

In Vitro Anticholinesterase 스크리닝을 위한 집파리 및 3종 곤충으로부터의 Acetylcholinesterase의 추출

Extraction of Acetylcholinesterase from the Housefly and Three Other Insect Species
for *In Vitro* Anticholinesterase Screening

李 時 赫 · 李 俊 浩 · 趙 匡 衍¹

Si Hyeock Lee, Joon Ho Lee, and Kwang Yun Cho¹

ABSTRACT The optimal pH of the extraction buffer was 7.5 considering AChE stability and its buffer capacity when AChE was isolated and extracted from the housefly (*Musca domestica* L.) and three other insect species with 0.01 M sodium phosphate buffer. Also, the optimal pH of the reaction buffer was 7.5 considering enzyme activity and its buffer capacity when AChE activity was measured with the substrate in 0.1 M sodium phosphate buffer. The Potter Elvehjem type homogenizer with Teflon pestle was used to homogenize the tissues. When preparing a AChE suspension by centrifuging the homogenate, 700 g supernatant of adult head for the housefly, 700 g supernatant of 5th instar nymphal whole body for the brown planthopper, lipid-eliminated 10,000 g supernatant of 5th instar larval whole body for the diamondback moth, and 700 g supernatant of 4th instar larval head for the tobacco cutworm were considered satisfactory as enzyme sources in view of mass preparation, extraction efficiency and stability of enzyme activity during evaluation. When AChE suspensions of 4 insect species were stored at -18°C , more than 90% of activity was maintained up to 3 weeks. Km values of AChEs of the housefly, the brown planthopper, and the diamondback moth were 0.042, 0.037 and 0.043 mM, respectively and AChE-specific substrate inhibition was observed at high concentration. Km value of the tobacco cutworm ChE was 1.15 mM and BuChE characteristics was observed, though further study is needed. The optimal substrate concentration for the AChE inhibition tests was 0.5 mM for the housefly, the brown planthopper, and the diamondback moth and 12 mM for the tobacco cutworm.

KEY WORDS AChE, housefly, brown planthopper, diamondback moth, tobacco cutworm

초 록 집파리 (*Musca domestica* L.)의 3종 곤충으로부터 0.01 M sodium phosphate buffer를 이용하여 AChE를 분리, 추출할 때 AChE의 안정성 및 buffer capacity를 고려한 적정 pH는 7.5였으며, 0.1 M sodium phosphate buffer의 기질 수용액으로 AChE의 활성을 측정할 경우 효소의 활성화와 buffer capacity를 고려했을 때 pH는 7.5가 적합한 조건이었다. AChE 분리·추출을 위한 조직의 마쇄시에는 Potter Elvehjem homogenizer를 사용하였으며, 마쇄액을 원심분리하여 AChE현탁액을 조제할 때 집파리의 경우에는 성충 頭部 700 g 상등액을, 버벌구 (*Nilaparvata lugens* Stal)는 5령 약충 전충체의 700 g 상등액을, 배추좀나방 (*Plutella xylostella* L.)의 경우에는 5령 유충 전충체의 지질을 제거한 10,000 g 상등액을, 그리고 담배거세미나방 (*Spodoptera litura* F.)의 경우에는 4령 유충·두부의 700 g 상등액을 AChE 0.2~0.5U 정도로 조정하여 효소원으로 사용하는 것이 대량조제, 추출수율 및 활성 측정상의 안정성등을 고려할 때 합리적인 것으로 조사되었다. 4종 곤충의 AChE현탁액을 -18°C 조건에서 냉동보관

¹ Pesticide Lab., Korea Research Institute of Chemical Technology (한국화학연구소 농약활성연구실)

할 경우 3주까지는 90% 이상의 활성이 유지되었다. 집파리, 벼멸구 및 배추좀나방 AChE의 Km 값은 각각 0.042, 0.037 및 0.043 mM이었으며, 고농도에서 AChE 특이적 기질 저해 현상이 관찰되었으나 담배거세미나방 ChE의 경우에는 1.15 mM의 Km값을 가지며 BuChE적 특성을 보이는 듯 하나 추가실험이 요구된다. 각 곤충의 AChE를 대상으로 한 저해실험시의 적정 기질농도는 집파리, 벼멸구, 배추좀나방의 경우에는 공히 0.5 mM 그리고 담배거세미나방의 경우는 12 mM이었다.

검 색 어 AChE, 집파리, 벼멸구, 배추좀나방, 담배거세미나방

동물신경계의 synapse에 존재하는 acetylcholinesterase(AChE)는 유기인계 및 카바메이트계 살충제의 주 작용점으로써 안전성 측면의 약리독물학에 있어서나 살충제 개발차원의 독성학에 있어서 주요한 연구대상이 되어왔다. 특히, 신규살충제의 개발에 있어서 AChE저해와 연관된 작용기구의 해명과 *in vitro* 구조-활성 상관관계를 토대로한 약물설계 (drug design)를 시도하기 위해서는 곤충 AChE를 대상으로한 시험화합물의 AChE 저해력 및 저해 특성의 파악이 전제되어야 하는데 이를 위해서는 우선 다양한 종류의 스크리닝대상 곤충으로부터 저해시험목적에 부합되는 효율적이며 간편한 AChE의 분리, 추출법이 정립되어야 한다.

지금까지 여러연구자에 의해 독일바퀴 (*Blattella germanica* L.), 집파리 (*Musca domestica* L.), 박각시(*Manduca sexta* L.) 및 모기 (*Culex tarsalis* Coquillett) 등으로부터의 AChE분리, 정제 및 그것들의 생화학적 특성이 보고되어 왔으나 (Load 1961, Dauterman 등 1962, Eldefrawi 등 1970, Huang & Dauterman 1973, Tripathi 등 1973, Houk 등 1981, Silver & Prescott 1982), 하나의 실험실 조건에 적용시키기에는 그 추출방법, 추출 및 반응 buffer의 종류나 pH조건 등과 같은 방법상의 통일성이 결여되어 있을 뿐만아니라 저해실험시 고려해야 할 기질 농도설정 등의 실제적 문제에 대한 언급이 미미한 실정이다.

