

급격한 용존산소량 증가에 순응한 꺾지(*Coreoperca herzi*)와 모래무지(*Pseudogobio esocinus*) 젖산탈수소효소 활성과 동위효소의 변화

조성규 · 염정주*

청주대학교 생명유전통계학부 생명과학전공

Received November 5, 2004 / Accepted January 31, 2005

Changes of Activities and Isozymes of Lactate Dehydrogenase in *Coreoperca herzi* and *Pseudogobio esocinus* Acclimated to Rapid Increase of Dissolved Oxygen. Sung Kyu Cho and Jung Joo Yum*. Department of Life Science, Cheongju University, Cheongju 360-764, Korea – The metabolism of lactate dehydrogenase (EC 1.1.1.27, LDH) and C₄ isozyme were studied in tissues of *Coreoperca herzi* and *Pseudogobio esocinus* acclimated to rapid increase of dissolved oxygen (DO). In *C. herzi* the LDH activity was changed 35-39% in brain and liver tissues, and within 20% in other tissues. The A₄ isozyme was increased and isozyme containing subunit C was decreased in muscle tissue. The B₄ isozyme was increased in heart and kidney. In *P. esocinus*, the LDH activity in liver tissues was largely increased to 150% for 30 minute and 70% in other tissues. The A₄ isozyme was increased in muscle and B₄ isozyme was increased in other tissues. Especially, the metabolism of liver tissue in *P. esocinus* was regulated by increasing liver-specific C₄ and decreasing A₄ isozyme. But the metabolism of eye tissue in *C. herzi* was regulated by decreasing LDH activity and eye-specific C₄ isozyme. The LDH activity and LDH isozyme in *P. esocinus* were largely increased than *C. herzi* acclimated to rapid increase of DO. And eye-specific C₄ and liver-specific C₄ isozymes played role as lactate oxidase. Therefore, the response of species acclimated to rapid increase of DO seems to be variable, perhaps due to prior exposure to environmental conditions.

Key words – lactate dehydrogenase, isozyme, *Coreoperca herzi*, *Pseudogobio esocinus*, DO

변은 척추동물의 생리적 기능 및 대사효율은 주변 환경요인의 직접적인 영향을 받고, 환경요인들은 서로 밀접한 상호의존적 관계를 나타낸다[18]. 환경내 용존산소량(DO)의 수준은 수생환경에서 중요한 요소이며, 변온동물의 전체적인 대사 또는 산소 소비율은 순응하는 환경의 온도에 따라 다르다[9]. 낮은 DO의 분포와 영향에 대해 대부분의 연구가 이루어졌으며[10,30] 생명체가 산소가 없거나 저산소 조건에 노출되었을 때 에너지 대사를 감소하거나 ATP 생성과정의 에너지 효율을 조절하고, 산화적 인산화에 의한 ATP 생성은 감소하고 혐기적 ATP 생성 회로인 해당과정이 활성화되어 산소 유용성에 따라 호기적 대사와 혐기적 대사의 비율이 조절된다고 보고 되었다[14,21,25]. 또한 DO가 높은 경우도 생리적으로 스트레스가 되고, 호기적 대사는 해가 될 수도 있는 반응성 산소를 형성하므로 환경내 DO 수준과 관련하여 생리적으로 방어하게 되는 것이다[12,22]. 그러나 DO의 수준에 따른 환경학적·생물학적 영향에 대해 연구가 잘 이루어지지 않았다. 따라서 어류가 환경 조건에 순응하는 초기과정에서 혐기적 대사 과정의 중요한 위치를 차지하는 LDH 대사를 확인하고자 하였다.

젖산탈수소효소(EC 1.1.1.27, lactate dehydrogenase, LDH)

는 Ldh-A, Ldh-B 및 Ldh-C에 의해 발현되는 동위효소이다. LDH A₄ 동위효소는 피루브산을 젖산으로 환원시키며 혐기적 조직인 근육에서 우세하게 나타나고, B₄ 동위효소는 젖산을 피루브산으로 산화시키며 호기적 조직인 심장조직에서 우세하게 발현된다. 하부단위체 C를 포함하는 동위효소는 포유류와 조류의 경우 정소에서, 고등한 경골어류의 경우 눈, 뇌 및 간 조직에서 주로 나타나지만 하등한 경골어류에서는 여러 조직에서 나타난다[23,26]. 이러한 조직 특이성은 조직내 LDH 동위효소들의 기능적인 특성을 반영한다. 즉 피루브산 농도가 높을 경우 호기적 조직에서는 젖산 축적이 제한되고 B₄ 동위효소의 기능이 억제되지만, 혐기적 조직에서는 A₄ 동위효소의 활성이 증가되어 젖산이 축적된다[1]. 따라서 LDH 동위효소의 기능적인 특성은 환경요인에 대한 순응과정에서의 대사 생리학적인 연구에 중요한 역할을 수행하며 특히 Ldh-C 유전자는 유전자 발현과 조절 기구를 연구하기 위한 흥미로운 모델이 될 수 있다[6].

본 연구는 Ldh-A, Ldh-B 및 eye-specific Ldh-C 유전자가 발현되어 A₄, B₄ 및 eye-specific C₄ 동위효소를 지닌 꺾지와 liver-specific Ldh-C 유전자가 발현되어 liver-specific C₄ 동위효소를 지닌 모래무지를 환경조건에 순응시킨 후 조직별 LDH 활성의 변화와 LDH 동위효소들의 대사, 특히 eye-specific C₄ 동위효소와 liver-specific C₄ 동위효소를 확인하고자 하였다.

*Corresponding author

Tel : +82-43-229-8527, Fax : +82-43-229-8525

E-mail : jjyum@cju.ac.kr

재료 및 방법

실험재료 및 환경조건

꺼지(*Coreoperca herzi*)는 충청북도 괴산군 달천강 상류와 경상남도 밀양시 밀양강에서 채집하여 90~140 mm 정도 크기의 성체를 사용하였고, 모래무지(*Pseudogobio esocinus*)는 달천강 상류에서 채집하여 130~180 mm 정도 크기의 성체를 사용하였다. 휴대용 전기기포발생기를 사용하여 살아있는 상태를 유지하면서 실험실의 순환식 수조에 운반하였다. 온도는 온도조절기가 부착된 히터(Sungsin SSE 9000)와 냉각수순환장치(Eyela CA-1100)를 사용하여 조절하였고, pH는 pH 상승제와 하강제로 조절하였으며 pH미터(TOA HM-11P)로 측정하였다. DO는 전기기포발생기(Daekang DK-8000)와 조절기가 장착된 고압 산소 탱크를 사용하여 조절하였고 DO미터(TOA DO-14P)로 측정하였다. 온도와 DO는 매 시간 측정하고 pH는 2 시간마다 측정하였다. 채집지인 달천강 상류의 환경조건을 2년간 매월 측정된 결과 수온은 1~28°C이고, DO는 8.4~17.5 ppm, pH는 5.6~9.0으로 조사되었으며, 여러 환경요인이 서로 관련되어 영향을 미치는 것으로 확인되었다(3,18). 단기간 순응 실험의 경우 일반적으로 일주일에서 여러 주 동안 실시하므로[20] 각각의 환경요인의 변화에 따른 결과를 얻기 위해 온도 20±1°C, pH 5±0.5, DO 6±1 ppm 조건에서 꺼지와 모래무지를 15일간 순응시킨 후, 20±1°C, pH 5±0.5, DO 18±1 ppm으로 DO를 증가시킨 조건에 갑작스럽게 30분 1, 2, 4 및 6시간 동안 순응시켜 시간별로 변화를 확인하였다.

