

꿩 *Phasianus colchicus* 흉근에서 Carnitine acetyltransferase의 분리와 특성에 관한 연구

정 충 덕*

Purification and Properties of Carnitine Acetyltransferase from Pheasant Breast Muscle Mitochondria

Choong Duk Chung

Abstract

Carnitine acetyltransferase is a short-chain acyltransferase in the cell organelle and was purified from pheasant breast muscle mitochondria. The molecular weight of mitochondrial carnitine acetyltransferase determined by SDS-PAGE is 66,000. Formation of acylcarnitine was assayed using the spectrophotometer forward assay with DTP as the SH complexing agent. When velocity vs. substrate concentration profiles were performed, using acetyl-CoA and propionyl-CoA at low acyl-CoA concentration less than $0.8\mu\text{M}$, an apparant lag in acetylcarnitine, but not propionylcarnitine, production observed. Such data suggest that carnitine acetyltransferase exhibits different kinetic parameter with acetyl-CoA as compared to propionyl-CoA. The acylgroup of octanoyl-CoA and decanoyl-CoA was not transferred by carnitine acetyltransferase.

서 론

먼 거리를 이동하는 조류들은 근육운동에 쓰기 위하여 지속적이며 많은 양의 에너지를 필요로 한다. 따라서 조류들도 포유동물과 같이 지방산 대사를 통한 에너지의 공급은 중요하다. 이러한 에너지를 공급하기 위하여 지방산이 산화과정을 거치기 위해 미토콘드리아로 운반되려면 carnitine과 결합되어야 한다. 이 과정에서 acyl-CoA의 acyl기를 carnitine에 전달하여

acylcarnitine으로 만드는 효소는 세 종류가 알려져 있다. 지방산 대사에 관여하는 효소들은 그들이 기질로 사용하는 지방산의 길이에 따라서 그 이름들이 정해졌다.

동물세포에서 가장 짧은 지방산의 acyl-CoA에 작용하는 carnitine acetyltransferase (CAT)는 탄소수가 2개 또는 3개인 acetyl-CoA 또는 propionyl-CoA와 carnitine을 기질로 하여 acetylcarnitine과 propionylcarnitine을 만든다. 그리고 이보다 더 긴 지방산의 acyl-CoA에 작용하

* 제주대학교 사범대학 과학교육과

** 이 논문은 1997년도 제주대학교 발전기금 학술연구비에 의해 연구되었다.

는 효소는 medium chain/long chain acyltransferase(Chung and Bieber, 1993)이며, 탄소수가 14이상인 지방산의 acyl-CoA에 작용하는 carnitine palmytoyltransferase(Kerner and Bieber, 1990; Murthy and Pande, 1994; Hoppel *et al.*, 1998)가 있으며 이러한 효소들에 대하여서는 많은 연구가 진행되고 있다.

Carnitine acetyltransferase(CAT)가 동물세포의 미토콘드리아에 존재한다는 보고가 Fritz와 Schultz(1963)에 의하여 발표된 이후, 지금까지 밝혀진 바에 따르면 이 효소는 동물의 조직(Bremer, 1983; Emaus and Bieber, 1982) 내에서 carnitine과 CoASH 사이의 짧은 사슬의 acyl기를 가역적으로 전달하며, 세포소기관인 미토콘드리아, 피옥시좀, 마이크로솜 등에도 있다고 보고되어 있다(Markwell *et al.*, 1973; Seccombe and Hahn, 1980; Farrell *et al.*, 1986). 그런데 이들이 사용한 실험재료는 주로 포유동물의 근육, 심장, 간 등이며, 조류를 재료로 한 보고는 거의 없다.

한편 포유동물에서 정제된 이 효소의 기질농도 변화에 따른 반응속도의 변화를 보면, 낮은 기질농도에서 기질의 농도를 서서히 증가시키면 기질의 농도에 대한 반응속도가 S자형 곡선(sigmoid curve)을 보여 이 효소는 dimer로 되어 있다는 보고(Mittal and kurup, 1980)와 원래는 monomer인데 변형되어 dimer로도 효소활성을 나타낸다는 보고(Bieber, 1988)가 있어 지금까지 그 특성이 명확히 결정되어 있지 않은 효소이다.

