

소의 뇌에서 Neurosteroid Acyltransferase의 분포 및 특성에 관한 연구

박인호 · 조성준 · 조도현*

아주대학교 생물공학과

초록 : 소의 뇌에서 neurosteroid의 지방산 에스터를 합성하는 neurosteroid acyltransferase(NSAT)의 뇌에서의 부위별, 세포분획별 분포 및 효소적 특성을 연구하였다. 소의 뇌 NSAT 활성도는 소뇌(小腦)에서 가장 높았으며 그 다음이 중뇌(中腦)이었다. 가장 활성도가 낮은 부위는 대뇌(大腦)로 소뇌(小腦)의 50% 수준이었다. 또한 소뇌(小腦) microsome에서의 활성도가 다른 세포분획에 비해 매우 높아 NSAT가 microsomal 효소임을 알 수 있었다. NSAT의 최적온도는 40°C이었으며, pH=4.9에서 최적 pH를 나타냈다. DHEA를 기질로 하였을 때 NSAT의 K_m 과 V_{max} 는 각각 32.6 μ M과 4.86 nmole/mg protein/h였다. 또한 DHEA를 기질로 하였을 때 pregnenolone (Δ^5 P)은 NSAT에 대하여 경쟁적 저해제로, testosterone은 비경쟁적 저해제로 작용하였다. Δ^5 P와 testosterone의 K_i 는 각각 22.8 μ M과 28.2 μ M이었다. 따라서 소의 NSAT는 C-3의 β -hydroxy 기와 C-17의 β -hydroxy 기를 에스터화하는 과정에서 다른 conformation을 가짐을 시사한다.(1997년 1월 7일 접수, 1997년 2월 3일 수리)

서 론

뇌는 steroid hormone의 주요 target이다. 최근의 연구에서는 포유동물의 뇌에서 steroid hormone이 부신과 생식 기관들에 의해 생성되어서 혈액을 순환하며 내분비 대사에 관여하는 peripheral steroid hormone들과는 독립적으로 항상성이 유지됨이 알려졌고,^{1,3)} 이들을 "neurosteroid"라 명명하였다.⁴⁾

Neurosteroid의 저장 형태인 steroid 지방산 유도체는 steroid acyltransferase에 의해 합성된다. steroid hormone의 지방산 에스터 유도체는 소 부신 조직에서 분리, 동정된 이래^{5,7)} 사람의 혈장,⁸⁾ 유방 조직,⁹⁾ 소 태반 microsome^{10,11)} 등에서 존재함이 밝혀졌다. 쥐 뇌의 경우에는 쥐 뇌 microsome에서 testosterone의 지방산 유도체 생성이 처음으로 보고된¹²⁾ 이래 Δ^5 -3 β -hydroxy steroid의 지방산 유도체가 쥐 뇌에 존재함이 밝혀졌고,^{13,14)} 이들의 뇌 부위별 함량이 다르며,¹⁴⁾ 숫쥐와 암쥐 뇌에서 그 함량의 차이가 없음이 밝혀졌고,³⁾ Δ^5 -3 β -hydroxy steroid acyltransferase(Δ^5 -3 β -OH-SAT)가 microsome에 주로 존재하며 기질의 특성에 있어서 cholesterol에는 작용하지 않으나 17 β -hydroxy기에는 작용하며,^{15,16)} 또한 에스터를 이루는 지방산은 palmitic acid, stearic acid, oleic acid가 주성분이라고 보고¹⁶⁾되었다.

본 연구에서는 소 뇌에서 neurosteroid의 생합성에 관여하는 neurosteroid acyltransferase(NSAT)의 특성을 좀 더 잘 이해하기 위하여 소 뇌에서 NSAT의 부위별, 세포분획별 분포와 효소적 특성에 대하여 연구하였다.

