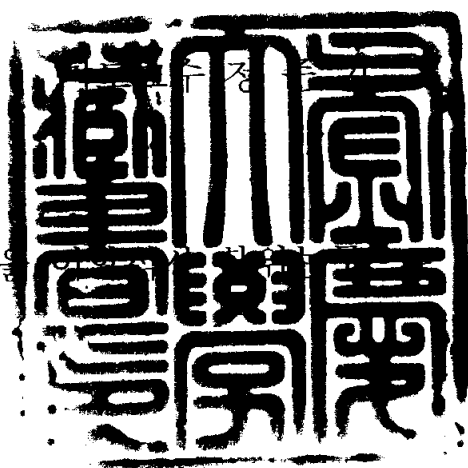


이학석사 학위논문

넙치(*Paralichthys olivaceus*) 간으로부터
phosphatidylcoline을 가수분해하는
효소의 특성

이 논문을 위하여
이 학 석 사 학 위 논 문
제출함



2004년 2월

부경대학교 대학원

어 병 학 과

이 상 환

이상환의 이학석사 학위논문을 인준함

2003년 12월

주 심 이학박사 김 기 홍



위 원 이학박사 강 주 찬



위 원 약학박사 정 준 기

인

목 차

목차	i
Abstract	ii
I. 서 론	1
II. 재료 및 방법	5
1. 재료	5
2. 실험 방법	5
2-1. 분리정제	6
2-2. 인지질 가수분해효소의 활성측정	8
2-3. Thin Layer Chromatography (TLC)	9
2-4. 생화학적 특성	10
2-5. 기질 특이성	11
III. 결 과	12
1. 분리정제	12
2. TLC 결과	17
3. 생화학적 특성	19
4. 기질 특이성	26
IV. 고 찰	31
V. 요 약	36
VI. 감사의 글	38
VII. 참 고 문 헌	39

Characterization of phosphatidylcholine hydrolyzing enzyme from the liver of flounder, *Paralichthys olivaceus*

Sang-Hwan Lee

Department of Aquatic Life Medicine, Graduate School
Pukyong National University

Abstract

In the present study, phosphatidylcholine (PC) hydrolyzing enzymes had been isolated from membrane and cytosol of flounder liver. PC hydrolyzing enzyme solubilized in 1% Triton - X 100 from membrane was partially purified by sequential chromatography on Heparin Sepharose CL-6B and Heparin-5PW columns. PC-hydrolyzing enzyme collected from cytosol was partially purified by sequential chromatography on DEAE Sephacel, DEAE-5PW, Heparin-5PW, Mono Q and Superdex-200 columns. The products by membrane-bound hydrolyzing enzyme were identified as phosphatidic acid and choline, but in the presence of primary alcohol, phosphatidylethanol was produced at the expense of phosphatidic acid. However, the products by cytosolic enzymes were detected as phosphocholine and diacylglycerol (DAG). These data suggest that membrane-bound and cytosolic hydrolyzing enzyme may be a PC-PLD type and PC-PLC type, respectively. Both enzymes had pH optimum at

below 6.0 and temperature optimum at 37°C. The activity of PC-PLD was dose-dependently increased by Ca^{2+} , whereas PC-PLC was increased by Mg^{2+} . The activity of PC-PLD was stimulated by PIP_2 and PE, but decreased by PC. Contrastly, the activity of PC-PLC was increased by PIP_2 , but not affected by PC and PE.

Key words : *Paralichthys olivaceus*, phosphatidylcholine, PLD, PLC

I. 서론

인지질가수분해 효소는 주요한 lipolytic enzyme으로서 인지질 (phospholipid)의 ester 또는 phosphodiester bond를 가수분해 하게 된다. 이러한 효소는 막지질의 생합성 및 분해를 포함하는 다양한 세포대사에 있어 중요한 역할을 하게 되며, 또한 가수분해에 의해 생성된 2차 전달자는 생체 신호 전달 과정에 있어 중요한 역할을 하고 있다(Andrew, 1997). 이러한 인지질가수분해 효소에는 phospholipase A₂ (PLA₂), phospholipase C (PLC), phospholipase D (PLD)가 있다.

생체막을 구성하는 인지질에는 phosphatidylethanolamine (PE), phosphatidylcholine (PC), phosphatidylserine (PS), phosphatidylinositol (PI), phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂), phosphatidylinositol 4-phosphate (PtlIns(4)P) 등이 있다. 특히 PC는 plasma membrane에 존재하는 주요 인지질로서 포유류의 경우 40 ~ 60%를 차지하는 것으로 알려져 있다(Zhang et al., 2001). 이러한 PC가 가수분해 되면 생체 신호전달 과정에 관여하는 2차 전달 물질을 생성하여 세포대사, 성장, 분화 등의 조절에 관여하게 된다(Wakelam, 1998). 생체 막을 구성하는 PC를 가수분해하는 효소로는 PC-specific phospholipase A₂ (PC-PLA₂), PC-specific phospholipase C (PC-PLC), PC-specific phospholipase D (PC-PLD)가 알려져 있으며, 이러한 가수분해 효소들은 PC의 기본구조 내에서 가수분해 되는 위치에 따라 명명이 달라진다.

PLA₂는 인지질의 기본 구조에서 sn-2 ester 결합부분을 가수분해 하게 된다. 이 가수분해 효소의 경우 sequence homology에 의해 12개의 그룹(I~XII)으로 나

누여지며, 포유류의 경우 다양한 조직에 분포되어져 있다(Diaz et al., 2003). 이 효소에 대한 정확한 활성기작은 밝혀져 있지 않으나 lipid digestion, cell migration, 세포증식, 세균방어 등에 있어 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Buck et al., 2000). PC-PLA₂는 PC를 가수분해하여 arachidonic acid (AA)와 lysophospholipid (LPL)를 생성하게 된다. 생성된 AA는 염증반응과 암식작용에 관여하며(Lennartz, 1998), NADPH oxidase의 활성화와 생체 신호전달에 관여하게 된다. LPL은 prostaglandin, thromboxanes, leukotrienes, lipoxins에 대한 유도제 역할을 하며(Dunn et al., 2001), 또한 신호전달에 있어 중요한 역할을 하게 된다.

PLC는 인지질의 기본구조에서 sn-3 부분을 가수분해 하는 효소이다. 이 가수분해 효소는 인지질에 대한 특이성에 따라 PC에 특이성을 나타내는 PC-PLC와 PI에 특이성을 나타내는 PI-PLC로 구분되어 진다. PC-PLC의 경우에는 PC를 가수분해하여 phosphocholine과 diacylglycerol (DAG)를 생성하게 된다(Shin et al., 2000), PI-PLC의 경우에는 domain과 아미노산 잔기의 구조에 따라 PLC- β , PLC- γ , PLC- δ 의 형태로 구분되며, PIP₂를 가수분해 하여 inositol triphosphate (IP₃)와 DAG를 생성하게 된다(Exton, 1994). PI-PLC에 의해 생성된 IP₃는 세포내에 저장된 Ca²⁺를 방출하게 되며, PC-PLC와 PI-PLC에 의해 생성된 DAG는 phospholipid-dependent protein kinase C (PKC)를 활성화하게 된다(Preuss et al., 2001; Nofer et al., 2000). 대부분의 연구는 PI-PLC에 대한 연구가 많이 이루어져 있으나(Rhee et al., 1997), PC-PLC의 경우에는 아직 정확한 생리적 기능 및 조절 기작이 명확히 규명되어져 있지 않다.

PLD는 인지질의 기본구조에서 phosphate와 치환부위의 phosphodiester 결합 부분을 가수분해하게 된다. 포유류의 경우 PLD 활성화에 있어 ARF 및 Roh A와 같

은 small GTP-binding protein과 PKC의 영향을 받는 PLD1 type과 영향을 받지 않는 PLD2 type으로 나누어 지며(Hammond et al., 1995, 1997, Han et al., 1996; Han et al., 1996), 일반적으로 다양한 세포의 신호전달과 분비기작에 있어 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Frohman et al., 1998). PC-PLD는 PC를 가수분해하여 phosphatidic acid (PA)와 choline을 생성하게 되며(Rizzo et al., 2002), 생성된 PA는 respiratory burst, exocytosis, proliferation, actin polymerization, hormone-induced steroidogenesis 등의 조절에 관여하게 된다(Exton, 1994; Billah, 1993; Lauritzen et al., 1994; Amsterdam et al., 1994). 또한 PLD 활성화는 hormone, growth factor, neurotransmitter 등의 기작에 있어 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Viggaard et al., 1995).

이상의 인지질 가수분해 효소에 대한 연구는 육상생물의 경우 포유류, 박테리아, 식물, 효모에 있어 많은 연구가 이루어졌다. 이 효소는 세포대사, 성장, 증식, 탐식작용, 염증반응, cell migration, lipid digestion, 세균방어 등에 관여하며, 또한 2차 전달 물질을 생성하여 신호 전달 과정에 있어 중요한 역할을 하는 것으로 밝혀져 있으나, 어류에 대한 보고는 거의 이루어지지 않았다. 어류는 육상 생물과는 다른 수계라는 특수한 환경 속에 살아가며, 육상 생물과는 다른 생리적 특성을 보이고 있다. 그러므로 육상과는 다른 수계 환경에 서식하고 있는 어류의 인지질 가수분해 효소를 확인하는 것은 어류의 다양한 생리적, 병리적 현상을 설명하는데 있어 중요한 기초적인 자료가 될 것이다.

따라서 이번 연구의 목적은, 어류 내 존재하는 인지질 가수분해 효소와 그 특성을 알아보기 위해 우리나라에서 가장 광범위하게 양식되고 있는 어종인 넙치를 이용하여 확인하고자 하였다. 포유류의 경우 가수분해 효소는 뇌와 간에

주로 분포하는 것으로 알려져 있으므로, 이번 연구에서는 남치의 간을 이용하여
인지질 가수분해 효소의 존재 여부, 동정 및 그 특성을 알아보고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

분리 정제 시 사용된 DEAE Sephacel 및 Heparin Sepharose resin은 Amersham Biosciences (U.S.A.)로부터 구입하였다.

Choline releasing activity 측정시 사용된 L- α -dipamiltonyl, [choline-methyl- ^3H] phosphatidylcholine은 NEN Life Science Products (U.S.A.)로부터 구입하였으며, phosphatidylethanol (PE), phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate (PIP_2), phosphatidylcholine (PC)는 Sigma (U.S.A.)로부터 구입하였다.

