

## 쥐 뇌의 $\Delta^5$ -3 $\beta$ -Hydroxy Steroid Acyl 전이효소의 용해 및 Liposome에서의 재구성

고규정<sup>1</sup> · 박인호<sup>2</sup> · 한범구<sup>2</sup> · 조도현<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>한미약품 주식회사, <sup>2</sup>아주대학교 생물공학과

**초록 :** 쥐 뇌의 microsome으로 부터  $\Delta^5$ -3 $\beta$ -hydroxy steroid acyl 전이효소( $\Delta^5$ -3 $\beta$ -OH-SAT)를 detergent를 이용하여 용해한 뒤에 인산지방질 liposome에서 재구성하여 처리하지 않은 microsome의  $\Delta^5$ -3 $\beta$ -OH-SAT의 활성도와 비교하였다. 용해에 사용한 detergent중에는 deoxycholic acid가 Tween 80이나 Triton X-100 보다 우수한  $\Delta^5$ -3 $\beta$ -OH-SAT 활성도를 나타냈으며, liposome 생성에 사용한 인산지방질중에서는 난황 및 대두 phosphatidylcholine이 가장 높은 활성도를 보였으며 그 다음이 phosphatidylethanolamine이었고 phosphatidylserine과 phosphatidic acid는 재구성하지 않은 용해된 효소보다  $\Delta^5$ -3 $\beta$ -OH-SAT 활성도가 낮았다. 따라서 인산지방질의 head group의 4차 암모늄기나 amine기는  $\Delta^5$ -3 $\beta$ -OH-SAT의 재구성활성을 촉진시키고 COOH기가 amine기와 함께 존재하거나 amine기가 없으면 이 효소의 활성이 저해됨을 알 수 있었다(1995년 5월 4일 접수, 1995년 7월 5일 수리).

### 서 론

Steroid acyl 전이효소는 steroid hormone의 hydroxyl기에 지방산 에스터를 생합성하는 효소이다. 지금까지 steroid hormone의 지방산 에스터 유도체는 소 부신 조직에서 분리, 동정된 이래<sup>1-3)</sup> 사람의 혈장,<sup>4)</sup> 유방조직,<sup>5)</sup> 소 태반 microsome<sup>6-7)</sup> 등에서 존재함이 밝혀졌다. 쥐 뇌의 경우에는 쥐 뇌 microsome에서 testosterone의 지방산 유도체 생성이 처음으로 보고된<sup>8)</sup> 이래  $\Delta^5$ -3 $\beta$ -hydroxy steroid의 지방산 유도체가 쥐 뇌에 존재함이 밝혀졌고,<sup>9-10)</sup> 이들의 뇌 부위별 함량이 다르며,<sup>10)</sup> 숫쥐와 암쥐 뇌에서 그 함량의 차이가 없음이 밝혀졌고,<sup>11)</sup>  $\Delta^5$ -3 $\beta$ -hydroxy steroid acyl 전이효소( $\Delta^5$ -3 $\beta$ -OH-SAT)가 microsome에 주로 존재하며 기질의 특성에 있어서 cholesterol에는 작용하지 않으나 17 $\beta$ -hydroxy group에는 작용하며,<sup>12,13)</sup> 또한 에스터를 이루는 지방산은 palmitic acid, stearic acid, oleic acid가 주성분이라고 보고<sup>13)</sup>되었다.

본 실험에서는 쥐 뇌의  $\Delta^5$ -3 $\beta$ -OH-SAT의 특성을 좀 더 잘 이해하기 위하여 microsome으로 부터  $\Delta^5$ -3 $\beta$ -OH-SAT를 detergent로 용해한 뒤 liposome으로 재구성할 때 용해시 사용하는 detergent의 종류와 liposome을 형성할 때 사용한 인산지방질의 종류 및 재구성 조건에 따른  $\Delta^5$ -3 $\beta$ -OH-SAT의 효소활성을 연구하였다.

