

넙치 간에 있어 가수분해 효소의 부분정제 및 특성규명

이상환 · 서정수 · 김나영 · 엄혜경 · 위효진 · 박성일 · 정준기[†]

부경대학교 수산생명의학과

Partial Purification and Characterization of Phosphatidylcholine Hydrolyzing Enzyme from Liver Membrane of Flounder, *Paralichthys olivervaceus*

Sang Hwan Lee, Jung soo Seo, Na young Kim, Hye Kyung Eom, Hyo jin Wee,
Seong Il Park and Joon-Ki Chung[†]

Department of Aquatic Life Medicine, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea

In the present study, phosphatidylcholine (PC) hydrolyzing enzyme had been isolated from membrane of flounder liver. PC hydrolyzing enzyme solubilized in 1% Triton X-100 from membrane was partially purified by sequential chromatography on Heparin Sepharose CL-6B and Heparin-5PW columns. The products by membrane-bound hydrolyzing enzyme were identified as phosphatidic acid and choline, but in the presence of primary alcohol, phosphatidylethanol was produced at the expense of phosphatidic acid. These data suggest that membrane-bound enzyme may be a PC-phospholipase D (PLD) type. The enzyme had pH optimum at below 6.0 and temperature optimum at $37 \pm$. The activity of PC-PLD was dose-dependently increased by Ca^{2+} but not Mg^{2+} . The activity of PC-PLD was stimulated by PC, PIP_2 and PE

Key words : Phospholipase D, Phosphatidylcholine, Transphosphatidylation, Phosphatidylethanol

Phospholipase D (PLD)는 Phosphatidylcholine (PC)를 가수분해하여 다양한 호르몬, 신경전달, 성장 인자들의 기작에 영향을 미치며, 다양한 세포의 신호전달과 분비기작에 있어 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다 (Frohman *et al.*, 1998). PC가 PLD에 의해 가수분해 되면 phosphatidic acid (PA)와 choline을 생성하며, 생성된 PA는 2차 전달 물질로서 호흡폭발, 세포외유출, 증식, actin 중합작용, hormone-induced steroidogenesis 등의 조절에 관여한다 (Exton, 1994; Billah, 1993; Lauritwen *et al.*, 1994; Amsterdam *et al.*, 1994). 또한 PLD는 1차 알콜이 포함된 경우 PC를 가수분해하여 Phosphatidylethanol (PEtOH)를 생성하는 transphosphorylation 반응을 보이게 되

며, 이러한 반응은 PLD 고유의 반응으로서 동정에 있어 중요한 단서가 된다. 식물에서 보고된 이후, 박테리아, 효모, 포유류에서 보고되었으며, 이 효소에 대한 기능 및 기작에 대한 연구가 많이 이루어졌다. 또한 효소의 활성화는 ADP-ribosylating factor (ARF), Rho A와 같은 small GTP-binding protein과 protein kinase C (PKC)에 영향을 받거나, phospholipid, 2가 이온인 Ca^{2+} , Mg^{2+} 등의 영향을 받는 것으로 알려져 있다.

하지만 어류에 있어 PLD에 대한 연구는 거의 이루어져 있지 않다. 따라서 이번 연구의 목적은, 어류 내 존재하는 인지질 가수분해 효소와 그 특성을 알아보기 위해 우리나라에서 가장 광범위하게 양식되고 있는 어종인 넙치를 이용하

[†]Corresponding Author : Joon-Ki Chung, Tel : 051-620-6142,
Fax : 051-628-7430, E-mail : jkchung@pknu.ac.kr

여 확인하고자 하였다. 포유류의 경우 가수분해 효소는 뇌와 간에 주로 분포하는 것으로 알려져 있으므로, 이번 연구에서는 넙치의 간을 이용하여 인지질 가수분해 효소의 존재 여부, 동정 및 그 특성을 알아보하고자 하였다.

