

*Mycobacterium fortuitum*의 스테로이드 9 α -하이드록실라제의 분리 및 부분정제

강 희 경*

서울대학교 약학대학

(Received July 12, 1997)

Isolation and Partial Purification of the Steroid 9 α -Hydroxylase from *Mycobacterium fortuitum*

Hee Kyoung Kang*

College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

Abstract-The steroid 9 α -hydroxylase activity has been detected in cytosol fraction. 100,000 \times g supernatant of cell free extract of *Mycobacterium fortuitum*. The activity was not linear with protein concentration in the assay suggesting 9 α -hydroxylase is a multicomponent enzyme. The 9 α -hydroxylase system was partially purified through fractional saturation of ammonium sulfate, strong anion exchange (Mono Q) column chromatography, gel filtration (Superose 12) column chromatography, and testosterone affinity gel chromatography. Ammonium sulfate 50~60% saturated fraction of the cytosol gave 9 α -hydroxylase activity. For further purification, the half-saturated ammonium sulfate fraction was applied to Mono Q, Superose 12, or affinity gel column. The purification factors of 9 α -hydroxylase containing fraction after Mono Q, Superose 12, and affinity gel chromatography was 13, 11, and 17 respectively.

Keywords □ steroid 9 α -hydroxylase, partial purification, multicomponent enzyme, fractional saturation of ammonium sulfate, Mono Q chromatography, Superose 12 chromatography, testosterone affinity gel chromatography.

스테로이드 9 α -hydroxylase에 대한 효소차원의 연구는 1960년대에 처음 시도되었다.¹⁾ 이때 *Nocardia res-trictus*의 crude cell free extract에서는 9 α -hydroxylase 활성이 나타났으나, 막에 결합된 효소의 정제를 위해 막을 가용화하였을 때는 효소활성을 찾을 수 없었다. 그후 1982년에 Strijewski는 *Nocardia* sp.에서의 9 α -hydroxylase는 세포 원형질 분획에 존재하며, 이 효소는 NADH 의존성 flavoprotein reductase와 Protein II, Protein III의 3개의 단백질로 이루어진 전자전달계로서 terminal oxidase인 Protein III가 시토크롬 P450이 아닌 non-heme iron sulfur 단백질이라

고 밝혔다.²⁾ 그러나 9 α -hydroxylase계를 구성하는 단백질 중 어느하나도 정제되지는 않았다.

특히 스테로이드 자화균주인 *Mycobacterium fortuitum*은 콜레스테롤이나 시토스테롤같은 스테롤의 측쇄 분해능이 커서 부신피질 호르몬제의 중요한 전구체인 9 α -hydroxy-androstenedione의 양산에 적합한 것으로 알려져 있다.^{3,4)} 그런데 *M. fortuitum*의 스테로이드 9 α -hydroxylase에 대해서는 연구가 매우 미진한 상태이므로, 이 균주에서의 9 α -hydroxylase에 대한 연구가 필요하다.

본 연구에서는 *M. fortuitum*으로 부터 9 α -hydroxylase를 분리, 부분정제 하였다. 이와같은 시도는 미생물 수산화 효소의 성질 규명에도 그 일익을 담당할 것이며 나아가서는 유전자 조작에 의한 산업적으로 유

* 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 02-740-8294 (팩스) 02-765-3855

용한 균주개발에도 이바지할 수 있을 것이라 사료된다.

실험 방법

사용 균주

본 실험에서는 스테로이드 자화능이 강한 *Mycobacterium fortuitum* ATCC 6842(*M. fortuitum* KCTC 1122)를 한국과학기술연구원 유전공학센터 유전자은행 (Korean Collection for Type Cultures, KCTC)에서 분양받아 사용하였다.

균주의 배양 및 세포 원형질 분획의 분리

*M. fortuitum*을 100 ml의 M 배지 (nutrient broth 8 g : Difco 사, yeast extract 1 g : Difco 사, glycerol 5 g, tween 80 1 g/l)에 접종하여 28°C, 160 rpm 진탕배양기에서 72시간 배양한 후, 이 배양액을 1 l의 배지에 10%로 재접종하여 36시간 더 배양하였다. 이 배양액에 9 α -hydroxylase의 유도물질로 N, N'-dimethylformamide(DMF)에 녹인 프로제스테론 (Sigma 사)을 최종 농도가 200 mg/l이 되게 가하여 12시간 더 배양하였다. 이 배양액을 10,000 \times g에서 7분간 원심분리(Beckman Model J2-21M/E 원심분리기)하여, 세포를 수확하였다. 이 수확한 세포를 배양액의 1/10에 해당하는 양의 25 mM 3-(N-morpholino)propane-sulfonic acid(MOPS : Sigma 사) 완충용액(pH 8.0)으로 세척하여 -70°C 냉동기에 보관하였다. -70°C에 보관했던 세포를 상온에 방치하여 녹인 다음, 세포 무게(wet weight)의 25%에 해당하는 양의 glass bead(150~212 microns, acid-washed : Sigma 사)와 함께 세포를 충분히 grinding하였다. 여기에 세포무게의 2배 정도의 buffer A (10% glycerol, 2 mM 1,4-dithiothreitol(DTT : Sigma 사), 100 μ M phenylmethyl sulfonyl fluoride(PMSF : Sigma 사)를 포함하는 25 mM MOPS, pH 8.0)을 가하여 현탁시킨 다음, 이를 초음파 분쇄(30 μ output, 50% duty cycle: Branson Sonifier 450)하였다. 이 현탁액의 20,000 xg 상징액을 cell free extract로 사용하였고, 침전물은 다시 buffer A로 현탁시켜 앞의 과정을 반복 시행하였다. 얻어진 cell free extract를 Beckman Model L-80 초원심분리기를 이용하여 100,000 \times g에서 90분간 원심분리하였으며, 여기서 얻어진 상징액을 세포원형질 분획으로

