

갈겨니(*Zacco temmincki*)의 進化에 관한 研究

Ⅲ. 온도변화에 따른 갈겨니 sMDH 동위효소의 반응성에 대하여

강 동 철·장 정 순·양 서 영
(인하대학교 이과대학 생물학과)

Evolutionary Study on the Dark Chub (*Zacco temmincki*)

Ⅲ. The Effect of Reaction Temperature on the Kinetic Mode of Isolated sMDH Isozymes from *Zacco temmincki*

Dong-Chul Kang, Chung-Soon Chang and Suh-Yung Yang
(Department of Biology, Inha University)

(1987. 6. 25. 접수)

ABSTRACT

Two allelotypes of sMDH variation, namely A and B type, are known in the dark chub, *Zacco temmincki*.

We attempted to clarify their probable functional enzymatic difference with temperature change. Two types of sMDH were purified separately by successive chromatography on DEAE-cellulose and blue 2-Sepharose affinity columns, and their enzymatic activities to temperature change were measured.

Q_{10} of V_{max} and V_{max}/K_m were significantly different between two types, i.e. A type being higher in Q_{10} values than B type.

Based on the result it is assumed that A type may be more sensitive to temperature change than B type.

서 론

자연상태의 생물집단에 존재하는 단백질의 다형현상과 생물의 환경적응 및 진화와의 관계에 대하여 선택설과 중립설의 두 견해가 대립되어 왔다(Kimura and Otha, 1971). 단백질의 다형현상이 생물의 생존에 선택적으로 작용하려면, 다형현상을 보이는 각 단백질들간에 기능적인 면에서 차이가 있어야 할 것으로 생각된다. 이러한 견지에서 최근 이들의 생태분포에 대한 연구와 더불어 기능에 대한 생화학적인 접근이 활발하게 시도되고 있다. 특히

본 연구는 1985년도 문교부 기초과학연구 육성연구비의 지원을 받아 수행되었음.

효소는 다형형태를 비교적 용이하게 확인할 수 있으며, 또한 동위효소간의 효소능 차이는 생리적으로 중요한 의미를 지닐 수 있으므로 이 점에 대하여 집중적인 논의가 이루어지고 있다(Baldwin, 1971; Merritt, 1972; Hedrick *et al.*, 1976; Malpica and Vassallo, 1980). 효소능의 차이와 적응현상과의 관계는 주로 해당계에 관여하는 효소를 중심으로 연구되어 왔으며 특히 LDH와 PGI는 그 대표적인 예로서 이들 *isozyme*의 지리적 분포상 및 그 온도 적응과의 관계가 북미 연안어류에 대하여 보고된 바 있다(Place and Powers, 1979; Hoffman, 1981; Graves and Somero, 1982). MDH (malate dehydrogenase; L-malate; NAD oxidoreductase, EC 1, 1, 1, 37)는 세포내 분포에 따라 mitochondrial MDH(mMDH) 및 cytosolic MDH(sMDH)의 두 *isozyme*형으로 나타나며 이들은 각각 해당되는 세포기관에서 대사적으로 중요한 중간산물인 oxaloacetate를 malate로 가역적으로 전환시켜 TCA회로, malate-aspartate shuttle 및 gluconeogenesis 등의 대사과정에 참여하는 것으로 알려져 있다. 특히 sMDH의 경우 다형현상이 매우 뚜렷하여 동일한 종의 집단에서도 위도에 따라(Powers and Place, 1978) 또는 적출된 기관에 따라(Bailey *et al.*, 1970; Starzyk and Merritt, 1980, Philipp *et al.*, 1979) sMDH의 출현양상이 다른 것으로 보고되었다. 따라서 sMDH의 이러한 다양성을 고려해 볼때 각각의 *isozyme*형이 생물체내에서 기능적인 분담을 이루고 있거나 또는 상이한 환경에 대한 적응정도가 차이가 있을 것으로 생각된다.

1984~1986년에 걸친 한국산 갈겨니 집단에 대한 동위효소 분석결과에 의하면 남한의 남해 및 서해로 유입되는 대부분의 하천에서 서식하는 집단과 경북 울진이남의 동해유입 하천에서 서식하는 집단들이 상이한 동위효소형을 가지는 것으로 관찰되었고, 특히 경남 남해군 동진천의 경우에는 이들 두 변이형태를 갖는 개체들이 공서할 뿐 아니라 그 빈도가 계절에 따라 변하는 것으로 밝혀져 이들을 각각 A(동해유입 하천의 변이형) 및 B형(남해 일부 및 서해유입 하천의 변이형)으로 명명하였다(양 등, 1987). 지리적인 차이나 계절변화에 따른 환경요인의 변화는 다양하기는 하나 그 중 온도변화가 생물의 생존에 대하여 임계적으로 작용하는 경우가 비교적 잘 알려져 있으며, 또한 담수어에 있어 외부온도는 체온의 변화에 대하여 직접적으로 작용한다는 점을 고려할 때 sMDH 동위효소의 변이분포는 온도적응현상과 연관된 것으로 생각된다. 따라서 본 연구에서는 갈겨니의 진화에 관한 연구의 일환으로 이들 집단에서 관찰되는 sMDH의 동위효소형을 분리하여 온도에 따른 효소능의 차이를 밝힘으로써 이들의 생태분포와의 관계를 고찰하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

