

광순환 에너지를 갖는 Halobacterium Halobium에서 마취제의 혼합에 따른 Membrane의 부피 변화

김 기준 · 성기천 · 이 후 설

*대진대학교 공과대학 화학공학과

Volume Change of Membrane Mixed with Various Anesthetics in Halobacterium Halobium with Photo-Cyclic Energy

Kim, Ki-Jun · Sung, Ki-Chun · Lee, Hoo-Seol

*Dept. of Chemical Engineering, Dae-Jin University

(Received Oct., 15, 1996)

ABSTRACT

The excess volumes of mixing of benzyl alcohol, ethyl alcohol, halothane, and procaine in vesicle and suspensions of several lipids have been determined at 25°C using a excess volume dilatometer. The potency of general anesthetics has long been known to be correlated with lipid solubility. Denaturations of the bacteriorhodopsin, which is a sole membrane protein in the purple membrane of Halobacterium Halobium, were studied by UV/Vis absorption changes.

The excess volumes of mixing of benzyl alcohol and procaine in egg lecithin were all found to be negative and this result was confirmed as Miller's supposition.

I. 서 론

생체막은 거의 모든 세포의 작용, 구조 현상학에서 중요한 역할을 하지만 막에 대한 분자구조, 아미노산 서열 결정법 및 생체 분자의 대사 등의 분자적 차원의 연구는 초보적인 단계이다.

최근에 살아있는 세포내에서 마취제의 작용에 대한 관심이 높아지고 있다. 생물학적 거대 분자가 생리적으로 수용액에서 활성적이고 지질-마취제 상호작용에 대한 지식은 살아있는 세포내에서 마취제 작용에 대한 부피변화를 이해하는데 필요하다.^{1~5)} 지질은 중성지

질, 납, 인지질 및 스테롤 등을 포함하고 있으며 생체 안에서 영양분의 저장물질 또는 세포의 구성 성분으로 알려져 있다. 특히 인지질은 생체막의 주요 성분으로 막의 용질 투과성에 있어서 중요한 역할을 한다. 또한 지질은 수용액에서 Zwitterions으로 존재하고, 부피 변화는 전해질의 경우와 같이 지질과 마취제가 구조적 상호작용을 하여 나타난다.^{6,7)}

마취제가 지질막에서 작용하는 부분의 생리적 작용과 특성은 잘 알려져 있지 않지만, Miller 등이 Dipalmitoyl phosphatidyl choline 등의 지질에서 정량적으로 부피변화를 식 1에 의하여 계산할 수 있다고 제안하였다.¹⁾ 마취제가 작용하는 부분의 순수한 분을 팽창 E는

$$E = \frac{V_2 \cdot X_2 \cdot P_2}{V_m} - \beta(P_t - 1) \quad (1)$$

으로 주어진다. 여기서

V_2 : 마취제가 작용하는 부분에서 마취제의 분몰 부피

X_2 : 1기압하에서 몰 분율 용해도($X_2 \ll 1$)

P_2 : 마취제가 작용하는 부분의 부분압력

V_m : 몰 부피

β : 등온 압축율

P_t : 전체 압력

본 연구에서 사용한 Halobacterium Halobium⁸⁾은 고농도의 염 용액에서 자라는 진핵 세포로서 미생물로부터 배양한 후 purple membrane⁹⁾(PM)을 분리하였다. Purple membrane에 빛을 쬐여주면 광순환 회로를 돌게 된다. 광순환 과정 중에 proton을 pumping하며 용액의 pH를 변화시킨다. 이 때 pH의 증감의 방향과 크기는 pH를 재구성시키고자 하는 지질의 종류와 완충용액 자체가 가지고 있는 pH에 의해 결정된다. 인지질과 함께 만든 PM-vesicle의 경우에는 연속적으로 빛을 쬐여주면 proton의 이동방향은 vesicle의 내부에서 외부로 이동한다.²¹⁾ PM의 마취제에 대한 부피 변화는 자체 제작한 excess volume dilatometer로 측정하였다. 따라서 vesicle, bacteriorhodopsin¹⁰⁾과 지질로 재구성된 vesicle, 콜레스테롤 및 bacteriorhodopsin이 함께 재구성된 vesicle에서 마취제에 대한 부피 변화를 측정함으로써 Miller 등이 제시한 가정을 규명하고, 각 성분물질의 소수성 부분과 친수성 부분의 차이에 의해 유발되는 부피변화의 영향을 조사하였다.

II. 기기 및 실험방법

자외선 및 가시광선 분광 광도계는 Varian회사 제품의 Model Cary-17D를 사용하였으며, 20kHz 초음파기는 국내에 의뢰 제작하였고, ultracentrifuger는 Beckman사 제품을 사용하였다. Beckman 온도계와 스위치가 부착된 항온조는 VWR Scientific사의 제품을 사용하였다. 또한 미세한 온도까지 측정할 수 있는 온도계는 자체 제작(모세관 길이 1.0m, 직경 0.05 mm, 톨루엔 저장길이 15cm와 외경 4.5cm, 동선지름

0.5mm와 동선길이 1m)하였다. 온도 조절 장치는 0.5mL에서 오차 ± 0.05 mL이내의 $\pm 0.001^\circ\text{C}$ 까지 조절할 수 있는 장치를 톨루엔, 수은, 백금으로 구성하여 정밀하게 제작하였다.