Thin Layer Chromatography (TLC)를 위한 silicagel 60 plates는 MERCK (Germany)로부터 구입하였으며, 기질에 사용된 [^3H]dipamitoyl PC는 NEN Life Science Products (U.S.A.)로부터 구입하였다.

buffer에 사용된 HEPES, dithithreitol (DTT), phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF), aprotinin, leuprotin등은 Sigma (U.S.A.)로부터 구입하였으며, 그 외 다른 모든 시약은 분석용 특급시약을 사용하였다.

2. 방법

2-1. 간조직 추출물 제조 과정

모든 실험 과정은 4℃ 하에서 실시하였다. 인산 양어장에서 구입한 넙치로부터 간조직을 신속히 분리·세척 후, 10배 volume의 homogenizing buffer (20mM Hepes/pH7.0, 1mM EGTA, 1mM DTT, 1.5mM PMSF, 1.5 μ g/ml leuprotin, 1.5 μ g/ml aprotinin)에 넣은 뒤, 파쇄기 (polytron, Switzerland)를 이용하여 30초간 10회 파쇄하였다. 1000 $\times$ g에서 20분간 원심분리 하였으며, 상층액을 다시 초고속원심분리기를 이용하여 100,000 $\times$ g에서 1시간동안 원심분리 하였다. 상층액은 cytosol fraction으로 사용하였으며, 생성된 침전물은 1% Triton X-100을 포함하는 homogenizing buffer를 첨가하여 1시간동안 교반하여 용출시킨 뒤, 다시 100,000 $\times$ g에서 1시간동안 초고속원심분리하여 생성된 상층액을 membrane fraction으로 사용하였다.

2-1-1 membrane의 PC 가수분해 효소 분리정제 과정

Membrane fraction을 buffer A (20mM Hepes/pH7.0, 1mM EGTA, 1mM DTT, 1.5 μ g/ml leuprotin, 1.5 μ g/ml aprotinin, 0.1% Triton X-100)를 이용하여 평형화 시킨 open Heparin Sepharose column에 흡착시키고 동일 buffer A를 충분히 흘려주어 비 흡착 단백질을 완전히 제거하였다. 흡착된 단백질을 1시간동안 NaCl농도가 0에서 1.0M이 되도록 하는 선형상 농도구배법으로 1분당 2ml 속도로 1분씩 분별용출 시켰다. 분별용출된 부분에 대해 choline releasing activity를 측정하여 활성이 높게 나타내는 부분의 fraction들을 질소압력농축기로 농축하였으며, 분리해 사용된 NaCl을 제거하기 위해 buffer A로 투석하였다. 투석한 sample을 buffer A로 평형화 시킨 Heparin-5PW column에 흡착시키고 위와 동일한 방법으로 1시

간동안 NaCl 농도가 0에서 1.0M이 되도록 선형상 농도구배법으로 1분당 1ml 속도로 1분씩 분별용출 시켰으며, 분별용출된 부분에 대한 choline releasing activity를 측정하였다.

이상의 과정을 통해 분리 정제된 부분 중 활성을 가장 높게 나타내는 부분을 이용하여 분리 정제된 PC 가수분해 효소에 대한 동정 및 특이성을 조사하였다.

2-1-2 cytosol의 PC 가수분해 효소 분리정제 과정

먼저, cytosol fraction을 buffer B (20mM Hepes/pH7.0, 1mM EGTA, 1mM DTT, 1.5 μ g/ml leuprotin, 1.5 μ g/ml aprotinin)를 이용하여 평형화시킨 DEAE-Sephacel column에 흡착을 시키고 동일 buffer를 충분히 흘려주어 비 흡착 단백질을 완전히 제거한 후, 흡착된 단백질을 1시간동안 NaCl농도가 0에서 1.0M이 되도록 하는 선형상 농도구배법으로 1분당 2ml의 속도로 10분씩 분별용출 시켰다. 분별용출된 부분은 choline releasing activity를 측정하여 높은 활성을 나타내는 부분의 fraction들을 질소압력농축기로 농축하고 buffer B 로 투석하였다. 그리고, buffer B를 이용하여 평형화 시킨 DEAE-5PW column을 이용하여 1시간동안 NaCl농도가 0에서 0.6M이 되도록 선형상 농도구배법으로 1분당 5ml의 속도로 하여 1분씩 분별용출 시켰으며, choline releasing activity를 높게 나타나는 부분의 fraction들을 질소압력농축기로 농축하고 buffer B를 이용하여 투석하였다. 다음 과정은 buffer B를 이용하여 평형화 시킨 Mono Q column에 단백질을 흡착시키고 1시간 동안 NaCl의 농도를 0에서 0.6M이 되도록 하는 선형상 농도구배법으로 1분당 1ml의 속도로 1분씩 용출하여 분리하였다. 마지막으로, 위의 과정을

통해 활성을 높게 나타내는 부분을 centriprep을 이용하여 농축하고 buffer C(20mM Hepes/pH7.0, 1mM EGTA, 1mM DTT, 1.5 μ g/ml leuprotin, 1.5 μ g/ml aprotinin, 150mM NaCl)로 투석한 sample을 buffer C를 이용하여 평형화 시킨 Superdex - 200을 이용하여 gel filtration 하였다.

이상의 과정을 통해 분리 정제된 부분 중 활성을 가장 높게 나타내는 부분을 이용하여 분리 정제된 PC 가수분해 효소에 대한 동정 및 특이성을 조사하였다.

2-2. 인지질 가수분해효소의 활성측정

인지질 가수분해 효소의 활성 측정은 인지질 중 phosphatidylcholine (PC)을 분해하는 능력으로 choline releasing activity를 측정하였다. PC 가수분해 능력은 16 : 1.4 : 1의 molar 비율로 phosphatidylethanol (PE), phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate (PIP₂), phosphatidylcholine (PC)에 assay 당 200,000 cpm을 나타내도록 [choline-methyl -³H](pam)₂PC가 첨가된 phospholipid vesicle을 기질로 사용하여 다음과 같이 측정한다. Membrane의 경우 25 μ l 기질과 분리정제한 sample 7 μ l를 포함하는 125 μ l 혼합액 (50 mM Hepes (pH 7.5), 3mM EGTA, 80 mM KCl, 2.5 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂)을 첨가한 후 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 배양 하였으며, cytosol의 경우 25 μ l 기질과 분리정제한 sample 20 μ l를 포함하는 125 μ l 혼합액을 첨가하여 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 배양하였다. 배양 후 Stop solution A (CHCl₃, CH₃OH, conc HCl = 50 : 50 : 0.3, v/v/v) 1ml 과 Stop solution B (1M HCl in 5mM EGTA) 0.35 ml를 넣어 반응을 종결시켰다. 반응액을 상온에서 500rpm으로 10분간 원심

분리한 후 수용층 부분을 0.5 ml 취하여 cocktail solution (Amersham Biosciences, U.S.A.) 5ml과 혼합한 후, 이 속에 함유된 [^3H]choline을 Liquid Scintillation Counter (ISC, Amersham Biosciences, U.S.A.)로 측정하였다.

2-3. Thin layer chromatography (TLC)

부분 정제된 인지질 가수분해효소의 PLD 및 PLC 특성을 확인하기 위하여 Chung et al. (1997)의 방법에 따라 16 : 1.4 : 1의 molar 비율의 PE, PI(4,5)P₂, PC에 분식 당 20,000 cpm을 나타나도록 [choline-methyl- ^3H](pam)₂PC와 [^3H]dipamitoyl PC를 첨가한 phospholipid vesicle을 기질로 사용하였다. membrane의 경우, 기질 25 μl 에 부분 정제된 sample 7 μl 을 포함하는 125 μl 혼합액 (50 mM Hepes (pH 7.5), 3mM EGTA, 80mM KCl, 2.5mM MgCl₂, 2mM CaCl₂)에 첨가한 후 37℃에서 1시간 배양하고 인지질 가수분해 활성측정에 사용된 Stop solution A 1ml 과 Stop solution B 0.35ml을 넣고 반응을 종결시켰다. cytosol의 경우 부분 정제된 sample 20 μl 를 이용하여 위와 동일한 과정을 거쳐 반응을 종결시켰다. 반응액을 상온에서 500rpm으로 원심분리한 후, 각각의 상층부와 침전부의 지질을 추출하여 chloroform/methanol/acetic acid (75/35/5, v/v/v) 또는 methanol/0.5% NaCl /acetic acid (100/100/5, v/v/v)용액에 용해시켜 같은 용매로 TLC상에 전개 시켰으며, 생성된 ^3H -labeled 생성물들을 Cyclone Storage Phosphor System (Packard, Co., U.S.A.)를 사용하여 ^3H - Labeled 생성물의 위치를 확인하였다.

2-4. PC 가수분해 효소에 대한 생화학 특성

PC 가수분해 효소의 활성 측정에 사용된 기질, 혼합액 (50 mM Hepes (pH 7.5), 3mM EGTA, 80mM KCl, 2.5 mM $MgCl_2$, 2 mM $CaCl_2$)과 37℃에서 1시간 배양하는 것을 기준으로 하여 아래의 다양한 조건으로 각각의 생화학 특성을 확인하였다.

2-4-1. pH, 온도, 배양시간에 대한 영향

pH에 대한 영향은 다양한 pH (pH 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5)에서 동일한 조건으로 PC 가수분해 효소의 활성에 대한 영향을 조사하였으며, 온도에 대한 영향은 동일 조건하에서 다양한 온도 (20, 25, 30, 37, 40℃)에서 1시간 배양하여 활성에 대한 영향을 조사하였다. 배양 시간에 대한 영향은 37℃에서 다양한 배양 시간 (30, 60, 90, 120, 150min)에서 배양하여 활성에 대한 영향을 조사하였다.

2-4-2. 이가 이온에 대한 영향

혼합액 중 마그네슘과 칼슘의 농도를 다음과 같이 다양하게 하여 각각의 영향을 조사하였다. 먼저 칼슘은 0, 0.21, 0.42, 0.83, 1.67, 3.33mM의 농도로 동일한 조건하에서 영향을 조사하였으며, 마그네슘의 경우 0, 0.3125, 0.625, 1.25, 2.5

5mM의 농도로 영향을 조사하였다.

2-5. PC 가수분해 효소에 대한 기질 특이성

PC 가수분해 효소의 활성 측정에 사용된 기질 중 PC, PIP₂, PE의 농도를 각각 다양하게 하여 동일한 조건하에서 활성 측정을 통해 기질에 대한 영향을 조사하였다. PC는 0, 0.76, 1.7, 3.4, 6.8 μ M 농도, PIP₂는 0, 1.176, 2.36, 4.7, 9.4 μ M 농도, PE는 0, 13.4, 26.8, 53.6, 107.2 μ M의 농도로 동일한 조건하에서 활성에 미치는 영향을 조사하였다.

