

단 신

Baker's Yeast로부터 Oxidosqualene-Lanosterol Cyclase의 분리 및 성질에 관한 연구(II)

鄭 龍 錫

충북대학교 자연과학대학 화학과
(1992. 9. 7 접수)

Purification and Characterization of Oxidosqualene-Lanosterol Cyclase from Baker's Yeast(II)

Yongseog Chung

Department of Chemistry, Chungbuk National University, Cheongju 360-763, Korea
(Received September 7, 1992)

2,3-Oxidosqualene-lanosterol cyclase는 포유동물의 간이나 yeast 등에서 발견되는 효소로 (s)-2,3-oxidosqualene을 protosterol 중간체를 거쳐 lanosterol로 변환시킨다고 알려져 있다¹. Yeast cyclase는 간으로부터 분리된 cyclase가 microsomal fraction에 있는 것과는 달리 초고속 원심분리 이후에도 supernatant 용액에 녹아 있다고 보고된 바 있으나², 최근 yeast로부터 분리된 cyclase도 microsomal fraction에 존재한다는 것이 밝혀졌다³. Yeast cyclase는 잘 녹지 않을 뿐만 아니라 극히 불안정하여 일반적인 분리방법을 사용하였을 때 효소의 활성도를 모두 잃는 등 분리정제에 많은 어려움이 있었으나, 최근 우리는 yeast cyclase의 분리정제에 부분적으로 성과를 거둔 바 있다³. 본 연구에서는 yeast cyclase의 분리정제를 더욱 효과적으로 수행하기 위하여 기질인 2,3-oxidosqualene을 1,6-diaminohexane을 spacer로 사용하여 Sepharose 6B에 붙여 affinity matrix를 만들었으며 이를 cyclase의 분리정제에 이용하였다. 이 2,3-oxidosqualene-lanosterol cyclase의 분리정제는 2,3-oxidosqualene으로부터 lanosterol로의 고리화 반응이 현재 알려진 바와 같이 Fig. 1에 보여준 non-stop anti-Markovnikov 메커니즘을 통한 protosterol 중간체(a)를 형성할 것인지 혹은 Markovnikov 중간체(b)를 형성한 후 2단계 반응으로 중간체(a)를 이룰 것인지를 밝히고자 하는데 있어 매우

중요하다.

Yeast cyclase의 활성도가 sonication에 의하여 증가된다는 것이 최근 알려져 French press 대신 초음파세포파쇄기를 이용하였다^{4,5}. Baker's yeast 60 g을 300 ml의 phosphate buffer(pH 7.4, 0.1 M)에 넣고 40°C에서 잘 저어준 후 dry ice/acetone bath를 이용하여 10°C 이하로 온도를 유지시키며 90분 동안 연속적으로 sonication 시켰다. Sonication 후 buffer의 pH는 6.5~6.7이었으며 1 ml의 파쇄된 yeast suspension을 사용하여 (R,S)-2,3-oxidosqualene을 assay 했을 때 35~40%가 lanosterol로 변환되었다. 이 yeast suspension을 15분 동안 원심분리(13000 g)시켜 cell debris를 제거하여 얻은 supernatant를 90분 동안 초고속 원심분리(150000 g)하여 microsomal fraction을 분리하였다. 분리된 microsomal fraction을 1.0% Triton X-100을 포함하고 있는 200 ml의 phosphate buffer(0.1 M)에 resuspend시키고 12시간 저어준 후 다시 원심분리(150000 g)하여 buffer에 녹아 있는 cyclase를 얻을 수 있었다. Solubilized cyclase는 -20°C에서 1달동안 활성도를 거의 그대로 유지하였다. Cyclase가 녹아 있는 supernatant 30 ml를 0.06% Triton X-100을 포함하는 phosphate buffer(10 mM)로 미리 처리해 놓은 hydroxylapatite column(2.5×35 cm)에 흡착시킨 다음 10 mM phosphate buffer로 씻어낸 후 300 ml의 linear gradient