조직추출액의 준비

DO 조건을 증가시킨 후 꺼지와 모래무지를 갑작스럽게 6 시간까지 시간별로 순응시킨 후 즉시 해부하여 골격근, 심장, 신장, 간, 눈 및 뇌 조직을 떼어 내어 증류수로 혈액을 제거한 후, 시료 조직에 4°C로 유지시킨 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 6.8)를 3배(v/w)가하여 얼음에 채운 glass homogenizer (Wheaton)로 파쇄 하였다. 조직파쇄액은 4°C, 20,000×g refrigerated centrifuge (Hitachi 20 PR-52D)에서 1 시간씩 2회 원심분리 하였고, 상등액을 시료로 사용하였다.

LDH 활성의 측정

LDH의 활성은 1.50 mM 피루브산 및 0.14 mM NADH를 함유한 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 6.8) 3 ml에 시료를 가한 다음 spectrophotometer (Shimadzu UV-160A)를 사용하여 25°C, 340 nm에서 NADH로부터 NAD⁺로 전환되는 정도를 측정하였다.

Polyacrylamide gel 전기영동과 동위효소 활성의 분석

전기영동은 polyacrylamide vertical slab system (Hoefer

SE250)으로 Davis의 방법[8]에 따라 실시하였다. Slab gel은 7.5% acrylamide separation gel 및 2.5% acrylamide stacking gel이 되도록 만들었다. 시료에는 50% sucrose와 0.05% bromophenol blue 용액을 1:1(v/v)로 가하였고, Tris-glycine buffer (pH 8.3)를 사용하여 전기영동 하였다. LDH 동위효소는 Whitt의 방법[27]에 따라 DL-lactate, nitroblue tetrazolium, phenazine methosulfate 그리고 NAD⁺를 포함한 용액으로 37°C에서 염색한 후, 15% 초산용액으로 고정하였다. LDH 동위효소의 확인 및 동위효소 활성은 PAGE gel상에서 확인하고 image analyzer (Vilber Lourmat) Bio Profil 프로그램으로 사진을 찍은 후 BIO-1D++ 소프트웨어를 이용하여 분석하였다. 밀도계에 의해 정량한 동위효소들의 밀도 또는 양은 각 동위효소 밴드를 구성하는 모든 점들의 합, $V = \sum m_i k_i$ 로 계산되었으며, 각 동위효소의 밀도는 동위효소들을 이룬 모든 점들의 합을 기준으로 하여 상대농도(%)로 측정하였다.

결과 및 고찰

급격한 DO 증가에 순응한 꺼지와 모래무지 조직내 LDH 활성의 변화

20°C, pH 5, DO 6 ppm에서 순응시킨 꺼지와 모래무지를 각각 20°C, pH 5, DO 18 ppm에 갑작스럽게 순응시킨 후 시간별로 LDH 활성의 변화를 측정하였다. LDH 활성의 변화는 DO 6 ppm에서 순응된 각 조직의 LDH 활성을 기준 활성으로 하여 이에 대해 상대적으로 확인하였다. 꺼지에서 기준 활성에 대한 LDH 활성의 변화는 뇌와 간조직에서 각각 39%와 35%로 나타나 다른 조직에 비해 변화 정도가 컸으며, 나머지 조직에서는 변화 정도가 20% 이내로 낮게 나타났다. LDH 활성은 골격근, 눈 및 뇌조직에서 감소하였으며 신장 및 간조직에서 조금 증가하였다(Fig 1). 모래무지 LDH 활성의 기준 활성에 대한 변화는 골격근조직에서 감소되었다 조금 증가하고, 다른 조직에서는 30분에서 급격히 70% 이상 증가하였고 시간이 경과됨에 따라 유사하게 유지되므로 기준 활성에 이르는 시간이 긴 것으로 나타났다. 특히 간조직에서 150% 이상 가장 크게 증가되었다(Fig. 1).

두 종을 비교하면 꺼지는 물이 맑고 DO가 높은 하천 상류에 서식하므로[5] DO가 증가해도 영향을 적게 받아 LDH 활성이 적게 변화된 것으로 보이고, 모래무지는 하천 중류의 모래 바닥이나 모래와 자갈이 섞여 있는 곳에서 서식하므로 꺼지보다는 DO가 낮은 환경에 적응되어 있어[5] 서식 환경의 DO가 급격히 증가되면 LDH 활성이 크게 변화된 것으로 보인다. 즉 급격한 산소 스트레스에 직면해서 더 많은 에너지를 소비하기위한 것으로 에너지 대사의 중요성을 나타내는 것이다. 특히 간조직에서 150% 정도 증가된 것은 급속히 많은 에너지를 생성하기위한 것으로 보인다. 폐기는 바닥에 해감이 깔려있는 하천, 호수 및 늪에서 서식하여 수질오염에