III. 결 과

1. 넵치 간으로부터 PC 가수분해 효소의 부분 정제 결과

넵치 간 조직에 homogenizing buffer를 넣고 파쇄한 뒤, 초고속 원심 분리기를 이용하여 membrane fraction과 cytosol fraction으로 분리하였다.

1-1. membrane로부터 PC 가수분해 효소의 분리정제 결과

넵치 간으로부터 초고속원심분리기를 이용하여 membrane fraction을 분리한 뒤 1% Triton X - 100을 이용하여 파쇄 하였다. 먼저, 파쇄한 membrane fraction을 Heparin Sepharose column을 이용하여 분리정제 후, choline releasing activity를 측정 하였다(Fig. 1A). 실선은 단백질 농도를 나타내고, 실선과 점으로 이루어진 부분은 choline releasing activity (cpm)를 나타내며, 점선은 선형상 농도구배법에 의한 NaCl 농도 변화를 나타내고 있다. 여기서 활성을 높게 나타내는 부분인 fraction 38~43번 부분을 모두 모아 분리 시 사용된 NaCl을 제거하기 위해 buffer A를 이용하여 투석하였다. 다음 과정으로 Heparin-5PW column을 이용하여 분리 정제 하였다(Fig. 1B). 그 결과 fraction 20번에서 가장 높은 활성을 나타내는 것을 관찰할 수 있었다.

1-2. Cytosol로부터 PC 가수분해 효소의 분리정제 결과

넘치 감으로부터 조고속원심분리기를 이용하여 cytosol fraction을 분리 후, DEAE-Sepacel column을 이용하여 분리정제 하였다(Fig. 2A). 그 결과 fraction 50번 이후로 높은 활성을 관찰할 수 있었으며, 활성을 높게 나타나는 부분을 질소압력농축기를 이용하여 농축을 한 뒤, buffer B를 이용하여 투석하였다. 준비된 sample을 다음 과정인 DEAE-5PW column을 이용하여 분리정제 하였다(Fig. 2B). 이 결과에서 두 부분 (fraction 14~20과 20~30번)의 활성구간이 관찰되었으나, 활성을 높게 나타내는 fraction 20~30번 부분을 농축하고 투석하였다. 다음 과정으로 준비된 sample을 Heparin-5PW column을 이용하여 분리하였다. 이 column에 대해 활성 단백질은 비흡착 하였으나, 비활성 단백질은 많은 흡착성을 나타내었다(결과를 나타내지 않음). 활성을 나타내는 비흡착 단백질을 농축하여 Mono Q column을 이용하여 분리하였다(Fig. 2C). 그 결과 활성을 높게 나타내는 부분 fraction 1~9번을 centriprep으로 농축하여, 마지막 단계인 gel filtration을 실시하였다(Fig. 2D). 그 결과 fraction 28번에서 가장 높은 활성을 나타내는 것을 관찰할 수 있었다.

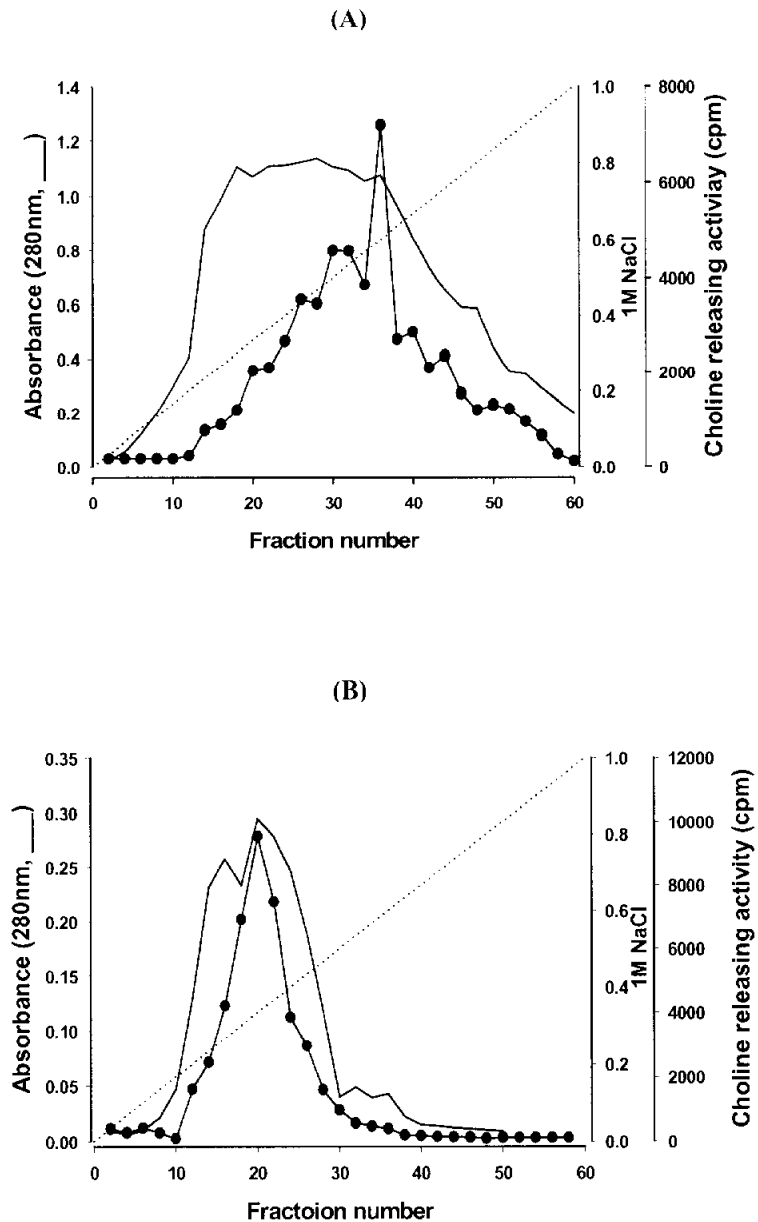
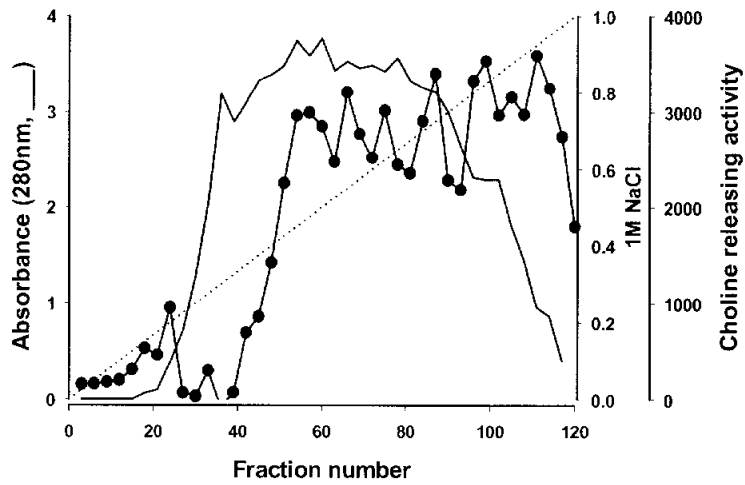
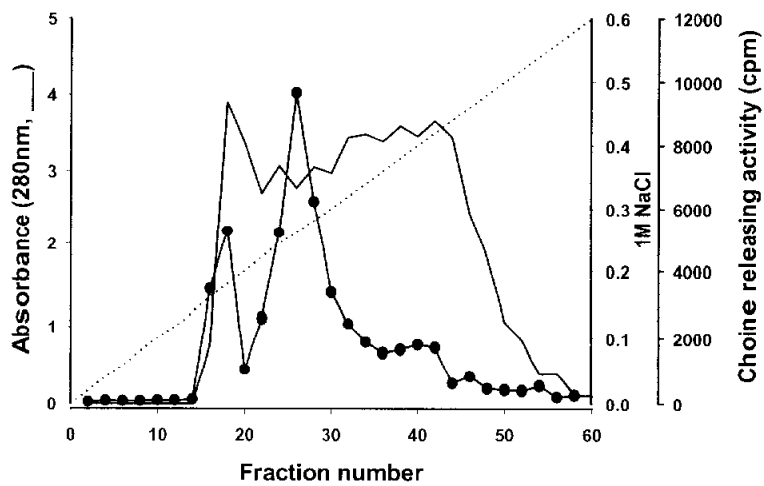


Fig. 1. Chromatography of choline releasing activity through a Heparin-Sepharose column (A) and HPLC Heparin-5PW column (B). Membrane from flounder liver were prepared, extracted, and processed as described under experimental procedures.

(A)



(B)



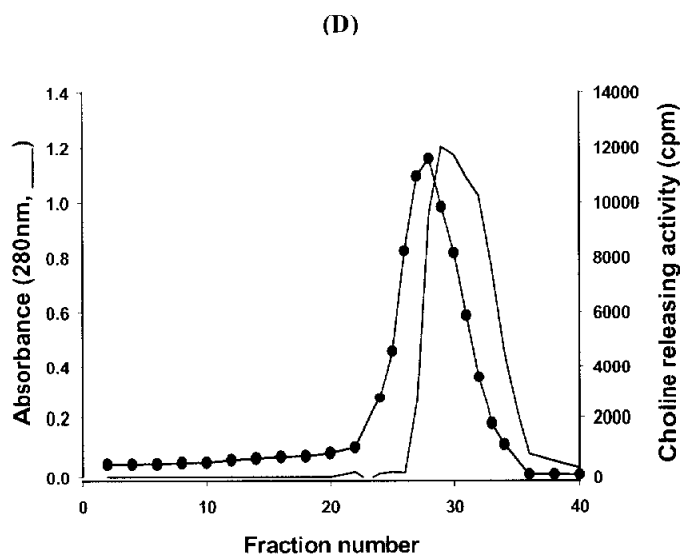
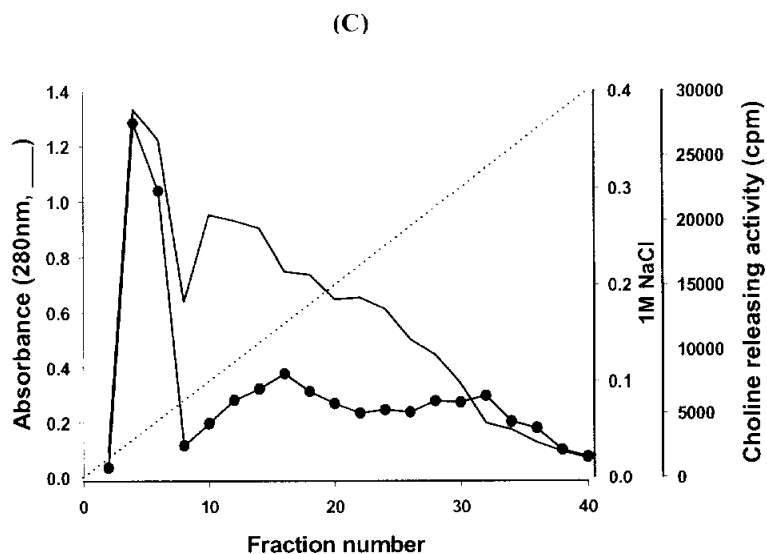


Fig. 2. Chromatography of PLD activity through a DEAE Sephacel column (A), DEAE-SPW column (B), Mono Q column (C) and gell filtration (D). Cytosol from flounder liver were prepared, extracted, and processed as described under experimental procedures.