재료 및 방법

실험 동물 및 시약

실험 동물로 쓰인 소 골은 수원 지역의 정육점에서 구입하였다. 기질로 사용된 [$1,2,3,7$ - 3 H] dehydroepiandrosterone (DHEA; 25.8 mCi/mmol)은 New England Nuclear Corp.(USA)사로부터 구입하였으며, 방사성 동위원소로 표지 되지 않은 DHEA, testosterone, pregnenolone (Δ^5 P)는 Steraloid(Wilton, USA)사로부터 구입하였고, 기타 시약 및 유기 용매는 Sigma(USA)나 Merck(Germany)의 GR급을 사용하였다.

Microsome 분리를 위하여 사용한 고속 냉동 원심분리기와 초원심분리기는 각각 Dupont Instrument의 Sorvall RC-5B high speed centrifuge와 Sorvall combi plus ultracentrifuge를 사용하였으며, 동위원소량 측정에는 Packard사의 1600TR liquid-scintillation counter를 사용하였다.

세포분획의 분리

4°C에서 소의 뇌를 대뇌(大腦), 소뇌(小腦), 중뇌(中腦), 시상(視床), 시상하부(視床下部)로 분리하여 절취한 후, 10 mM Tris buffer(1 mM EDTA, 0.8% NaCl, pH 7.0)를 1:4 (w/v)의 비율로 넣고 Potter type homogenizer에 의해 세포를 마쇄한 후 연속원심분리 방법을 이용하여 1,500 \times g에서 10분 원심분리 후 침전물(Nuclei), 10,000 \times g에서 20분 원심분리 후 침전물(Mitochondria)을 얻고 그 상등액을 105,000 \times g에서 60분 원심분리 후 침전물(Microsome)

찾는말 : neurosteroid acyltransferase, neurosteroid, 소의 뇌
*연락처자

과 상징액(세포액)으로 분획한 후 각 침전물들은 0.25M sucrose 용액에 재용해시켜 다음 실험 때까지 -70°C에 보관하였다. 각 세포분획의 단백질 양은 Lowry 등¹⁷⁾의 방법을 이용하여 측정하였다.

효소활성 측정

표준 효소반응 용액은 전보¹⁵⁾와 동일하게 하였다. 즉 200 μl의 초산 완충용액 (0.25M, pH 4.5)에 Tween 20 200 μg, EDTA 5 μmole, [1,2,3,7-³H]-DHEA 40,000 dpm (0.176 nmole), 단백질 0.2 mg에 해당하는 효소용액을 가한 후 최종 부피는 700 μl가 되도록 하여 37°C 항온 수조에서 30분간 반응시킨 후 -70°C에서 냉동시켜 반응을 정지시켰다.

Steroid 지방산 에스터의 추출 방법은 Albert 등¹⁸⁾의 방법을 따라 행하였다. 반응 종료 후 반응액에 메틸알콜 2.25 ml와 isooctane 2.5 ml를 가하여 진탕 후 isooctane 층을 추출한다. 추출한 isooctane 층에 메틸알콜:증류수(9:1, v/v) 3 ml씩을 가하여 세척한 후에 isooctane 층 2 ml를 취하여 β-scintillation counter로 측정하여 효소역가를 결정하였다.

결과 및 고찰

소 뇌 부위별, 세포분획별 NSAT 활성의 분포

소의 뇌 부위별 NSAT 활성도의 분포는 Fig. 1과 같다. Fig. 1에서 보는 바와 같이 소뇌(小腦)에서의 활성도가 가장 높았으며, 그 다음이 중뇌(中腦)와 시상(視床)부위이고, 시상하부(視床下部)와 대뇌(大腦)의 경우에는 소뇌(小腦)에서의 활성도의 50% 정도에 해당하는 활성도를 나타내었다. Kishimoto¹²⁾는 쥐 뇌의 testosterone acyltransferase가 소뇌(小腦)에 가장 많이 분포하며, 대뇌반구(大腦半球), 간뇌(間腦), 뇌간(腦幹)에도 활성도는 낮지만 고르게 분포한다고 보고하였다. 이러한 결과로 보아 소 뇌의 steroid acyltransferase는 뇌 전체 부위에 고르게 분포하나, 소뇌(小腦)에서 가장 높은 활성을 나타냄을 알 수 있다.

