

## Streptomyces 속 중의 Acetanilide p-Hydroxylase에 관한 연구

김 정 애 · 이 상 섭

서울대학교 약학대학

(Received August 24, 1988)

Studies on Acetanilide p-Hydroxylase in *Streptomyces* spp.

Jung Ae Kim and Sang Sup Lee

College of Pharmacy, Seoul National University Kwanak-Ku, Seoul 151

**Abstract** For microbial production of acetaminophen, a popular analgesic-antipyretic from aniline, we screened various fungi and bacteria. And we succeeded to some extents in acetaminophen production by successful protoplast fusion between *S. lividans* and *S. globisporus* and also between *S. rimosus* and *S. aureofaciens*.

However, more fertile results might be brought *via* performing the cloning of acetanilide p-hydroxylation genes of *Streptomyces* in yeast.

This study was initiated to determine whether the acetanilide p-hydroxylase of *Streptomyces* is cytochrome P-450 species or non-heme iron protein species.

The p-hydroxylation activity on acetanilide in *S. aureofaciens* ATCC 10762 was found to be unstable on exposing to the air. However, 100,000xg supernatant of the cell free extracts which were prepared in N<sub>2</sub> atmosphere showed the p-hydroxylation activity. Characteristic absorption peak of cytochrome P-450 after reduction with dithionite and addition of CO was not observed in the region of 450nm. Moreover, metyrapone and 2,6-dichloroindophenol did not affect this enzyme activity, but sodium azide, sodium cyanide, cupric sulfate, cadmium chloride,  $\alpha, \alpha'$ -dipyridyl, and o-phenanthroline reduced p-hydroxylase activity considerably.

*S. fradiae* NRRL 2702 was shown to have strong p-hydroxylation activity in intact cells. This activity disappeared in its cell free extracts. In its 100,000xg supernatant, however, characteristic absorption peak of cytochrome P-450 after reduction with dithionite and addition of CO was observed at 446nm.

Thus, the results herein presented suggest that acetanilide p-hydroxylase of *Streptomyces aureofaciens* is not related to cytochrome P-450 and may include non-heme iron protein for its activity. However, it is not clear whether acetanilide p-hydroxylase in *S. fradiae* belongs to the same category of *S. aureofaciens*.

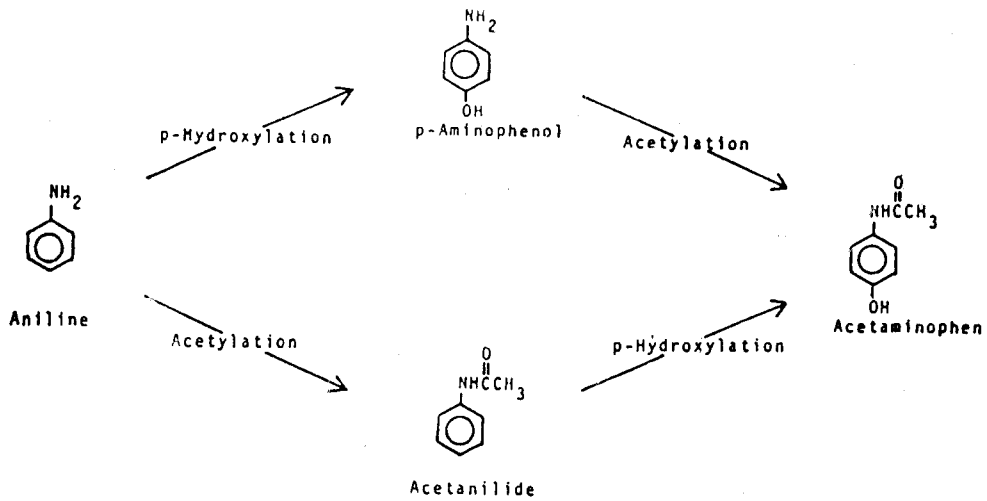
Acetaminophen은 aspirin에 버금가는 해열진통제로서 그 약효가 우수하고 독성이 적어 그 수요가 급증되고 있는 의약품이다. 1982년 미국 OTA(Office of Technology Assessment) report는 acetaminophen과 같은 저분자량의 합성의약품에 대해 미생물 전환 반응을 이용한 발효생산의 가능성을 시험바 있다.<sup>1)</sup>

미생물 전환 반응을 이용한 acetaminophen의 생산은 scheme 1과 같은 경로를 거치는 것으로 생각된다.<sup>2)</sup>

우리는 이미 aniline, acetanilide 및 p-aminophenol을 각각 기질로 투여하여 54종의 fungi,

2종의 *Pseudomonas*, 42종의 토양분리균주 및 10종의 *Streptomyces*에 대해 그 활성을 조사하였다.<sup>2,3)</sup> 이결과 *Streptomyces* 균주의 상당수가 N-acetylation 및 p-hydroxylation 활성을 가진 것으로 나타났다.<sup>3)</sup>

이중 *Streptomyces lividans*와 *Streptomyces globisporus*, 그리고 *Streptomyces rimosus*와 *Streptomyces aureofaciens*를 각각 융합하여 aniline에서 acetaminophen을 생산하는 균주를 개발하는<sup>4,5)</sup> 한편 acetanilide의 p-hydroxylation 활성에 관여하는 유전자를 cloning하여 acetaminophen의 생산력이 큰 균주를 개발하려고 하고 있



Scheme 1—A Possible biotransformation pathway of aniline to acetaminophen in microorganisms

다. 유전자 조작에 의한 acetaminophen 생산균주를 얻기 위해서는 먼저 acetanilide의 p-hydroxylation에 관여하는 효소의 특성을 알 필요가 있다.