2. Thin Layer Chromatography (TLC)에 대한 결과

TLC는 membrane과 cytosol로부터 분리된 PC 가수분해 효소에 의해 생성되는 대사산물을 확인하기 위해 지용성 부분과 수용성 부분을 나누어 실시하였다(Fig 3A and B).

지용성 부분에 대한 TLC 결과에서 cytosol로부터 분리된 PC 가수분해 효소는 10% 에탄올이 포함되거나 포함되지 않은 경우 DAG 생성을 관찰할 수 있었다. Membrane으로부터 분리된 PC 가수분해 효소는 10% 에탄올이 포함된 경우 phosphatic acid (PA)와 phosphatidyl ethanol (PEtOH)를 생성하는 것을 관찰할 수 있었으나, 10% 에탄올이 포함되지 않은 경우에는 PEtOH의 생성은 관찰되지 않고 단지 PA만 관찰되었다(Fig. 3A). 수용성 부분에 대한 TLC 결과에서는 cytosol로부터 분리된 PC 가수분해 효소의 경우 phophocoline의 생성이 관찰되었으나, membrane으로부터 분리된 PC 가수분해 효소의 경우에는 choline 생성물을 확인할 수 있었다(Fig. 3B).

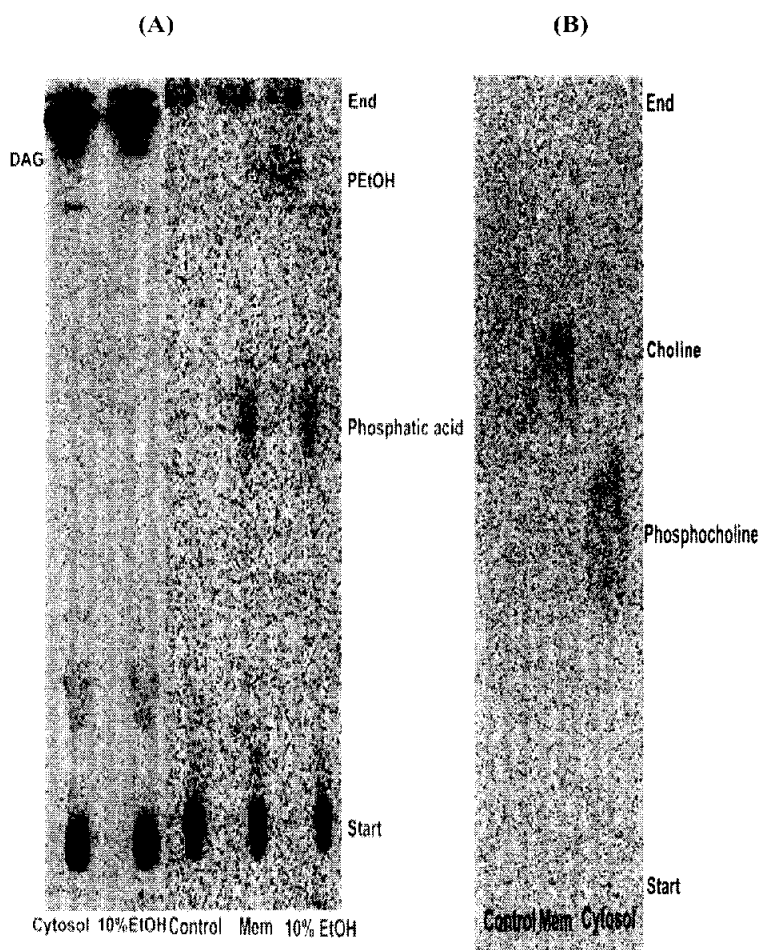


Fig. 3. Reaction of products formed from hydrolysis of PC. The substrate vesicle comprised PE, PIP₂, and PC in a molar ratio of 16:1.4:1 with [³H]dipamitoyl PC to yield 200,000 cpm per assay. After incubation for 1hr at 37°C, the lipid products were analyzed by TLC and visualized by Cyclone Storage Phosphor system (Packard, Co. U.S.A).

3. 분리한 PC 가수분해 효소에 대한 생화학적 특성

3-1. pH에 대한 영향

인지질 가수분해 효소의 활성을 다양한 pH 조건 (4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5)으로 측정하였다. Membrane과 cytosol로부터 분리한 PC 가수분해 효소 모두 pH 6.0 이하의 산성 조건에서 높은 활성을 나타내고 있는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 4A and B).

3-2. 온도에 대한 영향

인지질 가수분해 효소의 활성을 다양한 온도 (20, 25, 30, 37, 40℃)로 측정하였다. Membrane과 cytosol로부터 분리한 PC 가수분해 효소 모두 37℃에서 높은 활성을 나타내고 있는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 5A and B).

3-3. 반응 시간에 대한 영향

인지질 가수분해 효소의 활성 측정에 있어 다양한 반응 시간 30, 60, 80, 120, 160분에 대한 영향을 측정하였다. Membrane과 cytosol로부터 분리한 PC 가수분해 효소 모두 반응 시간이 늘어남에 따라 활성이 증가함을 관찰할 수 있었다(Fig. 6A and B).

3-4. 칼슘에 대한 영향

인지질 가수분해 효소의 활성을 다양한 칼슘 농도 (0.21, 0.42, 0.83, 1.67, 3.33mM)로 측정하였다. Membrane으로부터 분리한 PC 가수분해 효소는 칼슘 0.83mM 농도까지 영향을 미치지 않으나, 1.67mM 농도에서 가장 높은 활성을 나타냈으며, 3.33mM 농도인 경우에 다시 활성이 떨어지는 것을 확인 할 수 있었다(Fig. 7A). Cytosol로부터 분리한 PC 가수분해 효소의 경우에는 칼슘의 농도 변화에 따른 영향이 관찰되지 않았다(Fig. 7B).

3-5. 마그네슘에 대한 영향

인지질 가수분해 효소의 활성을 다양한 마그네슘 농도 (0.3126, 0.626, 1.26, 2.6, 5.2mM)로 측정하였다. Membrane으로부터 분리한 PC 가수분해 효소는 마그네슘 1.26mM 농도까지 영향 받지 않았으나, 2.6mM 이상의 농도에서 활성 감소를 관찰할 수 있었다(Fig. 8A). Cytosol로부터 분리한 PC 가수분해 효소는 마그네슘 0.626mM 농도에서 가장 높은 활성을 나타내는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 8B).

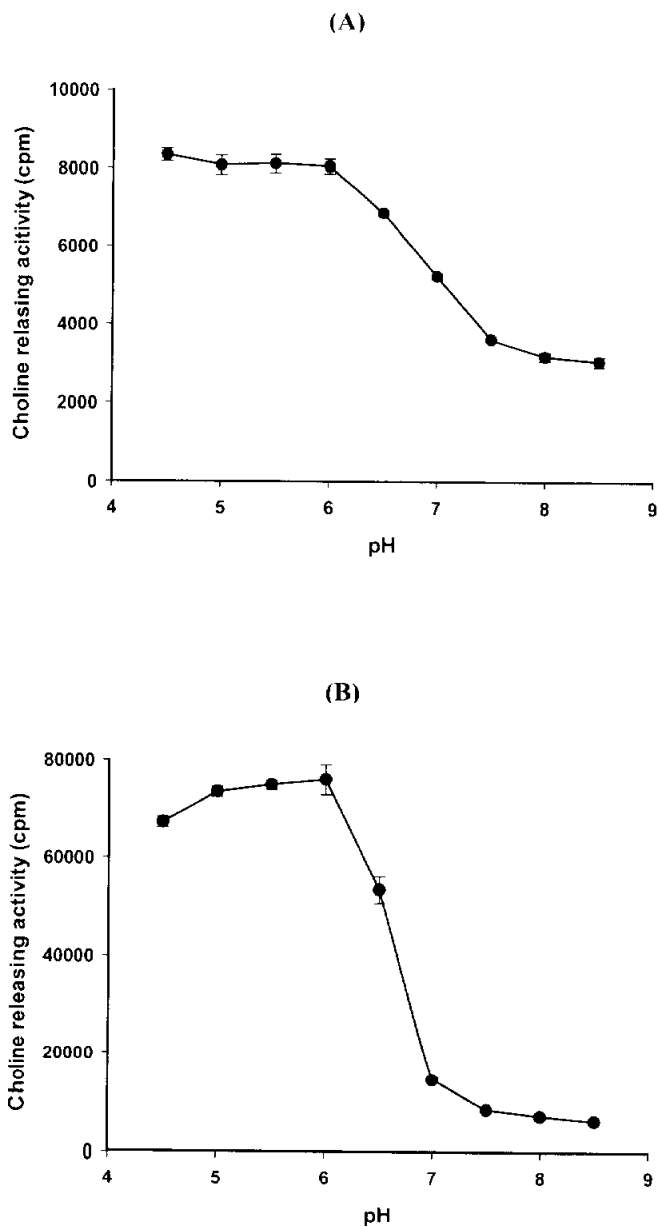


Fig. 4. Effect of pH on choline releasing activity. Each membrane (A) and cytosol (B) choline releasing activity fraction were incubated with phospholipid substrate vesicles in reaction mixture under various pH. Results are the mean $\pm$ S.D. from four independent experiments.