이에, 본 실험에서는 신규화합물의 *in vitro* AntiChE 스크리닝체제 확립의 선행적 단계로서 집파리 (*M. domestica*), 벼멸구 (*Nilaparvata lugens* Stal), 배추좀나방 (*Plutella xylostella* L.) 및 담배거세미나방 (*Spodoptera litura* F.)등의

스크리닝 공시충에 공시충에 공통적이고도 일률적으로 적용시킬 수 있는 AChE의 대량 추출 및 보관방법의 정립과 Km값 산출을 통한 저해실험시의 적정기질농도조건의 설정에 주안점을 두었다.

재료 및 방법

시약 및 Buffer

Acetylthiocholine chloride (ATCh)와 5,5-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB) 및 전기뱀장어 AChE (EC3117, 5000U)는 Sigma 제품을 사용하였고 dye concentrate 및 bovine serum albumin (BSA)은 Bio-Rad사로부터 구입, 사용하였으며 petroleum ether (동양화학)는 분별증류하여 41~46°C 분획을 사용하였다.

Buffer는 NaH_2PO_4 와 Na_2HPO_4 (Sigma)를 적량 혼합, 소정의 pH와 이온강도를 조절하여 조제하였으며, 모든 수용액의 조제에는 이온교환수 (전도도 0.1 μS)를 사용하였다.

AChE 추출원 (AChE source)

WHO표준계통 집파리 (*M. domestica*) 성충 (우화후 6~10일)을 -18°C 에서 30분 정도 저온마비시킨 후 Fig. 1A와 같은 용기에 넣고 충분한 양의 액체질소를 첨가하여 초저온으로 급속냉동시킨 다음 뚜껑을 덮는다. 격렬하게 상하좌우로 흔들어서 두부 및 흉복부를 분리시킨 다음 액체질소로 미리 충분히 냉각된 12, 20 mesh 표준체 (Fig. 1B)를 이용, 걸러낸 후 20 mesh 표준체로부터 분리된 두부를 수거하여 효소원으로 하였다. 두부를 일정수만큼 포

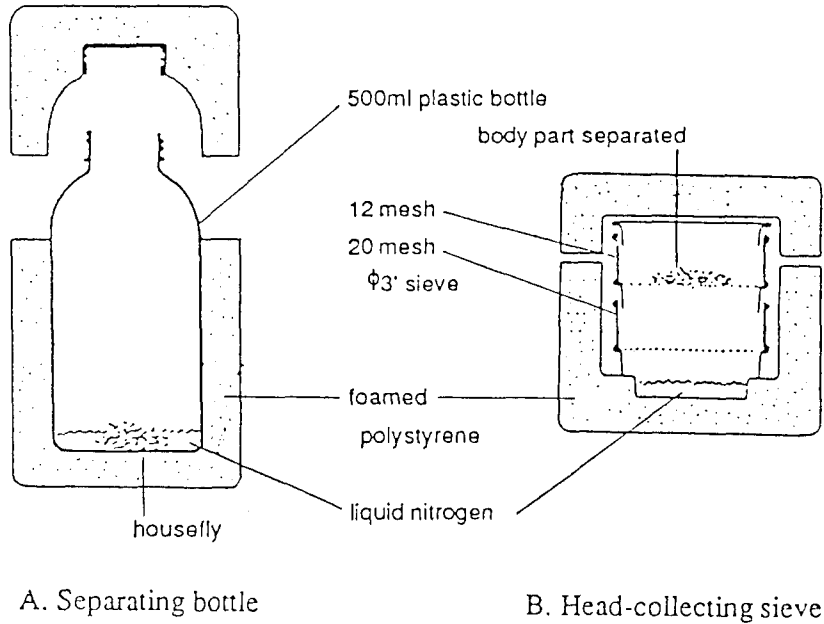


Fig. 1. Apparatus for fly head harvesting.

집할때는 소형 aspirator를 사용하였다.

벼멸구 (*N. lugens*)는 본 실험실에서 4년간 누대사육한 계통으로서 5령약충을 흡충기로 포획한 후 CO₂ gas로 마취시켜 전충제를 효소원으로 하였다. 배추좀나방 (*P. xylostella*)은 본 실험실에서 4년간 누대사육된 계통으로서 5령유충의 전충제를 효소원으로 하였고, 담배겨세미나방 (*S. litura*) 역시 본 실험실에서 4년간 인공사료를 이용하여 누대사육된 계통으로서 4령유충을 액체질소로 냉동시킨 후 해부용 가위를 이용하여 머리만을 절단, 분리하여 효소원으로 사용하였다. 이상의 공시충들은 본 실험실에서 신규화합물의 살충력 검정에 사용되는 것들이며 취급의 용이성 및 해충으로서의 중요성 등을 고려하여 AChE 분리원으로 선택하였다.

AChE 추출

집파리 5頭당 1ml의 比로 소정 pH의 0.01 M sodium phosphate buffer를 첨가하여 Potter Elvehjem homogenizer (clearance 0.25 mm, motor-driven, water-jacketed)로 2°C에

서 약 2분간 마쇄 (312 rpm 20 strokes)한 다음, 마쇄액을 syringe filter (Gelman 25 mm)를 이용하여 stainless steel screen (80 mesh)으로 여과, 마쇄과편을 제거한 후 700 g 또는 10,000 g로 4°C에서 15분간 원심분리하였다 (Sigma 2K-15, refrigerated centrifuge). 상등액을 2 ml refilling syringe를 사용하여 침전물과 혼합되지 않도록 유의하면서 분리한 다음 여과지 (Whatman No. 2) 두겹을 끼운 syringe filter로 여과, 효소현탁액으로 사용하였다.

