

성장중인 흰쥐 두개관에서
Guanine Aminohydrolase 활성 변화

서울대학교 치과대학 구강생화학교실 및 치학연구소

민 병 무

- ABSTRACT -

DEVELOPMENTAL CHANGES IN GUANINE AMINOHYDROLASE
IN RAT CALVARIA

Byung-Moo Min

*Department of Oral Biochemistry and Dental Research Institute,
College of Dentistry, Seoul National University*

As an attempt to clarify one end of enzymatic regulation of purine catabolism, the activity of guanine aminohydrolase and intracellular contents of guanine and xanthine in rat calvaria were determined in relation to its development. The portions of calvarias containing frontal and parietal bones was separated from 19-day-old rat foetuses as well as from 1-, 5-, 35- and 90-day-old rats. Specimens were assayed for their activity of guanine aminohydrolase in its cytosol, and simultaneously analyzed for their contents of intracellular purine metabolites in the tissues with rapid quenching. Guanine aminohydrolase activities were not detected at earlier stage of growth in rat calvaria, and only a few during its development. The contents of intracellular guanine were relatively high, but xanthine was not detected in developing rat calvaria. The results indirectly implied that the salvage pathway might be active in developing rat calvaria. Therefore, the purine metabolism in the tissues seemed to be regulated economically.

I. 서 론

Purines은 nucleotides와 핵산을 이루는 기본적인 구성성분으로서, 포유동물의 세포는 지속적인 핵산의 전환(turnover)을 유지하고 ATP농도를 적절하

게 유지하기 위하여 계속적인 purines의 공급이 요구된다.¹⁾ 대부분의 세포에서는 주로 purine 신생합성에 의해 purine nucleotides를 공급받으며 동시에 preformed purines을 회수경로를 통해 재활용하는 것으로 알려져 있으나 적혈구^{1,2)}, 백혈구^{1,2)}, 위장점

막¹², 두개골⁴, 골수¹¹와 같은 몇몇 세포와 조직에서는 purine 전환이 비교적 빨리 일어나고 있음에도 purine의 신생합성 경로가 결여되어 있거나 극히 제한되어 일어나는 것으로 알려져 있다. 한편 포유동물의 간은 purine의 신생합성이 활발히 일어나며¹⁶; purine 신생합성 경로가 결여되었거나 극히 제한되어 일어나는 조직은 간에서 합성된 purines을 공급받아^{16, 17} 회수경로를 통해 purine nucleotides을 합성하는 것으로 알려져 있다.

세포내 nucleotides은 계속적인 전환이 일어나므로 일련의 과정을 거쳐 분해가 일어나게 된다. Purine nucleotides의 분해와 재합성은 세포의 대사과정에서 정상적으로 일어나게 되며, 세포내 ATP 농도에 크게 좌우된다.¹⁰ 그러므로 purine염기는 nucleotides의 분해과정에서 지속적으로 생성되며, 조직에 따라 차이는 있으나 대부분이 회수되어 nucleotides을 합성하는데 재활용된다. 회수경로는 신생합성 경로보다 단순할 뿐 아니라, 소모되는 ATP 에너지가 작기 때문에 보다 경제적이라는 점에서 관심을 끌고 있다.

Purine이화대사의 중간 대사산물인 hypoxanthine과 guanine은 회수경로에 의해 재활용될 수도 있고, xanthine을 거쳐 요산이 되면 다시는 재활용될 수 없는 대사적 전환점이 되기 때문에 purine 이화대사에서 중요한 대사적 위치를 차지할 것으로 사료되며, Sitaramayya 등¹⁸은 흰쥐의 복강에 guanine을 주입시 간조직에서 guanine aminohydrolase가 induction됨을 보고하였으며, Park 등¹⁵은 guanine aminohydrolase가 regulatory enzyme으로서 purine이화대사에서 중요한 조절기능을 가질 것이라고 주장한 바 있다.

조직의 종류와 발육정도, 세포의 기능, 세포내 purine nucleotides의 전환율등이 서로 다르고 또한 purine nucleotides와 nucleosides은 세포기능을 조절하는데 중요한 역할을 담당하고 있으므로^{2, 6, 8, 9} purines의 합성과 분해는 purine대사산물이나 이화요소의 활성에 의해 정교하게 조절될 것으로 사료된다.

본 연구는 흰쥐 두개관의 성장과정에 따라 guanine aminohydrolase의 활성과 세포내 guanine 및 xanthine의 농도를 측정하여 효소적 purine 이화대사 조절의 일단을 연구하고자 시행하였다.

