

## 갑상선 기능 변화와 적혈구내 Trimethyllysine

김인숙 · 박선미 · 이향우\*

성균관 대학교 약학대학

### Trimethyllysine in RBC of the Experimentally Induced Hyper- and Hypo-Thyroid Rats

In Sook KIM, Sun Mee PARK, Hyang Woo LEE\*

College of Pharmacy, Sung Kyun Kwan University, Suwon 440-746, Korea

(Received February 20, 1993; accepted March 5, 1993)

**Abstract**—Trimethyllysine(TML) is *in vivo* released when the methylated proteins are subjected to metabolic breakdown and may serve as a precursor for the biosynthesis of carnitine. It was also demonstrated that high concentration of free TML was observed in red blood cell. Therefore, in order to study the functions of TML in RBC we determined the concentration of TML and carnitine in RBC of hyperthyroid and hypothyroid rats and the following results were observed. 1) In hyperthyroid rats, the concentrations of TML, free carnitine and acylcarnitine in RBC were increased. 2) In hypothyroid rats, the concentrations of TML and acylcarnitine were increased but free carnitine was sharply decreased. 3) In diabetic rats, TML and free carnitine both were inclined to decrease, but not significant statistically. 4) In fasting rats, TML was not changed but free carnitine was sharply decreased. These results suggest that TML in RBC is not directly related to biosynthesis of carnitine.

**Keywords** □ trimethyllysine, hyperthyroidism, hypothyroidism.

Protein methylation은 Protein methylases의 작용으로 S-adenosyl-L-methionine (AdoMet)을 methyl donor로 하여 단백질내 arginine, glutamic acid, lysine 및 histidine 등의 잔기가 메틸화 됨으로써 그 단백질의 구조와 기능에 변화를 일으키는 posttranslational modification의 일종으로 procaryote에서 eucaryote에 이르는 다양한 cell type에서 일어나며, 박테리아의 chemotaxis (Ambler와 Rees, 1959 ; Macnab, 1987 ; Clarke와 Koshland, 1979), 신경세포의 myelination(Carnegie, 1971a ; Eylar, 1970 ; Campagnoni, 1988 ; Carnegie, 1971), exocytosis(Diliberto와 Axelrod, 1974 ; Edgar와 Hope, 1976), muscle contraction(Trayer 등, 1968) 및 유전인자 조절 현상(Tidwell 등, 1968 ; McGhee와 Felsenfeld, 1980 ; Lee 등, 1973 ; Duerre와 Onisk, 1985) 등에 관여하는 것으로 보고되어 있으나 아직 생화학적 의미는 명확히 규명되어 있지않다.

이 반응에 관여하는 enzyme에는 Protein methylase

I, II, III, IV가 있고 이들의 작용에 의해 lysine, arginine 및 histidine 등은 N-methylation되어 monomethyllysine, dimethyllysine, trimethyllysine, monomethylarginine, dimethylarginine 및 3-methylhistidine 등 다양한 종류의 methylated amino acids가 생성되며 histone, calmodulin, myosin, actin, opsin, flagella protein, cytochrome c, ribosomal protein 등 많은 단백질에서 발견되고 있다.

Free methylated amino acids는 메틸화된 단백질이 생체내에서 turnover mechanism에 의해 가수분해될 때 유리되는데, 대부분은 단백질 합성에 다시 사용되지 않고 순환계를 거쳐 체외로 배설되나(Paik과 Kim, 1980 ; Young과 Munro, 1978) 일부 mono- 및 dimethyllysine은  $\epsilon$ -alkyllysinease에 의해 lysine이 재생되어 단백질 합성에 다시 이용되기도 한다(Eylar, 1970). Trimethyllysine (TML)은 mitochondrial hydroxylase의 작용받아 trimethylammoniumbutyrate가 되어 carnitine 생합성에 관여하는 것으로 밝혀졌다(LaBadie 등, 1976 ; Cox와 Hoppel, 1973 ; Tanphaichitr와 Broquist, 1973 ; Hulse와 Henderson, 1980). 또한 free methylated amino acids는 단지

\* To whom correspondence should be addressed.

뇨에만 고농도로 존재하는 것으로 알려졌으나, 최근 Mizobuchi 등(Mizobuchi 등, 1990)이 흰쥐 적혈구가 다른 조직에 비해 약 10배 이상 높은 농도의 TML을 함유하고 있음을 밝혀 erythrocyte에서 TML이 어떤 기능을 갖고 있음을 시사하였다.