벼멸구는 5령 약충 전충체 33마리당 1ml의 比로, 담배겨세미나방은 4령유충의 두부 5개당 1ml의 比로 0.01 M sodium phosphate buffer (pH 7.5)를 첨가하여 집파리 AChE 추출시와 동일한 방법으로 AChE 현탁액을 조제하였다. 배추좀나방의 경우에는 5령유충 전충체 25마리당 1ml의 比로 0.01 M sodium phosphate buffer (pH 7.5)를 첨가하여 전술된 방법대로 마쇄한 다음 syringe filter (Gelman 25 mm)의 80 mesh 망으로 여과하였다. 이어서 충체에 다량 함유된 지질을 제거하기 위해 여과액에 1:1의 比

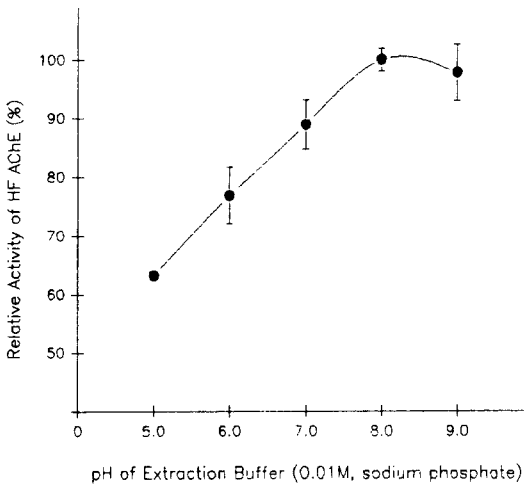


Fig. 2. Activities of housefly AChE extracted under different pH conditions AChE activities were determined in 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.5) at 30 °C sodium phosphate reaction buffer, 30 °C. Each point represents the mean ± SD for n=3.

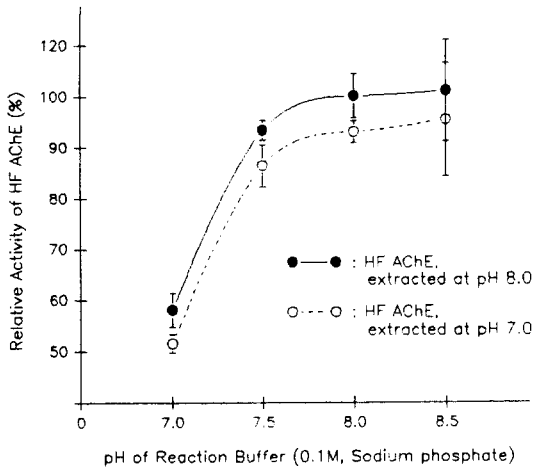


Fig. 3. Activities of housefly AChE under different pH conditions, of reaction buffer at 30 °C. Each point represents the mean ± SD for n=3.

로 petroleum ether (41~46°C 분별증류분획)를 혼합한 후 2°C에서 5분간 진탕한 다음 swing-out rotor를 이용하여 3,000 rpm에서 5분간 원심분리하였다. 원심분리관내의 수용성분획(water fraction)을 refilling syringe를 이용하여 분리해낸 후, suction flask에 주입하여 2°C에서 20분간 진공펌프로 잔존 ether를 제거한 다음 4°C에서 15분간 10,000g 로 원심분리, 상등액

을 AChE 현탁액으로 사용하였다.

AChE 활성측정

AChE추출액 0.5 ml를 cuvette (path length 1 cm)내의 기질수용액 (ATCh0.5 mM, DTNB 0.33 mM final; pH 7.5, 0.1 M sodium phosphate buffer) 3.0 ml에 신속히 첨가한 후 Ellman 등 (1961)의 방법에 따라 spectrophotometer (Beckman DU-65), Kinetics Soft Pack Module 장착)를 이용하여 412 nm에서의 흡광도 증가를 13초 간격으로 3분동안 30°C에서 측정, 흡광도 증가율 ($\Delta A/min$)을 효소반응속도로 하였다.

추출액내의 AChE 농도는 반응산물인 5-thio 2-nitrobenzoic acid의 흡광계수 (extinction coefficient = $1.36 \times 10^4 cm/M$)를 이용하여 다음과 같이 산출하였다.

AChE conc. of extract (U/ml)

$$= \frac{\Delta A/min}{1.36 \times 10^4} \times \frac{1}{1000} \times 10^6 \times 7 = 0.515 \times \Delta A/min$$

unit conversion
dilution factor

여기서 AChE 1 Unit(U)란 30°C, pH 7.5의 조건하에서 1분동안 1 μ mole의 ATCh를 가수분해할 수 있는 효소량을 말한다.

또한 Bradford (1976)의 방법에 따라 효소현탁액을 dye concentrate와 반응시켜 595 nm에서의 흡광도를 측정한 다음 BSA에 의한 calibration curve로부터 단백질함량을 산출하여 specific activity를 계산하였다.

Specific activity = AChE units/mg protein

K_m (Michaelis constant)결정

효소-기질반응에 있어서 $v = V_{max}/2$ 에 해당하는 기질농도를 K_m이라 하는데, 효소반응의 steady state에서 v_{max}의 실측이 불가능하므로 반응속도가 V_{max}에 근접하게 되는 포화기질농도의 산출을 위해서는 우선 K_m값을 결정해야 한다. 일반적으로 포화기질농도는 10×K_m 정

도의 수준을 말하며 이는 $[S] \gg [E]$ 의 조건을 만족시키는 농도이기도 하다.

본 실험에서는 전기뱀장어 AChE (Sigma, EC3117) 및 전술된 4종 곤충의 AChE를 대상으로 각각의 K_m 값을 산출하였다. ATCh의 최종 농도가 16, 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.063, 0.032 및 0.016 mM이 되도록 0.33 mM DTNB 수용액 (pH 7.5, 0.1 M sodium phosphate buffer) 과 혼합하여 반응액을 조제한 후 각각의 AChE 현탁액을 첨가하여 반응시켰다.

반응속도(ν)와 $\nu/[S]$ 를 산포시켜 $\nu = V_{max} - K_m \times \nu/[S]$ (Eadie-Hofstee Plot) 직선식을 직선회귀하여 도출한 다음 이로부터 K_m 값을 구하였다. K_m 값 산출시 Eadie-Hofstee Plot을 사용한 이유는 Lineweaver-Burk Plot에 비해 각 산포점에 있어서의 오차분포도가 균일함으로써 K_m 및 V_m 의 산출시 보다 높은 정확성을 기할 수 있기 때문이다 (Atkins & Nimmo 1975).