침전물은 buffer A로 현탁시켜 세포 원형질막 분획으로 사용하였다. 앞의 조작은 언급이 없는 한 모두 0~4°C에서 행하였다.

9 α -Hydroxylase 활성 검색

9 α -Hydroxylase 활성 검색을 위한 기질로는 9(11)-dehydro-17 α -methyl-testosterone(DHMT)를 사용하였다.⁵⁾ 기질인 DHMT에서 9 α -hydroxylation에 의해 생성되는 9 α ,11 α -oxido-17 β -hydroxy-17 α -methyl-4-androstene-3-one(9 α ,11 α -oxido-MT)와 Δ^1 -dehydrogenation 과 9 α -hydroxylation에 의해 생성되는 9 α ,11 α -oxido-17 β -hydroxy-17 α -methyl-1, 4-androstadiene-3-one(9 α ,11 α -oxido- Δ^1 -MT)를 박층 크로마토그래피와 HPLC(High Performance Liquid Chromatography) 분석하였다. 반응용액에 ethanol에 녹인 DHMT 50 μ g을 가하고, 총 반응액을 5 ml로 한 다음 30°C에서 20 분간 반응시켰다. 이 반응액을 10 ml의 ethylacetate로 추출한 다음, 그 ethylacetate층을 감압농축하였다. 박층 크로마토그래피 분석은 감압 농축시킨 잔사에 ethylacetate 100 μ l를 가한 다음 이중 3 μ l를 박층 크로마토그래피판(254 nm 형광, Sigma사)에 점적하고, 전개용매로 chloroform/methanol(96:4, v/v)를 사용하여 행하였으며, 검색은 UV 램프(단파장)를 이용하였다. HPLC 분석은 다음과 같이 행하였다. 감압 농축시킨 잔사에 methanol 500 μ l, chloroform 500 μ l, 증류수 500 μ l를 차례로 가하고 이것을 원심분리 하였다. 그중 chloroform층 25 μ l만을 취하여 475 μ l의 acetonitrile과 혼합하여, 이중에서 50 μ l만을 HPLC 분석하였다. HPLC분석은 reverse phase C₁₈-column(2.5 \times 150 mm, particle size 4 μ m : Cosmosil 사)을 사용하여 HPLC system(Pump : LC-9A, UV detector : SPD-6AV, System controller : SCL-6B, Integrator : C-R6A, Shimadzu 사)를 이용하여 실시하였다. Mobile phase는 50% acetonitrile/H₂O를 사용하였으며, 유속은 0.5 ml/min으로 하여 238 nm에서 정량하였다.

단백질 정량

가용성 단백질의 함량은 Bradford 방법에 의해 실시하였다. 표준물질로는 bovine serum albumin (Sigma 사)을 사용하였으며, 595 nm에서의 흡광도 변

화로 단백질 농도를 측정하였다.⁶⁾

황산 암모늄 분획

세포 원형질 분획에 황산 암모늄(Sigma 사)를 가하여 0°C에서 천천히 교반하였다. 이 황산 암모늄 포화용액을 15,000×g에서 30분간 원심분리하여 침전물을 모았다. 각 황산 암모늄 포화 분획의 침전물을 충분한 양의 buffer A에 녹인 후, YM10 membrane(Amicon 사)을 사용하여 한외여과법으로 염을 제거하면서 단백질 용액을 농축하였다. 농축시킨 각 분획에 기질인 DHMT를 50 µg 가한 다음, 이를 앞의 9α-hydroxylase 활성 검색시의 반응조건으로 반응시켰다. 이 반응물의 ethylacetate 추출물을 박층 크로마토그래피 분석하여, 9α-hydroxylase 활성을 나타내는 황산 암모늄 포화 분획을 확인하였다.