따라서 본 연구에서는 썩의 흉근에서 미토콘드리아를 분리하고 CAT를 정제하여 이제까지 보고된 포유동물의 CAT와 그 특성에서 차이가

있는지를 조사하고, 앞으로 이 결과를 토대로 먼 거리를 이동하는 새들과 텃새들의 CAT를 비교하여 효소활성의 차이가 있는지, 그리고 이 효소의 활성화에 영향을 미칠 수 있는 여러 가지 물질을 조사(Fiol *et al.*, 1987)하는 데 기초자료를 제공하고자 한다.

재료 및 방법

1. 썩의 흉근에서 미토콘드리아의 분리

썩의 흉근을 재료로 하여 Kerner와 Bieber(1990)의 방법으로 미토콘드리아를 추출하기 위하여 흉근 조직을 약 155g 절단하였다. 이것을 225mM mannitol, 75mM sucrose, 1mM E-GTA와 protease inhibitor(0.1mM phenylmethylsulfonyl fluoride(PMSF), 1 μ g/ml의 pepstatin A, leupeptin과 bestatin)가 들어있는 pH7.5 완충액(Lilly *et al.*, 1986)에서 Elvehjem tissue homogenizer로 균질화시키고 약 10%의 균질액(w/w buffer)이 되게 하였다. 그후에 이것을 약 600g에서 원심분리하여 상청액을 얻고 침전물을 버렸다. 이 상청액을 다시 800g에서 15분간 원심분리하여 상청액을 버리고 침전물을 mannitol 완충액으로 3회 씻은후 8,000g에서 15분간 원심분리하여 침전물을 1M KCl과 10% glycerol, 20mM Hepes, protease inhibitor가 녹아 있는 완충액에 녹인 다음 -50°C 에서 overnight시켜 막의 파괴를 유도하였다. 이것을 -4°C 이하에서 magnetic stirrer로 서서히 저으면서 녹인 후, 100,000g에서 20분간 원심분리하였다. 여기서 상청액만을 취하여 염에 의한 효소의 활성화도 감소를 줄이기 위해 염분획 하기전에 100mM Hepes의 농도가 되도록 조정하고, 여기에 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 를 천

천히 가하면서 35~55%가 되는 농도의 염분획만을 얻었다.

이 염분획을 mannitol 완충액으로 희석한 후, Amicon® ultrafiltration cell(DIAFLO® ultrafiltration membranes YM3)에서 염을 제거하고 농축시켰다. 충분한 염의 제거를 위하여 mannitol 완충액을 가하여 농축하는 과정을 1회 반복하였다.

2. 미토콘드리아에서 CAT의 정제

a) CAT의 추출

평의 흉근에서 추출한 미토콘드리아를 단백질량이 90mg/ml가 되도록 5mM HEPES, pH7.5에서 0.5mM EDTA, 0.3M KCl, 20% glycerol과 protease inhibitor들이 들어있는 완충액에 녹인 후 이것을 Sephacryl S-300 gel filtration에 사용하였다.

CAT의 활성측정은 spectrophotometer (spectronic® Genesis™)로 Bieber 등(1972)의 방법을 수정한 Lilly 등(1990)의 방법에 따랐다. 반응물은 50mM potassium phosphate, pH7.5에 150μM 4,4'-Dithiodipyridine (DTP), 10mM acetyl-CoA를 사용하였으며, 1.7mM L-carnitine을 더한 후 실온에서 1분 정도의 흡광도(324nm) 변화에 따른 slope로 계산하였다. 그리고 propionyl-CoA, octanoyl-CoA와 decanoyl-CoA에 대한 CAT의 반응도 같은 방법으로 측정하였다.