유기물의 산화에 관여하는 monooxygenase의 존재가 확인된 것은 근 30년전의 일이다.

1958년 Klingenberg와 Garfinkel은 간 microsome 중에 cytochrome b와는 다른 새로운 heme 단백질이 존재하고, 이 단백질의 환원형은 CO와 결합하는 것을 발견하였다. 뒤이어 Omura등은 간 microsome을 dithionite로 환원시킨 후 CO를 통과시키면 흡수 spectrum이 450nm에서 극대 흡수가 일어나므로 이 색소를 P-450(P는 pigment)이라고 명명하였다.<sup>6)</sup> 이 cytochrome P-450은 여러 내인성 생체성분이나 생체이물의 산화에 관여하며 현재 100여개의 종류가 다른 P-450종이 분리 되었고 이들 단백질의 아미노산 배열이나 DNA 배열분석결과 이들은 11개의 "gene family"중에 속하는 것으로 분류되고 있다.

미생물의 regio 및 stereospecific hydroxylation 능력은 종종 약물 및 그 합성중간체의 합성에 이용되고 있으며, 주로 steroid화학, 천연물화학 등에서 그 연구가 이루어져 왔으나 미생물이 갖는 mixed functionoxidase에 관한 연구는 아직도 미개척 상태인 부분이 많다.

Monooxygenase는 그 electron transport chain의 종류, terminal oxidase의 종류 등에 따라 여러가지로 분류될 수 있는데, 이 monooxygenase system 중 terminal oxidase가 바로 real hydroxylase로 이들은 기질과 O<sub>2</sub>에 대해 각각의 active site를 가지고 있으며, active center에는 heavy metal central atom을 갖는 경우가 많다. 그중 대다수가 iron-complex를 함유하고, 일부가 molybdenum-complex나 copper-complex 등을 함유한다.

Terminal oxidase의 주류를 이루는 iron-containing monooxygenase은 그 유형에 따라 heme-containing monooxygenase와 iron-sulfur-containing monooxygenase의 두가지 종류로 대별된다.<sup>8)</sup>

먼저 heme-containing monooxygenase 즉 cytochrome P-450를 terminal oxidase로 갖는 microbial monooxygenase로는 Gunsalus와 Katagiri 등에 의해 *Pseudomonas putida* strain P<sub>p</sub>G786에서 확인된 P450cam 즉, camphor-5-exo-monooxygenase와<sup>9,10,11,12)</sup> Lebeault 등과<sup>13)</sup> Duppel 등이<sup>14)</sup> 연구한 *Candida tropicalis*의 fatty acid와 alkane ω-hydroxylating system, 그리고 *Bacillus megaterium*의 여러 strain에서의 fatty acid와 steroid-hydroxylating system, 특히 Ingelman-Sundberg, Berg 등이 연구한 steroid 15β-

hydroxylating system의 P450meg,<sup>15,16,17)</sup> 또, Cardini 등이 연구한 *Corynebacterium* sp.의 n-octane hydroxylase,<sup>18)</sup> Ferris 등에 의해 연구된 *Cunninghamella bainieri*의 Aryl hydrocarbon hydroxylase 등이<sup>19,20,21)</sup> 알려져 있는데 mammalian P-450의 활성영역이 광범위한 데 비해 이들은 어느 정도 기질 특이성을 갖는다.

Iron-sulfur protein을 terminal oxidase로 갖는 종류는 연구된 바가 더욱 적는데, 이는 이들의 분리·정제가 어렵기 때문이다. Mammalian 에서는 Fisher 등의 rat liver phenylalanine hydroxylase,<sup>22)</sup> bovine adrenal tyrosine hydroxylase<sup>23)</sup> 등이 알려져 있고, 미생물에서는 *Nocardia*, *Mycobacterium*, *Arthrobacter*, *Corynebacterium* sp. 등의 steroid-ring B-splitting pathway의 key 효소인 steroid 9 $\alpha$ -hydroxylase<sup>24)</sup> *Pseudomonas putida*의 4-methoxybenzoate O-demethylating과 hydroxylating system 등이<sup>25,26)</sup> 알려져 있다. 앞으로 더 많은 iron-sulfur type의 microbial terminal oxidase 및 electron carrier가 발견될 것으로 믿어진다.

본 연구의 목적은 *Streptomyces*의 p-hydroxylase가 cytochrome P-450관련 monooxygenase인지, 비 P-450계열의 monooxygenase인지를 살펴보는 데 있다.

