1은 glutathione peroxidase의 각 순화과정에서의 효소활성과 단백질의 양을 표시한 것으로 33.5배 순화되었다.

(4) 효소의 분자량

Crude glutathione peroxidase용액을 3 단계 순화하는 과정에서 나타난 효소액을 농축시켜 Sephadex G-200 gel filtration에 의해 분자량을 측정한 결과 약 90,000 정도였다(Fig. 4).

2. Glutathione Peroxidase의 성질

(1) 효소활성에 미치는 온도의 영향

Fig. 5에서 보는바와 같이 glutathione peroxidase는 40°C에서 가장 강한 효소활성을 나타

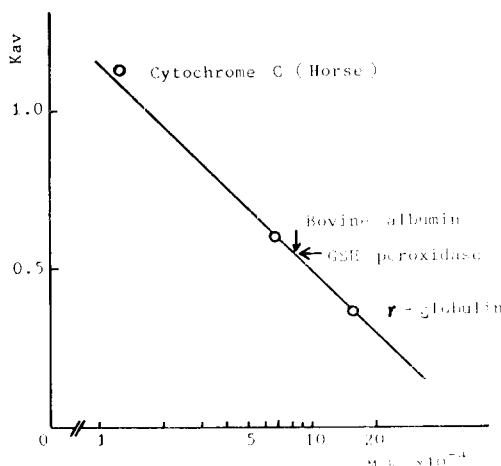


Fig. 4. Estimation of the molecular weight of glutathione peroxidase by Sephadex G-200 gel filtration. The molecular weight was estimated by plotting K_av against log(molecular weight). Standard proteins used were cytochrome c(horse, M.W. 12,400), bovine albumin(68,000) and r-globulin (16,000).

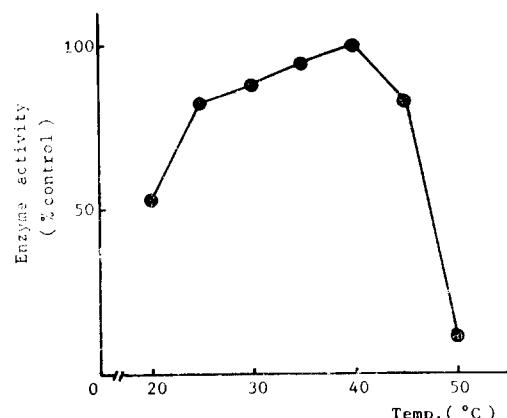


Fig. 5. Effect of temperature on the activity of glutathione peroxidase. The crude enzyme activity was determined at pH 7.5 by measuring the amount of glutathione remained after incubation of the enzyme-substrate mixtures for 10 min at various temperatures. The optimum temperature for the enzyme activity was 40°C.

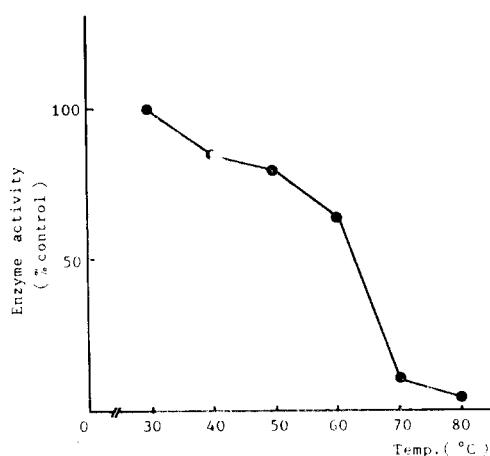


Fig. 6. Thermal stability of glutathione peroxidase. After heating the crude enzyme solution at various temperatures for 10 min, the residual enzyme activity was determined by measuring the amount of glutathione remained after incubation of the enzyme-substrate mixture at 40°C, pH 7.5 for 10 min. The enzyme was most stable at 30°C.

