

시안산이 수정체 단백의 Carbamylation과 Catalase 활성에 미치는 영향

문 교 철 · 이 세 엽*

= 요약 =

백내장 환자에서 수정체내 단백의 carbamylation 정도를 확인하고 요소(urea)에서 유래된 시안산이 수정체 단백과 catalase를 carbamylation시키고 catalase의 활성을 감소시킬 수 있는지를 확인하고자 본 실험을 수행하였다. 백내장 환자의 수정체는 대조군에 비해 약 76%가 carbamylation되어 있었다. 토끼 눈의 수정체에 시안산을 가하였을 때 시안산의 농도와 반응 시간에 따라 점차 carbamylation이 증가되었다. Catalase에 시안산을 가하였을 때도 시안산의 농도와 반응 시간이 지남에 따라 catalase의 carbamylation 정도가 증가하면서 catalase의 활성이 감소하였다. 이상의 결과로 보아 수정체 단백과 catalase는 시안산에 의해 carbamylation되며, catalase는 활성을 소실하여 백내장을 초래할 수 있을 것으로 사료된다(한안지 40:369~375, 1999).

= Abstract =

Effect of Cyanate on Lens Protein Carbamylation and Catalase Activity

Kyo-Cheol Mun, M.D. and Se-Youp Lee, M.D.*

Proteins are known to be carbamylated as a result of reactions with urea-derived cyanate. We investigated the effect of carbamylation by cyanate on the catalase activity which is known that its decreased activity contributes to cataract formation, and on the lens protein. Catalase and lens protein

<접수일 : 1998년 7월 16일, 심사통과일 : 1998년 8월 28일>

계명대학교 의과대학 생화학교실

Address reprint requests to Kyo-Cheol Mun, M.D.

Department of Biochemistry, Keimyung University School of Medicine

#194 Dong San Dong, Taegu, 700-712, Korea

Tel : 82-53-250-7786, Fax : 82-53-252-1605

계명대학교 의과대학 안과학교실*

Department of Ophthalmology, Keimyung University, School of Medicine, Taegu, Korea*

were carbamylated by incubation with cyanate at 37°C. The extent of carbamylation was monitored by following the loss of free amino group using trinitrobenzenesulphonic acid. The level of carbamylated protein was 76% in patients with cataract. Carbamylated proteins in normal lens from rabbits and carbamylated catalase were increased as the time of exposure to cyanate passes and as the concentration of cyanate increases. And increasing degrees of carbamylation produced a progressive impairment of catalase activity. Our results suggest that cyanate is an inhibitor of catalase, and carbamylation of catalase as a result of reaction with urea-derived cyanate may contribute to cataract formation (J Korean Ophthalmol Soc 40:369~375, 1999).

Key Words : Carbamylation, Cataract, Catalase, Cyanate

활성 산소(oxygen free radical)는 신체 내의 에너지 생성 과정, 정상적인 신진 대사 과정 및 면역 체계를 통해 끊임없이 생성된다^{1,2)}. 그러므로 이들 없이는 에너지를 생성하지도 감염원과 싸우지도 못할 뿐만 아니라 신체에 필요한 화학 물질도 생성하지 못한다. 그러나 과잉의 통제되지 않는 활성 산소는 세포에 손상을 주며 각종 질병을 일으키는 원인으로 작용한다. 이러한 유해 산소의 세포 손상 작용이 축적되어 동맥 경화³⁾, 심장 질환⁴⁾, 암⁵⁾, 노화⁶⁾, 신장질환⁶⁾, 간 등의 소화기계 질환⁷⁾ 등을 유발하는 것으로 알려져 있다. 특히 최근 안과 영역에서는 백내장이 활성 산소에 의한 손상으로 유발되는 것으로 알려져 있다⁸⁾. 생체는 이러한 활성 산소에 의한 산화적 손상에 대하여 이를 방어하는 superoxide dismutase, glutathione peroxidase 및 catalase와 같은 항산화 효소계를 가지고 있는데 이들 중 glutathione peroxidase와 catalase는 활성 산소 중 반응성이 강한 과산화수소를 분해를 촉매하여 무독화시킨다⁹⁾. Catalase와 glutathione peroxidase의 활성이 저하되면 활성 산소에 의한 손상은 증가되는데 특히 수정체에서는 glutathione peroxidase의 활성 저하가 없어도 catalase 기능이 감소하면 catalase의 기질인 과산화수소가 증가하여 이로 인한 손상이 증가하고 교차 결합을 일으켜 불투명한 고체 덩어리를 침전시킴으로써 백내장이 초래되는 것으로 알려져 있다^{8,9)}.