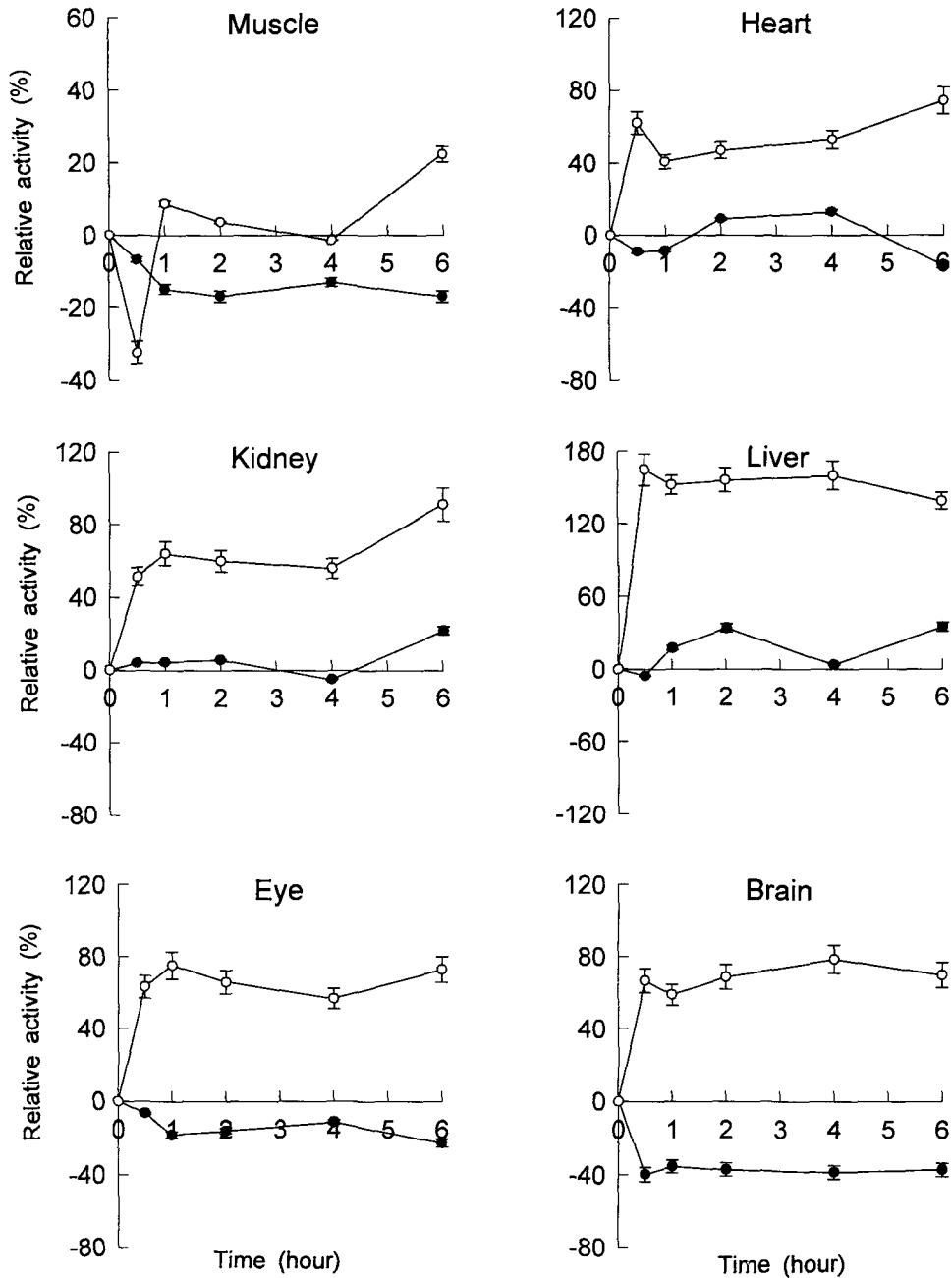


Fig. 1. Changes of relative activities (%) of LDH in tissues of fishes acclimated rapidly to DO change from 6 ppm to 18 ppm. *Coreoperca herzi* (●) and *Pseudogobio esocinus* (○).

대한 내성이 매우 강하므로[5] 온도와 pH 변화에 비해 DO를 증가했을 때 LDH 활성이 급격히 증가했고 특히 간조직에서 90% 정도의 변화를 나타냈다는 결과[15]와 본 연구의 모래무지에서의 결과는 모두 LDH 활성이 크게 변화되어 유사하였다. 그러나 모래무지는 온도가 증가된 조건에 갑작스럽게 순응시 LDH 활성이 20~40% 정도 증가되거나 감소되었고 4~6시간이 경과되면 기준 활성으로 되었지만[16] 본 실험에서 모래무지는 DO를 증가한 수조에 순응시 LDH 활성이 70~150% 정도 크게 증가되고 기준 활성에 이르는 시간이 상당

히 긴 것으로 나타나 환경내 산소 농도에 의해 영향을 많이 받았고, 꺾지는 온도와 pH를 증가한 경우 20~80% 정도 변화되었으나[4,17] DO를 증가한 환경에 순응시 영향을 적게 받아 변화가 적게 나타난 것으로 확인되었다. 순응은 다양한 환경 변화에 대한 체내의 변화를 보상하려는 생명체의 생존 방식이므로, 변온동물이 어떤 환경에 서식하여 적응되어졌느냐에 따라 체내 대사의 변화가 다르게 나타난 것으로 보인다. 온도, pH 및 DO가 변화되면 LDH 활성이 변화됨으로서 보상을 빠르게 수행하여 기준 활성의 수준으로 다시 회복되

며 환경에 순응할 때 동위효소가 매우 중요한 기능을 담당하는 것으로 보고 되었다[4,15,17]. 만조와 간조사이의 환경조건에 서식하는 무척추동물은 온도 보상이 즉각적으로 나타났으나, 대부분 경골어류에서는 몇 주 이상의 기간이 경과된 후 환경에 순응되어 나타난 생리적 대사로서 안정된 상태를 유지하며, 이러한 온도보상이 수세대에 걸쳐 완전히 적응됨으로써 진화에 영향을 미치는 것으로 보고 되었다[13,24]. 메기(*Clarias batrachus*) 경우 유기인산 살충제인 Rogor에 24~192시간 단계별로 노출시킨 경우 LDH 활성이 48시간 동안 최고점에 이르렀다가 96~192시간 후에 감소되고 저산소 조건에서 해당과정에 의해 젖산을 축적하는 것으로 관찰되었다[2]. 그리고 방사선 조사 후 생쥐 조직의 LDH 활성은 7일까지 모두 증가되어[19] 생명체의 종에 따라 환경내 자극이 되는 요인의 종류와 강도, 노출시간에 따라 순응되는 시간이 다른 것으로 보인다.

급격한 DO 증가에 순응한 꺾지와 모래무지의 LDH 동위효소 및 하부단위체의 변화

20℃, pH 5, DO 6 ppm에 순응시킨 꺾지와 모래무지를 20℃, pH 5, DO 18 ppm에 갑작스럽게 순응시킨 후 조직의 LDH 동위효소 활성을 시간별로 측정할 후, 20℃, pH 5, DO 6 ppm에 순응시 활성을 기준 활성으로 하여 상대적으로 활성

의 변화를 측정하고 비교 하였다. DO를 증가한 수조에 꺾지를 갑작스럽게 순응시켰을 때 골격근조직의 LDH는 A₄ 동위효소가 증가하는 경향이 조금 크고 A₂B₂와 B₄는 감소되었다 증가되나 감소폭이 조금 컸으며, 하부단위체 C를 포함하는 동위효소는 감소되었다(Table 1). 심장조직은 A₄는 감소하고 B₄는 조금 증가되었으며 LDH 활성이 감소되는 30분과 1시간에는 A₂B₂와 B₄가 모두 증가되었다. 신장조직은 B₄가 4시간까지 증가하고 A₄는 감소했고, 눈조직은 eye-specific C₄와 하부단위체 C를 포함하는 동위효소가 감소되어 조절되고 A₄, A₂B₂, 및 B₄는 변화가 적게 나타났다. 뇌조직은 A₄는 감소되었다 증가하고 하부단위체 C를 포함하는 동위효소는 증가되었다 조금 감소되나 감소 폭이 조금 더 컸다(Table 1). 꺾지에서 DO 증가에 대한 LDH 하부단위체의 활성의 변화는 골격근, 간 및 눈조직에서 활성이 조금 변화되었고 골격근 조직에서 A 하부단위체의 활성이 변화되었다. 심장, 신장, 뇌조직은 큰 변화가 없었다. 간조직에서는 하부단위체 A와 하부단위체 C를 포함하는 동위효소의 발현이 30분 및 4시간에서만 확인되었고 눈조직에서는 C₄ 동위효소의 활성이 감소되었다(Fig. 2).