#### 실험재료 및 방법

사용균주—본 실험에 사용된 균주중 *Streptomyces aureofaciens* ATCC 10762는 고려대학교 이세영 교수로부터 분양받았고, 토양분리균 18종과 *Streptomyces fradiae* NRRL 2702는 서울대학교 미생물학과 이계준교수로부터 분양받았으며, *Streptomyces lividans* 1326, *Streptomyces lividans* 3131과 *Streptomyces coelicolor* A3(2)는 서울대학교 약학대학 구양모교수로부터 분양받았다.

기구 및 시약—Yeast extract와 Bacto-agar는 Difco의 제품을 metyrapone과 sodium dithionite는 Sigma 제품을 사용하였고, sodium azide는 Merck 제품을, 2,6-dichloroindophenol은

Eastman Kodak제품을  $\alpha, \alpha'$ -dipyridyl과 o-phenanthroline은 Wako 제품을 사용하였으며, 그 외의 것은 특급 및 일급의 시약을 사용하였다.

Acetaminophen의 검색에 사용한 TLC plate는 pre-coated TLC plates SIL G-25 UV<sub>254</sub>로서 Machery-Nagel회사 제품을 사용하였고, cytosol 분리에는 MSE Europa 65 Ultracentrifuge를 사용하였다. 미생물 세포 분해에는 silica gel로 마쇄한 후 MSE MK-2 Sonicator를 사용하였고, rat liver tissue 마쇄에는 Elvehjem Tissue Homogenizer를 사용하였고, reduced CO difference spectrum 측정에는 computer가 장착된 LKB Ultrospec 4050을 사용하였다.

배지 및 완충용액—균주 보관에는 sporulation agar slant medium(ATCC medium 5, sp medium, Table 1)을 사용하였고, 균사체 배양에는 modified Theriault's screening medium을 사용하였다(Table 2).

Cell free extract의 조제 및 효소 반응 medium

**Table I**—Composition of sporulation agar slant medium (ATCC medium 5, SP medium)

Yeast extract	1.0g
Beef extract	1.0g
Tryptose	2.0g
FeSO <sub>4</sub>	Trace
Dextrose	10.0g
Bacto-agar	15.0g
Dist. Water	1000ml
(pH 7.2)	

**Table II**—Composition of modified Theriault's screening medium

Dextrose	50.0g
Soybean flour	5.9g
Yeast extract	5.0g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.0g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2.0g
Agar	20.0g
Dist. Water	1000ml
(pH 7.0)	

으로 0.05M 인산완충액(pH 7.8)을 사용하였다. 0.05M 인산 buffer는 재증류수로 0.05M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  용액과 0.05M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  용액을 각각 조제 후 두 용액을 서로 혼합하여 pH 7.8로 맞추었다.

**방선균종 acetanilide p-hydroxylase활성 검색**—*S. aureofaciens* ATCC 10762, *S. fradiae* NRRL 2702, *S. lividans* 1326, *S. lividans* 3131, *S. Coelicolor* A3(2) 및 토양분리 균주 18종에 대해 acetanilide p-hydroxylase의 활성을 조사하였다.

이들 균주를 modified Theriault's screening medium 10ml에 각각 접종하여 28°C, 180rpm rotary shaker에서 48시간 배양(*S. fradiae*는 72시간) 후, solid acetanilide를 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$  되게 가하고, 5일간 더 배양 후 그 배양액 5ml를 취하여 10,000xg에서 10분간 원심분리하고, 그 상정액 3.6ml를 취하여 발색시액(nitrosophthal sulfonic acid) 0.4ml를 가하고, 20초 동안 vortexing하여 다시 원심분리한 상정액 3.6ml를 취하여 1 sodium nitrite용액(1mg/ml) 0.4ml를 가하고 상온에서 15분간 방치후 붉은 색의 발색 정도를 관찰하였다. 발색제는 2-nitroso-1-naphthol-4-sulfonic acid 250mg과 trichloroacetic acid 100mg을 증류수 100ml에 녹여서 사용하였다.<sup>27)</sup>

***S. aureofaciens*와 *S. fradiae*의 p-hydroxylase 활성 비교**—Shihabi method에 따라 *S. aureofaciens*와 *S. fradiae*의 acetaminophen 생성 능력을 비교하였다.

*S. aureofaciens*와 *S. fradiae*를 각각 modified Theriault's screening medium 10ml에 접종하여 28°C, 180rpm rotary shaker에서 *S. aureofaciens*는 48시간, *S. fradiae*는 72시간 배양후, 그 배양액 5ml를 fresh modified Theriault's screening medium 50ml에 재접종하고 48시간 더 배양후 solid acetanilide를 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$  되게 가하고 0, 1, 3, 5, 9, 15일에 각각 배양액을 5ml씩 취하여 방법 4에서와 같은 조작으로 발색시켜 그 발색 정도는 530nm에서 optical density를 측정하고, standard acetaminophen 용액으로 동일 조작을 행

하여 검량선을 얻은 뒤, 두 균주의 acetaminophen 생성 능력을 정량 비교하였다.

