

## 체조직과 성장 발육에 따른 흰쥐 조직내 S-Adenosylmethionine Synthetase 활성도 및 S-Adenosyl-L-methionine의 분포

박승희 · 유태무\*\* · 홍성렬\* · 이향우#  
성균관대학교 약학대학 약학과, 성균관대학교 유전공학과\*  
(Received May 27, 1994)

### Distribution of S-Adenosylmethionine Synthetase in the Pancreatic Tissues of Various Animals and Changes of S-Adenosylmethionine Synthetase Activities and S-Adenosylmethionine in the Developing Rat Organs

Seung Hee Park, Tae Moo Yu\*\*, Sungyool Hong\* and Hyang Woo Lee#

*Department of Pharmacy, College of Pharmacy, Sungkyunkwan University, Suwon 440-746, Korea*

*\*Department of Genetic Engineering, College of Life Science and Natural Resources Sungkyunkwan  
University, Suwon 440-746, Korea*

*\*\*Department of Standardization of Herbal Drugs, National Institute of Health, Seoul, Korea*

**Abstract**—S-Adenosyl-L-methionine synthetase (ATP: methionine S-Adenosyltransferase, EC 2.5.1.6; AdoMet synthetase) catalyzes the biosynthesis of S-Adenosyl-L-methionine(AdoMet) from methionine in the presence of ATP. To elucidate the role of transmethylation reaction in the pancreatic tissues, we examined AdoMet synthetase and isozyme activities, and AdoMet contents in the various tissues. The activities of AdoMet synthetase marked the highest in the kidney, and the lowest in the testis among the various tissues of rat. Considerable amounts of AdoMet synthetase activities were detected in the pancreatic tissues of various animals except for those of frog. The level of  $\alpha$  and  $\gamma$  isozyme activities were present in the pancreatic tissues of various animals, while  $\beta$  isozyme activities were detected as trace. AdoMet synthetase activities of rat brain, liver, testis were decreased with growth. In the rat pancreatic tissues, AdoMet synthetase activities were increased during 16 days after birth and then decreased between 16 and 47 days of age. Levels of AdoMet contents of rat brain and testis were decreased with growth. However, AdoMet contents of rat pancreas were decreased until 26 days of age, and then increased thereafter. AdoMet synthetase isozyme patterns did not vary with growth in the pancreas and testis. But, in the liver,  $\beta$  form is strikingly increased with growth.

**Keywords** □ S-Adenosylmethionine synthetase, S-Adenosyl-L-methionine, pancreas, developing rat organs.

단백질의 메틸화 현상은 원핵 생물과 진핵 생물의 여러 장기에서 관찰되는 생체내 반응으로서, methyl 공여체로서 S-Adenosyl-L-methionine(AdoMet)이 사용되며 여러 종류의 methyltransferase들이 관여한다.

AdoMet은 거의 모든 세포내에 존재하며, 메틸기의 공여체로써, 또는 효소의 유도제로써 생체내 반응에 참여하기 때문에 생체내에서의 AdoMet의 역할과 분석에 관한 많은 연구가 진행되고 있다. Lee 등<sup>1)</sup>과 Warner 등<sup>2)</sup>은 *Saccharomyces cerevisiae*와 적출한 흰 쥐 hepatocyte에 2가지의 명확히 구별되는 AdoMet

\*본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로.

pool이 있는데, labile pool은 세포질에, stable pool은 yeast의 경우 vacuolar fraction에, hepatocyt의 경우 미토콘드리아 분획에 존재한다고 보고하였다. 또한 Paolo 등<sup>3)</sup>은 정맥내 투여한 AdoMet은 전체의 2/3가량이 transmethylation에 쓰이고, 나머지 1/3은 decarboxylation을 거쳐 methylthioadenosine 등으로 분해된다고 보고하였다.

S-Adenosyl-L-methioine synthetase (AdoMet synthetase) [ATP: L-methionine S-Adenosyltransferase, EC 2.5.1.6]는 methionine과 ATP로 부터 AdoMet이 생성되는 반응을 촉매하는 효소<sup>4)</sup>이며, 포유 동물 조직내 AdoMet synthetase<sup>5)</sup>는 주로 3가지 종류의 isozyme, 즉  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ 체가 있는데, 특정 물질에 의해 활성화 또는 저해되는 정도가 다르기 때문에, 이 성질을 이용한 특이적 효소 측정법에 의해 isozyme의 형태를 간접적으로 추정<sup>6)</sup>할 수 있다. 10% Dimethylsulfoxide에 의해  $\beta$ 체의 활성은 약 15배 증가하는 반면,  $\gamma$ 체는 20%의 활성도 감소를 보인다. Tripolyphosphate는 AdoMet synthetase의 저해제인데,<sup>7)</sup> 1.0 mM Tripolyphosphate에 의해  $\alpha$ 체는 효소 활성의 약 80%가 저해되는 반면,  $\beta$ 체는 효소 활성이 약 2배 증가한다. 또한, *p*-Hydroxymercuribenzoic acid를 첨가하면  $\alpha$ 체와  $\beta$ 체의 활성은 거의 소실되나,  $\gamma$ 체의 활성은 약 20% 정도만 소실된다. 정상적인 흰쥐의 간조직에는  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ 체의 3가지 isozyme이 모두 존재하는 것으로 보고되어 있으며,<sup>8)</sup> 흰쥐의 신장과 수정체에서는 흰쥐간의  $\gamma$ 체와 유사한 형태의 isozyme만이 정제<sup>9)</sup>되었다. 이외에도,  $\gamma$ 체의 isozyme은 흰쥐의 fetal liver,<sup>5)</sup> new born liver, regenerating liver,<sup>10)</sup> hepatoma cell, 사람의 chronic lymphocytic leukemia cell,<sup>11)</sup> 그리고 friend erythroleukemic cell 등에서 연구되었다. Horigawa<sup>12)</sup> 등은 흰쥐의 fetal liver에는  $\gamma$ 체가 대부분이나 성장 후의 조직에는  $\alpha$ 체와  $\beta$ 체가 대부분을 차지한다고 보고하였다. 한편, Tsukada<sup>13)</sup> 등은 carcinogenesis 도중  $\gamma$  isozyme이 증가하는데 반해,  $\alpha$ 와  $\beta$  isozyme은 감소한다고 보고하였으며, 근래에는 isozyme 특이적인 효소 저해제를 유기적으로 합성하여 malignant tissue에만 선택적으로 독성을 나타내는 항 종양제를 개발<sup>14,15)</sup> 중이다. 또한, 간내 AdoMet synthetase가 부족한 환자의 경우, 간의 형태나 임상적 소견은 정상이나, 단지  $\beta$ 체 isozyme의 활성만이 정상 활성의 약 28%에 불과하며,<sup>16)</sup> 간 경변

