

백서 신장 Phosphorylase 활성도에 대한 수중물질의 영향

부산대학교 의과대학 생리학교실

申錫大 · 金正漢 · 李相鎬

=Abstract=

Effects of Various Agents on the Phosphorylase Activity of Rat Kidney

Suk Dae Shin, Jung Han Kim, M.D. and Sang Ho Lee, M.D.

*Department of Physiology,
Pusan National University School of Medicine*

The direct effects of various agents on the phosphorylase activity of rat kidney was studied in vitro and the results were summarized as follows.

1. The kidney phosphorylase activity was markedly depressed by iodoacetic acid whereas it was increased by sodium azide.
2. DNP had no effect on the phosphorylase activity, while sodium cyanide slightly increased the activity of the enzyme.
3. Ouabain slightly depressed the phosphorylase activity whereas it was markedly depressed by oligomycin.
4. Vasopressin and histamine markedly increased the phosphorylase activity.

서 론

Epinephrine 에 의하여 간 phosphorylase 활성도가 증가되고 glycogenolysis 가 야기됨은 주지의 사실이다 (Sutherland and Rall 1960, Ellis 1965).

Sutherland and Wasilait(1956)와 Sutherland et al. (1962 및 1968)에 의하면 phosphorylase 는 active 형과 inactive 형이 있으며 active phosphorylase (phosphophosphorylase)는 그 분자 serine 의 인산 하나가 ester 형으로 결합되어 있는 것을 말하며, phosphophosphorylase phosphatase 는 active phosphorylase 의 serine 에 결합 되어 있는 인산을 제거하여 inactive phosphorylase 로 되게 한다고 한다. 이는 다시 adenosine triphosphate 와 dephosphophosphorylase kinase 에 의하여 인산화되어 active phosphorylase 로 전환됨을 증명하고, ATP 는 Mg^{++} 존재 하에서 adenylylase 에 의하여 cyclic AMP 가 형성된다고 하였다.

Epinephrine 의 phosphorylase 활성도에 대한 작용은 동물의 종류, 장기의 종류 및 투여방법에 따라 영향이 각각 다를 것을 지적하고 in vitro 와 in vivo 실험간에도 그 작용이 상이함을 보고한 바 있다(Niemeyer et al.

1963, Sutherland and Robinson 1966).

또한 phosphorylase 활성도 증가에 따라 조직내의 glycogen 함량이 감소된다는 사실도 여러 연구자들에 의하여 입증되었다(Hornbrook and Brody 1963, Dhalla and McLain 1967, Harper 1967). 이와같이 epinephrine 을 비롯한 많은 catecholamines 이 phosphorylase 활성도에 미치는 영향은 비교적 자세히 구명되었으나(Ali et al. 1964, Haugaard and Hess 1965) 대사 억제 물질이 phosphorylase 활성도에 미치는 영향에 대해서는 알려진 것이 희귀하다.

그래서 저자들은 대사 억제 물질인 IAA, NaN_3 , NaCN 및 DNP, Na 투과 억제물질인 ouabain 과 oligomycin, Na 투과와 밀접한 관련이 있는 vasopressin, 그리고 모세혈관막 투과성을 변화시키는 histamine 이 phosphorylase 활성도에 미치는 영향을 관찰하고자 이 실험을 하였다.

실험동물 및 실험방법

실험동물

일정한 조건하에서 사육한 체중 200 g 내외의 성숙한 웅성 백서를 사용하였다.