이에 본실험에서는 체내 대사 변화에 따른 TML의 변화와 carnitine의 변화를 측정하여 고농도로 존재하는 적혈구내 TML의 생화학적 의미와 기능을 규명하고 대사질환에 대한 임상적 응용 여부를 알아보려고 하였다.

## 실험방법

### 기기 및 시약

Trimethyllysine dioxalate(Hoechst, Germany), L-carnitine(Sigma, USA), triiodothyronine(Sigma, USA), propylthiouracil(PTU NIH, Korea), Phenylisothiocyanate (PITC 동경화성, Japan), acetyl-CoA sodium salt(95%, Sigma, USA), [ $I^{14}C$ ]acetyl-CoA(53.2 mCi/mmol, Amersham, USA), carnitine acetyltransferase(SA 80 U/mg, Sigma, USA), Dowex 50×8(200~400 mesh, Sigma, USA), Dowex 2×8(200~400 mesh, Sigma, USA)와 기타 시약은 시판 HPLC용 혹은 특급 시약을 사용하였다.

기기로는 HPLC(Spectra physics, SP 8800), Triiodothyronine assay kit(Abbott Diagnostic Co. Cicago III, USA), Liquid Scintillation Counter(1211 Rackbeta, LKB, USA), Gamma counter(Abbott Diagnostic Co. USA), Microcentrifuge(한일, Korea), UV-VIS Spectrophotometer(Varian, USA) 등을 사용하였다.

### 실험동물

Sprague-Dawley계 체중 150~200g의 흰쥐를 1주 이상 동물실에서 사육하여 환경에 적응시킨 다음 실험에 사용하였다. 실험 기간 중 사료는 조단백이 20.2% 이상이며 조지방이 3.0% 이상, 조회분 10.0%, 칼슘 0.6%, 인이 0.4% 함유된 시판 혼합 사료를 사용하였다.

### 갑상선 기능 변화

갑상선 기능 항진군은 saline 0.1 ml에  $T_3$ (triiodothyronine) 20  $\mu$ g을 녹여 체중 100g당 0.1 ml를 1주 및 2주동안 자성 흰쥐에 매일 복강 주사하였으며 대조군은 saline을 투여하였다. 갑상선 기능 저하군은 0.1% propylthiouracil을 음수로 하여 1주 및 2주간 음성 흰쥐에 투여하였으며 대조군은 상수를 사용하였다. 갑상선 기능 항진 및 저하의 확인은 혈장을 취해 radioimmuno assay를 실시하여  $T_3$  level을 측정하였다.

### 당뇨 유도

Alloxan을 생리식염수에 60 mg/ml로 조제하여 흰쥐 체중 100g당 6 mg을 꼬리 정맥에 주사하였고, 대조군은 생리식염수만을 동량 투여하였다. 당뇨 유도여부는 plasma glucose를 측정하여 확인하였다.

### 단식

동물실에서 조명이 켜진 후 2시간 내에 단식을 시작하였으며 단식 쥐들은 각각 wire-bottom cage에서 음용수만을 공급하였고 기간은 3일, 5일 및 7일간 실시하였다.

### 채혈 및 적혈구 분리

복부 대동맥에서 채혈한 혈액은 heparin처리된 시험관에 담아 즉시 ice box에 넣고 1500g에서 15분간 원심한 후 plasma는  $T_3$  혹은 혈당 측정에 사용하기 위해 분리하고 buffy coat는 aspiration에 의해 제거시킨 다음 냉식염수로 씻어준 후 1500g에서 3분간 다시 원심분리하여 적혈구를 얻었다. 이것을 일정량 취하여 동량에 증류수를 넣고 냉동과 해동을 3번 반복하여 혈구를 파괴한 뒤 시료로 하였다.

### 갑상선 호르몬 측정

측정 방법은 radioimmuno assay법을 이용하였다.

시험관에 측정하고자 하는 항원( $T_3$ )이 들어있는 혈장 50  $\mu$ l와 검량선을 작성하기 위한  $T_3$ 표준액(25~800 ng/dl) 여러 농도를 50  $\mu$ l씩 각각 취한 후 각 시험관에 200  $\mu$ l  $^{125}I$ - $T_3$  reagent를 가하고 잘 혼합한다. 동시에 각 시험관에  $T_3$ -antibody coated bead를 넣고 190 rpm으로 진탕하면서 60분간 반응 시킨다. 상등액을 제거하고 얹어 놓은 상태로 3~5분간 방치하여 건조한 다음 이것을  $\gamma$ -counter에서 1분간 방사능을 측정하여 검량선을 작성한 다음 시료 안의  $T_3$  농도에 따라 측정된 cpm을 검량선과 비교하여 혈장내  $T_3$  농도를 측정하였다.