### 재료 및 방법

#### 실험동물 및 시약

실험 동물로 쓰인 쥐는 12주된 숫쥐(Sprague-Dawley)를 구입하여 12시간씩 주야를 교대시키고 먹이와 물을

자유로이 먹도록 하였다. 전구체로 사용된 [<sup>4-14</sup>C] dehydroepiandrosterone(DHEA; 51.6 mCi/mmol)은 Amersham(England)사로 부터 구입하였으며, 인산지방질인 난황 L- $\alpha$ -phosphatidylcholine, 대두 L- $\alpha$ -phosphatidylcholine, 소의 뇌 L- $\alpha$ -phosphatidylethanolamine, 소의 뇌 L- $\alpha$ -phosphatidylserine, 난황 L- $\alpha$ -phosphatidic acid는 Sigma(USA)사 제품을 사용하였다. Detergent 중에서 deoxycholic acid(DOC)는 Fluka(Switzerland)사 제품을, Tween 80과 Triton X-100은 Sigma(USA)사 제품을 사용하였고, 기타 시약 및 유기용매는 Sigma(USA)나 Merck(Germany)의 GR급을 사용하였다.

Microsome 분리를 위하여 사용한 고속냉동 원심분리기는 Dupont Instrument의 Sorvall RC-5B를, ultracentrifuge는 Berkman사의 L8-M ultracentrifuge를 사용하였으며, 동위원소량 측정은 Packard사의 1600TR liquid-scintillation counter를 사용하였다.

#### 효소의 용해

전보에서<sup>12)</sup> 보고한 바와 같이, 10 mM Tris-HCl 완충 용액(pH=7.4, 1.5 mM EDTA)을 사용하여 Teflon-glass type의 Potter 균질기에 의해 세포를 마쇄한 후 연속원심분리 하여 mitochondria를 제거한 상등액을 105,000 g에서 60분 원심분리한 후 침전물인 microsome을 얻어서 0.32 M sucrose 용액에 현탁시킨 후 -70°C에 보관하였다.

단백질 6 mg에 해당하는 microsome을 취하고 세가지 종류의 detergent 즉, DOC, Triton X-100, Tween 80을 첨가량을 변화시켜 가한 후, 최종 부피가 1 ml가 되도록 한 다음 4°C 에서 1시간동안 천천히 진탕하였다. 진탕이

찾는말 :  $\Delta^5$ -3 $\beta$ -hydroxy steroid acyl transferase, rat brain, solubilization, reconstitution

\*연락처자

끝난 후 105,000 g에서 1시간동안 원심분리하여 상등액을 용해된 microsome 단백질로 하였으며, liposome에서의 재구성을 위하여 단백질 농도를 4 mg/ml로 조정하였다.

**Liposome에서의 재구성**

Detergent에 용해된 효소의 liposome에서의 재구성은 주로 Doolittle과 Chang<sup>14)</sup>이 기술한 방법을 사용하였다. Detergent에 용해된 효소를 detergent를 제거하지 않고 해당 인산지방질 10 mg이 포함되어 있는 Tris-HCl 완충용액 1 ml을 5분간 초음파 수조에서 처리하여 liposome을 형성시킨 다음, 효소용액(4 mg/ml)과 인산지방질 (10 mg/ml)을 1:0.5, 1:1, 1:2, 1:5, 1:10(v/v)의 비율로 혼합하여 효소활성도를 측정하였다. 또한 경우에 따라서는 detergent에 용해된 효소를 4°C에서 10시간 투석시켜 detergent를 제거한 후 동일한 방법으로 liposome과 혼합하여 활성을 측정하였다.

