

쥐 심장의 미토콘드리아에서 분리한 Carnitine Acetyltransferase에 대한 DTP의 반응 억제와 Acetyl-CoA와 Propionyl-CoA의 방어적인 효과에 관한 연구*

정 충 덕**

Studies on the Protective Effect of Acetyl-CoA and Propionyl-CoA Against the Inhibition of Rat Heart Mitochondrial Carnitine Acetyltransferase by DTP.*

Choong-Duk Chung**

Summary

Carnitine acetyltransferase was purified from rat liver peroxisomes and mitochondria, as well as rat heart mitochondria. Formation of acetylcarnitine was assayed using the spectrophotometric 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 concentrations less than 0.5 μ M, an apparent 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. These experiments were repeated using carnitine acetyltransferase purified from beef heart mitochondria and an isotope forward assay. With the isotope forward assay, a significant inhibition of carnitine acetyltransferase by DTP was observed at low acetyl-CoA concentrations (i. e., less than 0.5 μ m): much less inhibition by DTP was observed with propionyl-CoA. These data show that at acyl-CoA concentrations below the K_m for acyl-CoA, DTP is quite inhibitory to CAT. Better substrate protection is provided by propionyl-CoA compared to acetyl-CoA. The cause for the difference is not known.

서 론

생체막에 존재하는 carnitine 대사에 관여하는 효

소들(Fiol et al., 1987., Fritz et al., 1963)은 carnitine acetyltransferase(CAT), carnitineoctanoyltransferase(COT)와 carnitinepalmitoyltransferase(CPT) 등이 알려져 있는데, 이들 효소

* 이 논문은 한국과학재단 지원에 따른 '92년도 후반기 해외 Post-Doc. 연수에 의해 연구되었음.

** 사범대학 과학교육과(Dept. of Science Education, Cheju Univ., Cheju-do, 690-756, Korea)

의 활성을 측정하는 방법은 기질인 acyl-CoA와 carnitine이 결합하고 남은 CoASH와 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB)가 반응하여 생성된 5-thio-2-nitrobenzoate가 흡광하는 성질을 이용하여 측정하는 방법(Biber et al., 1972)을 사용하다가 지금에 와서는 dithiodipyridine(DTP)을 사용(Lilly et al., 1990)하여 324nm의 흡광도의 변화를 이용하여 상대적인 acylcarnitine의 합성을 측정하여 효소의 활성도를 계산하고 있다. 한편 Chung등(1991)은 이러한 spectrophotometric assay를 이용하여 쥐의 심장과 간에서 분리한 CAT가 기질인 acetyl-CoA와 propionyl-CoA와의 반응에서 매우 다른 양상을 나타내는 특이한 반응결과를 보고 하였다. 즉, acetyl-CoA에 대한 K_m 을 측정한 바 각각 39 μ M과 29 μ M인데 비하여, propionyl-CoA에 대한 K_m 은 3 μ M~2 μ M이라고 보고하였으며 propionyl-CoA를 기질로 하는 반응은 Michaelis-Menten식에 맞는 결과를 얻었으나, acetyl-CoA를 기질로 하였을 때에는 이 식에 맞지 않았다고 하였다. 따라서 본 실험에서는 CAT를 분리 및 정제하고 동위원소로 표지된 acetyl-CoA와 propionyl-CoA를 기질로 사용하고 HPLC를 이용하여 상기 2가지 기질에 대한 반응을 측정하고 CAT가 Michaelis-Menten식에 따르는 효소인가와 DTP에 의한 반응 억제효과를 조사하여 그 결과를 보고한다.

재료 및 방법

1. 쥐의 심장에서 mitochondria의 분리

쥐의 심장에서 mitochondria를 분리하는 과정은 Fallell등(1983)과 Lysiak 등(1988)의 방법에 따라서 Sprague-dawley 쥐에서 추출한 심장을 150~160g 정도 분리하여 무게를 재었다. 이것을 225mM mannitol, 75mM sucrose, 1mM EGTA과 protease inhibitor(phenylmethylsulfonyl fluoride, PMSF 0.1mM, 1 μ g/ml의 pepstatin, leupeptin과 bestatin)가 들어있는 pH7.5 완충액(Kerner and Bieber, 1990., Lilly et al. 1986)에서 homogenize 시키고 약 10%의 균질액(w/w buffer)이 되게 하였다. 그후에 이것을 600g에서 원심분리하여 상정액

을 얻고 침전물을 버린다. 이 상정액을 다시 800g에서 15분간 원심분리하여 상정액을 버리고 침전물과 같은 완충액으로 3회 씻은 후 8000g에서 15분간 원심분리하여 침전물을 1M KCl과 10% glycerol, 20mM HEPES, protease inhibitor가 녹아있는 완충액에 녹인 다음 -50°C에서 overnight 시켜 막의 파괴를 유도한다. 이것을 다시 4°C이하에서, magnetic stirrer로 천천히 저으면서 녹인후 100,000g에서 20분간 원심 분리 시킨다. 여기서 상정액만을 취하여 (NH₄)₂SO₄를 천천히 가하면서 35~55%가 되는 농도의 salt fractionation만을 얻는다. 이 침전물에 같은 완충액을 조금 가하여 다시 녹인후 Amicon centriprep™ 30 concentrator(series 8050, 25PM 30 filter)로 일부의 염을 제거하고 농축시켰다.