II. 연구재료 및 방법

실험대상

본 실험에 사용된 실험동물은 서울대학교 의과대학 동물사육실로부터 분양받은 Sprague-Dawley계 흰쥐를 사용하였다. 실험군으로는 태령 19일, 생후 1일, 5일, 35일, 90일된 흰쥐를 연령별로 나누어 사용하였다. 각 군당 사용한 실험동물의 수는 태령 19일, 생후 1일 및 생후 5일군은 각 군당 100마리, 생후 35일군은 30마리, 생후 90일군은 20마리이었으며, 각 군의 실험동물은 3군으로 나누어 사용하였다.

임신 19일된 흰쥐의 복강내로 sodium pentobarbital(30 mg/kg)을 복강주사하여 마취시킨 다음 흰쥐 태아를 분리한 후 태아의 두개관에서 피부를 제거시킨 다음 전두골의 후부와 두정골을 적출하였다. 적출한 흰쥐 두개관에서 혈액을 제거하기 위해 냉 0.25M sucrose용액으로 수회 세척한 후 안과용 핀셋으로 골막을 제거시킨 다음 여과지로 압박하여 수분을 제거하고 즉시 액체질소에 보관하였다.

생후 1일과 5일된 흰쥐는 마취없이, 생후 35일과 90일된 흰쥐는 마취를 시행한 후 위와 동일한 방법으로 두개관을 적출하여 액체질소에 보관하였다.

실험시약

Purine standard(uric acid, adenine, guanine, hypoxanthine, xanthine, adenosine, guanosine, inosine, xanthosine, AMP, GMP, IMP, XMP), dipotassium hydrogen phosphate, ammonium sulfate, sodium nitroprusside, bovine serum albumin, potassium bicarbonate, potassium hydroxide, sucrose는 Sigma(St. Louis, MO., U. S. A.) 제품을 사용하였다.

Methanol, perchloric acid, ammonium dihydrogen phosphate, LiChrosorb RP-8 column(10 μ m av. particle size, 250 \times 4.0 mm i. d.)은 Merck사(Darmstadt, West Germany) 제품을 사용하였다.

그외 sodium tungstate, sulfuric acid, phosphoric acid는 Mallinckrodt사(St. Louis, MO., U. S. A.)에서 구입하였고, 기타의 시약들은 각각 analytical grade를 구입하여 사용하였다.

세포질 분획 제조

각 실험군의 골조직은 무게를 잰 후 액체 질소에 얼린 다음 유봉과 유발을 사용하여 마쇄 후 냉 0.25 M sucrose 용액으로 10~15% homogenate를 만들어 Virtis 45 homogenizer를 사용하여 균질화시켰다. 이 homogenate를 냉동원침기로 4 °C에서 1,100 × g로 20분간 원침하였다. 그 상청액을 얻어 초원심분리기로 4 °C에서 134,000 × g로 1시간 동안 원침한 상청액을 세포질분획 시료로 사용하였다.

Guanine aminohydrolase 활성 측정

Guanine aminohydrolase (EC 3.5.4.3)의 활성은 1 mM guanine과 0.1M potassium phosphate 완충액 (pH 7.4)이 함유된 reaction mixture에 세포질분획을 0.2ml 넣어 총 2.7ml 되게 하여 측정하였다. 즉 37°C에서 30분간 반응시킨 후 0.4ml의 2/3N sulfuric acid와 0.2ml의 10% sodium tungstate를 연속적으로 가해 반응을 중지시켰다. 1,600 × g에서 10분간 원침하여 번성된 단백질을 침전시키고, 요소작용에 의해 상청액으로 유리된 ammonia를 Chaney와 Marbach 방법⁵에 의해 정량분석하여 guanine aminohydrolase의 활성을 측정하였다.

Guanine aminohydrolase 활성도 1 international unit (I. U.)는 37°C에서 1분간 기질(guanine) 1 μmole

을 분해하는 효소의 양으로 정의하였다.

Purine 대사산물의 추출

각 실험군의 골조직은 무게를 잰 후 액체 질소를 부어 얼린 다음 유봉과 유발을 사용하여 마쇄 후 냉 5% perchloric acid를 첨가하여 0°C에서 glass homogenizer를 사용하여 균질화하고 10분간 세워두었다. 이 homogenate를 냉동원침기로 4°C에서 12,000 × g로 7분간 원침하였다. 그 상청액을 2.0 M potassium bicarbonate로 pH 6.8~7.0이 되도록 중화시킨 다음 침전된 potassium perchlorate는 냉동원침기로 4°C에서 6,000 × g로 5분간 원침하여 제거하였다. 중화시킨 상청액은 0.2 μm membrane filter가 들어있는 centrifugal microfilter에 옮긴 다음 냉동원침기로 4°C에서 1,000 × g로 1분간 원침하여 그 여과액을 purine 대사산물의 분석에 사용하였다. 그 여과액은 분석할 때까지 -70°C에 보관하였다.