**효소활성 측정**

표준 효소반응 용액은 전보<sup>12)</sup>와 동일하게 하였다. 즉 200  $\mu$ l의 초산 완충용액 (0.25 M, pH 4.5)에 Tween 20 200  $\mu$ g, EDTA 5  $\mu$ mole, [4-<sup>14</sup>C]-DHEA 20,000 dpm, oleyl CoA 14 nmole과 단백질 0.3 mg에 해당하는 효소용액을 가한 후 최종 부피는 700  $\mu$ l가 되도록 하여 37°C 항온 수조에서 30분간 반응시켰다.

Steroid 지방산 에스터의 추출방법은 Albert 등<sup>15)</sup>의 방법을 따라 행하였다. 반응종료 후 반응액에 메틸알콜 2.25 ml와 isoctane 2.5 ml를 가하여 진탕 후 isoctane 층을 추출한다. 추출한 isoctane층에 메틸알콜:증류수 (9:1, v/v) 3 ml씩을 가하여 세척한 후에 isoctane 층 2 ml를 취하여  $\beta$ -scintillation counter로 동위원소량을 측정하여 효소역가를 결정하였다. 효소활성도는 처리하지 않은 microsome의  $\Delta^5$ - $\beta$ -OH-SAT의 효소활성도에 대한 백분율로 나타냈다.

**기타 분석법**

단백질 함량은 Lowry 등<sup>16)</sup>의 방법을 이용하였으며, 투석시 잔류 DOC의 분석은 시료에 진한 황산 4 ml를 가하여 60°C에서 1시간 동안 반응시킨 후 620 nm에서 흡광도를 측정하는 담즙산 측정법<sup>17)</sup>을 변형하여 사용하였다.

**결과 및 고찰**

**Microsome 용해를 위한 detergent 선정**

최대의 용해력과 용해시  $\Delta^5$ - $\beta$ -OH-SAT의 효소활성에 최소한의 영향을 주는 detergent를 선정하기 위하여 DOC, Triton X-100, Tween 80을 detergent로 사용하였다. 그 결과, Fig. 1에서 보는 바와 같이 DOC와 Triton X-100은 모두 0.1%에서 0.6%까지의 농도에서 각각 79±2%, 73±3%의 용해도를 나타낸 반면 Tween 80의 경우에는 0.1%에서 거의 최대치에 도달하며, 용해도는 30±2

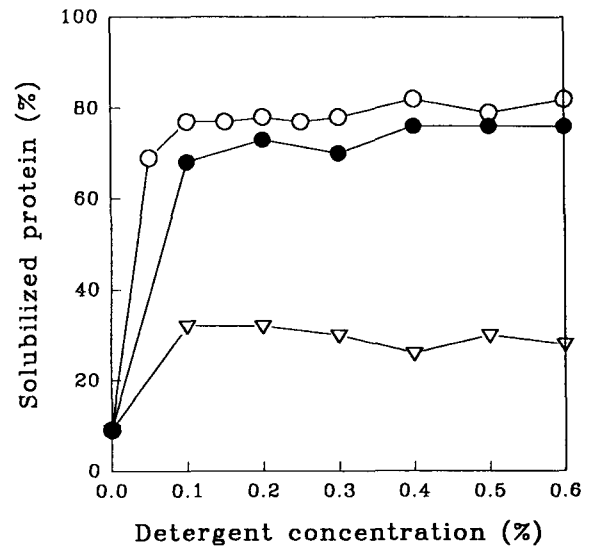


Fig. 1. Effect of the detergent and its concentration on the solubilization of the microsomal protein of the rat brain. The concentration of microsomal protein was fixed at 6 mg/ml. ●-●, Deoxycholic acid; ○-○, Triton X-100; ▽-▽, Tween 80.