2. Mitochondria에서 CAT의 정제

a) CAT의 추출

쥐의 심장에서 추출한 mitochondria를 단백질량이 90mg/ml가 되도록 5mM Hepes, pH 7.5에 0.5mM EDTA, 0.3M KCl, 20% glycerol과 protease inhibitor가 들어있는 완충액에 녹인다. 그리고 CAT의 activity는 실온에서 spectrophotometer(Lilly et. al., 1990)를 이용하여 측정하였다.

b) Sephacryl S-300 gel filtration

Sephacryl S-300(Clarke and Bieber, 1981)을 5mM Hepes, pH 7.5 완충액에서 가스를 제거한 후에 2.5cm×100cm의 column에 붓고 이것을 5mM Hepes, pH 7.5 완충액에 0.5mM EDTA, 0.3M KCl, 20% glycerol과 protease inhibitor가 녹아있는 완충액으로 column을 equilibration 시켰다. 여기에 a)의 mitochondria를 loading하고 용출 시키면서 분획된 각 tube마다 CAT의 활성을 spectrophotometer(Fiol, C. J. 1987)로 측정하고 단백질 양은 수정된 Lowry 방법(Mittal and Kyrup, 1980)으로 정량하였다. CAT가 들어있는 분획물만을 다시 Amicon centriprep™ 30 concentrator에서 원심분리기를 이용 2500rpm 이하에서 농축시켰다. 그리고 여기에 5mM Hepes, pH 7.5에 0.5mM EDTA, 0.1M KCl, 20% glycerol

이 있는 buffer를 가하면서 KCl의 농도를 낮추어 주었다.

c) Cellulose phosphate column chromatography

2cm×20cm의 column에 가스가 제거된 0.02%의 NaN₃ 용액에 들어있는 cellulose phosphate를 더하고 이것을 5mM HEPES, 0.5mM EDTA, 20% glycerol, 0.1M KCl과 protease inhibitor가 들어있는 pH 7.5의 완충액으로 equilibration 시킨후 여기에 b)에서 얻은 CAT를 loading 한 후 같은 buffer로 100ml를 흘려보내 세척한 다음 다시 0.1M~0.5M KCl이 있는 buffer로 linear gradient시키면서 용출시켰다. 여기서 얻은 CAT 분획물은 다시 5ml의 부피가 되게 농축시키고, Amicon centrprep™ 30 concentrator를 이용하여 탈염시켰다.

d) Agarose-CoA (Ag-CoA type 5) chromatography

1.5cm×10cm agarose-CoA column을 5mM HEPES, pH 7.5, 20% glycerol, 0.5mM EDTA, 0.02% NaN₃와 protease inhibitor가 들어있는 완충액으로 equilibration 시키고 여기에 cellulose phosphate chromatography에서 얻은 CAT를 loading 시켰다. bed volume의 3배인 15ml의 완충액으로 column을 세척하고 0.1~0.5M KCl 완충액으로 linear gradient로 용출시켰다. 그리고 이것은 다시 Amicon centrprep™ 30 concentrator를 이용하여 전체부피가 약 5ml정도가 되게 농축시키고 탈염시켰다.

3. CAT의 spectrophotometric assay

CAT활성측정은 spectrophotometer에 의한 Lilly 등(1990)의 방법에 따랐으며, 실온에서 50mM potassium phosphate, pH 7.5에 150μM DTP, 0.1μM 농도부터 Acetyl-CoA 또는 propionyl-CoA를 사용 측정하였고 1.7mM L-carnitine을 더하였으며 약 3분정도 O.D의 변화에 따른 slope로 계산하였다. E₃₂₂ = 19,600M⁻¹·cm⁻¹

4. ¹⁴C-Acyl-CoA의 분리 및 정제

HPLC에 의한 CAT의 활성을 측정하기 위한 ¹⁴C로 표지된 propionyl-CoA의 합성을 Taylor 등(1990)의 방법에 의하여 진행하였으며 메탄올에 녹아있는 1μM (52μCi)의 ¹⁴C-propionic acid를 N₂를 이용하여 건조시킨 후 여기에 Triton X-100 (0.1% w/v), 5mM CoASH, 1mM dithiothreitol (DTT), 10mM MgCl₂, 3-N-morpholinopropanesulfonic acid (MOPS)-NaOH, pH 7.5를 가하여 5분간 sonication (Model 2200, Branson ultrasonic Corp, Danbury, CT)시켜 균질화 시킨 후 acyl-CoA synthetase (0.25units, SIGMA)를 가하여 37°C에서 2시간 반응 시켰다.

5. ¹⁴C-Acyl-CoA의 분리 및 정제

Incubation 후에 반응물을 disposable Prep-Sep C₁₈ column을 이용하여 column 부피의 3배에 해당하는 메탄올로 씻은 후 다시 여기에 같은량의 100mM MOPS-NaOH, pH 7.4로 equilibration 시킨 다음 여기에 반응물을 더하고 0.5ml의 100mM MOPS-NaOH와 1ml의 50% 메탄올로 씻은후 20ml의 메탄올을 더하여 추출하고 rotary evaporator로 건조시킨 다음, 다시 사용하려는 완충액에 녹여 사용하였다. 순수도는 HPLC에 의해 결정하였다.