DO를 증가시킨 수조에 모래무지를 갑작스럽게 순응시켰을 때 골격근조직의 LDH 동위효소는 A₄와 A₃B가 증가하고 B₄, AB₃, 및 A₂B₂는 감소되었다. 심장은 A₄와 A₃B가 감소하고

Table 1. Relative activities (%) of LDH isozymes in tissues of *Coreoperca herzi* acclimated rapidly to DO change from 6 ppm to 18 ppm (mean±SD, n=5)

| LDH | Time(hr) | 0 | 0.5 | 1 | 2 | 4 | 6 |
|--------|-------------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Muscle | A ₄ | 61.1±2.3 | 60.6±0.9 | 66.9±2.2 | 72.1±1.5 | 53.6±0.4 | 62.4±0.9 |
| | A ₂ B ₂ | 15.6±1.7 | 16.2±1.2 | 14.6±1.5 | 11.1±2.5 | 17.6±1.5 | 16.7±2.5 |
| | B ₄ | 18.2±0.9 | 19.5±1.5 | 15.4±1.5 | 13.1±1.8 | 24.8±0.7 | 18.3±1.8 |
| | C hybrid | 5.1±0.7 | 3.7±0.7 | 3.1±0.9 | 3.7±0.9 | 4.0±1.2 | 2.6±1.0 |
| Heart | A ₄ | 14.0±0.8 | 12.0±0.3 | 11.4±0.2 | 11.5±1.1 | 12.0±2.5 | 11.1±0.3 |
| | A ₂ B ₂ | 30.3±0.5 | 31.2±0.4 | 31.0±0.8 | 28.5±1.3 | 26.7±2.4 | 30.7±0.6 |
| | B ₄ | 55.7±0.5 | 56.8±0.3 | 57.6±0.7 | 60.0±1.2 | 61.3±0.9 | 58.2±0.5 |
| Kidney | A ₄ | 23.9±1.8 | 21.4±0.2 | 22.3±2.9 | 24.3±2.3 | 23.3±2.4 | 22.3±0.9 |
| | A ₂ B ₂ | 24.6±1.2 | 25.6±0.3 | 25.4±0.5 | 22.0±1.7 | 22.9±0.9 | 32.0±1.1 |
| | B ₄ | 51.5±2.7 | 51.4±1.4 | 52.3±3.1 | 53.7±1.5 | 53.8±2.7 | 45.7±0.7 |
| | C hybrid | - | 1.6±1.1 | - | - | - | - |
| Liver | A ₄ | - | 13.9±2.8 | - | - | 2.9±0.9 | - |
| | B ₄ | 100.0 | 83.7±1.5 | 100.0 | 100.0 | 94.2±1.7 | 100.0 |
| | C hybrid | - | 2.4±1.5 | - | - | 2.9±1.0 | - |
| Eye | A ₄ | 10.9±0.9 | 11.5±0.4 | 11.3±0.1 | 7.3±1.8 | 12.1±0.3 | 12.2±0.2 |
| | A ₂ B ₂ | 10.1±0.7 | 16.1±0.5 | 16.5±0.5 | 13.4±1.5 | 11.8±0.5 | 18.2±0.3 |
| | B ₄ | 27.5±1.5 | 28.2±2.0 | 29.8±0.4 | 29.4±0.5 | 26.0±1.1 | 29.1±0.9 |
| | C hybrid | 33.0±2.1 | 31.3±1.7 | 29.6±0.5 | 34.0±2.2 | 34.4±1.4 | 30.4±0.8 |
| | C ₄ | 18.5±0.5 | 12.9±0.9 | 12.8±0.1 | 15.9±0.9 | 15.7±0.7 | 10.1±1.0 |
| Brain | A ₄ | 13.8±1.5 | 10.3±0.9 | 13.0±0.3 | 12.8±0.6 | 14.2±0.7 | 14.4±0.9 |
| | A ₂ B ₂ | 25.1±2.5 | 26.8±2.0 | 28.9±1.9 | 27.8±1.5 | 23.9±1.6 | 26.0±2.3 |
| | B ₄ | 43.2±3.2 | 42.0±1.8 | 43.3±2.5 | 42.2±1.5 | 43.5±0.8 | 44.1±2.7 |
| | C hybrid | 17.9±0.9 | 20.9±1.2 | 14.8±0.9 | 17.2±0.4 | 18.4±0.8 | 15.5±1.2 |

C hybrid : heterotetramer containing eye-specific subunit C.

