□ 보 문 □

韓應昆誌 34(3) : 181~190 (1995)
Korean J. Appl Entomol.

Aedes aegypti L. 난성숙과정중 생성되는 Mitochondrial Malate Dehydrogenase의 정제 및 특성

Purification and Characterization of Mitochondrial Malate Dehydrogenase during Ovarian Developmentin *Aedes aegypti* L.

김인규 · 이강석 · 정규회[1] · 박영민[2] · 성기창[2]

In Kyu Kim, Kang Suk Lee, Kyu Hoi Chung[1], Young Min Park[2] and Kee Chang Sung[2]

ABSTRACT Malate dehydrogenase in the mosquito ovary after a blood meal, *Aedes aegypti*, was purified and characterized. MDH purification steps involved DEAE-Sepharose, S-Sepharose and Cibacron blue affinity chromatography. The purified MDH was 70,000 daltons in molecular weight and was a homodimer consisting of two identical subunits. Optimal activity of purified MDH was obtained pH 9.0-9.2 in malate-oxaloacetate reaction and pH 9.8-10.2, in oxaloactate-malate reaction. With malate as substrate, purified mitochondrial MDH (1.28×10^{-4} M) had lower *Km* value than cytoplasmic MDH (8.92×10^{-3} M). MDH activity was inhibited by citrate, α-ketoglutarate, and ATP. Inhibition of MDH activity by ATP and citrate was less in malate-oxaloacetate reaction and in oxaloacetate-malate reaction. MDH activity was completely inhibited by ATP in oxaloacetate-malate reaction and not inhibited by citrate in malate-oxaloacetate reaction. Temporal activity change of MDH is similar to that of isocitrate dehydrogenase in the ovary after blood feeding; their activities in the ovary began to rise at 18 hours after a blood meal, and reached at the maximal level at 48 hours.

KEY WORDS Fat body, *Aedes aegypti*, mitochondrial malate dehydrogenase, substrate, chromatography

초 록 암컷 *Aedes aegypti*의 난성숙과정에서 새로 나타나는 malate dehydrogenase(L-malate, NAD^+ oxidoreductase, EC 1.1.1.37, MDH)를 DEAE-Sepharose, Sulphonyl-Sepharose, Cibacron 3FGA affinity chromatography를 이용하여 분리 정제하여 그 특성을 조사하였다. 분자량은 70,000 dalton 정도의 dimer 형태로 되어 있으며 최적 pH는 malate-oxaloacetate 반응에서는 pH 9.0~9.2, oxaloacetate-malate 반응에서는 pH 9.8~10.2이었다 정제된 MDH는 mitochondria에 위치하고 있으며 기질로서 malate에 대한 *Km*값의 경우 1.29×10^{-4} M, oxaloacetate에 대한 *Km*값은 6.58×10^{-4} M, NAD에 대한 *Km*값은 0.76×10^{-3} M이며 NADH에 대한 *Km*값은 3.8×10^{-3} M을 보이고 있으며 각각의 기질에 의한 저해현상을 보이고 있었다. 기질에 대한 *Km*값을 부분적으로 분리한 DEAE-sepharose에 흡착된 원형질 MDH와 비교한 결과 malate에 대한 *Km*이 8.92×10^{-3}으로 상당한 차이를 보이고 있었다 또한 정제된 MDH는 citrate, α-ketoglutarate, ATP 등의 대사산물에 의하여 저해작용을 받았다 ATP 및 citrate에 의한 MDH 활성도 저해는 oxaloacetate-malate반응에서 보다는 malate-oxaloacetate 반응에서 덜 일어났다. Oxaloacetate-malate 반응의 경우 ATP에 의하여 저해작용이 완전히 일어났으며 malate-oxaloacetate반응에서는 citrate에 의하여 저해작용이 일어나지 않았다. 흡혈 후 생성되는 MDH는 난소에서 합성되며 흡혈 후 난소에서 18시간 때부터 활성도가 나타나 48시간 이후 최고 활성도가 유지되는데 TCA회로의 isocitrate dehydrogenase의 경우 난소내에서의 활성도 변화가 MDH의 변화 양상과 같았다.

검색어 지방체, *Aedes aegypti*, mitochondrial malate dehydrogenase, 기질 크로마토그래피

Korea Atomic Energy Research Institute,
[1]Department of Biology, Kyong Gi University
[2]Department of Biology, Sung Kyun Kwan University

모기류는 흡혈 후 합성되는 난황단백질외에도 중장 및 난소에서 나타나 난소발달 및 난세포 성숙과정에서 합성되어 생리적 기능을 수행하고 있는 효소단백질로 trypsin 및 dopa decarboxylase 등이 연구보고되어졌다(Briegel and Foster 1975, Briegel and Lea 1979, Schlaeger and Fuchs 1974).

이 외에도 흡혈 후 변화되는 효소로는 동위효소가 있는데 모기의 난성숙과정중 변화 양상을 보이고 있는 동위효소에는 MDH, alkaline phosphatase, superoxide dismutase, pyruvate dehydrogenase(Fortunato and Fuchs 1980) 등이 있으며 특히 MDH는 흡혈 후 72시간 경과된 난소에서만 나타나고 있다(Kang and Kim 1986). 따라서 난황단백질 합성이나 난성숙 과정에서 흡혈전과는 상이한 동위효소형을 보이고 있으므로 효소 특성의 차이에 따른 기능상의 역할의 차이가 있으리라고 생각된다. 그러므로 효소학적인 측면에서 난황단백질 합성에 관여하리라 생각되는 효소나 단백질을 추적, 그 특성을 살펴보는 것은 난성숙에 관한 생식 생리를 연구하는데 있어 가장 기본적이라 할 수 있다.

