

## 쥐 뇌의 Steroid Acyl 전이효소에 대한 연구

조도현

아주대학교 생물공학과

## Study on Steroid Acyl Transferase in the Rat Brain

D. H. Jo

Department of Biotechnology, Ajou University

### ABSTRACT

The characteristics of steroid acyl transferase were studied in the rat brain with (4-<sup>14</sup>C)-dehydroepiandrosterone(DHEA). The results could be summarized as followings: The enzyme system responsible for the biosynthesis was localized at the microsome fraction. The optimum pH of this enzyme was 4.6 When DHEA was utilized as substrate,  $\Delta^5$ -pregnenolone was proved to be a competitive inhibitor. However testosterone was a noncompetitive inhibitor. The acylation at 3 $\beta$ -hydroxyl group was favored when the hydrophilicity at C17 position increased. However, this acylation at C3 was very low when A ring was aromatic. The acylation at C17 hydroxyl group required an absolute 17 $\beta$ -conformation.

### 서론

Steroid hormone의 지방산 유도체가 소의부신에서 1976년 Hochberg 등(1)에 의해 분리한 이래, Mellon-Nussbaum등 (2-4)과 Pearlman등(5)에 의하여 혈장 및 다른 동물의 조직에서도 분리됨이 보고되었다.

Kishimoto(6)가 쥐 뇌의 microsome에서 testosterone의 지방산 유도체에 대하여 보고하였으며, Robel등(7-8)은  $\Delta^5$ -pregnenolone( $\Delta^5$ P)이 쥐 뇌의 microsome에 의하여 Acyl 유도체로 됨을 보고하였으며, Jo등(11)은 쥐 뇌에서 dehydro epiandrosterone(DHEA)의 지방산 유도체를 정량하였다.

본 연구에서는 Steroid acyl 유도체를 생합성 하는 steroid acyl 전이효소의 뇌에서 subcellular fraction에서의 분포와 이 steroid acyl 전이효소의 효소적 특성 및 입체 특이성을 연구하였다.

### 재료 및 방법

실험동물로 10~11주령의 Sprague-Dawley의 숫컷 쥐를 사용하였으며, 방사선 동위원소로 표식된 것은 Amersham (영국)과 NEN(독일)사의 제품을 사용했으며, Steroid는 Steraloid(미국)에서 구입하였으며, 기타 시약 및 유기용매는 Sigma(미국)나 Merck(독일)의 GR급을 사용하였다.

### Subcellular Fraction의 제조

쥐의 머리를 절단한 후에 골을 얼음 위에서 채취하여 무게를 잰후에 0.8% NaCl을 포함하는 10mM pH=7.4의 인산 완충용액에서 Teflon-glass type의 Porter 균질기로 마쇄하였다.

이때 골과 완충액의 비는(1:2w/v)으로 조정하였다. 마쇄액을 4℃에서 600g로 5분간 원심분리하여 상등액을 다시 4℃ 12,000g에서 20분간 원심분리하였으며,

여기서 나온 상등액을 105,000 g 에서 60분 원심분리하여 nuclei(600 g 침전물), mitochondria(12,000 g 침전물), microsomes(105,000 g 침전물), cytosol(105,000 g 상등액)을 얻었다. 각 부분에 대하여 단백질은 Lowry등(9)의 방법으로 측정하였다.

### 반응 조건

표준 반응용액은 200ul의 초산완충액(0.25M pH=4.6)에 Tween 20 200μg, EDTA 5μmole, <sup>14</sup>C이나 <sup>3</sup>H로 표식된 Steroid 0.44nmole, 단백질 0.2mg에 해당되는 각 분획을 가하고 0.32M 설탕용액으로 최종 부피는 550 ul로 조정할 후에 37°C에서 1시간 반응시킨후 -20°C에 보관하였다.

### Steroid의 추출 및 분리

Ethyl Acetate를 2ml씩 3회 가하여 매번 10분간씩 진탕한 후 Steroid를 추출한 후, 감압건조시켜 Silica gel GF 245로 피복이 되어 있는 TLC판에 diisopropylether-isooctane (1:1 v/v)으로 일차 전개시킨 후 동일 방향으로 diisopropylether-diethylether(9:1 v/v)을 사용하여 2차 전개시켰다.

### 동정 및 정량

각 Steroid의 파르미트산 유도체를 사용하거나, 원 Steroid보다 Rf값이 높은 분획을 채취하여 동정하였으며 해당되는 부위를 절취하여 Picofluor 15(packard 사)를 5ml 가하여 Tri-Carb 4660(Packard)를 이용하여 dpm으로 정량하였다.

