

카드뮴 결합 고분자량 단백질의 생화학적 특성

천기정* · 김봉희*

*한국원자력연구소 기초과학실, 충남대학교 약학대학
(Received April 1, 1995)

Biochemical Characteristics of Cd-binding High Molecular Weight Proteins

Ki-Jung Chun* and Bong-Hee Kim*

*Korea Atomic Energy Research Institute, Taejon 305-600, Korea
College of Pharmacy, Chung Nam National University, Taejon 305-764, Korea

Abstract—The isoelectric points of Cd-BP(I) and Cd-BP(II), cadmium-binding proteins, were 6.01 and 5.35, respectively. Both of them contained zinc. As for the amino acid composition, Cd-BP(I) contained a lot of glycine and lysine but none of such aromatic amino acids as tyrosine and phenylalanine. On the other hand, Cd-BP(II) contained leucine, histidine, aspartic acid and alanine but no aromatic amino acids.

Keywords □ Cd-binding high molecular weight proteins, biochemical character, isoelectric point, heavy metal analysis, amino acid composition

카드뮴은 지구상 존재하는 천연 원소로서 직접적으로나 food chain에 의해 생체에 흡수되는 것을 피할 수 없다. 카드뮴은 아연과 아연함금 과정에서 물리적으로 또는 화학적으로 생성된다. 1900년대에는 소량만이 생산되었으나 1975년도의 연간 세계의 생산량이 약 15,000톤에 이른다. 카드뮴은 염료, 니켈-카드뮴 건전지 그밖에 다른 산업에서 사용되고 음식중의 카드뮴양도 증가하고 있으며 흡연은 인체에 카드뮴을 축적하는데 크게 기여하고 있다.¹⁾ 이와같이 인간의 카드뮴 흡수는 대기의 흡입, 식연, 물과 음식의 섭취를 통해서 흡수될 수 있으나 산업장 근로자를 제외하고는 일반인들은 주로 섭취에 의해서 야기된다. 자연계에서의 카드뮴은 보통 아연과 공존하며 인간의 필수원소가 아니나 체내에 축적되는 경향이 있으며 더욱이 이원소는 사람에게 있어 약 20년(10~30년)의 생물학적 반감기를 갖고 있는 가장 독성이 높은 환경오염원으로 알려져 있다.^{2,3)}

일반적으로 표적기관에 흡수되거나 축적된 카드뮴은

대개 Metallothionein(MT)과 결합되어 착화되며⁴⁾ 세포내에서 non-toxic 형태로 알려져 있으며^{5,6)} 세포내에서 MT와 결합되지 않은 카드뮴은 독성형이라 설명할 수 있다.⁷⁾ 세포내에서 MT와 결합되지 않은 카드뮴은 대개 high molecular weight protein(HMWP) 분획에서 나타난다.⁹⁻¹²⁾ 카드뮴이 HMWP에 결합되면 그들의 고유의 기능이 억제되므로써 세포장해를 초래하여 카드뮴 독성의 표적일 가능성을 시사하고 있다.^{6,13)} 따라서 카드뮴과 결합되는 고분자량 단백질은 독성학적으로 중요할 것으로 생각되기 때문에 카드뮴과 친화력이 높은 고분자량 단백질에 대한 연구가 카드뮴의 독성을 이해하는데 절실히 요구된다.

그러므로 일차적으로 카드뮴과 친화력이 높은 고분자량 단백질인 Cd-BP(I)과 Cd-BP(II)를 분리 정제하여 분자량, Alcohol dehydrogenase 및 Alkaline phosphatase 효소활성도를 밝혔으며¹⁴⁾ 본 연구에서는 isoelectric focusing, 중금속 및 아미노산 조성등 생화학적 특성을 밝히고자 함을 연구의 목적으로 하였다.

따라서 분리정제한 Cd-BP(I) 및 Cd-BP(II)를 이용

* 본 논문에 관한 문의는 이 지자에 게로

하여 pI를 측정하고 유도결합 플라즈마 원자방출 분광기를 이용하여 중금속을 분석하였으며 아미노산 분석기를 이용하여 아미노산 조성을 관찰하였다.