Purine 대사산물의 분리와 분석

Purine 대사산물의 분리에 이용된 HPLC system은 model 6000A solvent delivery system, model U 6K universal liquid chromatograph injector, data module model 730이었다. HPLC 조건은 압력 825 ±

Table 1. Activity of guanine aminohydrolase in developing rat calvaria cytosol

Age of rats	Enzyme activity	Activity* (units/g of tissue)	Specific activity (mU/mg of protein)
19-day-old rat fetuses		N.D.**	N.D.
1-day-old rats		N.D.	N.D.
5-day-old rats		0.014 ± 0.010***	0.731 ± 0.521
35-day-old rats		0.003 ± 0.002	0.752 ± 0.508
90-day-old rats		0.005 ± 0.004	1.716 ± 1.373

* The enzyme activity was assayed in reaction mixtures composed of 1.0mM substrate, and 0.1M potassium phosphate buffer, pH 7.4 at 37°C.

** No enzyme activity was detected.

*** The figures represent the average ± standard error (S.E.) of the values obtained from 3 experiments. And one unit of the enzyme activity was defined as that of enzyme which catalyzes the transformation of 1 μmole of substrate per minute at 37°C.

Table 2. Retention times of purine metabolites analysed by high performance liquid chromatography

Purine metabolite *	Retention Time (min)
AMP	5.70
IMP **	10.41
XMP **	12.83
GMP **	11.06
Adenosine	38.19
Inosine	10.07
Xanthosine **	13.67
Guanosine	11.35
Adenine	31.43
Hypoxanthine	6.71
Xanthine	6.99
Guanine	7.20

* Purine metabolites were separated on a LiChrosorb RP-8 column (4.0mm x 25cm) and eluted with 0.05M $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, pH 6.0, the flow rate of which was 1.0 ml/min.

** IMP, GMP, XMP, and xanthosine were separated on the same column as the above, but eluted with 2.5% $\text{CH}_3\text{CN}/65 \text{ mM } \text{KH}_2\text{PO}_4$ buffer containing 5.5 mM PIC reagent A, pH 5.05. The flow rate was 0.5 ml/min.

25 p. s. i., 유량 1.0ml/min., chart speed 0.4cm/min., record sensitivity 10mV, injection부피 20 μ l 이었고, 고정상은 reverse phase steel column인 LiChrosorb RP-8 column(10 μ m av. particle size, 250 \times 4.0 mm i.d.)을 이용하였다.

Purine대사산물의 정량은 Model 440 U. V. detector (Waters Associates)를 이용하여 파장 254nm, operation sensitivity 0.005~0.01 a. u. f. s. 에서 측정하였다.

이동상은 0.05M ammonium dihydrogen phosphate용액(pH 6.0)을 isocratic하게 사용하였으며, 사

용직전에 aqueous solvent filter(0.45 μ m, Millipore)로 여과하여 격렬하게 교반하면서 진공펌프로 10분간 degassing하였다.

Peaks의 확인은 retention time과 standard co-addition방법으로 확인하였으며, guanine과 xanthine의 정량은 peak area 또는 peak height을 이용하여 표준 bases에 의한 표준곡선으로 정량하였다.

단백질 정량

본 실험에 사용한 단백질 정량법은 Lowry방법¹¹⁾을 사용하였다. 본 실험에서 단백질 표준용액으로 사용한 bovine serum albumin은 micro-kjeldahlometry에 의해 질소함량을 측정한 다음 표준 bovine serum albumin에 의한 표준곡선으로 단백질을 정량하였다.

III. 연구결과 및 고찰

흰쥐 두개관은 골형성 기전의 연구에 좋은 연구 대상으로서 태령 17~18일에 파골세포가 출현하며⁷⁾, 태령 19일이 되면 골수강이 형성되고, 생후 34일이 되면 형태학적으로 neurocranium의 성장이 완료됨을 보고하였다.¹⁴⁾ 또한 세포내 purine 화합물은 세포질에 존재하는 효소들에 의해 이화대사가 일어나게 되므로³⁾, 본 실험은 태령 19일, 생후 1일, 5일, 35일, 90일된 흰쥐 두개관의 세포질분획에서 연령별로 guanine aminohydrolase의 활성을 측정하고, 효소의 기질인 guanine의 세포내 농도를 측정하여 흰쥐 두개관에서 효소적 purine이화대사의 일단을 연구하고자 시행하였다.