**균사체 배양**—Sporulation agar slant medium에 보관된 *S. aureofaciens*와 *S. fradiae*를 각각 50ml modified Theriault's screening medium에 접종하여 28°C, 180rpm rotary shaker에서 각각 48시간, 72시간 예비 배양후 이 배양액 50ml를 450ml fresh modified Theriault's screening medium에 재접종하였다. 72시간 배양후 원심분리(10,000rpm, 15분)하여 각각 wet weight 8g과 20g의 균사체를 수확한 뒤 0.05M 인산 완충액(pH 7.8)으로 2회 세척하여 -20°C 냉동기에 보관하였다.

**Cell Free Extract의 조제**—Frozen cell 3g (wet weight)에 1g의 silica gel (0.063~0.2mm)을 가하고 유발과 유봉으로 30분간 갈고난 다음 10ml의 0.05M 인산 완충액에 현탁시켜  $\text{N}_2$  gas<sup>28)</sup> 존재하에 30 $\mu$ 에서 30초 간격으로 15분간 sonication하여 cell lysate를 얻었다.

이 cell lysate를 18,000xg에서 20분간 원심분리하여 cell debris를 제거하고, 18,000xg 상정액을 다시 100,000xg에서 1시간 원심분리하여 그 상정액을 반응액으로 사용하였다.<sup>29)</sup>

위의 모든 조작은 0°C~4°C에서 행하였다.

**Cell Free Extract에서 효소 활성 검색**—18,000xg 상정액, 100,000xg 상정액 100,000xg pellet의 0.5M 인산 완충액 현탁액 각 4.8ml에 0.05M 인산 완충액에 녹인 acetanilide 포화용액(5mg/ml) 0.2ml를 가해 5ml가 되게 한 후 28°C, 180rpm rotary shaker에서 24시간 반응시켜, d-HCl로 액성을 pH 1로 맞춘 뒤 ethyl acetate로 추출하여 농축하였다. 농축 잔사를 methanol에 녹인 뒤 동일한 양을 TLC plate에 점적하고,  $\text{CHCl}_3 : \text{MeOH} : \text{HAc} = 85 : 15 : 1$ 의 전개 용매에서 전개하여 UV lamp로 확인하고 다시 ferric chloride-ferricyanide 발색 시약으로 발색시켜 확인하였다.<sup>30)</sup>

각각의 반응액에 대해 공시험을 실시하였다.

**Salt fractionation**—*S. aureofaciens*의 100,000xg 상정액에 대해 ammonium sulfate로 salt fractionation을 하였다.

100,000×g 상정액에 20%, 40%, 60%, 80% 포화되도록 ammonium sulfate 분말을 서서히 가하고, 완전히 녹을 때까지 저어준 다음, 염의 농도가 균일해지도록 약 30분간 방치하면서 때때로 저어주었다. 30분 방치후 18,000×g에서 20분간 원심분리하여 각 fraction에 대해 방법 8과 같은 방법으로 p-hydroxylase 활성을 검색하였다.

Salt fractionation 조작은 0°C~4°C에서 행하였다.

#### Reduced CO difference spectrum의 측정—

Omura 등의 방법을 변형하여 100,000×g 상정액의 reduced CO difference spectrum을 측정하였다.<sup>6)</sup>

먼저 100,000×g 상정액 3ml에 1분간 CO gas를 bubbling시킨 후 곧 2등분하여 UV측정용 cell에 넣고, 한 쪽 UV cell에만 소량의 sodium dithionite를 넣어 환원시킨 뒤, 환원되지 않은 것을 reference로 하여 400nm~560nm(또는 600nm) 사이에서 흡수 peak를 측정하였다. 이때 CO gas는 formic acid와 concentrated sulfuric acid를 반응시켜 얻은 것으로 30% 수산화加里 용액을 통과시켜 정제하여 사용하였다.

대조 실험으로 acetanilide p-hydroxylase가 cytochrome P-450 관련 monooxygenase라고 알려진 rat liver microsomal fraction에 대해 reduced CO difference spectrum을 측정하였다.

Rat liver microsomal fraction의 조제는 다음과 같이 하였다.

약 150g되는 웅성 Sprague-Dawley rat를 cervical dislocation 후 해부하여, 냉각시킨 염화加里용등장액(1.15%)으로 간를 관류하고 적출한 뒤 잘게 잘라, 간량(liver volume)의 약 4배 정도의 1.15% KCl 용액을 넣고 Elvehjem tissue homogenizer로 5분간 homogenize한 후, 10,000×g에서 30분간 원심분리하고, 10,000×g 상정액을 다시 100,000×g에서 1시간 원심분리하여 얻은 pellet을 1.15% KCl 용액에 현탁시켜 100,000×g에서 다시 1시간 원심분리하여 세척하고, 적당량의 1.15% KCl 용액에 현탁시켜 microsomal fraction으로 사용하였다.