MDH는 세포내의 존재가 확인된 이래 그 반응기작 및 분자 구조에 대하여 많은 연구가 수행되어 왔다. 대사적 기능으로는 oxaloacetate를 malate로 가역적으로 전환시킴으로서 malate-asparate shuttle, malate-citrate shuttle통한 lipid의 생합성, glucose의 생합성, aspartate 생합성 등 다양한 대사기능에 관여하고 있다(Meijer and Vandam 1974, Storey and Bailey 1978, Tripathi and Shukla 1987). 또한 MDH는 세포내 분포에 따라 상이한 동위효소형으로 나타나 cytoplasmic MDH와 mitochondrial MDH로 분포되며 이들의 효소적 특성의 차이와 세포내에서의 역할에 대한 접근도 이루어졌으며(Beeckmans and Kanarek 1981) 최근에는 발생단계에 따라 특별한 기관에 서로 상이한 동위효소형을 보이고 있는 것으로 알려졌다(Barnes *et al.* 1975, Nuramaker and Witson 1982). 이러한 발생단계 및 기관 특이적 동위효소는 MDH에 한정되지 않고 이미 많은 효소에서 나타나고 있는데 그 대표적인 것이 alcohol dehydrogenase, hexokinase, glucose-6-phosphate dehydrogenase, lactate dehydrogenase, creatine kinase 등 상당히 다양하다(Storey and Bailey 1978, Nuramaker and Witson 1982).

본 연구에서는 모기가 흡혈한 후 72시간 경과시까지의 충체, 지방체 및 난소에서 MDH와 IDH 활성도의 변화 및 특정한 시기에 특정한 장소에서 나타나는 MDH의 동위효소를 분리 정제하여 각 기질 및 대사산물에 대한 효소의 반응성 및 생화학적인 특성을 규명하므로써 이에 따른 난성숙과정에 있어서 생리적 기능을 규명하는 기초자료를 제공하는데 목적이 있다

재료 및 방법

1. 실험 곤충 사육

모기는 미국의 노틀담 대학교 Vector Biology Laboratory에서 Rock strain의 암컷 *Aedes aegypti*를 분양받아 Manual for Mosquito Control and Experimental Techniques(American Mosquito Control Association Incorporation)의 방법에 따라 온도 27°C± 1°C, 습도 70%± 5%, 광주기 16 : 8(L · D)로 조절되는 항온 항습실에서 사육하였다. 유충은 10% liver powder를 먹이로 하여 사육하였고 성충은 물과 10%의 설탕물을 솜에 적시어 먹이를 공급하였으며 흡혈은 모기의 사육상 안에서 실험용쥐를 철망으로 움직이지 못하게 한 후 1시간 이내에 완료시켰다. 효소정제를 위하여 모기는 흡혈을 시킨후 66~72시간에 성충을 수거하였다.

2. MDH의 동위효소의 정제

흡혈 후에 생성되는 MDH의 생화학적 특성을 비교검토하기 위하여 DEAE-Sepharose 음이온교환수지와 Sulphonyl-Sepharose 양이온교환수지, Dye-ligand affinity(Cibacron blue 3F-G-A-Sepharose) column chromatography를 이용하여 분리 및 정제하였다. Dye-ligand gel의 합성은 Bohme 방법을 사용하였다(Bohme *et al.* 1972). 모기는 흡혈한 후 72~73시간이 경과한 암모기 성충에서 분리한 난소를 10 mM phosphate buffer, pH 7.0로 4°C에서 glass homogenizer로 균질화 시킨 후 1시간 동안 25,000g에서 원심분리한 상등액을 동일 buffer로 평형시킨 DEAE-Sepharose column(2.5×20 cm)에 흡착시켰다 DEAE-Sepharose에 흡착되지 않은 단백질 분획을 받아 MDH의 활성도를 측정한 후 활성분획을 모아 YM-10 amicon ultramembrane을 사용하여 농축시킨

다음 동일 buffer로 평형된 Sulphonyl-Sepharose(1.5×15 cm)에 흡착시켜 10~300 mM의 NaCl로 염농도 구배로 용출하였다 MDH의 활성도가 나타나는 분획을 모아 Amicon YM-10 membrane을 사용하여 ultrafiltration을 시행하여 NaCl을 제거하면서 농축시켰다. 농축시킨 시료를 10 mM phosphate buffer, pH 6.0으로 평형시킨 Cibacron Blue 3F-G-A-Sepharose affinity column에 흡착시켜 세척한 다음 10 mM phosphate buffer, pH 6.0/100 mM NaCl로 용출하여 MDH를 정제하였다. 분리된 MDH의 분자량을 측정하기 위하여 Sephacryl-S200을 채운 Column(1.2×110 cm)을 사용하여 측정하였다

3. Mitochondrial MDH의 추출

흡혈 후 72시간 된 모기 1g을 5 ml의 250 mM sucrose, 100 mM KCl, 3 mM $MgCl_2$를 함유하고 있는 homogenation buffer(50 mM phosphate buffer, pH 7.0)로 Potter-Elvehjem 파쇄기로 파쇄한 다음 1,000 g에서 10분간 원심분리하여 침전물을 제거하였다. 그후 상등액을 12,000g에서 15분간 원심분리하여 침전된 물질을 mitochondria 분획으로 사용하였다. 이때 침전물은 buffer로 2~3회 세척하여 세포질 분획이 최소한으로 섞이게 하였으며 mitochondria 분획의 순도를 검사하기 위하여 세포질 효소인 lactate dehydrogenase의 활성도를 측정하였다. 이 침전물을 0.1% Triton X-100을 포함한 50mM phosphate bufer, pH 7.0에서 20분간 방치시킨 후 40,000 g에서 원심분리한(Goulielmos *et al* 1989, Tripathi *et al.* 1987)후 상층액을 mitochondria 분획으로 사용하였다.

