

생쥐의 장내미생물로부터 새로운 술포트랜스훼라제 생산균의 분리

김병택 · 김은하 · 김동현*

경희대학교 약학대학

(Received August 21, 1992)

Isolation of Sulfotransferase Producing Bacteria from Mouse Intestinal Microflora

Byung-Taek Kim, Eun-Ha Kim and Dong-Hyun Kim*

College of Pharmacy, Kyung Hee University, Seoul 130-701, Korea

Abstract—*Haemophilus* K-12 producing novel sulfotransferase was isolated from mouse intestinal flora. The enzyme catalyzed the transfer of sulfate group from p-nitrophenylsulfate to phenolic compounds. The optimum medium condition for the sulfotransferase production was 0.2% sucrose, 1% yeast extract, Na_2HPO_4 and 0.5% NaCl. The enzyme production was induced by donor substrate, but was not by acceptors. When p-nitrophenylsulfate was used as a donor substrate, 1-naphthol was best substrate, followed by phenol, p-acetaminophenol and tyramine.

Keywords □ Sulfotransferase, sulfoconjugation, intestinal bacteria, *Haemophilus* K-12, productivity.

Baumann에 의해 phenol화합물의 주요 대사경로는 sulfotransferase에 의해 촉매되는 공여체기질로 3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate(PAPS)를 이용하여 페놀성 수용체기질로 황산기를 전이하는 반응을 촉매하는 arylsulfotransferase(EC. 2.8.2.1)는 Banerjee와 Roy에 의해 guinea pig liver로부터 정제된 이래²⁾ 간장, 뇌, 신장과 소장상피세포와같은 다양한 포유동물 기관에서 이 효소의 존재가 시사되었다.^{3,4)} 이들 효소의 공통점은 공여체기질로써 PAPS만을 이용하여 황산전이 반응을 촉매하여 생체내에서 황산포합에 기여한다는 점이다. 최근 사람과 흰쥐의 장내세균총으로부터 sulfotransferase생성균주가 분리되었으며 그 균주로부터 sulfotransferase를 분리, 정제한 결과 이 효소들은 지금까지 보고된 황산전이효소와는 전혀 다르게 sulfate 공여체로 PAPS가 아닌 phenylsulfate esters화합물만을 이용하는 효소임이 밝혀졌다.^{5,6)} 아

올러 이효소를 생산하는 장내미생물은 생체내에서 acetaminophen의 약물대사에 관여하여 황산포합체를 형성한다고 보고되어 있다.⁷⁾

한편, 최근 생체내 peptide성 생리활성물질이 보고되면서 posttranslational modification이 되어져있는 단백질(특히 sulfated peptides)의 경우는 유전공학 방법만으로는 한계점을 가지고 있어 새로운 방법이 요구되고 있으며 생리활성물질에 이러한 수식반응을 이용하면 새로운 생리활성물질의 합성이 가능하다. 이러한 수식반응은 생리활성물질의 생체내 반감기를 연장할 수 있어 우수한 효과를 기대할 수 있다.⁸⁾ 이러한 반응 *Eubacterium* A-44의 sulfotransferase가 이용되어져 왔지만 이균주가 혐기성이며 이 sulfotransferase는 열에 상당히 불안정하며 또한 기질특이성 때문에 극복하지 못하는 부분이 있다. 따라서 안정하면서도 새로운 기질특이성을 갖는 호기성 균주의 검색과 효소의 분리가 요구되어 왔다. 저자는 생쥐의 장내세균에서 기존의 세균성 sulfotransferase와는

*본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로.

다른 성질을 가진 새로운 sulfotransferase를 분리하고 효소의 생산성이 좋은 배지 조건을 검토하였다.

실험방법

시약 및 균주—General anaerobic medium(GAM), glucose blood liver agar(BL), Eggerth and Gagnoon agar(EG)는 일본 Nissui제약(주)로부터 구입했으며, brain heart infusion(BHI), yeast extract, bacto-peptone, hemoglobin는 Difco사로부터 구입했다. Starch, lactose, p-acetaminophen은 Wako Pure Chemical Industries사로부터 구입했으며, p-nitrophenylsulfate (PNS), 4-methylumbelliferyl sulfate(MUS), 1-naphthol, tyramine은 Sigma사로부터 구입했다. *Eubacterium* A-44의 sulfotransferase 효소는 Kim의 방법⁵⁾에 따라 분리정제하여 사용했다.