실험방법

경동맥을 절단하여 출혈사를 일으킨후 신장을 적출하였다. 신장의 phosphorylase 활성도는 Cori and Cori (1943) 방법을 개량한 Diamond and Brody(1965) 방법으로 측정하였다. 이 방법의 원리를 요약하면 glucose-1-phosphate로부터 glycogen이 합성될때 inorganic phosphate(이하 I.P.라고 약기함)가 유리됨은 phosphorylase에 의하여 이루어지므로 I.P.를 측정하여 phosphorylase 활성도라고 정한 것이다. 실험조작을 기술하면 다음과 같다. 앞서 말한바와 같이 적출된 신장조직 500 mg을 평량하고 이를 냉장고내에 보관된 Solution A[0.05 M Tris buffer, pH 6.8, 0.001 M ethylenediaminetetraacetic acid(이하 EDTA라고 약기함), 0.02 M NaF 및 0.3% albumin] 10 ml에 넣어 waring blender로 1분간 homogenize하여 이를 10,000 g에서 10분간 원심침전하여 여기서 얻은 상등액을 취하여 본 실험에 사용하였다. 이때의 모든 조작은 4~5°C에서 하였다. 위와 같은 방법으로 얻은 상등액 0.2 ml를 최종농도인 0.05 M Tris buffer, 0.4% glycogen, 0.01 M glucose-1-phosphate, 0.001 M EDTA, 0.02 M NaF 그리고 0.3% albumin과 같이 소정된 실험관내에 배합하였다. 이때 용액의 전량은 1.0 ml이다. 그리고 위와 똑같이 배합된 실험관을 하나 더 만들어 0.001 M adenosine-5'-monophosphoric acid(이하 AMP라고 약기함)를 첨가하였다. 이와같이 배합된 각 실험관을 37.5°C 항온조에서 30분간 보존하였다가 10% trichloroacetic acid 2.0 ml을 첨가한후 10분간 2500 g로 원심침전하여 상등액을 분리하였다. 이 상등액 1.0 ml을 취하여 Fiske 및 Subbarow (1925) 방법에 의거하여 무기인산량을 측정하였다. AMP가 함유되어 있지 않은 실험관내의 무기인산량을 측정하여 이를 phosphorylase a라고 칭하고 AMP가 함유되어 있는 실험관내의 무기인산량을 측정하여 이를 total phosphorylase라고 칭하였다. 본 실험성적에 표기된 phosphorylase 활성도는 phosphorylase a activity를 말하는 것이며 이는 다음식에 의거하여 %로 표시한 것이다.

phosphorylase a activity =

$$\left(\frac{\text{phosphorylase a}}{\text{total phosphorylase}} \right) \times 100$$

시 약

본 실험에 사용한 시약은 다음과 같다.

α -D-Glucose-1-phosphate (Sigma)

Tris(hydroxy methyl) amino methane (Sigma)

EDTA (disodium salt, Sigma)

NaF (J.T. Baker Chemical)

Albumin (Bovine albumin, Sigma)

Glycogen (Rabbit liver, Sigma)

AMP (Sodium salt, Sigma)

Trichloroacetic acid (片山)

Ammonium molybdate (Merck)

Maleic acid (Eastman)

1-Amino-2-naphthol-4-sulfonic acid (koso)

Sodium Sulfit, anhydrous (片山)

IAA (和光)

NaN₃ (Mallinckrodt)

NaCN (Mallinckrodt)

DNP (Merck)

Vasopressin (Parke, Davis)

Histamine (Gotham Pharmaceutical)

Ouabain (Sigma)

Oligomycin (Sigma)

실험성적 및 고 안

1. 신장 phosphorylase 활성도에 대한 대사 억제 물질의 영향

이 실험에 있어서는 대사억제 물질인 IAA, NaN₃, NaCN 및 DNP 등이 백서신장 phosphorylase 활성도에 미치는 영향을 관찰하였다. 이때의 incubation medium의 조성은 제 1 표에 나타낸 바와 같으며 medium의 전량은 1.0 ml이다. 그리고 실험성적은 재료를 달리한 7~9 회 측정치의 평균치이다.

i) IAA의 영향 :

10 mM IAA는 phosphorylase 활성도를 현저히 억제하였으며 대조군에 비하여 17.6% 억제되었다. (제 1 표 및 제 1 도).

ii) NaN₃의 영향 :

1 mM NaN₃는 phosphorylase 활성도를 현저히 증가시켰는데 대조군에 비하여 15.3% 증가되었다. (제 1 표 및 제 1 도).

iii) NaCN의 영향 :

10 mM NaCN는 백서신장 phosphorylase 활성도를 미약하게 증가시켰다. (제 1 표 및 제 1 도).

iv) DNP의 영향 :

10⁻⁵M DNP는 phosphorylase 활성도를 아주 미약하게 증가를, 10⁻⁴M DNP는 phosphorylase 활성도를 미약하게 억제시켰는데 이로 보아 DNP는 백서 신장 phosphorylase 활성도에 별 영향을 주지 않은 것으로 생각

Table 1. The composition of incubation medium for the determination of the effect of metabolic inhibitors on kidney phosphorylase activity in vitro