%로 가장 낮았다. 따라서 본 실험에서는 microsome 용해를 위한 detergent로 DOC와 Triton X-100을 선정하였고 이들의 농도는 0.4%로 하였다. 또한 이들 detergent에 의해 용해된  $\Delta^5$ - $\beta$ -OH-SAT는 liposome으로 재구성되지 않은 상태에서는 모두 매우 낮은 효소활성도를 나타내었다(see Fig. 3). 이는 소 태반에서 Acyl CoA: estradiol-17 $\beta$  acyl 전이효소(AEAT)의 경우 liposome으로 재구성하지 않으면 효소활성도가 없다는 Lee와 Adams의 보고<sup>6)</sup>와 동일한 결과이다. 0.4% DOC를 사용할 때 microsome 단백질 양에 따른 용해도 변화와 0.4% DOC의 처리시간에 따른 용해도의 정도는 Fig. 2A, Fig. 2B와 같다. Fig. 2A에서 보는 바와 같이 0.4%의 DOC를 사용하였을 때, 단백질 양의 증가에 따른 용해도는 단백질 0.3 mg일때 80%에서 1.8 mg일때 70%까지 약간 감소한 듯 하나 그 이후에는 70%정도를 유지하였다. 한편 DOC의 처리 시간은 Fig. 2B에서 보는 바와 같이 DOC 처리 즉시 80%정도의 용해도를 보이고 30분 이후에는 용해도에 거의 영향을 주지 않는 것으로 나타났다. 이와 같이 DOC 처리 즉시 높은 용해도를 보이는 것은 microsome을 용해하기 위하여 DOC를 가하면 즉시 microsome 용액이 육안으로 보아도 투명하게 용해되는 것을 관찰할 수 있었고, 용해처리 시간후에 용해된 단백질을 분리하기 위한 초원심분리 시간이 60분이기 때문에 여기에서 오는 효과가 있는 것으로 생각된다. 따라서 DOC와 Triton X-100 모두 0.4% 농도로 60분간 반응시켰으며 단백질은 6 mg 이내로 하였다.

**Liposome에서의 재구성**

DOC와 Triton X-100을 사용하여 용해한 효소를 인산지방질인 난황 phosphatidylcholine(PC)으로 된 lipo-

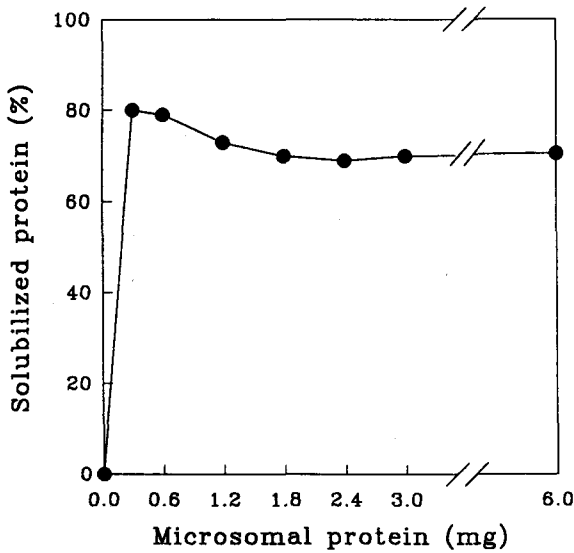


Fig. 2A. Effect of the protein concentration on the solubilization of the microsomal protein of the rat brain by deoxycholic acid. The concentration of deoxycholic acid was fixed at 0.4%(w/v).