### 혈당 측정

상기 방법에 따라 얻어진 혈장에서 Somogyi-Nelson법(Somogyi, 1945)을 사용하여 혈당을 측정하였다.

### Hemoglobin 측정

적혈구를 lysis시킨 후 spectrophotometric cyanmethemoglobin법(Drabkin과 Austin, 1932)에 의해 측정하였다.

### Trimethyllysine 정량

Lehman 등(Rebouche 등, 1986)의 방법에 따라 얻어진 시료에 냉 12%  $HClO_4$  250  $\mu$ l를 가하여 제단백하고 2M- $KHCO_3$  250  $\mu$ l를 가하여 중화시킨 다음 양이온 교환 컬럼(0.8 cm×4 cm, Dowex 50W,  $NH_4^+$  form)을 통과시켜 중성 및 산성의 아미노산을 제거한 후 1 M-ammonia water 15 ml로 용출시켰다. 이때 처음 용출되는 1 ml은 버리고 나머지 용출액을 받아 50°C 수욕상에서 갑압 농축하여 염기성 아미노산 분획으로 하였다.

염기성 아미노산 분획의 증발 잔류물에 물 500  $\mu$ l를 가하여 용해시킨 후 이 중 400  $\mu$ l를 취하여 재건고하였다. 이 잔류물에 ethanol : water : TEA(2 : 2 : 1)혼액 100  $\mu$ l를 가하여 50°C에서 갑압 농축시켜 액성을 변화시킨 다음 유도체화 시액(ethanol : TEA : water : PITC=7 : 1 : 1 : 1) 50  $\mu$ l를 가하고 마개를 씌운 후 실온에서 20분간 반응시켰다. 과잉의 미반응 시액은 50°C에서 갑압 농축하여 제거하고 잔류물을 acetonitrile : water(2 : 7)혼액 100  $\mu$ l에 용해하여 이 중 10  $\mu$ l를 HPLC에 적용하

였다.

**HPLC에 의한 분리 정량**

HPLC는 Spectra Physics SP 8800, ternary HPLC pump를 사용하였다. 고정상으로는 Resolve 5 C<sup>18</sup>(3.9×300 mm, 5 μm)를 사용하였고 이동상으로 A액은 Milli-Q water 1 L당 500 μl의 TEA를 함유한 0.14 M-sodium acetate를 조제한 후 인산으로 pH 6.4로 맞추고 acetonitrile이 6%(v/v)가 되도록 조제하였다. B액은 60% acetonitrile을 사용하였다. 유속은 1.0 ml/min로 하였으며 gradient program은 Young의 방법(Young와 Grynspan, 1987)을 변형시켜, 0분, 100% A~0% B; 14분, 70% A~30% B; 16.5분, 70% A~30% B(isocratic); 17.3분, 54% A~46% B; 18.0분, 54% A~46% B(isocratic); 20.7분, 0% A~100% B; 22.0분, 0% A~100% B(isocratic); 24.7분, 100% A~0% B; 30분, 100% A~0% B(isocratic)로 하였다.

**Carnitine 정량**

Carnitine 정량은 Cederblad 등(Cederblad와 Lindstardt, 1972)과 Perlman 등(Mares-Perlman 등 1986)의 방법에 따랐다. A액은 4 μM의 [1-<sup>14</sup>C] acetyl Co-A로 0.2 μCi/mmol의 radiospecific activity를 갖고 B액은 0.1 mM의 acetyl Co-A로 조제하였으며 이 A액 및 B액은 -20°C에서 보관 하였다. C액은 1 M-potassium phosphate buffer(pH 6.5)이다. 사용하기 직전에 A액 : B액 : C액의 용량들을 2 : 1 : 1로 혼합하여 이를 incubation mixture로 하고 ice bath에 보관한다. 유리 carnitine 정량은 lysis시킨 적혈구에 0.6 N-HClO<sub>4</sub>를 가해 제단백한 후 4 N-KOH로 중화시키고 이것을 4°C에서 하룻밤 방치한 다음 원심 분리하여 맑은 상당액을 시료로 하였다.