또한 Acyl 유도체를 만들시의 Steroid에 다른 반응이 일어나는지 여부를 조사하기 위하여 생성된 Steroid-acyl 유도체를 알칼리성 Alcohol로 가수분해하여 <sup>14</sup>C/<sup>3</sup>H의

비율을 조사 하였다.

이 반응이 ester의 생성반응이므로 생성된 ester가 가수분해되어 기질간의 평형상태가 존재하는 바를 확인하기 위하여 [4-<sup>14</sup>C]-DHEA-palmitate를 반응조건에서 반응시킨 후 조사 하였다.

## 결과 및 고찰

### 생합성된 Steroid-acyl 유도체의 동정

Tab. 1에서 보는 바와 같이 Steroid-acyl 유도체의 Rf 값은 모두가 기질인 Steroid보다 훨씬 높았다. 이러한 Rf값의 증가는 수산기가 에스테르 등으로 축성이 감소에 기인된 것이다. 또한 이들의 Rf값은 기질 Rf값의 순서와 같은 순서를 나타냄을 볼 수 있다.

또한 Steroid-acyl 유도체는 다른 반응이 일어나지 않았음을 <sup>14</sup>C/<sup>3</sup>H의 비율이 첫번째의 결정과 3차결정에서 동일하게 나타남으로써 확인을 할 수 있었다.

표품의 [4-<sup>14</sup>C]-DHEA-palmitate를 표준 반응 상태에서 동일처리한 후 추출하였을 때 팔미트산이 가수분해하여 생성되는 DHEA가 본 실험조건에서는 검출이 되지 않음으로써 본 실험조건하에서는 esterase의 활성도가 나타나지 않음을 알 수 있었다.

### Steroid Acyl 전이효소의 분포

Steroid Acyl 전이효소의 Subcellular fraction의 분포는 [4-<sup>14</sup>C]-DHEA를 기질로 하여 표준반응 조건에서 조사 하였다.

Tab. 2에서 보는 바와 같이 microsome에 가장 많이 존재함을 볼 수 있어 Kishimoto(6)의 Testosterone acyl 전이효소와 같은 분포를 나타내고 있음을 보여준다.

Table 1. Rf values of steroids and their acyl derivatives (AD).

Steroid	Rf	Steroid	Rf
Cholesterol	0.52	DHEA	0.22
Cholesterol AD	0.94	DHEA AD	0.86
Estrone	0.62	Δ <sup>5</sup> -androstenediol	0.18
Estrone AD	>0.95	Δ <sup>5</sup> -androstenediol AD	0.52
Estradiol	0.41	17α OH pregnenolone	0.13
Estradiol AD	>0.95	17α OH pregnenolone AD	0.70
Δ <sup>5</sup> -pregnenolone	0.28	Testosterone	0.10
Δ <sup>5</sup> -pregnenolone AD	>0.89	Testosterone AD	0.60
Dihydrotestosterone	0.25	17α-OH progesterone	0.10
Dihydrotestosterone AD	0.77	17α OH progesterone AD	0.60

Table 2. Subcellular distribution of rat brain steroid acyl transferase

Subcellular fraction	Enzyme activity (pmole / h-mg of protein)
Total homogenate	44
600 g ppt(nuclei+ cell debris)	35
12,000 g ppt(mitochondria)	48
105,000 g ppt(microsomes)	109

**Steroid Acyl 전이효소의 일반적 특성**

[4-<sup>14</sup>C]-DHEA에 대한 쥐 뇌의 microsome에서의 DHEA에 대한 acyl 전이효소의 반응속도를 Fig. 1에 나타냈고 Lineweaver-Burk식을 이용하여 KM, V<sub>max</sub>를 계산했다. 이때의 V<sub>max</sub>는 13.9n mole / mg 단백질 / h 이었

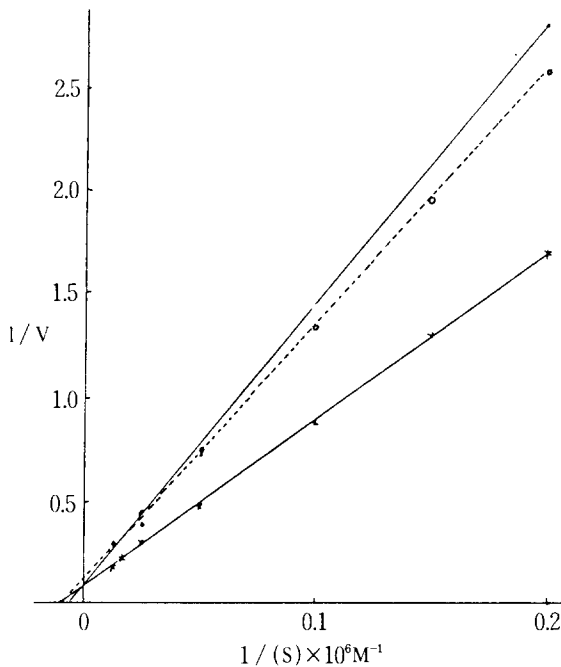


Fig. 1. Enzyme kinetics of dehydroepiandrosterone acyl transferase in absence and in presence of competitors.