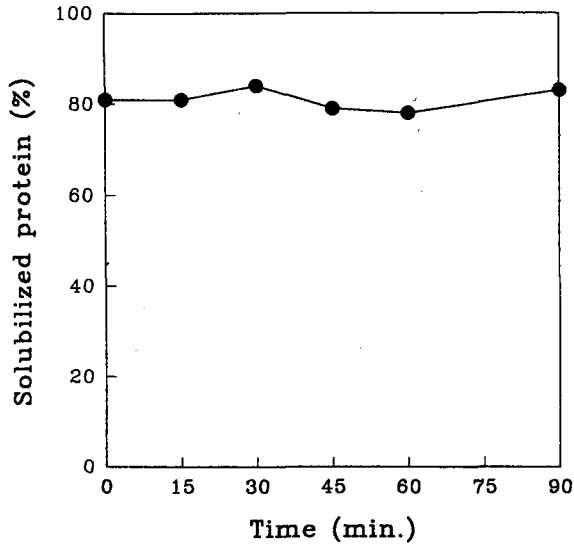


Fig. 2B. Effect of the treatment time of deoxycholic acid on the solubilization of the microsomal protein of the rat brain. Deoxycholic acid was added into 6mg of the microsomal protein to reach the concentration of 0.4%.

some으로 재구성시킨 효소의 활성을 detergent로 처리하기 전의 microsomal의 효소활성도와 비교하였다. Liposome으로 재구성하기 위해 두가지 방법을 사용하였다. 첫번째 방법은 DOC로 용해시킨 효소액을 바로 난황 PC liposome에 희석시키는 방법과 두번째 방법은 4°C에서 10시간 투석하여 DOC를 제거한 후 난황 PC liposome으로 재구성하여 비교하였다. Fig. 3에서 보는바와 같이 DOC를 제거한 후에 liposome에 혼합된 것과 바로 liposome에 혼합된 것 두가지 모두가 사용한 모든 liposome의 농도에서 재구성된 Δ<sup>5</sup>-3β-OH-SAT의 활성도가

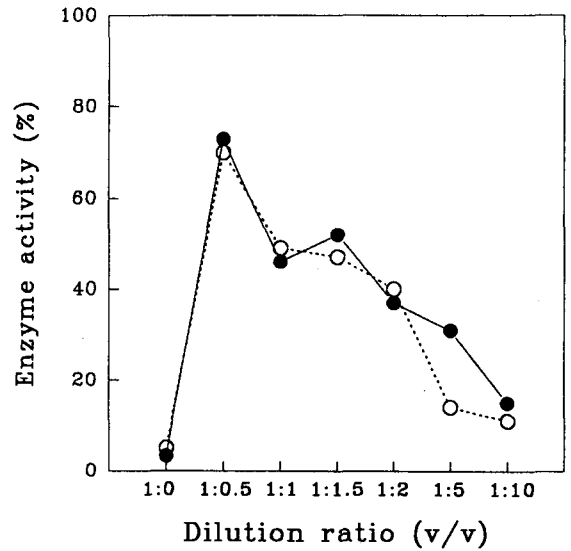


Fig. 3. Effect of mixing ratio of the egg yolk phosphatidylcholine on the enzyme activity of liposome-reconstituted Δ<sup>5</sup>-3β-OH-SAT. The dialysis before reconstitution was done at 4°C for 10 hours. The initial concentration of the deoxycholic acid-solubilized protein and the phospholipid was 4 mg/ml and 10 mg/ml respectively. ●-●, Reconstitution without dialysis; ○-○, Reconstitution after dialysis.

차이가 없음을 보여주고 있다. 이는 microsome 효소 용해시에 첨가한 음이온성 detergent인 DOC의 존재가 liposome에 재구성된 Δ<sup>5</sup>-3β-OH-SAT의 효소활성에 아무 영향을 미치지 못함을 시사한다.