마취제인 halothane, procaine은 Aldrich사에서 구입하였고, D- α -dipalmitoyl-phosphatidyl choline(DPPC), cholesterol과 tris-base 등은 Sigma chemical사에서 구입했고, pepton(Bacteriological Technical Bactor Agar)은 Difco Lab.에서 구입하였다. L- α -Lecithin은 동경화학 주식회사 제품을 사용하였다. 실험에 사용한 dilatometer는 Duncan과 Sheridan⁶⁾의 dilatometer를 이용하였다. Vesicle이 형성된 직접적인 확인은 300nm의 파장에서 turbidity의 감소로써 알 수 있는데 Fig. 1에 나타내었다. 콜레스테롤 등의 분말을 정확한 양의 인지질과 함께 섞어서 초음파 처리하였으며, 물에 녹는 프로카인 분말과 에탄올, 벤질알콜은 일정한 농도로 맞추어서 vesicle에 섞었다.

Bacteriorhodopsin(BR)이 첨가된 vesicle은 완충용액과 일정한 양의 BR을 함께 작은 유리병에 첨가한 후에 초음파 처리한 다음 부피 변화를 측정하였다. 배지의 조성은 Table 1과 같으며, 고온 고압하에서 배지 1L당 150mL의 접종액으로 접종하였다. 온도는 39°C 로 유지하였으며, 150rpm으로 회전시켜 가면서 100w 텅스텐 전구 4개로 빛을 쬐여 주면서 5일 동안 키운 후에 원심분리하였다.^{9, 13)}

완숙한 박테리아는 15분간 원심분리한 후 침전물을 기본 염용액에 풀어 넣고 D-Nase을 미소량 넣어 0.1M NaCl 3L속에서 24시간 투석시켰다. 최종 침전물은 5mL의 탈이온 증류수에 풀고, 원심분리병 바닥에 60% 설탕용액 1mL를 넣은 후 그 위에 50%에서 30%까지 농도 범위에서 rhodopsine을 원심분리한다. 따라서 DNA가 방출된 빨간 자주빛 침전물을 그 위에 붓고 15°C 에서 원심분리하면 purple membrane (PM)은 평형에 도달하게 된다. 중앙에 커다란 자주빛 띠와 바로 위에 얇은 빨강띠가 생기는데 이것은 red membrane의 밀도가 1.10g/cm^3 이고 PM의 밀도가 1.18g/cm^3 으로 분별 원심분리법에 의하여 제작되지 않았던 red membrane이 PM으로부터 분리되는 과정은 Fig. 2와 같다. 500mg의 인지질을 pH 7.5, 0.01M 인산 완충용액 혹은 트리스 완충용액 10mL에

넣고 vortexing한 후에 초음파 처리를 3분 간격으로 4 간 중에 용액에 질소를 불어 넣어준다.^{11, 12, 14)}
 번 반복한다. 온도는 0°C를 유지하고 초음파 처리 기