또한 소뇌(小腦)의 nuclei, mitochondria, microsome과 세포액에서의 NSAT 활성도를 측정해 본 결과, microsome에서 가장 높은 활성도를 나타내었으며, 다른 세포분획에서는 microsome 활성도의 약 10~20% 정도의 매우 낮은 활성도를 보여(Fig. 2), 소의 소뇌(小腦)의 steroid acyltransferase가 microsomal 효소임을 알 수 있었다. Jo¹⁵⁾와 Vourc'h 등¹⁶⁾은 쥐 뇌의 Δ⁵-3β-OH-SAT가 주로 microsome에 존재한다고 보고하였으며, 또한 Kishimoto¹²⁾는 쥐 뇌의 testosterone acyltransferase가 microsomal 효소라고 보고하여 본 연구와 일치된 결과를 나타내었다. 따라서 효소 활성도가 가장 높은 소뇌(小腦)의 microsome을 효소원으로 하여, NSAT의 특성에 대하여 실험을 하였다.

소 뇌의 NSAT의 특성

소의 소뇌(小腦) microsome의 NSAT 활성도는 단백질 양이 0.2 mg이 될 때까지 단백질양에 비례하여 증가하였으며(Fig. 3a), 반응 시간에 따른 활성도는 45분까지 반응 시

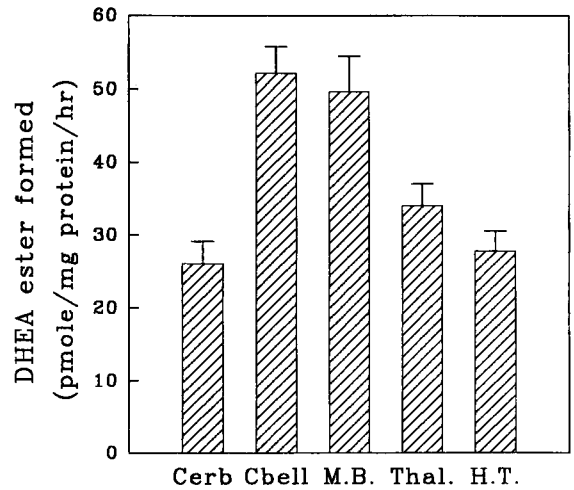


Fig. 1. The distribution of the neurosteroid acyltransferase in the bovine brain. The microsomal fraction of each cerebral region corresponding to 0.2 mg of protein was incubated at 37°C for 30 min with 0.176 nmoles of ³H-DHEA. Error bar represents the range of 3 incubations. Cerb.: Cerebrum, Cbell.: Cerebellum, M.B.: Mid-brain, Thal.: Thalamus, H.T.: Hypothalamus.

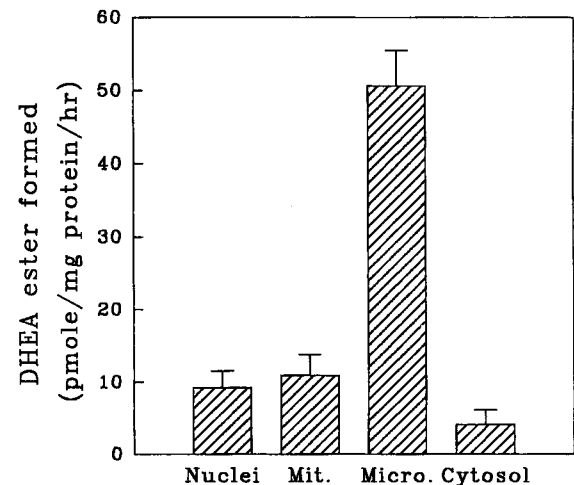


Fig. 2. The distribution of the neurosteroid acyltransferase in the subcellular fractions of the bovine cerebellum. Subcellular fractions of the cerebellum corresponding to 0.2 mg of protein were incubated at 37°C for 30 min with 0.176 nmoles of ³H-DHEA. Error bar represents the range of 3 incubations. Mit.: mitochondria, Micro.: Microsome.