결과 및 고찰

집파리 (*M. domestica*) AChE의 추출

AChE의 추출시의 최적 pH조건을 조사하기 위해 추출 buffer (0.01 M sodium phosphate)의 pH를 다르게 하여 조제한 700 g 원심분리상등액의 효소현탁액을 기질수용액(ATCh 0.5 mM, DTNB 0.33 mM final; pH 7.5, 0.1 M sodium phosphate buffer)과 혼합하여 측정된 집파리 AChE의 활성을 Fig. 2에 표시하였다. AChE 활성의 최적 pH는 7.2~9.3인 것으로 알려져 있는데 (Wilson & Berglman 1950), 이는 active site를 구성하는 histidine의 imidazole group (pK_2 7.2)과 tyrosine의 hydroxyl group (pK_2 9.3)이 pH 7.2~9.0의 조건하에서만 charge relay가 가능하기 때문인 것으로 알려져 있다. 본 실험에서도 pH 8.0 정도에서 최대 활성이 보여지며 대략적으로 pH 7.2~9.0의 범위 내에서는 90% 이상의 AChE 활성이 나타나고 있다. 반응액의 pH가 7.5로 고정되어 있음을 감안한다면, 관찰되는 활성의 차이는 추출시의

상이한 pH조건에 기인된 것이며 이는 추출 buffer의 pH가 추출과정상에서 AChE의 안정성에 지대한 영향을 미치고 있음을 시사하는 것이다. 결국, 추출 buffer의 pH 범위를 7.2~9.0 정도로 설정해야만이 추출과정상에서 AChE의 변성을 10% 이내로 감소시킬 수 있음을 알 수 있다.

Fig. 3은 pH 7 및 8 조건하에서 추출된 AChE를 상이한 pH의 기질수용액(0.1 M sodium phosphate buffer, ATCh 0.5 mM, DTNB 0.33 mM final)과 반응시켰을 때의 활성을 나타낸 것이다. Fig. 2의 추출 buffer의 pH 7과 pH 8간의 활성차이가 10% 수준인 것에 비해 반응 buffer의 pH 7~8간의 활성차이가 40% 정도로 높게 나타나는 것으로 미루어 반응액의 pH가 AChE의 활성에 보다 큰 영향을 미치는 것으로 보인다.

이상의 결과를 종합해 보면 추출 buffer의 pH는 7.2~9.0 수준이면 적당하고 효소반응액(기질수용액)의 pH는 7.5~8.5 정도면 97% 이상의 AChE 활성측정이 가능한 것으로 생각된다. 그런데 phosphate buffer는 pK_2 값인 pH 7.2 수준에서 최대의 buffer capacity를 가지므로, 이를 고려한다면 추출 및 반응 buffer의 pH를 7.5 정도로 설정하는 것이 바람직할 것으로 보인다. 또한 AChE의 catalytic subunit는 동일하다는 가정하에 (Eldefrawi 1985), 상기의 실험결과를 집파리 이외의 여타 곤충의 AChE 추출, 반응시에 적용시켜도 무방할 것으로 생각된다.

한편 Nachmansson & Wilson (1955)에 따르면 반응 buffer의 이온강도는 최소한 0.1~0.2 정도이어야 된다고 하였는데 0.1 M sodium phosphate buffer의 이온 강도는 1.2로 계산되었다.

Table 1에는 pH 7.5, 0.01 M sodium phosphate buffer로 마쇄하여 1차 여과한 여과액과 700 g 및 10,000 g로 각각 원심분리하여 취한 효소현탁액을 pH 7.5 기질수용액과 반응시켜 측정된 AChE의 활성을 나타내었다. 마쇄여과액은 흡광도 증가의 상관계수 ($r = 0.9800 \sim$

Table 1. AChE activity of enzyme suspensions prepared from housefly heads^a

AChE suspension	$\Delta A/\text{min}$	Correlation Coefficient(r)	AChE conc. of extract(U/ml)	Protein content (mg/ml extract)	Specific activity (U/mg protein)
Homogenate	0.546(0.022)	0.9800-0.9879 ^b	0.281	0.523(0.006) ^b	0.537
700 g supernatant	0.525(0.013)	0.9999-1.0000	0.270	0.472(0.012)	0.572
10,000 g supernatant	0.230(0.003)	0.9999-1.0000	0.118	0.363(0.015)	0.325

^a AChE activity was determined in 0.1 M sodium phosphate buffer(pH 7.5) at 30°C.

^b Standard deviation shown in parentheses.

0.9870)가 원심분리상등액($r = 0.9998 \sim 1.000$)에 비해 낮게 관찰되는 것으로 보아 측정시 측정 오차가 커질 우려가 있는데, 이는 마쇄여과액의 탁도가 상대적으로 높으며 이에 따라 측정광(412 nm)의 산란정도가 크기 때문인 것으로 생각된다. 또한 마쇄여과액에는 조직과편 및 세포핵등이 침강된 700g 상등액이나 mitochondria 정도의 organelle까지 침전된 10,000g 상등액보다 AChE의 분해에 관여하는 단백질 가수분해효소(proteolytic enzyme)의 함량이 보다 많을 것임을 감안한다면, 장시간 반응 측정시 AChE의 분해에 의한 활성감소의 폭이 더욱 확대될 것으로 보인다. 원심분리된 효소 현탁액에 있어서는 700g 상등액 및 10,000g 상등액 공히 반응측정시 고도의 정확성($r = 0.9999 \sim 1.000$)을 보이는데 700g 상등액이 10,000g 상등액에 비해 AChE총량(AChE

unit)뿐만 아니라 specific activity가 높게 관찰됨을 알 수 있다. 결국 마쇄여과액은 측정오차 및 측정과정중의 경시분해가 증대될 우려가 있으며 10,000g 상등액은 추출수율이 낮은점 때문에 반응측정상의 안정성이나 추출수율이 우수한 700g 상등액을 AChE현탁액으로 사용하는 것이 합리적인 것으로 생각되는데, 700g 상등액의 AChE농도 및 specific activity는 각각 0.205 U/ml 및 0.434 U/mg protein이었다.