세포의 경우에는 효소 활성이 정상 간 세포에 비하여 50% 감소하였는데, 이 때에는  $\beta$ 체 isozyme의 양이 크게 감소하였고 AdoMet 농도도 감소<sup>17)</sup> 하였다.  $\alpha$ 체와  $\beta$ 체의 isozyme은 면역학적으로 연관성이 있고, LiBr에 의해  $\alpha$ -> $\beta$ 체로 전환이 일어나며,<sup>18)</sup> methionine 투여시  $\alpha$ 체의 활성만 4~5배 증가한다는 보고<sup>19)</sup>가 있으나,  $\alpha$ 와  $\beta$ 의 효소 형태를 조절하는 기전은 아직 밝혀지지 않았다. 최근의 연구에 의하면, Alvarez<sup>20)</sup> 등은 사람의 간조직의 효소를 코딩하는 cDNA 염기 서열을 결정하였고, 간 조직에 특이적인 gene이 오직 간조직에서만 발현된다고 보고하였다.

본 연구에서는 흰쥐 장기내 AdoMet synthetase의 분포, 수종 동물의 체 조직내 AdoMet synthetase의 분포와 isozyme의 형태를 알아보고, 성장 발육에 따른 흰쥐의 장기내 AdoMet synthetase 활성 변화와 AdoMet의 농도 변화를 측정함으로써, 체 조직과 AdoMet synthetase의 연관성에 대하여 고찰하였으며, 간접적으로, 체장의 기능과 단백질 transmethylation과의 관계에 대하여 추정해 보고자 하였다.

### 실험방법

#### 재료

실험동물은 Sprague-Dawley계 웅성 흰쥐, ICR계 웅성 생쥐, 닭, 개구리, 개, 토끼를 일정 기간 사육한 후 단두 치사하여 각 조직을 절취하였으며, 소와 돼지의 체 조직은 수원 도축장에서 도살 직후에 절취하여 실험에 사용하였다.

L-[Methyl-<sup>14</sup>C]methionine(Specific activity : 56 mCi/mmol) Amersham(England), p-81 cellulose phosphate는 Whatman(England) 제품을 사용하였고, 그의 본 실험에 사용한 모든 시약은 Sigma Chemical Co.(U.S.A.) 및 Merck(West Germany)의 특급 시약 또는 HPLC용 시약을 사용하였다.

#### 효소의 활성도 측정 방법

AdoMet synthetase의 활성도는 Geller 등<sup>9)</sup>의 방법에 의하여 측정하였다. 간단히 기술하면, 50 mM Tris-HCl(pH 7.3, 4°C), 20 mM MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 25 mM KCl, 4.0 mM Dithiothreitol을 함유하는 반응액(총 80  $\mu$ l)에 효소원 10  $\mu$ l를 가한 다음, 37°C에서 5분 동안 preincubation한 후, 0.2 mM Methyl-<sup>14</sup>C methionine

10  $\mu$ 를 가하고, 37°C에서 10분간 incubation하였다. 5 mM Methionine을 함유하는 2.0 M HClO<sub>4</sub> 용액 20  $\mu$ 를 가하고 병육상에서 냉각하여 반응을 중지시킨 후, 3000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 침전을 제거하였다. 상등액 100  $\mu$ 를 Cellulose phosphate paper disc(직경 2.5 cm)에 점적하여, 생성된 S-adenosyl-L-[methyl-<sup>14</sup>C]methionine을 흡착시켰다. 과량의 미반응 방사성 물질을 제거하기 위하여 disc를 5 mM Phosphate buffer(pH 7.0) 30 ml로 5분간 총 4회, shaker(92 rpm)를 사용하여 세척하였다. Disc를 약 70°C에서 완전히 건조시킨 다음, Scintillation fluid 10 ml에 넣어 liquid scintillation counter로(LKB 1211 Rackbeta liquid scintillation counter, LKB, U. S.A.)로 생성된 S-adenosyl-L-[methyl-<sup>14</sup>C]methionine에 의한 방사능을 측정하였다. 효소의 비활성도는 시료 단백질 1 gram당 1분 동안에 생성된 S-adenosyl-L-methionine의 양(pmoles)으로 나타내었고, 총 효소 활성도는 습중량 1 gram당 1분 동안 생성된 S-adenosyl-L-methionine의 양으로 나타내었다.

AdoMet synthetase isozyme의 활성도는 특이적 효소 측정법을 이용하여, 반응액에 1.0 mM Sodium tripolyphosphate, 10% Dimethylsulfoxide를 각각 첨가, 또는 Dithiothreitol은 빼고 0.5 mM p-Hydroxymercuribenzoic acid를 첨가하여 효소의 활성을 측정하였다. 단백질은 Lowry<sup>19)</sup> 등의 방법에 의하여 Bovine serum albumin을 표준 물질로하여 정량하였다.

#### 각 조직내 AdoMet synthetase 및 isozyme 활성도 측정

흰쥐의 각 장기내 AdoMet synthetase의 활성도 측정—약 250 g 내외의 웅성 흰쥐를 단두 치사하여, 뇌, 심장, 신장, 간, 췌장, 비장, 정소의 조직을 절취한 후 0.25 M Sucrose 용액으로 세척하여 혈액, 지질 등을 제거하였다. 10 mM Tris-HCl(pH 7.3, 4°C), 100 mM KCl, 1.0 mM Dithiothreitol, 0.5 mM EDTA를 함유하는 0.25 M Sucrose 용액 9배 용량을 넣어, teflon-glass homogenizer(Potter Elvehjem type teflon-glass homogenizer, Fisher Scientific Co., U.S.A.)로 균질화한 후, double layered cheese cloth를 통과시켜 얻은, 균질액을 효소원으로 사용하였다.

수중 동물의 체 조직내 AdoMet synthetase와 그

isozyme 활성도 측정—소, 돼지, 닭, 개, 개구리, 토끼, 생쥐, 흰쥐의 체 조직을 절취하여 위의 방법으로 균질액을 얻어 AdoMet synthetase의 활성도와 isozyme 활성도를 측정하였다.