단백질의 정량은 수정된 Lowry의 방법(Markwell *et al.*, 1981)으로 측정하였다.

b) Sephacryl S-300 gel filtration

Sephacryl S-300 gel filtration은 Chung 등(1991)의 방법을 변형하고 Pharmacia의

HiLoad System Plus™를 사용하여 진행하였다. 기포를 제거한 5mM HEPES 완충액, pH7.5에는 0.5mM EDTA, 0.3M KCl, 20% glycerol과 protease inhibitor가 녹아있는데, 이 완충액을 Sephacryl S-300 컬럼(Pharmacia XK16, 2.5×100cm)에 bed volume의 3배를 흘려 equilibration 시킨 후 superloop™을 이용하여 시료를 loading 하였다. elution 과정에서 각 시험관의 단백질량의 변화는 Monitor UV-MII로 254nm에서 흡광도로 측정하였다. 그리고 얻어진 CAT는 Amicon® ultrafiltration cell에서 농축하여 SP Sepharose cation exchange chromatography 단계에서 사용하였다.

c) SP Sepharose cation exchange chromatography

SP Sepharose chromatography는 Pharmacia의 HiLoad System Plus™에 SP Sepharose 컬럼(Pharmacia XK26, 2.5×100cm)을 사용하였다. 기포를 제거한 5mM HEPES 완충액, pH7.5에는 20% glycerol, protease inhibitor, KCl 10mM, 0.5mM EDTA가 들어 있다. 이 완충액으로 컬럼을 equilibration 시키고 여기에 superloop™을 사용하여 시료를 loading시킨 후 bed volume 3배의 완충액으로 씻고 10mM ~ 0.5M KCl로 직선적 농도구배의 완충액을 가하면서 CAT를 얻고 다시 농축시켰다.

d) Agarose-CoA affinity chromatography

SP Sepharose cation exchange chromatography를 통해서 얻은 CAT를 염을 제거한 후 Pharmacia의 HiLoad System Plus™의 1.0×10cm의 agarose-CoA (bed volume 10ml) 컬럼에 loading하기전에 컬럼을 5mM HEPES, 20% glycerol, 0.5mM EDTA, protease

inhibitor로된 50ml의 완충액으로 equilibration 하였다. CAT는 loading후에 컬럼 부피 3배의 완충액으로 씻은 후 여기에 10mM ~ 0.5M KCl로 직선적 농도구배의 완충액을 더하면서 CAT를 얻고 다시 농축시켰다.

e) SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

SDS-PAGE는 Laemmli(1970)의 방법을 일부 수정한 Lilly 등(1990)의 방법을 사용하였는데, sample buffer는 10% glycerol, 2% sodium dodecyl sulfate(SDS), 0.05% TEMED와 5% mercaptoethanol로 조성되었으며, running gel은 10% acrylamide, 0.14% N, N'-methylene-bis-acrylamide와 1% SDS로, stacking gel은 4% acrylamide, 0.14% N, N'-

methylene-bis-acrylamide, 0.3% TEMED와 1% SDS로 조성되었다.

결과 및 고찰

1. CAT의 분리 및 정제

꿩의 흉근으로부터 분리 정제된 미토콘드리아 CAT의 분자량은 SDS-PAGE를 이용하여 측정된 결과 약 66,000인 것으로 나타났다(Fig. 1). 이 분자량은 Chung 등(1991)이 보고한 쥐의 심장의 미토콘드리아에서 정제된 CAT와 같은 분자량을 보였다. 그리고 CAT의 정제과정의 크로마토그래피 profile은 Fig. 2, Fig. 3 및 Fig. 4과 같았다.

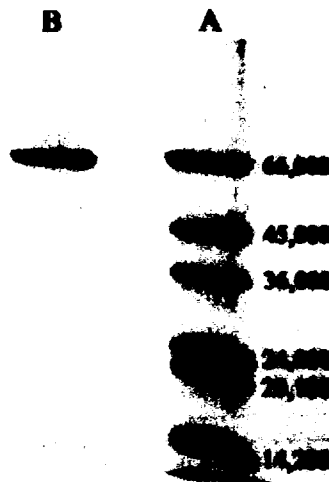


Fig. 1. SDS-PAGE of purified pheasant breast muscle mitochondrial CAT. Lane A contains the molecular weight markers albumin, 66,000 ; ovalbumin, 45,000 ; G-3-P dehydrogenase, 36,000 ; trypsinogen, 24,000 ; and trypsin inhibitor, 20,100 ; α -lactoalbumin, 14,200. Lane B contained 20 μ g purified CAT. The gel was stained with coomassie brilliant blue.