다음은, 30°C 조건하에서 AChE의 활성측정중에 유발되는 AChE의 분해정도를 조사하기 위하여 700g 상등액을 동일한 추출 buffer(0.01 M sodium phosphate, pH 7.5)에 1/5, 3/10, 및 2/5로 희석한 후 각각의 활성을 경시적으로 측정한 결과를 Fig. 4에 표시하였다.

경시적 활성감소는 효소현탁액의 희석배수가

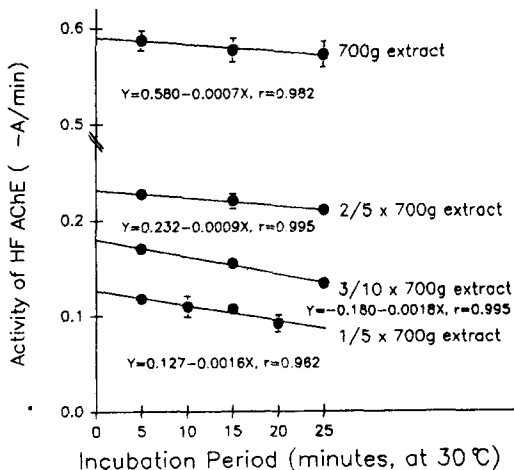


Fig. 4. Progressive decrease of AChE activities of serially diluted housefly enzyme extracts during incubation period. Each point represents the mean \pm SD for n = 3.

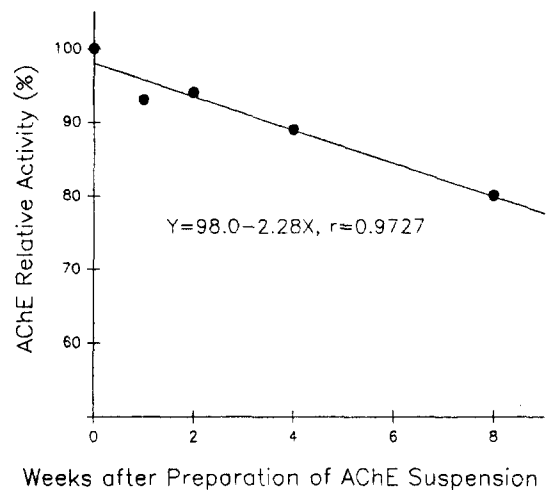


Fig. 5. Progressive decrease of AChE activity during the storage of housefly enzyme suspension at -18°C .

높을수록 증가하는 경향을 보여 분당 활성감소율은 700 g 효소현탁액, 2/5, 3/10, 1/5 희석현탁액에 있어서 각각 0.2, 0.4, 1.1 및 1.6%로 계산되었다. AChE의 활성이 30°C 조건하에서 이상의 수치로 감소되는 이유는 알수 없으며 효소현탁액의 희석배수에 따른 AChE분해 정도의 있을 수 있는 차이는 현탁액중에 존재하는 protease군의 정량이 전제되지 않고는 그 이유의 추측이 어려울 것으로 여겨진다.

이상의 결과를 토대로 30°C 조건하에서 AChE의 활성을 조사할 경우에 AChE현탁액의 경제적 사용량을 염두에 두고 경시적 활성감소를 고려한다면 두 요건을 충족시키는 2/5희석현탁액의 사용이 합리적일 것으로 생각되는데, 이때에는 희석, 반응후 25분 경과시 약 10%의 활성감소가 예상된다. 또한 장시간 동안 AChE현탁액을 30°C에서 배양하여 저해시험을 수행할 경우에 매 조사시각마다 무처리 AChE활성을 측정하여 각 처리구의 잔여활성을 계산해야 AChE의 경시적 활성감소에 의한 실험오차를 제거할 수 있을 것으로 생각된다. 그러나 AChE 및 protease는 온도에 따라 각각의 활성특성이 변동하므로 여타의 온도 조건하에서는 전술된 결과와는 상이한 AChE의 경시적 활성감소가 예상된다.

AChE현탁액의 냉동보관시 발생하는 분해정도를 조사하기 위하여 700 g AChE현탁액을 cryotube (1.8 ml)에 1.7 ml씩 분주한 후 -18°C 냉동고에 넣고 보관하면서 1, 2, 4 및 8주후에 꺼내어 AChE활성을 측정한 결과를 Fig. 5에 나타내었다. -18°C에서의 냉동보관시 AChE활성감소는 8주후에 19%로 관찰되었으며 각 경과시기별 활성으로부터 회귀직선($y = 98.0 - 2.28x$)을 구하여 산출한 90% 활성 유지기간($t_{1/10}$) 및 반감기($t_{1/2}$)는 각각 25일 및 147일이었다.

일반적으로 효소현탁액은 냉동과정중의 pH 변화에 의한 효소의 변성을 방지하고 protease의 활성을 억제하기 위해 가능한한 액체질소로 급속냉동시켜 초저온상태(-25~-80°C)에서

보관하는 것이 바람직한 것으로 되어 있으나 전술한 방법으로 추출된 집파리 AChE현탁액의 경우에는 -18°C에서도 1개월 정도는 활성의 큰 손실없이 보관 가능함을 알 수 있다. 그러므로 AChE에 대한 저해시험시 AChE 현탁액을 조제직후 일반냉동고(-18~-20°C)에 보관할 경우 3~4주 이내에 사용한다면 AChE의 활성저하에 의한 문제는 야기되지 않을 것으로 생각된다.

한편, 해동과정중에 발생될 수 있는 효소의 변성을 방지하기 위해서 40~50°C의 온수에 효소현탁액을 넣고 진탕하여 급속해동시키는 것이 좋을 것으로 생각된다.