실험에 사용한 갈겨니 중 A type은 경북 울진군 소광리 소재 하천에서 1985년 6월에, B type은 경기도 가평군 북면(속칭 밥나무골)소재 하천에서 1985년 12월에 각각 채집하여 dry ice로 급속냉동시킨 다음 실험실로 운반하여 deep freezer (-80°C , Revco)에 보관하면서 사용하였다. 냉동된 갈겨니의 등근육을 적출하여 1:1.4(W:V)의 비율이 되도록 10mM Tris-HCl buffer(pH7.2)를 가한 다음 ice bath에서 teflon homogenizer(B. Braun)로 마쇄하였다. 마쇄된 재료를 4°C 에서 12,000rpm으로 30분간 원심분리한 후(Sorvall, SS-34 Rotor) 그 상등액을 동위효소 정제를 위한 시료로 사용하였다.

2. 등위효소의 분리

위에서 얻은 상등액으로부터 sMDH의 각 isozyme subtype을 분리하고자 DEAE-cellulose chromatography와 blue 2-Sepharose affinity chromatography를 실시하였다.

A type sMDH의 경우, DEAE-cellulose chromatography로 근육상등액을 분리한 다음 분리된 분획에 대하여 blue 2-Sepharose affinity chromatography를 실시하였다. DEAE-cellulose chromatography는 DEAE-cellulose(Sigma)를 충전한 DEAE-cellulose column, (4.5×5cm)을 이용하여 10mM Tris-HCl buffer (pH7.2)로 평형을 시킨 다음 위에서 얻은 근육상등액을 넣어 분리하였다. 유출용 완충용액으로 상기 buffer에 NaCl의 농도가 0, 20, 40, 60 및 80mM이 되도록 각각 처리한 후 계단식 염농도 구배를 통해 유출시켰다. DEAE-cellulose chromatography에서 분리된 sMDH의 각 분획에 대하여 10mM Tris-HCl buffer(pH7.2; 이하 투석용액)로 약 24시간 투석하여 염을 제거한 다음 50mM Tris-HCl buffer (pH7.2)로 평형을 이룬 blue 2-Sepharose affinity column (ϕ 1.5×5.0cm, Sigma)에 넣어 동일한 완충용액으로 첫번째 유출되어 나오는 분획을 완전히 씻어 내린 다음 상기 완충용액에 β -NADH (Sigma)가 0.8mM이 되게 처리한 buffer로 유출시켰다.

B type sMDH는 전술한 A type의 경우와는 역순으로 분리하였다. 즉 근육상등액을 먼저 blue 2-Sepharose affinity column (1.5×5cm)에 넣어 A type의 경우와 동일한 방법으로 유출시켜 MDH분획을 얻은 다음 투석용액으로 24시간 동안 투석하였다. 얻어진 MDH분획을 DEAE-cellulose column (4.5×5cm)에 넣어 10mM Tris-HCl buffer(pH7.2) 및 50mM NaCl로 처리된 완충용액으로 유출시켰다.

3. 전기영동

등위효소의 동정 및 정제도확인을 위하여 Davis-PAGE를 실시하였다. Davis-PAGE는 Sigma Technical Bulletin No. MKR 137 (1984)의 방법에 따라 준비된 6% polyacrylamide slab gel (14×10×0.15cm)에서 10mA의 정전류로 4°C에서 약 5시간 동안 실시하였다. 영동이 완료된 gel은 Selander *et al.* (1971)의 방법에 따라 MDH 특이 효소염색을 40°C에서 10분간 실시하였다.

4. Enzyme Activity 측정

효소농은 340nm에서 β -NADH의 감소분율을 Perkin-Elmer 552S UV/VIS spectrophotometer로 측정하였다. 온도조절 system으로 Julabo U3/7과 LKB 2209 multitemp.를 연결하여 반응조의 온도를 각각 5°C, 10°C, 15°C, 20°C, 25°C 및 30°C로 일정하게 유지시켰다. 반응혼합액은 적절히 희석된 효소용액 50 μ l와 14.39mM NADH 용액 50 μ l에 각각 20, 40, 60, 80, 160 μ l의 1.125mM oxaloacetate를 첨가하고 80mM Imidazole-HCl buffer(pH 7.0 at 25°C)를 개개의 반응용기에 적량 넣어 최종 반응부피가 3ml이 되도록 조절하였다. 반응은 전술한 각각의 온도에서 oxaloacetate를 제외한 반응혼합물을 30분간 평형을 시킨 다음 oxalacetate를 넣어 반응을 시작하였다.

V_{max} 및 K_m 값은 측정된 결과를 least square method에 따라 Lineweaver-Burk식에 회귀시켜 계산하였다. 비활성도는 unit로 표기하고, 1unit는 $\Delta\mu$ mol NADH/min/mg protein으로 정하였다.