간에 비례하여 증가하였다(Fig. 3b).

NSAT 활성도에 대한 온도의 영향은 Fig. 4와 같다. Fig. 4에서 보는 바와 같이 온도가 증가할 수록 NSAT 활성도가 증가하여 40°C에서 최대치를 보여 58 pmole/mg protein/h 였다. 그 후에는 활성도가 급격히 감소하여 70°C에서는 활성도를 완전히 상실하였다.

NSAT의 활성에 대한 pH의 영향은 Fig. 5에서와 같이 최적 pH=4.9였으며, pH의 변화에 대하여 아주 예민한 활성도의 변화를 보여주고 있다. Martyn 등¹¹⁾은 소 대반에서 steroid acyltransferase의 최적 pH가 5.0이라고 보고하였으며, Jo¹⁵⁾와 Vourc'h 등¹⁶⁾은 쥐 뇌의 Δ⁵-3β-OH-SAT의 최

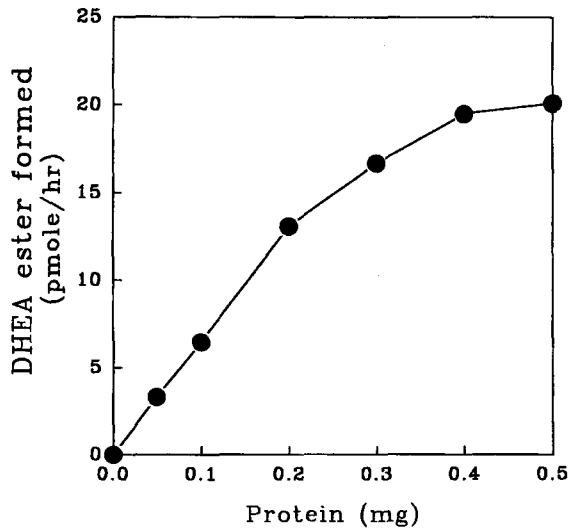


Fig. 3a. Effects of protein concentration on the activity of the neurosteroid acyltransferase of the microsome from the bovine cerebellum. The microsomal fraction was incubated at 37°C for 30 min with 0.176 nmoles of ^3H -DHEA.

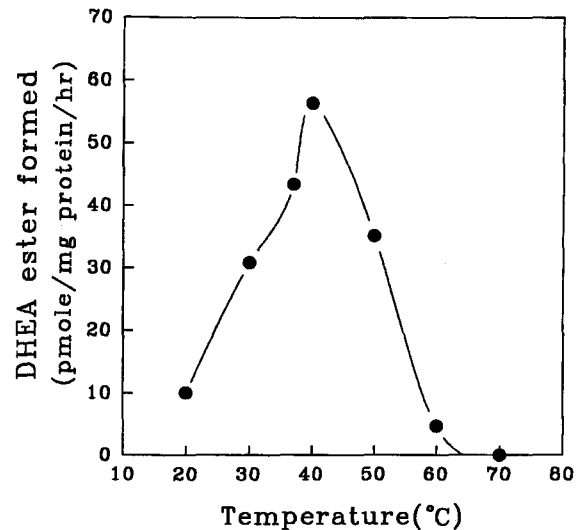


Fig. 4. Effects of incubation temperature on the activity of the neurosteroid acyltransferase of the microsome from the bovine cerebellum. 0.2 mg of the microsomal protein were incubated for 30 min with 0.176 nmoles of ^3H -DHEA.