성장 발육에 따른 흰쥐 장기내 AdoMet synthetase와 그 isozyme 활성도 측정—출생 후 5, 9, 16, 26, 47일 된 흰쥐를 단두 치사하여 각각 뇌, 간, 췌장, 정소 조직을 절취하여 위와 같은 방법으로 균질액을 얻어 AdoMet synthetase 활성도를 측정하였으며, 반응액에 10% Dimethylsulfoxide를 첨가하여 isozyme 활성도를 측정하였다.

#### 성장 발육에 따른 흰쥐 장기내 AdoMet의 농도 변화 측정

시료의 전처리<sup>21,22)</sup>—출생 후 나이별로 5, 9, 16, 26, 47일째된 흰쥐를 단두 치사하여 각각 뇌, 간, 췌장, 정소 조직을 취하여, 2배 용량의 냉각된 0.4 M HClO<sub>4</sub> 용액을 넣어 균질화한 후 9000×g, 4°C에서 10분간 원심분리(high speed centrifuge KR-20000T, Kubota, Japan)하였다. 상등액 2 ml를 취한 후, 2.0 M KOH 용액을 사용하여 상등액의 pH를 약 7.0으로 조정하였으며, 이때 생성된 KClO<sub>4</sub> 침전을 제거하기 위하여 9000×g, 4°C에서 10분간 원심분리하여 그 상등액을 취하였다.

Methanol과 물을 차례로 5 ml씩 통과시켜 활성화시킨 SEP-PAK C<sub>18</sub> cartridge에 상등액을 통과시킨 후, 물 1.0 ml로 세척하고, 0.175 M Acetic acid 1.2 ml와 0.175 M Acetic acid를 함유한 25% Methanol 1.0 ml를 차례로 통과시켜 얻은 분획을 합하여 HPLC (high performance liquid chromatograph: 6000A solvent delivery system, Model 440 absorbance detector, Model U6K Injector, Waters Associates, U.S.A.)로 분석하였다.

HPLC에 의한 AdoMet의 정량—Column은  $\mu$ -Bondapak C<sub>18</sub>(30 cm×3.9 mm i.d., Waters Associates, U.S.A.)을 사용하였으며, 이동상으로는 5 mM 1-Octanesulfonic acid를 함유한 20% Methanol을 사용하여 isocratic elution으로 AdoMet peak를 분리하였다. 이동상의 유출 속도는 1.7 ml/min이었으며, 압력은 약 2000 p.s.i.였다. 주입 용량은 100  $\mu$  l 이었고, 검출기는 254 nm의 UV absorbance detector를 사용하였다. 검량선은 AdoMet  $\mu$ g에 대한 peak height의

관계로 작성하였으며, 시판 AdoMet을 SEP-PAK C<sub>18</sub> cartridge를 통과시켜 실험실내에서 정제하여 사용하였다.

AdoMet peak는 일정량의 S-adenosyl-L-[methyl-<sup>14</sup>C]methionine을 injection하여 각 peak 위치에서 유출되는 분획의 방사능을 측정함으로써 확인하였고, AdoMet의 회수율은 시판 AdoMet을 SEP-PAK C<sub>18</sub> cartridge에 통과시켜 정제한 후, 정제된 표준품 AdoMet 일정량을 조직에 혼합해서 균질화하여 AdoMet의 분리 정제 과정을 거친 후 HPLC 결과 분석으로부터 구하였으며, 회수율은 %로 나타내었다.

**실험결과**

**Rat의 각 장기내 AdoMet synthetase 활성도 분포**

흰쥐 각 장기 조직의 균질액에서 AdoMet synthetase 활성도 분포는 Table I과 같으며, 정소를 제외한 여러 기관에서 상당한 양의 활성을 보였다. 정소 조직의 효소 활성도가 7가지 장기 중에서 가장 낮았으며, 신장 조직이 가장 높은 활성을 나타내었고, 그 이외의 장기 조직은 대부분 1.00~2.00 pmoles Met./min./mg protein. 정도의 활성을 나타내었다.

**수중 동물의 체 조직내 AdoMet synthetase 활성도 분포**

수중 동물의 체 조직내 AdoMet synthetase 활성도 분포는 Table II와 같으며, 개구리를 제외한 여러 동물에서 상당량의 활성을 보였다. 전체적으로 보아 소의 체 조직에서의 활성도가 가장 높았다. 소, 돼지, 개

**Table I**—AdoMet synthase activities in the various rat organs

| Organ    | Total activity <sup>a</sup> /g.wet tissue | Specific activity <sup>b</sup> |
|----------|---|--------------------------------|
| Brain    | 195.88± 13.80                             | 1.81± 0.13                     |
| Heart    | 99.26± 7.95                               | 1.05± 0.09                     |
| Kidney   | 461.28± 28.90                             | 3.02± 0.18                     |
| Liver    | 186.98± 23.00                             | 1.01± 0.14                     |
| Pancreas | 188.52± 21.85                             | 1.40± 0.19                     |
| Spleen   | 156.35± 30.87                             | 1.16± 0.19                     |
| Testis   | 41.75± 5.44                               | 0.53± 0.07                     |

Each value represents Mean + S.E. of 5 observations.

<sup>a</sup> Total activity is defined as picomoles of Met./min.

<sup>b</sup> Specific activity is defined as picomoles of Met./min./mg protein under the assay condition.

**Table II**—AdoMet synthase activities in the pancreatic tissues of various animals

| Animals | Total activity <sup>a</sup> /g. wet tissue | Specific activity <sup>b</sup> |
|---------|--|--------------------------------|
| Bovine  | 6442.53± 634.02                            | 48.82± 3.14                    |
| Chicken | 898.08± 47.49                              | 5.37± 0.16                     |
| Dog     | 2178.28± 154.73                            | 10.16± 0.62                    |
| Frog    | 46.50± 3.00                                | 0.31± 0.02                     |
| Mouse   | 696.97± 51.88                              | 5.59± 0.40                     |
| Porcine | 4011.75± 145.05                            | 24.74± 0.39                    |
| Rabbit  | 1160.68± 102.53                            | 9.43± 0.67                     |
| Rat     | 211.10± 28.76                              | 1.34± 0.23                     |

Each value represents Mean± S.E. of 5 observations.