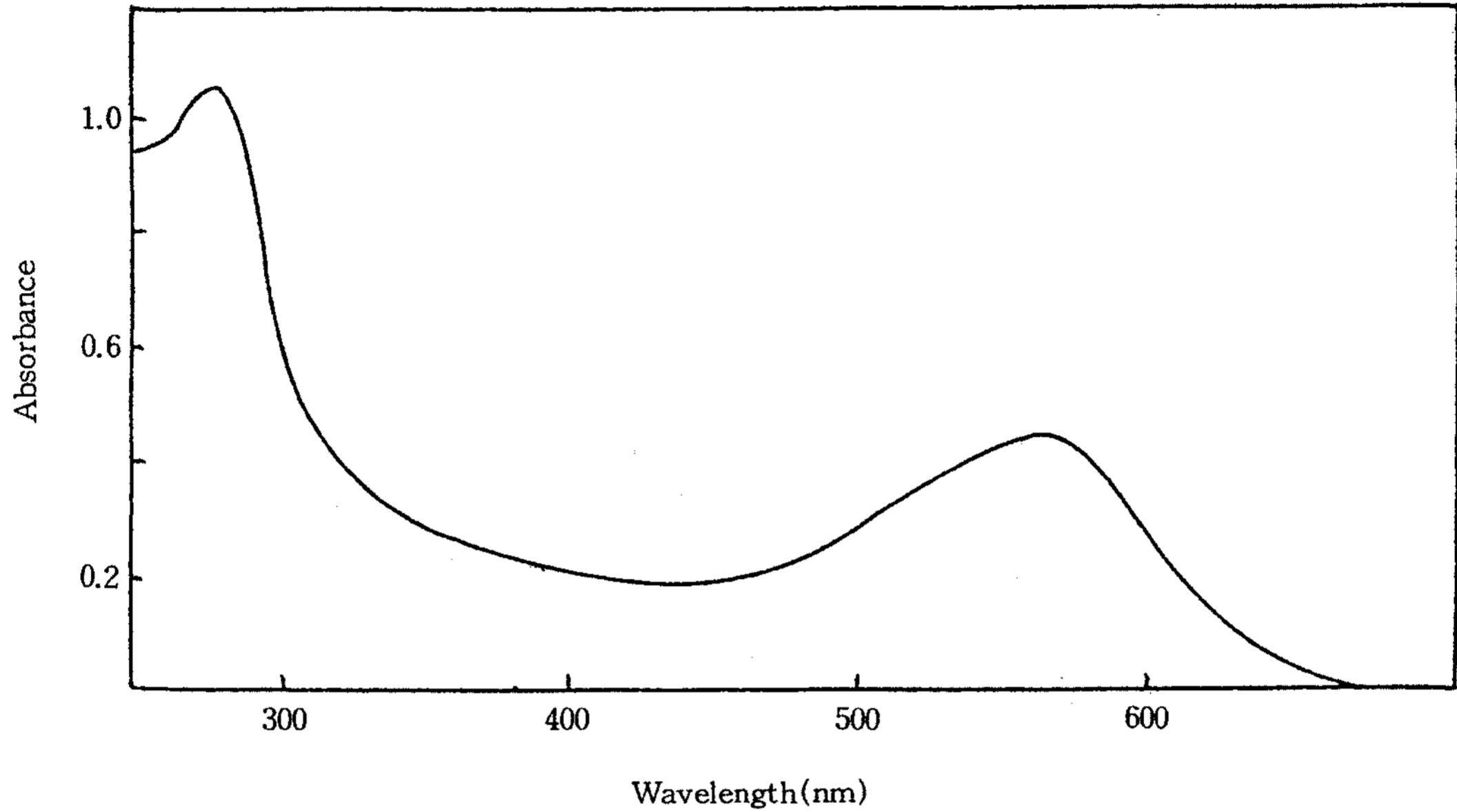


Fig. 1. The UV/Vis absorption spectrum of PM in distilled water at room temperature.