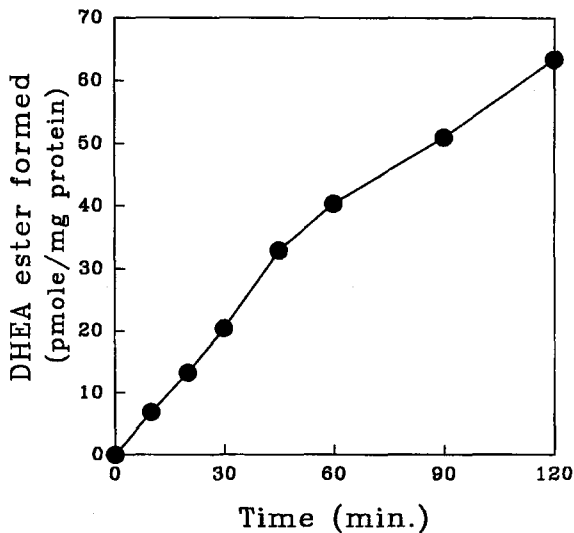


Fig. 3b. Effects of incubation time on the activity of the neurosteroid acyl transferase of the microsome from the bovine cerebellum. 0.2 mg of the microsomal protein were incubated at 37°C for the time indicated with 0.176 nmoles of ^3H -DHEA.

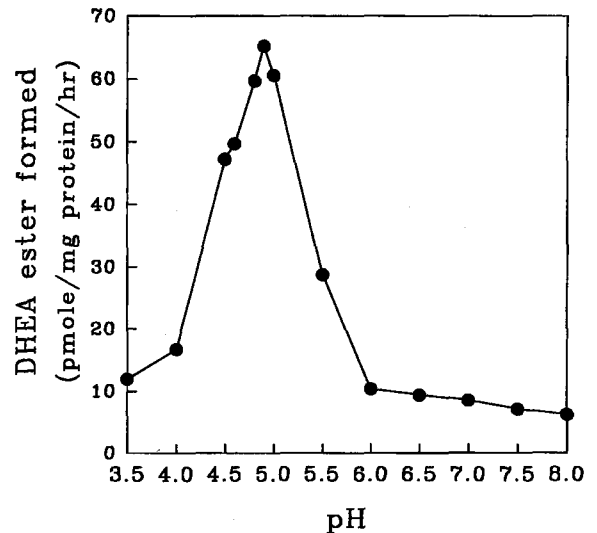


Fig. 5. Effects of pH on the activity of the neurosteroid acyltransferase of the microsome from the bovine cerebellum. 0.2 mg of the microsomal protein were incubated at 40°C for 30 min with 0.176 nmoles of ^3H -DHEA. pH 3.5~5.5: 0.1M Acetate buffer; pH 6.0~7.0: 0.1M Phosphate buffer; pH 7.0~8.0: 0.1M Tris buffer.

적 pH가 각각 4.6과 4.9라고 보고하였다. 또한 Kishimoto¹²⁾는 쥐 뇌에서 testosterone acyltransferase의 최적 pH가 4.9라고 보고하여 steroid acyltransferase이 산성 조건하에서 높은 활성을 나타낼 수 있다. 이러한 결과로 볼 때, 실험 동물의 차이나 동물의 조직의 차이에 따른 최적 pH의 변화는 없는 것으로 사료된다.

Kinetic analyses

기질인 ^3H -DHEA의 농도를 달리하여 NSAT활성을 측정 한 후 Lineweaver-Burk plot을 작성하여 NSAT의 K_m 와 V_{max} 를 구한 결과, K_m 은 32.6 μmole 이었으며, V_{max} 는 4.86 nmole/mg protein/h이었다(Table 1, Fig. 6). 이러한 결과는 쥐 뇌의 Δ^5 -3 β -OH-SAT¹⁵⁾와 비교하여 볼 때 V_{max} 는 소

뇌의 NSAT가 쥐 뇌의 Δ^5 -3 β -OH-SAT의 1/3에 불과하였으나, K_m 은 1/5 정도여서 소 뇌의 NSAT가 쥐 뇌의 Δ^5 -3 β -OH-SAT에 비해 기질인 DHEA에 대한 친화도가 매우 높음을 알 수 있다.