재료 및 방법

간조직 추출물 제조 과정

모든 실험 과정은 4°C 하에서 실시하였으며, 인근 양어장에서 구입한 넙치 (*Paralichthys olivaceus*)로부터 간조직을 분리·세척 후, 10배 양의 homogenizing buffer (20 mM HEPES/pH7.0, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 1.5 mM PMSF, 1.5 µg/ml leuprotin, 1.5 µg/ml aprotinin)에 넣고 파쇄 하였다. 초고속원심분리 (100,000 g, 4°C, 1시간)에 의해 생성된 침전물은 1% Triton X-100을 포함하는 homogenizing buffer를 첨가하여 용출시킨 뒤, 다시 초고속원심분리하여 생성된 상층액을 아래의 과정을 통해 분리 정제하였다.

PC 가수분해 효소 분리정제 과정

Buffer A (20 mM HEPES/pH7.0, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 1.5 µg/ml leuprotin, 1.5 µg/ml aprotinin, 0.1% Triton X-100)를 이용하여 평형화 시킨 open Heparin Sepharose column을 이용하여 NaCl농도가 0에서 1.0 M이 되도록 선형상 농도 구배법으로 분별용출 시켰다. 각각 분별용출된 부분에 대해 choline releasing activity를 측정하였으며, 활성을 높게 나타내는 부분에 대해 Heparin-5PW 칼럼을 이용하여 위와 동일한 조건으로 분별 용출 시켰다. 이상의 과정을 통해 분리 정제된 부분 중 choline releasing activity를 가장 높게 나타내는 부분을 이용하여 PC 가수분해 효소에 대한 동정 및 특성을 조사하였다.

인지질 가수분해효소의 활성측정

인지질 가수분해 효소의 활성 측정은 인지질

중 PC를 가수분해하는 능력으로 choline releasing activity를 측정하였다. PC 가수분해 능력은 16 : 1.4 : 1의 molar 비율로 phosphatidylethanol (PE), phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate (PIP₂), PC를 assay 당 200,000 cpm을 나타내도록 [choline-methyl-³H](pam)₂PC가 첨가된 phospholipid vesicle을 기질로 사용하여 측정하였으며, 수용성 대사산물인 [³H]choline을 확인하기 위해 Liquid Scintillation Counter (LSC, Amersham Biosciences, U.S.A.)를 사용하였다.

Autoradiography

부분 정제된 PC 가수분해효소의 PLD 특성을 확인하기 위하여 Chung *et al.* (1997)의 방법에 따라 16 : 1.4 : 1의 molar 비율의 PE, PI(4,5)P₂, PC에 분석 당 200,000 cpm을 나타내도록 [choline-methyl-³H](pam)₂PC와 [³H]dipalmitoyl PC를 첨가한 phospholipid vesicle을 기질로 사용하여 측정하였다. 상층부와 침전부의 지질을 추출하여 chloroform/methanol/acetic acid (75/35/5, v/v/v) 와 methanol/0.5% NaCl/acetic acid (100/100/5, v/v/v) 용액에 용해시켜 TLC상에 전개하였으며, 생성된 [³H] 생성물은 Cyclone Storage Phosphor System (Packard, Co., U.S.A)을 사용하여 확인하였다.

PC 가수분해 효소에 대한 생화학 특성

넙치 간으로부터 부분 정제된 PC 가수분해 효소에 대한 생화학적 특성을 조사하기 위해 상기의 인지질 가수분해 측정 방법을 이용하였으며, 생화학적 특성은 다양한 pH, 온도, 배양시간, Ca²⁺, Mg²⁺에 대한 영향을 조사하였다.

PC 가수분해 효소에 대한 기질 특이성

PC 가수분해 효소에 대한 기질 특이성을 조사하기 위해 상기의 인지질 가수분해 측정 방법을 이용하였으며, 기질 특이성은 다양한 농도의 PC, PIP₂, PE에 대한 영향을 조사하였다.