Polystyrene tube(56×6 mm)에 incubation mixture 100 μl를 넣고 시료 100 μl 혹은 표준액 100 μl를 가하여 3분간 preincubation한 다음 1 unit의 carnitine acetyltransferase 20 μl를 가한 후 37°C에서 30분간 배양한다. Dowex 2×8(Cl<sup>-</sup> form)을 10 mg 가해 진탕하여 반응을 종결시킨 후 ice bath에 넣어 10분간 방치하고 이 과정을 2번 반복한다. 다음 10,000 rpm에서 5분간 원심분리하며 그 상등액을 100 μl 취하여 scintillation fluid 5 ml를 넣은 vial에 넣어 진탕시키고 liquid scintillation spectrometer에서 측정한다. 적혈구내 carnitine 농도는 hemoglobin 농도에 대해서 나타냈다.

총 carnitine의 정량은 lysis시킨 적혈구 200 μl에 4 N-KOH 25 μl를 가하여 50°C에서 30분간 배양한 후 0.6 N-HClO<sub>4</sub>를 3배 용량넣어 제단백한 다음 상기에 유리 carnitine 정량과 같은 방법으로 시행하였다. Acylcarnitine은 총 carnitine량과 유리 carnitine량의 차로 구하였다.

**실험결과**

**갑상선 기능 항진에 따른 변화**

갑상선 기능 항진증이 유도된 쥐의 적혈구내 TML농도는 Table I에서 보는 바와 같이 대조군에 비해 T<sub>3</sub>를 1주간 투여한 군의 경우 36.32±4.10 nmol/g에서 49.47±6.18 nmol/g으로 136%의 유의한 증가를 나타냈고 2주간 투여군에서는 대조군과 유사하였다. 그러나 유리 carnitine은 대조군 보다 2주간 T<sub>3</sub>투여군이 134.8%로 유의한 증가함을 보였다. 또한 total carnitine의 농도도 65.48±3.16 pmol/mg Hb에서 107.82±5.80 pmol/mg Hb로 164.7%의 큰 증가를 나타냈는데 이는 acylcarnitine의 증가에

**Table I.** Changes of TML concentration in RBC of the normal and hyperthyroid rats

group	T <sub>3</sub> (ng/dl)	TML(nmol/g)
contol	91.61±8.03	36.32±1.30
7 days after <sup>a</sup>	more than 500	49.47±1.78*
14 days after <sup>a</sup>	more than 500	41.12±2.85

Values are mean±S.E. n=10.  
Statistical significance; \*p<0.001.  
<sup>a</sup> after first injection of T<sub>3</sub>.

**Table III.** Changes of TML concentration in RBC of the normal and hypothyroid rats

group	T <sub>3</sub> (ng/dl)	TML(nmol/g)
contol	100.19±0.56	46.43±2.39
7 days after <sup>a</sup>	less than 40	45.02±3.42
14 days after <sup>a</sup>	less than 40	52.62±2.71

Values are mean±S.E. n=10.  
<sup>a</sup> after first administration of propylthiouracil(PTU).

**Table II.** Changes of free, total and acylcarnitine concentrations in RBC of the normal and hyperthyroid rats

group	free carnitine (pmol/mg Hb)	total carnitine (pmol/mg Hb)	acylcarnitine (pmol/mg Hb)	ac <sup>a</sup> yl/free carnitine
control	28.19±2.68	65.48±3.16	37.16±2.83	1.32
7 days after <sup>a</sup>	33.12±1.94	73.63±5.04	38.88±5.47	1.17
14 days after <sup>a</sup>	38.00±3.58*	107.82±5.80**	76.65±3.81**	2.02

Values are mean±S.E. n=10.  
Statistical significance; \*p<0.05, \*\*p<0.001.  
<sup>a</sup> after first injection of T<sub>3</sub>.

**Table IV.** Changes of free, total and acylcarnitine concentrations in RBC of the normal and hypothyroid rats

group	free carnitine (pmol/mg Hb)	total carnitine (pmol/mg Hb)	acylcarnitine (pmol/mg Hb)	acyl/free carnitine
control	61.18± 3.42	87.28± 2.54	22.29± 2.05	0.36
7 days after <sup>a</sup>	53.10± 2.29	78.05± 3.41	21.85± 1.27	0.41
14 days after <sup>a</sup>	48.41± 3.43*	84.61± 6.08	36.75± 2.06**	0.76

Values are mean± S.E. n=10.