**Inhibition Study**—Frozen cell을 0.05M 인산 완충액에 현탁(1g/3ml)시킨 후 metyrapone,<sup>20,24)</sup> 2,6-dichloroindophenol,<sup>18,20)</sup> sodium azide,<sup>18,24)</sup> sodium cyanide,<sup>18,20,24,31)</sup> cupric sulfate,<sup>18,20,24)</sup> cadmium chloride,<sup>24)</sup>  $\alpha,\alpha'$ -dipyridyl,<sup>24,31)</sup> o-phenanthroline,<sup>24,31)</sup>을 각각  $10^{-3}$ M 되게 cell 현탁액 5ml에 가하고, 28°C, 180rpm rotary shaker에서 4시간 예비 배양시킨 뒤, 최종 농도가 200 $\mu$ /ml가 되도록 acetanilide 분말을 가하고, 동일한 조건에서 48시간 반응시켜 효소활성의 변화여부를 TLC로 확인하였다.

#### 실험결과 및 고찰

**S. aureofaciens와 S. fradiae의 p-hydroxylase 활성 비교**—Shihabi method에 따라 *S. aureofaciens*, *S. fradiae*, *S. coelicolor*, *S. lividans* 2종 및 토양 분리군 18종에 대해 acetanilide p-hydroxylase 활성을 검색한 결과, 토양 분리군 4종과 *S. aureofaciens*, *S. fradiae*, *S. lividans* 1326에서 양성 반응인 붉은색이 나타났다.

이 중 토양 분리군과 *S. aureofaciens*, *S. lividans* 1326은 대조용액과 비교하여 5 $\mu$ /ml 이하의 acetaminophen 농도에 해당하는 정도의 붉은 색이었고, *S. fradiae*는 15 $\mu$ g~20 $\mu$ g/ml에 해당하는 정도의 강한 붉은 색을 나타내었다.

검색 결과 p-hydroxylase 활성이 큰 *S. fradiae*와 p-hydroxylase의 gene이 plasmid에 coding되어 있다고 생각되는 *S. aureofaciens*의<sup>32)</sup> p-hydroxylase 활성을 다시 Shihabi법으로 time study하여 정량적으로 비교한 결과 Figure 1과 같은 그래프를 얻었다.

두 균주 모두 acetanilide를 가한 후 5일 째에 product(acetaminophen)양이 최고에 달하며, 그 이후의 생성량은 아주 소량인 것을 볼 수 있는데 이는 acetanilide를 가한 후 5일째 즉, 재결종(transfer)후 7일째부터는 균주의 성장 곡선이 사멸기로 접어드는 것과 일치하는 결과이다.

**Cell Free Extract에서 효소 활성 검색**—*S. aureofaciens*의 경우, 18,000×g 상정액 및 100,

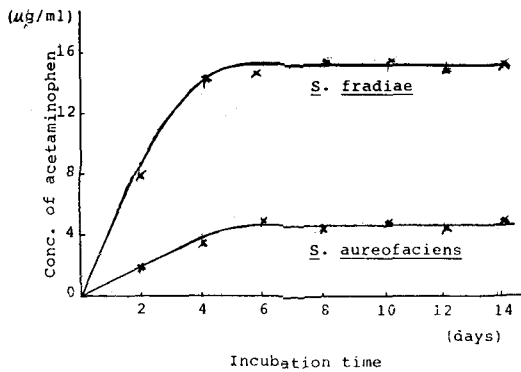


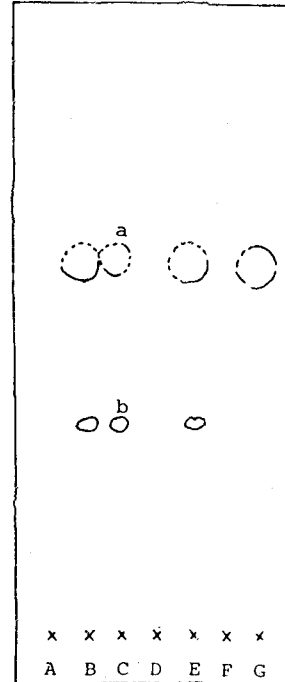
Fig. 1—Production of Acetaminophen in *S. aureofaciens* and *S. fradiae*

000xg 상정액와 100,000xg pellet 현탁물에 최종 농도가 200µg/ml가 되게 acetanilide 포화 용액을 첨가하고, 28°C, 180rpm rotary shaker에서 24시간 반응을 시킨 결과 18,000xg 상정액와 100,000xg 상정액에서 p-hydroxylase 활성을 확인할 수 있었으며, 100,000xg pellet에는 p-hydroxylase 활성이 없는 것을 알 수 있었다(Figure 2).

위의 결과는 sonication시 N<sub>2</sub> gas를 계속 주입했을 때 얻은 것으로 실제로 N<sub>2</sub> gas를 사용하지 않고 10분 이상 sonication한 경우 또 N<sub>2</sub> gas를 사용하지 않고 sonication 시간을 줄인 경우에는 어느 쪽도 효소 활성이 나타나지 않았다. N<sub>2</sub> gas의 존재 여부에 따라 효소 활성에 큰 차이가 있는 것으로 보아, 이 acetanilide p-hydroxylase는 O<sub>2</sub>에 대해 대단히 불안정한 효소임을 알 수 있다.