<sup>a</sup> Total activity is defined as picomoles of Met./min.

<sup>b</sup> Specific activity is defined as picomoles of Met./min./mg protein under the assay condition.

등의 포유류 동물의 체 조직이 높은 효소활성을 나타낸 반면, 양서류인 개구리는 가장 낮은 활성을 보였다. 한편, 설치류 동물들은 종간의 차이가 컸다.

**수중 동물의 체 조직내 AdoMet synthetase isozyme의 활성도 분포**

특이적 효소 측정 방법에 의해 수중 동물의 체 조직내 AdoMet synthetase isozyme의 활성도를 측정 한 결과는 Table III과 같다. 표준적인 효소 활성 측정법으로 측정 한 효소 활성도를 기준으로 하여, 각각 Dimethylsulfoxide, Tripolyphosphate, p-Hydroxymercuribenzoic acid를 첨가했을 때, 효소가 활성화 되거나 또는 불활성화되는 정도를 비교하여 체 조직내 존재하는 isozyme의 형태를 추정하였다.

수중 동물의 각 체 조직내 AdoMet synthetase isozyme의 활성도는 동물에 따라 큰 차이를 보이나, 특이적 효소 측정법으로 활성화되거나 불활성화되는 비율은 거의 비슷하였다. 소, 닭, 토끼의 체 조직내 AdoMet synthetase는 활성화되거나, 또는 불활성화 되는 양상이 유사하였다. 개의 경우에는 다른 동물에 비해 Dimethylsulfoxide에 의해 활성화되는 비율이 컸으며, 반대로 생쥐의 경우에는 다소 불활성화되었다. 개구리는 특이한 양상을 보이고 있으나, 활성도가 극히 낮기 때문에 의의가 없다. 전체적으로 보아, 여러 체 조직내 AdoMet synthetase는, 표준 효소 측정법으로 측정 한 효소의 활성도를 100%라고 기준하였을 때, 10% Dimethylsulfoxide에 의해 약 97~163%의 활성을 나타내었으며, 1.0 mM Tripolyphosphate에

**Table III**—AdoMet synthetase isozyme activities at the specific assay system in the pancreatic tissues of various animals

| Assay system | Normal            |                    | + 10% DMSO   |       | + 1.0 mM Tripolyphosphate |       | -Dithiothreitol + 0.5 mM p-hydroxymercuribenzoic acid |       |
|--------------|-------------------|--------------------|--------------|-------|---------------------------|-------|---|-------|
|              | S.A. <sup>a</sup> | Ratio <sup>b</sup> | S.A.         | Ratio | S.A.                      | Ratio | S.A.  | Ratio |
| Rat liver    | 1.06 ± 0.08       | 100                | 3.99 ± 0.13  | 376   | 0.25 ± 0.01               | 24    | 1.49 ± 0.12   | 140   |
| Bovine       | 48.82 ± 3.14      | 100                | 64.06 ± 2.97 | 131   | 4.52 ± 0.36               | 9     | 18.41 ± 1.69  | 38    |
| Chicken      | 5.37 ± 0.16       | 100                | 7.14 ± 0.25  | 133   | 0.94 ± 0.11               | 18    | 1.73 ± 0.12   | 32    |
| Dog          | 10.16 ± 0.62      | 100                | 16.52 ± 1.01 | 163   | 0.69 ± 0.03               | 7     | 5.75 ± 0.23   | 56    |
| Frog         | 0.31 ± 0.02       | 100                | 0.75 ± 0.01  | 242   | 0.15 ± 0.01               | 48    | 0.05 ± 0.02   | 16    |
| Mouse        | 5.59 ± 0.40       | 100                | 5.41 ± 0.26  | 97    | 0.03 ± 0.02               | 0.6   | 0.62 ± 0.08   | 11    |
| Porcine      | 24.74 ± 1.39      | 100                | 29.50 ± 2.60 | 119   | 1.08 ± 0.05               | 4     | 12.13 ± 0.96  | 49    |
| Rabbit       | 9.43 ± 0.67       | 100                | 12.80 ± 1.18 | 136   | 0.78 ± 0.08               | 8     | 1.93 ± 0.11   | 21    |
| Rat          | 1.34 ± 0.23       | 100                | 2.06 ± 0.17  | 154   | 0.20 ± 0.05               | 15    | 0.62 ± 0.07   | 46    |

Each value represents Mean ± S.E. of 4 observations.

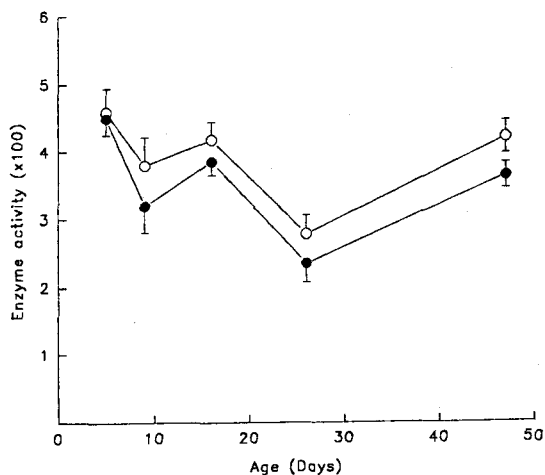
<sup>a</sup> S.A. is defined as picomoles of Met./min./mg protein under the assay condition.

<sup>b</sup> Ratio;  $\frac{\text{Specific activities with the specific assay system}}{\text{Specific activities with the normal assay system}} \times 100(\%)$

의해 0.6~18%의 활성을 나타내었고, 0.5 mM p-Hydroxymercuribenzoic acid에 의해 11~56%의 활성을 나타내었다. 성장 발육에 따른 흰쥐 장기 조직내 AdoMet synthetase 및 isozyme 활성도 변화 뇌 조직 1 gram당 총 효소 활성도는 생후 5일째에 가장 높았으며, 그후 감소한 뒤, 16일째 다시 증가하였으며 다시 감소후 47일째에 16일과 거의 같은 활성도를 보였다. Specific activity는 5일째에  $8.31 \pm 0.49$  pmoles Met./min./mg protein으로 가장 높았으며, 9일까지 급격히 감소하였고, 그 이후로 완만히 감소하였다. 한편, 표준 효소 측정법으로 측정한 효소의 활성도를 100%라고 기준하였을 때 10% Dimethylsulfoxide에 의해서 활성화되는 비율은 약 84~98%로 성장 발육함에 따라 거의 변화 없이 일정하였다(Fig. 1).