Statistical significance; \*p<0.05, \*\*p<0.01.

<sup>a</sup> after first injection of PTU.

**Table V.** The concentrations of TML and carnitine in RBC of the normal and diabetic rats

group	plasma glucose (mg/dl)	TML (nmol/g)	free carnitine (pmol/mg Hb)
control	94.10± 29.20	35.43± 3.77	51.14± 3.45
diabetes	406.00± 59.90	31.29± 3.57	45.85± 4.27

Values are mean± S.E. n=10.

**Table VI.** Changes of TML and carnitine concentration in RBC of the normal and fasting rats

group	loss of body wt. (%)	TML (nmol/g)	free carnitine (pmol/mg Hb)
control	113.40± 0.65	40.55± 2.63	53.04± 3.67
3 days	81.00± 1.04	36.81± 2.11	ND
5 days	74.60± 3.02	45.00± 2.36	42.27± 2.33*
7 days	66.50± 0.74	34.70± 2.70	21.20± 1.33**

Values are mean± S.E. n=10.

Statistical significance; \*p<0.05, \*\*p<0.01.

ND; not detected.

기인한 것으로 보인다(Table II).

#### 갑상선 기능 저하에 따른 변화

PTU에 의한 갑상선 기능 저하시 TML 및 carnitine의 변화는 Table III에서 보는 바와 같이 대조군에 비해 TML이 증가하는 경향을 보였으나 통계학적 유의성은 없었다. Carnitine의 경우에는 유리 carnitine량은 대조군의 79.1%로 유의한 감소를 나타내었으나, 총 carnitine량은 큰 변화를 나타내지 않았다. 이는 acylcarnitine량이 22.29± 2.05 pmol/mg Hb에서 36.75± 2.06 pmol/mg Hb으로 증가되었기 때문으로 생각된다(Table IV).

#### 당뇨병이 유도된 상태에서의 변화

Alloxan에 의한 당뇨병 유도시의 TML 및 carnitine 농도 변화는 Table V에서 보는 바와 같이 대조군에 비해 TML은 88.3%, carnitine의 경우는 89.7%로 감소하는 경향을 보였으나 통계학적 유의성은 없었다.

#### 단식시킨 상태에서의 변화

단식시킨 쥐에서의 TML 및 carnitine 변화는 Table VI에서 보는 바와 같이 대조군에 비해 TML은 단식에

**Table VII.** Changes of TML concentrations in RBC of growing rats

days after birth	TML(nmol/g)
3 days	23.08± 2.47
10 days	23.28± 2.53
3 weeks	38.43± 2.80*
5 weeks	35.94± 3.55*
adult	40.80± 3.18*

Values are mean± S.E. n=10.

Statistical significance; \*p<0.05.

다른 큰 변화를 나타내지 않았으나 carnitine은 이와는 달리 5일간은 약 80%, 7일간의 경우는 40%로 현저한 감소를 나타냈다.

#### 성장 발육에 따른 변화

흰쥐를 출생한 날로부터 3일, 10일, 3주 및 5주 후 TML의 농도 변화는 Table VII에서 보는 바와 같이 10 일째까지는 낮은 농도로 존재하나 3주째 부터는 성장한 쥐의 함량과 유사하였다.

## 고 찰

Trimethyllysine은 Protein methylase III에 의해 특정부위의 peptide-linked lysine 잔기에 methylation이 일어나 생성되는 물질로 histone, myosine 등 많은 단백질에서 발견되었다. 이 메틸화된 단백질은 체내 대사를 받아 가수분해 될 때 유리되어 plasma와 urine에서 발견된다. 일단 유리된 TML은 다른 methylated lysines와는 달리 dealkylase의 작용을 받지 않고 protein합성에도 재사용되지 않으나 지방산의 mitochondrial  $\beta$ -oxidation에 관여하는 carnitine의 생합성 경로로 들어가 carnitine의 전구물질로 사용된다고 보고되어 있다(Labadie 등, 1976; Tanphaichitr과 Broquist, 1973; Rebouche 등, 1986; Sachan과 Hoppel, 1980; Uchigawa 등, 1982).