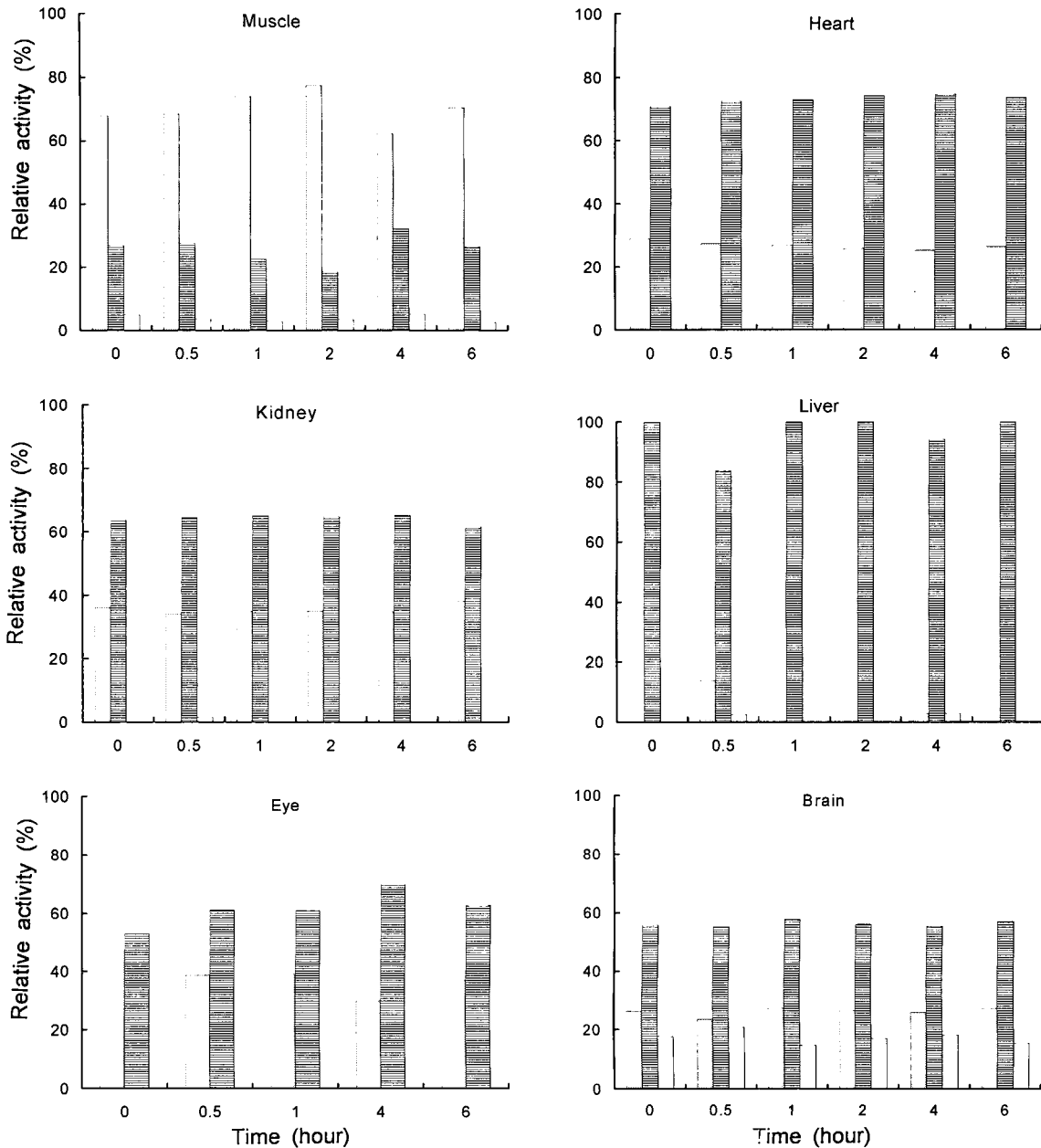


Fig. 2. Relative activities (%) of LDH subunits and isozymes in tissues of *Coreoperca herzi* acclimated rapidly to DO change from 6 ppm to 18 ppm. Subunit A (□); subunit B (▨); heterotetramer containing subunit C (▤); eye-specific C₄ isozyme (▧).

B₄와 AB₃는 증가되었다. 신장은 이질사량체들이 감소하는 경향을 보이고 A₄는 감소했다 증가하고 B₄가 크게 증가되었다. 간조직은 A₄, A₂B₂ 및 AB₃는 감소하고 B₄와 C₄는 증가되었으나 C₄의 증가폭이 훨씬 컸으며, 눈조직은 A₄, A₃B 및 A₂B₂는 감소하고 AB₃와 B₄는 많이 증가되었다. 뇌조직은 A₄, A₃B 및 A₂B₂는 감소하고 AB₃와 B₄는 증가되었다(Table 2). 따라서 골격근조직만 A₄ 동위효소가 증가하고 다른 조직들에서는 B₄가 증가되었으며 liver-specific C₄가 발현된 간조직은 B₄도 증가되지만 주로 C₄ 동위효소가 가장 크게 증가되었다. 또한 모래무지 골격근은 하부단위체 A가 증가하고 하부단위

체 B는 감소하였으며, 나머지 조직은 하부단위체 B가 증가하고 하부단위체 A는 감소하였다. 눈과 뇌조직은 변화가 크게 나타나 하부단위체 A가 감소하고 하부단위체 B는 증가되었으나, 간조직은 하부단위체 A와 하부단위체 B는 감소하고 하부단위체 C는 가장 많이 증가되었다. 간조직에서 B₄ 동위효소는 증가되지만 하부단위체 B는 감소되는 현상이 나타났다(Fig. 3). 따라서 모래무지는 썩어지기에 비해 LDH 활성도 크게 변화되었고 동위효소 종류의 변화 정도도 크게 나타났다. 메기의 LDH 하부단위체 B는 하부단위체 A와 유사한 특징을 나타내어 혐기적 대사에 적응되었고, icefish (*Channichthys*

Table 2. Relative activities (%) of LDH isozymes in tissues of *Pseudogobio esocinus* acclimated rapidly to DO change from 6 ppm to 18 ppm (mean±SD, n=5)