간 조직 1 gram당 총 효소 활성도는 생후 5일째와 16일째에 거의 비슷하였으며, 이때 가장 높은 효소 활성을 보였다. 비활성도는 5일째에  $7.72 \pm 0.49$  pmoles Met./min./mg protein으로 가장 높았으며 그 이후로 감소하는 경향을 보였다. 10% Dimethylsulfoxide에 의해 활성화되는 비율은 286%에서 540%까지 간 조직이 성장 발육함에 따라 계속하여 증가하였다(Fig. 2).

췌장 조직 1 gram당 총 효소 활성도는 생후 16일째에  $1690.47 \pm 68.85$  pmoles Met./min./mg protein



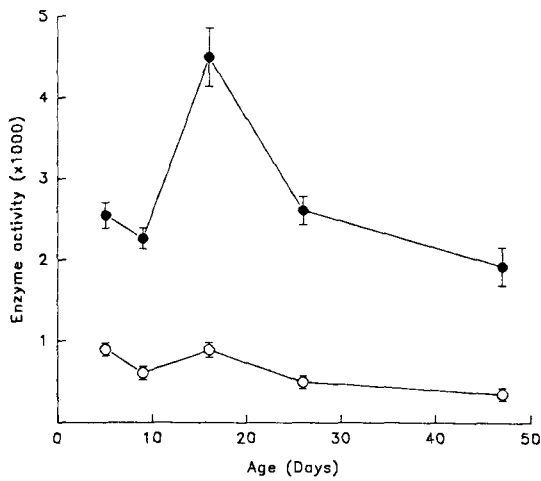
**Fig. 1**—Changes of AdoMet synthetase activities in developing rat brain. Enzyme activity is defined as pmoles of Met./min./g wet tissue.

○: normal assay mean ●: +10% DMSO assay system

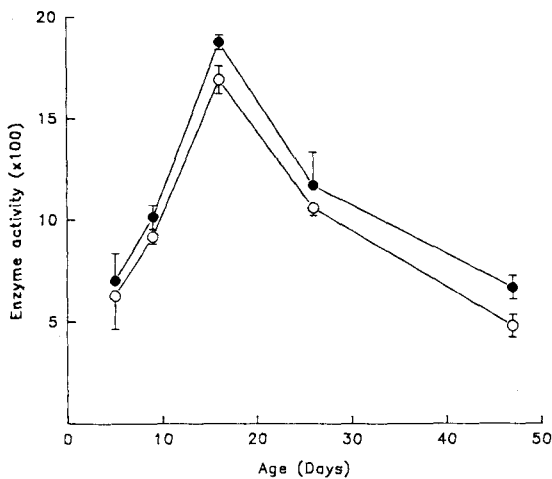
Each value represents mean ± S.E. of 4 observations.

으로 가장 높았으며, 16일까지 증가한 후 그 이후로 감소하였다. 비활성도도 16일째에  $11.78 \pm 0.69$  pmoles Met./min./mg protein으로 가장 높았으며, 5~16일까지 거의 변화가 없었고, 그 이후로 급속히 감소

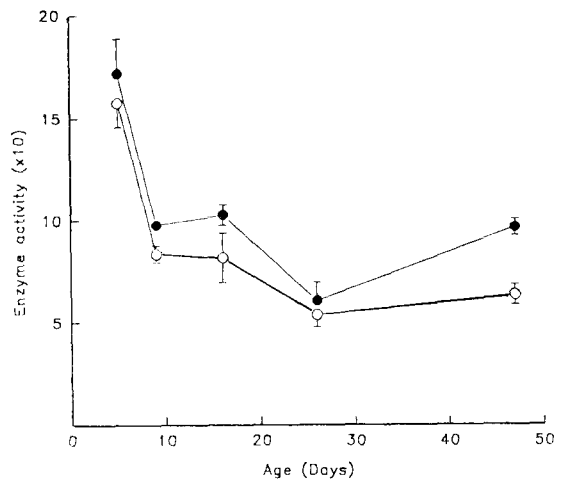
하였다. 췌 조직이 성장 발육함에 따라 10% dimethylsulfoxide에 의해 활성화 되는 비율은 105~140%로 나이에 따라 큰 변화는 없었다(Fig. 3).



**Fig. 2**—Changes of AdoMet synthetase activities in developing rat liver Enzyme activity is defined as pmoles of Met./min./g wet tissue.  
○: normal assay system ●: +10% DMSO assay system  
Each value represents mean±S.E. of 4 observations.



**Fig. 3**—Changes of AdoMet synthetase activities in developing rat pancrea Enzyme activity is defined as pmoles of Met./min./g wet tissue.  
○: normal assay system ●: +10% DMSO assay system  
Each value represents mean±S.E. of 4 observations.



**Fig. 4**—Changes of AdoMet synthetase activities in developing rat testis Enzyme activity is defined as pmoles of Met./min./g wet tissue.  
○: normal assay system ●: +10% DMSO assay system  
Each value represents mean±S.E. of 4 observations.

정소 조직 1 gram당 총 효소 활성도와 비활성도는 각각  $158.10 \pm 12.20$  pmoles Met./min./g wet tissue 와  $4.58 \pm 0.29$  pmoles Met./min./mg protein으로 생후 5일째에 가장 높았으며, 9일까지 급속히 감소한 후 그 이후로 완만히 감소하였다. 10% dimethylsulfoxide에 의해 활성화되는 비율은 109~149%로 성장 발육함에 따라 큰 변화가 없었다(Fig. 4).

#### HPLC에 의한 AdoMet peak의 확인 및 검량선 작성

AdoMet peak의 retention time은 약 10.70 min. 이었다. 전 단계에 걸친 AdoMet의 분리 과정중 회수율은 70.0%였다. 검량선은 SEP-PAK C<sub>18</sub> cartridge를 통과시켜 정제한 표준품 AdoMet 0.42 µg~1.82 µg을 주입하여 peak 높이와 주입량과의 관계로 작성하였다. 검량선의 회귀 방정식은  $Y=5.4231X-0.1085(r=0.9997)$  이었다.