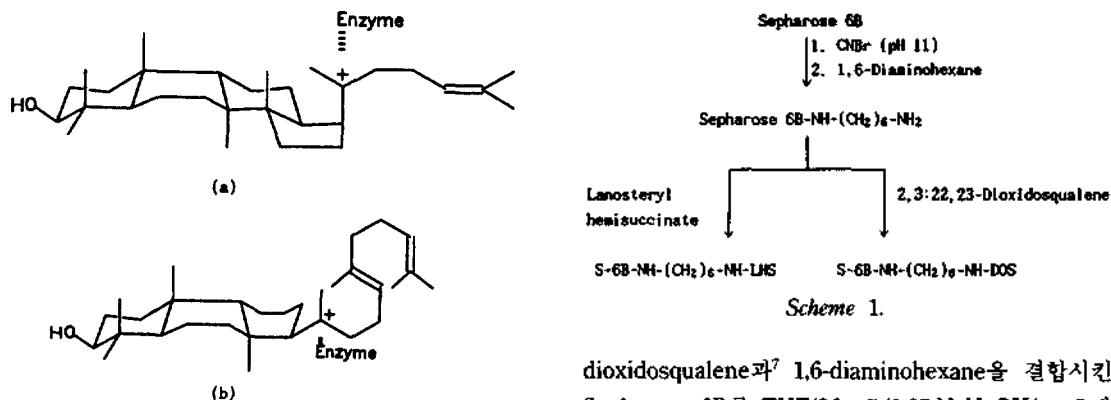


Fig. 1. Two possible intermediates for the conversion of 2,3-oxidosqualene to lanosterol. (a) protosterol intermediate, (b) Markovnikov intermediate.

phosphate buffer(pH 6.2, 10 mM-0.5 M)로 용리시켰다. 활성을 가진 우유빛의 fraction을 모아 Amicon concentrator로 10 ml로 농축시킨 후 10 mM phosphate buffer에서 12시간 동안 투석시키고 밑에 기술한 방법으로 만든 5 ml의 affinity column에 흡착시켰다. 이 column을 10 mM(60 ml)과 0.2 M(60 ml)의 phosphate buffer로 씻어낸 후 affinity matrix에 붙어있는 cyclase를 0.05% Triton X-100을 포함하고 있는 0.4 M phosphate buffer로 용리시켰다. Affinity column에 의하여 분리된 cyclase solution과 hydroxylapatite treated cyclase solution의 specific activity를 비교하였을 때 0.013 U/mg과 0.0013 U/mg으로써 10배 이상의 활성도 증가를 보였는데 이는 yeast cyclase의 경우 현재까지 알려진 다른 분리 방법을 이용했을 때와 비교하였을 때 가장 좋은 결과이다. Affinity column으로 분리한 cyclase solution을 Amicon concentrator로 농축시킨 후 SDS-PAGE electrophoresis시켰을 때 40 kDa에 single band가 관찰되었으나 55 kDa에 매우 열은 band가 존재하는 듯 보여 아직 소량의 불순물이 있는 것으로 생각된다. Affinity column matrix는 다음과 같은 방법으로 만들었다. 먼저 2차중류수로 깨끗하게 씻은 Sepharose 6B(9 g)를 Cuatrecasas의 방법을 따라⁶ cyanogen bromide(3 g)로 활성화시킨 후 spacer로 이용되는 1,6-diaminohexane(5 g)을 반응시킨 다음 과량의 cyanogen bromide를 물로 씻어내었다. 2 eq의 NBS와 squalene을 반응시켜 만든 2,3:22,23-

dioxidosqualene과⁷ 1,6-diaminohexane을 결합시킨 Sepharose 6B를 THF(26 ml)/0.05 N NaOH(4 ml)에 넣고 60°C에서 90분 실온에서 12시간 동안 반응시킨 후 유리필터로 거른다음 THF(250 ml), 50% aq. THF(250 ml) 그리고 2차중류수(3 l)로 씻어 affinity matrix를 만들었다⁸ (Scheme 1).