Mono Q column 크로마토그래피

황산 암모늄 포화 분획으로 9α-hydroxylase 활성이 있는 것으로 확인된 세포 원형질 분획의 황산 암모늄 50~60% 포화 분획의 침전물을 충분한 양의 buffer B (10% glycerol, 2 mM DTT, 0.2% Aprotinin; Sigma 사, 0.2% Leupeptin; Sigma 사를 포함하는 25 mM MOPS, pH 8.0)에 녹였다. 이를 YM10 membrane을 이용하여 한외여과하였으며, 농축된 단백질 용액에 대해 Mono Q column(HR 5/5 : Pharmacia 사) 크로마토그래피를 실시하였다. Mono Q column을 우선 buffer B로 평형시킨 다음, 농축시킨 단백질 용액 500 µl를 점적하였다. 6 ml의 buffer B를 흘려보낸 후에, 0~0.75 M KCl/buffer B 농도 구배로 단백질을 용출시켰다. 이때 유속은 0.5 ml/min으로 하였으며, 한 분획을 1 ml씩으로 모았다. 각 분획의 단백질 양은 280 nm에서의 흡광도로 측정하였으며, 각각의 분획을 몇개씩 모아 농축한 다음 9α-hydroxylase 활성 검색을 실시하였다. 기질인 DHMT를 50 µg 가하여 주고, 보조인자로 NADH를 250 µM이 되게 가하였다. 이를 30°C에서 20분간 반응시킨 후, 반응물의 ethylacetate 추출물에 대해 HPLC 분석을 행하여 9α-hydroxylase 활성을 측정하였다.

Superose 12 column 크로마토그래피

9α-hydroxylase 활성을 보이는 세포 원형질 분획의 황산 암모늄 50~60% 포화 분획의 침전물을 소량의

buffer B에 녹였다. 이 단백질 용액에 대해 Superose 12 column(HR 10/30 : Pharmacia 사) 크로마토그래피를 실시하였다. Buffer B로 평형된 Superose 12 column에 단백질 용액 200 µl를 점적하고, buffer B로 유속이 0.3 ml/min이 되게 유출시켜, 한 분획을 600 µl 씩으로 모았다. 각 분획의 단백질 양은 280 nm에서의 흡광도로 측정하였으며, 여러 분획을 모아 농축한 다음 9α-hydroxylase 활성 검색을 실시하였다. 기질인 DHMT를 50 µg 가하고, 보조인자로 NADH를 250 µM이 되게 가하였다. 이를 30°C에서 20분간 반응시킨 후, 반응물의 ethylacetate 추출물에 대해 HPLC 분석을 행하여 9α-hydroxylase 활성이 있는 가를 확인하였다.

Affinity gel의 제조

Affinity gel 크로마토그래피를 이용하기 위하여 테스토스테론을 ligand로 갖는 affinity gel을 제조하였다. 우선 epoxy-activated Sepharose 6B (Pharmacia 사) dry gel을 증류수에 현탁시킨 후, sintered glass filter에서 1시간 동안 증류수로 계속 씻어주면서 swelling하였다. 이 gel 현탁액에 DMF에 녹인 테스토스테론과 0.3 M Na₂CO₃를 1:1로 섞어 가하였다. 이때 테스토스테론의 양은 gel 1g에 대해 100 µmol이 되게 하였으며, DMF는 gel 현탁액과 같은 양 사용하였다. 이것을 40°C에서 20시간 반응시킨 다음, 0.3 M Na₂CO₃/DMF(1:1)의 coupling 용액으로 반응하지 않고 남아있는 테스토스테론을 씻어주었다. 여기에 1 M ethanolamine을 가하여 10시간 동안 40°C에서 반응시킨 다음, 0.5 M NaCl을 포함하는 0.1 M acetate 완충용액(pH 4.0), 증류수, 0.5 M borate 완충용액(pH 8.0)으로 계속 3번 반복하여 gel을 씻어주었다. 이 gel을 buffer A로 평형시킨 후, column에 충전하였다.

Affinity gel 크로마토그래피

9α-Hydroxylase 활성을 보이는 세포 원형질 분획의 50~60% 황산 암모늄 포화 분획의 침전물을 충분한 양의 buffer A에 녹였다. 이를 YM10 membrane을 이용하여 충분히 한외여과하였으며, 이 농축된 단백질 용액에 대해 ligand로 테스토스테론이 coupling된 Sepharose 6B gel을 사용하여 affinity 크로마토그래피를 실시하였다.

Affinity gel이 충전된 column(1×6.8 cm)에 앞의

농축시킨 단백질을 점적한 다음, 30 ml의 buffer A로 용출시켰다. 그리고 나서 0.1 M NaCl을 포함하는 buffer A 12 ml, 1.0 M NaCl을 포함하는 buffer A 12 ml로 계속 용출시켰다. 각 용출된 분획을 YM10 membrane을 사용하여 한의여과한 후, 9 α -hydroxylase 활성 검사를 행하였다. 농축된 용출 분획에 DHMT를 50 μ g 가하고, 보조인자로 NADH를 250 μ M이 되게 가하였다. 이를 30°C에서 20분간 반응시킨 후, 반응물의 ethylacetate 추출물에 대해 HPLC 분석을 행하여 9 α -hydroxylase 활성을 측정하였다.