#### 성장 발육에 따른 흰쥐 장기내 AdoMet의 농도 변화

성장 발육하는 흰쥐 뇌 조직내 AdoMet 농도는 생후 5일째에  $47.10 \pm 0.30$  nmoles/g wet tissue로 가장 높

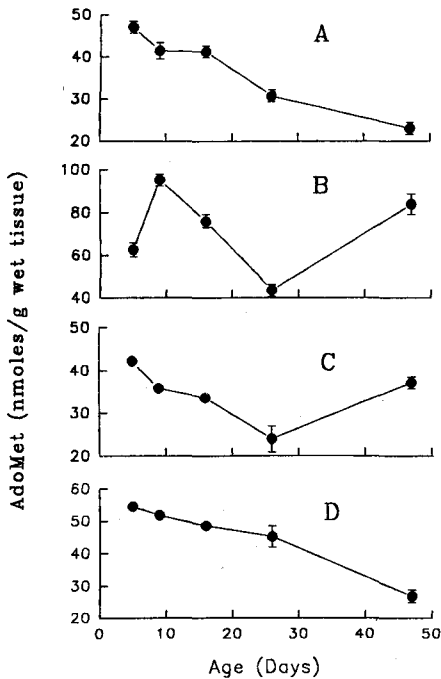


Fig. 5—Changes of AdoMet contents in developing rat organs A: Brain, B: Liver, C: Pancreas D: Testis

Each value represents mean  $\pm$  S.E. of 2 observations.

았으며, 그 후로 계속 감소하였고, 5일 이후부터 16일째까지는 거의 변화가 없었다. 성장 발육하는 흰쥐 간 조직내 AdoMet 농도는 생후 9일째에  $95.25 \pm 2.75$  nmoles/g wet tissue로 가장 높았으며, 26일째에  $43.55 \pm 2.75$  nmoles/g wet tissue로 가장 낮았다.

#### 성장 발육에 따른 흰쥐 장기내 AdoMet의 농도 변화

성장 발육하는 흰쥐 체 조직내 AdoMet 농도는 생후 5일째에 40.20 nmoles/g wet tissue로 가장 높았으며, 26일까지 감소하다가, 47일까지 다시 증가하였다. 성장 발육하는 흰쥐 정소 조직내 AdoMet 농도는 생후 5일째에 54.50 nmoles/g wet tissue였으며, 26일까지 완만히 감소하다가 그 이후로 급격히 감소하였다 (Fig. 5).

#### 고 찰

AdoMet synthetase는, transmethylation시 methyl 공여체로 쓰이는 AdoMet의 생성을 촉매하는 효소로 성질과 기능이 다른 3종류의 isozyme으로 존재한다. 본 연구는 transmethylation의 전 단계 즉, 단백질 methylase의 기질인 AdoMet을 생성하는 효소의 활성과 형태를 알아보고, 여러 organ내 AdoMet 양을 측정함으로써, 체 조직내 AdoMet synthetase에 대해 고찰해 보고, 나아가 체장의 기능과 단백질 transmethylation과의 관계에 대하여 추정해 보고자 하였다. 흰쥐의 여러 장기내 AdoMet synthetase의 활성을 균질액에서 측정하였을 때, 각 장기에서 상당한 활성이 관찰되었으며, 정소내 효소 활성이 가장 낮았는데, 이는 정소에서 단백질 methylase의 활성이 비교적 높은 것<sup>24)</sup>과는 대조적이다. 또한, Eloranta 등<sup>25)</sup>의 연구에 의하면 세포질 분획에서 효소의 활성을 측정하였을 때, 간장에서 가장 높은 활성을 관찰하였는데 반해, 본 연구에서는 신장에서 가장 높은 활성이 검출되었는데, 이는 효소원이 다르기 때문이라 생각되며, 단백질 methylase II의 경우처럼 흰쥐 간장내 AdoMet synthetase에 대한 일종의 저해제가 존재하리라 사료된다.

수종 동물의 체 조직내 AdoMet synthetase 활성을 균질액에서 측정하였을 때, 개구리를 제외한 여러 동물의 효소 활성이 높은 것으로 보아 체장의 기능과 이 효소 사이에 밀접한 관계가 있으리라 사료된다. 특히 소와 돼지 체장에서 효소 활성이 높았는데, 이는 단백질 methylase의 활성이 이 동물들의 체 조직에서 높았던 보문<sup>26)</sup>과 관련이 있다. 개구리 체 조직내의 protein methylase와 AdoMet synthetase가 모두 활성이 낮은 것은 변온 동물이기 때문일 것이다.

특이적 효소 측정 방법<sup>27)</sup>으로 AdoMet synthetase isozyme의 활성을 측정한 결과, 생쥐를 제외한 수종 동물의 체 조직에서, 효소의 활성이 특정 물질에 의해 활성화되거나 불활성화 되는 양상이 유사하였다. 10% Dimethylsulfoxide에 의해 약 1.3배 활성도가 증가하였고, 1.0 mM Tripolyphosphate에 의해 효소 활성이 거의 소실되었으며, 0.5 mM *p*-Hydroxymercuribenzoic acid에 의해 효소 활성이 약 70% 감소하는 것으로 보아, 체 조직내 AdoMet synthetase isozyme의 형태는 흰쥐 간장의 것과는 상당히 다르리라 사료되며, 주로  $\alpha$ 체 그리고 상당량의  $\gamma$ 체의 isozyme이 존재하며,  $\beta$ 체는 소량 존재할 것이라 추정할 수

있다. 또한, 체 기능에는 주로  $\alpha$ 체 isozyme이 관여 하리라 사료되며 그 작용 기전에 대한 연구가 진행 되어야 할 것이다.