4. 효소 활성도 측정 및 최적 pH의 결정과 열안정성

MDH의 활성도 측정은 25°C에서 3 ml cuvette 속에서 Shimadzu recording spectrophotometer (UV-160A)로 340 nm에서 흡광도의 증감(malate-oxaloacetate반응에서의 NADH 형성에 따른 흡광도 증가 및 oxaloacetate-malate 반응에서의 NAD 형성에 따른 흡광도 감소)을 측정하므로써 시행하였다. Malate-oxaloacetate반응에서 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 9.0)용액 2.6 ml, 0.015 M NAD^+용액 0.2 ml, 0.02 M malate용액 0.1 ml, 시료 0.1 ml를 혼합하였고 oxaloacetate-malate반응에서는 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 9.0)용액 2.6 ml, 0.007 M NADH 용액 0.2 ml, 0.012 M OAA를 혼합하여 2분간 흡광도의 변화를 측정하였다. MDH 동위효소의 기질에 대한 *Km*(Michaelis-Menten상수) 값을 결정하기 위하여 동일한 pH(100 mM Tris-HCl buffer, pH 9.0)와 고정된 효소의 양 아래서 하나의 기질(malate, oxaloacetate 혹은 NAD^+, NADH)은 고정시키고, 다른 기질(NAD^+, NADH 혹은 malate, oxaloacetate)은 농도를 조절하여 측정된 초기속도(ΔA/min 혹은 $\mu moles \times mg^{-1} \times min^{-1}$)를 구하여 Lineweaver-Burk plot을 이용하여 *Km*값을 결정하였다. Oxaloacetate나 L-malate 등은 기질로 사용되기 때문에 이론적으로 *Ki*(inhibition constant)값을 구할 수 없다. 따라서 각각의 기질에 대한 *Ki* 값은 실험적으로 최고활성도의 50%를 나타내는 각 기질의 농도(Bernstein 1978)로 결정하였다. MDH 동위효소의 최적 pH는 7~11의 범위에서 0.1 M Tris-HCl buffer와 0.1 M Glycine-NaOH buffer를 이용하여 구하였다. 특히 malate-oxaloacetate반응의 경우 NAD^-는 pH 11.0 이상에서는 NAD^+ 자체가 변화하므로 측정할 수가 없다. 효소 활성도의 측정은 위의 조건과 동일하게 실시하였다. 열에 대한 안정성은 20~60°C에서 효소를 각각 0~30분간 열처리를 하여 남아있는 활성도를 측정하여 조사하였다.

5. 전기영동(polyacrylamide gel electrophoresis: PAGE)

정제된 MDH 동위효소를 분석하기 위하여 non dissociating buffer system(Davis 1964)을 이용한 전기영동을 실시하였다. 전기영동 후 염색은 1 M malate용액 1 ml, 1% NAD^+ 용액 2 ml, 1% phenazine methosulfate용액 0.5 ml, 1% nitroblue tetrazolium 용액 1 ml, 0.5 M Tris-HCl buffer(pH 9.0) 용액 35 ml 등이 혼합된 기질염색법을 사용하여 15분간 염색시킨 후 7% acetic acid 용액에 고정시켰으며, 일반 단백질 염색은 50% methanol과 7% acetic acid 용액에 녹인 0.125% Coomassie brilliant blue로 60°C에서 2시간 동안 염색한 후 10% acetic acid, 50% methanol 용액에서 탈색시켰다 MDH 동위효소의 분자량은 10% sodium dodecyl sulfate(SDS)-PAGE (Laemmli 1971) 방법을 사용하였다. 단백질 농도의

정량은 Bradford 방법(1976)에 따라 측정하였다

결 과

1. 모기의 MDH의 분리와 정제

흡혈 후 생성되는 MDH의 경우 phosphate buffer, pH 7.0으로 평형시킨 DEAE-Sepharose column 상에서 전혀 흡착되지 않고 빠르게 용출되는 것으로 보아 강한 염기성 단백질로 생각된다. DEAE-Sepharose에 흡착되어 있는 단백질을 염농도 구배로 용출한 분획을 pH 9.0에서 oxaloacetate-malate 반응으로 측정하였을 경우는 활성도가 검출되었다. Malate-oxaloacetate 반응에서는 흡착되지 않고 용출된 분획에서는 활성도를 보였으나 흡착된 분획에서는 활성도가 거의 나타나지 않고 있다. 음이온 교환수지에서 흡착되지 않고 용출된 분획을 농축시킨후 S-Sepharose에 흡착시켜 염농도 구배로 chromatography를 실시하여 활성도가 있는 분획을 농축한 후 최종적으로 Cibacron affinity chromatograpy를 사용하였다. 이때 용출액으로는 NAD^- 대신 100 mM의 NaCl을 사용하였다(Fig. 1). Table 1에서 보는 바와 같이 MDH의 경우 최종 정제과정인 Cibacron affinity chromatography를 사용한 후 yield는 대략 60~70% 정도를 보이고 있으며, 난소를 파쇄한 후 원심분리한 분획의 MDH의 비활성도는 0.175 umole NADH/min/mg이었으며 정제된 후에는 69.84 umole NADH/min/mg로 purification fold가 400배 정도가 정제되었다.

2. 분리 정제된 MDH의 전기영동 및 분자량

정제된 MDH시료를 5% nondenaturing 방법으로 전기영동을 한 결과 MDH는 강한 염기성 단백질로서 전기영동결과 매우 짧은 이동거리를 나타내고 있었다(Fig. 2). Fig. 2C는 흡혈 후 72시간이 경과한 모기의 몸체에서 mitochondria분획을 모아 단백질을 추출한 후 전기영동을 하여 기질염색법으로 염색한 것이다. 그 결과 흡혈 후 새롭게 생성되는 MDH는 5% 전기영동상에서 같은 위치에 있는 것을 볼 수 있었다. 따라서 흡혈 후 생성되는 MDH는 mitochondria에 존재함을 알 수 있었다. 분리 정제된 MDH의 분자량을 측정하기 위하여 10% SDS-PAGE를 한 결과 정제된 MDH의 monomer의 분자량은 35,000이었