한편 사람의 체내에서 요소(urea)의 0.8%

자연적으로 시안산로 바뀌어져 요소(urea)와 시안산은 체내에서 평형 상태를 유지한다¹⁰⁾. 이러한 시안산은 단백질을 비롯한 각종 생체 물질을 변화시키는 것으로 알려져 있다¹⁰⁻¹²⁾. 시안산은 생체 활성 물질, 특히 단백질에 결합함으로써 단백질을 carbamylation시키며, 단백질의 여러 잔기들 중에서는 free amino기와 가장 쉽게 반응하여 carbamylation시키는 것으로 알려져 있다¹⁰⁻¹⁵⁾. 특히 나이가 증가할수록 백내장이 잘 초래되는 이유는 수정체내 단백, 특히 수정체 결정(crystalline)이 요소(urea)에서 유래된 시안산에 의해 carbamylation되기 때문인 것으로 알려져 있다¹³⁻¹⁵⁾. 그러나 최근 수정체내의 시안산이 단백 중 6-phosphogluconate dehydrogenase를 carbamylation시켜 백내장 형성에 관여할 것이라는 보고¹²⁾는 있으나 catalase의 carbamylation에 대한 보고는 없다. 만약 catalase가 시안산에 의해 carbamylation되어 그 활성이 감소한다면 이는 곧 활성 산소에 의한 백내장 형성에 관여될 것이다.

따라서 본 연구에서는 노인 백내장 환자에서 수정체내 단백의 carbamylation 정도를 확인하고 요소(urea)에서 유래된 시안산이 수정체 단백과 catalase를 carbamylation시키며 catalase의 활성을 감소시킬 수 있는지를 확인하기 위하여 본 실험을 수행하였다.

대상 및 방법

1. 대상

계명대학교 동산의료원에서 노인 백내장으로 진단된 21명의 환자에서 낭외 수술 방법으로 백내장 수정체를 적출하여 시료로 사용하였다. 수술시 환자의 평균 나이는 63.8 ± 16.3 세였다.

2. 방법

1) 시약

Catalase 표품, potassium diposphosphate, potassium monophosphate, trinitrobenzenesulphonic acid 및 단백 표준 혈청 (bovine albumin, 10g/100ml) 등은 미국 Sigma사의 제품을 구입하여 사용하였으며 그 외 일반 시약은 특급 또는 일급품을 사용하였다.

2) 수정체 단백의 carbamylation 정도의 측정 수정체 단백이 carbamylation되어 소실되는 free amino group의 소실양은 Roxborough 등¹⁰⁾의 방법을 약간 변형하여 측정하였다. 즉, 사람의 수정체 단백 500 μg 을 37°C 수용액 중에서 4% sodium hydrogen carbonate(pH 8.4) 존재 하에서 0.1% trinitrobenzenesulphonic acid 와 반응하는 정도를 340nm에서 측정하였으며 백내장 단백질의 carbamylation 정도는 토끼 수정체의 carbamylation 정도에 대한 비를 구하여 %로 나타내었다.

3) 정상 토끼 수정체와 시안산의 반응

정상 토끼 수정체와 시안산의 반응은 Hörrkkö 등의 방법¹⁶⁾에 따라 37°C 수용액에서 실시하였다. 즉, 정상 토끼눈 균질 마쇄액을 단백량으로 20mg /ml되게 한 후 이를 37°C 수용액 중에서 2M 시안산과 6시간 동안 반응시키거나 시안산 농도를 50mM에서 2M까지 변화시키면서 정상 수정체의 단백이 시안산에 의해 carbamylation되는지를 확인하였다.