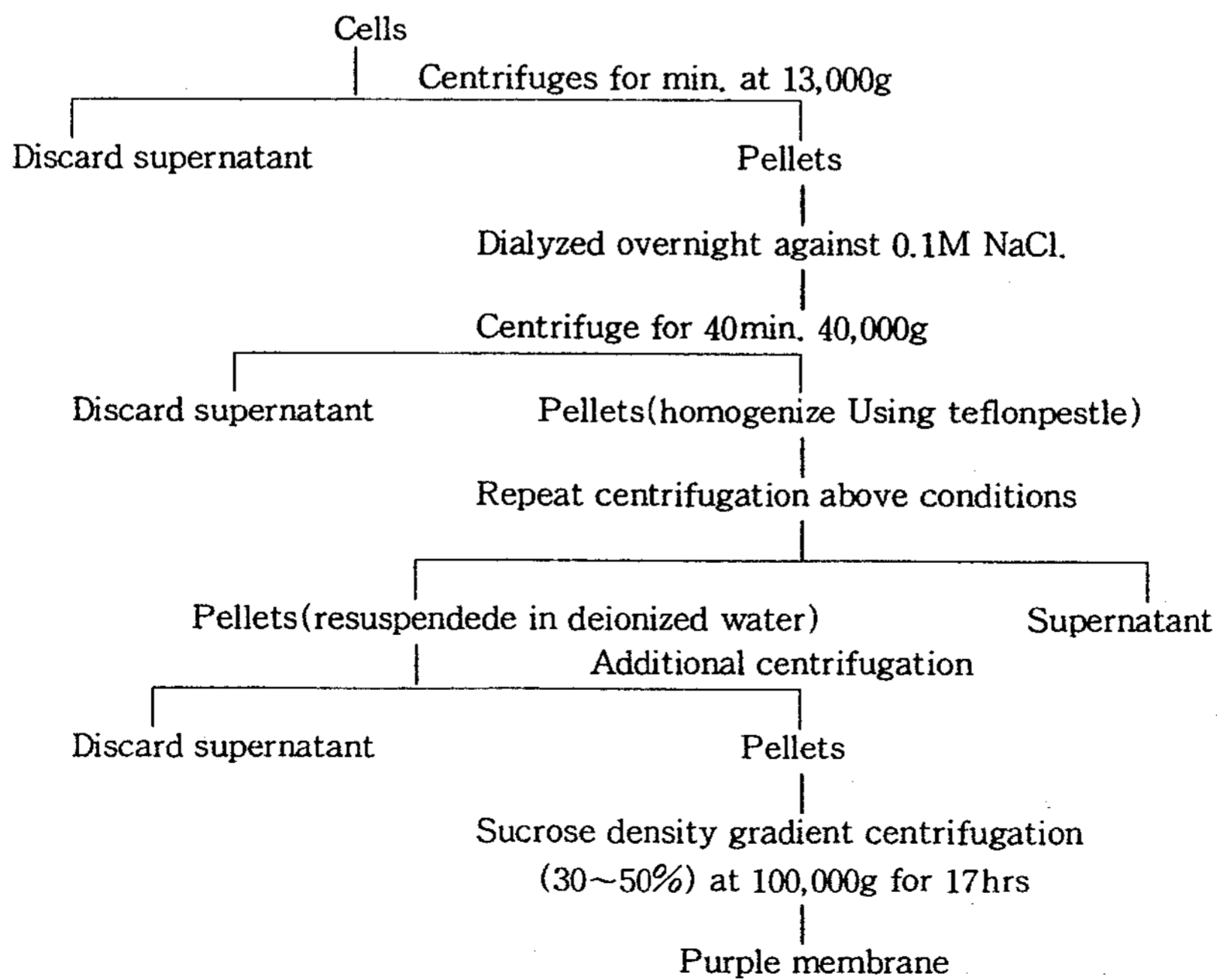


Fig. 2. Flow sheet for isolation of the purple membrane.

Table 1. Composition of medium per 1000mL for shaker culture

NaCl	250.0g
MgSO ₄ 7H ₂ O	20.0g
Trisodium Citrate 2H ₂ O	3.0g
KCl	2.0g
Bactor-peptone	10.0g

III. 계산방법

A의 분 몰 부피는 다음과 같이 정의하고

$$\bar{V}_A = \left(\frac{\partial V}{\partial n_A} \right)_{T,P,n_i} \quad (2)$$

마취제를 포함하는 지질 수용액의 부피 V 는

$$V = n_1\bar{V}_1 + n_2\bar{V}_2 + n_3\bar{V}_3 + n_4\bar{V}_4 \quad (4)$$

여기에서 n_i 는 몰수($i=1$; 물, 2 ; 지질, 3 ; 물에서 마취제, 4 ; 지질에서 마취제)이고, 또한 마취제를 섞었을 때 변화된 전체부피는 V' 는

$$\begin{aligned} V' - V = \Delta V &= (n'_3 - n_3)\bar{V}_3 + (n'_4 - n_4)\bar{V}_4 \\ &= \Delta n_3\bar{V}_3 + \Delta n_4\bar{V}_4 \end{aligned} \quad (4)$$

부피 변화 \bar{V}^E 는

$$\begin{aligned} \bar{V}^E &= \Delta n_3\bar{V}_3 + \Delta n_4\bar{V}_4 \\ &= -n'_4\bar{V}_3 + n'_4\bar{V}_4 \quad (\because n_3 = n'_3 + n'_4) \\ &= -n'_4(-\bar{V}_3 + \bar{V}_4) \end{aligned} \quad (5)$$

물에 대한 지질의 분배계수 λ_3 는 다음과 같다.

$$\lambda_3 = \frac{n'_4}{n_3} \cdot \frac{\bar{V}_3}{\bar{V}_4} \quad (6)$$

또한 $\frac{n'_4}{n'_3}$ 는 아래와 같이 주어지며

$$\frac{n'_4}{n'_3} = \lambda_3 \cdot \frac{\bar{V}_4}{\bar{V}_3} = \frac{1}{A} \quad (\because n'_3 = An'_4) \quad (7)$$

n_3 는 A항으로 표현할 수 있고

$$n_3 = n'_4A + n'_4 \quad (8)$$

$$n'_4 = \frac{n_3}{A+1} \quad (9)$$

식(8)을 식(5)에 대입하여

$$\bar{V}^E = \frac{n_3}{A+1} (-\bar{V}_3 + \bar{V}_4) \quad (10)$$

로 나타내고, \bar{V}^E 와 n_3 의 그래프의 기울기로 부터

$$\bar{V}_4 = \frac{\bar{V}^E(A+1)}{n_3} + \bar{V}_3 \quad (11)$$

를 구할 수 있다.

IV. 결과 및 논의

Bacteriorhodopsin(BR)이 인지질에 의해서 재구성된 여러 크기의 vesicle을 Sepharose 4B column을 통과시켜, 평균 크기가 250Å 정도의 작은 unilamella 구조에 가까운 bilayer lipid vesicle에 벤질알콜을 혼합한 시료의 자외선 및 가시광선 흡수 스펙트럼은 Fig. 3과 같다. 한편 Fig. 3과 자외선 및 가시광선에서 얻은 PM의 흡수 스펙트럼 Fig. 1에 의해서 그 농도가 7.4×10^{-5} M임을 알았다. 25°C에서 측정된 각 용매들에서 벤질 알콜의 농도에 따른 부피 변화는 Table 2와 같다. PM에서 5×10^{-5} mol 벤질 알콜의 잉여부피는 3회 반복 측정된 평균값은 1.05mL/mol이었으며, 벤질 알콜의 몰부피는 103.83mL/mol이다. 이 값은 Miller 등이 측정하여 얻은 값들과 비교할 때 거의 유사하였다.¹²⁾