6. CAT에 의한 ¹⁴C-acetylcarnitine과 ¹⁴C-propionylcarnitine 합성반응에서의 DTP의 영향조사

Acetyl-CoA와 propionyl-CoA가 0.5μM 이하의 농도에서 CAT에 의하여 acetylcarnitine, propionylcarnitine을 합성하는데 대한 DTP의 영향을 측정하기 위하여 Agarose-CoA chromatography 과정을 거친 CAT (28.17units/mg)를 사용하였다. 반응액의 전체 부피는 92.5μl였으며 여기에는 대조구의 경우에 2.5μl의 메탄올을 더하고 DTP 처리구의 경우에는 45mM DTP를 2.5μl (in ethanol)을 더한 후, 140mM NEM 20μl (Kerner and Bieber, 1983), CAT 10μl (1.86μg), 500mM MOPS 20μl와 ¹⁴C-acetyl-CoA 10μl (133, 566dpm)과 acetyl-CoA (최종농도 0.1, 0.3, 0.5μ

M) 또는 ^{14}C -propionyl-CoA $10\mu\text{l}$ (190, 401dpm)와 propionyl-CoA (최종농도 0.1, 0.3 μM)로 조성되었으며 반응은 18°C에서 propionylcarnitine의 합성은 15초 동안, acetylcarnitine은 30초동안 시켰으며 반응이 끝나면 6%의 10 μl perchloric acid (Lysiak et al., 1986)를 더하여 반응을 정지시켰고 여기에 다시 10 μl 의 0.5M NaOH를 가하였다. 그 후에 HPLC(Bieber and Kerner, 1986)와 연결된 Flo Scint- β -counter(Lysiak et al., 1986)로 각각 20 μl 를 주입하여 측정하였다. 원충액은 5mM butane sulfonic acid, 5mM ammonium acetate, pH 3.4(A)와 메탄올(B)를 사용하였으며 flow rate는 1.0ml/min으로 하였고 gradient는 처음에 100% A, 0% B: 15분 79%, A, 21% B: 25분 50% A, 50% B: 30분 0% A, 100% B로 하였으며 retention time은 ^{14}C -acetylcarnitine은 7.4min, ^{14}C -propionylcarnitine은 13.6min이었다.

결과 및 고찰

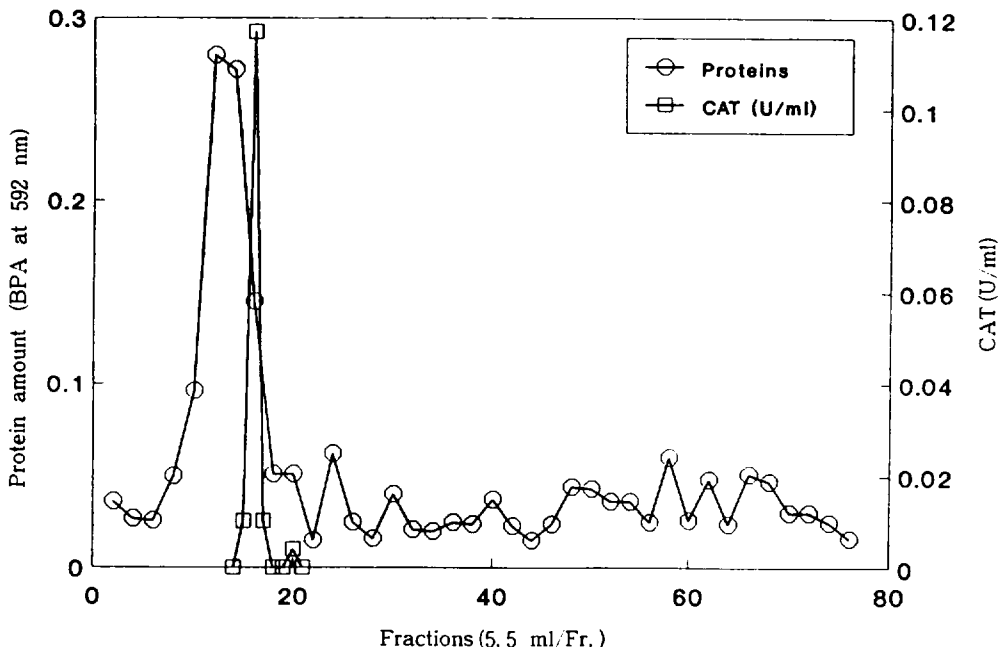


Fig. 1. Sephacryl S-300 gel filtration chromatography of rat heart mitochondria. Mitochondria were suspended in buffer and applied as described in "Materials and methods" and 20 μl aliquots from each fractions (5.5ml) were assayed for CAT activity at pH7.5(□) and protein was monitored by A_{592} (○).