-x- without competitor, -○- with Δ5-P 50μM, -○- with testosterone 50 μM.

으며 KM값은 100μM이었다.

또한 50μM의 Δ5-pregnenolone의 존재하에서 DHEA에 대한 효소의 V<sub>max</sub>는 14.5 n mole / mg 단백질 / h, KM값은 175μM로써 Δ5-pregnenolone은 V<sub>max</sub>가 동일하고 기올기가 증가함으로 경쟁적 저해제였고 50μM의 testosterone의 존재하에서 DHEA에 대한 효소의 V<sub>max</sub>는 8.4n mole / mg 단백질 / h, KM이 96μM로써 Testosterone은 기올기와 절편이 모두 증가하였으므로 비경쟁적 저해제로 나타났다(Fig. 1).

Δ5-pregnenolone의 Ki값은 7.0mM이었고 Testosterone의 Ki값은 8.4mM 이었다.

**입체 특이성**

Steroid-acyl 전이효소의 공간적 특이성을 조사하기 위하여 Steroid의 A고리 뿐만 아니라 측쇄의 구조를 변화시켜 조사하였다(Fig. 2).

Cholesterol과 Δ5-pregnenolone 및 DHEA를 비교하여 보면 Steroid의 A, B, C, D 고리는 모두 같으나 측쇄의 길이가 다르다.

즉 Cholesterol은 소수성인 지방족탄화수소로 C<sub>8</sub>의 측쇄를 갖고 Δ5-pregnenolone은 아세틸기를 갖고 있고, DHEA는 케톤기만을 갖고 있다.

Cholesterol은 1 pmole보다 적게 ester로 변화된 반면 Δ5-pregnenolone(Δ5p)는 24 pmole, DHEA는 120 pmole 이 변환이 되므로 Steroid-acyl 전이효소의 3β-수산기에 ester가 생성될 때 소수성인 측쇄가 입체장애를 준다고 볼 수 있다. 이는 17α-OH-Δ5p의 경우는 Δ5p 보다는 훨씬 높은 102 pmole이 형성되었다.

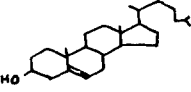
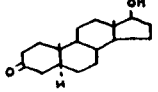
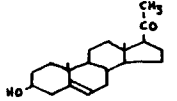
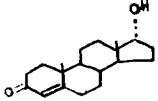
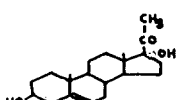
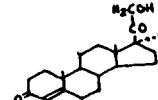
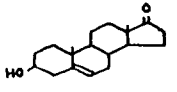
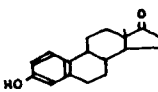
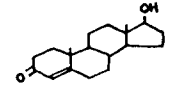
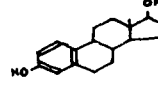
이 경우에 17α-수산기의 Acylation 가능성은 17α-OH-progesterone 에서는 Acyl 유도체가 거의 생성되지 않았으므로 배제된다. 따라서 17α의 수산기가 C<sub>17</sub>측쇄의 친수성을 증가시켜 Acylation이 증가됐음을 알 수 있다.

또한 3β수산기와 17β수산기를 비교하면 17β수산기가 훨씬 좋은 기질로써 작용됨을 알 수 있다(DHEA와 Testosterone 및 dihydro-testosterone (DHT) 120 pmoles, 188 pmole, 181 pmole).

그러나, Epitestosterone의 경우에는 17α 수산기으로써 전혀 Acylation이 일어나지 않고 17α-OH-progesterone의 경우도 Acylation이 일어나지 않으므로 Steroid Acyl 전이효소는 C<sub>17</sub>의 수산기으로써 17α-수산기가 아닌 17β-수산기만을 기질로 사용하고 있음을 보여준다.

DHT와 Testosterone을 비교하여 보면 Acylation에 차이가 없으므로 17β-수산기의 Acylation에서는 A고리가 C<sub>4</sub>에 이중결합이 있거나 A고리가 환원이 되거나 아무런 영향을 받지 않음을 알 수 있다.