Composition		Tube no.	1	2	3	4	5	6	F.C.
0.5 M	Tris buffer	(ml)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.05 M
4 %	glycogen	"	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.4 %
0.1 M	G-1-P	"	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.01 M
0.01 M	EDTA	"	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.001 M
0.2 M	NaF	"	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.02 M
3 %	albumin	"	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.3 %
	Supernatant sol.	"	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	
10 ⁻¹ M	IAA	"	—	0.1	—	—	—	—	
10 ⁻² M	NaN ₃	"	—	—	0.1	—	—	—	
10 ⁻¹ M	NaCN	"	—	—	—	0.1	—	—	
10 ⁻³ M	DNP	"	—	—	—	—	0.1	—	
10 ⁻⁴ M	DNP	"	—	—	—	—	—	0.1	
	Distilled water	"	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	

G-1-P; Glucose-1-phosphate,

F.C.; Final Concentration

※ Duplicate samples of the supernatant solutions were incubated in the same reaction mixture containing in addition, AMP in a final concentration of 0.001 M for the determination of total phosphorylase.

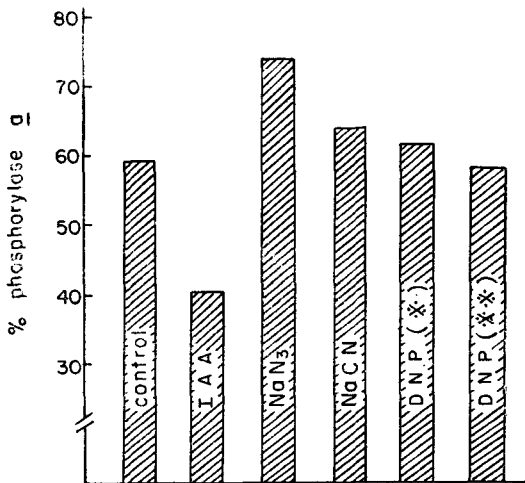


Fig. 1. Effect of metabolic inhibitors on kidney phosphorylase activity in vitro.

* : DNP 10⁻³M

** : DNP 10⁻⁴M

된다(제 1 표 및 제 1 도).

2. 신장 phosphorylase 활성도에 대한 vasopressin 및 histamine 의 영향

이 실험에 있어서는 vasopressin 및 histamine 이 백서신장 phosphorylase 활성도에 미치는 영향을 관찰한 것인데 incubation medium 의 조성은 제 2 표에 나타낸 바와 같으며 그 영향은 다음과 같다.

i) Vasopressin 의 영향 :

Phosphorylase 활성도에 미치는 vasopressin 의 영향은 제 2 표 및 제 2 도에 보인바와 같이 vasopressin 에 의하여 phosphorylase 활성도가 현저히 증가되었는데 0.02 u/ml vasopressin 농도에서 phosphorylase 활성도를 12.6% 증가시켰고 0.2 u/ml vasopressin 은 17.8% 증가시켰다. 그런데 두꺼비 방광상피세포막에서 vasopressin 이 Na 에 대한 투과성을 증가시키며(Frazier et al. 1962), 두꺼비 방광상피세포막과 포유동물 신장에서 vasopressin 에 의하여 phosphorylase 활성도가 증가되었다고 하였는데(Handler and Orloff 1963), 저자들의 본 실험적은 두꺼비 방광상피세포막등에서 연구한 성적과 부합된다고 하겠다(제 2 표 및 제 2 도).

ii) Histamine 의 영향 :

이 실험에 있어서는 phosphorylase 활성도에 미치는 histamine 의 영향을 관찰한 것인데 제 2 표 및 제 2 도에 나타낸 바와 같이 histamine 에 의하여 phosphorylase 활성도가 현저히 증가되었는데 농도변동에 따르는 영향을 보면 0.001 mg/ml 의 histamine 농도에서 phosphorylase 활성도가 15.3% 증가되었고 0.01 mg/ml 의 histamine 농도에서 18.2% 증가되었다. 이러한 사실은 histamine 이 모세혈관막에 작용해서 그 투과성을 변화시키며 투과성증가로 혈장단백질이 투과되어 나갈때 체액 각 구분사이의 이온농도 경사 및 수분량에 변화를 가져오는 기본작용외에 phosphorylase 활성도에도 영향

Table 2. The composition of incubation medium for the determination of the effect of vasopressin and histamine on kidney phosphorylase activity in vitro

Composition	Tube no.	1	2	3	4	5	F.C.
0.5 M Tris buffer	(ml)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.05 M
4 % glycogen	"	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.4 %
0.1 M G-1-P	"	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.01 M
0.01 M EDTA	"	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.001 M
0.2 M NaF	"	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.02 M
3 % albumin	"	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.3 %
Supernatant sol.	"	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	
2 u/ml vasopressin	"	—	0.01	0.1	—	—	
0.1 mg/ml histamine	"	—	—	—	0.01	0.1	
Distilled water	"	0.2	0.19	0.1	0.19	0.1	

※ Duplicate samples of the supernatant solutions were incubated in the same reaction mixture containing in addition, AMP in a final concentration of 0.001 M for the determination of total phosphorylase.