1. CAT의 분리 및 정제

쥐의 심장에서 CAT를 분리 정제하는 과정의 chromatography의 profile은 Fig. 1, Fig. 2 및 Fig. 3과 같았다. 그리고 CAT의 분자량은 약 66,000으로 (Fig. 4) Chung 등 (1991)의 결과와 일치하였다. 그런데 활성도의 비교에 따르면 Agarose-CoA (type 5) chromatography 후에 활성도는 28.17units/mg으로 Chung등(1991)의 결과에서 보다 약 2.4배 증가를 보였다. 이와 같은 결과는 각각의 chromatography 후에 바로 Amicon centriprep™ 30의 concentrator를 이용하여 짧은 시간 안에 desalting 시켰고 즉시 다음 단계인 chromatography로 진행 시켰던 것과 정제 후에 보다 낮은 KCl 농도인 30mM KCl의 용액에 20%의 glycerol과 protease inhibitor가 녹아 있는 pH 7.5 원충액에 보존시킨 결과, 고농도의 염에 의한 활성도 감소를 방지한 것으로 사료되었다. 또한 이러한 활성은 10개월 이상 계속 유지되었다.

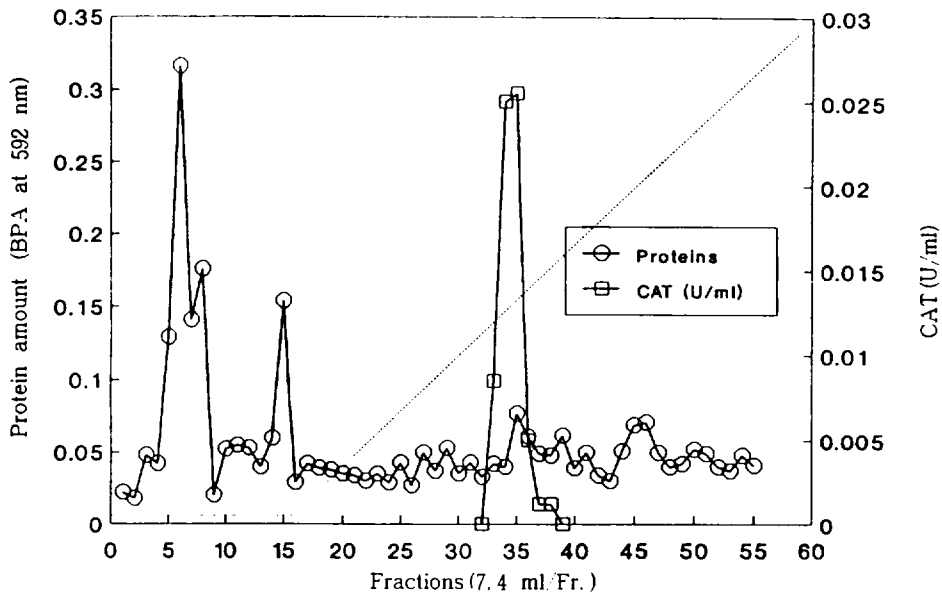


Fig. 2. Cellulose phosphate chromatography of CAT. CAT were suspended in buffer and applied as described in "Materials and Methods". The column was washed with 3 bed volumes of buffer and then eluted with a 100 to 500mM linear gradient of KCl in buffer, pH7.5. Each 20 μ l aliquots from each fractions (7.4ml) were assayed for CAT activity at pH7.5 (□) and protein was monitored by A_{592} (○).

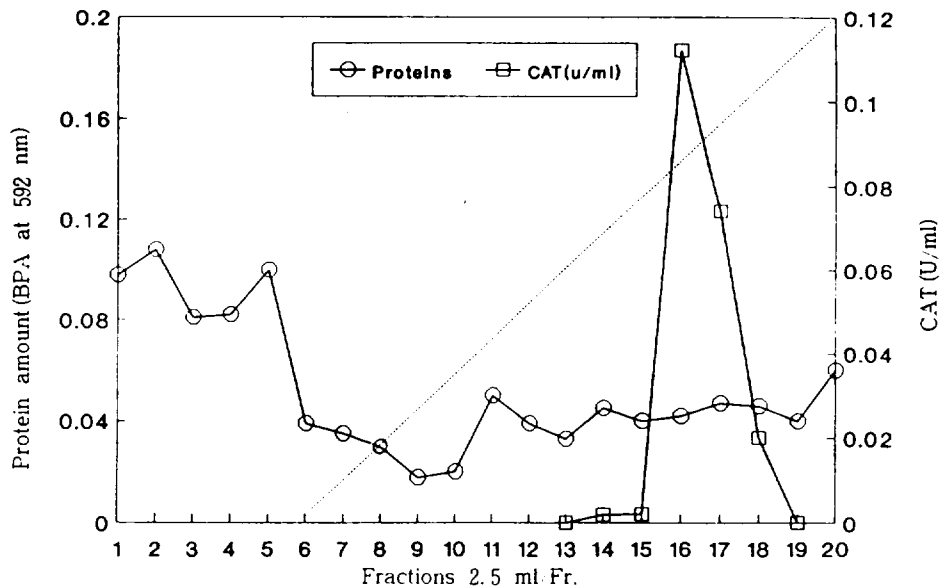


Fig. 3. Agarose-CoA chromatography of CAT. CAT were suspended in buffer and applied as described in "Materials and Methods". The column was washed with 3 bed volumes of buffer and then eluted with a 100 to 500mM linear gradient of KCl in buffer, pH 7.5. Each 20 μ l aliquots from each fractions (2.5ml) were assayed for CAT activity at pH 7.5 (□) and protein was monitored by A_{592} (○).