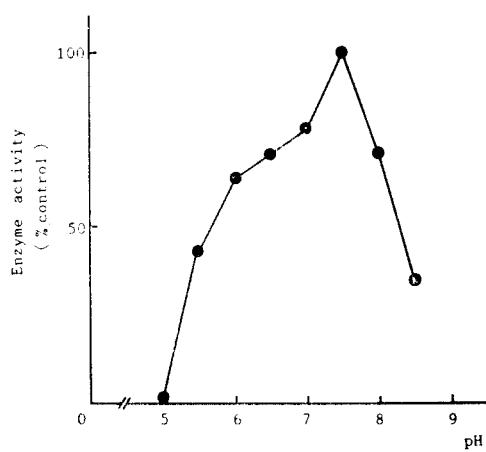


Fig. 7. Effect of pH on the activity of glutathione peroxidase. The crude enzyme activity was determined by measuring the amount of glutathione remained after incubation of the enzyme-substrate mixtures at 40°C for 10 min at various pH's of 0.4M sodium phosphate buffer. The optimum pH for the enzyme activity was 7.5.

내었다. 25°C에서 45°C까지는 80%이상의 효소활성을 보여 비교적 안정되었으나 20°C에서는 50%정도, 50°C에서는 효소의 활성이 거의 상실되었다.

(2) 효소의 열에 대한 안정도

Fig. 6에서와 같이 30°C에서 가장 안정되었으며 40°C~50°C까지는 80%이상의 활성을 가지고 있는데 비해 그 이상의 온도에서는 불안정하여 70°C~80°C에서는 효소활성의 90% 이상 상실되었다.

(3) 효소활성에 미치는 pH의 영향

Fig. 7에서와 같이 효소의 활성이 pH 7.5에서 가장 강하게 나타났고 산이나 강한 알칼리 쪽에서 활성이 크게 감소됨을 알 수 있다. 또한 pH 5 이하에서 효소활성이 나타나지 않았다.

(4) Glutathione에 대한 효소역학

최적조건(40°C, pH 7.5)에서 기질용액 중 glutathione용액의 농도만 달리하여 측정한 결과 Km값이 8.5 mM로 최대 반응속도가 15.6 μmoles/min로 계산되었다(Fig. 8).

(5) H₂O₂에 대한 효소역학

Fig. 9에서 보는바와 같이 H₂O₂용액의 농도만 변화시킨 기질용액을 사용하여 최적조건에서 효소활성을 측정한 결과 Km 값과 최대 반응속도가 각각 40 μM과 10.5 μmoles/min로 계산되었다.

3. Glutathione peroxidase의 활성부위에 대한 미세구조적 관찰

세밀한 간조직을 DAB 및 glutathione을 포함하는 배지에서 활성화시킨 후 전자현미경을

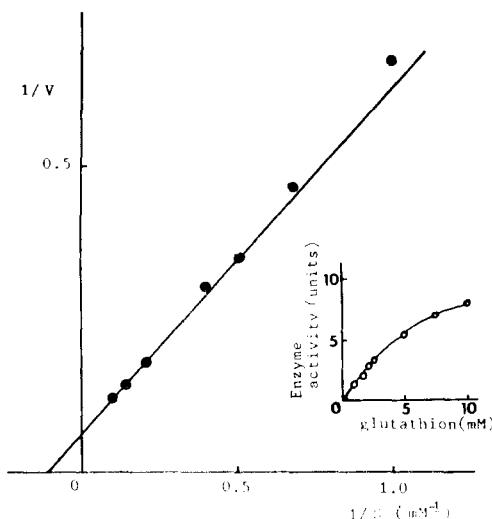


Fig. 8. Glutathione peroxidase activity as a double reciprocal function of glutathione concentration at 40°C, pH 7.5. The values of K_m and V_{max} were calculated to be 8.5mM and 15.6 μ moles/min respectively.

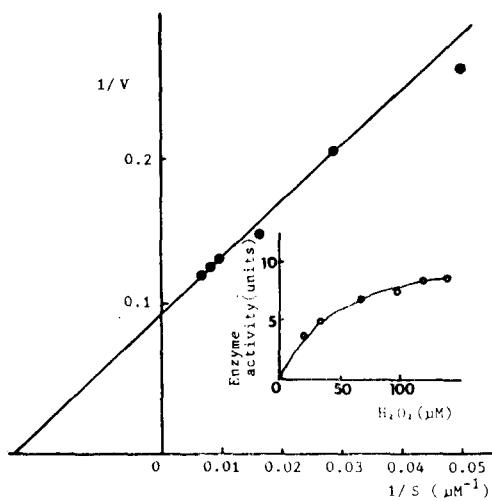


Fig. 9. Glutathione peroxidase activity as a double reciprocal function of H_2O_2 concentration at 40°C, pH 7.5. The values of K_m and V_{max} were calculated to be 40 μ M and 10.5 μ moles/min, respectively.