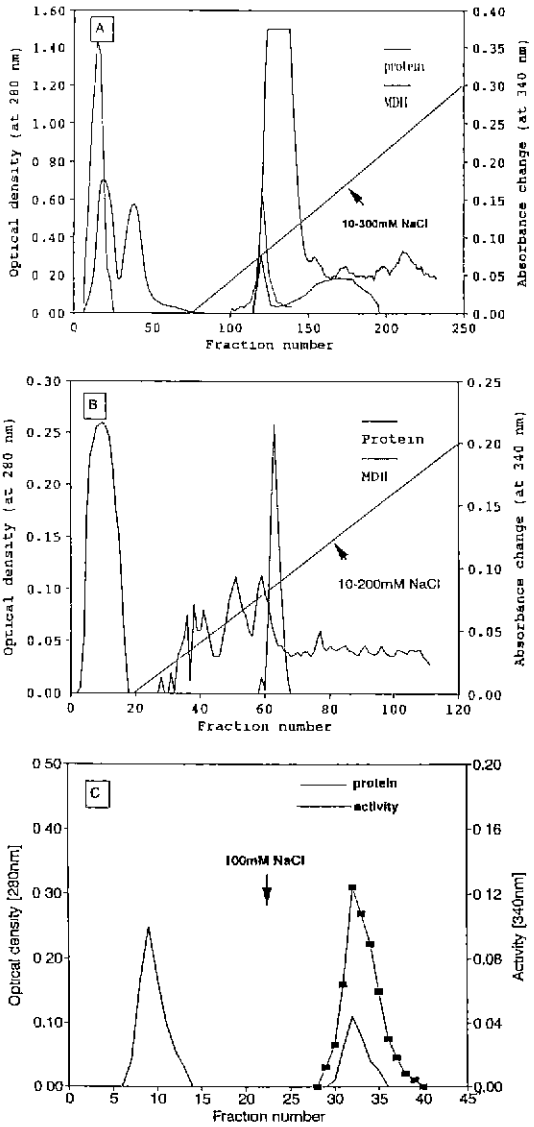


Fig. 1. Chromatographic purification of *Aedes aegypti* ovarian mitochondrial MDH (A) DEAE-Sepharose ion exchange chromatography, (B) S-Sepharose ion exchange chromatography, (C) Cibacron blue Sepharose affinity chromatography.

으며 Sephacryl-S200으로 측정한 분자량은 70,000이었다(Fig. 3).

3. 분리된 MDH의 최적 pH 및 열 안정성

분리 정제된 MDH의 최적 pH는 oxaloacetate-malate 반응에서는 pH 9.0과 9.2사이에서 최적을 보였

Table 1. Purification procedure of michondrial MDH from *Aedes aegypti* ovary

	Total activity (umole NADH min)	Total protein(mg)	Specific activity (umole NADH/min/mg)	Yield (%)	Purification fold
Crude extract	84.1	480	0.175	100	1
DEAE-Sepharose(YM-10)	78.2	90.4	0.867	93	4 95
S-Seppharose(YM-10)	67	4 42	7.58	79.6	43.31
Affinity(Cibacron)	58.44	0.395	69 48	64	394 29

Fig. 2. Davis-polyacrylamide gel electrophoresis of purified MDH. A) Coomassie staining, B) Specific staining, C) Specific staining protein extracted from mitochondrial fraction in *Aedes aegypti* ovary.

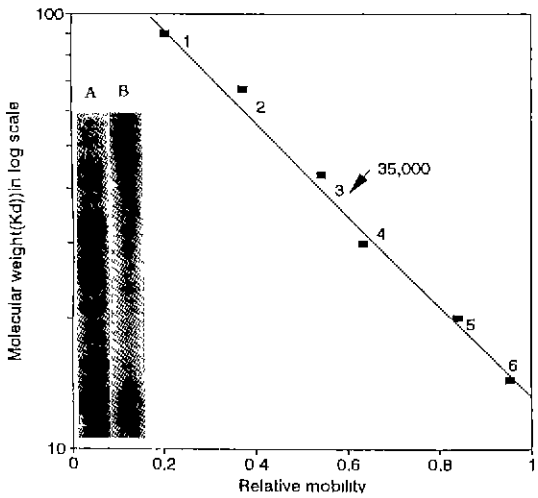


Fig. 3. Determination of molecular weight of *Aedes aegypti* ovarian mitochondrial malate dehydrogenase subunit by SDS polyacrylamide gel electrophoresis. Lane A: Molecular size standards were as follows 1: Phosphorylase b(94KD), 2: Bovine Serum Albumin(67 KD), 3: Ovalbumin(43KD), 4: Carbonic Anhydrase (30 KD), 5: Soybean Trypsin inhibitor(20.1KD), 6. Lactalbumin(14.4KD); Lane B: Purified *Aedes aegypti* ovarian mitochondrial malate dehydrogenase.

으며 malate-oxaloacetate 반응의 경우 pH 9.8과 10.2 사이였다(Fig. 4). 정제된 MDH는 20~45°C에서는 비교적 안정하였으나 60°C에서는 시간경과에 따라 효소활성도가 급격히 감소하였다(Fig. 5).

4. 분리 정제된 MDH의 각 기질에 대한 *Km*값 및 기질억제

Malate, OAA 및 NAD^+, NADH에 대한 *Km*값은 측정한 실험치를 회귀방법을 사용하여 Lineweaver-Burk plot을 만들어 Grapher program으로 자료를 분석하여 각각의 *Km*값을 이것으로부터 구하였다 (Table 2). 흡혈 후 새롭게 생성된 MDH의 경우 DEAE-Sepharose에 흡착된 cytoplasmic MDH보다 특히 malate에 대한 *Km* 값이 상당히 작은 것을 볼 수 있는 반면 OAA의 경우는 두 동위효소간의 *Km* 값은 차이를 보이지 않았다. Malate의 경우 흡혈 후 생성되는 mitochondrial MDH에서의 *Km*값 보다 cytoplasmic MDH의 *Km*값이 약 70배 정도의 차이를 보이고 있다. 이러한 현상은 난성숙시 malate가 OAA로 전환되어야 하는 생리적 현상이 일어나고 있음을 암시하고 있다. OAA경우 각각 6.58×10^{-4} M와 8.68×10^{-4} M으로 별 차이가 없었다. NADH의 *Km*값은 각각 0.76×10^{-3} M과 2.04×10^{-3} M이며 NAD의 경우는 각각 3.8×10^{-3} M과 9.2×10^{-3} M의 값을 보였다.