| LDH | Time(hr) | 0 | 0.5 | 1 | 4 | 6 |
|--------|-------------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Muscle | A ₄ | 42.6±1.4 | 46.0±1.5 | 44.6±0.9 | 50.1±3.1 | 44.7±2.7 |
| | A ₃ B | 22.9±0.8 | 26.5±1.0 | 28.1±0.7 | 32.3±2.8 | 27.8±1.8 |
| | A ₂ B ₂ | 14.0±0.8 | 10.4±1.2 | 12.5±0.4 | 7.7±0.3 | 11.4±1.4 |
| | AB ₃ | 10.2±0.4 | 9.2±0.8 | 6.9±0.7 | 4.1±0.7 | 7.9±0.8 |
| | B ₄ | 10.3±0.2 | 7.9±0.5 | 7.9±0.2 | 5.8±0.3 | 8.2±0.4 |
| Heart | A ₄ | 10.8±0.5 | 11.9±0.1 | 7.3±0.1 | 3.3±0.2 | 7.0±0.8 |
| | A ₃ B | 20.4±0.9 | 19.2±0.5 | 18.6±0.7 | 16.9±0.1 | 16.7±1.0 |
| | A ₂ B ₂ | 24.2±2.0 | 22.6±1.2 | 25.1±0.9 | 26.3±2.5 | 24.4±1.7 |
| | AB ₃ | 25.1±1.4 | 22.1±0.9 | 27.1±0.6 | 29.3±3.1 | 28.3±1.5 |
| | B ₄ | 19.5±0.5 | 22.9±0.8 | 21.9±0.6 | 24.2±2.5 | 23.6±3.2 |
| | C hybrid | - | 1.3±0.2 | - | - | - |
| Kidney | A ₄ | 26.1±1.5 | 22.5±1.1 | 26.6±2.0 | 25.3±2.0 | 28.6±1.5 |
| | A ₃ B | 21.0±1.1 | 21.2±0.5 | 20.9±0.7 | 18.0±1.0 | 14.8±0.6 |
| | A ₂ B ₂ | 17.9±0.9 | 17.7±0.4 | 12.8±1.1 | 11.9±0.9 | 10.5±0.9 |
| | AB ₃ | 15.9±0.9 | 14.6±0.9 | 11.6±1.0 | 9.6±0.5 | 9.7±0.3 |
| | B ₄ | 19.1±2.0 | 24.0±1.7 | 28.1±1.8 | 35.2±3.5 | 36.4±2.1 |
| Liver | A ₄ | 13.4±1.0 | 6.4±0.5 | 7.6±0.4 | 7.9±0.7 | 10.2±0.5 |
| | A ₃ B | 17.9±0.9 | 20.8±0.9 | 20.5±1.5 | 20.7±1.2 | 19.0±0.8 |
| | A ₂ B ₂ | 21.3±1.5 | 10.4±0.7 | 9.3±0.7 | 12.4±0.4 | 12.3±0.5 |
| | AB ₃ | 15.3±1.2 | 9.4±0.5 | 8.0±0.9 | 12.0±0.6 | 9.5±0.4 |
| | B ₄ | 9.0±0.7 | 11.7±0.2 | 10.2±0.2 | 12.5±0.1 | 8.3±0.3 |
| | C hybrid | 15.5±1.1 | 12.9±0.5 | - | - | - |
| | C ₄ | 7.6±0.5 | 28.3±1.5 | 44.4±0.3 | 34.5±0.8 | 40.7±1.2 |
| Eye | A ₄ | 16.9±0.9 | 10.5±0.5 | 11.1±0.5 | 8.0±0.1 | 12.5±0.2 |
| | A ₃ B | 19.7±1.2 | 16.6±0.5 | 15.7±0.5 | 11.2±0.9 | 13.4±0.8 |
| | A ₂ B ₂ | 20.6±1.5 | 20.6±1.1 | 21.5±1.0 | 16.0±1.2 | 18.3±0.5 |
| | AB ₃ | 19.9±1.1 | 21.9±1.1 | 21.4±1.3 | 22.1±1.5 | 21.4±0.9 |
| | B ₄ | 22.9±0.4 | 30.3±1.3 | 30.3±1.2 | 42.7±0.9 | 34.4±1.1 |
| Brain | A ₄ | 12.8±0.2 | 7.9±0.5 | 3.4±0.1 | 2.5±0.3 | 3.6±0.3 |
| | A ₃ B | 16.9±0.4 | 14.1±0.6 | 10.6±0.8 | 6.2±0.8 | 10.0±1.6 |
| | A ₂ B ₂ | 19.3±0.8 | 19.4±0.9 | 18.2±0.7 | 14.0±0.8 | 17.2±1.3 |
| | AB ₃ | 21.5±1.0 | 22.2±1.9 | 25.8±2.9 | 26.7±1.7 | 27.1±1.0 |
| | B ₄ | 29.5±1.7 | 36.4±2.6 | 42.0±3.4 | 50.6±2.0 | 42.1±2.3 |

C hybrid : heterotetramer containing liver-specific subunit C.

rhinocerotus)에서 LDH 하부단위체 B가 저산소에 적응되어 하부단위체 A와 유사한 특성을 지닌다는 결과와 유사하였다 [11,15]. 따라서 메기와 비교하면 모래무지는 DO가 좀 더 높은 환경에 적응되어 있는 것을 알 수 있었고, 꺾지 및 모래무지의 경우 호기적 조직인 눈 및 뇌조직에서 LDH 하부단위체 B가 하부단위체 A보다 높게 나타났으나 메기의 경우 하부단위체 B가 낮게 나타났다. 모래무지 눈 및 뇌조직의 LDH 동위효소는 온도 및 DO에 의한 영향을 크게 받는 것으로 사료된다.

LDH A₄, B₄ 및 C₄의 변화양상을 비교한 결과 간조직에서 LDH 활성이 크게 증가하고 liver-specific C₄가 증가하였을 때 A₄는 감소하고 B₄ 동위효소는 조금 증가하였다. 이러한 결과는 간조직에서 LDH C₄가 lactate oxidase 활성을 나타내 젓산을 피루브산으로 산화시키는 B₄의 기능을 갖는 것으로

볼 수 있다. 반면 A₄ 동위효소는 pyruvate reductase 활성을 보이는 결과로 사료된다. 또한 꺾지 눈조직에서는 LDH 활성이 조금 감소하고, A₄와 B₄ 동위효소가 조금 증가하는데 비해 eye-specific C₄는 많이 감소하므로, 주로 C₄에 의해 조절되는 것으로 나타났다. 그러나 증가된 온도에 갑작스럽게 순응했을 때 꺾지 눈조직은 LDH 활성이 감소하였으며 하부단위체 A는 감소하고 B 및 C는 증가되었으나, 하부단위체 C는 30분부터 증가되고 하부단위체 B는 감소했다 서서히 증가하므로 급격한 온도 변화에 대해 초기순응단계에서는 하부단위체 B보다 하부단위체 C에 의해 먼저 조절되는 것으로 나타났다[17]. 따라서 DO가 증가된 조건에 순응시 C₄ 동위효소가 감소되므로 온도 증가시 C₄ 동위효소가 증가되는 결과와 대사상의 유사함을 알 수 있었다. Eye-specific C₄ 동위효소는 광수용기 세포에서 나타나며 경골어류의 시각에 중요한