또한 DOC에 용해된 단백질과 liposome의 비율이 1:0.5 (v/v)일 때 detergent를 처리하기 전의 microsome에 대해 76%의 활성도를 보여 가장 높은 활성도를 나타냈다. 이는 소 태반에서 Acyl CoA: estradiol-17β acyl 전이효소의 경우, 대두 crude phospholipid II를 사용하여 liposome을 만들었을 때, 직접 liposome을 가하였을 경우 detergent를 처리하지 않은 microsome에 대해 78%의 효소활성도를 나타낸 보고와 일치하나, 투석 후 liposome을 가하였을 경우 45%로 보고된 것과는 상당한 차이를 보였다.<sup>9)</sup> 또한 재구성시 liposome의 비가 1:0.5 (v/v)에서 가장 높은 활성도를 나타낸 것은 소 태반에서 Acyl CoA: estradiol-17β acyl 전이효소나<sup>9)</sup> 돼지 간 microsome의 Acyl CoA: cholesterol acyl 전이효소<sup>14)</sup>의 경우 모두 1:10에서 최대 활성도를 나타낸것과는 상이하다. 이와같이 쥐 뇌 microsome의 Δ<sup>5</sup>-3β-OH-SAT의 경우 아주 낮은 liposome 농도에서 최대 활성도를 갖는다는 것은 쥐 뇌의 Δ<sup>5</sup>-3β-OH-SAT가 다른 steroid나 cholesterol acyl 전이효소와 다른 특성을 보여주고 있음을 시사한다.

**Liposome을 형성하는 인산지방질의 종류에 따른 재구성 효소활성도의 비교**

Liposome을 구성하는 인산지방질의 종류에 따른 재

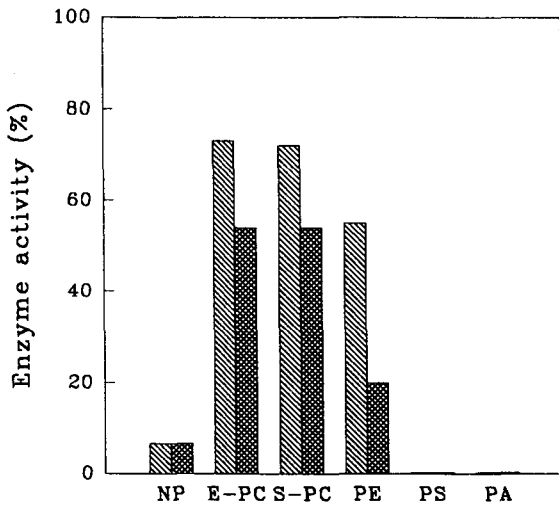


Fig. 4. Effect of phospholipids on the enzyme activity of liposome-reconstituted  $\Delta^5$ -3 $\beta$ -OH-SAT. ▨-▨, Solubilization with deoxycholic acid; ▩-▩, Solubilization with Triton X-100. NP, No phospholipid was added; E-PC, egg yolk phosphatidylcholine; S-PC, soybean phosphatidylcholine; PE, bovine brain phosphatidylcholine; PS, bovine brain phosphatidylserine; PA, egg yolk phosphatidic acid.

구성 효소활성도를 비교하기 위하여 용해된 microsome 단백질에 liposome을 직접 가하는 방법을 사용하여 DOC나 Triton X-100으로 용해된 효소: 인산지방질 = 1:0.5(v/v)으로 실험하였다. Fig. 4에서 보는 바와 같이 DOC로 용해된 효소용액이 Triton X-100으로 용해된 효소용액보다  $\Delta^5$ -3 $\beta$ -SAT의 liposome 재구성시 활성도가 높게 나타났으며, 그 정도는 인산지방질의 종류에 따라 심한 차이를 보이고 있다. PC의 경우에는 난황이나 대두에서 추출된 것 모두 DOC에 용해된 경우가 73%이고 Triton X-100에 용해된 경우가 56%로서 DOC가 Triton X-100보다 1/3 정도 높았고, phosphatidylethanolamine (PE)의 경우에는 DOC의 경우가 57%이고 Triton X-100이 20%로서 DOC가 Triton X-100보다 2.5배 정도 더 높은 활성도를 보였다. 또한 phosphatidylserine(PS)과 phosphatidic acid(PA)의 경우에는 오히려 liposome에 재구성시키지 않은 것보다도  $\Delta^5$ -3 $\beta$ -OH-SAT의 활성도가 적게 나타남으로써 오히려 PS와 PA 인산지방질에 의하여 저해를 받음을 보이고 있다.