이 효소를 정제하기 위해 100,000xg 상정액을 ammonium sulfate로 salt fractionation하여 p-hydroxylase 활성을 조사한 결과, 어느 fraction에서도 그 활성을 확인할 수 없었는데, 이것도 또한 p-hydroxylase가 매우 불안정한 효소라는 생각을 뒷받침해 준다.

또한 100,000×g 상정액에는 효소 활성이 나타나고 100,000×g pellet에는 효소 활성이 없는 것으로 보아 *S. aureofaciens*의 acetanilide p-hydroxylase는 cytosol에 존재하는 효소라고 생각된다.



developing solvent  
 CHCl<sub>3</sub> : MeOH : HAc=85:15:1  
 Visualization  
 50% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in MeOH  
 1% K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> : 1% FeCl<sub>3</sub>=1:1  
 A : 18,000g supernatant (blank)  
 B : 18,000g supernatant (acetanilide)  
 C : standard a: acetanilide  
       b: acetaminophen  
 D : 100,000g supernatant (blank)  
 E : 100,000g supernatant (acetanilide)  
 F : 100,000g pellet (blank)  
 G : 100,000g pellet (acetanilide)

Fig. 2—Detection of p-Hydroxylation Activity in Various Fractions of Cell Free Extract of *S. aureofaciens*

*S. fradiae*의 경우 intact cell의 p-hydroxylase 활성은 *S. aureofaciens*의 3~4배가 되지만 cell free extract에서는 효소 활성을 확인할 수 없었다. 상당히 순한 조건에서 cell free extract를 조제하여 반응시켜도 마찬가지로 결과를 나타내었다.

따라서 *S. fradiae*의 acetanilide p-hydroxylase가 어느 fraction에 존재하는지는 아직 알 수 없다.

## Reduced CO Difference Spectrum의 측정—

*S. aureofaciens*와 *S. fradiae*의 cytosol fraction과 cytochrome P-450이 다량함유되어 있다고 알고 있는 rat liver microsomal fraction에 대하여 reduced CO difference spectrum을 측정 한 결과 Figure 3~Figure 5에서 보듯이 rat liver microsomal fraction에서는 cytochrome P-450의 특징적인 peak을 확인할 수 있었으며, *S. fradiae*의 경우에도 효소 활성은 확인하지 못했으나 cytosol fraction에서 446nm에 흡수 peak을 볼 수 있었다. 그러나 이 peak가 p-hydroxylase에 의한 것인지의 여부는 알 수 없다.

*S. aureofaciens*의 경우, 동일한 방법으로 측정하였으나 p-hydroxylase활성이 나타난 cytosol fraction에서 P-450의 peak은 볼 수 없었다. Cytosol에서 P-450 peak이 나타나지 않으므로, *S. aureofaciens*의 acetanilide p-hydroxylase는

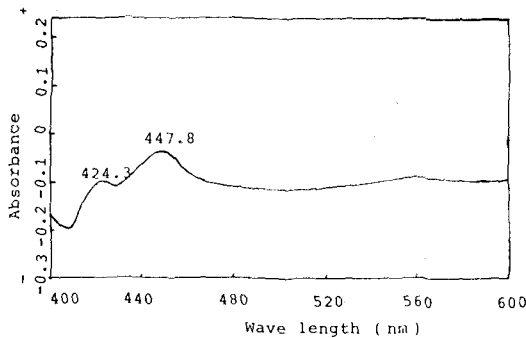


Fig. 3—Reduced carbon monoxide difference spectrum of rat liver microsomal fraction

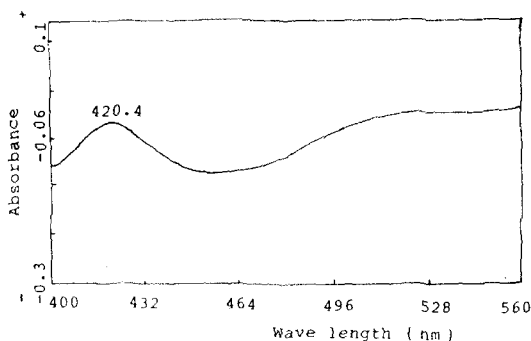


Fig. 4—Reduced carbon monoxide difference spectrum of *S. aureofaciens* cytosol fraction

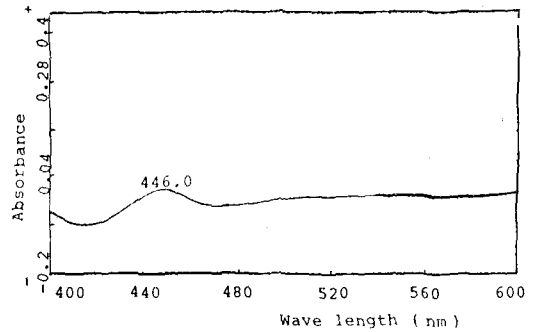


Fig. 5—Reduced carbon monoxide difference spectrum of *S. fradiae* cytosol fraction

P-450과는 무관하다고 생각된다.