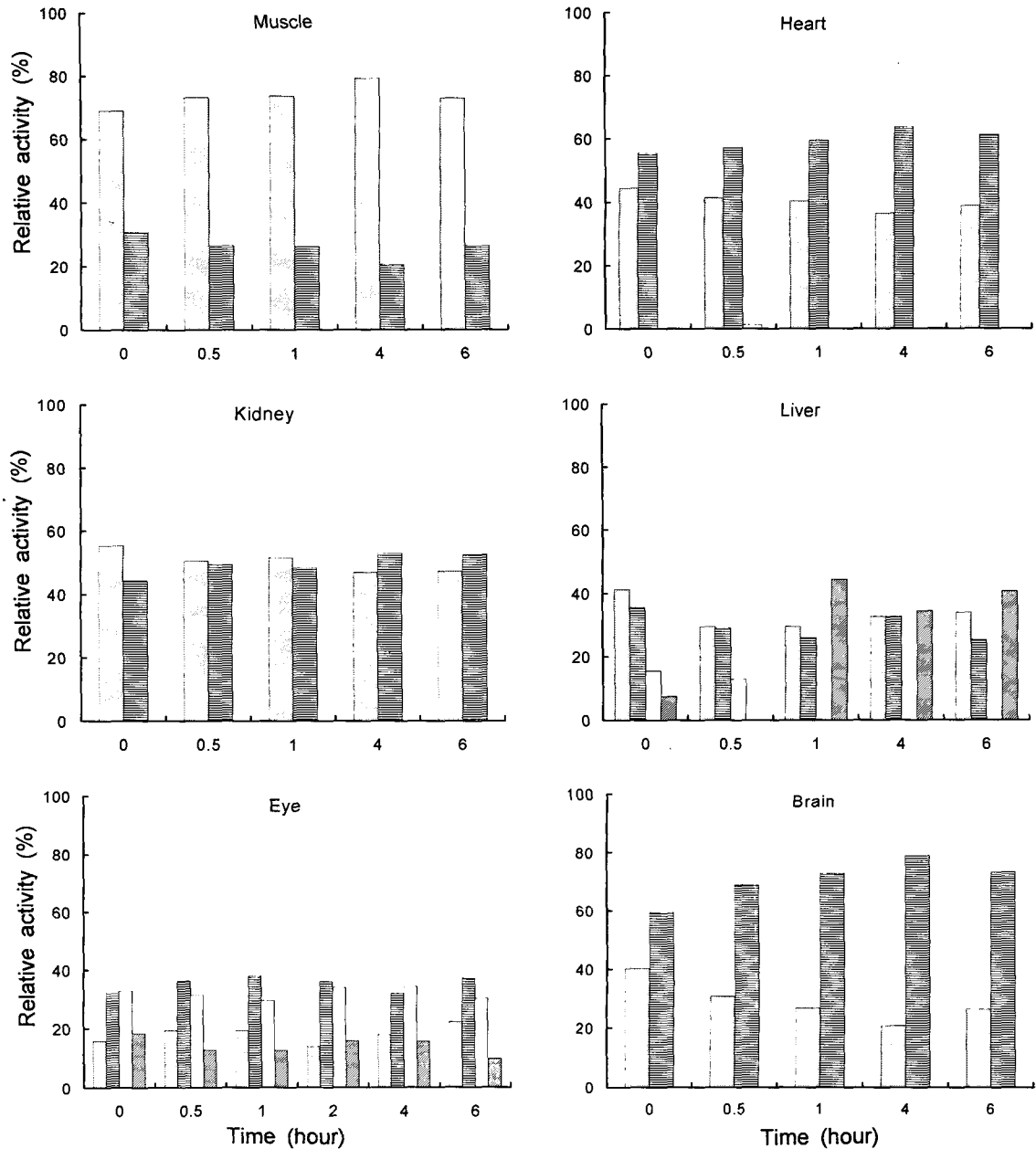


Fig. 3. Relative activities (%) of LDH subunits and isozymes in tissues of *Pseudogobio esocinus* acclimated rapidly to DO change from 6 ppm to 18 ppm. Subunit A (□); Subunit B (▨); heterotetramer containing subunit C (▤); liver-specific C₄ isozyme (▩).

대사적 기능을 나타낸다. C₄ 동위효소는 젖산에 의해 매우 민감하게 억제되며 이러한 특성은 광수용기 세포내에 젖산이 축적되어 일어나는 유독 현상을 막는 생리적 기능을 나타낸다[29]. 이러한 LDH C₄ 동위효소의 생리적 조절 기능이 특히 눈조직에서 민감하게 나타나 하부단위체 C가 하부단위체 B의 기능을 한다는 결과[7,28]와 유사하였다.

호기적 조직인 심장, 신장조직에는 주로 B₄ 동위효소가 많고, 혐기적 조직인 골격근 조직에서는 A₄ 동위효소가 우세하게 기능을 나타내므로[27], DO를 증가시킨 환경에서는 모든 조직에서 B₄ 동위효소가 증가될 것으로 생각되어왔다. 그러

나 본 실험에서 갑자기 DO를 증가시킨 후 단시간 동안 순응시킨 결과 예상했던대로 심장, 신장, 눈 및 뇌조직은 B₄ 동위효소가 증가되었고, 간조직은 LDH 활성이 증가하고 liver-specific C₄ 동위효소가 증가되어 조절되었으나, 골격근 조직은 DO가 증가되었으나 주로 구성하는 동위효소인 A₄ 동위효소가 증가하여 에너지 생성을 하고, 눈조직은 LDH 활성이 감소하고 eye-specific C₄ 동위효소가 감소되어 조절되는 것으로 나타났다. 본 연구결과 급격한 환경변화에 대한 변온동물의 생리적 대사를 나타내는 것으로 LDH 활성이 변화되고 동위효소의 변화도 확인되었으나, 적응기간이 길 경우 기준

활성으로 되어 변화가 적게 일어날 것으로 생각되고, 모래무지와 꺾지처럼 각각의 종이 서식하는 환경조건에 적응되어 있으므로, 자극의 종류, 자극의 정도 및 적응기간에 따라 생체내 반응이 다르게 나타나는 것으로 사료된다.

요 약

용존산소(DO)의 급격한 증가에 순응된 꺾지(*Coreoperca herzi*)와 모래무지(*Pseudogobio esocinus*) 조직내 젖산탈수소효소(EC 1.1.1.27, lactate dehydrogenase, LDH)의 대사와 C₄ 동위효소를 확인하였다. DO 18 ppm에 갑작스럽게 순응시 꺾지 LDH 활성은 뇌와 간조직에서 각각 35~39% 변화되었고, 다른 조직에서는 20%이내로 변화가 적었다. 골격근조직은 LDH A₄ 동위효소가 증가되고 하부단위체 C를 포함하는 동위효소는 감소되었다. 심장조직은 B₄ 동위효소가 조금 증가되었다. 신장조직도 B₄가 증가하고 눈조직은 eye-specific C₄와 C hybrid가 감소되어 조절되었다. DO 증가에 갑작스럽게 순응한 모래무지 간조직에서 LDH 활성은 30분에서 급격하게 150%이상 크게 증가되었고, 다른 조직에서는 70% 이상 변화되었다. 그리고 골격근조직은 A₄ 동위효소가 증가하고 다른 조직들에서는 B₄가 증가되었으며 특히 간 조직의 대사는 liver-specific C₄가 증가하고 A₄는 감소되어 조절되었다. 그러나 꺾지 눈조직의 대사는 LDH 활성이 감소하고 eye-specific C₄ 동위효소가 감소되어 조절되었다. 따라서 DO 증가에 순응시 모래무지는 꺾지에 비해 LDH 활성이 크게 증가되었고 동위효소의 변화정도도 크게 나타났으며, eye-specific C₄와 liver-specific C₄ 동위효소는 lactate oxidase로서 대사를 조절하였다. 그러므로 환경변화에 순응하여 나타나는 대사는 종이 이전에 어떤 서식조건에 적응되었는가에 따라 다른 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