벼멸구(*N. lugens*), 배추좀나방(*P. xylostella*) 및 담배거세미나방(*S. litura*) AChE의 추출

각 곤충으로부터 추출한 AChE활성을 Table 2에 나타내었다. 벼멸구의 경우, 700 g 및 10,000 g 원심분리 현탁액의 AChE 농도 및 specific activity가 마쇄여과액에 비해 높게 나타나지 않는 것으로 미루어 원심분리만으로 정제효과를 기대하기는 어려울 것으로 보인다. 그러나 원심분리현탁액에 있어서 반응속도 산출시의 상관계수(r)가 보다 높게 나타남으로써 활성 측정시 측정오차의 감소를 기대할 수 있는데 현탁액내의 AChE 총량 및 측정상의 정확성을 고려할때 700 g 현탁액을 효소원으로 하는 것이 적절하리라 본다.

배추좀나방에 있어서는 전충체를 효소원으로 할 경우 충체내에 존재하는 과량의 지질때문에 마쇄하여 10,000 g로 원심분리하여도 상등액내에 lipid micelle이 부유하게 되는데 이로 인한 측정감도의 저하를 예상할 수 있다.

마쇄액내의 지질을 제거하기 위해 비극성으로서(극성지수: H₂O를 0.9로 하였을때 0에 근접) 지질추출성이 우수한 petroleum ether(partitioning후 잔존 ether의 제거가 용이하도록 41~46°C 분별증류 분획을 취함)를 마쇄액과 혼합, 진탕 후 수용성 분획을 분리, 원심분리한 효소현탁액의 AChE 활성을 Fig. 6B에 제

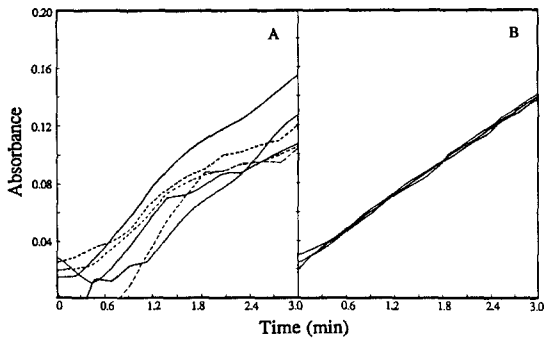


Fig. 6. Spectrophotometric tracings of not ether-partitioned(A) and ether-partitioned enzyme suspensions(B) from diamondback moth during the determination of AChE activity.

시하였다. 지질이 제거되지 않은 효소현탁액 (Fig. 6A)은 지질이 제거된 효소현탁액 (Fig. 6B)에 비해 흡광도의 변동이 현저히 크게 나타나는 경향을 보였다. Table 2에 제시되어 있듯이 지질제거 효소액의 흡광도 증가의 상관계수는 0.9990~0.9991로서 높은 상관성을 보이는 반면 지질이 제거되지 않은 효소액은 낮은 수치 ($r=0.9155\sim0.9582$)를 보였다. 따라서 AChE 활성의 측정오차를 감소시키기 위해서

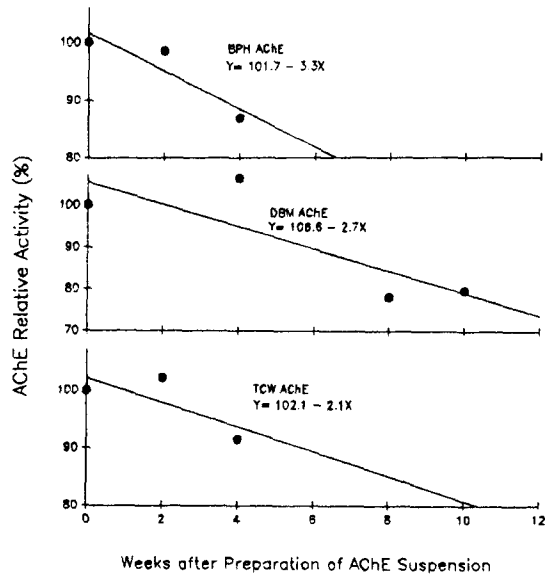


Fig. 7. Progressive decrease of AChE activity during the storage of enzyme suspensions from three insect species at -18°C . BPH AChE, 5th N. whole body 700 g supernatant; DBM AChE, 4th L. whole body, ether-partitioned 10,000 g supernatant; TCW AChE, 4th L. head, 700 g supernatant; BPH : Brown planthopper; DBM : Diamondback moth; TCW : Tobacco cutworm.

Table 2. AChE activity of enzyme suspensions prepared from three species of insects^a

AChE suspension	$\Delta A/\text{min}$	Correlation coefficient(r)	AChE conc. of extract(U/ml)	Protein content (mg/ml extract)	Specific activity (U/mg protein)
<i>N. lugens</i>					
5th nymph whole body					
Homogenate	0.460(0.039) ^b	0.9976-0.9987	0.237	2.70(0.03) ^b	0.088
700 g supernatant	0.334(0.016)	0.9991-0.9996	0.127	2.42(0.05)	0.071
10,000 g supernatant	0.178(0.007)	0.9999-0.9992	0.092	2.12(0.03)	0.043
<i>P. xylostella</i>					
5th nymph whole body (Ether-partitioned)					
10,000 g supernatant	0.127(0.003)	0.9990-0.9992	0.065	—	—
(Not ether-partitioned)					
700 g supernatant	0.155(0.017)	0.9144-0.9272	0.080	—	—
10,000 g supernatant	0.108(0.008)	0.9155-0.9582	0.056	—	—
<i>S. litura</i>					
4th larva head					
700 g supernatant	0.047(0.004)	0.9990-0.9992	0.024	0.620(0.011)	0.071
10,000 g supernatant	0.023(0.003)	0.9991-0.9992	0.012	0.558(0.010)	0.022

^a AChE activity was determined in 0.1 M sodium phosphate buffer(pH 7.5) at 30°C .

^b Standard deviation shown in parentheses.

는 지질제거 과정이 필수적이라 생각되며 지질 제거효소액의 AChE 농도가 0.065U/ml로서 지질비 제거효소액의 0.056U/ml보다 높게 관찰되는 것으로 미루어 지질제거에 의한 AChE 추출수율의 증대를 기대할 수 있음을 알 수 있다. 이와 더불어 배추좀나방과 유사하게 총체가 왜소하여 두부와 같은 특정부위를 분리할 수 없고 총체내에 다량의 지질을 함유하고 있는 종령의 나비목 유충의 경우에도 같은 이유로서 AChE 추출시 지질제거과정이 필요할 것으로 생각된다. 한편 5령 유충 500마리 (생중량 1.56 g)의 마쇄액을 petroleum ether로 partitioning할 경우 ether분획에 추출된 지질량은 약 10 mg이었다.