5. 단백질 정량

단백질 정량은 Bradford(1976)의 방법에 준하여 protein assay용 dye concentrate (Bio-Rad)

용액의 원액을 사용하였고 표준단백질로는 BSA를 각각 사용하였다.

결과 및 고찰

1. B type sMDH Isozyme의 분리

Starch gel전기영동에서 전형적인 이량체 단백질의 형태인 3 bands를 나타내는 B type sMDH는 6% polyacrylamide slab gel을 이용한 Davis-PAGE에서도 Fig. 1에서 보는 바와

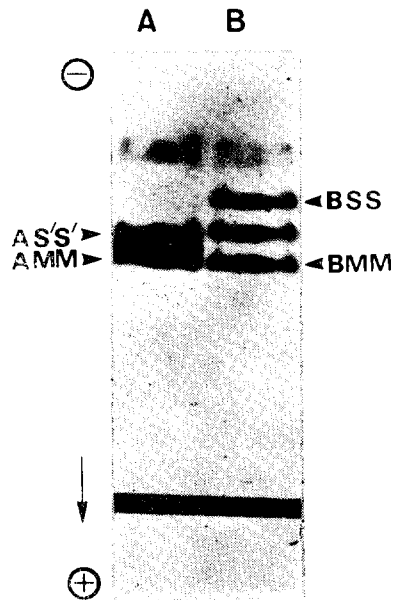


Fig. 1. Davis-PAGE patterns of crude muscle extract from *Zacco temmincki* that represent two different types of sMDH isozyme; A(left) and B(right) types were collected at Uljin and Kapyung, respectively. The gel was stained with MDH-specific substrate.

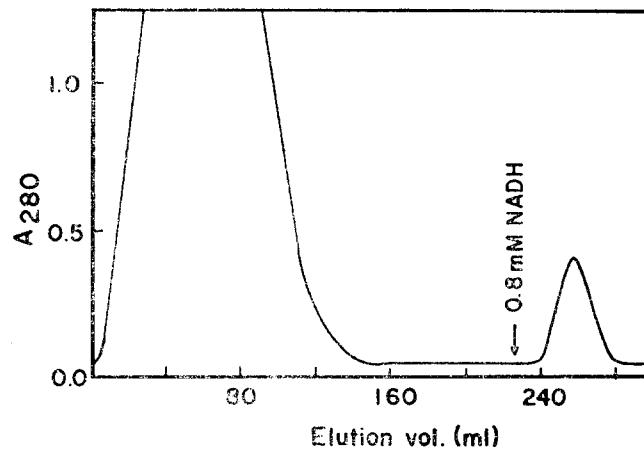


Fig. 2. Chromatogram of crude muscle extract from B type *Z. temmincki* on blue 2-Sepharose affinity column (1.5×5cm). The MDH fraction was eluted with 50mM Tris-HCl buffer, pH 7.2, containing 0.8mM NADH.

같이 동일한 양상을 보여줌에 따라 이들 중 양극으로 편재하는 band를 BMM 음극으로 편재하는 것을 BSS로 명명하였다.

근육상등액에서 MDH를 추출하고자 dinucleotide fold가 있는 효소에 친화력을 가진 것으로 알려진 blue 2-Sepharose affinity column (Thomson *et al.*, 1975; Wilson, 1976)을 통과시킨 결과 Fig. 2와 같은 chromatogram을 얻을 수 있었으며, 0.8mM NADH 용출분획에서 mMDH 및 sMDH가 존재함을 알 수 있었다. 한편 본 실험을 위한 예비실험에 의하면 Wright and Sundaram(1979)에 의해 MDH에 친화성이 있는 것으로 알려진 5'-AMP Sepharose는 mMDH에 대한 친화성은 있으나 sMDH에 대한 결합능력은 없는 것으로 나타났다.

상기 분획을 DEAE-cellulose column을 통과시켜 Fig. 3과 같은 chromatogram을 얻었으며 50mM NaCl 용출분획인 분획 II와 IV에서 각각 BSS 및 BMM subtype이 존재하고 있음을 알 수 있었다.

분리된 각 isozyme subtype에 대한 Davis-PAGE 결과는 Fig. 3에 삽입된 사진에서 보는 바와 같았으며, 이들의 25°C pH 7.0에서의 최고 비활성도는 BSS의 경우 2,600units, BMM의 경우 2,648units였다

2. A type sMDH Isozyme의 분리

Starch gel전기영동에서 단일 band로 나타난 A type sMDH는 6% Davis-PAGE결과 B type과 전기이동도에 있어 양극으로 더 치우친 3개의 band로 나타남에 따라 B type에 준하여 AS'S' 및 AMM으로 명명하였다. (Fig. 1)

A type갈겨니의 근육상등액을 DEAE-cellulose column을 통과시킨 결과 Fig. 4와 같이 4개의 peak로 분리되었으며 이들 중 40mM 및 80mM NaCl에 의하여 용출된 분획 II와 IV에서 각각 AS'S' 및 AMM이 있음을 확인할 수 있었다. 분리된 분획 II와 IV에 대하여 각각 blue 2-Sepharose affinity chromatography를 실시한 결과는 Fig. 5와 같으며 NADH용출분획에 분리된 AS'S' subtype 및 AMM subtype이 있음을 Davis-PAGE를 통해 확인할 수