4) Catalase 활성 측정

Catalase 활성도는 H_2O_2 를 기질로 사용하여

25°C에서 1분간 반응시키는 동안에 240nm 파장에 서 H_2O_2 가 환원되어 감소하는 흡광도로써 효소 활성도를 측정하는 Nelson과 Kiesow¹⁷⁾의 방법에 따라 측정하였으며 효소 활성도의 단위는 1분간에 1mg의 단백이 반응하여 환원시킨 H_2O_2 를 μmol 로 나타내었다.

5) Catalase와 시안산의 반응

Catalase 효소 표품과 시안산의 반응은 Hörrkkö 등의 방법¹⁶⁾에 따라 37°C 수용액에서 실시하였으며 시안산 농도에 의한 영향을 평가하기 위하여 단백 mg당 150 unit의 catalase를 시안산과 반응시키되 시안산의 농도를 50mM에서 2M까지 변화시키거나 0시간부터 6시간까지 경과시키면서 catalase의 활성과 carbamylation 정도를 2회 측정하여 그 평균치를 취하였다.

6) 통계처리

자료는 평균±표준편차로 표시하였고, 양군 사이의 비교는 Student's t-test로 하였으며 통계학적 유의수준은 p값이 0.05 미만으로 하였다.

결 과

백내장 환자의 수정체는 정상 토끼 눈의 수정체 비해 carbamylation 정도가 34%에서 100%까지 평균 $76.1 \pm 20.6\%$ 였다.

정상 토끼눈 수정체의 균질 마쇄액을 37°C 수용액 중에서 50mM에서 2M까지 시안산 농도를 변화시키면서 6시간 동안 반응시켰을 때 carbamylation되어 소실되는 free amino group의 양은 50mM의 시안산에서 약 2.1%였고 농도가 증가함에 따라 증가하여 2M에서는 약 46.5%가 되었다(Fig. 1).

정상 토끼 수정체의 균질 마쇄액을 37°C 수용액 중에서 2M 시안산과 반응시켰을 때 반응 1시간 후에는 약 20.5%가 carbamylation되었고 시간이 지남에 따라 점점 증가하여 6시간 후에는 약 46.5%가 carbamylation되어 free amino group을 소실하였다(Fig. 2).

Catalase가 시안산에 의해 활성을 소실되는 정도를 파악하기 위하여 catalase 효소 표품 150

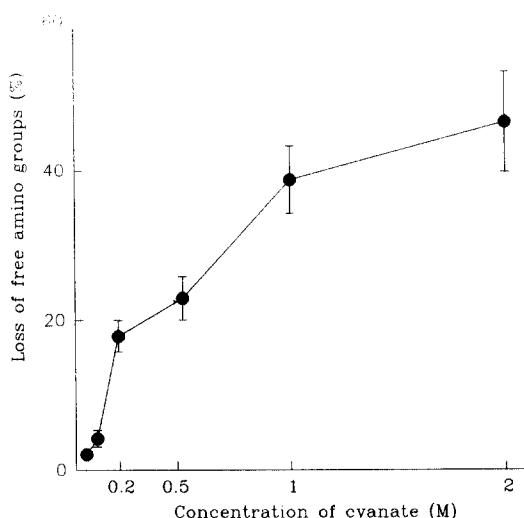


Fig. 1. Effect of cyanate on loss of free amino group in lens protein. Lens proteins from rabbits were carbamylated depending on the concentration of cyanate. Free amino groups were measured by reaction with trinitrobenzenesulphonic acid.