국부 마취제로 작용하는 벤질 알콜은 지질의 머리부분 근처에서 작용하는 것으로 알려져 있는데, 할로테인과 콜레스테롤의 소수성 부분은 지질의 소수성 영역으로 침투하고, 친수성 부분은 지질의 머리 부분인 아실기에 수소 결합을 한다.³⁾ Fig. 3에서 벤질 알콜을 지질에 첨가함에 따라 240nm의 peak가 약간 장파장 쪽으로 이동하는 것을 관찰할 수 있는데, 이는 지질에 마취제가 첨가됨에 따라 벤질 알콜의 $\pi \rightarrow \pi^*$ 전자 전이가 비극성 용매 효과에 의해 에너지 준위차가 감소하여 발생하는 현상이다.^{16), 17)} 25°C에서 측정된 각 용매들에서 각 마취제의 농도에 따른 부피 변화에서 휘발성이 큰 할로테인은 전체적으로 부피변화 폭이 커짐을 알 수 있다. Table 3와 Fig. 4에서 할로테인은 전신 마취제로 비극성 물질이므로 아실기를 가진 머리 부분에서 반발력이 작용하고, 소수성 영역으로 투과가 잘 되어 부피 변화가 커진다고 생각된다.

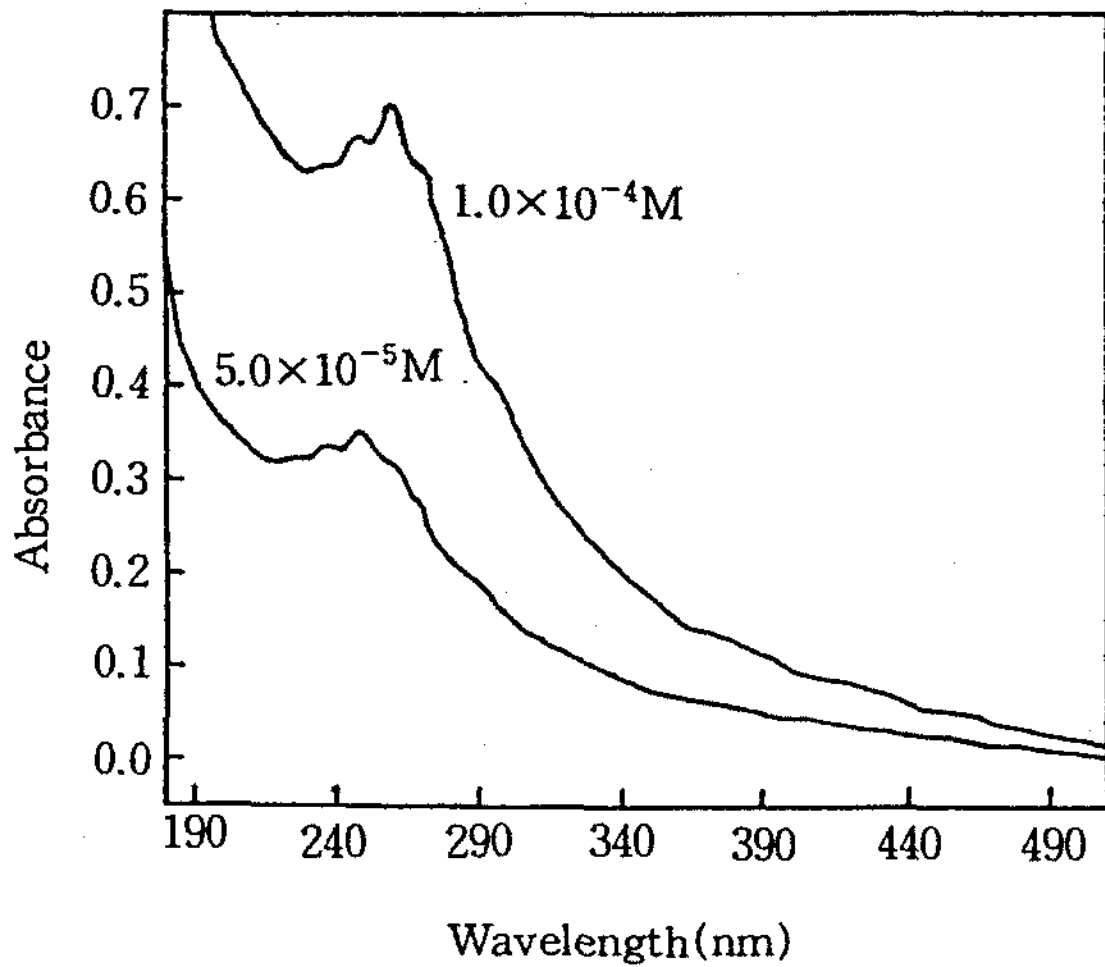


Fig. 3. The UV/Vis spectra of the benzyl alcohol in lipid vesicle.