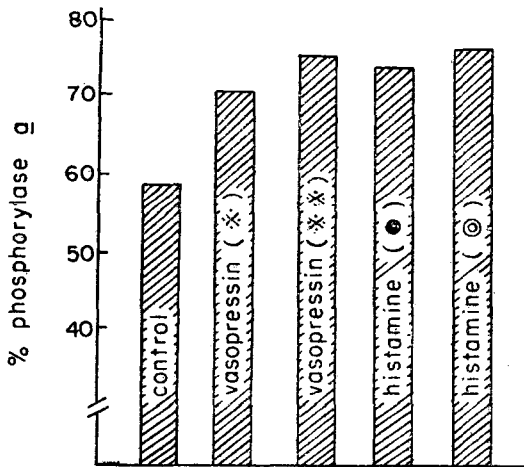


Fig. 2. Effect of vasopressin and histamine on kidney phosphorylase activity in vitro.

- * : vasopressin 0.02 u/ml
- ** : vasopressin 0.2 u/ml
- : histamine 0.001 mg/ml
- ⊙ : histamine 0.01 mg/ml

을 미치는 것으로 생각되며 대단히 흥미있는 사실로서 금후의 연구가 요할 것으로 사료된다(제 2 표 및 제 2 도).

3. 신장 phosphorylase 활성도에 대한 ouabain 및 oligomycin의 영향 :

이 실험에 있어서는 ouabain 및 oligomycin이 백서신장 phosphorylase 활성도에 미치는 영향을 관찰한 것인데 incubation medium의 조성은 제 1 표와 같으며

다만 그 조성중 ouabain 과 oligomycin으로 각각 대체한 것이다. 제 3 표에 나타낸 바와 같이 0.1 mM 및 1 mM ouabain에 의하여 phosphorylase 활성도가 별 영향을 받지 아니하였으며 한편 oligomycin에 의하여 현저히 억제되었는데 농도변동에 따르는 영향을 보면 1 μg/ml의 oligomycin 농도에서 phosphorylase 활성도가 17% 억제되었고 6 μg/ml의 oligomycin 농도에서는 31%나 억제되었다. 이러한 사실은 ouabain 과 oligomycin 양자 공히 Na 이동을 억제하는 물질로서 phosphorylase 활성도에 미치는 영향은 상이한 것으로 생각된다. 그런데 ouabain 과 oligomycin은 Na-K ATPase 활성도를 억제하며, ouabain은 ATP로부터 유래된 인산화 중간화합물의 유리를 분해하므로 Na-K ATPase 활성도를 억제한다고 하며(Matsui and Schwartz 1968), oligomycin은 산화적 인산화를 억제하고(Slater 1963), mitochondria에서 고에너지 인산화 중간산물로부터 ADP로의 인산이동단계를 분해하므로 ATP의 형성을 억제할 것이라고 추정하고 있다. 더욱이 oligomycin은

Table 3. Effect of ouabain and oligomycin on kidney phosphorylase activity in vitro

Compound	Relative phosphorylase activity (%)
control	100
ouabain 0.1 mM	98±5.9
1 mM	95±5.2
oligomycin 1 μg/ml	83±5.6
6 μg/ml	69±4.2

Activity in the control preparation is taken as 100%. Results are expressed as mean±standard error

적혈구에서 Na의 유출을 억제하며(Glynn 1963, Whittam et al. 1964), 뇌 microsome 분획의 Na-K ATPase 활성도를 억제한다고 하였다(Whittam et al. 1964). 그리고 ouabain과 oligomycin이 Na-K ATPase 활성도의 억제양상은 흡사하여 이들 양자가 인산화 중간단계에 작용하는 것으로 생각되나 ATPase계의 서로 다른 부위에 영향을 준다고 하였다(한 및 이 1971). 이로 보아 phosphorylase 활성도에 미치는 이들 양자의 영향이 서로 다른 것은 흥미있는 사실이라 사료된다(제 3 표).