결 과

PC 가수분해 효소의 분리정제 결과

준비된 sample을 Heparin Sepharose column을 이용하여 분리정제 후, choline releasing activity를 측정 하였다 (Fig. 1A). 실선은 단백질 경향을 나타내며, 실선과 점으로 이루어진 부분은 choline releasing activity (cpm)를 나타내고, 점선은 선형상 농도구배법에 의한 NaCl 농도 변화를 나타내고 있다. 여기서 활성을 높게 나타내는 부분 38~43번을 다음 과정인 Heparin-5PW 칼럼을 이용하여 분리정제 하였다 (Fig. 1B). 그 결과 fraction 20번에서 가장 높은 활성을 나타내는 것을 관찰할 수 있었다.

Fig. 1. Chromatography of choline releasing activity through a Heparin-Sepharose column (A) and HPLC Heparin-5PW column (B). Membrane from flounder liver were prepared, extracted, and processed as described under experimental procedures.

PC 가수분해 효소의 동정

분리한 PC 가수분해 효소가 어떠한 형태인지 알아보기 위해 지용성 부분과 수용성 부분을 나누어 autoradiography를 실시하였다.

지용성 부분에 대한 autoradiography 결과에서 분리된 PC 가수분해 효소는 10% 에탄올이 포함된 경우 PA와 phosphatidylethanol (PEtOH)를 생성하는 것을 관찰할 수 있었으나, 10% 에탄올이 포함되지 않은 경우에는 PEtOH의 생성은 관찰되지 않고 단지 PA만 관찰되었다 (Fig. 2A). 그리고 수용성 부분에 대한 autoradiography 결과에서 choline 생성을 확인할 수 있었다 (Fig. 2B).

분리한 PC 가수분해 효소에 대한 생화학적 특성

인지질 가수분해 효소의 활성을 다양한 pH,

Fig. 2. Reaction of products formed from hydrolysis of PC. The substrate vesicle comprised PE, PIP₂ and PC in a molar ratio of 16:1.4:1 with [³H]dipalmitoyl PC and [³H]dipalmitoyl PC to yield 200,000 cpm per assay. After incubation for 1hr at 37°C, the lipid products were analyzed by TLC and visualized by Cyclone Storage Phosphor system (Packard, Co. U.S.A).

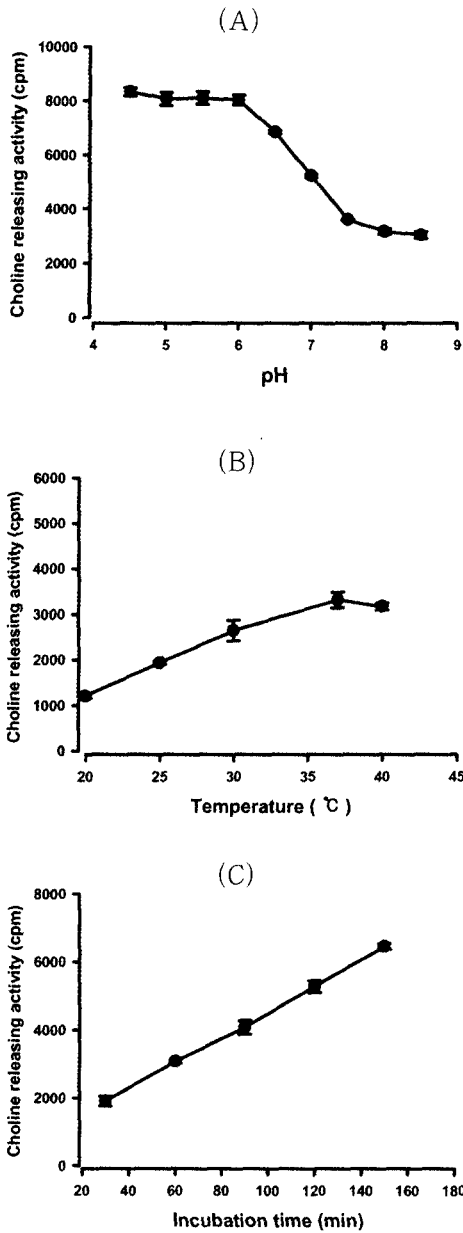


Fig. 3. Effect of pH (A), temperature (B) and incubation time (C) on choline releasing activity. Choline releasing activity fraction were incubated with phospholipid substrate vesicles in reaction mixture under various pH, temperature and incubation time. Results are the mean \pm S.D. from four independent experiments.