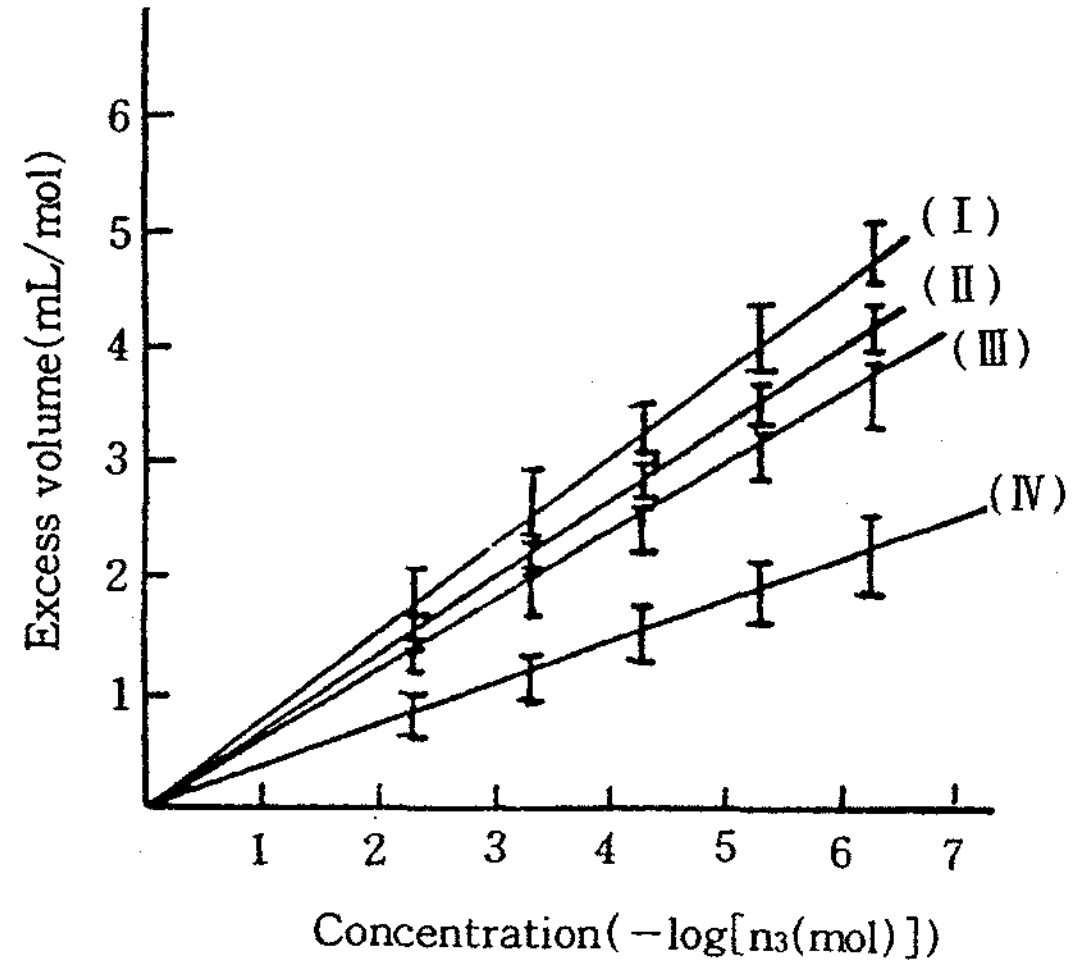


Fig. 4. Excess volume of halothane with various vesicular system.
 ; I, PM(1.02mM) ; II, DPPC/cholesterol(2:1)
 ; III, DPPC/BR(200:1) ; IV, DPPC(1.02 /cholesterol(0.0486mM)+BR(0.0102mM)

Table 2. Comparison of volume change for benzyl alcohol in lipids at 25°C

PM		DPPC + Cholesterol		DPPC + BR		DPPC + Cholesterol+BR		Egg lecithin	
$\bar{V}^E \times 10^3$ (mL/mol)	n_3 (mol)	$\bar{V} \times 10^3$ (mL/mol)	n^3 (mol)	$\bar{V}^E \times 10^3$ (mL/mol)	n^3 (mol)	$\bar{V}^E \times 10^3$ (mL/mol)	n^3 (mol)	$\bar{V}^E \times 10^3$ (mL/mol)	n_3 (mol)
9.70×10^{-2}	5×10^{-6}	1.10×10^{-1}	5×10^{-6}	1.00×10^{-1}	5×10^{-7}	3.24	5×10^{-7}	-2.00×10^{-2}	5×10^{-7}
1.05	5×10^{-5}	1.09	5×10^{-5}	1.06	5×10^{-6}	5.40	5×10^{-6}	-7.00×10^{-2}	5×10^{-6}
1.05×10	5×10^{-4}	1.08×10	5×10^{-4}	1.08×10	5×10^{-5}	7.90	5×10^{-5}	-2.80×10^{-1}	5×10^{-5}
				1.50×10	2.25×10^{-4}			-2.30	5×10^{-4}

Table 3. The ratios of volume change for anesthetics in lipid.