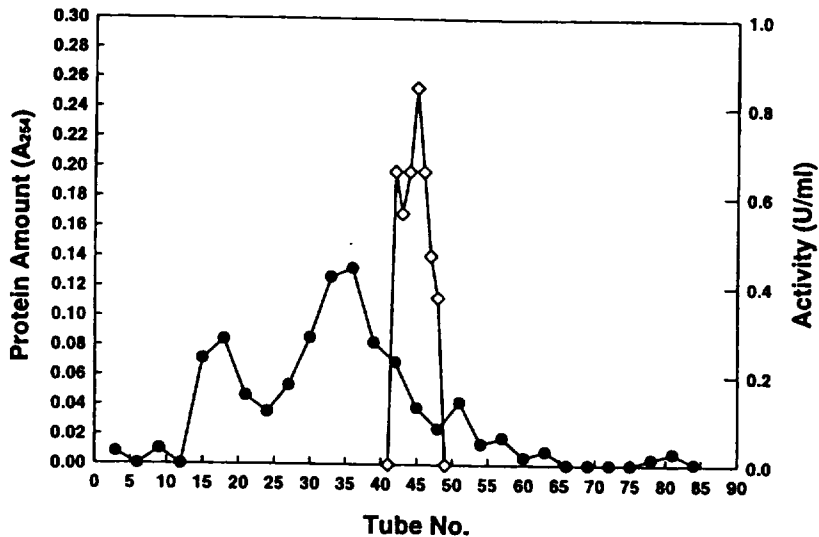


Fig. 2. Sephacryl S-300 gel filtration chromatography of pheasant breast muscle mitochondria. Mitochondria were suspended in buffer and applied as described in "Materials and Methods" and 20 μ l aliquots from each fractions (3.0ml) were assayed for CAT activity at pH7.5 (◇) and protein was monitored by A₂₅₄ (●).

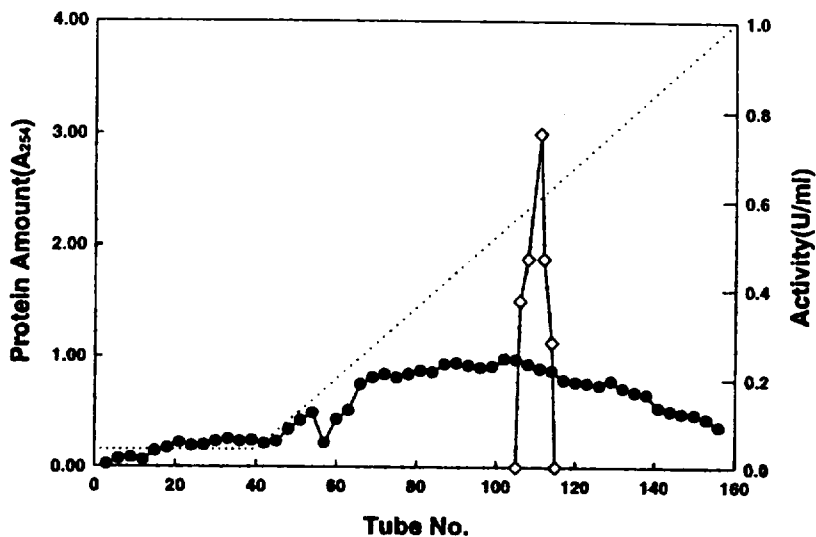


Fig. 3. SP Separose cation exchange chromatography of CAT. CAT were suspended in buffer and as described in "Materials and Methods". CAT was loaded and the column washed with 3 bed volumes of buffer and then eluted with a 10 to 500mM linear gradient of KCl in buffer, pH7.5. Each 20 μ l aliquots from each fracton (3.3ml) was assayed for CAT activity at pH7.5 (◇) and protein was monitored by A₂₅₄ (●).