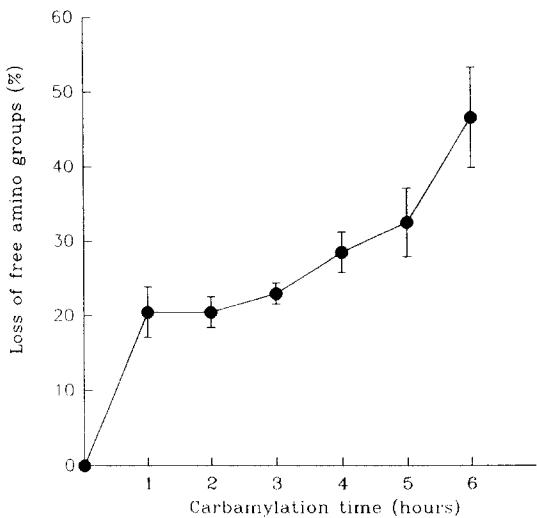


Fig. 2. Relationship between carbamylation time and loss of free amino groups in rabbit lens protein. Lens proteins from rabbits were carbamylated for 6 hours by reaction with cyanate. Free amino group were measured by reaction with trinitrobenzenesulphonic acid.

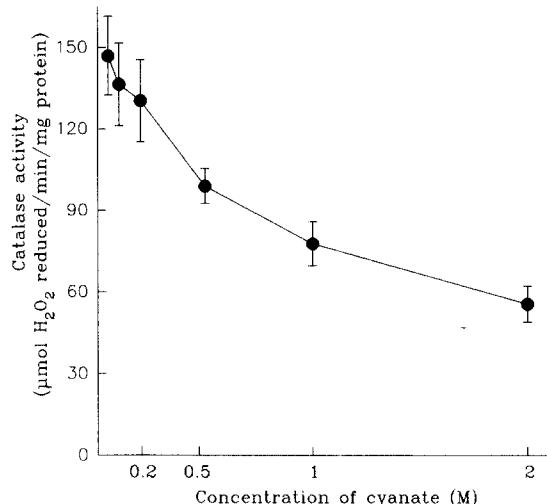


Fig. 3. Relationship between the cyanate concentration and catalase activity. Catalase activity was decreased depending on the concentration of cyanate.

unit를 시안산과 반응킨 경우는 potassium phosphate buffer(pH 6.8)를 대신 사용한 대조군에 비해 catalase의 활성이 각각 50mM에서는 약 2%가 감소하였으며 이후 농도가 증가함에 따라 계속 감소하여 2M에서는 62.9%가 감소하였다 (Fig. 3).

Catalase 효소 표품 150 unit를 37°C 수용액 중에서 6시간 동안 시안산과 반응시키되 시안산의 농도를 50mM에서 2M까지 변화시켰을 때 catalase는 50mM에서 약 30%의 amino group이 carbamylation 되었고 이후 시안산의 농도가 증가함에 따라 2M에서는 약 98%가 carbamylation되어 free amino group을 소실하였다 (Fig. 4).

Catalase 효소 표품 150 unit를 2M 시안산과 반응시키면서 시간에 따른 변화를 관찰한 결과 대조군에 비해 그 활성이 1시간까지는 별로 없었으나 이후 감소하여 6시간에는 약 100%의 활성 감소를 보였으며 (Fig. 5) carbamylation은 1시간 까지 변화가 없다가 이후 시간이 지남에 따라 점점 증가하여 6시간 후에는 약 98%가 carbamylation되었다 (Fig. 6).

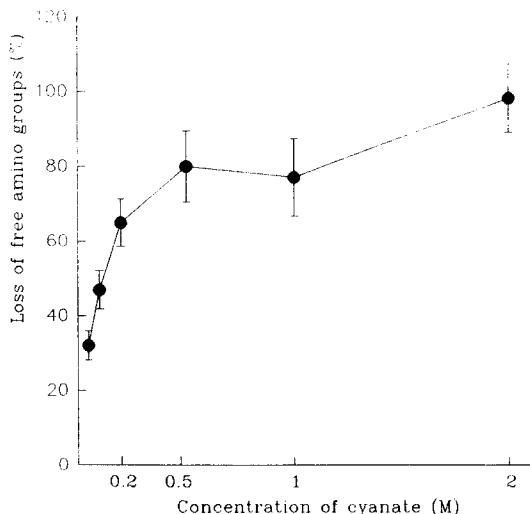


Fig. 4. Relationship between the cyanate concentration and loss of free amino group in catalase. Catalase lost free amino group depending on the concentration of cyanate. Free amino groups were measured by reaction with trinitrobenzenesulphonic acid.