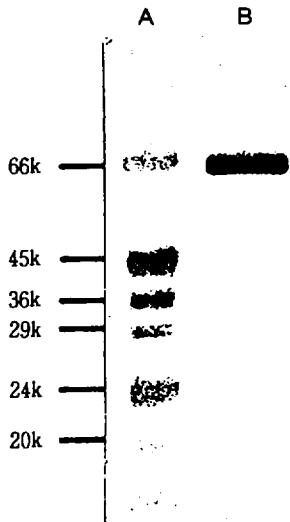


Fig. 4. SDS-PAGE of purified heart mitochondrial CAT. Lane A contains the following molecular weight markers: albumin 66,000; ovalbumin 45,000; G-3-P dehydrogenase 36,000; carbonic anhydrase 29,000; trypsinogen 24,000; and trypsin inhibitor 20,100. Lane B had 3 μ g purified heart mitochondrial CAT. The gel was stained with silver nitrate using DTP.

2. CAT의 spectrophotometric assay

Spectrophotometer를 이용하여 CAT의 활성 (Lilly et al., 1990, Bieber et al., 1972)을 측정한 결과는 다음과 같았다. CAT는 propionyl-CoA에 대한 반응에서 K_m 이 acetyl-CoA에 대한 K_m 보다 매우 낮음을 보여서 CAT가 propionyl-CoA에 대한 친화도가 더 크다는 것을 보여주었다. Fig. 5에서 보면 acetyl-CoA의 농도가 $0.8\mu M$ 이하에서는 acetylcarnitine의 합성이 이루어지지 않는다는 결과를 보였으며, $0.9\mu M$ 이상에서는 acetylcarnitine 합성이 기질의 농도 증가에 따라 증가하여 V_{max} 에 이르는 결과를 얻었다. 이에 대하여 CAT가 propionyl-CoA를 기질로 하여 propionylcarnitine을 합성하는 반응인 Fig. 6에서 보면 기질의 농도가 $0.7\mu M$ 이하에서도 propionylcarnitine 합성이 이루

어지며 기질의 농도증가에 따라 합성량이 증가하는 결과를 보여서 낮은 농도에서 acetyl-CoA를 기질로 하는 반응과 대조를 이루었다. 이러한 결과는 Mittel과 Kurup (1980)이 보고한 바와 같이 CAT이 dimer라면, 촉매적으로 기질이 낮은 농도에서 보다 높은 농도에서 활성화 되는 것이 dimer로 되어 기질의 농도 증가와 효소의 구조적인 변화에 따른 활성변화일 가능성이 있다는 방향의 연구가 이루어질 필요가 있지만, 아직까지 CAT가 dimer라는 증거는 더 보고되지 않았다. 따라서 acetyl-CoA를 기질로 하였을 경우에 Michaelis-Menten식에 맞지 않는 이유를 Spectrophotometric assay로는 설명할 수가 없었다.

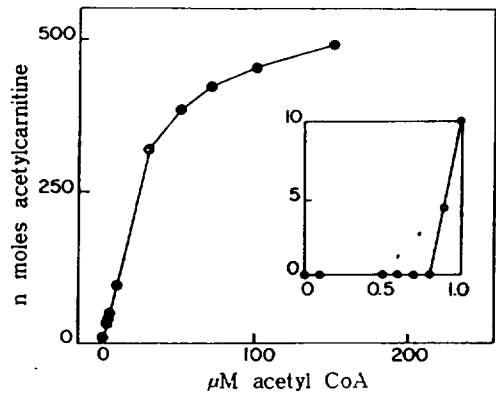


Fig. 5. Effect of acetyl-CoA concentrations on CAT activity. Rat heart mitochondrial CAT was spectrally assayed in the presence of increasing acetyl-CoA concentrations.

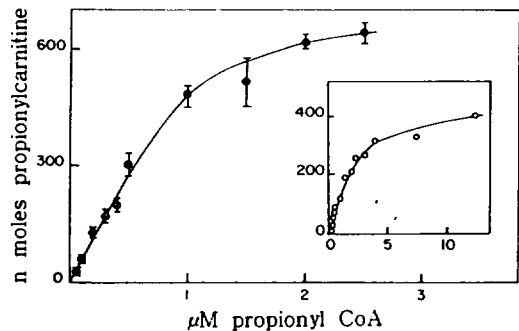


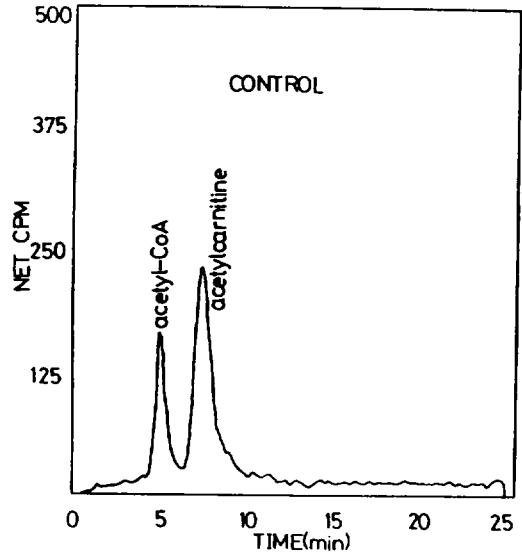
Fig. 6. Effect of propionyl-CoA concentrations on CAT activity. Assays were the same as in Figure 5, except propionyl-CoA was the substrate.