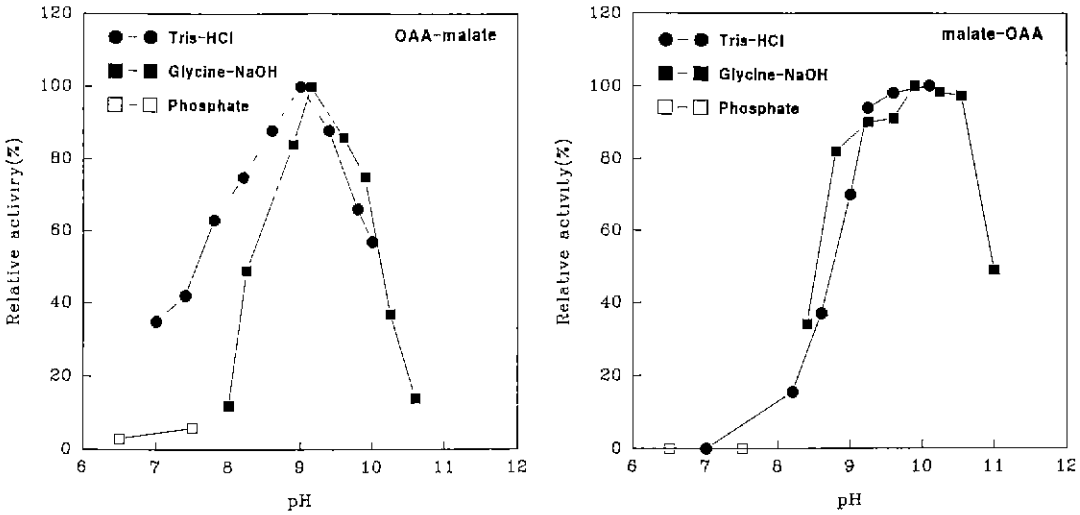


Fig. 4. Effect of pH on the activity of *Aedes aegypti* ovarian mitochondrial MDH.

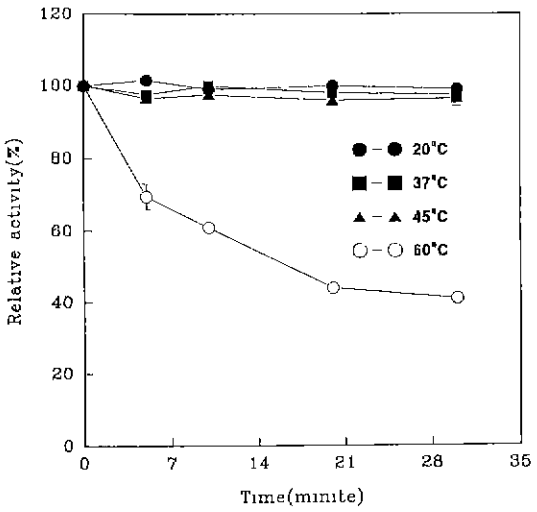


Fig. 5. Heat stability of *Aedes aegypti* ovarian mitochondrial MDH. The results are expressed as mean± SD of four experiment.

Table 2. *Kms* of mitochondrial MDH and cytoplasmic MDH in *Aedes aegypti* for different substrates

Substrates	Mitochondrial MDH	Cytoplasmic MDH
Oxaloacetate	6.58×10^{4} M	8.68×10^{4} M
Malate	1.29×10^{4} M	8.92×10^{3} M
NADH	0.76×10^{3} M	2.04×10^{3} M
NAD	3.80×10^{3} M	9.20×10^{3} M

Data was obtained using Lineweaver-Burk plots.

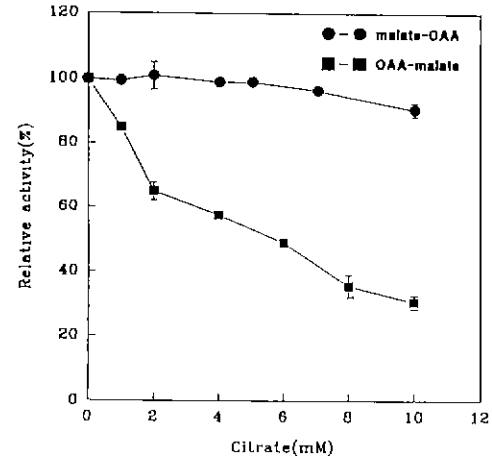
Table 3. Substrate inhibition(*Ki*) of mitochondrial MDH in *Aedes aegypti*

Substrates	Malate dehydrogenase
Oxaloacetate	31.0 mM
Malate	27.0 mM
NADH	12.5 mM
NAD	6.1 mM

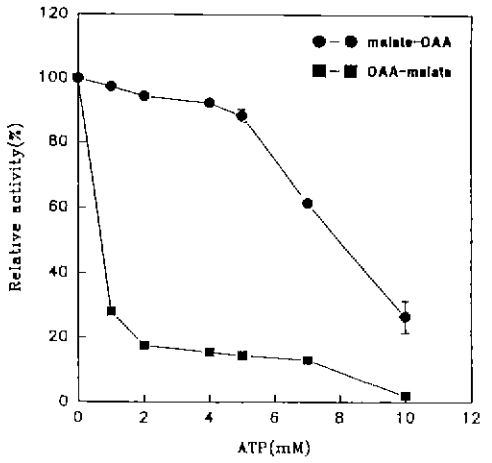
보통 MDH는 OAA나 NADH에 의하여 기질 저해 작용을 보이고 있으며(Bernstein *et al.* 1978) malate나 NAD에 의해서는 공통적으로 모두 저해작용을 보이고 있지는 않는다. 현재 정제된 MDH는 malate, OAA, NADH, NAD기질에 대하여 활성도 억제효과를 보였다. Table 3은 각 기질에 대한 *Ki*값(최고 활성도의 1/2이 되는 기질농도)이다.