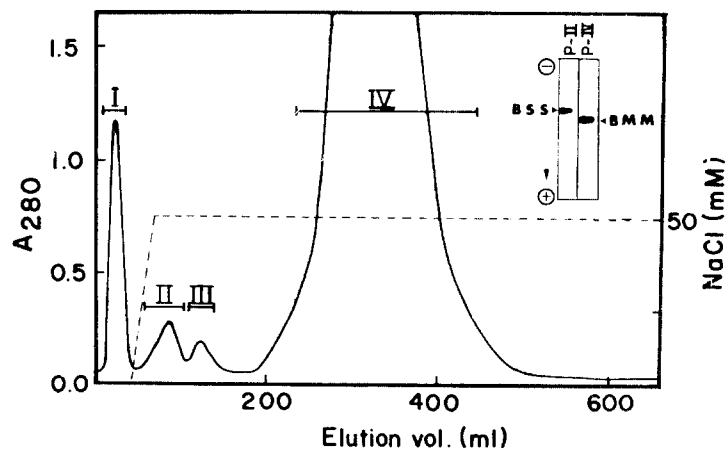


Fig. 3. Rechromatographic elution profile of the MDH fraction from blue 2-Sepharose affinity chromatography on DEAE-cellulose column (4.5×5.0cm). The inserted photograph showed separated isozyme subtypes, BSS and BMM which had been eluted at peak II and peak IV, respectively.

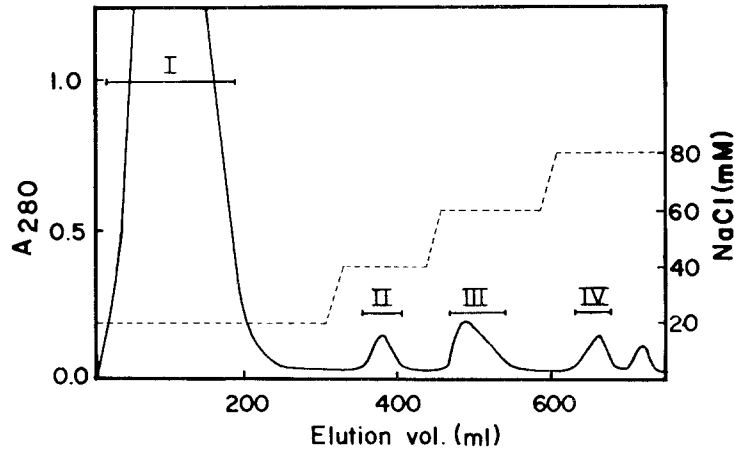


Fig. 4. DEAE-cellulose chromatography (4.5×5.0cm) of crude muscle extract from A type *Z. temmincki*. The isolated subtypes (AS'S' and AMM) were appeared at peak II and IV, respectively.

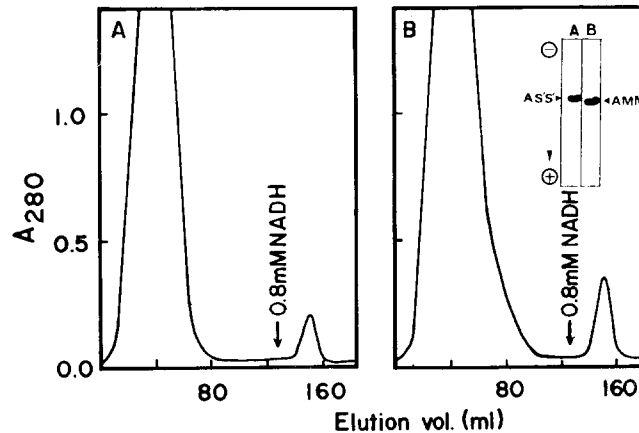


Fig. 5. The chromatography of peak II(left) and peak IV(right) from Fig. 4 on blue 2-Sepharose affinity column (1.5×5.0cm). Each fraction was eluted with 0.8mM NADH in 50mM TrisHCl buffer, pH 7.2, and also identified as AS'S' and AMM isozyme subtypes after 6% Davis-PAGE (inserted photo).

있었다(Fig. 5의 사진).

분리된 isozyme subtype의 25°C, pH7.0에서의 최고 비활성도는 AS'S'의 경우 63units, AMM의 경우 1,804units였다.

3. 효소능 측정

*In vitro*에서의 효소능이 다양한 보상기작이 형성되는 *in vivo*에서 갖는 실질적인 의미에 관하여 많은 논란이 있어 왔으며 따라서 가능한 한 이러한 보상기작을 삽입하여 효소능—기능관계를 고찰하여야 할 것으로 생각된다. 이러한 일례로서 Reeves(1969), Howell(1970) 등 및 Somero(1981) 등에 의해 보고된 변온동물의 체온변화에 따라 체액의 pH가 전이되

는 현상이 있는 바, 이들에 의하면 변온동물에 있어서 체온의 변화는 pH 변화와 밀접하게 연관되어 있어 온도 10°C 상승은 체액의 pH를 0.17 unit 감소시키며 이로 인하여 효소의 V_{max} 및 K_m 값의 변화에 미치는 온도의 영향을 완화시킬 수 있는 것으로 알려졌다. 이러한 기능은 LDH의 경우 반응중심에 있는 histidine 잔기의 α -imidazole기의 해리분율을 일정하게 유지함으로써 LDH의 효소능에 대한 온도보상에 기여하는 것으로 알려져 있다. 한편

Table 1. V_{max} and apparent K_m values at each reaction temperature for oxidative reaction of NADH of A type isozyme subtypes, AS'S' and AMM.