또한 DHEA를 기질로 하여, NSAT에 대한 $\Delta^5\text{P}$ 와 testosterone의 저해 효과를 실험한 결과, $\Delta^5\text{P}$ 를 저해제로 사용한 경우에는 V_{max} 는 동일하고 K_m 은 104.2 μM 로 증가하여 경쟁적 저해제로 작용함을 알 수 있었고, 반면 testosterone의 경우에는 K_m 은 32.6 μM 로 일정하고 V_{max} 는 1.91 nmole/mg protein/h으로 감소하여 비경쟁적 저해제로 작용하였다(Table 1, Fig. 6). $\Delta^5\text{P}$ 와 testosterone의 K_i 는 각각 22.8 μM 과 28.2 μM 이었다(Table 1).

Table 1. Effects of pregnenolone(Δ^5P) and testosterone on the kinetic properties of the neurosteroid acyltransferase from the bovine cerebellum.

	No Inhibitor	Inhibitor	
		Δ^5P	testosterone
V_{max} (nmole/mg protein/h)	4.86	4.86	1.91
K_m (μM)	32.6	104.2	32.6

*The substrate was [1,2,3,7- 3H]DHEA. The concentration of pregnenolone(Δ^5P) and testosterone was 50 μM . The cerebellar microsomes corresponding to 0.2 mg of protein were incubated at 40°C for 30 min.

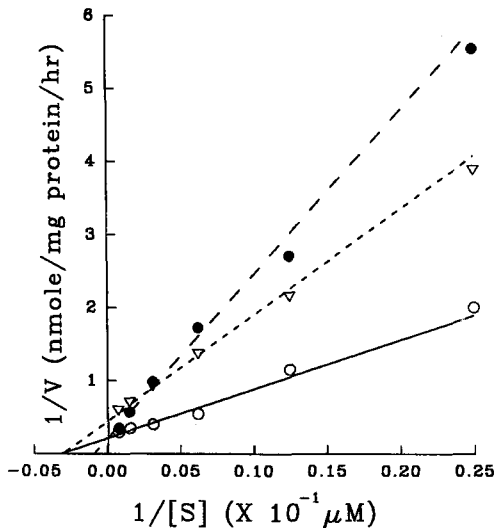


Fig. 6. Lineweaver-Burk plot of the effect of pregnenolone(Δ^5P) and testosterone on the neurosteroid acyltransferase of the microsomes from the bovine cerebellum. The substrate was [1,2,3,7- 3H]DHEA. The cerebellar microsomes corresponding to 0.2 mg of protein were incubated at 40°C for 30 min. ○—○, No inhibitor; ●—●, 50 μM Δ^5P ; ▽—▽, 50 μM Testosterone.

쥐 뇌의 $\Delta^5-3\beta-OH-SAT$ 에 대한 Jo¹⁵⁾의 연구 결과에 의하면, DHEA를 기질로 하였을 때, Δ^5P 는 경쟁적 저해제로, testosterone은 비경쟁적 저해제로 보고하여 본 연구와 동일한 결과를 나타내었다. DHEA와 Δ^5P 의 구조를 비교하면 모두 $\Delta^5-3\beta$ -hydroxy steroid이나 DHEA는 C₁₉ 계열이며 Δ^5P 는 C₂₁ 계열로서 steroid의 D ring의 side chain의 길이에 의한 차이이므로, 3 β -hydroxy기에 에스터를 만드는 반응에서 경쟁적인 저해제로 작용한다고 생각된다. 그러나 testosterone은 DHEA와 같이 C₁₉ 계열의 steroid이나 DHEA가 $\Delta^5-3\beta$ -hydroxy steroid이며 C₁₇이 ketone기이나 testosterone은 Δ^4-3 -keto steroid이며 C₁₇에 β -hydroxy기를 갖고 있어서 NSAT의 기질과 결합에서 차이를 보이는 것으로 추측되나 이에 대한 연구가 계속 수행되어야 할 것으로 본다.