각 인산지방질의 구조를 살펴보면, PC는 4차 암모늄기를 갖고 있고, PE의 경우에는 amine기를 갖고 있으나 PS의 경우에는 amine기가 있으나 동시에 COOH기가 바로 인접하여 존재하고 PA의 경우에는 amine기가 존재하지 않는 구조를 갖고 있다. 따라서 4차 암모늄기나 amine기의 존재유무가  $\Delta^5$ -3 $\beta$ -OH-SAT의 재구성활성도에 영향을 미치는 것을 보여준다. 한편 돼지 간 microsome의 Acyl CoA: cholesterol acyl 전이효소의 경우에는 PC에 대한 PE, phosphatidylinositol(PI), PS비의 변화에 따른 재구성 활성도를 비교하였는데,<sup>14)</sup> 이때에는 PE의 경우에는 PC만 있을 때와 비교하여 활성도의 변화가 없었으나 PI와 PS는 PI(PS)/PC=0.25에서 이미 20%로

효소활성도가 감소되어 이 비율이 0.75~1.0에서는 PC만 있을 때의 활성도의 1~2%에 지나지 않는다고 보고하였다. 따라서 이 실험에서도 amine기의 존재가 Acyl CoA: cholesterol acyl 전이효소의 경우에도 중요한 작용을 함을 보여준 면에서는 본 실험의 결과와 동일하다고 할 수 있다.

그러나 이러한 사항들을 좀 더 확실하게 규명하기 위해서는 이들 liposome을 형성하는 인산지방질의 종류에 따른 liposome의 직경이나 구조가 어떻게 변하는지, 또는  $\Delta^5$ -3 $\beta$ -OH-SAT가 liposome에서 어떤 공간구조로 배치되어 있는지에 대한 연구가 진행되어야 명확한 설명이 가능할 것으로 사료된다.

### 감사의 글

본 연구는 1993년 아주대학교 교내연구비의 지원으로 이루어진 결과이며 이에 깊은 감사를 드립니다.

### 참고 문헌

- Hochberg, R. B., L. Bandy and S. Lieberman (1977) Detection in bovine adrenal cortex of a lipoidal substance that yields pregnenolone upon treatment with alkali. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 941-945.
- Mellon-Nussbaum, S., L. Pontiorvo and S. Lieberman (1979) Characterization of the lipoidal derivatives of pregnenolone prepared by incubation of the steroid with adrenal mitochondria. *J. Biol. Chem.* **254**, 12500-12505.
- Mellon-Nussbaum, S. and R. B. Hochberg (1980) Biosynthesis of lipoidal derivatives of pregnenolone and dehydroepiandrosterone by the adrenal. *J. Biol. Chem.* **255**, 5566-5572.
- Janocko, L. and R. B. Hochberg (1983) Estradiol fatty acid esters occur naturally in human blood. *Science* **222**, 1334-1336.
- Pealman, W. H., E. N. Lamay, L. H. Pery and J. R. Hass (1985) *In vitro* metabolism of [<sup>3</sup>H] corticosterone by mammary gland from lactating rats: Isolation and Identification of 21-acyl [<sup>3</sup>H] corticosterone. *J. Biol. Chem.* **260**, 5296-5301.
- Lee, F. T. and J. B. Adams (1987) Solubilization and reconstitution of acylcoenzyme A: estradiol-17 $\beta$  acyltransferase. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **144**, 569-575.
- Martyn, P., D. L. Smith and J. B. Adams (1988) Properties of fatty acylcoenzyme A: estradiol-17 $\beta$  acyltransferase in bovine placenta microsomes. *Mol. Cell. Endocr.* **60**, 7-13.
- Kishimoto, Y. (1973) Fatty acid esters of testosterone in rat brain: identification, distribution and some properties of enzymes which synthesize and hydrolyse the esters. *Arch. Biochem. Biophys.* **159**, 528-542.
- Robel, P., E. Bourreau, C. Corpéchet, D. C. Dang, F. Halberg, C. Clarke, M. Hang, M. L. Schlegel, M. Synguelakis, C. Vourc,h and E. E. Baulieu (1987) Neurosteroids: 3 $\beta$ -hydroxy- $\Delta^5$ -derivatives in rat and monkey brain. *J. Steroid Biochem.* **27**, 649-655.
- Baulieu, E. E., P. Robel, O. Vatie, M. Haug, C. Le Goasco