Temp. (°C)	AMM		AS'S'	
	V_{max} (units)	$K_m(\times 10^{-5})$	V_{max} (units)	$K_m(\times 10^{-5})$
5	242.23	2.72	10.90	9.26
10	590.45	3.07	30.21	1.65
15	852.07	4.01	36.07	1.07
20	1,272.13	5.51	53.22	1.47
25	1,804.00	4.58	63.36	0.95
30	1,688.42	4.43	103.27	2.33

Table 2. V_{max} and apparent K_m values at each reaction temperature for oxidative reaction of NADH of B type isozyme subtypes, BSS and BMM.

Temp. (°C)	BMM		BSS	
	V_{max} (units)	$K_m(\times 10^{-5})$	V_{max} (units)	$K_m(\times 10^{-5})$
5	635.62	2.19	717.03	2.30
10	862.27	1.91	845.75	2.94
15	969.81	1.09	704.66	1.91
20	1,307.95	1.39	790.26	1.89
25	2,612.51	2.63	2,648.12	5.34
30	4,639.42	4.50	1,796.51	1.98

Table 3. Q_{10} values for given temperature range of the isolated isozyme subtypes.

Temp. range(°C)	'A' Type		'B' Type	
	AMM	AS'S'	BMM	BSS
5~10	5.94	7.68	1.18	1.84
10~15	2.08	1.43	0.69	1.13
15~20	2.23	2.18	1.26	1.82
20~25	2.01	1.19	3.99	11.236
25~30	0.88	2.66	3.15	0.68
5~30 ^{a)}	2.73	2.46	2.22	1.92

^{a)} Q_{10} values of AMM and BMM isozyme subtypes were at the reaction temperature range of 5~25°C.

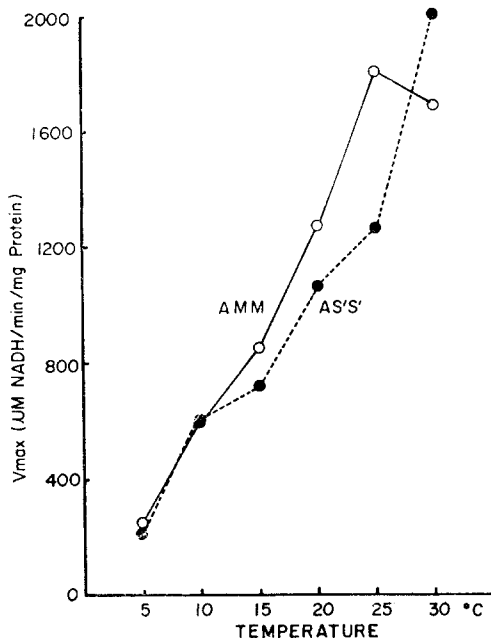


Fig. 6. The effect of reaction temperature on V_{max} for oxidative reaction of NADH of A type isozyme subtypes, AS'S' and AMM.

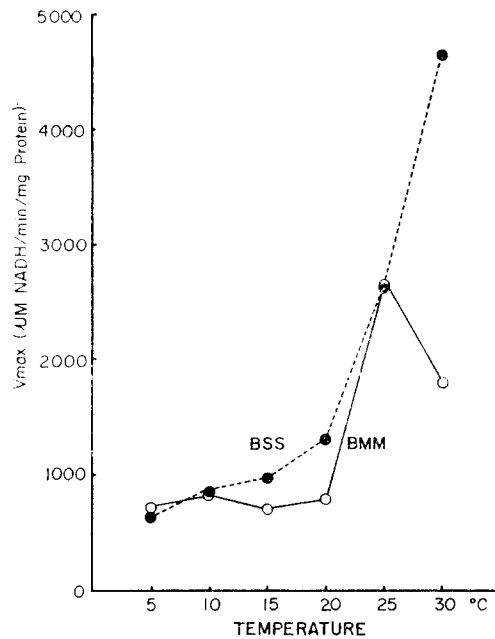


Fig. 7. The effect of reaction temperature on V_{max} for oxidative reaction of NADH of B type isozyme subtypes, BSS and BMM.

MDH의 경우에도 LDH와 마찬가지로 반응중심의 histidine 잔기가 조효소인 NADH와의 결합에 중요한 역할을 하고 있는 것(Foster and Harrison, 1974)으로 보아 상기 한 바와 같은 α -stat regulation이 중요한 의미를 가질 것으로 사료되며 따라서 이러한 현상을 고려한 buffer계를 선정하여 *in vivo*의 조건에 접근하고자 Somero(1981)에 의해 제안된 바 있는 80 mM imidazole-HCl buffer (pH7.0 at 25°C)계를 사용하였다.