온도, 반응시간, Ca^{2+} , Mg^{2+} 에 대한 영향을 조사하였다. pH의 경우 6.0이하인 산성 조건에서 높은 활성을 나타내는 것을 관찰할 수 있었고, 온

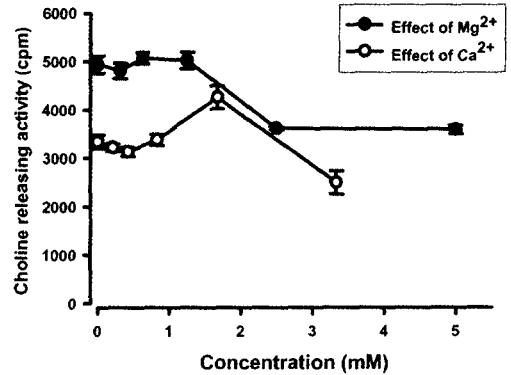


Fig. 4. Effect of changes in the concentration of Ca^{2+} and Mg^{2+} on choline releasing activity. The choline releasing activity fraction were measured in the presence of five different concentration of Ca^{2+} and Mg^{2+} . Results are the mean \pm S.D. from four independent experiments.

도의 경우에는 37°C 에서 높은 활성을 나타냈으며, 반응시간에 대한 영향은 시간이 늘어남에 따라 활성도의 증가를 관찰할 수 있었다 (Fig. 3A, B and C). 2가 이온인 Ca^{2+} 대한 영향은 0.83 mM까지 영향을 미치지 않았으나 1.67 mM 농도에서 가장 높은 활성을 나타낸 것을 관찰할 수 있었다. Mg^{2+} 의 경우에는 1.26 mM 농도까지 영향을 받지 않았으나, 2.6 mM 이상의 농도가 되는 경우 활성이 감소하는 것을 관찰할 수 있었다 (Fig. 4).

분리한 PC 가수분해 효소에 대한 기질 특이성

인지질 가수분해 효소의 활성에 있어 인지질의 영향을 알아보기 위해 측정된 결과로서, PC는 $0.76 \mu\text{M}$ 농도에서 가장 높은 활성을 관찰할 수 있었으며, 그 이상의 농도가 된 경우에 활성이 감소되는 것을 관찰할 수 있었다. PIP_2 에 대한 영향은 $2.36\text{--}4.7 \mu\text{M}$ 농도에서 높은 활성을 나타내는 것을 관찰할 수 있었으며, PE에 대한 영향은 $26.8 \mu\text{M}$ 농도에서 가장 높은 활성을 나타내는 것을 관찰할 수 있었다 (Fig. 5A, B and C).