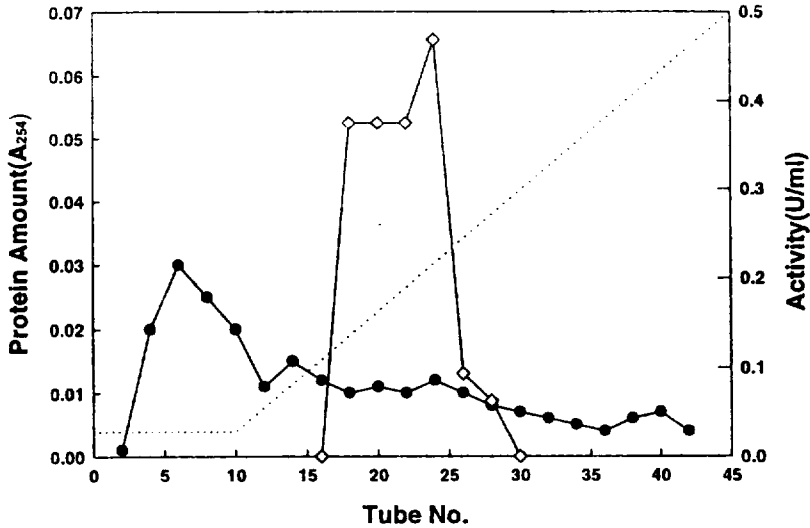


Fig. 4. Agarose-CoA chromatography of CAT. CAT were suspended in buffer and applied as described in "Materials and Methods" CAT was loaded and the column was washed with bed volume of buffer and then eluted with 10 to 500mM linear gradient of KCl in buffer, pH7.5. Each 20 μ l aliquots from each fractions (1ml) was assayed for CAT activity at pH7.5 (◇) and protien was monitored by A₂₅₄ (●).

효소의 정제단계에 따른 활성도 비교는 표 1과 같았다.

Table 1. Purification of pheasant breast muscle mitochondrial CAT

Purification step	Total protein(mg)	Total Activity(U)	Specific Activity(U/mg)	Yield	Purification (fold)
Mitochondrial extract	1,351	66.2	0.049	100	1
Sephacryl S-300 chromatography	202	19.6	0.11	29.6	2.24
SPS epharose chromatography	6.23	7.22	1.16	10.9	23.7
Agarose CoA chromatography	0.416	3.74	9.2	5.6	188

미토콘드리아 추출물에서부터 3단계의 크로마토그래피를 거친 후 비활성은 0.049 U/mg에서 9.2 U/mg으로 높아졌으며 전체활성은 66.2U에서 3.74U로 낮아졌다. 그리고 비활성으로 비교

한 효소의 순도는 Agarose-CoA후에는 188배나 증가되었다. 비활성을 Chung등(1991)의 결과(11.9U/mg)와 비교하면 약 23% 낮은 값이었다. 효소의 정제과정에서 고농도의 KCl에 의

한 활성도 저하 영향을 최소로 하였고, 이외에도 Amicon concentrator를 이용한 염의 제거과정에서 magnetic bar의 stirring에 의한 효소활성이 낮아지는 것을 막기 위해 정제 2일 후에 활성을 측정했음에도 이러한 결과를 보였다.

2. CAT의 spectrophotometric assay

spectrophotometer를 이용하여 CAT의 활성을 측정한 결과는 Fig. 5, Fig. 6과 같았다. Fig. 5에서 보면 acetyl-CoA의 농도가 $0.8\mu\text{M}$ 이하에서는 acetylcarnitine의 합성이 이루어지지 않았으며, $0.9\mu\text{M}$ 이상에서부터 acetylcarnitine 합성이 기질의 농도 증가에 따라 증가하며 V_{max} 에 이르는 결과를 얻었다. 또한 Fig. 6을

보면 CAT가 propionyl-CoA를 기질로 한 경우 $0.5\mu\text{M}$ 이하의 농도에서도 propionylcarnitine을 합성하고 기질의 농도증가에 따라 합성량이 증가하는 경향을 보여서 Fig. 5의 결과와는 대조적이었다. CAT는 acetyl-CoA보다 propionyl-CoA에 대한 친화성이 큰 성질을 가진 효소라는 것을 알 수 있었다. 이러한 결과는 Bieber (1988)가 이 효소는 원래 monomer이며 dimer로도 효소활성을 보인다는 보고 보다는 Mittal과 Kurup가 보고(1980)한 바와 같이 기질의 농도를 낮은 수준에서부터 서서히 증가시켰을 때 반응속도가 S자형 곡선을 보인다는 결과와 같았다.