Anesthetics Solvents	$\frac{1}{1+A} (-\bar{V}_3^E + \bar{V}_4^E, \langle \rangle V = \frac{(-\bar{V}_3^E + \bar{V}_4^E)_i}{(-\bar{V}_3^E + \bar{V}_4^E)_{DPPC}} \quad i = \text{solvent}$				
	Benzyl alcohol	Ethyl alcohol	Chloroform	Halothane	Procaine
PM	$4.08 \times 10^{-2} \langle 1 \rangle$	$8.44 \times 10^{-3} \langle 1 \rangle$	$5.88 \times 10^{-3} \langle 1 \rangle$	4.20×10^{-2}	$7.80 \langle 1 \rangle$
DPPC + cholesterol	$4.60 \times 10^{-2} \langle 0.96 \rangle$	$8.29 \times 10^{-3} \langle 0.98 \rangle$	$5.50 \times 10^{-3} \langle 0.94 \rangle$	$3.20 \times 10^{-2} \langle 0.76 \rangle$	$10.5 \langle 1.35 \rangle$
DPPC + BR	$1.08 \times 10^{-2} \langle 0.23 \rangle$	—	$5.11 \times 10^{-3} \langle 0.87 \rangle$	$5.04 \times 10 \langle 1.2 \rangle$	—
DPPC + Cholesterol + BR	$1.26 \times 10^{-2} \langle 0.26 \rangle$	—	$5.60 \times 10^{-3} \langle 0.95 \rangle$	$4.02 \times 10 \langle 0.96 \rangle$	—

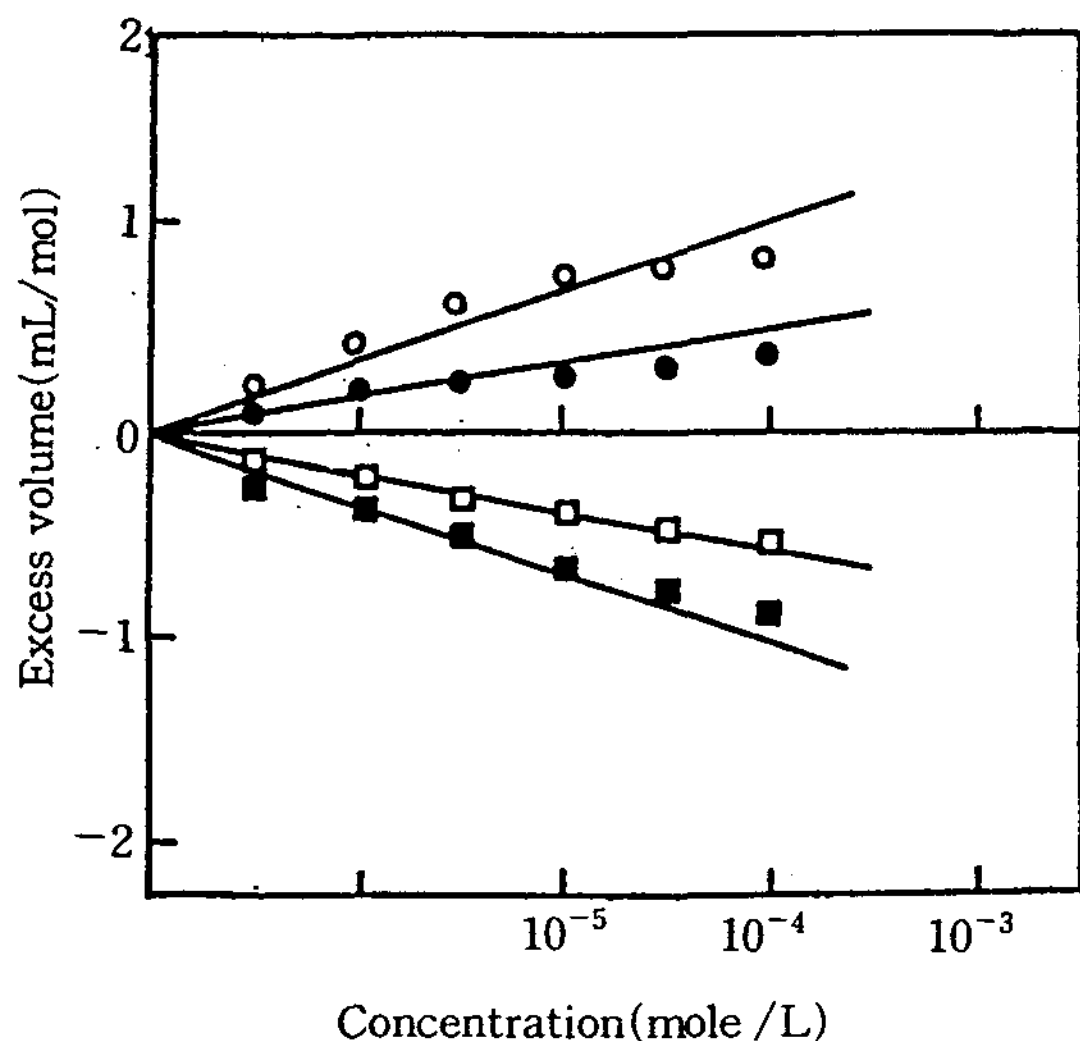


Fig. 5. Excess volume of procaine with various vesicular system.