실험방법

시료의 조제 - 체중 200 g 전후 수컷 Sprague Dawley를 계통엔지니어링에서 구입하여 실온에서 사육하면서 카드뮴 주사를 투여하였다. 카드뮴은 $CdCl_2 \cdot 2H_2O$ 를 사용하여 Cd 1 mg/kg body wt.로 복강 주사로 1일 1회, 연속 3일간 주사후 24시간 경과한 다음 간을 적출하였다. 간을 10 mM phosphate buffer(pH 7.0)으로 4°C에서 glass homogenizer로 균질화 시킨후 2시간동안 25,000 g에서 원심분리한 후 그 상층액을 -20°C에서 냉동한 후 다시 17,000 g로 원심분리하여 그상층액을 시료로 사용하였다. Fig. 1에서와 같이 시료를 Sephacryl S-100 column으로부터 분리하고 카드뮴이 높은 분획을 모아 다시 DEAE-Sephacryl column으로부터 분리하여 카드뮴 고분자량 단백질을 분리할 수 있었는데 이를 Cd-BP(I)으로 명명하였으며 또다시 Sulphonyl(S)-Sephacryl column으로부터 분리하여 또다른 카드

뮴 고분자량 단백질을 분리할 수 있었는데 이를 Cd-BP(II)로 명명하여 생화학적 특성을 위한 시료로 사용하였다.

중금속 측정 - 흰쥐의 간으로 부터 카드뮴 결합 고분자량 단백질을 분리 정제하는 과정에서 얻은 각 과정에서의 분획을 카드뮴을 비롯한 크롬, 아연, 구리등의 중금속양을 알기 위하여 한국원자력 연구소 소재 유도결합 플라즈마 원자방출 분광기(Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrophotometer, Model JY 50P)를 이용하여 분석하였다.

아미노산 분석 - 각 시료를 0.1 N HCl로 10배 희석한후 10분간 초음파 처리하고 70 μ l를 취해 reaction vial에 넣어 완전 건조시켰다. 여기에 6 N HCl(1% phenol) 250 μ l를 넣어 질소가스로 3회 반복 치환한후 105°C에서 24시간 가수 분해시켰다. 새로운 reaction vial에 넣은후 완전 건조시켰다. 1 ml glass sample tube에 1 ml 0.1 N HCl을 넣고 5분간 초음파 처리후 vortexing시킨후 여과지(0.45 μ m)로 여과하여 아미노산 자동분석기(Amino Acid Analyzer, Beckman 6300)로 분석하였다. 표준 아미노산 분석은 아미노산 표준품(2.5 μ mol/ml, Pierce)을 사용하여 분석하였다.

Isoelectric focusing(IEF) - 각각 분리한 고분자량 카드뮴 결합 단백질의 native한 형태의 동위효소isoelectric point를 측정하기 위하여 Manabe방법에¹⁵⁾ 따라 isoelectricfocusing gel electrophoresis를 실시하였다. Ampholine은 pH 3.5~10.0범위의 것을 사용하였으며 pH gradient의 확인은 gel을 0.3 cm씩 잘라 증류수로 용출시킨 후 pH meter로 측정하였다. 0.25% N,N,N,N'-tetramethyl ethylenediamine(TEMED) 용액 2 ml, Acrylamide: bisacrylamide(16:0.8)용액 4 ml, 40% ampholine용액 1.8 ml, 0.1% Ammonium persulfate 1.2 ml를 섞어 4% gel을 만들어 polymerization 시킨후 tube의 밑은 투석막(dialysis membrane)으로 덮었다. 그후 gel위에 overlay 용액(10% sucrose를 함유한 2% ampholine용액)을 30~40 μ l를 얹고 시료는 그위에 얹었다. 양전극 용액으로는 0.01 M H_3PO_4 , 음전극 용액으로는 0.04 M NaOH를 사용하여 tube당 2 mA의 전원을 걸어주고 (40 min.) 230 volt까지 올라가면 460 volt로 20시간 전기영동을 실시하였으며 염색은 50% methanol과 7% acetic acid용액에 녹인 0.125% Coomassie brilliant blue로 60°C에서 2시