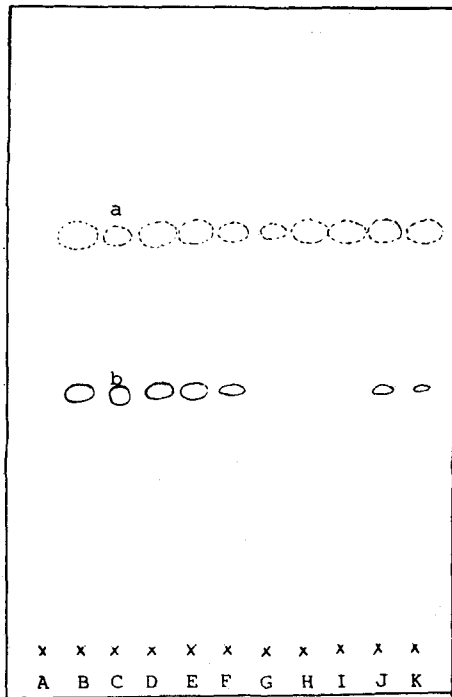
저해 시험—Figure 6에서 보듯이 저해제로 metyrapone, 2,6-dichloroindophenol을 가한 경우는 저해제를 가하지 않은 control과 거의 같은 효소 활성을 나타내었고, sodium cyanide를 가한 경우는 효소 활성이 어느 정도 감소하였으며, sodium azide를 가한 경우 acetaminophen이 거의 생성되지 않았을 뿐 아니라, acetanilide의 양도 다른 것에 비해 많이 줄었으며 실제로 acetaminophen 이외의 부산물들이 많이 생긴 것을 볼 수 있었다. Cupric sulfate와 cadmium chloride에 의해서는 효소 활성이 거의 완전히 억제되었는데, 이는 이들 금속 이온에 의해 효소 단백질이 변성되었기 때문이라 생각된다.

Iron chelator인  $\alpha, \alpha'$ -dipyridyl과 o-phenanthroline에 의해서도 상당량의 활성저하를 보였는데, 이로써 p-hydroxylase가 active site에 iron을 함유하는 효소임을 알 수 있다.

일반적으로 metyrapone은 cytochrome P-450의 특이적 저해제이고, 2,6-dichloroindophenol도 hepatic cytochrome P-450의 저해제로 작용하여 P-450을 P-420으로 변화시키며,<sup>20)</sup> cyanide에 의한 cytochrome P-450의 저해는 보고된 적이 없다.

또한, iron-sulfur protein인 steroid 9 $\alpha$ -hydroxylase의 경우, cyanide에 의해 효소 활성이 상당히 저하되고, sodium azide에 의해 완전히 제거된 보고가 있다.<sup>24)</sup>

이러한 inhibition study의 결과는 iron chelator



developing solvent

$\text{CHCl}_3 : \text{MeOH} : \text{HAc} = 85 : 15 : 1$

visualization

50%  $\text{H}_2\text{SO}_4$  in MeOH

1%  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6 : 1\% \text{FeCl}_3 = 1 : 1$

A : Blank (Cell suspension)

B : Cell suspension + Acetanilide

C : Standard a: Acetanilide

b: Acetaminophen

D : Cell suspension + Metyrapone + Acetanilide

E : Cell suspension + 2,6-dichloroindophenol + Acetanilide

F : Cell suspension + Sod. cyanide + Acetanilide

G : Cell suspension + Sod. azide + Acetanilide

H : Cell suspension + Cupric sulfate + Acetanilide

I : Cell suspension + Cadmium chloride + Acetanilide

J : Cell suspension +  $\alpha, \alpha'$ -Dipyridyl + Acetanilide

K : Cell suspension + o-Phenanthroline + Acetanilide

**Fig. 6**—Detection of p-Hydroxylation Activity in the Presence of Various Enzyme Inhibitor in *S. aureofaciens*

에 의해 효소 활성이 저하되고, 그 밖의 저해양상도 9 $\alpha$ -hydroxylase와 유사하게 나타나므로 이들 *S. aureofaciens*의 acetanilide p-hydroxylase

가 P-450관련 monooxygenase라기보다는 non-heme iron protein일 가능성을 제시해 준다.

## 결 론

*Streptomyces aureofaciens* ATCC 10762와 *S. fradiae* NRRL 2702에서 acetanilide p-hydroxylase에 대해 실험한 결과, *streptomyces aureofaciens*의 acetanilide p-hydroxylase 활성은 100,000xg 상정액에서 나타났고, 이들 효소는  $\text{O}_2$ 에 대해 매우 불안정하다. Cytosol fraction에 대해 reduced CO difference spectrum을 측정하였을 때, cytochrome P-450의 전형적인 peak을 관찰할 수 없었으며, metyrapone이나 2,6-dichloroindophenol에 의해서는 효소 활성이 억제되지 않는 반면 sodium azide나 sodium cyanide에 의해 효소 활성이 억제되었으며,  $\alpha, \alpha'$ -dipyridyl과 o-phenanthroline에 의해서도 효소 활성이 억제되었다. 그러므로, *S. aureofaciens*의 acetanilide p-hydroxylase는 cytochrome P-450 관련 monooxygenase라기 보다는 non-heme iron protein일 가능성이 크다.