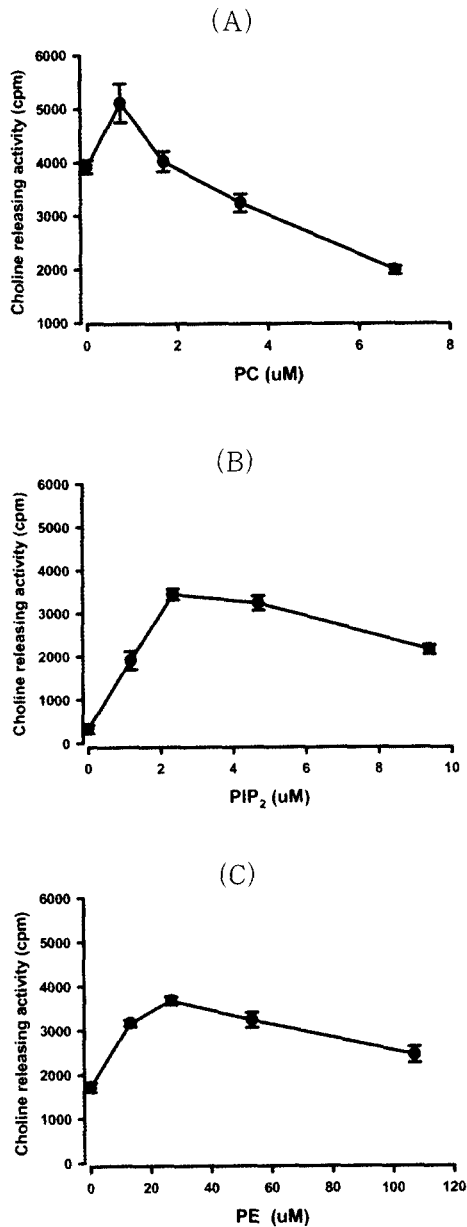


Fig. 5. Effect of changes in the concentration of PC (A), PIP₂ (B) and PE (C) on choline releasing activity. The choline releasing activity fraction were measured in the presence of five different concentration of PC, PIP₂ and PE. Results are the mean ± S.D. from four independent experiments.

고찰

본 실험은 어류인 넙치 간의 막층부분에 존재

하는 PC 가수분해 효소에 대해 살펴보았다. Triton X-100을 사용하여 membrane으로부터 PC 가수분해 효소를 분리한 뒤, affinity column을 이용하여 분리정제 하였으며, 분리된 PC 가수분해 효소에 대한 autoradiography를 통해 동정을 실시하였다 (Scherer *et al.*, 2002). PC-PLD의 경우 PC를 가수분해하여 PA와 choline을 생성하는 특성을 가진다. 하지만 1차 알콜이 존재하는 경우 PLD는 transphosphatidylatation 반응을 하여 PEtOH을 생성하는 주요한 특성을 가지며 (Kobayashi *et al.* 1987), 이러한 특성은 PLD의 동정에 있어 중요한 단서가 된다. 본 실험의 autoradiography 결과에서, 10% 에타올이 포함된 경우 PEtOH의 생성을 통해 넙치 간의 막층부분으로부터 분리한 PC 가수분해 효소는 PC-PLD임을 확인할 수 있었다.

다양한 종의 PLD에 대한 생화학적 특성에 관한 연구는 많이 이루어졌다. 포유류의 경우 Kanfer 등의 연구에서 PLD에 대한 특성 규명이 처음으로 실시되었으며 (Saito *et al.*, 1973), 그 후 특성 규명에 대한 많은 연구가 수행되었다. 먼저 Rat로부터 분리한 PC-PLD에 대한 생화학적 특성 살펴보면, 쥐뇌의 막으로부터 분리한 PLD의 경우 적정 pH 6.0, 2가 이온인 Ca²⁺와 Mg²⁺에 의존적인 것으로 보고되었고 (Chang, 1992), 쥐뇌로부터 분리한 synaptosomal PLD의 경우 적정 pH 7.2, Mg²⁺(<1 mM)에 대해 매우 의존적인 것으로 보고되었으며 (Chalifa *et al.*, 1990), 쥐의 frontal cortex로부터 분리한 PLD의 경우 적정 pH 7.2, 2가 이온인 Ca²⁺와 Mg²⁺에 의해서는 억제제가 일어난다고 보고되었다 (Nishida *et al.*, 1992). 또한 Kanoh 등에 의한 연구에서 쥐뇌로부터 분리한 PLD의 경우 적정 pH 7.1~7.3, 2가 이온 Ca²⁺와 Mg²⁺에 의해서는 억제제가 일어난다고 보고했다 (Kanoh *et al.* 1991). 쥐로부터 분리된 PC-PLD의 경우 일반적으로 pH 7.0이며, synaptosomal PLD를 제외한 모든 PLD에서는 2가 이온에 의해 활성 억제가 일어나는 것을 알 수 있었다. 또한 돼지의 폐로부터 분리한 PLD의