3. CAT의 ^{14}C -acetylcarnitine과 ^{14}C -propionylcarnitine 합성 반응에서의 DTP의 영향

Fig. 7 A, B와 Fig. 8 A, B는 HPLC에 의한 ^{14}C -acetylcarnitine과 ^{14}C -propionylcarnitine의 합성반응에 대한 profile이다. DTP가 없는 대조구와 처리구 사이의 acylcarnitine 합성량이 크게 차이가 있는 결과를 보여주었다. 그리고 Fig. 9와 Fig. 10은 $0.5\mu\text{M}$ 이하의 acetyl-CoA, ^{14}C -acetyl-CoA와 propionyl-CoA, ^{14}C -propionyl-CoA를 기질로 하여 DTP가 있는 조건과 없는 조건에 CAT와 반응시키고 ^{14}C -acetylcarnitine과 ^{14}C -propionylcarnitine이 생성되는 결과를 나타내었다. CAT는 DTP를 처리 않은 대조구의 acetyl-CoA를 기질로 하는 경우에 $0.1\mu\text{M}$ 에서는 $0.0073\text{nmole}/\text{min}$, $0.3\mu\text{M}$ 에서는 $0.0154\text{nmole}/\text{min}$, $0.5\mu\text{M}$ 에서는 $0.0273\text{nmole}/\text{min}$ 의 acetylcarnitine을 합성하였으나 propionyl CoA에 대한 반응에서는 $0.1\mu\text{M}$ 에서 $0.0334\text{nmole}/\text{min}$, $0.3\mu\text{M}$ 에서는 $0.0449\text{nmole}/\text{min}$ 의 propionyl CoA를 합성하였다. 이러한 결과는 Chung 등(1991)이 보고한 CAT의 spectrophotometric assay에서 얻은 결과에서 acetyl-CoA를 기질로 하였을때 보다 propionyl-CoA에 대한 K_m 값이 낮은 결과 및 본 실험에서의 CAT의 spectrophotometric assay 결과와 일치하였다. 그리고 DTP를 반응액에 더한 경우에 있어서 acylcarnitine의 합성을 보면 Acetyl-CoA와 CAT의 반응의 경우에 $0.1\mu\text{M}$ 에서는 $0.0023\text{nmole}/\text{min}$, $0.3\mu\text{M}$ 에서는 $0.0040\text{nmole}/\text{min}$, $0.5\mu\text{M}$ 에서는 $0.0055\text{nmole}/\text{min}$ 의 acetylcarnitine의 합성을 나타내어 각 DTP를 처리하지 않는 경우에 비하여 30.82%, 25.97% 및 20.31%의 합성만을 보여서 DTP에 의한 acetylcarnitine의 합성억제효과를 보였다. 이에 대하여 propionyl-CoA를 기질로 하는 반응에 DTP를 처리한 실험구에 있어서는 $0.1\mu\text{M}$ 에서는 $0.0108\text{nmole}/\text{min}$, $0.3\mu\text{M}$ 에서는 $0.0277\text{nmole}/\text{min}$ 의 propionylcarnitine이 합성되어 각각 DTP를 처리않는 대조구에 비해 32.25%와 61.65%의 합성만이 이루어졌다.

이와 같은 결과로 볼때 CAT의 spectrophotometric assay에 있어서 $0.8\mu\text{M}$ 이하의 acetyl-CoA 농

(Fig. 7. A)



(Fig. 7. B)

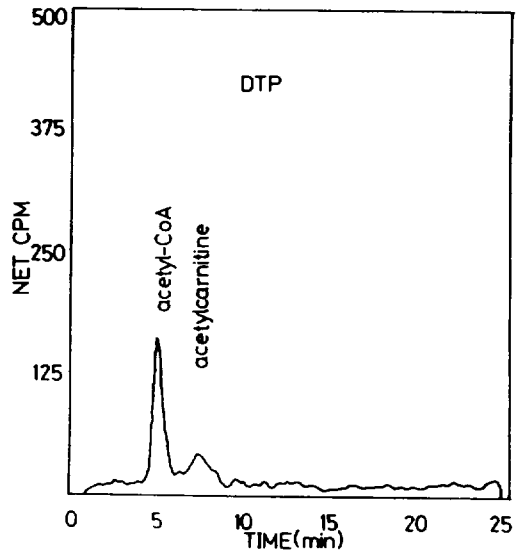


Fig. 7. A, B. HPLC profiles of effluxed ^{14}C -acetylcarnitine produced from ^{14}C -acetyl-CoA, cold acetyl-CoA and carnitine by rat heart mitochondrial carnitine acetyltransferase treated without (A) or with (B) DTP at $0.1\mu\text{M}$ acetyl-CoA. The procedure was carried out as described under "Materials and Methods".