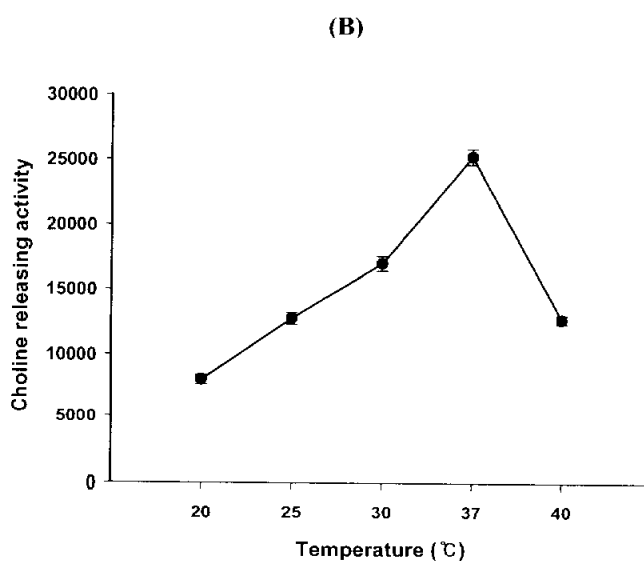
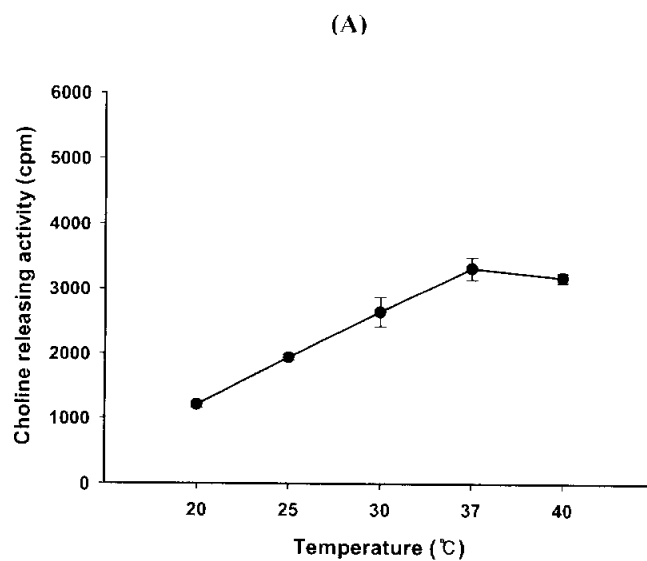


Fig. 5. Effect of incubation temperature on choline releasing activity. Each membrane (A) and cytosol (B) choline releasing activity fraction were incubated with phospholipid substrate vesicles in reaction mixture under various incubation temperature. Results are the mean $\pm$ S.D. from four independent experiments.

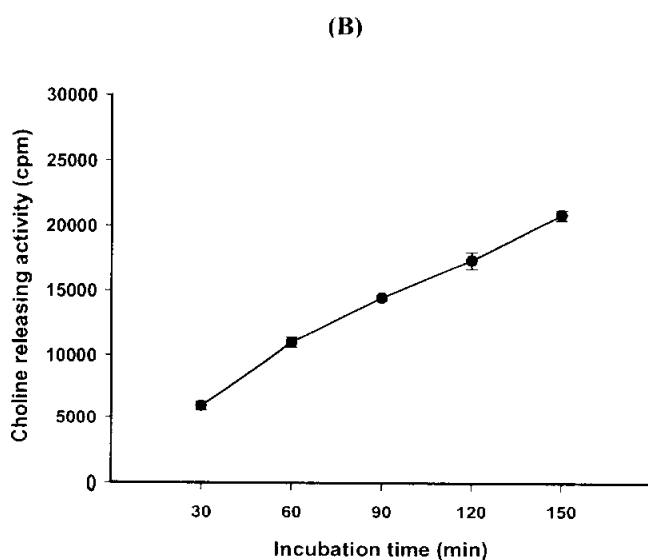
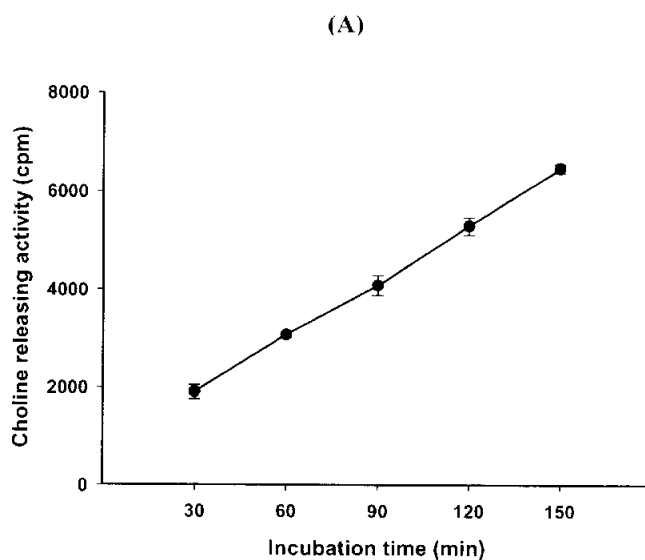


Fig. 6. Effect of incubation time on choline releasing activity. Each membrane (A) and cytosol (B) choline releasing activity fraction were incubated with phospholipid substrate vesicles in reaction mixture under various incubation times. Results are the mean $\pm$ S.D. from four independent experiments.

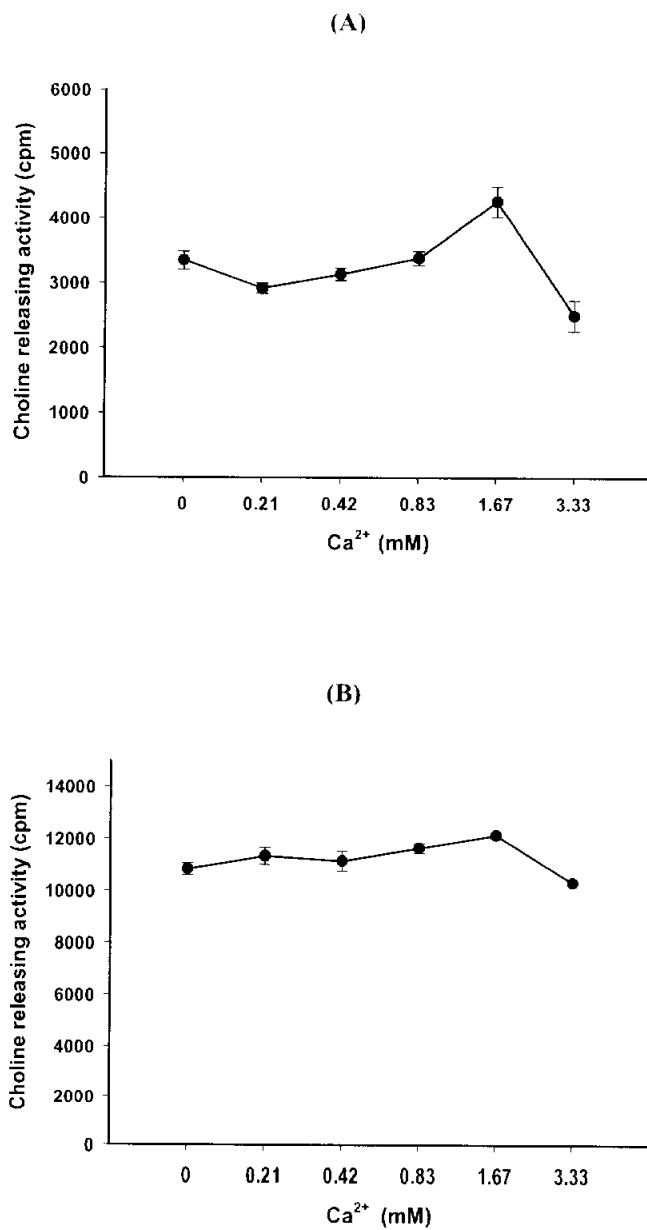


Fig. 7. Effect of changes in the concentration of Ca^{2+} on choline releasing activity. Each membrane (A) and cytosol (B) choline releasing activity fraction were measured in the presence of five different concentration of Ca^{2+} . Results are the mean + S.D. from four independent experiments.

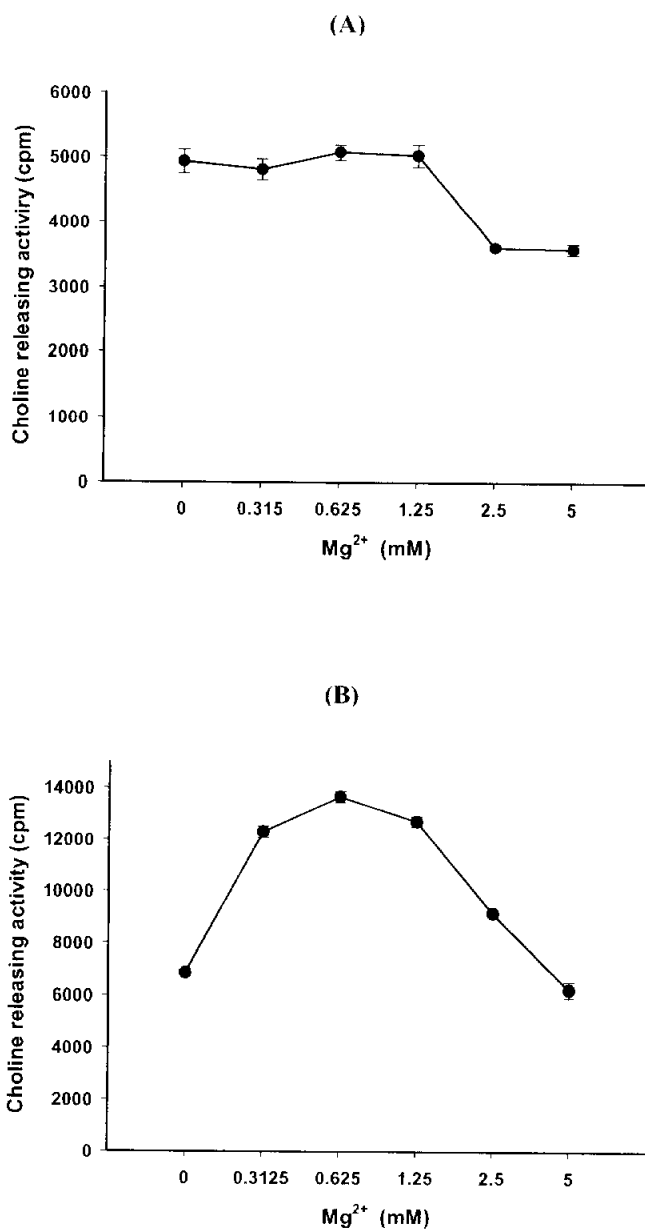


Fig . 8. Effect of changes in the concentration of Mg^{2+} on choline releasing activity. Each membrane (A) and cytosol (B) choline releasing activity fraction were measured in the presence of five different concentration of Mg^{2+} . Results are the mean $\pm$ S.D. from four independent experiments.