한편, *S. fradiae*는 cell free extract에서 acetanilide p-hydroxylase 활성을 확인하지 못했으나, cytosol fraction에서 cytochrome P-450 peak을 얻었다. 그러나 이 cytochrome P-450가 acetanilide p-hydroxylase활성에 관계하는 것으로 아직 단정할 수는 없다.

## 참 고 문 헌

- 1) Genetic Technology; A New Frontier, Office of Technology Assessment, U.S. Congress. Westview press (1982).
- 2) Sohn, Y.W.: Microbial Synthesis of Acetaminophen, SNU. M.S. Thesis (1984).
- 3) Jeong, I.K.: Microbial Synthesis of Acetaminophen by Cell Fusion I, pp.26 (1985).
- 4) Sohn, M.W.: Microbial Synthesis of Acetaminophen by Cell Fusion of *S. lividans* and *S. globisporus*, SNU. M.S. Thesis (1986).
- 5) Chung, S.H.: Microbial Synthesis of Acetam-



- inophen through Protoplast Fusion between *S. aureofaciens* and *S. rimosus*, SNU. M.S. Thesis (1986).
- 6) Omura, T. and Sato, R.: *J. Biol. Chem.* **239**, 2370 (1964).
  - 7) Estabrook, R.W., Waterman, M., Peterson, J. Mason I. and Simpson, E.: 14th IUB Congress Abstracts, MO: C6-1, Prague, Czechoslovakia, July 10 (1988).
  - 8) Strijewski, A.: Int. Conf. Chem. Biotechnol. Biol. Act. Nat. Prod. 1st, 2, 215 (1981).
  - 9) Tsibris, J.C.M., Tsai, R.L., Gunsalus, I.C., Orme-Johnson, W.H., Hansen, R.E. and Beinert, H.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **59**, 959 (1968).
  - 10) Katagiri, M., Ganguil, B.N. and Gunsalus, I.C.: *Fed. Proc.* **27**, 525 (1968).
  - 11) Katagiri, M., Ganguli, B.N. and Gunsalus, I.C.: *J. Biol. Chem.* **243**, 3543 (1968).
  - 12) Yu, C-A., Gunsalus, I.C., Katagiri, M. Suhara, K. and Takemori, S.: *J. Biol. Chem.* **249**, 94 (1974).
  - 13) Lebeault, J-M., Lode, E.T. and Coon, M.J.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **42**, 413 (1971).
  - 14) Duppel, W., Lebeault, J-M. and Coon, M.J.: *Eur. J. Biochem.* **36**, 583 (1973).
  - 15) Berg, A., Carlström, K., Gustafsson, J-Å. and Ingelman-Sundberg, M.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **66**, 1414 (1975).
  - 16) Berg, A., Gustafsson, J-Å. and M. Ingelman-Sundberg: *J. Biol. Chem.* **251**, 2831 (1976).
  - 17) Berg A. and Rafter, J.J.: *Biochem. J.* **196**, 781 (1981).
  - 18) Cardini, G. and Jurtschuk, P.: *J. Biol. Chem.* **245**, 2789 (1970).
  - 19) Ferris, J.P., Fasco, M.J. and Stylianopoulou, F.L.: *Arch. Biochem. Biophys.* **156**, 97 (1973).
  - 20) Ferris, J.P., Macdonald, L.H., Patrie, M.A. and Martin, M.A.: *Arch. Biochem. Biophys.* **175**, 443 (1976).
  - 21) Smith R.V. and Rosazza, J.P.: *Arch. Biochem. Biophys.* **161**, 551 (1974).
  - 22) Fisher, D.B., Kirkwood, R. and Kaufman, S.: *J. Biol. Chem.* **247**, 516 (1972).
  - 23) Petrack, B., Sheppy, F. and Fetzer, V.: *J. Biol. Chem.* **243**, 743 (1968).
  - 24) Strijewski, A.: *Eur. J. Biochem.* **128**, 125 (1982).
  - 25) Bernhardt, F.H., Ruf, H.H. and Standinger, H.: *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **352**, 1091 and **351**, 467 (1971, 1970).
  - 26) Bernhardt, F.H., Erdin, N., Standinger, H. and Ullrich, V.: *Eur. J. Biochem.* **35**, 126 (1973).
  - 27) Shihabi and David, R.M.: *Therapeutic Drug Monitoring* **6**, 449 (1984).
  - 28) Hedegaard, J. and Gunsalus, I.C.: *J. Biol. Chem.* **240**, 4038 (1965).
  - 29) Sariaslani, F.S. and Kunz, D.A.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **141**, 405 (1986).
  - 30) Theriault, R.J., Longfield, T.H.: *Appl. Microbiol.* **15**, 1431 (1967).
  - 31) Rahim M.A., and Sih, C.J.: *J. Biol. Chem.* **241**, 3615 (1966).
  - 32) Lee, S.S., Jin, H.J. and Sohn, Y.W. in Recent Progress in Molecular Biology and Genetic Engineerin in Korea (1987), Edited by Institute for Molecuar Biology and Genetics, SNU.