담배거세미나방의 4령유충은 총체가 비대하

므로 두부의 분리가 용이하기 때문에 절단된 두부를 효소원으로 하였다. 700 g 효소현탁액의 AChE 농도는 10,000 g 현탁액에 비해 2배 정도 높게 나타나며 specific activity 역시 높게 보여지고 있고 반응측정의 상관성($r=0.9990\sim 0.9992$)이 높으므로 700 g 원심분리 현탁액을 효소원으로 사용하는 것이 합리적으로 보인다. 그러나 5두부당 1ml의 추출비율로서는 추출액내의 AChE 농도가 0.024 U/ml 수준으로서 상대적으로 낮아 이로부터 AChE활성을 측정할 경우 반복간의 실험오차가 커질 것으로 보인다. 따라서 단위 buffer당 두부의 마쇄량을 2~3배 정도 증대시켜, 즉 10~15두부당 1ml buffer의 비율로 마쇄하는 것이 바람직할 것으로 생각된다.

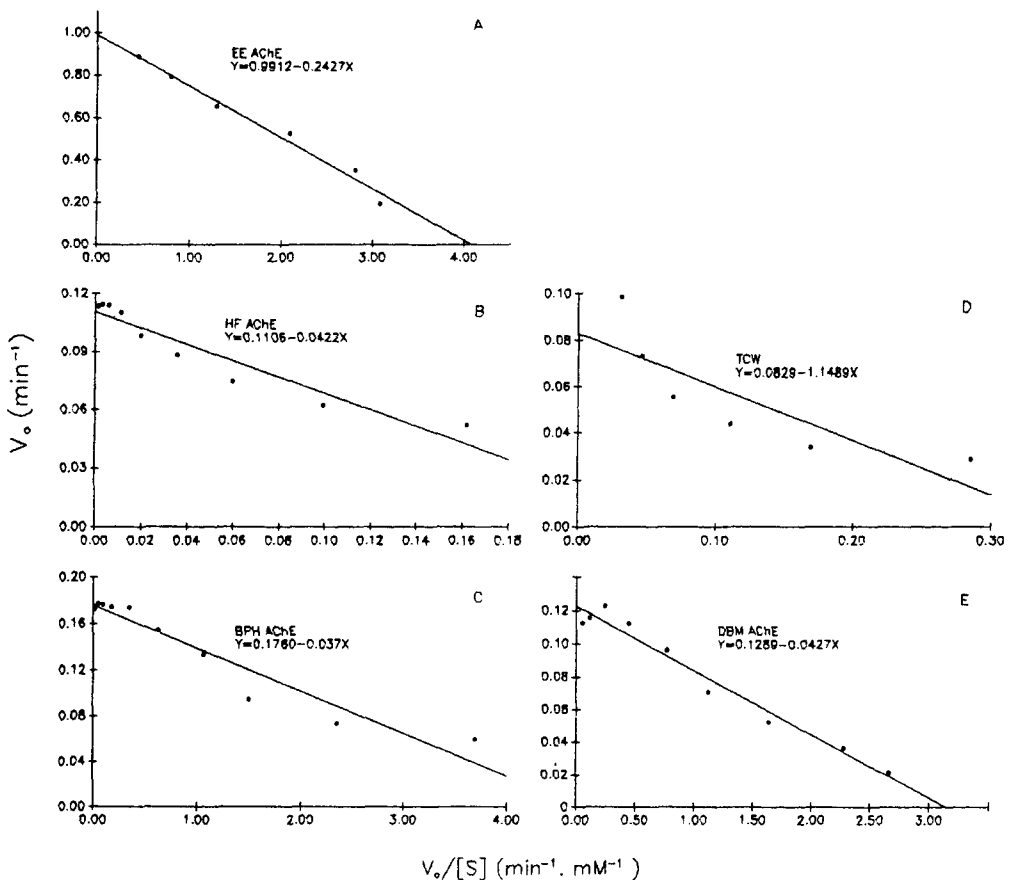


Fig. 8. Eadie-Hofstee plots of electric eel and four insect AChEs. A : Electric eel(EE), B : Housefly(HF), C : Brown planthopper(BPH), D : Tobacco cutworm(TCW), E : Diamondback moth(DBM).

이상의 결과를 종합하여 요약한다면, 벼멸구는 5령약충 전충체의 700 g 원심분리 상등액을 배추좀나방은 5령유충 전충체의 지질제거된 10,000 g 원심분리 상등액을 그리고 담배거세미나방은 4령유충 두부의 700 g 원심분리상등액을 각각 0.2~0.5 U 정도로 조제하여 AChE 저해실험시의 효소원으로 사용하는 것이 대량 조제의 잇점 및 측정상의 정확성 등을 고려할 때 효율적인 것으로 생각된다.

이상의 3종 곤충으로부터 조제된 AChE 현탁액의 보관성을 조사하기 위해 각각의 동일한 시료를 -18°C 에서 냉동보관하면서 1~2주내에 측정된 AChE의 활성감소를 Fig. 7에 나타내었다. 벼멸구 AChE 현탁액의 경우는 활성감소의 회귀식이 $y=101.7-3.3x$ 로서 90% 이상의 활성유지기간($t_{1/10}$)이 25일 정도로 계산되었다. 배추좀나방과 담배거세미나방의 경우에는 활성감소 회귀식이 각각 $y=106.6-2.7x$ 및 $y=102.1-2.1x$ 로서 $t_{1/10}$ 은 43일 및 40일로 계산되었다. 따라서 각 곤충의 AChE 현탁액을 -18°C 에서 냉동 보관하여 3주 이내에 사용한다면 90% 이상의 AChE 활성유지가 가능할 것임을 알 수 있다.