■ : water ; □, egg lecithin ; ●, DPPC ; ○, DPPC/cholesterol(2 : 1)

극성 마취제로 작용하는 프로카인은 분자량과 크기가 크며, 지질에 콜레스테롤이 첨가되어 재구성된 vesicle에서 적은 양의 부피 증가 현상을 나타내었으며, 물에서는 음의 부피 팽창을 보임을 Fig. 5에서 알 수 있다. 또한 Fendler는 벤질알콜의 영향은 막 두께의 변화를 주지 않지만 콜레스테롤의 첨가는 막 두께를 약간 증가시키는 효과가 있음을 발표하였다.²⁰⁾ Egg lecithin의 경우에 각 마취제에 대하여 모두 음의 잉여부피를 나타내었다. 이 효과는 용액 부피가 용매와 용질 부피의 합보다 적기 때문에 생기는 electrostriction현상이며,¹⁸⁾ 이는 전기장하에서 마취제 자체를 극성인 물 분자가 둘러싸는 현상을 의미한다. 또한 egg lecithin은 여러 종류의 지질을 포함하는 혼합물로서, 2중, 3중 결합의 지질들은 cis-trans 형태로 꼬여 있어 packing이 잘 안되며, 소수성이 작아 부피 변화가 감소한 결과라고 생각한다. Seeman¹⁵⁾은 ESR을 이용하여 극성물질과 비극성 물질의 원형질 막에 대한 투과를 조사하였는데, 극성인 물질은 결합을 형성하는 한쪽 음이온에 편재하고 있어서 분자는 쌍극자로 작용하며 머리 부분에 배열한다.¹⁹⁾ 이는 lecithin에 대한 부피 변화를 조사한 결과 음의 값임을 밝혀 냄으로써 본 실험과도 잘 일치하고 있으며, 휘발성제에 의한 마

취작용은 지질의 소수성 영역에 따른 부피 팽창과 상호관련이 있음을 확인한 것이다.

V. 결 론

1. 극성 마취제인 벤질 알콜과 에틸 알콜의 경우, 콜레스테롤이 재구성된 vesicle에 영향은 거의 없었다.
2. Halothane, chloroform, procaine에서 vesicle이 재구성된 용매의 농도가 증가함에 따라 부피 변화가 증가하였다.
3. 지질에 콜레스테롤과 bacteriorhodopsin이 첨가되어 재구성된 vesicle에서 halothane의 영향은 작았다.
4. 순수한 지질에서 보다 콜레스테롤이 첨가된 지질에서 분자량이 큰 프로카인에 의해 잉여부피가 약간 증가하였다.
4. Egg lecithin은 모두 마취제에 의한 음의 잉여부피를 나타내었다.

문 헌

1. Miller, K. W., Hammond, L. and Porter, E. G. (1977) : Chem. Phys. Lipids 20, 229~241.
2. Simon, S. A., McIntosh, T. J., Bennett, P. B. and Shrivastav, B. B. (1979) : Mol. Pharmacol. 16, 163~170.
3. Colley, C. M. and Metcalfe, J. C. (1972) : FEBS Lett. 24, 241~246.
4. Smith, R. A., Porter, E. G. and Miller, K. W. (1981) : Biochim. Biophys. Acta 645, 327~338.
5. Franks, N. P. and Leib, W. R. (1967) : Nature 274, 339.
6. Battino, R. (1971) : Chem. Rev. 71, 5~45.
7. Pflug, H. D. and Benson, G. C. (1968) : Can. J. Chem. 46, 287~294.
8. Duncan, W. A., Sheridan, J. P. and Swinto, J. L. (1965) : Trans. Faraday Soc., 61, 421.
9. Steeckenius, W., Roean, R. (1967) : J. Cell Biol. 34, 337~357.

10. Mullins, L. J.(1964) : Chem. Rev. 54, 289~323.
11. Haydon, D. A., Hendry, B. M., Lerinson, S. R.(1977) : Biochim Biophys. Acta 470, 17~34.
12. Yoshiko Ki, Miller, K.W and Bennett, L.J. (1981) : Biochim Biophys. Acta 647, 130~139.
13. Donan, A. and stoeckenius, W. (1974) : Proc. Natl. Acad. Sci. 71(4), 1234~1238.
14. Miller, K. W., Paton, W. D. M., Smith, R. A. and Simith, E. B.(1973) : Mol. Pharmacol. 9, 131~143.
15. Seeman, P. (1972) : Pharmacol. Rev. 224, 583~655.
16. Miller, K. W. and Yu, s-c. T. (1977) : Br. J. Pharmaclo. 61, 57~63.
17. Friedman, M. E. and Sheraga, H. A. (1965) : J. Phys. Chem. 69, 3795~3800.
18. Koehler, L. S. Fossel, E. T. and Koehler, K. A.(1977) : Biochemistry 16, 3700~3705.
19. Bausserman, L. L. and Herber, P.N(1983) : J. Biol. Chem. 258(17), 10,681~10,688.
20. Fendler, J. H. (1982) : Membrane Mimetic Chem.
21. Fung, B. K. K and Stryer, L. (1980) : Proc. Natl. Acad. Sci. 77(5), 2500.