본 실험에서는 Young 등의 방법에 따라 염기성 아미노산류 및 그 유도체들을 PTC-유도체화 하여 TML를 분리 정량하였다. 이 방법에 따라 정상쥐의 혈구로부터 얻은 TML의 양은 40.80± 3.18 nmol/g으로 이는 Mizobuchi(Mizobuchi 등, 1990)가 보고한 쥐 혈구중 TML이

69±5 nmol/g인 것보다는 낮은 농도이었다. 그러나 그의 보고에 의하면 animal species에 따라 2~79 nmol/g으로 큰 차이가 있는 바 이는 분석 방법 및 rat의 종에 따른 차이일 것으로 추측된다.

정상 쥐의 적혈구내 TML이 36.32±1.30 nmol/g에서 T<sub>3</sub>를 1주간 투여하여 갑상선 기능을 항진시킨 군에서는 49.47±1.78 nmol/g으로 136%의 현저한 증가를 보인 것은 Choi 등(Choi 등, 1989)이 serum중에서 TML이 갑상선 기능 항진시 188.9%의 증가를 보인 것과 유사한 결과를 얻었다. 이는 갑상선 호르몬의 영향을 받아 적혈구 및 혈장내 TML이 증가한 것으로 사료된다. 한편 PTU를 투여한 갑상선 기능 저하군에서는 적혈구내 TML이 유의성있는 변화를 보이지 않아 갑상선 기능 저하시 serum내 TML이 50%의 감소를 나타낸다고 보고한 Choi 등과는 달리 상이한 결과를 얻었다. 이러한 결과로 볼 때 적혈구내 TML은 갑상선 호르몬의 영향을 받아 갑상선 기능 항진에 따른 변화를 나타내나 TML은 혈액중 적혈구에 90%이상 존재하므로 그 일부가 적혈구막을 통해 유리되어 혈장내의 농도를 증가시키는 것인지 아니면 적혈구내 TML과 혈장내 TML의 농도는 서로 직접 관여 하지않고 TML source가 서로 다른 것인지는 아직 분명치 않다.

갑상선 기능 항진시 적혈구내의 유리 carnitine 농도는 28.19±2.68 pmol/mg Hb에서 38.00±3.58 pmol/mg Hb로의 증가를 보였고 총 carnitine의 양도 갑상선 기능 항진시 164.7% 까지 상승하였다. 이러한 증가는 유리 carnitine에 대한 acylcarnitine의 비율이 1.32에서 2.02로의 상승을 보여 유리 carnitine의 증가보다 acylcarnitine이 현저하게 증가 하였음을 나타내고 있다. 또한 갑상선 기능 저하시 유리 carnitine 농도는 61.18±3.42에서 48.41±3.43 pmol/mg Hb로 현저한 감소를 나타내었고 총 carnitine의 양은 큰 변화를 보이지 않았으나 유리 carnitine에 대한 acylcarnitine의 비율이 0.36에서 0.76으로 증가하여 acylcarnitine이 증가 하였음을 나타냈다. 이는 갑상선 호르몬에 의한 영향으로 적혈구내 carnitine에 대한 변화를 가져온 것으로 보인다.

당뇨 유발시 적혈구내 TML은 35.43±3.77에서 31.29±3.57 nmol/g으로 약 12% 감소하는 경향을 나타내어 Shin 등(Shin과 Lee, 1989)이 당뇨 유발시 혈청내 TML이 약 3배이상 증가하였다고 보고한 것과는 다른 결과를 얻었다. 이는 체단백의 분해에 따라 혈액내로 유입되어 혈청내 TML 농도가 증가되었으나 적혈구로의 유입은 일어나지 않은 것으로 사료된다.

TML은 체단백 또는 외부로 부터 섭취된 단백질이 분해되어 생성될 수 있지만 단식한 경우는 체단백만이 TML원이 되므로 Davis 등(davis와 Hoppel, 1986)은 흰 쥐를 단식시켜 조직, 뇨 및 혈액중의 TML 농도 변화를 검색하여 본 바 뇨 중의 유리 TML은 유의하게 감소하였고 혈장의 유리 TML은 유의한 증가를 보였으며 유리

TML 및 peptide linked TML을 가장 많이 보유한 골격근의 경우는 큰 변화를 보이지 않았는데 이는 체내 TML의 농도가 일정하게 유지되는 것으로 추측하였다. 본 실험에서도 단식시킨 group에서 적혈구내 TML은 큰 변화를 보이지 않아 적혈구내 TML은 체내 대사에 의한 직접적인 영향은 받지않는 것으로 사료된다. 그러나 단식 group에서 적혈구내 유리 carnitine은 현저한 감소를 나타내어 Brass 등(Brass와 Hoppel, 1978)의 단식시킨 쥐에서 혈장 carnitine 농도가 현저하게 감소하였음을 보고한 것과 같이 단식중 체내 대사 변화는 적혈구내 carnitine에도 직접적인 영향을 미치는 것으로 추측되었다.