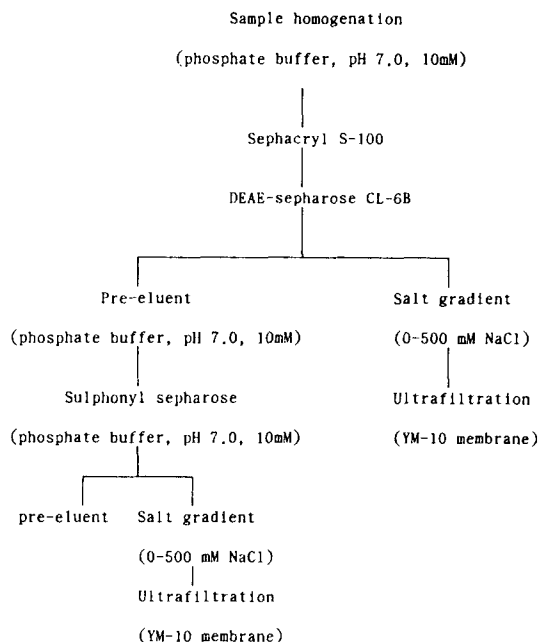


Fig. 1 - Cd-binding high molecular weight protein purification procedure.

Table I — Concentration of various elements in extracted fraction by purification step of Cd-binding high molecular weight protein from rat liver exposed to Cd

Elements	Concentration of various elements($\mu\text{g/ml}$)				
	Crude Extract	Sephacryl S-100	DEAE Sepharose	S Sepharose	MT* from rabbit liver
Cr	0.038	0.015	0.020	-0.002	0.004
Co	0.017	-0.001	0.035	-0.005	-0.000
V	-0.017	0.009	0.002	-0.005	0.004
Zn	9.38	1.90	0.756	0.246	0.440
Ni	0.024	0.060	0.075	0.002	0.000
Cu	0.486	0.197	0.149	0.089	0.017
Pb	0.201	0.045	0.068	-0.037	0.030
Ba	0.005	0.000	0.003	0.008	-0.001
Cd	11.7	0.476	0.075	0.011	2.5
Mn	0.120	0.039	0.010	0.001	0.000
Protein (mg/ml)	48.8	1.69	0.38	0.17	0.1
Cd $\mu\text{g/mg}$ protein	0.25	0.28	0.2	0.06	2.5

* Metallothionein: Purchased from Sigma Chemical Co.

Table II — The amino acid compositions of Cd-BP(I) and Cd-BP(II)

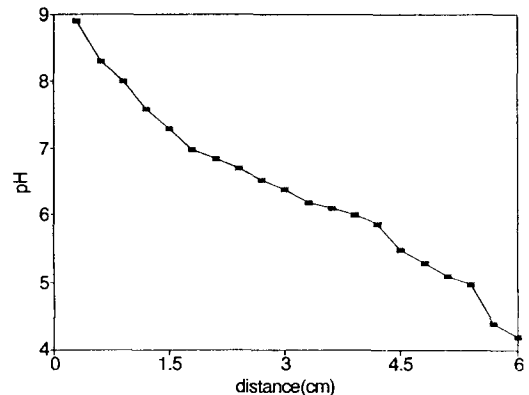
Amino acid	Cd-BP(I)	Cd-BP(II)
Aspartic acid	0.0267	0.0838
Threonine	N.D.	0.0400
Serine	0.193	0.0397
Glutamic acid	0.0231	0.0346
Proline	N.D.	0.0217
Glycine	0.177	0.0523
Alanine	N.D.	0.0732
Cysteine	-	-
Valine	0.0105	0.0393
Methionine	N.D.	N.D.
Isoleucine	0.0180	0.0489
Leucine	0.0196	0.1031
Throsine	N.D.	0.0538
Phenylalanine	N.D.	0.0569
Histidine	N.D.	0.0887
Lysine	0.966	0.0650
Arginine	N.D.	N.D.