통하여 glutathione peroxidase의 작용부위를 관찰하였다.

효소가 활성화 되지 않은 흰쥐 간세포에는 잘 발달된 mitochondria, 소포체 그리고 glycogen 등이 정상적으로 나타나는 반면(Figs. 10, 11) 효소를 활성화시킨 간세포에서는 이 효소의 활성산물이 세포질내의 microbody에 국한되어 나타났다(Figs. 12, 13).

또한 이 효소는 간소엽 중심세포(parenchymal cell)에 주로 존재하며, Kupffer 세포, 저장세포 및 혈관 내피세포등에서는 그 활성도가 낮은 것으로 나타났다(Figs. 12, 13). 이 밖에도 효소의 작용으로 인한 반응산물은 전자밀도가 매우 높으며 그 형태는 보통 통글고 크기는 0.2~0.7 μ m정도의 두께로서 그 경계막은 불분명하였다(Fig. 14, 15).

고 찰

1957년 Mills에 의해 glutathione peroxidase에 대한 첫보고가 있은 이래, 많은 동물의 조직에서 연구되어 왔으며 특히 hemoglobin을 보호하는 적혈구내의 glutathione peroxidase에 관한 연구가 활발히 진행되었다(Flohe *et al.*, 1971; Mills, 1959; Oh *et al.*, 1974; Paglia 와 Valentine, 1967; Stults *et al.*, 1977; Yagi *et al.*, 1960). 정상적인 사료로 사육한 흰쥐를 재료로 하여 적혈구로부터 glutathione peroxidase를 분리, 추출하여 Sephadex G-200 column chromatography한 결과 glutathione peroxidase활성을 나타내는 1개의 peak를 얻었다.

이러한 결과는 사람의 적혈구에는 분자량이 다른 2개의 glutathione peroxidase가 존재한다는 Awashi등(1975)의 보고와는 달리 bovine(Yagi *et al.*, 1960)이나 ovine(Oh *et al.*,

1974) 등에서 처럼 하나의 효소로 되어 있음을 알 수 있다.

Mills 등(1957, 1959), Flohe 등(1971)에 의하여 glutathione peroxidase는 다른 peroxidase와는 달리 cyanide나 azide에 의해 그 활성이 억제되지 않는, 즉 heme group을 갖지 않는 효소임이 밝혀졌다. Sephadex G-200 chromatography하여 효소활성을 가지는 분획들을 410 nm에서 흡광도를 조사한 결과 전반적으로 약간의 흡광을 보였는데 이는 효소가 heme group을 가지고 있어서 나타난 현상이라기 보다는 분자량이 비슷한 hemoglobin의 contamination에 의한 것으로 여겨지는데 이것을 확인하기 위하여 순화 다음단계인 DEAE-Sephadex A-50 column chromatography를 하여 위 사실을 재확인할 수 있었다. 효소액을 column에 올린 후 10 mM, pH 7.0의 buffer를 사용하여 투과하였는데, 이때 효소액은 contamination된 hemoglobin과 분리되어 column에 결합되지 않고 10 mM buffer로 끗어주는 곳에서 얻어졌다.

이렇게 하여 얻은 효소액을 410 nm에서 흡광도를 조사한 결과 전혀 흡광을 하지 않았다. 따라서 흰쥐 적혈구의 glutathione peroxidase도 none heme enzyme임을 확실히 알 수 있었다.