5. Citrate, ATP α-ketoglutarate에 의한 활성도 변화

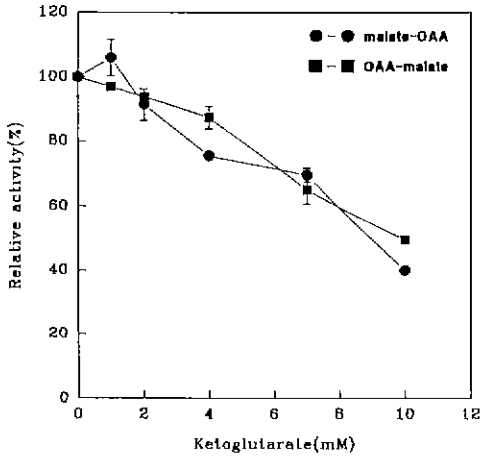
Citrate의 경우 malate-oxaloacetate 반응에 있어서 고농도에서도 활성도의 변화에 영향을 주지 못하고 있었으나 oxaloacetate-malate 반응에 있어서는 citrate의 농도가 증가할수록 활성도 억제현상이 일어났다. ATP의 경우는 oxaloacetate-malate 반응에서



(a)



(b)



(c)

Fig. 6. MDH activity inhibition at various inhibitors. The results are expressed as mean± SD of four experiment.

적은 농도의 ATP에 의해서도 활성도억제 현상이 현저하게 일어나고 있으며 malate-oxaloacetate 반응에서는 고농도의 ATP에서 활성도 저해현상이 일어나고 있다. α-ketoglutarate는 malate-oxaloacetate 반응과 oxaloacetate-malate 반응에서 활성도 억제의 차이는 보이지 않았다(Fig. 6)

6. 흡혈 후 시간별, 기관별 MDH, IDH의 활성도 변화

MDH의 경우 충체를 균질화하여 활성도를 측정한 결과 32시간 이후 66시간까지 활성도가 증가하는 것을 볼 수 있다. 그러나 각 시간별로 지방체 활성도를 측정한 결과 18시간에서 36시간 사이에 활성도가 증가하고 있고 48시간 이후에는 활성도가 급격히 떨어졌다. 반대로 난소에서 활성도를 측정한 결과는 18시간부터 활성도가 나타나기 시작하여 60시간까지 증가하는 현상을 볼 수 있으며 그 이후 활성도를 유지하였다. 충체로부터 추출된 IDH의 경우에 있어서도 몸체에서는 흡혈 후 36시간 까지의 활성도가 36시간이후 72시간까지의 활성도보다 높게 유지하고 있는 반면 지방체에서는 흡혈 후 72시간에 이르기까지 낮은 활성도가 변화없이 그대로 유지되었다. 그러나 난소에서는 흡혈 후 18시간 후에 IDH 활성도가 나타나기 시작하여 54~60시간 사이에 가장 높은 활성도를 보이면서 72시간까지 활성도를 유지하였다(Fig. 7). 이러한 양상은 난소내에서의 MDH의 활성도 변화 양상과 유사하였다.

고 찰

MDH의 최적 pH, *Km*값, 기질저해, 분자구조 등 생화학적 특성은 종 및 동위효소, 반응과정 등에 따라 상당히 다른 것으로 알려졌다(Markert 1975, Weeda 1981, Smith and Sundrum 1986). 이러한 차이는 기관 특이적 분포 및 그 기관의 대사특성과 서로 연관된 현상이라고 볼 수 있으며 특정세포에 필요한 대사의 효율을 증가시키거나 혹은 조절하므로서 기관의 특정한 역활 분담에 기여하는 것으로 보인다. 최적 pH를 살펴보면 malate-oxaloaetate 반응에서는 최적 pH가 10.0, oxaloacetate-malate 반응에서는 최적 pH가 9.0인 *Bombyx mori*(Kageyama *et al.* 1972)의 경우와 비슷한 값을 보이고 있다. 반면 같은

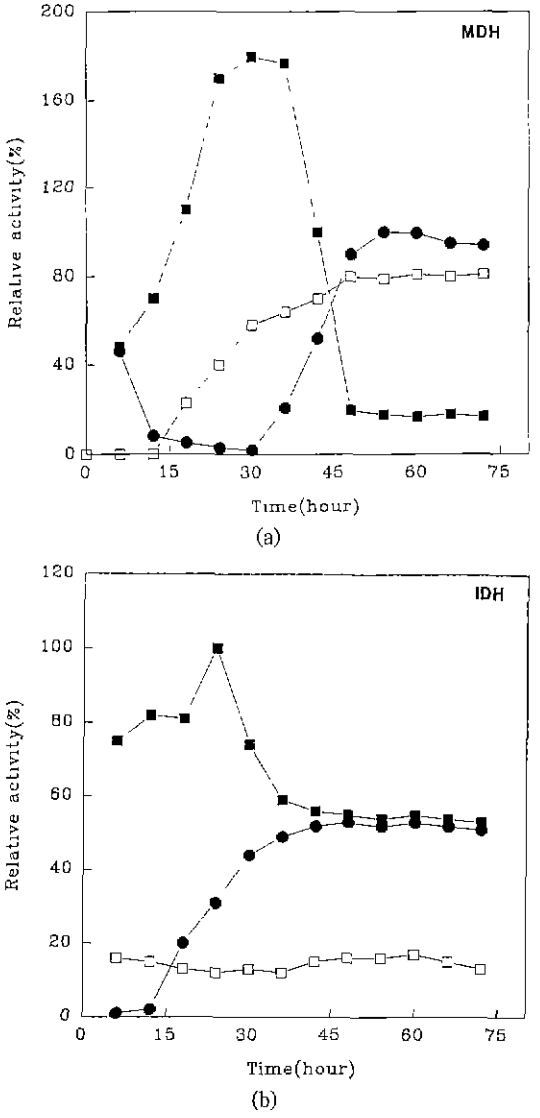


Fig. 7. MDH and IDH activities of *Aedes aegypti* females in different tissues after blood feeding; whole body (■), fat body (●); ovary (□).