4. 분리한 PC 가수분해 효소에 대한 기질 특이성

4-1. PC에 대한 영향

인지질 가수분해 효소의 활성을 다양한 PC 농도 (0, 0.76, 1.7, 3.4, 6.8 μM)로 측정하였다. Membrane으로부터 분리한 PC 가수분해 효소의 경우 PC는 0.76 μM 농도에서 가장 높은 활성을 관찰할 수 있었고, 1.7 μM 농도인 경우에는 PC를 넣지 않은 경우와 유사한 활성을 관찰할 수 있었으며, 3.4 μM 이상 농도에서는 PC를 넣지 않은 control에 비해 낮게 나타나는 것을 관찰 할 수 있었다(Fig. 9A). Cytosol로부터 분리한 PC 가수분해 효소의 경우 PC의 농도 3.4 μM 이하에서는 영향을 받지 않았으나, 6.8 μM 의 농도에서는 활성이 감소하는 것을 관찰 할 수 있었다(Fig. 9B).

4-2. PIP₂에 대한 영향

인지질 가수분해 효소의 활성 측정에 있어 다양한 PIP₂ 농도 (0, 1.176, 2.36, 4.7, 9.4 μM)로 측정 하였다. 각각 membrane과 cytosol로 부터 분리한 PC 가수분해 효소 모두 PIP₂ 2.36~4.7 μM 농도에서 높은 활성을 나타내는 것을 관찰 할 수 있었다(Fig. 10A and B).

4-3 PE에 대한 영향

인지질 가수분해 효소의 활성을 다양한 PE 농도 (0, 13.4, 26.8, 53.6, 107.2 μ M)로 측정하였다. Membrane으로부터 분리한 PC 가수분해 효소의 경우 PE 26.8 μ M 농도에서 가장 높은 활성을 나타내는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 11A). 그러나 cytosol로부터 분리한 PC 가수분해 효소는 PE에 대한 영향이 없는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 11B).

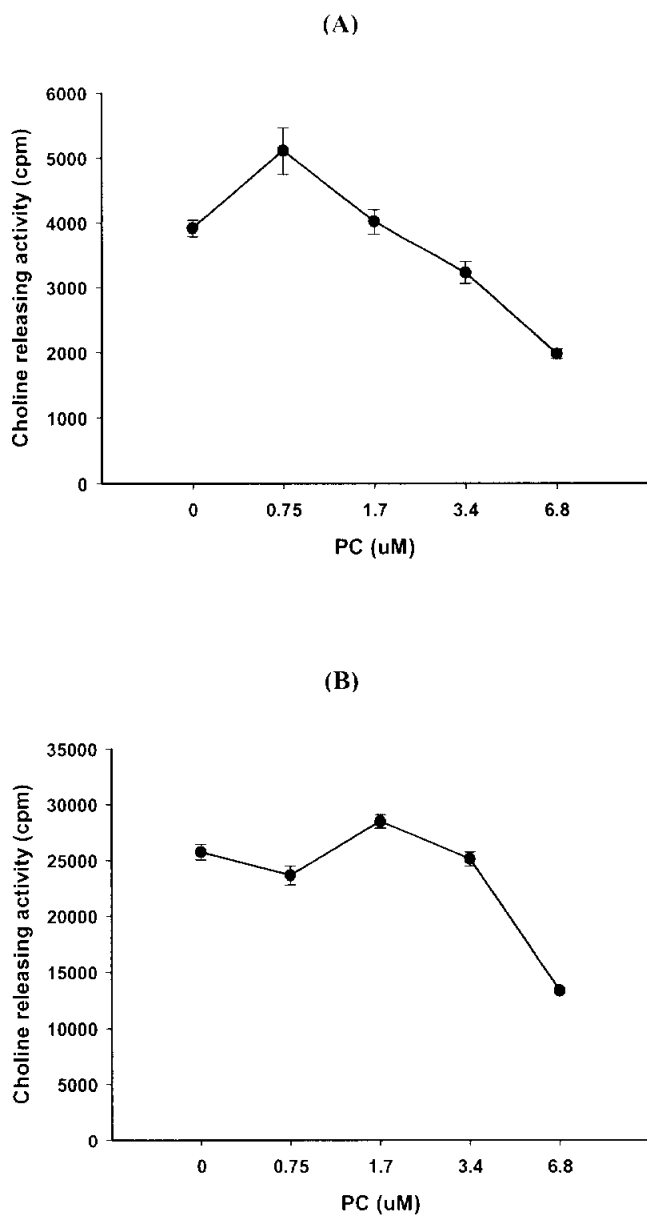


Fig. 9. Effect of changes in the concentration of PC on choline releasing activity. Each membrane (A) and cytosol (B) choline releasing activity fraction were measured in the presence of five different concentration of PC. Results are the mean $\pm$ S.D. from four independent experiments

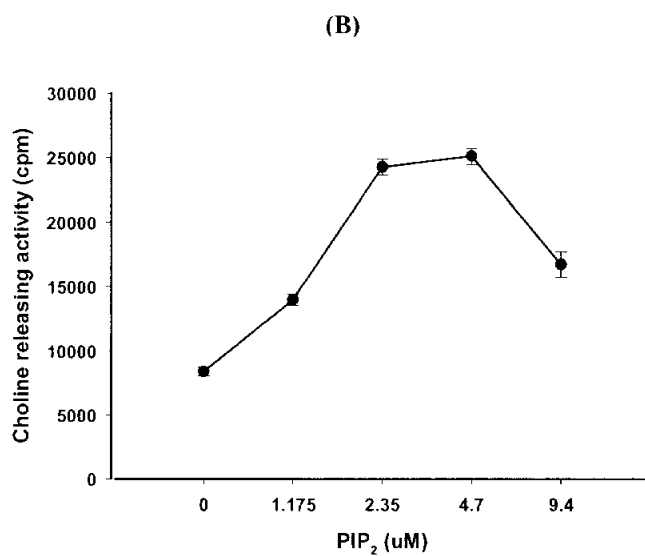
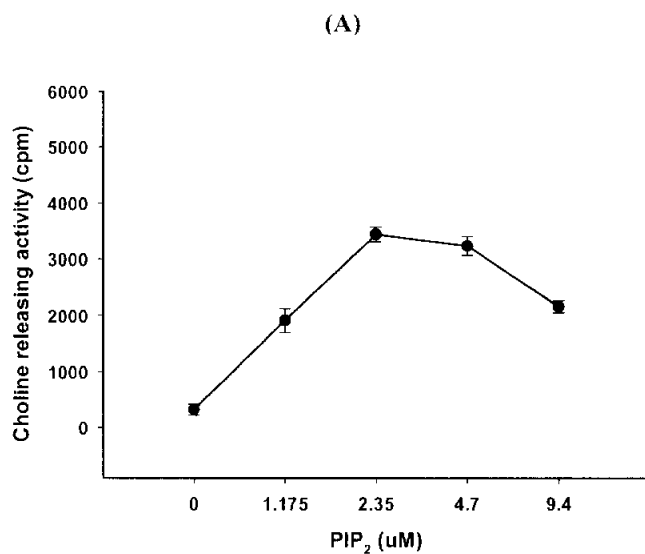


Fig. 10. Effect of changes in the concentration of PIP₂ on choline releasing activity. Each membrane (A) and cytosol (B) choline releasing activity fraction were measured in the presence of five different concentration of PIP₂. Results are the mean $\pm$ S.D. from four independent experiments.

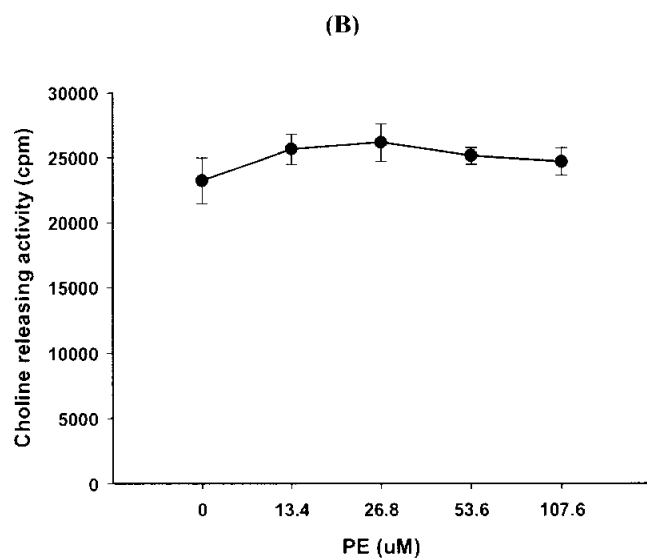
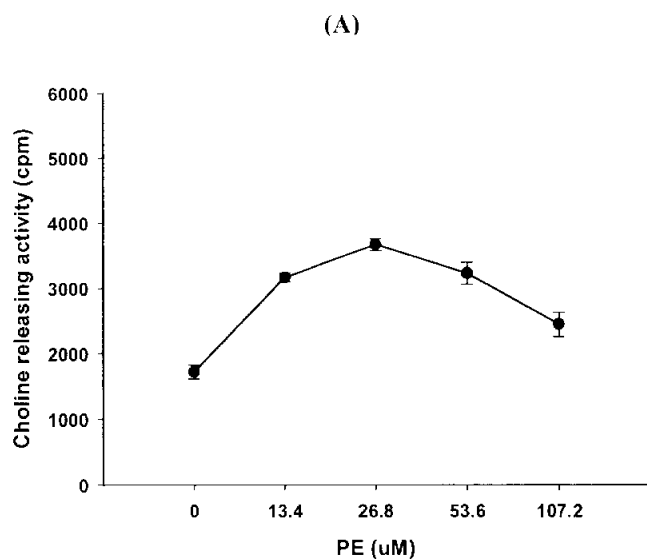


Fig. 11. Effect of changes in the concentration of PE on choline releasing activity. Each membrane (A) and cytosol (B) choline releasing activity fraction were measured in the presence of five different concentration of PE. Results are the mean $\pm$ S.D. from four independent experiments.

IV. 고 찰

본 실험은 뇌치 간의 membrane과 cytosol 부분에 존재하는 인지질 가수분해 효소 phosphatidylcholine (PC)를 가수분해 하는 효소에 대해 살펴보았다.