Purine염기인 guanine은 salvage enzyme인 hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase에 의해 재활용되어 purine nucleotides을 합성할 수도 있고, 그렇지않고 guanine aminohydrolase에 의해 xanthine으로 분해되면 다시는 재활용될 수 없으므로 purine 이화대사에서 중요한 대사적 전환점이라 할 수 있다.

본 실험에서 태령 19일 및 생후 1일된 흰쥐 두개관에서는 guanine aminohydrolase활성이 전혀 측정되지 않았으며, 생후 5일, 35일 및 90일된 흰쥐에서는 0.73~1.72 mU/mg protein으로서 매우 낮은 활성을 나타내었다(Table 1). 또한 각 연령의 흰

Table 3. Intracellular purine metabolite contents in developing rat calvaria

Age of rats	Purine metabolite *	Purine metabolite content (nmoles/g of tissue)	
		Guanine	Xanthine
19-day-old rat fetuses		122.04 ± 10.40 **	N.D. ***
1-day-old rats		114.69 ± 22.28	N.D.
5-day-old rats		66.66 ± 11.32	N.D.
35-day-old rats		47.70 ± 2.95	N.D.
90-day-old rats		10.74 ± 2.12	N.D.

* Extraction and assay procedure were as described in "Materials and methods."

** The figures represent the average ± standard error (S.E.) of the values obtained from 6 experiments.

*** Xanthine was not detected.

쥐 두개관에서 세포내 guanine과 xanthine의 농도를 고성능액체크로마토그래피로 측정된 결과 guanine의 농도는 태령 19일된 흰쥐에서 122 nM/g tissue로서 최대치를 보였으며 생후 1 일에는 114 nM/g tissue이었고, 그 후 성장이 완료됨에 따라 점차 감소하였다. 그러나 xanthine은 각 연령의 흰쥐 두개관 조직에서 측정되지 않았다(Table 2, 3). 흰쥐 두개관의 골세포에서 비교적 고농도의 guanine이 측정되었는데, 이것은 흰쥐 두개관에서는 guanine aminohydrolase활성이 전혀 없거나 매우 낮으므로 주로 salvage enzyme에 의해 대사가 일어날 것으로 사료된다. 아울러 세포내 purine대산물중 xanthine이 측정되지 않은 것과 일치하는 결과라고 사료된다. 이것은 신생 흰쥐 두개관에서 분리해낸 골세포에 방사성 동위원소가 표지된 guanine을 첨가하여 배양시 동위원소가 nucleotides의 여러 성분내에서 검출되는 것으로 보아 흰쥐 두개관의 골세포에도 salvage enzyme인 hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase가 존재하며, 회수경로를 통해 nucleotides의 합성이 활발히 진행되고 있다는 Carnis와 Campell⁴⁾의 보고와 잘 부합된다.

두개관 성장의 초기단계에서는 guanine aminohydrolase활성이 전혀 보이지 않았는데 이것은 성장이 진행중인 두개관에서는 세포의 증식과 DNA 합성이 매우 활발히 진행되어야하나 백서 두개관에서

는 purines의 신생합성이 매우 제한되어 일어나므로⁴⁾ purines을 효율적으로 사용하기 위한 제도적 장치라고 사료된다. 두개관의 성장이 완료됨에 따라 약간의 guanine aminohydrolase활성이 보여 필요시 purine염기의 분해가 가능함을 시사하고는 있으나 활성이 매우 낮아 큰 의미는 부여할 수 없을 것으로 사료된다.

본 연구에서는 성장중인 흰쥐 두개관에서 guanine aminohydrolase활성과 세포내 guanine농도를 측정하여 효소적 purine이화대사 조절의 일단을 고찰해 보았다. 이를 보다 상세히 연구하기 위하여 salvage enzyme인 hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase에 관한 연구가 앞으로 더 이루어져야할 것으로 사료된다.

IV. 결 론

골조직에서 purine이화대사의 구명은 골대사뿐 아니라 골생물학의 정확한 이해를 위해 매우 중요하다. 본 실험에서는 흰쥐 두개관의 성장과정에 따라 효소적 purine이화대사 조절의 일단을 연구하기 위하여 태령 19일, 생후 1일, 5일, 35일, 90일된 Sprague-Dawley계 흰쥐를 대상으로하여 다음과 같은 성적을 얻었다.