Lanosteryl hemisuccinate와 cholesteryl hemisuccinate를 Sepharose 6B에 붙여 새로운 affinity matrix들을 만들어 시험해 보았으나 이들 matrix들은 cyclase를 붙잡지 못하고 그대로 통과시켜 효과적인 affinity column을 이루지 못하였다. 일반적인 방법으로 yeast cyclase를 분리정제 하였을 때 cyclase의 활성도를 모두 잃는다고 보고된 바 있으나² Hydroxylapatite와 DEAE Sephacel을 사용하여 cyclase를 정제한 경우 5배와 3배의 활성도 증가를 보였다. Yeast cyclase의 활성도는 cyclase를 용해시키는데 쓰인 detergent에 따라 많은 영향을 받았는데 zwitterionic detergent인 CHAPS나 anionic detergent인 sodium cholate를 critical micelle concentration 이상으로 사용하였을 경우 활성도가 비가역적으로 감소하였다. Non-ionic detergent인 Tween #40의 경우 활성도에 별 영향을 주지 못하였으나 Triton X-100를 사용하였을 경우 활성도가 증가되었으며 1% 용액을 사용하였을 때 cyclase가 거의 완전히 용해되어 초고속 원심분리 후 supernatant와 침전물의 활성도를 조사한 결과 supernatant만이 활성도를 나타내었다. pH의 변화에 따른 cyclase의 활성도는 pH 6~6.5 사이에서 가장 높았으며 >pH 7.5에서 급격한 감소를 보였다. Cyclase의 활성도는 또한 cysteine 변형제인 N-ethylmaleimide, 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid), 그리고 p-chloromercuribenzenesulfonic acid에 의하여 매우 강하게 억

제되었으나 Diethylpyrocarbonate와 phenylmethylsulfonyl fluoride에 의하여는 전혀 영향을 받지 않았는데 이로부터 cyclase가 활성을 갖기 위하여는 catalytic site에 cysteine thiol group이 존재하여야 하지만 histidyl group이나 serine hydroxyl group은 필요하지 않다는 것을 알 수 있었다.

Yeast cyclase와 oxidosqualene의 carboxylic acid 유도체를 이용하여 앞서 언급한 반응 중간체(a), (b)를 규명하고자 하는 연구가 현젠 진행중에 있다.

인 용 문 헌

1. (a) P. D. G. Dean, *Steroidologia*, **2**, 143 (1971); (b) Van Tamelen, J. D. Willet, R. B. Clayton, and K. E. Lord, *J. Am. Chem. Soc.*, **88**, 4752 (1966).
2. I. Shechter, F. W. Sweat, and K. Bloch, *Biochem. Biophys. Acta*, **220**, 463 (1970).
3. (a) T. Hoshino, H. J. Williams, Y. Chung, and A. I. Scott, *Tetrahedron*, **47**, 5925 (1991); (b) E. J. Corey and S. P. T. Matsuda, *J. Am. Chem. Soc.*, **113**, 8172 (1991).
4. R. Bujons, R. Guajardo, and K. S. Kyler, *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 604 (1988).
5. J. C. Medina and K. S. Kyler, *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 4818 (1988).
6. (a) P. Cuatrecasas, *J. Biol. Chem.*, **245**, 3059 (1970); (b) R. Axen, J. Porath, and S. Ernback, *Nature (London)*, **214**, 1302 (1967).
7. R. G. Nadeau and R. P. Hanzlik, *Methods in Enzymology*, Vol. XV, p. 346, R. B. Clayton, Ed., Academic Press, New York, 1969.
8. M. G. Rowan and P. D. G. Dean, *Phytochem.*, **11**, 3111 (1972).

이 학회지는 한국과학기술단체총연합회의 일부 재정지원(한국과학재단 출연금)에 의하여 발간되었습니다.

대한화학회지

JKCSEZ 37(2) 181~268(1993)

ISSN 1017-2548

제 37 권, 제 2 호

1993년 2월 20일

이론 및 물리화학

- 산화아연 단결정 면에서 일산화탄소의 산화반응에 대한 연구 全 鎭 · 韓鍾洙 183
 750°C에서 탈수한 Cd₆A의 결정구조와 이 결정을 세습 증기로 반응시킨 결정구조 張世福 · 金 洋 191

무기 및 분석화학

- 구리(II)-아민류착물에 의한 과산화수소의 분해반응속도와 메카니즘 金善憲 · 申潤烈 · 朴正殷 · 金昌洙 199
 황함유리간드의 금속착물 I. 디티오카바메이트류의 니켈(II)착물의 합성과 그 성질 金寅植 · 金謙宇 · 金昌洙 206
 SnO₂ 광전기화학 셀에서 Rhodamine B에 의한 광전류 閔炫眞 · 金起範 · 俞貞娥 · 金康鎮 213
 실라에텐 Cl₂Si=CHCH₂Bu의 생성과 반응성 金貞均 · 朴恩美 · 具美英 · 朴慶來 · 孫炳榮 220