성장 발육하는 흰쥐 장기내 AdoMet synthetase의 비활성도는 뇌, 간, 정소에서 성장 발육함에 따라 대체로 감소하며, 췌장에서는 16일경에 증가한 후에 그 이후로 감소하였다. 조직의 습중량당 총 활성도는 정소의 경우 9일까지 급속히 감소한 후 그 이후로 약간씩 감소하였다. 성장 발육중인 흰쥐 장기내 AdoMet 양은, 뇌와 정소에서는 성장함에 따라 감소하는 경향을 나타내었는데, 47일째에는 5일째 농도의 약 1/2로 감소하였다. 췌장에서는 26일경까지 감소하다가 그 이후로 증가하여 47일째에는 9일째의 양과 거의 비슷하였다. 그리고, 간장에서는 증가 감소가 반복되었다. 정소에서는 AdoMet synthetase의 활성도 감소와 더불어 AdoMet 양도 감소하였는데 이는 단백질 methylase III의 활성도 변화와 비슷한 양상을 보였다. 뇌 조직에서는 26일경까지 AdoMet synthetase와 AdoMet 양이 모두 감소하는 경향을 보이다가, 47일경 AdoMet synthetase의 활성도만 약간 증가하였다. Yu<sup>28)</sup>에 의하면, AdoMet은 흰쥐 뇌의 세포질에 약 35%, mitochondria에 약 35%가 존재하는 데, 성장하면서 출생시의 약 1/2까지 양이 감소한다.<sup>4)</sup> Geller 등<sup>29)</sup>은 developing rat lens에서 AdoMet synthetase 및 AdoMet 양이 감소한다고 보고하였다. 본 실험 결과, 췌장의 경우, AdoMet 양은 성장 발육함에 따라 계속 감소하였으나, AdoMet synthetase는 16일경 최대를 이루었다가 그 이후로 감소하는 경향을 보였다. 간장과 췌장에서 AdoMet synthetase 활성과 AdoMet 양 변화가 일치하지 않는 것은, 생체 내에서 AdoMet이 여러 반응에 능동적으로 관여하고, 또한 turn over<sup>4)</sup>가 빨라 분해나 대사과정에 여러 효소와 인자들이 관여하기 때문이라고 사료된다. Gensaku<sup>9)</sup> 등은 흰쥐 태아의 간조직에는  $\gamma$ 체의 isozyme만이 존재하며 성장 발육함에 따라  $\alpha$ 체는 생후 10일까지,  $\beta$ 체는 생후 15일까지 증가한다고 발표하였으며, Liou<sup>10)</sup> 등도 fetal, new born, regenerating 간조직과 같이 성장이 빠른 세포에서  $\gamma$ 체의 isozyme이 급격히 증가하며  $\beta$ 체의, isozyme은 태아의 간조직에서는 볼 수 없다고 보고하였다.

본 실험에서는, 표준 효소 활성 측정법으로 측정된 효소의 활성을 100% 라고 기준하였을 때, 10% Di-

methylsulfoxide에 의해 활성화 되는 비율(%)로 isozyme의 형태를 추정하였다. 흰쥐 간장에서는 성장 발육함에 따라 286%에서 540%까지 증가한 것으로 보아, 성장 발육하는 간 조직내에는 출생 후 5일째에도 이미 상당량의  $\beta$  isozyme이 존재하며 47일까지 그 양이 계속 증가할 것이라 사료된다. 그러나, 뇌조직은 84~98%로 성장 발육함에 따라 거의 변화가 없었다. 따라서, 성장 발육하는 흰쥐 뇌조직내에는  $\beta$  isozyme이 거의 존재하지 않을 것이라 사료된다. 췌장과 정소 조직에서도 약 105~149%로 나이에 따라 거의 변화가 없는 것으로 보아,  $\beta$  isozyme은 거의 없고,  $\alpha$  또는  $\gamma$  isozyme이 존재하리라 추정되며, 이 경향은 성장 발육과 관계없이 비교적 일정하리라 사료된다.

이상으로, 여러 체 조직내에서 비교적 많은 양의 AdoMet synthetase 활성이 관찰되고, 상당량의 AdoMet이 있는 것으로 보아, 이 두 인자가 체 기능에 중요한 역할을 할 것이라 사료되지만, AdoMet이 생체내 여러 반응에 관여하기 때문에 단백질 transmethylation과 직접 결부시키기에는 무리가 있으며, isozyme의 작용 기전에 관해 더 많은 연구가 진행되어야 할 것이다.

## 결 론

흰쥐의 장기별 AdoMet synthetase 활성은 비교적 유사한 분포를 보였으며, 신장에서  $3.02 \pm 0.18$  pmoles Met./min./mg protein으로 가장 높았고, 정소에서  $0.53 \pm 0.07$  pmoles Met./min./mg protein으로 가장 낮았다. 한편, 췌 조직은  $1.40 \pm 0.19$  pmoles Met./min./mg protein의 활성을 나타내었다.

수종 동물의 체 조직에서 상당량의 효소 활성이 관찰되었는데, 특히 소의 체 조직내 활성도가  $48.82 \pm 3.14$  pmoles Met./min./mg protein으로 가장 높았다. 이것으로 보아, AdoMet synthetase가 췌장의 기능에 유관하리라 사료된다. 또한, 정상 상태의 체 조직내에는  $\beta$  isozyme의 활성은 거의 없으며, 주로  $\alpha$  또는  $\gamma$  isozyme의 활성이 관찰되었다.

성장 발육함에 따라 흰쥐의 뇌, 간, 정소내 AdoMet synthetase의 비활성도는 감소하였고, 췌 조직에서는 9일째 감소 후 16일까지 증가하여 최대를 이룬 후, 47일까지 감소하였다. 흰쥐 췌조직에서 습중량 1 gram당 총활성도는 16일경까지 증가하여  $1690.47 \pm$



68.85 pmoles Met./min./g wet tissue로 최대를 이룬 후 감소하였다.

성장 발육함에 따라 흰쥐 장기내 AdoMet 양은 간 조직을 제외한 뇌, 췌장 정소에서 점차 감소하는 경향을 보였다.

성장 발육함에 따라, 흰쥐 간 조직은  $\beta$  isozyme의 활성이 현저히 증가하였으나, 뇌, 췌장, 정소 조직에서는  $\beta$  isozyme의 활성이 거의 관찰되지 않았으며, 그 경향은 성장 발육과 관계없이 일정하였다.