1. Guanine aminohydrolase활성은 두개관 성장

의 초기단계에서는 전혀 측정되지 않았으며, 성장이 완료됨에 따라 매우 낮은 활성을 보였다.

2. 각 연령의 흰쥐 두개관에서 측정된 세포내 guanine농도는 성장의 초기단계에서 최대치를 보였으며 그 후 성장이 완료됨에 따라 점차 감소하는 경향을 보였으나, xanthine은 각 연령의 두개관에서 측정되지 않았다.

이상의 결과에서 흰쥐 두개관의 guanine aminohydrolase활성은 성장과정에 따라 다소 차이를 보였으며, 또한 최후경로가 활발히 진행될 것임을 간접적으로 시사하여 두개관조직에서 대사의 경제성을 엿볼 수 있었다.

REFERENCES

1. Abrams, R., Goldfinger, J.M.: Utilization of purines for nucleic acid synthesis in bone marrow slices. *Arch. Biochem. Biophys.* 30:261-268, 1951.
2. Berger, S.J., Carter, J.G., Lowry, O.H.: Distribution of guanine deaminase in mouse brain. *J. Neurochem.* 44:1736-1740, 1985.
3. Berne, B.M.: Cardiac nucleotides in hypoxia: possible role in regulation of coronary blood flow. *Am. J. Physiol.* 204:317-322, 1963.
4. Carnis, D.I. Jr., Campell, J.W.: Incorporation of purines and purine precursors into the nucleotide pool of isolated bone cells. *Int. J. Biochem.* 9:517-521, 1978.
5. Chaney, A.L., Marbach, E.P.: Modified reagent for determination of urea and ammonia. *Clin. Chem.* 8:130-132, 1962.
6. Fredholm, B.B., Hedqvist, P., Lindstrom, K., *et al.*: Release of nucleosides and nucleotides from the rabbit heart by sympathetic nerve stimulation. *Acta Physiol. Scand.* 116:285-295, 1982.
7. Ko, J.S., Bernard, G.W.: Osteoclast formation in vitro from bone marrow mononuclear cells in osteoclast-free bone. *Am. J. Anatomy* 161:415-425, 1981.
8. Levy, D.E., Duffy, T.E.: Cerebral energy metabolism during transient ischemia and recovery in the Gerbil. *J. Neurochem.* 28:63-70, 1977.
9. Lothrop, C.D. Jr., Uziel, M.: Rapid preparation of nucleotides from acid soluble pools by chromatography on silica, as exemplified with acid extracts of cultured cells. *Clin. Chem.* 26:1430-1434, 1980.
10. Lomax, L.A., Henderson, J.F.: Adenosine formation and metabolism during adenosine triphosphate catabolism in Ehrlich ascites tumor cells. *Cancer Res.* 33:2825-2829, 1973.
11. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., *et al.*: Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275, 1951.
12. MacKinnon, A.M., Deller, D.J.: Purine nucleotide synthesis in gastrointestinal mucosa. *Biochim. Biophys. Acta* 319:1-4, 1973.
13. Meich, R.P., Santos, J.N.: The metabolic route for the conversion of adenosine to adenine nucleotides by rat erythrocytes. *Physiol. Chem. Phys.* 1:127-130, 1969.
14. Moss, M.L.: Growth of the calvaria in the rat: The determination of osseous morphology. *Am. J. Anatomy* 94:333-361, 1954.
15. Park, J.B., Kim, H.L., Kim, C.J., *et al.*: Molecular property of guanine aminohydrolase from rat liver. *Korean J. Biochem.* 15:49-55, 1983.
16. Pritchard, J.B., Chavez-Peon, F., Berlin, R.D.: Purines: Supply by liver to tissues. *Am. J. Physiol.* 219:1263-1267, 1970.
17. Pritchard, J.B., O'connor, N., Oliver, J.M., *et al.*: Uptake and supply of purine com-

- pounds by the liver. Am. J. Physiol. 229: 967-972, 1975.
18. Sitaramayya, A., Shahid, A., Kumar, S., *et al.*: Induction of guanine deaminase and its inhibitor in rodent liver and brain. Biochem. J. 13:143-146, 1974.
19. Scott, J.L.: Human leukocyte metabolism *in vitro*: Incorporation of adenine-8-¹⁴C and formate-¹⁴C into the nucleic acids of leukemic leukocytes. J. Clin. Invest. 41:67-79, 1962.
-