N.D. = Not Detected

간 동안 염색하여 10% acetic acid, 50% methanol 용액으로 탈색시켰고 7% acetic acid로 고정하였다.

결 과

단백질의 중금속 분석 - 카드뮴 결합 고분자량 단백질의 분리 정제과정중의 시료에 대한 중금속을 측정한 결과는 Table I에서와 같다. 여러가지 금속 가운데서 카드뮴과 아연이 주종을 이루었으며 그밖에 구리의 함량이 높았고 크롬, 코발트, 망간등이 미량 함유하고 있다. 이들을 단백질 mg당 카드뮴 μg 으로 표시해 보면

**Fig. 2** — pH gradient of isoelectric focusing gel. Isoelectric focusing was performed at constant voltage of 460 V for 20 hrs.

DEAE Sepharose column으로 부터 분리정제한 Cd-BP(I)은 0.2이었으며 S-Sepharose column으로 부터 분리정제한 Cd-BP(II)는 0.06이었다.

단백질의 아미노산 조성 - 카드뮴 결합 고분자량 단백질로 분리정제한 Cd-BP(I) 및 Cd-BP(II)의 아미노산 조성을 관찰하기 위하여 아미노산 분석기를 이용하여 아미노산을 분석한 결과는 Table II와 같다. Table II에서와 같이 Cd-BP(I)은 glycine의 함량이 가장 높아 0.177 $\mu\text{mol/ml}$ 였으며 그다음이 lysine으로 0.0966 $\mu\text{mol/ml}$ 를 나타내었으며 그밖에 aspartic acid, serine, glutamic acid, valine등이 검출되었다. Cd-BP(II)의 경우는 leucine의 함량이 가장 높

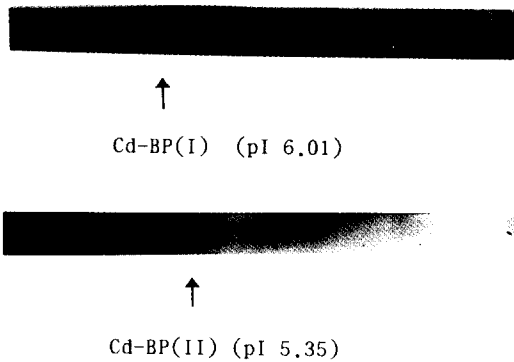


Fig. 3— Isoelectric focusing gel electrophoresis of Cd-BP (I) and Cd-BP(II).

아 $0.1031 \mu\text{mol/ml}$ 이었으며 그다음에 histidine으로 $0.0887 \mu\text{mol/ml}$ 를 나타내었으며 그밖에 aspartic acid, alanine, lysine등이 검출되었다.

단백질의 등전점 - 카드뮴 결합 고분자량 단백질로 분리정제된 Cd-BP(I) 및 Cd-BP(II)의 등전점을 결정하기 위해 Manabe방법에¹⁵⁾ 의해 전기영동하였다. 우선 등전점을 결정하기 위해 표준곡선을 구한 결과는 Fig. 2와 같다. 실제 isoelectric focusing에서 pH gradient 형성은 4.5~8.6 으로 생성되었다. Cd-BP(I)과 Cd-BP(II)의 등전점을 위한 전기영동한 결과는 Fig. 3과 같다. Fig. 2와 3을 통해서 등전점을 구해준 결과 Cd-BP(I)과 Cd-BP(II)의 pI값은 6.01과 5.35 정도이었다.