흰쥐 적혈구의 glutathione peroxidase의 일반적인 성질들을 살펴보면, 반응 최적온도의 경우 1980년 Yoshimura 등은 rat에서 42°C라고 보고했는데, 본 실험의 결과인 40°C와 비슷함을 알 수 있다. 반응최적 pH에 대해서 Mills(1959)는 bovine 적혈구의 효소는 pH 8 이상에서 가장 강하게 활성을 나타낸다고 보고했으며, 사람의 적혈구로부터 분리해낸 효소는 pH 8 이상이라고 밝혔고(Paglia와 Valentine, 1969), Awashi 등(1975)은 반응최적 pH가 8.5라고 보고하였다. 적혈구 이외에 흑쥐의 간조직에서 얻어낸 glutathione peroxidase도 pH 8.5에서 효소활성이 가장 강하게 나타났다고 보고된 바 있다(Yoshimura *et al.*, 1980). 본 실험에서는 crude glutathione peroxidase를 사용하여 조사한 결과 pH 7.5에서 효소활성이 가장 강하게 나타났다. 반응최적 pH는 효소원에 따라 약간씩 다르게 측정되었으나 대개 약알칼리성 영역임을 알수 있다.

Paglia 등(1967)은 사람 적혈구로부터 순화한 glutathione peroxidase로 열에 대한 안정도를 실험하였는데 45°C까지는 비교적 효소활성의 감소가 없다가 그 이후의 온도에서 급격히 효소활성이 감소하여 65°C정도에서 효소활성을 완전히 잃었다고 하였다. 본 실험의 흰쥐 적혈구로부터 얻은 crude glutathione peroxidase의 경우는 30°C 이후부터 점차 효소활성이 감소되기는 하지만 비교적 안정되었다. 그러나 60°C 이상에서 급격한 감소가 일어나 80°C에서는 거의 효소활성을 잃었다. 많은 동물들의 적혈구로부터 추출한 glutathione peroxidase의 Km값이 측정되었는데, 사람 적혈구의 경우는 glutathione에 대한 Km값이 10mM이며 H₂O₂에 대한 Km은 25 μM로 보고되었고(Scott와 Noguchi, 1973), 돼지적혈구의 경우 glutathione에 대한 Km 값이 3 mM로(Little *et al.*, 1970), progesteron 17-hydroperoxide에 대한 Km이 40 μM로 알려졌으며(Little, 1972), Awashi 등(1975)에 의해 사람 적혈구에서 glutathione과 t-butylhydroperoxide에 대하여 각각 4.1 mM과 52 μM로 밝혀졌다. 본 실험에서 흰쥐 적혈구의 glutathione peroxidase의 Km값이 glutathione에 대하여 8.5 mM로 H₂O₂에 대하여서는 40 μM로 측정되었다.

glutathione에 대해 측정된 Km값들을 살펴보면 약간의 차이를 보이고 있는데 이는 효소원과 반응조건의 차이에 의한 것으로 여겨진다. 또한 이 효소의 최대반응속도 glutathione에 대하여서는 15.6 μmoles/min로 나타났고 H₂O₂에 대하여서는 10.5 μmoles/min로 나타나

약간의 차이를 보이고 있다.

Glutathione Peroxidase의 분자량이 여러 조직에서 측정되었는데 Oh 등 (1974)은 Sephadex G-150 gel filtration에 의해 ovine의 적혈구 glutathione peroxidase의 분자량을 89,000으로 보고하였고, Awashi 등 (1975)은 sedimentation equilibrium 방법으로 사람 적혈구의 효소 분자량이 $95,000 \pm 3,000$ 으로 측정하였다. 또 bovine의 적혈구에서 Sephadex G-150 gel filtration 방법에 의해 88,000의 분자량을 얻었으며 (Yagi *et al.*, 1960), 적혈구 이외에 rat의 간조직에서 Nakamura 등 (1974)은 sedimentation equilibrium 방법으로 96,000을 Yoshimura 등 (1980)은 94,000의 분자량을 Sephadex G-150 gel filtration에 의해 얻었으며, Awashi 등 (1979)은 사람의 태반에서 추출한 glutathione peroxidase의 분자량을 Sephadex G-200 gel filtration 방법에 의해 85,000이라 보고했다.

본 실험에서는 Sephadex G-200 gel filtration을 사용하여 흰쥐의 적혈구 glutathione peroxidase의 분자량을 90,000정도로 측정하였는데 이는 이상에서 보고된 분자량들과 매우 비슷하였다. 이것으로 지금까지 보고된 여러 동물들에서 추출된 glutathione peroxidase들의 크기는 서로 비슷하다고 생각된다.