파리목인 *Drosophila virilis*에서는 malate-oxaloacetate의 반응에서 최적 pH가 9.75이며 oxaloacetate-malate의 반응에서는 최적 pH가 7.0으로 *Aedes aegypti*의 MDH와는 oxaloacetate-malate의 반응에서 차이를 보이고 있다(Naris 1979). 한편 같은 세포내에서도 MDH가 존재하는 위치에 따라 mitochondria형과 cytoplamic형의 두가지 형태가 존재하는데 이것 역시 열에 대한 안정성, 기질에 대한 억제 정도 및 구조적인 면에서 다른 특성을 가지고 있다. 따라서 *mitochondrial MDH*에 대한 항혈청이 *cytoplamic* MDH와는 전혀 반응을 하지 않는 것으로 알려졌다 (McReynold *et al* 1970).

모기류의 MDH에 관한 연구는 *Culex pipiens quinquetosciatus*에서 발생단계별 변화 및 물리화학적 특성에 관한 연구와 전기영동법에 의한 동위효소의 분석 등이 보고되었다(Narang and Narang 1975, Novak *et al.* 1985) 본 실험의 *Aedes aegypti* 암모기 난소에서 mitochondria에서 새롭게 생성되는 MDH가 malate에 대한 *Km*값이 1.29×10^{-4}M로 cytoplasmic MDH의 *Km*값 8.68×10^{-3}M 보다 1/70 만큼 *Km* 값이 차이가 나고 있으므로 난성숙 과정 및 난황물질의 합성에 필요한 대사의 효율을 극대화 하기 위한 것으로 생각된다. 일반적으로 cytoplasmic MDH와 mitochondria MDH의 *Km*값은 약간의 차이를 보인다고 하였다(Wilkinson 1970). 예를 들어 소 심장의 mitochondrial MDH는 malate에 대한 *Km* 값이 9.9×10^{-4}M이며 cytoplasmic MDH는 5.4×10^{-4}M로 오히려 2배 정도 높다(Wilkinson 1970). 그러나 *Aedes aegypti*에서는 보는 바와 같이 난소에서 흡혈 후 새로이 생성되는 MDH의 *Km*값은 현저하게 작으므로 그 경향성이 해당기관에 대사특성과 일치되는 성질이 요구되는 것으로 알려졌다.

MDH의 대사생리적으로 중요역할은 lipid와 glucose 생합성에 필요한 에너지를 공급하기 위한 환원제인 NADH를 생성하여 이를 mitochondria로의 운반 등을 들 수 있다(Storey and Bailey 1978, Tripathi and Shukla 1987). 특히 citrate는 mitochondria안에서 TCA회로 및 세포질내에서의 다른 반응의 중요한 조절물질의 역할을 하게 되며 세포의 대사방향을 결정함에 중요한 역할을 하고 있는 것으로 알려져 있다(Meijer and Van Dam 1974). 난소에서 흡혈 후 생성되는 MDH가 malate에 대하여 매우 낮은 *Km*값을 가지고 있고, malate-oxaloacetate 반응에 있어서 TCA회로의 산물인 citrate에 의한 저해작용을 거의 받지않고 고농도의 ATP에서 활성도 저해작용을 보이는 것으로 보아 세포내에서는 빠르게 malate가 OAA로 전환되고 있다는 것을 추측할 수 있으며 이러한 결과는 분자의 특성이 해당기관의 생리적 특성과 무관하지 않으리라 사료된다.

흡혈 후 생성되는 MDH는 지방체와 난소에서 거의

비슷한 시기에 생성되기 시작하지만 활성도를 유지하는 시기 및 감소시기와 생성되는 동위효소의 종류가 각기 달랐다. 지방체에서 MDH의 활성도 증가는 난황단백질합성과 같은 시기에 이루어 지고 있으며 기존의 cytoplasmic MDH가 증가하는 것으로 보아 난황단백질 합성에 필요한 glucose 및 lipid 생합성에 관련된 것으로 생각되며 반면 난소에서 생성되는 MDH의 경우 malate에서 OAA로의 전환이 상당히 이루어지고 있음을 반영한다.

*Aedes aegypti*의 경우 흡혈 후 난소에서 새로이 생성된 MDH가 mitochondria에서 나타나며 특성상 malate 대한 낮은 *Km*값을 나타내 생체내에서 빠르게 OAA로의 전환이 일어난다고 생각할 수 있다. 흡혈 후 72시간이 지난 *Aedes aegypti* 모기에서 pyruvate dehydrogenase의 동위효소가 새로이 생성된다고 하였는데(Fortunato and Fuchs 1980) 이러한 pyruvate dehydrogenase는 mitochondria에 위치하여 TCA cycle의 시작물질인 citrate 합성에 필요한 acetyl-CoA를 만드는 pyruvate dehydrogenase complex의 일부분이다. 또한 citrate 뿐만 아니라 ATP에 의하여 malate-oxaloacetate반응이 oxaloacetate-malate 반응에서 저해를 활성도저해가 적게 일어나므로서 따라서 citrate 합성이 빠르게 일어나 이것이 TCA cycle로 접어든다고 생각할 수 있다. 또 다른 TCA cycle의 중간효소인 IDH의 활성도를 측정하였을 경우 흡혈 후 활성도의 변화가 난소에서 18시간 이후에 나타나 48~54시간까지 계속 증가하여 난소내에서의 MDH활성도 증가와 같은 양상을 보인반면 지방체에서는 낮은 IDH활성도가 흡혈 후 어떠한 변화도 보이지 않고 있으므로 이러한 정제된 MDH가 최소한 대사상 에너지 대사와 관련된 TCA 회로와 관련이 있음을 강력히 시사하고 있다.

인 용 문 헌

Barnes, C.S, P.M. Toom and F. Cupp. 1975. Protein and lactate dehydrogenase levels in *Aedes aegypti*. *Insect Biochem.* 7: 387-391.