고 찰

카드뮴을 처리한 흰쥐의 간에서 두종류의 카드뮴과 결합하는 고분자량 단백질을 분리, 정제하여 Cd-BP(I) 및 Cd-BP(II)로 명명하여 지난번에 생화학적 특성으로 분자량을 측정하여 보고한 바 있다. 본 연구 보고에서는 분자량 이외의 생화학적 특성을 보고하고자 한다. 우선 두 시료에서 카드뮴이외의 중금속에 대한 함유량을 관찰한 결과 구리 크롬등은 미량 검출되었으나 모두 아연을 많이 함유하고 있어 아연 함유 단백질을 알 수 있었다. 또한 Cd-BP(I)은 단백질 1M당 카드뮴이 70 mM이었으며 Cd-BP(II)는 단백질 1M당 카드뮴이 10 mM로 나타났다. 이들 단백질의 아미노산 조성을 살펴보면 Cd-BP(I)은 MT의 특성이 방향족 아미노산 즉, tyrosine 및 phenylalanine등이 검출되지 않았으며 그밖에 gly-

cine과 lysine의 함량이 다른 아미노산 보다 높았다. 반면 Cd-BP(II)는 방향족 아미노산 즉, tyrosine 및 phenylalanine등이 약간 검출 되었으며 histidine 및 leucine등의 함량이 비교적 높았으나 모든 일반적인 아미노산을 두루 함유하고 있었다. 따라서 Cd-BP(I)과 Cd-BP(II)는 아미노산 조성으로 볼때 전혀 다른 단백질임을 알 수 있었으며 씨스테인에 대한 실험을 수행하지는 못했지만 본 연구결과와 지난번 전기영동상 및 분자량으로 볼때 Cd-BP(I)과 Cd-BP(II)는 metallothionein이 아님이 분명하였다. 이 두 단백질의 등전점을 살펴보면 Cd-BP(I)은 6.01이었으며 Cd-BP(II)는 5.35를 나타내었다. 현재까지 카드뮴과 결합되는 고분자량 단백질에 대해 분리보고된 예는 매우 적으며 특히 *in vivo* 상태에서 분리정제하여 생화학적 특성을 보고한 예는 거의 없다. Sunaga등은¹⁷⁾ 카드뮴을 주사한 흰쥐 간의 용해성 분획에서 MT보다 높은 친화력을 갖는 카드뮴 결합 단백질을 동정하였는데 이는 아연 결합 단백질을 밝혔으며 또한 이는 alcohol dehydrogenase로 동정되었는데⁷⁾ 이는 *in vitro*에서 카드뮴과 결합하는 것으로 알려져 있다.^{17, 18)} ADH에서 non-active site에 결합된 아연이 카드뮴과 *in vivo*나 *in vitro* 상에서 대체되었는데 카드뮴은 *in vivo* 상에서는 *in vitro* 상에서 대체한 것보다 훨씬 많은 양이 ADH에 결합되어 있었으며 효소활성은 *in vivo* 상에서 감소하였다. 그러나 ADH 효소활성도는 *in vivo*에서는 아연대신 카드뮴이 붙었는데도 별 영향이 없었다. 이러한 차이는 고분자량 결합부위의 카드뮴보다 active site의 카드뮴의 친화력이 약한 때문으로 설명하였다.⁷⁾ 그밖에 카드뮴과 결합된 고분자량 단백질에 대해 분리정제한 예는 흰쥐 간에서 분리한 40 kD의 Cd-BP는 ornithyl carbamoyltransferase¹⁹⁾이며 흰쥐 혈청에서 분리한 77 kD의 Cd-BP는 mercaptoalbumin²⁰⁾ 이라고 분리 보고된 바 있다. 이와같이 카드뮴과 결합하는 고분자량 단백질에 대한 연구는 소수에 불과하다. 본 연구에서 분리한 Cd-BP(I)은 등전점이 6.01이며 아연을 함유하였고 또한 Cd-BP(II)는 등전점이 5.35이며 아연을 함유하는 단백질이었으며 아미노산 조성 분석결과, Cd-BP(I) 및 Cd-BP(II)는 서로 다른 단백질로 Metallothionein이 아님이 분명하였다.