단백질의 전기영동

단백질을 분자량에 따라 분리하기 위해 sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)를 행하였다. SDS-PAGE 하고자 하는 각 단백질 분획에서 총 단백질 양이 20 μ g이 되게 취하여 여기에 5배 양의 acetone을 가하였다. 이것을 -70°C에서 30분간 방치한 다음 15,000 \times g에서 10분간 원심분리하여 침전물을 얻었다. 이 침전물을 gel loading buffer(50 mM Tris pH 6.8, 10% glycerol, 2% SDS, 0.1% bromophenol blue, 100 mM DTT) 5 μ l에 녹인 후 100°C 끓는 물에서 5분간 가열하여 완전히 변성된 시료를 얻었다. 단백질 분자량 marker(high molecular weight marker: BRL 사)는 pre-stained된 것을 사용하였으며, 각 표준 단백질이 3 μ g씩 포함되게 하여 동일하게 조작하였다. 5% Stacking gel 및 12% resolving gel된 slab gel을 만든다음⁷⁾, 단백질 시료를 점적하고 Tris-glycine electrophoresis buffer(5 mM Tris pH 6.8, 50 mM glycine, 0.02% SDS)를 사용하여 20 mA로 전기영동하였다. 전기영동이 끝난 후 gel을 판에서 분리하여 염색액(0.1% Coomassie brilliant blue R250 in H₂O : MeOH : HAc=60:30:10)에 넣어 10분 동안 흔들어 주면서 염색하였다. 염색이 끝난후 gel을 탈색액(H₂O : MeOH : HAc=60:30:10)에 넣어 2~3회 탈색액을 갈아주면서 15시간 동안 탈색시켰다. 탈색이 끝난 gel을 이차 증류수로 씻어준 다음 셀로판지를 이용하여 상온에서 건조시켜 단백질 band를 확인하였다.

실험결과 및 고찰

*M. fortuitum*의 9 α -hydroxylase 활성을 나타내는

세포 원형질 분획의 단백질 농도에 따른 9 α -hydroxylase 활성을 정량하여, 이 효소가 하나의 단백질로 구성되어 있는지 아니면 활성을 나타내는데 2개 이상의 단백질이 요구되는지 알아보았다. 9 α -Hydroxylase의 활성 정량은 HPLC 분석을 이용하여, 기질인 DHMT에서 9 α -hydroxylase에 의해 9 α , 11 α -oxido-MT와 9 α , 11 α -oxido- Δ^1 -MT로 전환되는 정도로 확인하였다(Fig. 1).

그 결과 보통 단일 효소 작용에서 보여지는 단백질 농도 증가시 활성이 linear하게 증가하는 관계가 아닌, 다성분 효소 반응에서 보여지는 nonlinear한 형태를 보였다(Fig. 2). 이것은 *M. fortuitum*의 9 α -hydroxylase가 다성분 효소라는 것을 암시한다. 이런 결과는 *Nocardia* sp.의 9 α -hydroxylase가 3개의 단백질로 구성된 효소라는 점에서도 입증된다.²⁾ 그리고 대부분의 monooxygenase의 작용은 reductase를 포함하는 2개 또는 3개의 구성성분의 단백질에 의해 나타난다.⁸⁾ *Pseudomonas putida*에 존재하는 camphor-5-exo-monooxygenase⁹⁾, *Streptomyces griseus*의 시토크롬 P450_{80y}계¹⁰⁾, 스테로이드 hydroxylation 활성을 나

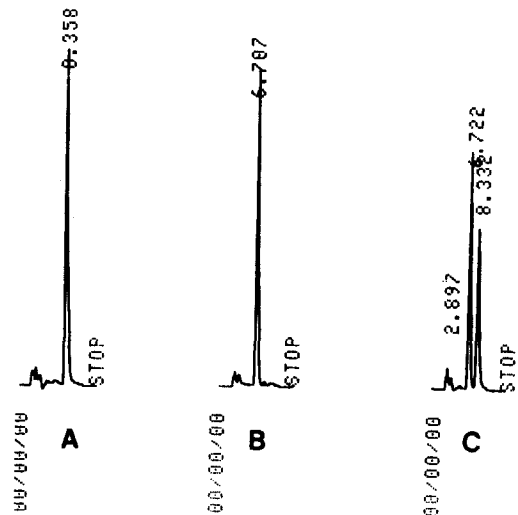


Fig. 1—The HPLC chromatograms of 9 α , 11 α -oxido compds. of 9(11)-dehydro-17 α -methyl-testosterone(DHMT). A and B exhibited 9 α , 11 α -oxido-17 β -hydroxy-17 α -methyl-4-androstene-3-one(9 α , 11 α -oxido-MT) and 9 α , 11 α -oxido-17 β -hydroxy-17 α -methyl-1,4-androstadiene-3-one(9 α , 11 α -oxido- Δ^1 -MT) as standards. C showed steroids after incubation of DHMT with cytosol of *M. fortuitum*. The retention time of DHMT was 12 min (data not shown).

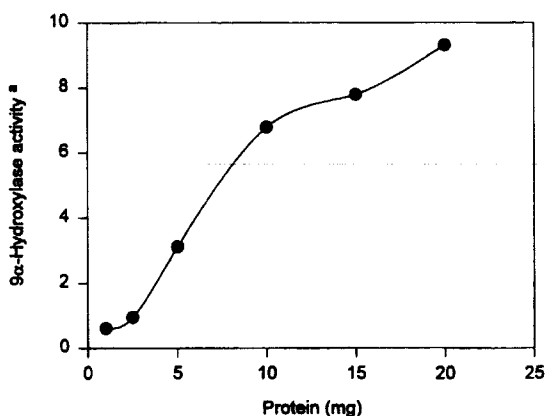


Fig. 2—Relationship between 9 α -hydroxylase activity and the amount of protein in the assay. Reaction was carried out in the cytosol fraction of *M. fortuitum*. ^aProduced 9 α , 11 α -oxido compds. of DHMT nmol/min.