이밖에도 이 효소의 분포 및 성질등을 확인하기 위하여 흰쥐 간세포를 세밀하여 조직화학적 처리를 통해 작용부위를 전자현미경으로 관찰하였는데 적혈구 대신 간조직을 택한 이유는 흰쥐 간조직에서 glutathione peroxidase는 적혈구에서보다 그 활성도가 2배이상 높고 (Behne과 Wolters, 1983), 다루기 쉬운 장점이 있기 때문이다. 본 실험에서 나타난 결과는 이 효소의 작용부위가 간소엽 주변부에 있는 간소엽 중심세포(parenchymal cell)에서 그 활성도가 크며 세포질의 microbody에만 국한되어 나타나는 것은 Little과 O'Brien(1969)의 생화학적 연구에서 얻어진 결과와도 일치한다. 또한 활성부위의 형태는 일반적으로 원형으로 타나나고 그 크기는 직경이 $0.2\sim0.7 \mu\text{m}$ 정도로 다양하였다.

그러나 이 효소의 반응부위에서 전자밀도가 높고 경계막이 불분명한 것은 이 효소가 세포질내의 특이한 위치에 분포하며 효소가 많이 모여 덩어리를 이루고 있음을 나타내는 것으로 생각된다. 이 외에도 효소의 작용부위가 간소엽 주변부에 두드러지게 나타나는 것은 간조직이 지방대사를 수행하는 과정에서 나타나는 lipid peroxide를 분해시키는데 이 효소가 크게 영향을 미치고 있다고 생각되며 이것은 Christophersen(1968)의 견해와도 일치한다.

그러나 이 효소의 구조 및 기능을 정확히 파악하고 그 위치를 규명하는데는 아직까지 많은 어려움이 있으며, 최근의 면역화학적 방법등은 이러한 연구에 많은 도움을 줄 수 있을 것이다.

요 약

흰쥐를 실험재료로 그 적혈구에서 glutathione peroxidase를 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 침전법, Sephadex filtration column, DEAE-sephadex column chromatography하여 순화시키고 이것의 성질을 연구하였으며, 간에서 이 효소의 작용부위를 조직화학적 처리를 하여 전자현미경으로 관찰한 결과는 다음과 같다.

1. Glutathione peroxidase는 약 33.5 배 순화되었다.
2. Crude glutathione peroxidase의 최적온도는 40°C 이며, 반응 최적 pH는 7.5였다.

3. 이 효소는 30 °C에서 가장 안정되었으며 glutathione 농도 변화에 대한 Km값은 8.5 mM, 최대 반응속도는 15.6 μmoles/min이 있고, H₂O₂ 농도변화에 대한 Km값은 40 μM이며, 최대 반응속도는 10.5 μmoles/min이었다.

4. 이 효소의 분자량은 약 90,000정도로 측정되었다.

5. 쥐의 간에서 이 효소의 활성부위는 microbody에 국한되며 간소엽의 주변부에서 그 활성이 크게 나타났다.

6. 조직화학적 방법으로 나타난 반응산물은 적경 0.2~0.7 μm 정도의 원형으로 그 경계 막은 뚜렷하지 않았다.