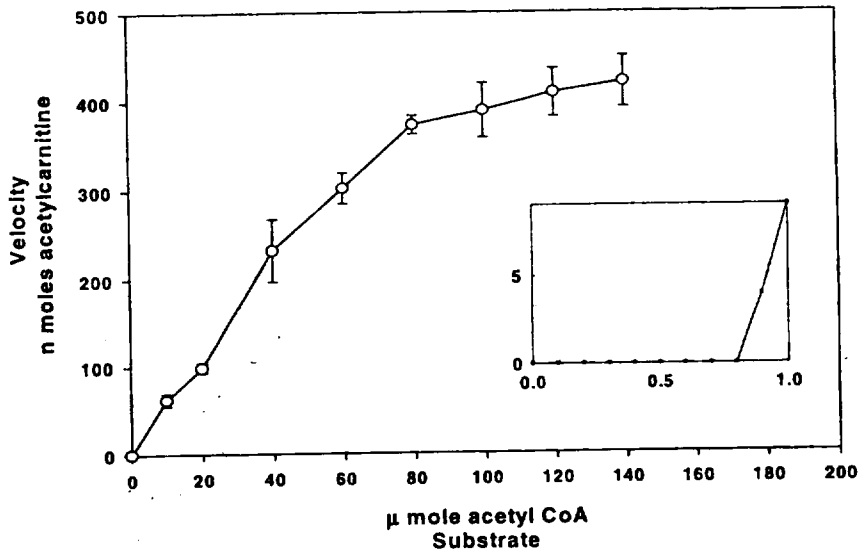


Fig. 5. Effect of acetyl-CoA concentrations on CAT activity. Pheasant breast muscle mitochondrial CAT was spectrally assayed in the presence of increasing acetyl-CoA concentrations.

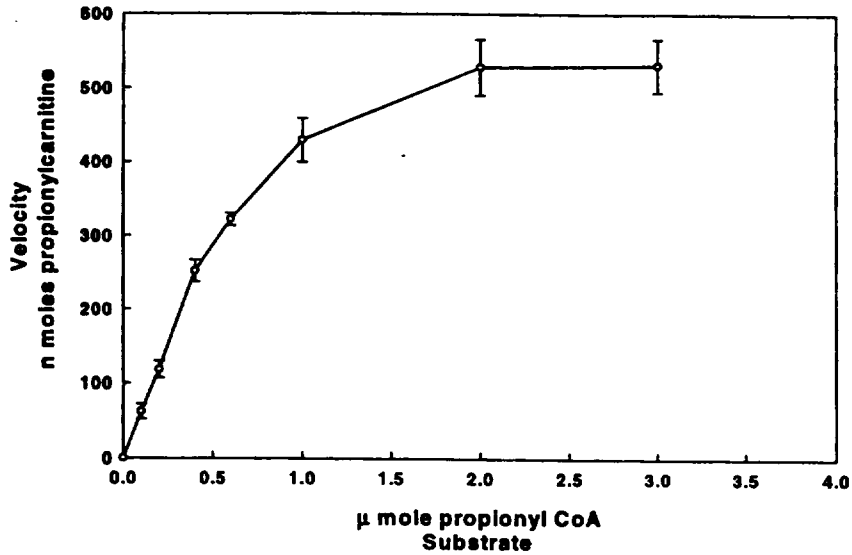


Fig. 6. Effect of propionyl-CoA concentrations on CAT activity. pheasant breast muscle CAT was spectrally assayed in the presence of increasing propionyl-CoA concentrations.

3. Octanoyl-CoA와 decanoyl-CoA와의 반응 용하여 acylcarnitine의 생성정도를 측정된 비
성 비교 활성도 결과는 표 2와 같았다.

CAT를 acetyl-CoA와 propionyl-CoA 및 octanoyl-CoA와 decanoyl-CoA를 기질로 사

Table 2. Synthesis of acylcarnitine by carnitine acetyltransferase (CAT)

Substrate	Specific activity ($\mu\text{mole}/\text{min}/\text{mg}$)
acetyl-CoA	9.7 ± 1.14
propionyl-CoA	13.6 ± 3.46
octanoyl-CoA	none
decanoyl-CoA	none