적혈구내 TML이 다른 조직에 비해 많은 농도로 존재하나 이들이 직접 carnitine 생합성에 이용되지는 않을 것으로 추측되나 이들 TML의 세포내 분포, 이동 및 대사에 대해 더 연구하면 적혈구내 TML의 기능을 규명할 수 있으리라 사료된다.

## 결 론

Methylated protein의 체내 대사에 의해 유리되어 carnitine의 전구물질로 사용되는 trimethyllysine(TML)이 erythrocyte에서 높은 농도로 존재함에 따라 이들의 생화학적 의미를 밝히고자 그 일환으로 갑상선 기능 변화, 당뇨병 유도, 단식 상태 및 age에 따른 erythrocyte내에서의 TML과 carnitine의 농도 변화를 검색하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. T<sub>3</sub>(triiodothyroine)를 투여하여 갑상선 기능 항진시킨 흰쥐의 적혈구내 TML, 유리 carnitine 및 acylcarnitine은 모두 증가하였으며 유리 carnitine에 대한 acylcarnitine의 비율은 1.32에서 2.02로 상승하여 acylcarnitine의 농도가 유리 carnitine보다 더 큰 증가를 나타내었다.

2. PTU(propylthiouracil) 투여에 의한 갑상선 기능 저하시 TML은 유의성 있는 변화를 보이지 않았으나 유리 carnitine은 현저한 감소를 나타냈고 acylcarnitine은 증가하였다.

3. Alloxan으로 당뇨 유도시 적혈구내 TML 및 유리 carnitine은 모두 감소하는 경향을 나타내었고 단식시킨 경우 TML은 큰 변화를 보이지 않았으나 유리 carnitine은 현저한 감소를 나타내었다.

4. 성장에 따라 TML의 농도는 점차 증가하였고 생후 3주 이 후는 성장한 쥐의 농도와 유사하였다.

## 참고문헌

- Ambler, R.P. and Ress, M.W. (1959).  $\epsilon$ -N-Methyllysine in bacterial flagella protein, *Nature*(London) **184**, 56.  
Brass, E.P. and Hoppel, C.L. (1978). Carnitine metabolism