유기 및 생화학

- Grignard 시약과 브로모벤질과의 반응에서 첨가전이 금속이온의 영향 연구 金正均 · 高永心 · 尹雄燦 · 金珉淑 228
Xanthomonas celebensis 5S rRNA의 몇 가지 삼차상호작용 趙峯來 · 李永勳 · 崔明彦 · 朴仁源 237
 α,ω -디올로부터 디니트로 α,ω -디올의 합성 丁圭鉉 · 朴一教 244
 N-*p*-Nitrophenyl Poly(*m*-Phenylene Isophthalamide)의 합성 金洪範 · 金東炫 · 李在雄 · 宋相燁 · 金珞中 249

단 신

- 치환된 케로브스카이트형 복합산화물 LaMn_{1-x}Cu_xO₃의 환원반응성 黃鎬淳 · 崔 熾 · 朴一鉉 255
 이온 크로마토그래피의 양이온 검출기로서 적합한 다중이온선택성 막전극 朴允淑 · 車旻鍾 · 韓相鉉 · 申斗淳 · 金海鎬 · 車根植 259
 구리(II)-아민 착물의 합성과 전자전이 스펙트럼 金昌錫 · 金泰承 265

발 행

大 韓 化 學 會

서울특별시 성북구 안암동 5가 35번지

Journal of the Korean Chemical Society

JKCSEZ 37(2) 181~268(1993)

ISSN 1017-2548

Vol. 37, No. 2

February 20, 1993

THEORETICAL AND PHYSICAL CHEMISTRY

A Study of Carbon Monoxide Oxidation on ZnO Single Crystal Surface

Jin Jun and Chong Soo Han 183

Crystal Structures of Cd₆-A Dehydrated at 750°C and Dehydrated Cd₆-A Reacted with Cs Vapor

Se Bok Jang and Yang Kim 191

INORGANIC AND ANALYTICAL CHEMISTRY

Rates and Mechanism of Decomposition of Hydrogen Peroxide by Copper(II)-Amines Complexes

Sun-Deuk Kim, Yun-Yeol Shin, Jeong-Eum Park, and Chang-Su Kim 199

Metal Complexes of Sulfur-containing Ligands I. Syntheses and Properties of Nickel(II)

Complexes of Dithiocarbamates

In-Sik Kim, Chan-Woo Kim, and Chang-Su Kim 206

Photocurrents in the SnO₂ Photoelectrochemical Cell Sensitized by Rhodamine B

Hyun-Jin Min, Gi-Bum Kim, Jeong-A Yu, and Kang-Jin Kim 213

Generation and Reactivities of Silaethene Cl₂Si=CHCH₂Bu - Unsaturated Compounds of

14 group Elements(IX)¹ -

Chung-Kyun Kim, Eunmi Park, Mi-Young Ku, Kyunglae Park,
and Byung-Yun Son 220

ORGANIC AND BIOLOGICAL CHEMISTRY

Effect of Transition Metal Ion on the Reaction of Benzylbromide with Grignard Reagent

Jack C. Kim, Young-Sim Koh, Ung-Chan Yoon, and Min-Sook Kim 228

Some Tertiary Interactions in 5S rRNA from *Xanthomonas celebensis*

Bongrae Cho, Younghoon Lee, Myung-Un Choi, and Inwon Park 237

Synthesis of Dinitro α,ω -Diols from α,ω -Diols

Kyoo-Hyun Chung and Il-Gyo Park 244

Synthesis of *N-p*-Nitrophenyl Poly(*m*-Phenylene Isophthalamide)

Hongbum Kim, Donghyun Kim, Jaewung Lee, Sangyeop Song, and Nakjoong Kim 249

NOTE

Study on the Reduction Reaction of Doped Perovskite Type Oxide LaMn_{1-x}Cu_xO₃

Hoo-Soon Hwang, Hyeok Choi, and Il-Hyun Park 255

Mixed Neutral Carrier-Based Ion-Selective Membrane Electrodes as a Cation Detector for

Ion Chromatography

Yoon Sook Park, Min Jong Cha, Sang Hyun Han, Doo Soon Shin,

Hai Dong Kim, and Geun Sig Cha 259

Synthesis and Charge-Transfer Absorption Spectra of Cu(II)-Amine Complexes

Chang Suk Kim and Tae Seung Kim 265

Published by

THE KOREAN CHEMICAL SOCIETY

35, 5-Ka, Anam-Dong, Sungbuk-Ku, Seoul 136-075, Korea