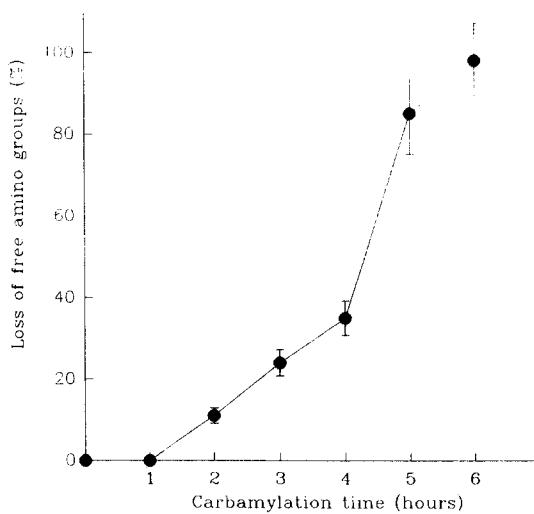


Fig. 6. Relationship between carbamylation time and loss of free amino group in catalase. Catalase was carbamylated depending on carbamylation time. Free amino group were measured by reaction with trinitrobenzenesulphonic acid.

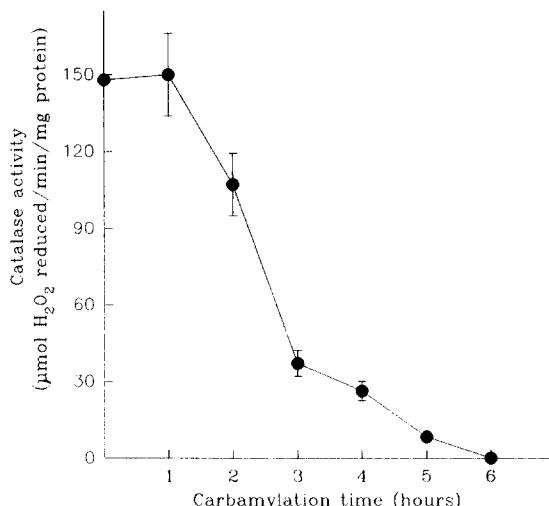


Fig. 5. Relationship between carbamylation time and catalase activity. Catalase activity was decreased in time dependent manner of carbamylation.

고 찰

백내장이 초래되는 원인으로는 osmotic stress,

단백의 응집, 산화적 손상 등이 있다¹⁸. 이러한 원인들 중 활성산소에 의한 것을 보면 항산화 효소 중 glutathione peroxidase의 활성 저하가 없어도 catalase 기능이 감소하면 catalase의 기질인 과산화수소가 증가하여 이로 인한 손상이 증가하여 눈에서는 백내장이 초래되는 것으로 알려져 있는데^{8,9}, 이는 활성산소가 수정체내의 단백질을 손상시키고 교차 결합을 일으켜 불투명한 고체 덩어리를 침전시킴으로써 백내장을 유발하기 때문인 것으로 알려져 있다⁹. 이렇게 백내장 환자에서 항산화 효소 중 catalase의 활성 저하가 백내장 형성에 관여된다는 보고^{8,9}는 있지만 catalase의 활성 저하의 원인은 밝혀져 있지 않다.

한편, 사람의 체내에서 요소(urea)는 자연적으로 시안산으로 바뀌어져 단백질을 비롯한 각종 생체 물질을 carbamylation시키는 것으로 알려져 있다¹⁰⁻¹². 특히 최근에는 수정체내의 시안산이 단백중 6-phosphogluconate dehydrogenase를 carbamylation시켜 백내장에 관여할 것이라는 보고¹²는 있으나 catalase의 carbamylation에 대한 보고는 없다. 만약 catalase가 시안산에 의

해 carbamylation되어 그 활성이 감소한다면 이는 곧 활성 산소에 의한 백내장 형성에 관여될 것이다. 본 실험에서는 시안산이 catalase를 carbamylation시킴으로써 catalase의 활성을 억제하여 백내장의 형성에 관여될 수 있는지를 확인하기 위하여 본 실험을 수행하였다.