- Almeida-Val, V. M. V. and A. L. Val. 1993. Evolutionary trends of LDH isozymes in fishes. *Comp. Biochem. Physiol.* **105B**, 21-28.
- Begum, G. and S. Vijayraghavan. 1999. Effect of acute exposure of the organophosphate insecticide Rogor on some biochemical aspects of *Clarias batrachus* (Linnaeus). *Environ. Res. Sec.* **A80**, 80-83.
- Cho, S. K. and J. J. Yum. 1996. The adaptational phenotype of lactate dehydrogenase isozymes in *Pseudogobio esocinus* by the environmental variation. *J. Ind. Sci.*, Cheongju Univ. **14**, 333-343.
- Cho, S. K., J. B. Kim and J. J. Yum. 2004. Acclimation of lactate dehydrogenase in tissues of *Coreoperca herzi* to acute change of pH. *J. Ind. Sci.*, Cheongju Univ. **22**, 35-41.
- Choi, K. C., S. R. Jeon, I. S. Kim and Y. M. Son. 1990. *Coloured Illustrations of the Freshwater Fishes of Korea*. pp. 69, 152, 177. Hyangmoon Co., Korea.
- Cooker, L. A. and E. Goldberg. 1994. Organization and Roles in Evolution, Genetics and Physiology, pp. 83-93, *In* Markert, C. L., J. G. Scandalios, H. A. Lim and O. L. Serov (eds.), *Isozymes*, World Scientific Publishing Co., Singapore.
- Coppes, Z. L., M. L. B. Schwantes and A. R. Schwantes. 1987. Adaptive features of enzymes from family Sciaenidae-III. Studies on lactate dehydrogenase(LDH) of fishes from the south coast of Uruguay. *Comp. Biochem. Physiol.* **88B**, 1005-1012.
- Davis, B. J. 1964. Disc electrophoresis-II. Method and application to human serum proteins. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **121**, 404-427.
- Di Giulio, R. T., P. C. Washburn, R. J. Wenning, G. W. Winston and C. S. Jewell. 1989. Biochemical responses in aquatic animals: a review of determinants of oxidative stress. *Environ. Toxicol. Chem.* **8**, 1103-1123.
- Diaz, R. J. and R. Rosenberg. 1995. Marine benthic hypoxia: a review of its ecological effects and the behavioral responses of benthic macrofauna. *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.* **33**, 245-303.
- Feller, G., J. P. Pauly, A. Smal, P. P'Carra, and C. Gerday. 1991. The lactate dehydrogenase of the icefish heart: biochemical adaptations to hypoxia tolerance. *Biochem. Biophys. Acta.* **1079**, 343-347.
- Felton, G. W. 1995. Oxidative stress of vertebrates and invertebrates, pp. 356-434, *In* Ahmad, S. (eds.), *Oxidative stress and antioxidant defense in biology*, Chapman and Hall, New York.
- Hazel, J. R. and C. L. Prosser. 1974. Molecular mechanisms of temperature compensation in poikilotherms. *Physiological reviews* **54(3)**, 620-677.
- Hochachka, P. W., S. C. Land, and L. T. Buck. 1997. Oxygen sensing and signal transduction in metabolic defense against hypoxia: lessons from vertebrate facultative anaerobes. *Comp. Biochem. Physiol.* **118A**, 23-29.
- Kim, J. B. and J. J. Yum. 1997. Acclimation of lactate dehydrogenase in *Silurus asotus* to acute environmental variations. *J. Ind. Sci.*, Cheongju Univ. **15**, 381-388.
- Kim, J. B., S. K. Kim and J. J. Yum. 2003. Changes of activities and isozymes of lactate dehydrogenase in *Pseudogobio esocinus* acclimated to acute change of temperature. *J. Ind. Sci.*, Cheongju Univ. **21**, 37-44.
- Kim, J. B., S. K. Cho and J. J. Yum. 2004. Changes of activities and isozymes of lactate dehydrogenase in *Coreoperca herzi* acclimated to acute increase of temperature for short-term period. *J. Ind. Sci.*, Cheongju Univ. **22**, 43-50.
- Park, S. Y. and J. J. Yum. 1995. Acclimation of lactate dehydrogenase isozymes in *Coreoperca herzi* by environmental variation. *Korean J. Environ. Biol.* **13**, 121-130.
- Park, H. D. and J. J. Yum. 1999. Redistribution of lactate dehydrogenase isozymes and morphology of tissues in *Mus musculus* after irradiation. *Korean J. Environ. Bio.* **17**, 263-270.
- Prosser, C. L. 1958. The nature of physiological adaptation. pp. 167-180. *In* C. L. Prosser, (ed.), *Physiological adaptation*.

Ronald Press, New York.

21. Rees, B. B., F. A. Sudradjat and J. W. Love. 2001. Acclimation to hypoxia increases survival time of zebrafish, *Danio rerio*, during lethal hypoxia. *J. Exp. Zool.* **289**, 266-272.
22. Rifkind, J. M., O. Abugo, A. Levy, R. Monticone and J. Heim. 1993. Formation of Free Radicals under Hypoxia, pp. 509-525. In Hochachka, P. W., P. L. Lutz, M. Rosenthal, G. V. D. Thillart, (eds.), *Surviving hypoxia: mechanism of control and adaptation*. CRC Press Inc., Boca Raton, FL.
23. Shaklee, J. B. and G. S. Whitt. 1981. Lactate dehydrogenase isozymes of Gadiform fishes: divergent patterns of gene expression indicate a heterogeneous taxon. *Copeia* **3**, 567-578.
24. Somero, G. N. and P. W. Hochachka. 1969. Isoenzymes and short-term temperature compensation in poikilotherms: activation of lactate dehydrogenase isoenzymes by temperature decreases. *Nature* **223**, 194-195.
25. Virani, N. A. and B. B. Rees. 2000. Oxygen consumption, blood lactate and inter-individual variation in the gulf killifish, *Fundulus grandis*, during hypoxia and recovery. *Comp. Biochem. Physiol.* **126A**, 397-405.
26. Wheat, T. E. and E. Goldberg. 1983. Sperm-specific lactate dehydrogenase C₄: Antigenic structure and immunosuppression of fertility. pp. 113-129. In *Isozymes: Current Topics in Biological and Medical Research* **7**.
27. Whitt, G. S. 1970. Developmental genetics of the lactate dehydrogenase isozymes of fish. *J. Exp. Zool.* **175**, 1-36.
28. Whitt, G. S. 1987. Species differences in isozyme tissue patterns: their utility for systematic and evolutionary analysis. 1-26. In *Isozymes: Current Topics and Medical Research* **15**, Genetics, development and evolution. Alan R. Liss, New York.
29. Whitt, G. S., E. T. Millet and J. B. Shaklee. 1973. Developmental and biochemical genetics of lactate dehydrogenase isozymes in fishes. pp. 243-276. In J. H. Schroder(eds.), *Genetics and Mutagenesis in Fish..* Spring Verlag, Berlin.
30. Winn, R. N. and D. M. Knott. 1992. An evaluation of the survival of experimental populations exposed to hypoxia in the Savannah River estuary. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **88**, 161-179.