경우 적정 pH 6.6이며, Ca^{2+} 와 Mg^{2+} 에 의해 최대 활성을 나타낸다고 보고되었다 (Okamura *et al.*, 1994). 그리고 인간으로부터 분리한 태반 PLD의 경우 적정 pH 7.0~7.5, 이가 이온 Ca^{2+} 와 Mg^{2+} 에 의해 억제가 일어난다고 보고되었다 (Vinggaard *et al.*, 1995). 본 실험에서 분리된 PC-PLD의 생화학적 특성 중 적정 pH 6.0 이하인 산성 조건에서 높은 활성을 나내고 있는데, 이것은 포유류의 PC-PLD의 적정 pH가 중성이라는 특성과 큰 차이를 보이고 있다. 이 결과를 통해 어류에 존재하는 PC-PLD와 포유류의 PC-PLD는 생화학적 특성뿐 아니라 형태적, 기능적인 차이를 보일 것으로 사료 되어진다. 그리고 이가 이온의 결과로부터 Ca^{2+} 의 경우 농도 의존적인 영향을 받으며, Mg^{2+} 의 경우 특정 농도 (1.25 mM) 이상인 경우 활성 억제를 확인할 수 있었다. 따라서 어류의 PC-PLD의 경우 Ca^{2+} 와 Mg^{2+} 에 대해 모두 영향을 받는 것을 확인할 수 있었으며, 특히 농도의 의존적인 경향을 보이는 Ca^{2+} 에 의해 PLD 활성이 조절되는 것으로 사료 되어진다.

PC-PLD 활성은 인지질에 의해 영향을 받으며, 포유류의 경우 일반적으로 PIP_2 에 영향을 받는 것으로 알려져 있다 (Morris *et al.*, 1997). 생화학적 특성을 살펴보았던 돼지 폐로부터 분리한 PLD, 쥐뇌로부터 분리한 PLD (Liscovitch *et al.*, 1994) 및 인간 태반으로부터 분리한 PLD 모두 PIP_2 의 영향을 받는다. 본 실험에서도 PIP_2 의 영향을 받는 것을 확인할 수 있었으며, 또한 PC와 PE는 PLD의 최대 활성에 영향을 미치는 것을 확인할 수 있었다.

포유류의 경우, ADP-ribosylating factor (ARF), Rho A와 같은 small GTP-binding protein과 protein kinase C (PKC) 등의 영향을 받는 PLD1 형태와 영향을 받지 않는 PLD2 형태로 나누어지는 특징을 가지고 있다 (Hammond *et al.*, 1995; Han *et al.*, 1996). 본 실험에서는 이러한 조절인자가 없더라도 활성을 나타내는 것으로 보아 포유류의 PLD2 형태와 유사할 것으로 생각되지만, 앞으로 이러한 조절인자에 대한 확인이 이루어

져야 할 것이며, 또한 분자 생물학적인 접근을 통해 형태 및 기능적인 측면을 밝힘으로써 어류의 생리적 현상을 이해하는데 있어 중요한 자료가 될 것이라 사료되어진다.

요 약

본 실험은 넙치 (*Paralichthys olivaceus*) 간으로부터 membrane부분에 존재하는 PC 가수분해효소의 특성에 대해 조사하였다. 먼저 간 조직을 초고속 원심 분리기와 nonion-detergent인 1% triton X - 100을 이용하여 membrane 부분을 분리하였으며, Heparin-Sepharose CL-6B 칼럼과 Heparin-5PW 칼럼을 이용하여 분리정제 하였다.

얻어진 PC 가수분해효소에 대한 반응·생성물을 확인하기 위해 autoradiography를 실시하였다. 지용성 부분의 결과에서 transphosphatidylatation 반응의 결과물인 PEtOH 을 형성하는 것으로 보아 PC-PLD임을 알 수 있었다.