타내는 *Bacillus megaterium*의 P450_{meg}계¹¹, P450_{lin} monooxygenase계¹², *Pseudomonas putida* JT810의 p-cymene의 수산화에 관여하는 monooxygenase계¹³, *Methylococcus capsulatus*의 methane monooxygenase¹⁴, *Pseudomonas oleovorans*의 지방산 ω -hydroxylase¹⁵, *Pseudomonas* sp.의 naphthalene dioxxygenase¹⁶, 그리고 *Mycobacterium*의 alkene monooxygenase¹⁷ 등이 널리 알려져 있다. 그러나, 시토크롬 P 450_{BM-3}인 지방산 monooxygenase는 단독으로도 충분한 촉매작용을 나타낸다.¹⁸

가용성의 형태로 존재하는 *M. fortuitum*에서 9 α -hydroxylase의 분리 및 정제는 단백질의 용해도 차이를 이용한 황산 암모늄 분획법, 전하량의 차이를 이용한 이온교환 크로마토그래피, 분자량의 차이를 이용한 gel filtration 크로마토그래피, ligand에 대한 친화도를 이용한 affinity 크로마토그래피를 실시하여 수행하였다. 스테로이드 자화균주인 *M. fortuitum*보다 *Nocardia*나 *Rhodococcus*의 9 α -hydroxylase 활성이 더 강하나, 이들 균주에서의 9 α -hydroxylase는 세포막에 결합된 형태로 존재하여¹⁹ 여러가지 계면 활성제등을 사용하여 가용화하였을 때는 효소 활성을 찾을 수 없었다. 그리고 *M. fortuitum*의 스테로이드 9 α -hydroxylase도 황산 암모늄 분획법으로 침전으로 떨어뜨렸을 때는 안정하나, 이것을 DEAE-cellulose 크로마토그래피 또는 Sephadex G-75 gel filtration 크로마토그래피 하였을 때는 활성을 찾을 수 없었다. 그래서

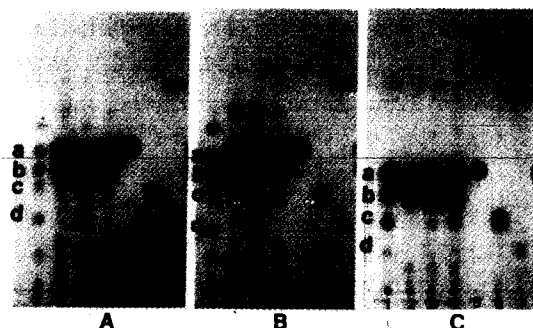


Fig. 3—The TLC profile of conversion of 9(11)-dehydro-17 α -methyl-testosterone by $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ precipitate of cytosol fraction of *M. fortuitum*. Lane 5, 6, and 7 designated "DHMT", 9 α , 11 α -oxido-MT, and 9 α , 11 α -oxido- Δ^1 -MT as standards. ^bexpected to be 9(11)-dehydro-17 β -hydroxy-17 α -methyl-1, 4-androstadiene-3-one(Δ^1 -DHMT). In A, lane 1, 2, 3, and 4 showed transformation patterns of DHMT by cytosol fraction, <30% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ fraction, 30~70% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ fraction, and >70% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ fraction, respectively. In B, lane 1, 2, 3, and 4 showed transformation patterns of DHMT by cytosol fraction, 30~45% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ fraction, 45~60% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ fraction, and 60~70% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ fraction, respectively. In C, lane 1, 2, 3, and 4 showed transformation patterns of DHMT by cytosol fraction, 45~50% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ fraction, 50~55% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ fraction, and 55~60% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ fraction, respectively.

FPLC(Fast Protein Liquid Chromatography)를 이용하였다. 그러나 FPLC를 사용하는 경우, 점적할 수 있는 단백질 양이 매우 적으므로 효소 활성을 측정하는데 어려움이 있었다.

우선 *M. fortuitum*의 세포 원형질 분획을 <30%, 30~70%, >70%의 황산 암모늄 포화 분획으로 나누는 다음 각 분획에서의 9 α -hydroxylase 활성을 박층 크로마토그래피 분석으로 확인하였다(Fig. 3-A). 그 결과, 스테로이드 9 α -hydroxylase 활성은 30~70% 황산 암모늄 포화 분획에서 나타났다. 이 30~70% 황산 암모늄 포화 분획을 좀 더 세분하여 30~45%, 45~60%, 60~70% 황산 암모늄 포화 분획으로 나누어 9 α -hydroxylase 활성을 측정하였을 때, 45~60% 황산 암모늄 포화 분획에서 이 효소의 활성을 확인할 수 있었다(Fig.3-B). 이 분획을 다시 45~50%, 50~55%, 55~60% 황산 암모늄 포화 분획으로 나누어 효소 활성을 검색한 결과, 50~55%와 55~60% 황산 암모늄 포화 분획에서 DHMT의 9 α , 11 α -oxido 화합물이 생성되

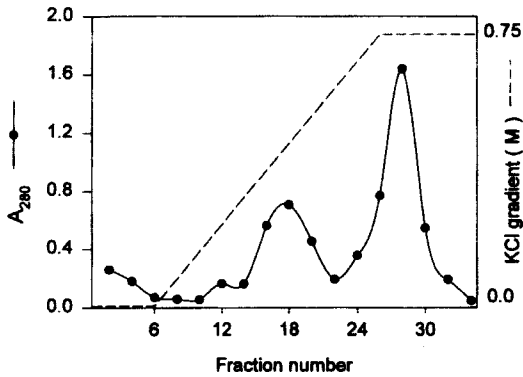


Fig. 4—Mono Q chromatography of 50~60% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ saturated fraction of cytosol from *M. fortuitum*.