참고 문헌

1. Corpéchet, C., M. Synguelakis, S. Talha, M. Axelson, J. Sjövall, R. Vihko, E. E. Baulieu and P. Robel (1983) Pregnenolone and its sulfate esters in the rat brain. *Brain*

research, **270**, 119-125.

2. Corpéchet, C., P. Robel, M. Axelson, J. Sjövall and E.E. Baulieu (1981) Characterization and measurement of dehydroepiandrosterone sulfate in rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 4704-4707.

3. Jo, D. H., M. A. 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.

4. Goascogne, C., P. Robel, M. Gouézou, N. Sananès, E.E. Baulieu and M. Waterman (1987) Neurosteroids: Cytochrome P-450scc in rat brain. *Science*, **237**, 1212-1215.

5. 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.

6. 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.

7. 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.

8. Janocko, L. and R. B. Hochberg (1983) Estradiol fatty acid esters occur naturally in human blood. *Science*, **222**, 1334-1336.

9. Pealman, W. H., E. N. Lamay, L. H. Pery and J. R. Hass (1985) In vitro metabolism of [3H] corticosterone by mammary gland from lactating rats: Isolation and Identification of 21-acyl [3H] corticosterone. *J. Biol. Chem.*, **260**, 5296-5301.

10. Lee, F. T. and J. B. Adams (1987) Solubilization and reconstitution of acylcoenzyme A:estradiol-17 β acyltransferase. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **144**, 569-575.

11. Martyn, P., D. L. Smith and J. B. Adams (1988) Properties of fatty acyl-coenzyme A: estradiol-17 β acyltransferase in bovine placenta microsomes. *Mol. Cell. Endocr.*, **60**, 7-13.

12. 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.

13. 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 β -hydroxy- Δ^5 -derivatives in rat and monkey brain. *J. Steroid Biochem.*, **27**, 649-655.

14. Baulieu, E. E., P. Robel, O. Vatie, M. Haug, C. Le Goascogne and E. Bourreau (1987) Neurosteroids: pregnenolone and dehydroepiandrosterone in the brain. In 'Receptor-Receptor Interactions,' Vol. 48, p.89-104, MacMillian Press, Basingstoke, USA.

15. Jo, D. H. (1990) Study on steroid acyltransferase in the rat brain. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, **5**, 201-205.

16. Vourc'h, C., B. Eychenne, D. H. Jo, J. Raulin, D. Lapous,

- E. E. Baulieu and P. Robel (1992) Δ^5 -3 β -Hydroxysteroid acyltransferase activity in the rat brain. *Steroids*, **57**, 210-215.
17. 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.
18. 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.

Distribution and Characterization of the Neurosteroid Acyltransferase from the Bovine Brain

In Ho Park, Sung Jun Jo and Do Hyun Jo* (*Department of Biotechnology, Ajou University, Suwon 441-749, Korea*)

Abstract : The enzymatic properties as well as its distribution in the cerebral region and subcellular organelles were investigated for the neurosteroid acyltransferase from the bovine brain, which synthesizes the fatty acid esters of the neurosteroids. The cerebellum region was the highest in NSAT activity while the cerebrum was the lowest with 50% of the cerebellar activity. The NSAT was found to be mainly localized in the microsomal fraction. The optimal temperature and pH were 40°C and 4.9, respectively. When ^3H -DHEA was utilized as substrate, the K_m and V_{max} was 32.6 μM and 4.86 nmole/mg protein/h, respectively. Under the same condition pregnenolone($\Delta^3\text{P}$) was a competitive inhibitor with $K_i=22.8 \mu\text{M}$ and testosterone was a uncompetitive inhibitor with $K_i=28.2 \mu\text{M}$. This may suggest that the NSAT has a different conformation in the acylation of the β -hydroxyl group at C-3 and C-17.

Key words : neurosteroid acyltransferase, neurosteroid, bovine brain

*Corresponding author