선정된 buffer계에서의 온도변화에 따른 각 isozyme subtype의 V_{max} 및 K_m 값의 변화는 Table 1 및 Table 2와 같았고, 이를 도식화하면 Fig. 6, Fig. 7 및 Fig. 8에서 보는 바와 같았다.

본 실험에서 분리된 isozyme subtype의 V_{max} 값은 정제도에 따라 차이가 있을 것이므로 본 논문에서는 Q_{10} 값을 중심으로 논하고자 한다. 측정된 결과로부터 온도구간에 따라 산출된 Q_{10} 값은 Table 3과 같았고 이러한 Q_{10} 값의 isozyme subtype간의 차이를 도식화한 결과는 Table 4와 같았다.

Table 3에 의하면 A type isozyme의 subtype인 AS'S' 및 AMM의 경우 각각 5°C~30°C구간과 5°C~25°C구간에서 2.46 및 2.73으로 동일한 구간에서 BSS 및 BMM의 1.92 및 2.22보다 비교적 높은 Q_{10} 값을 나타내었으며, 이러한 차이를 정량화한 Table 4에서 보는 바와 같이 A형 subtype간의 차이(AS'S'-AMM) 또는 B형 subtype간의 차이(BSS-BMM)는 서로 다른 형의 sMDH로부터 유래된 subtype들간의 차이에 비하여 적은 것으로 나타났다. 이와 같은 결과로 보아 이들 두 type의 개체는 비록 동일한 종의 집단이라 할지라도 isozyme

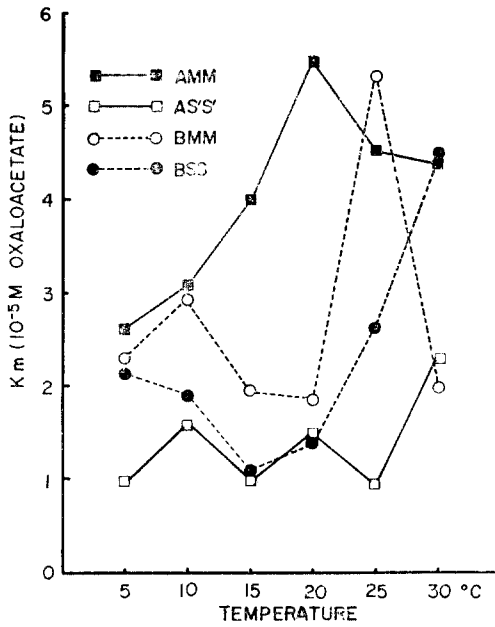


Fig. 8. The relationship between apparent K_m and reaction temperature for oxidative reaction of NADH of each isozyme subtypes, AS'S', AMM, BSS and BMM.

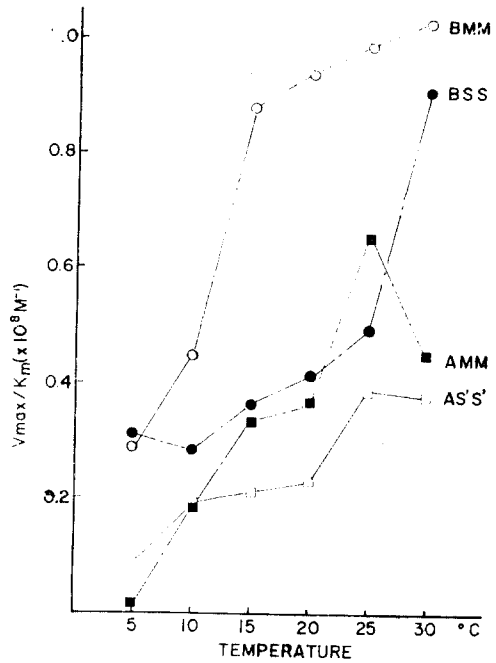


Fig. 9. The relationship between V_{max}/K_m value and reaction temperature for oxidative reaction of NADH of each isozyme subtypes, AS'S', AMM, BSS and BMM.

Table 4. Difference in Q_{10} of V_{max} and V_{max}/K_m for temperature range divided by 5°C among the isolated isozyme subtypes.

Q_{10} of V_{max}/K_m		Q_{10} of V_{max}			
		'A' Type		'B' Type	
		AMM	AS'S'	BMM	BSS
A type	AMM	—	1.36±0.74	2.26±1.33	2.98±3.43
	AS'S'	0.93±0.80	—	2.29±2.26	3.71±3.76
B Type	BMM	1.38±1.08	0.99±1.07	—	2.28±2.59
	BSS	1.65±1.35	1.82±1.06	1.31±0.92	—

The difference and standard deviation were calculated by the following formula;

$$D = \frac{\sum Xi - Y_i I}{N} \quad \text{and} \quad SD^2 = \frac{\sum Di^2 - D^2 I}{N}$$

subtype의 온도순응에 있어서 상이한 양상을 보여 주며, 이러한 차이가 이들 isozyme이 분포하는 지역의 기후상과 연관되는 것으로 추정된다.