결 론

백서신장 phosphorylase 활성도에 미치는 수증물질의 영향을 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 백서신장 phosphorylase 활성도는 IAA에 의하여 현저히 억제되었고 NaN_3 에 의하여 증가되었다.
2. 이 phosphorylase 활성도는 DNP에 의하여 영향을 받지 않았으며 NaCN에 의하여 경미하게 증가되었다.
3. 백서신장 phosphorylase 활성도는 ouabain에 의하여 경미하게 억제되었고 oligomycin에 의하여 현저히 억제되었다.
4. 이 phosphorylase 활성도는 vasopressin과 histamine에 의하여 현저히 증가되었다.

REFERENCES

Ali, H.I., El. S., Antonio, A. and Haugaard, N.: *The action of sympathomimetic amines and adrenergic blocking agents on tissue phosphorylase activity. J. Pharmacol.* 145:142, 1964.

Cori, G.T. and Cori, C.F.: *Crystalline muscle phosphorylase. 4. Formation of glycogen. J. Biol. Chem.* 151:57, 1943.

Dhalla, N.S. and McLain, P.L.: *Studies on the relationship between phosphorylase activation and increase in cardiac function. J. Pharmacol.* 155:389, 1967.

Diamond, J. and Brody, T.M.: *Phosphorylase activity in rat uterus after catecholamine administration. Biochem. Pharmacol.* 14:7, 1965.

Ellis, S.: *Cited by Haugaard, N. and Hess, M.E.: Actions of autonomic drugs. Pharmacol. Rev.*

17:27, 1965.

Fiske, C.H. and Subbarow, Y.: *The colorimetric determination of phosphorus. J. Biol. Chem.* 66:375, 1925.

Frazier, H., Dempsey, E.F. and Leaf, A.: *Movement of sodium across the mucosal surface of the isolated toad bladder and its modification by vasopressin. J. Gen. Physiol.* 45:529, 1962.

Glynn, I.M.: *Transport of adenosine triphosphatase in the electric organ. The relation between ion transport and oxidative phosphorylation. J. Physiol. London,* 169:452, 1963.

Handler, J.S. and Orloff, J.: *Activation of phosphorylase in toad bladder and mammalian kidney by antidiuretic hormone. Amer. J. Physiol.* 205:298, 1963.

Harper, H. A.: *Review of physiological chemistry, 11th ed., Lange medical publication, Los Altos, California, p. 223, 1967.*

Haugaard, N. and Hess, M.E.: *Actions of autonomic drugs on phosphorylase activity and function. Pharmacol. Rev.* 17:27, 1965.

Hornbrook K.R. and Brody, T.M.: *Phosphorylase activity in rat liver and skeletal muscle after catecholamines. Biochem. Pharmacol.* 12:1407, 1963.

Matsui, H. and Schwartz, A.: *Mechanism of cardiac glycoside inhibition of the $(\text{Na}^+ - \text{K}^+)$ -dependent ATPase from cardiac tissue. Biochim. Biophys. Acta,* 151:655, 1968.

Niemeyer, H., Gonzalez, C. and Rozzi, R.: *Cited by Hornbrook, K.R. and Brody, T.M.: Phosphorylase activity in rat liver and skeletal muscle after catecholamines. Biochem. Pharmacol.* 12:1407, 1963.

Slater, E.C.: *Uncouplers and inhibitors of oxidative phosphorylation. In: Metabolic inhibitors, edited by R.M. Hochster and J.H. Quastel. New York, Academic, 503, 1963.*

Sutherland, E.W. and Wasilati, W.D.: *The relationship of epinephrine and glucagon to liver phosphorylase. J. Biol. Chem.* 218:459, 1956.

Sutherland, E.W. and Rall, T.W.: *The relation of adenosine-3',5'-phosphate to the actions of*

- catecholamines and other hormones. Pharmacol. Rev. 12:265, 1960.*
- Sutherland, E.W., Rall, T.W. and Menon, T.: *Adenylcyclase. I. Distribution, preparation and properties. J. Biol. Chem. 237:1220, 1962,*
- Sutherland, E.W. and Robinson, G.A.: *The role of cyclic 3', 5'-AMP in responses to catecholamines and other hormones. Pharmacol. Rev. 18:145, 1966.*
- Sutherland, E.W., Robinson, G.A. and Butcher, R. W.: *Some aspects of the biological role of adenosine 3', 5'-monophosphate(cyclic AMP). Circulation 37:279, 1968.*
- 한성수, 이상호 : 백서 신장 Cell Debris 분획내 ATPase 활성도에 관한 연구. 부산의대 잡지 11:129, 1971.
- Whittam, R., Wheeler, K.P. and Blake, A.: *Oligomycin and active transport reactions in cell membranes. Nature 203:720, 1964.*