CAT는 acetyl-CoA와 propionyl-CoA를 기질로 하는 경우의 반응에서 acylcarnitine의 생성은 각각 $9.7 \pm 1.14 \mu\text{mole}/\text{min}/\text{mg}$, $13.6 \pm 3.46 \mu\text{mole}/\text{min}/\text{mg}$ 으로 나타났다. 두 가지의 기질에 대한 반응에서 propionylcarnitine의

생성이 acetylcarnitine의 생성보다 높았다. 그리고 octanoyl-CoA와 decanoyl-CoA와는 acylcarnitine 합성 반응을 하지 않았다. 이러한 결과는 Firtz와 Schultz(1963)의 보고와 같았으며 CAT의 특성을 잘 나타내는 결과를 얻었다.

참 고 문 헌

- Bieber, L. L., T. Abraham and T. Helmrath. 1972. A rapid spectrophotometric assay for carnitine palmitoyltransferase. *Anal. Biochem.* 50: 509-518.
- Bieber, L. L. 1988. Carnitine. *Ann. Rev. Biochem.* 57: 261-283.
- Bremer, J. 1983. Carnitine-metabolism and functions. *Physiol. Rev.* 63. 1420-1468.
- Chung, C. D. and L. L. Bieber. 1993. Properties of the medium chain/long chain carnitine acyltransferase purified from rat liver microsomes. *J. Biol. Chem.* 268: 4519-4524.
- Chung, C., C. D. Chung, and L. L. Bieber. 1991. Purification of heart and liver mitochondrial carnitine acetyltransferase. *Protein Expression and Purification.* 2: 426-431.
- Emaus, R. and L. L. Bieber. 1982. Preparation of radioactive acetyl-L-carnitine by an enzyme exchange reaction. *Anal. Biochem.* 119: 261-265.
- Farrell, S., J. Vogel and L. L. Bieber. 1986. Entry of acetyl-L-carnitine into biosynthesis pathways. *Biochimica of Biophysica Acta.* 876: 175-177.
- Fiol, C. J., J. Kerner and L. L. Bieber. 1987. Effect of malonyl-CoA on the kinetics and substrate cooperativity of membrane-bound carnitine palmitoyltransferase of rat heart mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta.* 916: 482-492.
- Fritz, I. B. and S. K. Schultz. 1965. Carnitine Acetyltransferase. II. *J. Biol. Chem.* Vol. 240: 2188-2192.
- Hoppel, C. L., J. Kerner, P. Turkaly, J. Turkaly and B. Tandler. 1998. The malonyl-CoA-sensitive form of carnitine palmitoyltransferase is not localized exclusively in the outer membranes of rat liver mitochondria. *J. Biol. Chem.* 273: 23495-23050.
- Kerner, J. and L. L. Bieber. 1990. Isolation of malonyl-CoA-sensitive CPT/ β -oxidation enzyme complex from heart mitochondria. *Biochemistry.* 29: 4326-4334.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature.* 227: 680-685.
- Lilly, K., G. E. Bugaisky, P. K. Umeda and L. L. Bieber. 1990. The medium-chain carnitine acyltransferase activity associated with rat liver microsomes is maloyl-CoA sensitive. *Archives of Biochem. and Biophysics.* 280: 167-174.
- Markwell, M. A. K., E. J. McGroarty, L. L. Bieber and N. E. Tolbert. 1973. The subcellular distribution of liver and kidney: A New peroxisomal enzyme. *J. Biol. Chem.* 248: 3426-3432.
- Markwell, M. A., S. Haas, N. E. Tolbert and L. L. Bieber. 1981. Protein determination in membrane and lipoprotein samples, in *"Methods in Enzymology"*(ed by Lowenstein,

- J. M.). 72: pp. 296–303, Academic Press, San Diego.
- Mittal, B. and C. K. R. Kurup. 1980. Purification of clofibrate induced carnitine acetyltransferase from rat liver mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* 619: 90–97.
- Murthy, S. R. and S. V. Pande. 1994. Malonyl-CoA sensitive and insensitive carnitine palmitoyltransferase activities of microsomes are due to different proteins. *J. Biol. Chem.* 269: 18283–18286.
- Secombe D. W. and P. Hahn. 1980. Carnitine acetyltransferase in developing mammals. *Biol. Neonate.* 38 : 90–95.