한편 Powers and Place(1978) 및 Hoffman(1981) 등은 효소능의 변화를 실질적인 의미에서 고찰하고자 이에 대한 새로운 지수로서 V_{max}/K_m 값을 사용한 바 있으며, 이 값은 온도 상승등의 요인으로 인하여 V_{max} 값이 증가함에 따라 K_m 값도 증가하게 되므로 이를 보상하

여 세포내 유용기질의 농도 범위내에서의 반응속도의 증가를 나타내는 것이라 하겠다. 본 실험에서 얻어진 결과로 부터 산출된 V_{max}/K_m 값은 Fig. 9와 같고 온도변화에 따른 이 값의 차이를 V_{max} 와 동일한 방법으로 처리하여 isozyme subtype간의 차이를 비교한 것은 Table 4에서 보는 바와 같다. 이들 도표에 의하면 V_{max}/K_m 값에 있어서도 V_{max} 에서와 마찬가지로 이역집단에서 추출된 isozyme subtype간의 차이가 개체내에 공존하는 isozyme subtype간의 차이보다 평균적으로 크게 나타나는 것으로 보아 이는 전술한 바 있는 A type 및 B type의 두 isozyme형이 온도적응에 있어서 상이하다는 사실을 뒷받침하여 주는 것으로 생각된다.

한편 Table 3에서 5°C 간격으로 구획된 온도범위에서의 Q_{10} 값을 보면 B type의 경우 5°C ~ 20°C 구간에서 BSS 및 BMM이 각각 평균 1.59 및 1.44의 값을 가지나 20°C ~ 30°C 구간에서는 평균 3.57 및 11.24로서 높은 Q_{10} 값을 가지는 것으로 나타났으며, 이러한 현상은 A type isozyme subtype의 경우에서도 다른 온도구간에서 관찰되는 바, 10°C ~ 30°C (AMM의 경우에는 25°C) 구간에서 AS'S' 및 AMM이 각각 평균 1.85 및 2.11의 낮은 값을 갖는 반면에 5°C ~ 10°C 구간에서는 비교적 높은 7.68 및 5.94로 나타났다.

온도는 반응에 참가하는 분자종들의 운동성과 이들의 헤리분율등을 결정하므로써 효소반응속도에 영향을 미치게 되고 그 결과를 Q_{10} 값으로 표시하고 있으나, 본 실험의 경우에는 전술한 바와 같은 온도-pH관계를 통해 반응중심에 있는 잔기의 헤리분율을 일정하게 유지함으로써 Q_{10} 값이 내포하는 의미를 축소시켰다. Table 3에 의하면 각 isozyme subtype의 Q_{10} 값이 온도구간에 따라 큰 차이를 보여주고 있는 바 생체내 효소반응의 안정화요구를 고려한다면 낮은 Q_{10} 값을 갖는 온도범위에 적응된 것으로 추정할 수 있으며 또한 주변의 상호작용이 없는 상태의 정제된 효소가 이러한 특성을 나타내는 것으로 보아 이들 isozyme subtype이 분자수준에서 상이한 것으로 생각된다. 그러나 이와 같은 Q_{10} 값의 변화를 분자운동에 미치는 온도의 영향만으로 설명하기에는 난점이 있으며 따라서 온도변화에 의해 이들 효소에 있어서 구조적인 변화가 일어나 반응기작에 영향을 주는 것으로 생각된다.

한편 Table 1, Table 2에서 한 집단의 개체에서 추출되는 AS'S'-AMM 및 BMM-BSS isozyme subtype간의 K_m 값을 비교해 보면 평균 2.10 및 1.29의 t 값을 갖는 것으로 보아 서로 다른 것으로 생각되며 이는 sMDH isozyme subtype의 기관특이적 분포와 관련되는 것으로 사료된다.

이상의 결과를 종합하면 한국산 갈겨니 집단에서 나타나는 A type sMDH와 B type sMDH는 부분정제된 상태에서 온도변화에 대하여 상이하게 반응하는 것으로 보아 분자수준에서의 차이로 인해 온도순응양상이 달라지는 것으로 보이며 이는 이들 동위효소의 지리적 분포와 관련되는 것으로 생각된다. 한편 온도순응양상이 비교적 유사한 AS'S'-AMM간 및 BSS-BMM간에 유의할 정도의 K_m 값의 차이가 있는 것으로 보아 LDH, hexokinase등의 효소에서 보는 바와 같은 isozyme subtype의 기능적인 분담이 있을 것으로 추정된다.

적 요

한국산 1차 담수어인 갈겨니(*Zacco temmincki*)의 2개 집단으로 부터 얻은 sMDH 동위효소(A, B형)에 대하여 온도 변화에 따른 효소 반응성의 차이를 비교검토하였다. 온도변화에 따른 sMDH 동위효소 반응성의 변화를 측정 V_{max} 및 V_{max}/K_m 값에 대한 Q_{10} 값을 산출한

결과 일반적으로 A형 동위효소가 B형 동위효소 보다 높은 Q_{10} 값을 나타내어 A형 동위효소가 B형에 비하여 온도변화에 더 민감하게 반응하는 것으로 생각되었다.