K_m (Michaelis constant) 결정

Fig. 8에 나타낸 바와 같이 전기뱀장어 AChE에 대한 K_m 값은 0.243 mM로 조사되었는데, Nachmanson & Wilson (1955)에 의해 보고된 AChE에 대한 K_m , 0.46 mM에 비해 다소 낮으며 집파리 AChE의 K_m 값은 0.042 mM 수준으로서 Huang & Dauterman(1973)의 결과($K_m=0.018$ mM) 및 Booth & Lee(1971)의 결과($K_m=0.029$ mM)와 차이를 보인다. 이처럼 동일종의 동일부위에서 추출된 AChE의 K_m 값이 서로 다르게 나타나는 이유는 Tripathi 등 (1973)이 보고한 바와 같이 이들 AChE는 기질 및 저해제에 대해 각기 상이한 반응을 보이는 몇개의 isozyme들로 구성되어 있음으로써 분리, 추출방법의 차이에 기인된 현탁액중의 isozyme 조성이 다르기 때문인 것으로 풀이된

다. 한편 벼멸구, 배추좀나방 및 담배거세미나방의 AChE의 K_m 값은 각각 0.037, 0.043 및 1.15 mM로 결정되었다.

Fig. 8에서 보듯이 집파리, 벼멸구 및 배추좀나방 AChE의 경우에 각각 기질농도 8, 16 및 1 mM이상에서는 오히려 AChE의 활성이 감소되는 AChE 특이적 고농도 기질저해현상이 관찰되고 있다. Cholinesterase (ChE)는 그 특성상 두 종류로 분류되는데 과량의 ACh에 의해 특이적 저해현상을 보이고 ACh에 대한 반응성이 butyrylcholine (BuCh)에 비해 월등히 높은 것을 AChE라 하고 반대로 BuCh에 대한 반응성이 특이적으로 높은 것을 butyrylcholinesterase(BuChE)라 하며 전자를 erythrotype ChE, 후자를 serum type ChE라 칭하기도 한다(Main 1979).

그러나 담배거세미나방의 효소현탁액의 경우에는 ATCh 16 mM까지도 활성의 지속적 증가가 관찰되었으며 (Fig. 8D), 곡선화될 산포점을 직선회귀하여 구한 K_m 값이 1.15 mM임을 감안한다면 보다 고농도 기질수준에서 K_m 을 산출할 경우에는 특이하게 높은값이 얻어질 것으로 보이므로 담배거세미나방의 ChE는 BuChE적 특성을 가진것으로 추측되나 보다 높은 ATCh농도에서의 활성측정 및 BuCh에 대한 반응성조사가 수반되지 않고는 단언할 수 없다.

요컨대 AChE가 그 기원에 따라 상이한 K_m 값과 임계기질저해농도를 가지는, 즉 기질에 대한 반응성의 차이를 보이는 이유는 각각의 AChE는 공통된 catalytic subunit(73,000~82,000 dalton)를 가지면서도 이들로 구성되는 multimer에 있어서는 그 크기와 형태가 다르기 때문이라 알려져 있다(Eldefrawi 1985).

한편, 포화기질농도를 임계기질농도와 $10 \times K_m$ 값 사이의 농도로 설정한다면 전기뱀장어는 2.5 mM, 집파리는 0.42~8 mM, 벼멸구는 0.37~16 mM, 배추좀나방은 0.43~1 mM 그리고 담배거세미나방은 12 mM 정도의 수준이 된다. 그러나 시험의 편리성을 고려하여 집파리, 벼멸구 및 배추좀나방 AChE의 경우에는 공통적

으로 0.5 mM을 저해시험시의 시험기준농도로 설정해도 무방할 것이다.

인 용 문 헌

- Atkins, G. L. & I. A. Nimmo. 1975. A comparison of seven methods for fitting the Michaelis Menten equation. *Biochem. J.* 149 : 775~777.
- Booth, G. B. & A. Lee. 1971. Distribution of cholinesterases in insect. *Bull. World Health Org.* 44 : 91~107.
- 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.
- Dauterman, W. C., A. Talens & K. Van Asperen. 1962. Partial purification and properties of flyhead cholinesterase. *J. Insect Physiol.* 8 : 1~14.
- Eldefrawi, A. T. 1984. Acetylcholinesterases and anticholinesterases, pp. 115~130. *In* G. A. Kerkut & L. I. Gilbert(eds), *Comprehensive Insect Physiology Biochemistry and Pharmacology*, Vol. 12.
- Eldefrawi, M. E., R. K. Tripathi & R. D O'Brien. 1970. Acetylcholinesterase isozymes from the housefly brain. *Biochim. Biophys. Acta.* 212 : 308~314.
- Ellman, G. L., K. D. Courtney, V. Andres & R. M. Featherstone. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7 : 88~95.
- Houk, E. J., J. L. Hardy & W. J. Cruz. 1981. Acetylcholinesterases of mosquito *Culex tarsalis* C. *Comp. Biochem. Physiol.* 69C : 117~120.
- Hung, C. T. & W. C. Dauterman. 1973. Purification of fly head cholinesterase. *Insect Biochem.* 3 : 325~334.
- Load, K. A. 1961. The partial purification and properties of a cholinesterase from *Blattella germanica* L. *Biochem. J.* 78 : 483~490.
- Main, A. R. 1979. Mode of action of anticholinesterase. *Parmaol. Therapy.* 6 : 579~628.
- Nachmanson, D. & I. B. Wilson. 1955. Acetylcholinesterase. *Methods in Enzymol.* 1 : 642~651.
- Silver, L. H. & D. J. Prescott. 1982. Aggregation properties of acetylcholinesterase from the central nervous system of *Manduca sexta*. *J. Neurochem.* 38 : 1709~1718.
- Tripathi, R. K., Y. C. Chiu & R. D. O'Brien. 1973. Reactivity *in vitro* toward substrate and inhibitors of acetylcholinesterase isozymes from electric eel eldectroplax and housefly brain. *Pestic. Biochem. Physiol.* 3 : 55~60.
- Wilson, I. B. & F. Bergmann. 1950. Acetylcholinesterase VIII. Dissociation constants of active group. *J. Biol. Chem.* 186 : 683~692.

(1990년 7월 19일 접수)