REFERENCES

- Awashi, Y.C., E. Beutler and S.K. Srivastava, 1975. Purification and properties of human erythrocyte glutathione peroxidase. *J. Biol. Chem.* **250**:5144.
- Awashi, Y.C., D.D. Dao, A.K. Lal and S.K. Srivastava, 1979. Purification and properties of glutathione of glutathion peroxidase from human placenta. *Biochem. J.* **177**:47.
- Behne, D. and W. Wolters, 1983. Distribution of Selenium and glutathion peroxidase in the rat. *J. Nutr.* **113**:456.
- Behne, D. and W. Wolters, 1979. Selenium content and glutathione peroxidase activity in the plasma and erythrocytes of non-pregnant and pregnant women. *J. Clin. Chem. Biochem.* **17**:133.
- Chow, C.K. and A.L. Tappel, 1972. An enzymatic protective mechanism against lipid peroxidation damage to lungs of ozone exposed rats. *Lipids* **7**:518.
- Chow, C.K., K. Reddy and A.L. Tappel, 1973. Effect of dietary vitamin E on the activities of the glutathione peroxidase system in rat tissues. *J. Nutr.* **103**:618.
- Chow, C.K. and A.L. Tappel, 1974. Response of glutathione peroxidase to dietary selenium in rats. *J. Nutr.* **104**:444.
- Christophersen, B.O., 1968. Formation of monohydroxy polyenic fatty acids from lipid peroxides by a glutathione peroxidase. *Biochem. Biophys. Acta.* **164**:35.
- Christophersen, B.O., 1969. Reduction of linolenic acid hydroperoxide by a glutathion peroxidase. *Biochim. Biophys. Acta.* **176**:463.
- Cohen, G. and P. Hochstein, 1964. Glucose-6-phosphate dehydrogenase and detoxification of hydrogen peroxide in human erythrocyte. *Science* **134**:1756.
- Cohen, G. and P. Hochstein, 1963. Glutathione peroxidase: The primary agent for the elimination of hydrogen peroxide in erythrocyte. *Biochemistry* **2**:1420.
- Fahimi, H.D. and M.J. Karnovsky, 1968. Fine structural localization of peroxidase in rat liver. In Third international congress of histochemistry and cytochemistry, summary reports. R.M. Rosenbaum, editor. Springerverlag, N.Y. Inc. New York 55.
- Fahimi, H.D., 1969. Cytochemical localization of peroxidatic activity of catalase in rat hepatic microbodies (peroxisomes). *J. Cell. Biol.* **43**:275.
- Folhe, L. and R. Zimmermann, 1970. The role of GSH peroxidase in protecting the membrane of rat liver mitochondria. *Biochem. Biophys. Acta.* **223**:210.
- Flohe, L., B. Eisele and A. Wendel, 1971. Glutathione peroxidase, I. *Hoppe-seyler's S. Physiol. Chem.* **352**:151.

- Flohe, L., W.A. Gunzler, G. Jung, E. Schaich and F. Schneider, 1971. Glutathione peroxidase. *H. Hoppe-Seyler's Z. Chem.* 352:159.
- Flohe, L., W.A. Gunzler and H.H. Schock, 1972. Glutathione peroxidase: A selenoenzyme. *FEBS Letters* 42:132.
- Hafema, D.G., R.A. Sunde and W.G. Hoekstra, 1974. Effect of dietary selenium on erythrocytes and liver glutathione peroxidase in the rat. *J. Nutr.* 104:580.
- Hill, A.S., Jr., A. Haut, G.E. Cartwright and M.L. Wintrobe, 1964. The role of nonhemoglobin proteins and reduced glutathione in the protection of hemoglobin from oxidation *in vitro*. *J. Clin. Invest.* 43:17.
- Hoekstra, W.G., D. Hafeman, S.H. OH, R.A. Sunde and H.E. Ganther, 1973. Effect of dietary selenium on liver and erythrocyte glutathione peroxidase in the rat. *Fed. Proc.* 32:885.
- Jacob, H.S. and J.H. Sande, 1966. A simple visual screening test for glucose-6-Phosphate dehydrogenase deficiency employing ascorbate and cyanide. *New England J. Med.* 274:1162.
- Kanovsdy, M. J., 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixture of high osmolality for use in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 27:137 A.
- Kosower, N.S., Y. Marikovsky, B. Wertheim and D. Danon, 1971. Glutathione oxidation and biophysical aspect of injury to human erythrocyte. *J. Lab. Clin. Med.* 78:533.
- Lawrence, R.A. and R.F. Burk, 1976. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficiency rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 71:952.
- Lawrence, R.A. and R.F. Burk, 1978. Species, tissues and subcellular distribution of non-Se-dependent glutathione peroxidase activity. *J. Nutr.* 108:211.
- Lineweaver, H. and D. Burk, 1934. The determination of enzyme dissociation constants. *J. Amer. Chem. Soc.* 56:658.
- Little, C. and P.J. O'Brien, 1968. An intracellular GSH peroxidase with a lipid peroxide substrate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 31:145.
- Little, C., R. Olinescu, K.G. Reid and P.J. O'Brien, 1970. Properties and regulation of glutathione peroxidase. *J. Biol. Chem.* 245:3632.
- Little, C., 1972. Steroid hydroperoxides as substrate for glutathione peroxidase. *Biochim. Biophys. Acta.* 284:375.
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.L. Randall, 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265.
- Luft, J.H., 1961. Improvements in epoxy resin embedding methods. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 9: 409.
- Mills, G.C., 1957. Hemoglobin Catabolism. I. Glutathione Peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown. *J. Biol. Chem.* 299:189.
- Mills, G.C. and H.P. Randall, 1958. Hemoglobin Catabolism. II. The protection of hemoglobin from oxidative breakdown in the intact erythrocyte. *J. Biol. Chem.* 232:589.
- Mills, G.C., 1959. The purification and properties of glutathione peroxidase of erythrocyte, *J. Biol. Chem.* 234:502.
- Mills, G.C., 1960. Glutathione peroxidase and the destruction of hydrogen peroxide in animal tissues. *Arch. Biochem. Biophys.* 86:1.
- Nakamura, W., S. Hosoda and K. Hayashi, 1974. Purification and properties of rat liver glutathione