는 것으로(Fig. 3-C), 50~60% 황산 암모늄 포화 분획에 스테로이드 9 α -hydroxylase가 존재함을 확인할 수 있었다.

*M. fortuitum*의 세포 원형질 분획의 50~60% 황산 암모늄 포화 분획을 YM10 membrane을 사용하여 한외여과하여 염을 제거한 후의 단백질 용액에서는 9 α -hydroxylase 활성이 35% 회수되었다. 이 단백질 용액을 FPLC용 anion exchange Mono Q column에 점적한 다음, 0~0.75 M KCl 농도 구배를 걸어주어 단백질을 용출시켰을 때, 9 α -hydroxylase는 0.3~0.4 M KCl에서 용출되었으며 효소 활성은 13% 회수되었고 specific activity는 13배 증가하였다(Fig. 4, Table I).

그리고 50~60% 황산 암모늄 포화 분획을 FPLC용 gel filtration column인 Superose 12를 사용하여 크로

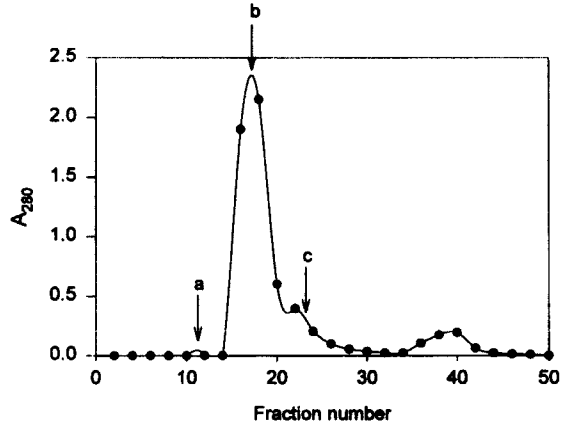


Fig. 5—Superose 12 chromatography of 50~60% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ saturated fraction of cytosol from *M. fortuitum*. As molecular weight markers, ^athyroglobulin(667,000 dalton), ^bbovine serum albumin(68,000 dalton), and ^c β -lactoglobulin(18,400 dalton) were used.

마토그래피 하였을 때는 specific activity가 세포 원형질 분획에 비해 11배 밖에 증가하지 않았다(Fig. 5, Table II). 그래서 ligand로 테스토스테론이 결합된 affinity gel을 만들어 affinity 크로마토그래피를 시행하였으며, 이 경우 9 α -hydroxylase의 specific activity는 Mono Q나 Superose 12 크로마토그래피 이용했을 때보다 좀 더 증가하였으나(Table III), ligand에 대한 친화도를 고려하면 크게 증가했다고 할 수 없다.

Affinity gel에서 부터 용출된 단백질을 SDS-PAGE 하여 9 α -hydroxylase의 band를 확인하였다(Fig. 6).

Table I—Purification of the steroid 9 α -hydroxylase from *M. fortuitum*

Step	Total Protein (mg)	Total activity ^a	Specific activity ^b	Recovery (%)	Purification factor
Cytosol fraction	374	965	2.6	100	1.0
50~60% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ saturated fraction	32	335	10.5	35	4.0
Mono Q chromatography	3.9	130	33.3	13	12.8

^aProduced 9 α , 11 α -oxido compds. of DHMT (nmol)

^bProduced 9 α , 11 α -oxido compds. of DHMT (nmol)/mg of protein

Table II—Purification of the steroid 9 α -hydroxylase from *M. fortuitum*.

Step	Total Protein (mg)	Total activity ^a	Specific activity ^b	Recovery (%)	Purification factor
Cytosol fraction	340	747	2.2	100	1.0
50~60% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ saturated fraction	56	599	10.7	80	4.9
	4.5	105	23.3	14	10.6

^aProduced 9 α , 11 α -oxido compds. of DHMT (nmol)

^bProduced 9 α , 11 α -oxido compds. of DHMT (nmol)/mg of protein

Table III—Purification of the steroid 9 α -hydroxylase from *M. fortuitum*

Step	Total Protein (mg)	Total activity ^a	Specific activity ^b	Recovery (%)	Purification factor
Cytosol fraction	1720	3680	2.1	100	1.0
50~60% (NH ₄) ₂ SO ₄ saturated fraction	192	1597	9.4	43	4.5
Affinity chromatography	9.6	345	36	9	17.1

^aProduced 9 α , 11 α -oxido compds. of DHMT (nmol)