Sulfotransferase의 효소 활성측정⁶⁾—공여체기질로 50 mM p-nitrophenyl sulfate(PNS) 30 μ l, 수용체기질로 20 mM phenol 0.29 ml(경우에 따라서는 같은 농도의 페놀성 화합물), 0.1 M NaOH-glycine buffer (pH 10) 0.21 ml, 효소액을 0.1 ml 넣어 반응을 정지시킨후 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Sulfotransferase생성균의 검색—전보⁶⁾에서와 같이 마우스의 분(糞)을 회석한 액을 0.1 mM 4-methylumbelliferylsulfate을 함유하는 GAM, BL, EG agar plate에 접종하여 37°C에서 3~5일 배양한 후 UV lamp하에서 형광을 나타내는 colony들을 sulfotransferase양성균으로 하였다. 이 양성균에 대해서는 500 ml GAM배지 또는 brain heart infusion배지에서 배양하여 효소활성을 확인한 후 효소활성이 있는 균에 대해서 황산전이효소생성균으로 하였다.

균의 동정—Bergey's Manual에 따라 동정하였다.⁹⁾

균의 성장곡선과 효소 활성의 시간별 측정—Seed culture한 배양액을 1000 ml의 brain heart infusion 배지에 균을 접종시키고 37°C에서 배양하여 매 3시간 마다 1 ml씩 채취하여 그 탁도를 600 nm에서 흡광도측정 후 이 액을 3000 rpm에서 20분간 원심분리 후 초음파 처리하여 이 액을 효소액으로하여 sulfotransferase효소활성을 측정하였다.

Sulfotransferase의 부분정제—Seed culture한 배양액 10 ml를 brain heart infusion broth 1L에서 18시간 배양하여 집균 초음파처리한 뒤 원심분리하여



Fig. 1—The micrograph of *Haemophilus* K-12 ($\times 1000$).

그 상등액을 70% ammonium sulfate 분획, DEAE-cellulose column chromatography를 행하여 효소활성을 갖고있는 분획을 조효소액으로 사용하였다.

단백질 측정¹⁰⁾—단백질량 측정은 bovine serum albumin을 표준으로하여 Lowry 등의 방법에 따라서 행하였다.

Haemophilus K-12 균주의 배양조건—균주를 분리한 뒤 균배양을 위한 배지로 BHI 및 합성배지를 이용하여 sulfotransferase 생산성을 검토하였다.

탄소원의 효과시험— Na_2HPO_4 0.5 g, NaCl 1 g, yeast extract 2 g을 이온교환 수지를 통한 물 200 ml에 녹인후 탄소원을 0, 0.1, 0.2, 0.5, 1, 5% 농도로 첨가하여 만든 배지에 1% seed culture액을 이식하여 18시간 배양한 후 효소활성을 측정하였다.

질소원의 효과시험— Na_2HPO_4 0.5 g, NaCl 1 g, sucrose 2 g을 이온교환수지를 통한 물 200 ml에 넣은뒤 질소원을 1% 농도로 첨가하여 만든 배지를 이용하여 위의 방법에 준하여 측정하였다.

기질에 의한 유도시험—공여체로써 PNS, 수용체로써 p-acetaminophen을 각각 최종농도 0, 1, 2, 5, 10 mM로 배지에 첨가하고 또한 PNS와 p-acetaminophen을 위와 같은 농도로 병용첨가하여 위 방법에 준하여 측정하였다.

실험결과 및 고찰

생쥐로부터 새로운 sulfotransferase를 생성하는 균주 생쥐의 장내세균중에서 sulfotransferase활성이 있는 것으로 확인된 것은 4종류였으며 그 중에서 가장 활성이 높은 것을 K-12라 명하였다(Fig. 1).