먼저 백내장 환자의 수정체 단백의 carbamylation 정도를 측정하여 보았을 때 34%에서 100% 까지로 평균 $76.1 \pm 20.6\%$ 였다. 또한 정상 토끼 눈 균질 마쇄액을 37°C 수용액 중에서 각종 농도의 시안산과 반응시키거나(Fig. 1), 2M 시안산과 6시간동안 반응시켰을 때(Fig. 2) 정상 토끼 눈의 수정체는 시안산의 농도가 증가함에 따라 혹은 시안산과의 반응 시간이 경과함에 따라 carbamylation되어 free amino group을 소실하였다. 이는 환자 수정체의 단백이 심하게 carbamylation 되어 있으며 정상 눈 또한 시안산에 의해 carbamylation될 수 있음을 보여 주는 것이다. 또한 몇몇 보고자들의 연구^[13, 15]에 의하면 백내장이 초래되는 이유의 하나로 수정체내 단백이 시안산에 의해 carbamylation되기 때문인 것으로 알려져 있다. 따라서 본 실험의 결과는 수정체내의 단백이 시안산에 의해 carbamylation되어 백내장을 초래할 수 있다는 결과를 지지하는 또 다른 하나의 결과라 할 수 있을 것이다. 이상 저자들의 실험 결과는 백내장내의 단백이 carbamylation되 있으며 이는 시안산과의 반응으로 초래될 수 있음을 나타낸다고 생각된다.

백내장 기전의 하나로 알려진 catalase에 대한 활성 감소에 시안산이 작용할 수 있는지를 검토하기 위하여 catalase에 시안산을 첨가하였을 때 시안산의 농도가 증가함에 따라 catalase의 활성은 감소되었으며(Fig. 3) 이에 따라 carbamylation 정도도 증가하였다(Fig. 4). 또한 일정 농도의 시안산에 대하여 catalase는 시간이 지남에 활성을 소실하면서(Fig. 5) carbamylation되었다(Fig. 6). 이는 환자에서 수정체내 요소(urea)의 농도가 높으면 높을수록 시안산의 농도가 증가되어 catalase의 활성 저하가 초래됨을 의미한다고 생각되며 또한 오랜 기간동안 시안산에 노출되면 catalase의 활성이 carbamylation

에 의해 그 활성을 소실한다고 생각된다.

이렇게 catalase는 시안산과 반응하는 시간이 경과하면 할수록, 그리고 시안산 농도가 진하면 진할수록 활성이 감소하는 것으로 보아 수정체내 요소(urea) 농도의 증가로 인한 시안산 농도와 시안산에 대한 노출 시간이 중요한 역할을 하는 것으로 생각된다. 따라서 이는 수정체의 요소(urea) 농도를 감소시키는 것이 catalase의 활성 소실을 방지하는 길이며 이로 인한 활성 산소에 의한 손상을 막는 하나의 방법이라고 생각된다.

이상의 실험 결과와 문헌의 고찰로 보아 catalase의 활성이 백내장 환자에서 감소하는 것은 요소(urea)에서 유래되는 시안산에 의해 carbamylation되기 때문이라고 생각된다.