^bProduced 9 α , 11 α -oxido compds. of DHMT (nmol)/mg of protein

Affinity gel에 단백질을 점적한 후 ligand에 결합된 단백질을 0.5 M NaCl, 0.1 M NaCl, 1.0 M NaCl로 용출 시에는 9 α -hydroxylase와 Δ^1 -dehydrogenase 활성을 동시에 확인할 수 있었다(Fig. 6: Lane 3, Lane 7, Lane 8). 그러나 ligand에 붙지않은 단백질을 용출시 (Fig. 6: Lane 1, Lane 2, Lane 4, Lane 5)에는 Δ^1 -dehydrogenase 활성은 찾을 수 없었으며, 9 α -hydroxylase 활성은 Lane 4의 단백질 분획에서만 확인이 되었는데, 그것은 affinity gel에 점적하는 단백질 용액에 염이 제대로 제거가 되지 않았기 때문으로 여겨진다. 이

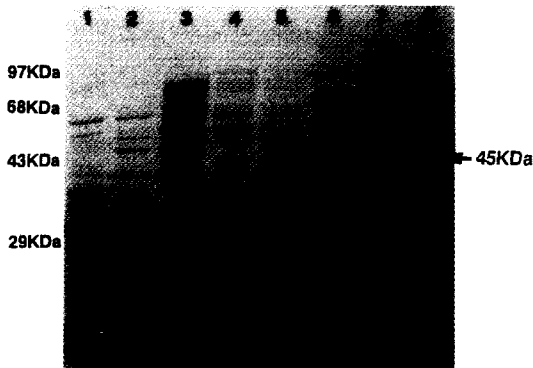


Fig. 6—SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of elution fractions from affinity chromatography step of 50~60% (NH₄)₂SO₄ saturated fraction of cytosol from *M. fortuitum*. Lane 6 showed SDS-PAGE patterns of molecular weight standards (myosin, 200,000; phosphorylase B, 97,400; bovine serum albumin, 68,000; ovalbumin, 43,000; carbonic anhydrase, 29,000; β -lactoglobulin, 18,400; lysozyme, 14,300). Lane 3, 7, and 8 exhibited electrophoresis of 0.5 M, 0.1 M, and 1.0 M NaCl eluent that gave 9 α -hydroxylase and Δ^1 -dehydrogenase activity. Lane 4 showed PAGE pattern of binding eluent that exhibited 9 α -hydroxylase activity. Lane 1, 2, and 5 showed electrophoresis of binding eluent that didn't give either of these activities.

와같은 결과로 Fig. 6의 Lane 3, 7, 8에서 나타나는 45,000 dalton 근처의 band가 혼재하는 Δ^1 -dehydrogenase에 의한 것으로 예상할 수 있었다. 그러나, *Nocardia corallina*에서 분리 정제된 Δ^1 -dehydrogenase의 분자량은 60 KDa이라고 보고되어 있다.²⁰

9 α -Hydroxylase를 구성하는 단백질에 대한 정보를 얻기위해 affinity 크로마토그래피 하여 강한 9 α -hydroxylase 활성을 보이는 1.0 M NaCl eluent를 Mono Q 크로마토그래피 하였다(Fig. 7). 여기서 얻어진 분획 중 앞의 Mono Q 크로마토그래피에서 9 α -hydroxylase 활성을 나타낸 분획이 0.3~0.4 M KCl eluent인 것을 고려하여, 9 α -hydroxylase 활성은 확인할 수 없었으나, 이 분획을 SDS-PAGE 하였을 때 50 KDa, 60 KDa, 72 KDa 정도의 3개의 band가 9 α -hydroxylase 효소 활성을 나타내는데 필요한 단백질에 의한 것으로 추정할 수 있었다(Fig. 8). 그러나 이 효소를 구성하는 단백질에 대한 정보는 전무한 상태이므로, 구성 단백질을 따로따로 분리 정제하여 특성을 규명하는 것이 바람직할 것이다.

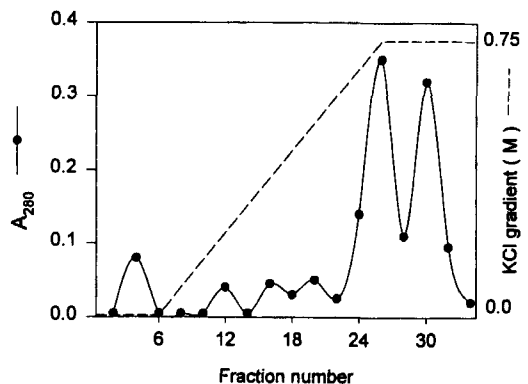


Fig. 7—Mono Q chromatography of the steroid 9 α -hydroxylase containing fractions resulting from affinity chromatography of (NH₄)₂SO₄ saturated fraction of cytosol from *M. fortuitum*.