Table I—Charcterization of K-12 producing a sulfotransferase

Charactreistics	K-12	<i>Haemophilus spp.</i>
VP	+	+
MR	+	+
Catalase	+	+
Oxidase	+	+
Indole production	+	+
H ₂ S production	-	-
Motility	-	-

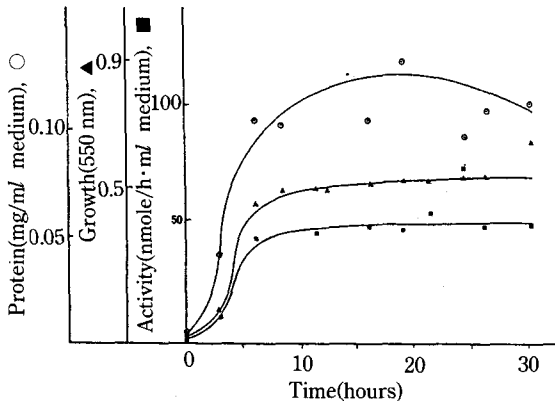


Fig. 2—Time course of the *Haemophilus K-12* growth and novel sulfotransferase production.

이 K-12균주는 혐기적 및 호기적 양 조건하에서도 잘자라는 통성혐기성 균이었으며 포자를 형성하지 않는 Gram 음성의 구간균이었다. K-12균주는 또한 Voges-Proskauer(VP) test, methyl red, catalase, oxidase test와 indole production은 양성이었으며 H₂S 생성과 운동성은 음성이었다(Table I). 이상의 실험 결과로 미루어 보아 이 균주는 *Haemophilus*속의 한 균주로 사려되어 K-12균주를 *Haemophilus K-12*라 명명하였다.

Haemophilus K-12균의 성장곡선과 효소활성의 시간별 측정

이식한 이후부터 서서히 균은 증식하기 시작하여 약 10시간에서 완전히 성장하였으며 효소활성도 이것과 비례하여 이후 약 30여 시간까지 일정하였다 (Fig. 2).

수용체기질 특이성

Haemophilus K-12 균주로부터 부분정제하여 specific activity가 34 nmole/min/mg protein인 효소를 얻

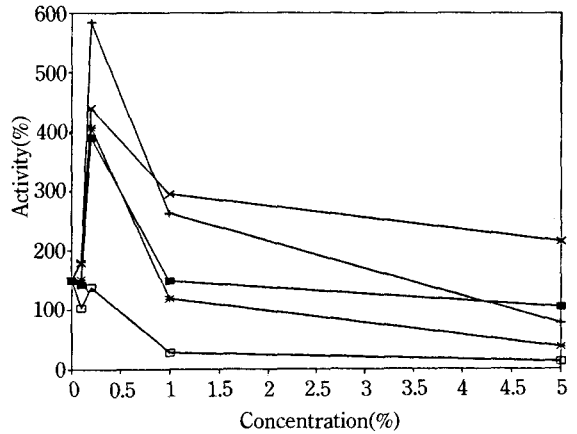


Fig. 3—Effect of carbon sources on the enzyme production: sucrose(+), lactose(x), starch(■), dextrin(*) and maltose(□). Activity was indicated, compared to the production of brain heart infusion broth.

어 수용체의 기질 특이성을 조사하였다.

페놀을 100으로 하였을때 1-naphthol이 233%로 가장 좋은 기질이였으며 p-acetaminophenol, tyramine, tyrosine, 9-phenanthrol은 각각 15.9%, 15.2%, 6.1%, 1.4%로 좋은 기질이 되지 못했다. *Eubacterium A-44* sulfotransferase의 좋은 기질이었던 p-acetaminophenol, tyramine, 9-phenanthrol이 *Haemophilus K-12* sulfotransferase에서는 별로 좋지않은 기질인 것으로 보아 *Haemophilus K-12* sulfotransferase가 *Eubacterium A-44* sulfotransferase와는 다른 별개의 효소임을 시사한다.

배지조성에 따른 sulfotransferase의 생산성

탄소원의 영향—탄소원의 농도가 증가할 수록 sulfotransferase생산성은 좋았으며 0.2%에서 대체적으로 활성이 높았고 그 이상의 농도에서 활성의 저하를 보였다. 탄소원 0.2% 농도에서는 sucrose가 584%로 가장 높았으며 lactose, starch순이었다(Fig. 3).

질소원의 영향—Yeast extract가 266%로 가장 높았고 peptone, hemoglobin 순이었다(Fig. 4).