## 문 헌

- 1) Farooqui, J. T., Lee, H. W., Kim, S., and Paik, W. K.: Studies on compartmentation of S-adenosyl-L-methionine in *Saccharomyces cerevisiae* and isolated rat hepatocytes. *Biochimica et Biophysica Acta* **754**, 342-351 (1983).
- 2) Warner, J. R., Morgan, S. A., and Shulman, R. W.: Kinetics of labeling of the S-adenosylmethionine pool of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **125**, 887-891 (1976).
- 3) Paolo, G., Marzia, G. K., Emilia, C., and Giorgio, S.: Transmethylation, transsulfuration, and aminopropylation reactions of S-adenosyl-L-methionine *in vivo*. *J. Biol. Chem.* **259**, 4205-4211 (1984).
- 4) Baldessarini, R. J., and Kopin, I. J.: S-adenosylmethionine in brain and other tissues. *J. Neurochem.* **13**, 769-777 (1966).
- 5) Okada, G., Watanabe, Y., and Tsukada, K.: Changes in patterns of S-adenosylmethionine synthetase in fetal and postnatal rat liver. *Cancer Res.* **40**, 2895-2897 (1980).
- 6) Cox, R., and Goorda, S.: Synthesis of S-adenosylmethionine by  $\gamma$  isozyme of methionine adenosyltransferase from friend erythroleukemic cells. *Cancer Res.* **44**, 4938-4941 (1984).
- 7) Shimizu, K., Maruyama, I., Iijima, S., and Tsukada, K.: Tripolyphosphatase associated with S-adenosylmethionine synthetase isozymes from rat liver. *Biochimica et Biophysica Acta* **883**, 293-298 (1986).
- 8) Sullivan, D. M., and Hoffman, J. L.: Fractionation and kinetic properties of rat liver and kidney methionine adenosyltransferase isozymes. *Biochemistry* **22**, 1636-1641 (1983).
- 9) Geller, A. M., Kotb, M. Y., Jernigan, H. M. Jr., and Kredich, N. M.: Purification and properties of rat lens methionine adenosyltransferase. *Exp. Eye Res.* **43**, 997-1003 (1986).
- 10) Liao, C., Chang, C. F., and Becker, F. F.: Alteration of S-adenosylmethionine synthetase during chemical hepatocarcinogenesis and in resulting carcinomas. *Cancer Res.* **39**, 2113-2119 (1979).
- 11) Kotb, M., and Kredich, N. M.: S-adenosylmethionine synthetase from human lymphocytes. *J. Biol. Chem.* **260**, 3923-3928 (1985).
- 12) Horigawa, S., Ozasa, H., Ota, K., and Tsukada, K.: Immunochemical analysis of rat S-adenosylmethionine synthetase isozymes in developmental liver. *FEBS LETTETS* **330**, 307-311 (1993).
- 13) Liao, M. C., Chang, C. F., and Giovanella, B. C.: Demonstration of altered S-adenosylmethionine synthetase in human malignant tumors xenografted into athymic nude mice. *J. Natl. Cancer Inst.* **64**, 1071-1075 (1980).
- 14) Vrudhula, V. M., Kappler, F., and Hampton, A.: Isozyme specific enzyme inhibitors. 5'(R)-C-[(L-homocystein-S-yl)methyl]adenosine 5'-( $\beta,\gamma$ -imidotriphosphate), a potent inhibitor of rat methionine adenosyltransferase. *J. Med. Chem.* **30**, 888-894 (1987).
- 15) Vrudhula, V. M., Kappler, F., and Hampton, A.: Toward the synthesis of isozyme specific enzyme inhibitors. Potent inhibitors of rat methionine adenosyltransferase. Effect of one-atom elongation of the ribose-P bridge in two covalent adducts of L-methionine and  $\beta,\gamma$ -imido-ATP. *J. Med. Chem.* **31**, 384-389 (1988).
- 16) Gahl, W. A., Finkelstein, J. D., Mullen, K. D., Bernardino, I., Martin, J. J., Backlund, P., Ishak, K. G., Hoofnagle, J. H., and Mudd, S. H.: Hepatic methionine adenosyltransferase deficiency in a 31-year-old man. *Am. J. Hum. Genet.* **40**, 39-49 (1987).
- 17) Cabrero, C., Duce, A. M., Ortiz, P., Alemany, S., and Mato J. M.: Specific loss of high-molecular-weight form of S-adenosyl-L-methionine synthetase in human liver cirrhosis. *Hepatology* **8**, 1530-1534 (1988).
- 18) Cabrero, C., and Alemany, S.: Conversion of rat

- liver S-adenosyl-L-methionine synthetase from high-Mr form to low-Mr form by LiBr. *Biochimica et Biophysica Acta* **952**, 277-281 (1988).
- 19) Matsumoto, C., Suma, Y., and Tsukada, K.: Changes of the activities of S-adenosylmethionine synthetase isozymes from rat liver with dietary methionine. *J. Biochem.* **95**, 287-290 (1984).
  - 20) Alvarez, L., Corrales, F., Martin-Duce, A., and Mato, J. M.: Characterization of a full-length cDNA encoding human liver S-adenosylmethionine synthetase: tissue-specific gene expression and mRNA levels in hepatopathies. *Biochem. J.* **293**, 481-486 (1993).
  - 21) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **93**, 265-275 (1951).
  - 22) Fell, D., Benjamin, L. E., and Steele, R. D.: Determination of adenosine and S-adenosyl derivatives of sulfur amino acids in rat liver by high performance liquid chromatography. *J. Chromatogra.* **345**, 150-156(1985).
  - 23) Gharib, A., Sarda, N., Chabannes, B., Cronenberger, L., and Pacheco, H.: The regional concentrations of S-adenosyl-L-methionine, S-adenosyl-L-homocysteine, and adenosine in rat brain. *J. Neurochem.* **810-815** (1982).
  - 24) Paik, W. K., Lee, H. W., and Lawson, D.: Age-dependency of various protein methylases. *Exp. Geront.* **6**, 271-277 (1971).
  - 25) Eloranta, T. O.: Tissue distribution of S-adenosylmethionine and S-adenosylhomocysteine in the rat. *Biochim. Acta* **166**, 521-529 (1977).
  - 26) 이향우, 한정환: 수종 동물의 퀘 조직내 Protein Methylases의 활성도 분포에 관한 연구. 성균관대학교 논문집 자연계 제 35집 No. 1 별쇄, 45-51 (1984).
  - 27) Okada, G., Teraoka, H., and Tsukada, K.: Multiple species of mammalian S-adenosylmethionine synthetase. Partial purification and characterization. *Biochemistry* **20**, 934-940 (1981).
  - 28) Yu, P. H.: Radioenzymatic estimation of S-adenosylmethionine in rat brain regions and subcellular fractions. *Anal. Biochem.* **86**, 498-504 (1978).
  - 29) Geller, A. M., Kotb, M. Y., Jernigan, H. M. Jr., and Kredich, N. M.: Methionine adenosyltransferase and S-adenosylmethionine in the developing rat lens. *Exp. Eye Res.* **47**, 197-204 (1988).