REFERENCES

- 1) PUNCHARD NA, KELLY FJ : *Introduction*. In: PUNCHARD NA, KELLY FJ. eds. *Free radicals*. Oxford, Oxford University Press, pp. 1-8, 1996.
- 2) MOSLEN MT : *Reactive oxygen species in normal physiology, cell injury and phagocytosis*. In: ARMSTRONG D. ed. *Free radicals in diagnostic medicine. A systems approach to laboratory technology, clinical correlations, and antioxidant therapy*. New York, Plenum Press, pp. 17-27, 1994.
- 3) REAVEN PD : *Mechanisms of atherosclerosis: Role of LDL oxidation*. In: ARMSTRONG D. ed. *Free radicals in diagnostic medicine. A systems approach to laboratory technology, clinical correlations, and antioxidant therapy*. New York, Plenum Press, pp. 113-128, 1994.
- 4) FERRARI R : *Oxygen free radicals at myocardial level: Effect of ischemia and reperfusion*. In: ARMSTRONG D. ed. *Free radicals in diagnostic medicine. A systems approach to laboratory technology, clinical correlations, and antioxidant therapy*. New York, Plenum Press, pp. 99-112, 1994.
- 5) AMES BN, SHIGENAGA MK : *Oxidants are a major contributor to cancer and aging*. In: HALLIWELL B, ARUOMA. eds. *DNA and free radicals*. New York, Ellis Horwood, pp. 1-15,

- 1993.
- 6) Waz WR, Feld LG : *Reactive oxygen molecules in the kidney*. In: Armstrong D. ed. *Free radicals in diagnostic medicine. A systems approach to laboratory technology, clinical correlations, and antioxidant therapy*. New York, Plenum Press, pp. 171-184, 1994.
 - 7) Yagi K : *Lipid peroxides in hepatic, gastrointestinal and pancreatic disease*. In: Armstrong D. ed. *Free radicals in diagnostic medicine. A systems approach to laboratory technology, clinical correlations, and antioxidant therapy*. New York, Plenum Press, pp. 165-170, 1994.
 - 8) Halliwell B, Gutteridge JC : *Protection against radical damage: systems with problems*. In: Halliwell B, Gutteridge JC. eds. *Free radicals in biology and medicine*. 2nd ed. Oxford, Clarendon Press, pp. 277-298, 1989.
 - 9) Halliwell B, Gutteridge JC : *Protection against oxidants in biological systems: the superoxide theory of oxygen toxicity*. In: Halliwell B, Gutteridge JC. eds. *Free radicals in biology and medicine*. 2nd ed. Oxford, Clarendon Press, pp. 86-187, 1989.
 - 10) Roxborough HE, Millar CA, McEneny J, Young IS : *Carbamylation inhibits the ferricidase activity of caeruloplasmin*. *Biochem Biophys Res Commun* 214:1073-1078, 1995.
 - 11) Roxborough HE, Young IC : *Carbamylation of proteins and atherogenesis in renal failure*. *Med hypothesis* 45:125-128, 1995.
 - 12) Ganea E, Harding JJ : *Inhibition of 6-phosphogluconate dehydrogenase by carbamylated α -crystallin, a chaperone-like protein*. *Biochem Biophys Res Commun* 222:626-631, 1996.
 - 13) Beswick HT, Harding JJ : *Conformational changes induced in bovine lens alpha-crystallin by carbamylation. Relevance to cataract*. *Biochem J* 223:221-227, 1984.
 - 14) Crompton M, Rixon KC, Harding JJ : *Aspirin prevents carbamylation of soluble lens proteins and prevents cyanate-induced phase separation opacities in vitro: a possible mechanism by which aspirin could prevent cataract*. *Exp Eye Res* 40:297-311, 1985.
 - 15) Beswick HT, Harding JJ : *High-molecular-weight crystallin aggregate formation resulting from non-enzymic carbamylation of lens crystallins: relevance to cataract formation*. *Exp Eye Res* 45:569-578, 1987.
 - 16) Hörkkö S, Savolainen MJ, Kervinen K, Kesäniemi A : *Carbamylation-induced alterations in low-density lipoprotein metabolism*. *Kidney Int* 41:1175-1181, 1992.
 - 17) Nelson DP, Kiesow LA : *Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25°C (with molar extinction coefficients of H_2O_2 solutions in UV)*. *Anal Biochem* 49:474-478, 1972.
 - 18) Chylack LT, Jr. : *Surgical anatomy, pathogenesis and classification of cataracts*. In: Steinert RF ed. *Cataract surgery*. 1st ed., Philadelphia, WB Saunders Co., pp. 3-9. 1995.