도의 경우에 acetylcarnitine의 합성반응이 일어나

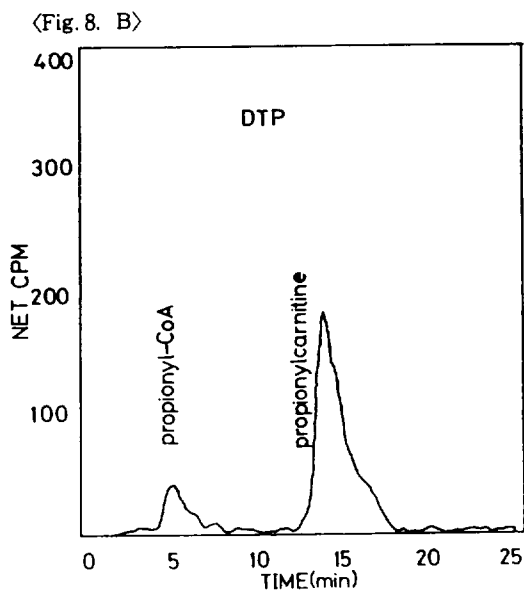
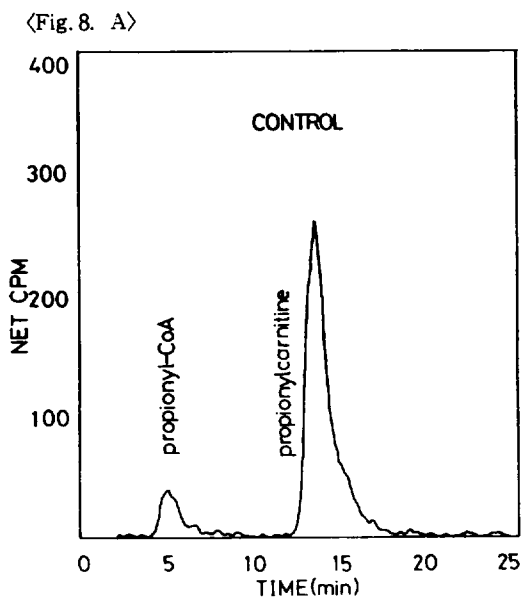


Fig. 8. A, B. HPLC profiles of effluxed ^{14}C -propionylcarnitine produced from ^{14}C -propionyl-CoA, cold propionyl-CoA and carnitine by rat heart mitochondrial carnitine acetyltransferase treated without (A) or with (B) DTP at $0.1\ \mu\text{M}$ propionyl-CoA. The procedure was carried out as described under "Materials and Methods".

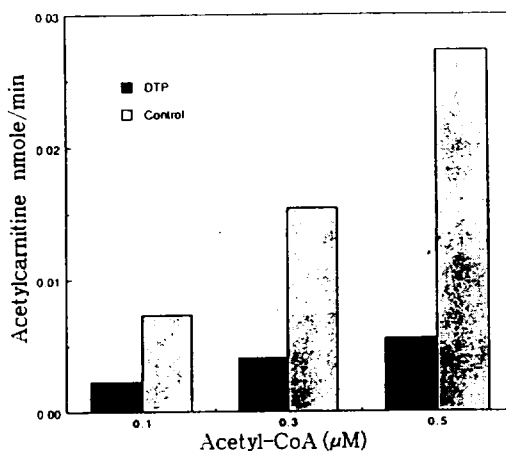


Fig. 9. Effect of DTP on Acetylcarnitine Production by CAT. 5.4 units of rat heart mitochondrial CAT were assayed at 18°C in $93\ \mu\text{l}$ containing ^{14}C -acetyl-CoA, $1.3\ \text{mM}$ DTP, $28\ \text{mM}$ NEM, $1\ \text{mM}$ carnitine and $100\ \text{mM}$ MOPS at pH 7.5. The samples were incubated for 30 sec and stopped by the addition of $100\ \mu\text{l}$, 6% perchloric acid. After neutralization, the acetylcarnitine was quantitated by HPLC. The profile is representative of 6 different experiments.

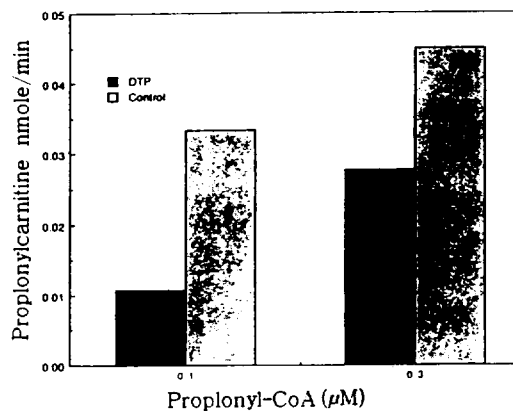


Fig. 10. Effect of DTP on Propionylcarnitine Production by CAT. 5.4 unit of rat heart mitochondrial CAT were assayed at 18°C in $93\ \mu\text{l}$ containing ^{14}C -propionyl-CoA, $1.3\ \text{mM}$ DTP, $28\ \text{mM}$ NEM, $1\ \text{mM}$ carnitine and $100\ \text{mM}$ MOPS at pH 7.5. The samples were incubated for 15 sec and stopped by the addition of $100\ \mu\text{l}$, 6

% perchloric acid. After neutralization, the propionylcarnitine was quantitated by HPLC. The profile is representative of 6 different experiments.