- peroxidase. *Biochim. Biophys. Acta.* **358**:251.
- O'Brien, P.J. and C. Little, 1969. Intracellular mechanisms for the decomposition of a lipid peroxide. II. Decomposition of a lipid peroxide by subcellular fractions. *Can. J. Biochem.* **47**:493.
- Oh, S.H., H.E. Ganther and W.G. Hoekstra, 1974. Selenenium as a component of glutathione peroxidase isolated from ovine erythrocyte. *Biochemistry* **13**:1825.
- Paglia, D.E. and W.N. Valentine, 1967. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J. Lab. Clin. Med.* **70**:158.
- Reynold, E.S., 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.* **17**:208.
- Scott, M.L. and T. Noguchi, 1973. Metabolic function of selenium in prevention of exudative diathesis in chicks. *Fed. Proc.* **32**:855.
- Sedlak, J. and R.H. Lindsay, 1968. Estimation of total protein-bound, and non-protein sulphhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal. Biochem.* **25**:192.
- Stults, F.H., J.W. Forstron, D.T.Y. Chiu and A.L. Tappel, 1977. Rat liver glutathione peroxidase: Purification and study of multiple forms. *Arch. Biochem. Biophys.* **173**:490.
- Yagi, K., N. Knodo, H. Ohkawa and N. Ohishi, 1960. A simplified procedure for the purification of glutathione peroxidase from bovine erythrocyte. *Biochemistry International* **11**:245.
- Yoshimura, S., N. Komatsu and K. Watanabe, 1980. Purification and immunohistochemical localization of rat liver glutathione peroxidase. *Biochim. Biophys. Acta.* **621**:130.

Figure Legends

- Fig. 10.** Part of a liver cell non-incubated. There are many mitochondria (Mi) and well developed endoplasmic reticulum(PER). Nuclear membrane(Nm) is clear and nucleolus(No) is observed. (section stained with uranyl acetate and lead) ($\times 25,000$)
- Fig. 11.** Non-incubated control liver cells. Endoplasmic reticulum(RER, SER) mitochondria(Mi) are well seen. Glycogen granules are dispersed in the cytoplasm. Normal bile canalculus is also seen. (section stained with uranyl acetate and lead) ($\times 10,000$)
- Fig. 12.** Liver cell incubated with DAB and substrate for glutathione peroxidase activity. There is uniform staining of the matrix of all microbodies(Mb). Most of the microbodies are spherical. (Section contrasted with lead citrate) ($\times 6,500$)
- Fig. 13.** Electron micrograph of the liver cell for glutathione peroxidase activity. The electron-dense reaction products are limited only in the microbody (Mb) (peroxisome) of the cytoplasm. (Section contrasted with lead citrate) ($\times 7,500$)
- Fig. 14.** Microbodies stained for glutathione peroxidase activity. These organelles are spherical. Reaction products are dense stained with DAB and substrate. (Section stained with lead citrate) ($\times 25,000$)
- Fig. 15.** Microbodies stained for glutathione peroxidase activity. These reaction products have various diameters and their limiting membranes are unclear. (Section contrasted with lead citrate) ($\times 37,500$)