뇌치의 간으로부터 cytosol 부분과 membrane 부분을 분리하여 각각 PC 가수분해 효소를 분리하였다. Membrane의 경우에는 Triton X-100을 사용하여 membrane 으로부터 PC 가수분해 효소를 분리한 뒤, affinity column을 이용하여 분리정제 하였으며, cytosol의 경우 음이온 column과 affinity column을 이용하여 분리정제 하였다(Fig. 1~2).

분리된 각각의 PC 가수분해 효소에 대한 Thin Layer Chromatography (TLC)를 실시하여, 가수분해 시 생성된 생성물을 통해 가수분해 효소에 대한 동정을 하였다(Scherer et al., 2002). PC-PLD의 경우 PC를 가수분해 하여 phosphatidic acid (PA)와 choline을 생성하는 특성을 가진다. 하지만 일차 알콜이 존재하는 경우 PLD는 Phosphatidyltransfer 반응을 하여 phosphatidylethanol (PEtOH)을 생성하는 주요한 특성을 가지고 있다(Kobayashi et al. 1987). 지용성 부분에 대한 TLC 결과에서 membrane으로부터 분리한 PC 가수분해 효소는 10% 에탄올이 존재하지 않는 경우 phosphatidic acid (PA)만을 형성하지만, 10% 에탄올이 존재하는 경우 PA와 Transphosphatidylation 반응에 의해 생성된 PEtOH를 확인할 수 있었다(Fig 3A). 이 결과를 통해 membrane으로부터 분리한 PC 가수분해 효소는 PC-PLD임을 확인할 수 있었다. 그러나 cytosol로부터 분리한 PC 가수분해 효소는 지용성 부분의 TLC 결과에서 10% 에탄올의 존재유무와 관계없이 diacylglycerol (DAG)

반을 형성하는 특성을 보였다(Fig. 3A). DAG는 PLC에 의해 가수분해가 일어났을 경우 나타나는 생성물로서 phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂)를 가수분해 하거나, PC를 가수분해 하였을 경우 생성된다(Wakelam, 1998). 따라서, 지용성부분에 대한 TLC 결과로부터 cytosol에서 분리한 PC 가수분해 효소는 PLC의 형태였으며, 수용성부분에 대한 TLC 결과에서 cytosol로부터 분리한 PC 가수분해 효소의 경우 phosphocholine을 형성하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3B). 이러한 생성물은 PLC가 PC를 가수분해하여 나타나는 생성물로서 PC-PLD의 특징이라고 하겠다. 따라서 지용성 부분과 수용성 부분의 TLC 결과를 통해 cytosol로부터 분리한 PC 가수분해 효소는 PC-PLC인 것으로 알 수 있었다. 따라서 넘치 간으로부터 분리 정제된 PC 가수분해 효소는 membrane의 PC-PLD와 cytosol의 PC-PLC이며, 넘치에 존재하는 인지질 가수분해 효소는 적어도 두 종류 이상이 될 것으로 사료되어 진다.

PLD와 PLC에 대한 생화학적인 특성에 대한 연구는 많이 이루어져있다. PLC의 경우 PI-PLC에 대한 특성 연구는 많이 되었으나, PC-PLC에 대한 보고는 아직도 비후한 실정이다. 포유류의 경우 Kanfer 등의 연구에서 PLD에 대한 특성 규명이 처음으로 실시되었으며(Saito et al., 1973), 그 후 특성 규명에 대한 많은 연구가 수행되었다. 먼저 Rat로부터 분리한 PC-PLD에 대한 생화학적 특성 살펴보면, rat 뇌의 membrane으로부터 분리한 PLD의 경우 적정 pH 6.0, 이가 이온인 Ca²⁺와 Mg²⁺에 의존적인 것으로 보고되었고(Chang, 1992), rat의 뇌로부터 분리한 synaptosomal PLD의 경우 적정 pH 7.2, Mg²⁺(<1mM)에 대해 매우 의존적인 것으로 보고되었으며(Chalifa et al., 1990), rat의 frontal cortex로부터 분리한 PLD의 경우 적정 pH 7.2, 이가 이온인 Ca²⁺와 Mg²⁺에 의해서는 억제된다고 보

보되었다(Nishida et al., 1992). 또한 Kanoh 등에 의한 연구에서 rat brain으로부터 분리한 PLD의 경우 적정 pH 7.1~7.3, 이가 이온 Ca^{2+} 와 Mg^{2+} 에 의해시는 억제가 일어난다고 보고했다(Kanoh et al. 1991). Rat로부터 분리된 PC-PLD의 경우 일반적으로 pH 7.0이며, synaptosomal PLD를 제외한 모든 PLD에서는 이가 이온에 의해 활성 억제가 일어나는 것을 알 수 있었다. 그리고 인간으로부터 분리한 태반 PLD의 경우 적정 pH 7.0~7.5, 이가 이온 Ca^{2+} 와 Mg^{2+} 에 의해 억제가 일어난다고 보고되었다(Vinggaard et al., 1995). PC-PLC의 경우 Ca^{2+} 에 의존적인 형태와 비의존적인 형태의 PLC가 존재하며(Xingzhong et al., 1997, Illka et al., 2001), bull seminal plasma로부터 분리한 PC-PLC의 경우 적정 pH 7.2 (Sheikhnegad et al., 1986), rat platelets의 PC-PLC의 경우 적정 pH 7.2~7.6(Randell et al., 1992), bull과 토끼의 spermatozoa로부터 분리한 PLD의 경우 적정 pH 7.5, Ca^{2+} 에 의해 억제가 일어나는 것으로 보고 되었다(Hinkovska et al., 1992).

본 연구에서 membrane과 cytosol로부터 분리한 PC 가수분해 효소에 대한 생화학적 특성은 PC-PLC, PC-PLD 모두 적정 pH 6.0 이하인 산성 조건에서 높은 활성을 나타내었다. 이것은 포유류의 PC-PLC와 PLD의 적정 pH가 중성이라는 특성과 큰 차이를 보이고 있다. 이 결과를 통해 어류에 존재하는 PC 가수분해 효소와 포유류의 PC 가수분해 효소는 많은 차이가 있을 것으로 사료되어진다.

Membrane으로부터 분리한 PC-PLC에 대한 이가 이온의 영향을 살펴보면, Ca^{2+} 에 대한 영향은 0.83mM의 농도까지 영향을 받지 않다가 1.67mM에서 가장 높은 활성을 나타낸 뒤 다시 활성이 감소하는 농도의존적인 증가와 감소를 나타냈으며, Mg^{2+} 에 대한 영향은 1.25mM까지 아무런 영향을 받지 않다가 2.5mM 이후 활성이 감소되는 것을 확인할 수 있었다. 이상의 결과, 이가 이온의 경우 Ca^{2+} 에

대해 농도 의존적으로 활성의 증가와 억제가 일어난다는 것을 확인 할 수 있었다. 포유류의 경우 Ca^{2+} 와 Mg^{2+} 에 의해 활성억제가 일어나는 결과와 비교하였을 경우, 넵치 간으로부터 분리한 PC-PLD는 Ca^{2+} 에 대해 농도 의존적인 활성억제를 보이는 유사한 결과를 확인할 수 있었다. cytosol로부터 분리한 PC-PLC의 경우 Ca^{2+} 에 대한 영향은 관찰되지 않지만, Mg^{2+} 의 경우 0.625mM에서 높은 활성을 나타내고 이후 활성 감소를 나타내는 농도 의존적인 증가와 감소를 나타내었다. 이상의 결과 포유류와 같이 넵치로부터 분리한 PC-PLC는 Ca^{2+} 에 대해 비 의존적인 특성을 가지고 있으며, Mg^{2+} 에 대해서는 농도 의존적인 활성과 억제를 확인할 수 있었다. 이상의 결과를 통해 pH를 제외한 이가 이온에 대한 영향은 포유류의 PC 가수분해 효소와 유사성을 가지는 것으로 사료되어진다.

기질에 대한 특이성은 PC-PLD에 있어 많은 보고가 되었고, 또한 PLC의 경우 PI-PLC에 대한 기질 특이성에 대해 많은 연구가 되었으나, PC-PLC에 대한 연구는 마흡하다. 인간의 태반으로부터 분리한 PC-PLD의 경우 PIP_2 에 의해 활성이 일어나며, PE에 대한 영향은 없는 것으로 보고되었다. 일반적으로 포유류의 PC-PLD는 일반적으로 PIP_2 에 의해 활성이 증가하는 것으로 알려졌다(Nalefski et al., 1996; Okamura et al., 1995; Massenburg et al., 1994).

각각 효소의 기질특이성을 조사한 결과, membrane으로부터 분리한 PC-PLD의 경우 0.76 μM PC에서 가장 높은 활성을 나타내었으나 그 이후 감소를 보였으며, 2.36~4.7 μM PIP_2 에서 높은 활성을 나타내다가 감소를 보이고 있으며, 26.8 μM PE에서 높은 활성을 나타내었다. membrane으로 분리한 PC-PLD는 PC, PIP_2 , PE에 대해 모두 농도 의존적으로 영향을 받는 것을 확인할 수 있었다. 그러나 cytosol로부터 분리한 PC-PLC의 경우 PC 3.4 μM 농도까지 영향을 주지 않았으나

6.8 μ M에서 활성 감소를 나타내었으며, 2.36-4.7 μ M PIP_2 에서 높은 활성을 나타냈고, PE에 대한 영향은 없는 것으로 나타났다. 따라서 cytosol로부터 분리한 PC-PLC는 PIP_2 에 대해 농도 의존적인 영향을 받으며, PC와 PE에 대한 영향은 없는 것을 알 수 있었다. 이상의 결과를 통해 PC-PLD의 조절에 있어 PC, PIP_2 , PE 모두가 관여 하며, PC-PLC의 경우에는 단지 PIP_2 에 의해 조절 되는 것으로 사료되어진다.

이상의 결과에서 넘치의 간에 존재하는 PC 가수분해 효소의 형태는 최소 PC-PLD, PC-PLC 등 최소 두 가지 이상의 형태가 존재할 생각되어진다. 또한, 생화학적 특성 중 넘치로부터 분리한 PC 가수분해의 적정 pH는 포유류의 적정 pH와 많은 차이를 나타내고 있는데, 이것은 어류와 포유류 간에 어떠한 차이점이 존재할 것으로 사료되어진다.