- gne and E. Bourreau (1987) Neurosteroids: pregnenolone and dehydroepiandrosterone in the brain. In 'Receptor-Receptor Interactions,' Fuxe, K. and L.F. Agnati, vol. 48, 89-104, MacMillian Press, Basingstoke, USA.
11. Jo, D. H., M. Ait Abdallah, J. Young, E. E. Baulieu and P. Robel (1989) Pregnenolone, dehydroepiandrosterone and their sulfate and fatty acid esters in the rat brain. *Steroids* **54**, 287-297.
  12. Jo, D. H. (1990) Study on steroid acyltransferase in the rat brain. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **5**, 201-205.
  13. Vourch, C., B. Eychehenne, D. H. Jo, J. Raulin, D. Lapous, E. E. Baulieu and P. Robel (1992)  $\Delta^5$ - $3\beta$ -Hydroxysteroid acyltransferase activity in the rat brain. *Steroids* **57**, 210-215.
  14. Doolittle, G. M. and T. Y. Chang (1982) Solubilization, partial purification and reconstitution in phosphatidylcholine-cholesterol liposomes of acyl-CoA: cholesterol acyltransferase. *Biochemistry* **21**, 674-679.
  15. Albert, D. H., L. Ponticorvo and S. Lieberman, (1980) Identification of fatty acid esters of pregnenolone and allopregnenolone from bovine corpora lutea. *J. Biol. Chem.* **255**, 10618-10623.
  16. Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall (1951) Protein measurement with the Foline phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
  17. Sjövall, J. (1964) Separation and determination of bile acids. In 'Methods of biochemical analysis' Glick, D., vol 12, pp 97-141, John Wiley & Son Inc., N. Y., USA.

---

**Solubilization and Reconstitution of  $\Delta^5$ - $3\beta$ -Hydroxy Steroid Acyl Transferase from the Rat Brain**  
 Kyu-Jung Ko<sup>1</sup>, In-Ho Park<sup>2</sup>, Beom-Ku Han<sup>2</sup> and Do Hyun Jo<sup>2\*</sup> (<sup>1</sup>Hanmi Pharm. Co., Ltd, <sup>2</sup>Department of Biotechnology, Ajou University)

**Abstract**: Solubilization of microsomal  $\Delta^5$ - $3\beta$ -hydroxy steroid acyl transferase ( $\Delta^5$ - $3\beta$ -OH-SAT) of rat brain and its reconstitution into liposomes were investigated. Among the detergents utilized for the solubilization, deoxycholic acid was superior to Tween 80 or Triton X-100 for the reconstituted activity of  $\Delta^5$ - $3\beta$ -OH-SAT. The enzyme activity was shown to be affected by the nature of phospholipids used for the preparation of the liposome. Phosphatidylcholines from egg yolk and soybean showed the highest activity of  $\Delta^5$ - $3\beta$ -OH-SAT and phosphatidylethanolamine came next. However phosphatidylserine and phosphatidic acid showed a lower activity than those obtained before the reconstitution. This study suggests that the presence of quaternary ammonium salt or amine group in the phospholipids stimulates the activity of  $\Delta^5$ - $3\beta$ -OH-SAT. However the presence of a carboxylic group or the absence of the amine group may have an inhibitory effect on the  $\Delta^5$ - $3\beta$ -OH SAT.

---

\*Corresponding author