REFERENCES

- Bailey, G.S., A.C. Wilson, J.E. Halver and C.L. Johnson, 1970. Multiple Forms of Supernatant Malate Dehydrogenase in Salmonid Fishes. *J. Biol. Chem.* **245**, 5927-5940.
- Baldwin, J., 1971. Adaptation of Enzymes to Temperature; Acetylcholinesterases in the Central Nervous System of Fishes. *Comp. Biochem. Physiol.* **40**, 181-187.
- Bradford, M.M., 1976. A Rapid Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Foster, M. and J.H. Harrison, 1974. Characterization of Porcine Malate Dehydrogenase; II. Amino Acid Sequence of a Peptide Containing the Active Center Histidine Residue. *Biochem. Biophys. Acta.* **351**, 295-300.
- Graves, J.E. and G.N. Somero, 1982. Electrophoretic and Functional enzymic Evolution in Four Species of Eastern Pacific Barracudas from Different Thermal Environment. *Evolution* **36**, 97-106.
- Hedrick, P.W., M.E. Givevan and E.P. Ewing, 1976. Genetic Polymorphism in Heterogeneous Environments. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* **7**, 1-32.
- Hoffmann, R.J., 1981. Evolutionary Genetics of *Metridium Senile*. *Biochem. Genetics* **19**, 129-154.
- Howell, B.J., F.W. Baumgardner, K. Bondi and H. Rahn, 1970. Acid-Base Balance in Cold-Blooded Vertebrates as a Function of Body Temperature. *Am. J. Physiol.* **218**, 600-606.
- Kimura, M. and T. Ohta, 1971. Protein Polymorphism as a phase of molecular Evolution. *Nature* **229**, 467-469.
- Malpica, J.M. and J.M. Vasallo, 1980. A test for the Selective Origin of Environmentally Correlated Allozyme Patterns. *Nature* **286**, 407-408.
- Merritt, R.B., 1972. Geographic Distribution and Enzymatic Properties of Lactate Dehydrogenase Allozymes in the Fathead Minnow, *Pimephace promelas*. *Amer. Nat.* **196**, 173-184.
- Philipp, D.P., W.P. Childers and G.S. Whitt, 1979. Evolution of Patterns of Differential Gene Expression; A Comparison of the Temporal and Spatial Patterns of Isozyme Locus Expression in Two Closely Related Fish Species (Northern Largemouth Bass, *Micropterus salmoides salmoides*, and Smallmouth Bass, *Micropterus dolomieu*). *J. Exp. Zool.* **210**, 473-487.
- Powers, D.A. and A.R. Place, 1978. Biochemical Genetics of *Fundulus heteroclitus*(L.). I. Temporal and Spatial Variation in Gene Frequencies of *Ldh-B*, *Mdh-A*, *Pgi-B*, and *Pgm-A*. *Biochem. Genetics* **16**, 593-607.
- Place, A.R. and D.A. Powers, 1979. Genetic Variation and Relative Catalytic efficiencies; Lactate Dehydrogenase B Allozymes of *Fundulus heteroclitus*. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* **76**, 2354-2358.
- Reeves, R.B., 1969. Role of Body Temperature in Determining the Acid-Base State in Vertebrates. *Federation Proceedings* **28**, 1204-1208.
- Selander, R.K., M.H. Smith, S.Y. Yang, W.E. Johnson and J.B. Gentry, 1971. Biochemical Polymorphism and Systematics in the Genus *Peromyscus*. I. Variation in the Old-field Mouse (*Peromyscus*

- myscus polionotus*). In; Studies in Genetics VI. Univ. of Texas Publ. 7103, Feb., pp.49-90.
- Sigma Chem. Co., 1984. Nondenatured Protein Molecular Weight Marker kit. Technical Bulletin No. MKR-137. Sigma Chem. Co. USA; 2-4.
- Somero, G.N., 1981. pH-temperature Interactions on Proteins; Principles of Optimal pH and Buffer System Design. *Marine Biology Letters* 2, 163-178.
- Starzyk, R.M. and R.B. Merritt, 1980. Malate Dehydrogenase Isozymes in the Longnose Dace, *Rhinichthys cataractae*. *Biochem. Genetics* 18, 755-764.
- Thomson, S.T., K.H. Cass and E. Stellwagen, 1975. Blue Dextran-Sepharose; An Affinity Column for the Dinucleotide Fold in Proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72, 669-672.
- Wilson, J.E., 1976. Applications of Blue Dextran and Cibacron Blue F3GA in Purification and Structural Studies of Nucleotide-Requiring Enzymes. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 72, 816-823.
- Wright, I.P. and T.K. Sundaram, 1979. Simple Efficient Methods for the Isolation of Malate Dehydrogenase from Thermophilic and Mesophilic Bacteria. *Biochem. J.* 177, 441-448.
- 양서영, 민미숙, 김영진, 1987. 갈겨니 (*Zacco temmincki*)의 進化에 관한 研究 I. 갈겨니 2형의 지리적 분포 및 계절적 변이에 관하여. 한국 동물학회지(십사증).