Beeckmans and Kanarek. 1981. Demonstration of physical interaction between consecutive enzymes of the citrate acid cycle and of the aspatate-malate Shuttle. *Eur J Biochem* **117**: 527-535

Bernstein, L.H., M.B. Grisham, K.D. Cole and J. Everse. 1978. Substrate inhibition of the mitochondrial and cytoplasmic malate dehydrogenases. *J Biol Chem.* **253**(24): 8697-8701

Bhome, H.J, G Kopperschlager, J. Schulz and E Hofmann. 1972. Affinity chromatography of phosphofructokinase using Cibacron blue F3GA *J Chromatogr.* **69**. 209-214.

Bradford, M.M. 1976 A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding *Anal. Biochem.* **72**. 248-254.

Briegel, H. and A.O. Lea. 1979. Influence of the endocrine system on tryptic activity in female *Aedes aegypti J Insect Physiol* **25**: 227-230.

Cremel, G., D. Filliol and A. Waksman 1985. Simultaneous purification by affinity chromatography of rat liver mitochondria asparate aminotransferase and malate dehydrogenase and electrophoretic properties *Anal Biochem.* **150** 332-336

Davis, B.J. 1964. DISC electrophoresis-II Method and application to human serum proteins. *Ann rev. of the N.Y Acad Sci.* **121**: pp 404-427

Feinsod, F.M. and A Spielman 1980. Independently regulated juvenile hormone activity and vitellogenesis in mosquitoes. *J. Insect Physiol.* **26**: 829-832.

Fortunato, P.J. and M S Fuchs. 1980 A comparison of the number of multiple enzymatic forms in gravid and nongravid *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.* **17**(4): 383-384

Goulielmos, G N. and S.N. Alahiotis. 1989 Induction of malate dehydrogenase and aetylcholinesterase by 20-hydroxyecdysone and heat shock in *Drosophila* ovaries. *Insect Biochem* **19**: 393-399.

Hagedorn, H H., J.P Shapiro and K. Hanaoka 1979. Ovarian ecdysone secretion is controlled by a brain hormone in an adult mosquito. *Nature.* **282**: 92-94.

Hans, U.B. 1974. Methods of enzymatic analysis volume I Verlag Chemie Weinheim Academic Press, Inc. New York and London.

Hochachka, P.W. and G.N. Somero 1984. Biochemical adaptation. 2nd ed. Princeton Univ Press, Princeton.

Kageyama, T., S.Y. Takahashi and E Ohnishni. 1972. Malate dehydrogenase in the egg of silk worm, *Bombyx mori*: Purification and properties. *Insect Biochem.* **2**: 186-196.

Kim, I.G. and S.H. Kang. 1986 A new ovarian mitochondrial malatedehydrogenase isozyme from the mosquito, *Aedes aegypti*. 성균관대학교 논문집 **37**(1): 21-31.

Law, J.H., J.M.C. Ribeiro and M.A. Wells 1992. Biochemical insights derived from insect diversity *Annu Rev. Biochem.* **61**: 87-111

Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227** 680-683

Lea, A.O. 1969. Egg maturation in mosquitoes not regulated by the corpora allata. *J. Insect Physiol.* **15**. 537-541.

MacReynold, M.S. and G.B. Kitto. 1970 . Purification and properties of *Drosophilla* malate dehydrogenase. *Biochem. Biophy Acta* **198**(2). 165-175

Markert, C.L. 1975 . Biology of Isoenzymes Isoenzymes I: Molecular structure. *Academic Press*, New York.

Mcevily, A.J., A.J. Flint and J.H. Harrison. 1985. Concomitant purification of three porcine heart mitochondrial enzymes: citrate synthase, asparate aminotransferase, and malate ehydrogenase. *Anal. Biochem.* **144**. 159-164.

Narang, S. and N. Narang. 1975 Malate dehydrogenase of a mosquito, *Culex pipience quinquefasciatus*; Developmental changes, polymorphism, and physicochemical characterization. *Biochemical Genetics.* **13**: 73-84

Naris, S. 1979. Biochemical differences between cytoplasmic malate dehydrogenase allozymes of *Drosophila virilis. Biochemical Genetics* **17**: 433-444.

Nunamaker, R.A. and W.A. Witson, 1982. Isozyme changes in the Honeybee, *Apis mellifera L.*, during larval morphogenesis. *Insect Biochem.*, **12**(1). 99-104.

Rustin, P. and M. Valat. 1986 The control of malate dehydrogenase activity by adenine nucleotides in purified potato tuber(*Solanum tuberosum L.*)mitochondria. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* **247**: 62-67.

Schlaeger, D.A., M.S. Fuchs and S.H. Kang. 1974. Ecdysone mediated stimulation of dopa decarboxylase activity and its relationship to ovarian development in *Aedes aegypti. J cell Biol.* **61**: 154-165.

Smith, K. and T.K. Sundaram 1986. Action of surfactants on porcine heart malate dehydrogenase isozymes and a simple method for the differential assay of these isozymes *Biochem. Biophy. Acta.* **884**: 109-118

Stepien, G.M., R.I. Savre and R. Durand. 1988. Juvenile hormone increase mitochondrial activity in *Drosophila* cells *Insect Biochem.* **18**(3): 313-321.

Storey, K.B. and E. Bailey. 1978. Intracellular distribution of enzymes associated with lipogenesis and gluconeogenesis in fatbody of adult cockroach, *Periplaneta Insect Biochem.* **8**: 125-131.

Triphathi, G. and S.P. Shukla. 1987. Study of liver cytoplasmic and mitochondrial malate dehydrogenases of the freshwater catfish, *Clarias batrachus Zool J. Physiol.* **91**: 447-456

Weeda, E. 1981. Some properties of mitochondrial NAD linked malic enzyme and malate dehydrogenase from the flight muscles of *Leptinotarsa decemlineata Insect Biochem.* **11**(6): 679-684

(1995년 4월 12일 접수)