감사의 글

본 연구는 보사부 신약개발 과제의 연구비 지원에 의

해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

문 헌

- 1) Engvall, J., and Perk, J.: Prevalence of hypertension among cadmium-exposed workers. *Arch. Environ. Health* **409**, 185 (1985).
- 2) Takabatake, E.: Experimental studies on human cadmium studies in Japan (K. Tsuchiya, ed), p. 129. Kodasha, Tokyo (1978).
- 3) Friberg, L., Kjellstrom, T., Nordberg, G. and Piscator, M.: *Handbook on the toxicology of metals*, Biomedical press, Elsevier, North Holland, Amsterdam-New York-Oxford, p. 135 (1979).
- 4) Lucis, O., Link, M.E., and Rucis, R.: Turnover of cadmium 109 in rats. *Arch. Environ. Health* **18**, 307 (1969).
- 5) Frazier, J. M.: The role of Metallothionein in the systemic distribution of cadmium. In Foulke, E.C. (ed.) *Biological Roles of Metallothionein* Elsevier, North-Holland, New York, pp. 141 (1982).
- 6) Webb, M.: Toxicological significance of metallothionein. In Kagi, J.H.R. and Kojima, Y. (eds.), *Metallothionein II* Birkhauser Verlag, Basel, pp. 109 (1987).
- 7) Suzuki, K. T., Sunaga, H., Yamane, Y. and Aoki, Y.: Binding of cadmium to alcohol dehydrogenase in the liver before induction of metallothionein. *Research communications in chemical pathology and pharmacology* **74**, 223 (1991).
- 8) Polek, B.: Cadmium-binding proteins of digestive tract caterpillars of the species *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae). *Biologia* **46**, 947 (1991).
- 9) Goering, P. L. and Klaassen, C. D.: Altered subcellular distribution of cadmium following cadmium pretreatment. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **70**, 195 (1983).
- 10) Goering, P. L. and Klaassen, C. D.: Zinc-induced tolerance to cadmium hepatotoxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **74**, 299 (1984).
- 11) Kershaw, W. C., Iga, T. and Klaassen, C. D.: Ethanol decreases cadmium hepatotoxicity in rats: possible role of hepatic metallothionein induction. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **106**, 448 (1990).
- 12) Tao, L. and Wang, X.: Distribution of cadmium to blood components in rat. *Human Yike Daxue Xuebao* **17**, 25 (1992).
- 13) Muller, L.: Consequences of cadmium toxicity in rat hepatocytes: Mitochondrial dysfunction and lipid peroxidation. *Toxicology* **40**, 285 (1986).
- 14) Chun, K. J. and Kim, B. H.: Isolation and purification of Cd-binding high molecular weight protein in rat liver(I). *Yakhak Hoeji* **38**, 608 (1994).
- 15) Manabe, T., Kojima, K., Jitzukawa, S., Hoshino, T. and Okuyama, T.: Normalization of two dimensional electrophoresis patterns of human plasma proteins and comparisons of cerebrospinal fluid and urine patterns in terms of the normalized map. *J. of Biochem.* **89**, 841 (1981).
- 16) Sunaga, H., Aoki, Y., Yamane, Y. and Suzuki, K. T.: Detection of a zinc-containing protein as the primary cadmium-binding protein before induction of metallothionein in rat liver. *Eisei Kagaku* **33**, 423 (1987).
- 17) Anderson, I., Bauer, R. and Demeter, I.: Structural information concerning the catalytic metal site in horse liver alcohol dehydrogenase, obtained by perturbed angular correlation spectroscopy on ¹¹¹Cd. *Inorg. Chim. Acta.* **67**, 53 (1982).
- 18) Sytkowski, A. J. and Vallee, B. L.: Cadmium-109 as a probe of the metal binding sites in horse liver alcohol dehydrogenase. *Biochemistry* **18**, 4095 (1979).
- 19) Aoki, Y., Sunaga, H. and Suzuki, K.T.: A Cadmium-binding protein in rat liver identified as ornithine carbamoyltransferase. *Biochem. J.* **250**, 735 (1988).
- 20) Suzuki, K. T., Sunaga, H., Kobayashi, E. and Shimojo, N.: Mercaptoalbumin as a selective cadmium-binding protein in rat serum. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **86**, 466 (1986).