V. 요약

본 실험은 넙치 (*Paralichthys olivaceus*) 간으로부터 membrane과 cytosol 부분에 존재하는 phosphatidylchoine (PC) 가수분해 효소의 특성에 대해 조사하였다. 먼저 간은 초고속 원심분리기에 의해 membrane과 cytosol로 분리한 후, membrane으로 부터의 PC 가수분해효소 정제는 nonion-detergent인 Triton X-100을 이용하여, Heparin Sepharose CL-6B 칼럼과 Heparin-5PW 칼럼을 수행하여 분리정제 하였다. Cytosol의 경우에는 DEAE Sephacel column, DEAE-5PW column, Heparin-5PW column, Mono Q column 및 gel filtration Superdex-200을 이용하여 분리정제 하였다.

각각 membrane과 cytosol에서 얻어진 PC 가수분해효소들은 반응생성물을 확인하기 위해 autoradiography를 실시하였다. Membrane의 경우 transphosphatidylation 반응의 생성물인 phosphatidylethanol (PEtOH)을 형성하는 것으로 보아 PC-phospholipase D (PC-PLD)임을 알 수 있었으며, cytosol에서의 경우는 지용성 부분에서 DAG를 생성하고 수용성 부분에서 phosphocholine을 형성하는 것으로 보아 PC-phospholipase C (PC-PLC)임을 알 수 있었다.

각각 membrane과 cytosol에서 얻어진 PC 가수분해효소들의 생화학적 특성을 조사한 결과 membrane PC-PLD의 경우 최적 pH가 6.5이하인 산성 조건 및 37℃의 배양온도에서 최고 활성을 나타내었으며, 이가 이온들에 대한 영향의 경우 칼슘은 1.67mM 농도에서 최고 활성을 나타냈으나, 마그네슘은 활성에 영향을 미치지 않았다. 각종 세포막 기질에 대한 영향을 조사한 결과 PC는 0.75 μ M, PIP는 2.35 μ M, PE는 26.8 μ M 농도에서 최고 활성을 나타내었다. Cytosol PC-PLC

의 적정 pH와 온도에 대한 영향은 membrane PC-PLD와 동일한 결과를 나타냈으며, 이가 이온에 대한 영향은 membrane PC-PLD와 반대로 마그네슘은 0.625mM 농도에서 최고 활성을 나타냈으나, 칼슘에 대한 영향은 없는 것으로 나타났다. 각종 기질에 대한 영향을 조사한 결과 PIP₂는 2.35~4.7 μ M 농도에서 높은 활성을 나타냈지만, PC와 PE에 대한 영향은 없는 것을 알 수 있었다. 이와 같은 결과부터 넓치의 간 조직에 PC를 가수분해효소에는 membrane의 PC-PLD와 cytosol의 PC-PLC가 존재함을 알 수 있었다.

VI. 감사의 글

마무리 하는 시점이 다가 오면 언제나 그렇듯 최선을 다하지 못했음을 반성하게 됩니다. 이 논문이 나오기까지 지나온 시간동안 많은 도움을 주신 분들께 감사의 마음을 전하고자 이 글을 씁니다.

이번 연구의 결실이 있기까지 많은 가르침과 격려를 아끼지 않으셨고 언제나 든든한 후원자가 되어주신 정준기 교수님께 진심으로 감사를 드립니다. 그리고 관심과 조언을 아끼지 않으셨던 강주찬 교수님, 김기홍 교수님, 박수일 교수님, 정현도 교수님, 허빈도 교수님께도 진심으로 감사를 드립니다.

약리학 실험실이라는 공간에서 생활하며 도움을 주신 많은 분들께 감사의 마음을 전합니다. 5년이라는 시간동안 같이 생활하면서 저에게 많은 도움과 애정을 주신 서정수 선배님, 충고와 격려를 아끼지 않는 오현석 선배님, 항상 열심히 생활 하시는 조비경 선배님, 저에게 도움을 아끼지 않는 서창호 학우님, 언제나 묵묵히 자기 자리를 지키는 김나영, 엄혜경 후배님, 언제나 웃음을 잃지 않고 생활하는 이현경, 배정희 후배님, 그리고 항상 밝은 얼굴로 생활하는 김다정, 손은민, 유선화 후배님, 실험실을 떠나 있지만 언제나 동생처럼 따라주던 상우에게 감사하다는 말을 전하고 싶습니다. 실험실은 다르지만, 언제나 큰형 노릇을 해주시는 이덕찬 선배님, 언제나 열심히 하는 모습을 보여 주시는 이무근 선배님, 친구처럼 편안하게 대해 주는 김천수 선배님, 이찬열 선배님, 류갑민 선배님, 언제나 충고를 아끼지 않는 이재원 박사님, 김성길 박사님께 감사드립니다. 또한 언제나 맘 편히 기댈 수 있었던 96동기 순범, 호연, 재훈, 신후, 영주, 세련, 효주에게 고마운 마음을 전합니다. 또한 일본에서 열심히 공부하고 있을 상규에게 고마운 마음을 전합니다.

언제나 뒤에 서서 묵묵히 후원을 아끼지 않는 영원한 친구 순화에게 고마움을 전합니다. 마지막으로 제가 언제나 맘 편히 공부할 수 있도록 소리 없이 지켜봐 주시는 부모님께 감사하다는 말씀을 드립니다.

VII. 참고 문헌

- Morris, A. J., M. A. Frohman and J. Engebrecht. 1997. Measurement of phospholipase D activity, *Analyt. Biochem.*, 252, 1~9.
- Zhang, F., G. Zhao and Z. Dong. 2001. Phosphatidilcholine-specific C and D in stimulation of RAW264.7 mouse macrophage-like cells by lipopolysaccharide. *Inter. Immunopharm.*, 1, 1375~1384.
- Wakelam, M. J. O. 1998. Diacylglycerol - when is it an intracellular messenger? *Biochim. Biophys. Acta*, 1536, 117~126.
- Bruno, L. D. and J. P. Arm. 2003. Phospholipase A2, prostaglandins, leukotrienes and Essential fatty acid 69, 87~97.
- Dana, R., T. L. Leto, H. L. Malech and R. Levy. 1998. Essential requirement of cytosolic phospholipase A2 for activation of the phagocyte NADPH oxidase, *J. Biol. Chem.*, 273, 441~445.
- Lennartz, M. R. 1994. Phospholipase and phagocytosis: the role of phospholipid-derived second messengers in phagocytosis. *J. Biochem. Cell Biol.*, 31, 415~430.

- Buckland, A. G. and Wilton D. C. 2000. The antibacterial properties of secreted phospholipase A₂. *Biochim. Biophys. Acta*, 1483, 199~216.
- Dunn, R. D. and K. W. Broady. 2001. Snake inhibitors of phospholipase A₂ enzymes, *Biochim. Biophys. Acta*, 1553, 29~37.
- Shin, I. C. and J. S. Han. 2000. Phosphatidylcholine-specific phospholipase C-mediated induction of phospholipase D activity in Fas-expression murine cells. *Biochem. Mol. Biology.*, 126, 445~453.
- Exton, J. H. 1994. Phosphatidylcholine breakdown and signal transduction. *Biochim. Biophys. Acta*, 1212, 26~42.
- Price, B. D., J. D. Morris, C. J. Marshall and A. Hall. 1989. Stimulation of phosphatidylcholine hydrolysis, diacylglycerol release, and arachidonic acid production by oncogenic ras is a consequence of protein kinase C activation. *J. Biol. Chem.*, 264, 16638~16643.
- Rhee, S. G. and Y. S., Bae 1997. Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C isozymes. *J. Biol. Chem.*, 272, 15045~15048.
- Nofer, R. J., U. Seedorf, G. Assmann and M. Tepel, 2000.

D609-phosphatidylcholine-specific phospholipase C inhibitor attenuates thapsigargin-induced sodium influx in human lymphocyte. *Cell sing.*, 12, 289~296.

Saito, M. and Kanfer, J. N. 1973. Solubilization and properties of a membrane-bound enzyme from rat brain catalyzing a base-exchange reaction. *Biochem Biophys Res Commun.*, 53, 391~398.

Kanoh, H., Kanaho Y. and Nozawa, Y. 1991. Phospholipase B-like activity in rabbit brain membrane. *Comp. Biochem. physiol. B.*, 110, 367~369.

Hammond, S. M., Altshuller, Y. M., Sung, T.C., Rudege, S. A. Rose, K., Engebrecht, J., Morris, A. J., and Frohman, M. A. 1995. Human ADP-ribosylation factor-activated phosphatidylcholine-specific phospholipase D defines a new and highly conserved gene family. *J. Biolo. Chem.*, 270, 29640~29643.

Hammond, S. M., Jenco, J. M. Nakashima, S., Cawallader, K., Gu, Q., Cook, S., Nozawa, Y. Prestwich, G. D., Frohman, M. A. and Morris, A. J. 1997. Characterization of two alternately spliced forms of phospholipase D1. Activation of the purified enzymes by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, ADP-ribosylation factor, and Rho family monomeric GTP-binding proteins and

protein kinase C- α . *J. Biol. Chem.*, 272, 3860~3868.

Rizzo, G. R. 2002. Pharmacological importance of phospholipase D and phosphatidic acid in the regulation of the mitogen-activated protein kinase cascade. *Pharm. Thera.*, 94, 35~50.

Viggaard, H. S. H. 1995. Characterization and partial purification of phospholipase D from human placenta. *Biochim. Biophys. Acta*, 1258, 169~176.

Han, Joong-Soo, Joon-Ki Chung, Heun-Soo Kang, Jason Donaldson and Yun Soo Bae 1996. Multiple Forms of phospholipase D inhibitor from Rat Brain Cytosol. *J. Biol. Chem.*, 271, 11163~11169.

Vinggaard, A. M. and Hansen H. S. 1995. Characterization and partial purification of phospholipase D from human placenta. *Biol. Biophys. Acta*, 1258, 169~176.

Sheikhnejad R. G. and Srivastava P. N., 1986. Isolation and properties of phosphatidylcholine-specific phospholipase C from bull seminal plasma. *J. Biol. Chem.*, 261, 7544~7549.

Randell E., Mulye H., Mookerjee S. and Nagpurkar A., 1992. Evidence for phosphatidylcholine hydrolysis by phospholipase C in rat platelets. *Biochim.*

Biophys. Acta, 1124, 273~278.

Hinkovska-Galchev, V. and Srivasta P. N. 1992. Phosphatidylcholine and phosphatidylinositol-specific phospholipase C of bull and rabbit spermatozoa. Mol. Reprod. Dev., 33, 281~6.

Scherer, G. F. E., Roland U. Paul, Andre Holk, and Jan Martinec, 2002. Down-regulation by elicitors of phosphatidyl choline-hydrolyzing phospholipase C and up-regulation of phospholipase A in plant cells, BioChem. Biophys. Res. Commun., 283, 766~770.