Fig. 2. Formation rate of steroid acyl derivatives.(P mole/mg protein/h)

Substrate			Substrate		
Structure	Name	(P mole)	Structure	Name	(P mole)
	cholesterol	1		dihydrotestosterone	181
	Δ5-pregnenolone	24		Epitestosterone	0
	17α-OH-Δ5-pregnenolone	102		17α-OH-progesterone	0
	DHEA	120		Estrone	5
	testosterone	188		Estradiol	310

한편, Estrone의 경우 5 pmoles로 Acylation이 매우 적게 되는 반면 Estradiol의 경우에는 310 pmole로 가장 많이 되는 것으로 보아서 17β-수산기에서의 Acylation은 C<sub>5</sub>의 이중결합보다는 Δ4-3-Ketone이나 3-keto-steroid인 testosterone 이나 DHT가 높고 A고리가 방향족고리를 갖는 Estradiol이 가장 높게 나타났다.

Lee와 Adams(10)는 소의 태반에서 estradiol-17β의 KM은 11μM인데 반하여 testosterone의 KM은 62μM로써 testosterone에 대한 태반의 Acyl 전이효소의 친화력이 Estradiol-17β보다 낮은 것은 본 연구와 비록 조직은 다르나 동일한 경향을 보이고 있다.

결 론

쥐 뇌에서의 Steroid Acyl 전이효소를 [4-<sup>14</sup>C]-DHEA를 기질로 하여 조사한 결과 다음과 같은 사실을 발견하였다.

첫째, 쥐 뇌의 Steroid Acyl 전이효소는 microsome에 존재하며 최적 pH는 4.6이었다. pH 4.6의 반응조건하에서는 기질 Steroid에 다른 변환이 없었으며 Acyl 유도체를 가수분해하는 Esterase의 활성도도 발견되지 않았다.

둘째로 Steroid-Acyl 전이효소에 DHEA를 기질로 하였을 때 Δ5-pregnenolone은 경쟁적 저해제로, testosterone은 비경쟁적 저해제로 작용함을 보였다.

셋째로 Steroid Acyl 전이효소의 입체특이성은 3β-수산기의 Acylation에 대하여서는 C<sub>17</sub>에 부착한 측쇄가 짧으면서 친수성일수록 증가되었으며 Steroid의 A고리가 방향족일 경우에는 C<sub>3</sub>의 수산기는 Acylation이 아주 저하되었다. C<sub>17</sub>-수산기에서의 Acylation은 수산기가 반드시 β-형태를 가져야하며, 이 경우에 A고리는 Δ4이거나 혹은 이중결합이 존재하지 않거나 상관이 없음을 보였다.

감 사

본 연구는 1988년도 문교부 학술연구 조성비로 수행하였으며 연구비 지원에 감사 드립니다.

참 고 문 헌

1. R. B. Hochberg, L. Bandy, and S. Lieberman (1979), Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 74, 941~945.

2. S. H. Mellon-Nussbaum, L. Ponticorvo, S. Lieberman (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 12500~12505.
  3. S. H. Mellon-Nussbaum, and B. Hochberg (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 5566~5572.
  4. S. H. Mellon-Nussbaum, L. Ponticorvo, F. Schatz, and R. B. Hochberg (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 5678~5684.
  5. W. H. Pearlman, E. N. Lamay, L. H. Peng, and J. R. Hass (1985), *J. Biol. Chem.*, **260**, 5296~5301.
  6. Y. Kishimoto (1973), *Arch. Biochem. Biophys.*, **159**, 528~542.
  7. P. Robel, C. Corpechot, M. Synguelakis, A. Groyer, M. Clarke, M. L. Schlegel, P. Brazeau, and E. E. Baulieu (1984), Pregnenolone, dehydroepiandrosterone and their sulfate esters in rat brain. In "metabolism of hormonal steroids in the neuroendocrine structures" Edited by C. F. Naftolin and L. Martini, p. 185~194, Raven Press.
  8. P. Robel, E. E. Baulieu (1985), *Neurochem. Intl.*, **7**, 953~958.
  9. O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall (1951), *J. Biol. Chem.*, **193**, 265~275.
  10. F. T. Lee, and J. B. Adams (1987), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **144**, 569~575.
  11. D. H. JO, M. A. Abdallah, J. Young, E. E. Bauleiu, and P. Robel (1989), *Steroids*, **54**, 287~297.
- (Received; March 19, 1990, Accepted; November 13, 1990)**