금속이온 및 배지 pH의 영향—2가 금속이온에 의한 효소생산성증가는 현저하지 않았으며 Mn⁺⁺이 107% 가장 높았다(Fig. 5). Zn⁺⁺과 Ni⁺⁺, EDTA에 의해서는 저해를 받았는데 이것으로 보아 특히 Zn⁺⁺은 효소저해제라 생각되어지며 EDTA에 의한 저해는 K-

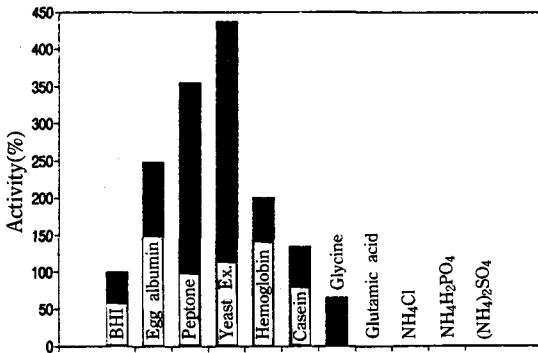


Fig. 4—Effect of nitrogen sources on the enzyme production.

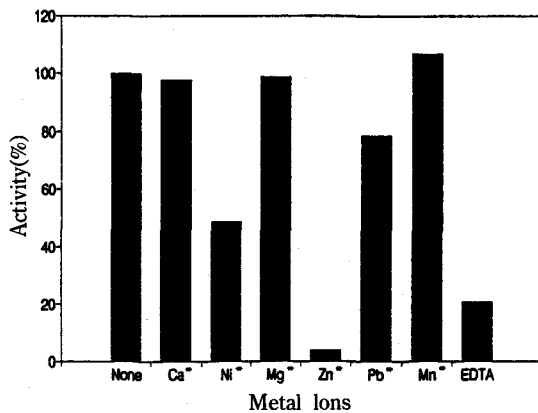


Fig. 5—Effect of metal ion on the enzyme production.

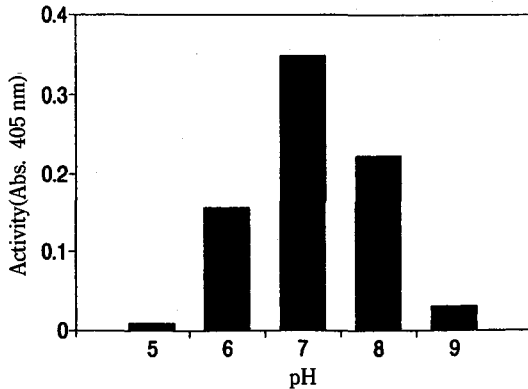


Fig. 6—Effect of medium-pH on the enzyme production.

12 sulfotransferase가 metalloenzyme 또는 이 효소의 생산성이 좋은 배지 pH는 7이었으며 산성과 알칼리성에서는 성장하지 못하였으며 아울러 생산성도 좋지 못했다(Fig. 6).

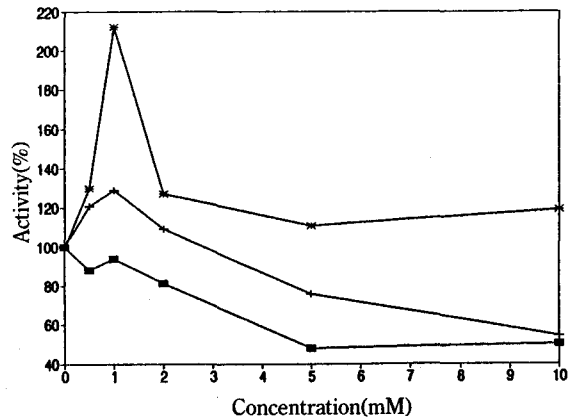


Fig. 7—Induction of the sulfotransferase of *Haemophilus K-12* by its substrates: PNS(*), p-acetaminophenol(■) and PNS + p-acetaminophenol (+).

Table II—Acceptor substrate specificity

Acceptor	Activity*(%)	
	K-12	A-44
Phenol	100	100
p-Acetaminophenol	15.9	129
Tyramine	15.2	100
Tyrosine	6.1	0.2
1-Naphthol	233	1560
9-phenanthrol	1.4	1390

*Specific activity of the enzyme for PNS+phenol was 34 nmol/min/mg protein.