- in the fasting rats, *J. Biol. Chem.* **253**, 2688.
- Campagnoni, A.T. (1988). Molecular biology of myelin proteins from the central nervous system, *J. Neurochem.* **51**, 1.
- Carnegie, P.R. (1971). Amino acid sequence of the encephalitogenic basic protein from human myelin, *Biochem. J.* **123**, 57.
- Carnegie, P.R. (1971). Properties, structure and possible neuroreceptor role of the encephalitogenic protein of human brain, *Nature* **229**, 25.
- Cederblad, G. and Lindstedt, S. (1972). The method for the determination of carnitine in the picomole range, *Clin. Chim. Acta.* **37**, 235.
- Choi, W.S., Hong, S.Y. and Lee, H.W. (1989). Methylated basic amino acids in serum of the experimentally induced hyper- and hypo thyroid rats, *Sungkyun Pharm. J.* **1**, 37.
- Clarke, S. and Koshland, D.E. Jr. (1979). Membrane receptors for aspartate and serine in bacterial chemotaxis, *J. Biol. Chem.* **254**, 9695.
- Cox, R.A. and Hoppel, C.L. (1973). Carnitine biosynthesis from trimethyllysine, *Biochem. J.* **136**, 1083.
- Davis, A.T. and Hoppel, C.L. (1986). Tissue trimethyllysine biosynthesis and carnitine content in pregnant and lactating rats fed a lysine limiting diet, *J. Nutr.* **116**, 760.
- Diliberto, E.J. Jr., and Axelrod, J. (1974). Characterization and substrate specificity of a protein carboxymethylase in the pituitary gland, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **71**, 1701.
- Drabkin, D.L. and Austin J.H. (1932). Spectrophotometric studies: II. preparations from washed blood cells; nitric oxide hemoglobin and sulfhemoglobin, *J. Biol. Chem.* **112**, 51.
- Duerre, J.A. and Onisk, D.V. (1985). Specificity of the histone lysine methyltransferases from rat brain chromatin, *Biochem. Biophys. Acta.* **843**, 58.
- Edgar, D.H. and Hope, D.B. (1976). Protein carboxymethyltransferase of the bovine posterior pituitary gland: neurophysin as a potential endogenous substrate, *J. Neurochem.* **27**, 949.
- Eylar, E.H. (1970). Amino acid sequence of the basic protein of the myelin membrane, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **67**, 1425.
- Hulse, J.D. and Hendeson, L.M. (1980). Carnitine biosynthesis: Purification of 4-N-trimethylaminobutyraldehyde dehydrogenase from beef liver, *J. Biol. Chem.* **255**, 1146.
- LaBadie, J., Dunn, W.A. and Aronson, N.N. (1976). Hepatic synthesis of carnitine from protein-bound trimethyllysine: lysosomal digestion of methyllysine labelled asialo-fetuin, *Biochem. J.* **160**, 85.
- Lee, H.W., Paik, W.K. and Borun, T.W. (1973). The periodic synthesis of S-adenosyl methionine: protein methyltransferases during the HeLa S-3 cell cycle, *J. Biol. Chem.* **248**, 4194.
- Macnab, R.N. (1987). Motility and Chemotaxis, In *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Vol. 1, (F.C. Neidhardt, Ed.), American Society for Microbiology p. 732.
- Mares-Perlman, J.A. Farrell, P.M. and Gutcher, G.R. (1986). Changes in erythrocyte and plasma carnitine concentrations in preterm neonates, *Am. J. Clin. Nutr.* **43**, 77.
- McGhee, J.D. and Felsenfeld, G. (1980). Nucleosome structure, *Annu. Rev. Biochem.* **47**, 1115.
- Mizobuchi, M., Miyake, M., Sano, A. and Kakimoto, Y. (1990). High concentration of free trimethyllysine in red blood cells, *Biochim. Biophys. Acta.* **1033**, 119.
- Paik, W.K. and Kim, S. (1980). *Protein Methylation* (A. Mister, Ed.) Vol. 1, *Biochemistry; A Series of Monographs*, Wiley-Interscience, NY.
- Rebouche, C., Lehman, L. and Olson, L. (1986).  $\epsilon$ -N-Trimethyllysine availability regulates the rate of carnitine biosynthesis in the growing rat, *J. Nutr.* **116**, 751.
- Sachan, D.S. and Hoppel, C.L. (1980). Carnitine biosynthesis: Hydroxylation of N<sup>6</sup>-trimethyllysine to 3-hydroxy-N<sup>6</sup>-trimethyllysine, *Biochem. J.* **188**, 529.
- Shin, J.M. and Lee, H.W. (1989). Methylated basic amino acids in the serum of the experimentally induced diabetic rats, The master's thesis.
- Somogyi, M. (1945). A new reagent for the determination of sugar, *J. Biol. Chem.* **160**, 61.
- Tanphaichitr, V. and Broquist, H.P. (1973). Role of lysine and  $\epsilon$ -N-trimethyllysine in carnitine biosynthesis: II. Studies in the rat, *J. Biol. Chem.* **248**, 2176.
- Tidwell, T., Allfrey, V.G. and Mirsky, A.E. (1968). The methylation of histones during regeneration of the liver, *J. Biol. Chem.* **243**, 707.
- Trayer, I.P., Haris C.I. and Perry, S.V. (1968). 3-Methyl histidine and adult and foetal forms of skeletal muscle myosin, *Nature* **217**, 452.
- Uchigawa, Y., Yamamoto, H. Kawamura, A. and Kawato, H.O. (1982). Protection by superoxide dismutase, catalase and poly(ADP-ribose) synthetase inhibitors against the alloxan- and streptozotocin-induced islet DNA strand breaks and against the inhibition of proinsulin synthesis, *J. Biol. Chem.* **257**, 6084.
- Young, P.R. and Grynspan, F. (1987). Analysis of methylated amino acids by high performance liquid chromatography: methylation of myelin basic protein, *J. Chromatogr.* **421**, 130.
- Young, V. and Munro, H. (1978). N $\tau$ -Methylhistidine (3-methylhistidine) and muscle protein turnover: an overview, *Fed. Proc.* **37**, 2291.