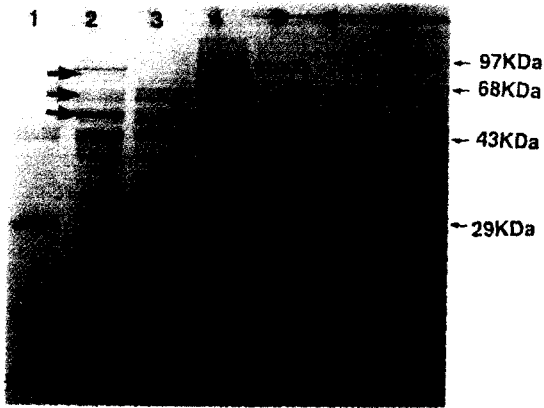


Fig. 8—SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of elution fractions from Mono Q chromatography step of 9 α -hydroxylase containing fraction resulting from affinity chromatography. Lane 1 and 7 showed SDS-PAGE patterns of molecular weight standards(myosin, 200,000; phosphorylase B, 97,400; bovine serum albumin, 68,000; ovalbumin, 43,000; carbonic anhydrase, 29,000; β -lactoglobulin, 18,400; lysozyme, 14,300). Lane 2 exhibited SDS-PAGE of 9 α -hydroxylase containing fraction from affinity chromatography. Lane 3, 4, 5, and 6 exhibited electrophoresis of 0.3~0.35 M, 0.35~0.4 M, 0.4~0.45 M, and 0.45~0.5 M KCl eluent from Mono Q chromatography, respectively.

문헌

- 1) Chang, F. N. and Sih, C. J. : Mechanisms of steroid oxidation by microorganisms. VII. Properties of the 9 α -hydroxylase. *Biochem.* **3**, 1551 (1964).
- 2) Strijewski, A. : The steroid 9 α -hydroxylation system from *Nocardia* species. *Eur. J. Biochem.* **128**, 125 (1982).
- 3) Kieslich, K. : *Biotechnology*, 6a, Verlag chemie, Weinheim, p. 50 (1984).
- 4) Marsheck, W. J., Mentor, O., Morton, G. III., and Wang, P. T. 9 Aug. 1983. Microbial Process for 9 α -hydroxylation of steroids. U.S. 4,379,947
- 5) Kang, H. K. and Lee, S. S. : Microbial 9 α -hydroxylase (Epoxidation of 9(11)-dehydro-17 α -methyl-testosterone). *Arch. Pharm. Res.* in press.
- 6) Bradford, M. : A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of pro-

- tein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248 (1976).
- 7) Laemmli, U. K. : Cleavage of the structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 68 (1970).
- 8) Fulco, A. J. : P450_{BM-3} and other inducible bacterial P450 cytochromes : Biochemistry and regulation. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **31**, 177 (1991).
- 9) Katagiri, M., Ganguli, B. N., and Gunsalus, I. C. : A soluble cytochrome P450 functional role in methylene hydroxylation. *J. Biol. Chem.* **243**, 3543 (1968).
- 10) Trower, M. K., Sariaslani, F. S., and O'keefe, P. O. : Purification and characterization of a soybean flour-induced cytochrome P450 from *Streptomyces griseus*. *J. Bacteriol.* **171**, 1781 (1989).
- 11) Berg, A., Ingelman-Sundberg, M., and Gustafsson, J-A. : Purification and characterization of cytochrome P450_{mag}. *J. Biol. Chem.* **254**, 5264 (1979).
- 12) Ullah, A. J. H., Murray, R. I., Bhattacharyya, P. K., Wagner, G. C., and Gunsalus, I. C. : Protein components of a cytochrome P450 linalool 8-methyl hydroxylase. *J. Biol. Chem.* **265**, 1345 (1990).
- 13) De Frank, J. J. and Ribbons, D. W. : p-Cymene pathway in *Pseudomonas putida* : initial reactions. *J. Bacteriol.* **129**, 1356 (1977).
- 14) Green, J. and Dalton, H. : Steady-state kinetic analysis of soluble methane monooxygenase from *Methylococcus capsulatus*(Bath). *Biochem. J.* **236**, 155 (1986).
- 15) Peterson, J. A., Basu, D., and Coon, M. J. : 1966. Fatty acid ω -hydroxylating system of *Pseudomonas oleovorans*. *J. Biol. Chem.* **241**, 5162 (1966).
- 16) Ensley, B. D., Gibson, D. T., and Laborde, A. L. : Oxidation of naphthalene by a multicomponent enzyme system from *Pseudomonas* sp. strain NCIB 9816. *J. Bacteriol.* **149**, 948 (1982).
- 17) Hartmans, S., Frans, J. W., Dianne, P. M. Somhorst, and Jan A. M. DEBont. : Alkene monooxygenase from *Mycobacterium* : a mul-

- ticomponent enzyme *J. Gen. Microbiol.* **137**, 2555 (1991).
- 18) Ho, P. P. and Fulco, A. J. : Involvement of a single hydroxylase species in the hydroxylation of palmitate at the ω -1, ω -2, and ω -3 positions by a preparation from *Bacillus megaterium*. *Biochim. Biophys. Acta* **431**, 249 (1976).
- 19) Kang, H. K. and Lee, S. S. : Heterogeneous nature of the steroid 9α -hydroxylase in nocardioforms. *Arch. Pharm. Res.* in press.
- 20) Itagaki, E., Wakabayashi, T., and Hatta, T. : Purification and characterization of 3-ketosteroid- Δ^1 -dehydrogenase from *Nocardia corallina*. *Biochim. Biophys. Acta* **1038**, 60 (1990).