얻어진 PC 가수분해효소에 대한 생화학적 특성을 조사한 결과 적정 pH가 6.5이하인 산성 조건 및 37°C의 배양온도에서 최고 활성을 나타내었으며, 2가 이온들에 대한 영향의 경우 칼슘은 1.67mM 농도에서 최고 활성을 나타냈으나, 마그네슘은 활성에 영향을 미치지 않았다. 각종 세포막 기질에 대한 영향을 조사한 결과 PC는 0.75 μM , PIP_2 는 2.35 μM , PE는 26.8 μM 농도에서 최고 활성을 나타내었다. 이상의 결과로부터 넙치 간 조직의 막층부분에 존재하는 PC를 가수분해효소는 PC-PLD가 존재함을 알 수 있었다.

참 고 문 헌

- Morris, A. J. Frohman, M.A. and Engebrecht, J. : Measurement of phospholipase D activity. *Anal. Biochem.*, 252 : 1~9, 1997.
- Zhang, F., Zhao, G. and Dong, Z. : Phosphatidylcholine-specific C and D in stimulation of RAW264.7 mouse macrophage-like cells

- by lipopolysaccharide. *Inte. Immunopharm.*, 1 : 1375~1384, 2001.
- Wakelam, M.J.O. : Diacylglycerol - when is it an intracellular messenger? *Biochim. Biophys. Acta*, 1536 : 117~126, 1998.
- Shin, I. C. and Han, J.S. : Phosphatidylcholine-specific phospholipase C-mediated induction of phospholipase D activity in Fas-expression murine cells. *Biochem. Mol. Biology.*, 126 : 445~453, 2000.
- Exton, J. H. : Phosphatidylcholine breakdown and signal transduction. *Biochim. Biophys. Acta*, 1212 : 26~42, 1994.
- Saito, M. and Kanfer, J.N. : Solubilization and properties of a membrane-bound enzyme from rat brain catalyzing a base-exchange reaction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 53 : 391~398, 1973.
- Hammond, S.M., Altshuller, Y.M., Sung, T.C., Rudege, S.A. Rose, K., Engebrecht, J., Morris, A.J., and Frohman, M.A. : Human ADP-ribosylation factor-activated phosphatidylcholine-specific phospholipase D defines a new and highly conserved gene family. *J. Biol. Chem.*, 270 : 29640~29643, 1995.
- Hammond, S.M., Jenco, J.M. Nakashima, S., Cawallader, K., Gu, Q., Cook, S., Nozawa, Y. Prestwich, G.D., Frohman, M.A. and Morris, A.J. : Characterization of two alternately spliced forms of phospholipase D1. Activation of the purified enzymes by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, ADP-ribosylation factor, and Rho family monomeric GTP-binding proteins and protein kinase C- α . *J. Bio. Chem.*, 272 : 3860~3868, 1997.
- Rizzo, G.R. : Pharmacological importance of phospholipase D and phosphatidic acid in the regulation of the mitogen-activated protein kinase cascade. *Pham. Thera.*, 94 : 35~50, 2002.
- Vinggaard, H.S.H. : Characterization and partial purification of phospholipase D from human placenta. *Biochim. Biophys. Acta*, 1258 : 169~176, 1995.
- Han, J.S., Chung, J.K., Kang, H.S., Donaldson, J. and Bae, Y.S. : Multiple forms of phospholipase D inhibitor from rat brain cytosol. *J. Biol. Chem.*, 271 : 11163~11169, 1996.
- Vinggaard, A.M. and Hansen H.S. : Characterization and partial purification of phospholipase D from human placenta. *Biochim. Biophys. Acta*, 1258 : 169~176, 1995.

Manuscript Received : January 22, 2004

Revision Accepted : April 26, 2004

Responsible Editorial Member : Kwan-Ha Park
(Kunsan Univ.)