공여체, 수용체 기질의 첨가에 의한 영향—p-acetaminophenol은 효과가 없었으며 오히려 저해를 나타내었으며 1 mM 이상에서는 현저히 활성이 감소하였다(Fig. 7). PNS와 p-acetaminophenol의 병용첨가에 의해서는 1 mM에서 가장 높은 효소유도를 나타내 129% 증가를 보였으나 그 이상의 농도에서는 점차 감소하였다. 가장 높은 효소 유도는 PNS의 단독첨가에 의해 1 mM에서 212%의 증가를 보였다.

수용체기질특이성

K-12 sulfotransferase의 수용체에 대한 기질 특이성을 *Eubacterium A-44* sulfotransferase와 비교한 것을 Table II에 나타냈다. K-36 sulfotransferase의 가장 큰 특징은 A-44와 같이 1-naphthol이 가장 높았으며, phenol, p-acetaminophenol, tyramine 순이었다.

결 론

생쥐의 장내세균으로부터 황산전이 반응을 촉매하는 효소인 sulfotransferase를 생산하는 균주를 분리하였으며 동정결과 *Haemophilus*속 균주로 확인되어 *Haemophilus K-12*라 명명하였다. 균의 성장과 효소 활성과의 관계를 보면 균은 10시간에서 완전히 성장하였으며 효소활성도 이와 비례하였다.

*Haemophilus K-12*의 배지조성에 따른 sulfotransferase의 생산성을 보면 탄소원으로는 sucrose가 0.2% 농도에서 584%로 가장 좋았으며 질소원으로는 yeast extract가 266%로 가장 높았다. 공여체와 수용체의 첨가에 의한 영향을 보면 공여체로 p-nitrophenylsulfate를 최종농도 1 mM로 하여 배지에 첨가하였을 때 212%로 가장 높은 효소증가를 보였다. 이상의 결과를 종합하여 균배양을 위한 이상적인 배지조성을 sucrose 0.2%, yeast extract 1%, Na₂HPO₄ 0.25%, NaCl 0.5%로 결정하였다.

수용체 기질특이성을 살펴본 결과 1-naphthol이 phenol을 100%로 하였을 때 233%로 가장 좋았으며, *Eubacterium A-44* sulfotransferase의 좋은 기질이었던 p-acetaminophenol, tyramine, 9-phenanthrol은 좋은 기질이 되지 못했다.

감사의 말씀

본 연구는 경희대학교 1991년도 연구지원비에 의하여 이루어졌기에 감사할 드립니다.

문 헌

1) Baumann, E.: Über gepaarte Schwefelsäure im

Organisms. *Pflugers Arch. Gesamte Physiol.*, **13**, 285 (1976).

2) Banerjee, R. K. and Roy, A. B.: The sulfotransferase of guinea pig liver. *Mol. Pharmacol.*, **2**, 56 (1966).

3) Roy, A. B.: *Sulfotransferases (Sulfation of Drugs and Related Compounds)*, CRC Press p. 131(1981).

4) Jakoby, W. B., Sekura, R. D., Lyon, E. S., Marrous, C. J. and Wang, J. L.: *Sulfotransferases (Enzymatic Basis of Detoxification)*, Vol. 2, Academic Press, p. 199(1980).

5) Kim, D.-H., Konishi, L. and Kobashi, K.: Purification, characterization and reaction mechanism of novel sulfotransferase obtained from an anaerobic bacterium of human intestine. *Biochim. Biophys. Acta* **872**, 34(1986).

6) Kim, H.-S. and Kim, D.-H.: Novel phenol sulfotransferase of *Klebsiella K-36*, rat intestinal bacterium. *Yakhak Hoeji* **36**, 167(1992).

7) Kim, D.-H. and Kyoichi, K.: The role of intestinal flora in the metabolism of phenylsulfate esters. *Biochem. Pharmacol.*, **30**, 350(1986).

8) Konishi-Imamura, L., Kim, D.-H. and Kobashi, K.: Effect of enzymatic sulfation on biochemical properties of catecholamines and tyrosine-containing peptides. *Chem. Pharm. Bull.*, **39**, 2994(1991).

9) Kreig, N. R. and Holt, J. G.: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Williams & Wilks, p. 558 (1984-1989).

10) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265(1951).