지 않은 것으로 나타난 이유는 DTP와 반응할 CoASH의 생성이 너무 적었기 때문에 측정이 되지 못한 결과라고 사료되었으며, 대조구와 DTP 처리구를 비교한 결과를 보면 DTP가 CAT의 작용을 억제시키고 있음을 보여 주었으며 propionyl-CoA를 기질로 하는 경우보다 acetyl-CoA를 기질로 하는 경우에 억제효과가 더 크게 나타난 차이점은 밝혀지지 않았다.

적 요

쥐의 심장의 미토콘드리아에서 여러가지 세포소기관막에 존재하며 carnitine 대사에 관여하는 short-chain carnitine acyltransferase인 carnitine acetyltransferase (CAT)를 몇 단계의

chromatography 과정에 따라 분리 정제하여 분자량을 확인하고 spectrophotometric assay와 ^{14}C -acetyl-CoA와 ^{14}C -propionyl-CoA를 기질로 하여 실험한 결과 다음과 같은 결론을 하였다.

Spectrophotometric assay에서 acetyl-CoA를 기질로 하는 반응에서 $0.8\mu\text{M}$ 이하에서는 acetylcarnitine의 합성이 측정되지 않았으나 HPLC를 이용한 실험에서는 기질의 농도가 $0.1\mu\text{M}$ 에서도 대조구와 DTP처리구에서 모두 acetylcarnitine 합성이 되고 있음을 측정할 수 있었으며, 대조구에 비하여 DTP 처리구에서는 약 30%이하의 acetylcarnitine만이 합성되어 DTP가 CAT의 작용을 현저하게 저해하는 효과를 가진다는 것을 알게 되었으며, 따라서 이 효소는 Michaelis-Menten 식에 따르는 효소이며, 또한 propionyl-CoA를 기질로 하는 반응에서도 DTP에 의한 반응 억제가 일어나지만 억제효과는 acetyl-CoA를 기질로 하는 경우보다 크게 나타나지 않았기 때문에 spectrophotometric assay에서는 acetylcarnitine의 합성을 측정하지 못한 것으로 사료되었다.

참 고 문 헌

- Bieber, L. L., T. Abraham and Helmrath. 1972. A rapid spectrophotometric assay for carnitine palmitoyltransferase, *Analyt. Biochem.*, 50 : 509-518.
- Bieber, L.L. and J.Kerner. 1986. Short-chain acylcarnitines : Identification and quantitation, *Methods in Enzymology*, 123 : 264-276.
- 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.
- Farrell, S.O. and L.L.Bieber. 1983. Carnitine octanoyltransferase of mouse liver peroxisomes : Properties and effect of hypolipidemic drugs, *Arch. Biochem. Biophys.*, 222 : 123-132.
- 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, *Biochimica et Biophysica Acta.*, 916 : 482-492.
- Fritz, I.B. and S.K.Schultz. 1965. Carnitine acetyltransferase. II. Inhibition by carnitine analogues and by sulfhydryl reagents, *J. Biol. Chem.*, 240 : 2188-2192.
- Kerner, J. and L.L.Bieber. 1983. A radioisotopic-exchange method for quantitation of short-chain (acid-soluble) acylcarnitines, *Analyt. Biochem.*, 134 : 459-466.
- Kerner, J. and L.L.Bieber. 1990. Isolation of malonyl-CoA sensitive CPT- β -oxidation enzyme complex from heart mitochondria, *Biochemistry*, 29 : 4326-4334.

- Lilly, K., J. Kerner and L. L. Bieber. 1988 : International symposium on clinical, biochemical, and molecular aspect of fatty acid oxidation, Abstract 17.
- Lilly, K., Bugaisky, G. E., Umeda, P. K., and L. L. Bieber. 1990. The medium-chain carnitine acyltransferase activity associated with rat liver microsomes is malonyl-CoA sensitive, *Arch. Biochem. Biophys.*, 280 : 167-174.
- Lysiak, W., K. Lilly, F., DiLisa., P. P. Toth and L. L. Bieber. 1988. Quantitation of effect of L-carnitine on the levels of acid-soluble short-chain acyl-CoA and CoASH in rat heart and liver mitochondria, *J. Biol. Chem.*, 263 : 1151-1156.
- Markwell, M. A., Haas, S., Tolbert, N. E., and L. L. Bieber. 1981. Protein determinations in membranes and lipoprotein samples, in "Methods in Enzymology" (Lowenstein, J. M., Ed.), 72 : 296-303.
- Mittal, J., and Kurup, C. K. R. 1980. Purification of clofibrate-induced carnitine acetyltransferase from rat liver mitochondria, *Biochim. Biophys. Acta.*, 619 : 90-97.
- Taylor, D. C., N. Weber, L. R. Hogge and E. W. Underhill. 1990. A simple enzymatic method for the preparation of radiolabeled erucoyl-CoA and other long-chain fatty acyl-CoAs and their characterization by mass spectrometry, *Analyt. Biochem.*, 184 : 311-316.