

해모필루스 K-12가 생산하는 황산전이효소의 고정화

이남수 · 김병택 · 최승기* · 김동현#

경희대학교 약학대학, *차병원 약제부

(Received November 26, 1997)

Immobilization of Arylsulfate Sulfotransferase Obtained from *Haemophilus* K-12

Nam-Soo Lee, Byung-Taek Kim, Seung-Ki Choi* and Dong-Hyun Kim#

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

*Cha Medical Center, Sungnam, Kyungki-do, Korea

Abstract—A novel type of sulfotransferase, arylsulfate sulfotransferase (EC 2.8.2.22) purified from *Haemophilus* K-12, an intestinal bacterium of a mouse, was immobilized onto AH-Sepharose 4B, CH-Sepharose 4B and DEAE-cellulose. The enzyme was stabilized for storage more markedly by covalent immobilization onto AH-Sepharose 4B or CH-Sepharose 4B and by adsorptive immobilization onto DEAE-cellulose than the free enzyme. The optimal pH and acceptor substrate specificity of immobilized enzyme were similar to those of the free enzyme.

Keywords □ Sulfotransferase, immobilized enzyme, *haemophilus* K-12.

Banerjee와 Roy에 의해서 공여체기질인 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate(PAPS)로부터 phenol성 수용체기질로 황산기의 전이를 촉매하는 arylsulfotransferase를 기니아피그의 간장으로 부터 정제하는데 성공하였으며,²⁾ 이후로도 간장, 폐, 뇌, 신장, 그리고 장상피세포와 같은 다양한 포유동물의 기관에서 이 효소의 존재가 확인되었다.^{3,4)} 이러한 진핵생물에 존재하는 황산전이효소는 공여체기질로 PAPS만을 사용하며, 수용체기질로는 당단백과 글리코아미노글리칸의 당, 단백질의 티로신, 스테로이드화합물, catecholamine 및 많은 약물 들이 있다. 그러나, 김¹⁵⁾ 등에 의하여 사람의 장내세균인 *Eubacterium* A-44균주가 황산전이효소를 생산함이 밝혀진 이래, *Klebsiella* K-36, *Haemophilus* K-12 등으로부터 이 효소가 분리정제되었다.^{5,6)} 지금까지 보고된 세균의 황산전이효소는 PAPS가 아닌 phenylsulfate ester화합물만을 이용하

는 효소로서 arylsulfate sulfotransferase라고 명명되었다. 아울러 이 효소들의 유전형 역시 기존에 보고된 황산전이효소와는 전혀 다른 효소였다.⁷⁾ 한편, 생체내 peptide성 생리활성물질이 보고되면서 이러한 생리활성물질을 합성하기 위하여 단순한 유기합성법과 함께 최근에는 유전공학적이법이 사용되고 있다. 그러나 전사후 수식된 단백질들, 특히 sulfated peptide와 glycosylated peptide의 경우는 이들 방법이 한계점을 가지고 있어 새로운 방법이 요구되고 있다. 따라서 좀 더 효율이 좋은 새로운 합성방법, 즉 효소를 이용한 수식반응이 대두되고 있으며, 이와같은 수식반응에 의해 손쉽게 새로운 생리활성물질을 합성하고 생리활성물질의 생체내 반감기를 연장할 수 있어 우수한 효과를 기대할 수 있다.⁸⁾ 황산전이효소는 이러한 수식반응중 펩타이드에 황산화반응을 시킬 수 있었으며, 실제로 *Eubacterium* A-44에서 분리 정제된 황산전이효소는 펩타이드의 티로신 잔기에 황산기를 도입하는데 성공하였다.⁸⁾ 특히 생체내 활성물질인 CCK, caerulein, enkephalin, gastrin, angiotensin을 손쉽게 황산화시

본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 02-961-0374 (팩스) 02-957-5030

킬 수 있었다. 그러나 이 효소의 생산균주인 *Eubacterium* A-44는 혐기성균주이고 이로부터 얻어낸 황산전이효소는 상당히 불안정하며 기질특이성 때문에 극복하지 못하는 부분이 있다.

따라서 여기에서는 *Eubacterium* A-44균주와는 다른 기질특이성을 갖고있는 통성혐기성균주인 *Haemophilus* K-12의 arylsulfate sulfotransferase 효소의 고정화를 시도하였다.

실 험

실험재료

Yeast extract는 Difco Co.(미국)에서 구입했고, *p*-nitrophenyl sulfate(PNS), *p*-nitrophenol(PNP), α -naphthylsulfate, α -naphthol 등은 Sigma Co.(미국)에서 구입하였으며, Sephacryl S-300, AH-Sepharose 4B, CH-Sepharose 4B 등은 Pharmacia Co.(스웨덴)에서 구입하였다. DEAE-Cellulose는 Brown Co.(일본)에서 구입하였고 silica PAE와 ultrafilter는 Amicon Co.(미국)에서 구입하였다. carbodiimide는 Peptide Inst. Co.(일본)에서 구입하였다.

실험방법

황산전이효소의 활성측정⁴⁾

공여체 기질로 50 mM PNS 30 μ l, 수용체 기질로 20 mM phenol 290 μ l, 완충액으로 0.1 M glycine-NaOH 완충액(pH 10.0) 210 μ l, 효소액 100 μ l를 넣어 37°C에서 반응시킨 후 1N NaOH 400 μ l를 넣어 반응을 정지시켜 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

단백질량 측정⁵⁾

단백질량 측정은 bovine serum albumin을 표준으로 하여 Lowry법을 따랐다.

황산전이효소의 정제

Haemophilus K-12균주를 종자배양한뒤 최적배지⁶⁾ 20L에 이식, 18시간 배양하였다. 배양한 균액을 4°C에서 7,000 rpm으로 20분간 원심분리하여 집균한뒤 생리식염수로 2회 세척하였다. 이 균체를 70 ml의 25 mM 인산완충액(pH 7.0)에 현탁시켜 초음파처리하여 균을 파괴한 후 12,000 rpm으로 60분간 원심분리하여 상등

액을 취했고 이 침전액을 다시 50 ml의 동일한 완충액에 현탁시킨 후 초음파처리, 원심분리하여 앞에서 얻은 상등액과 합하여 조효소액으로 하였다. 이 조효소액에 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 를 넣어 70% 포화액으로 만든후 충분히 교반시키고 12,000 rpm으로 60분간 원심분리하여 효소를 침전시켰다. 이 침전을 120 ml의 25 mM 인산완충액(pH 7.0)에 녹여 1 L의 같은 완충액으로 2회 투석시켰다. 투석한 효소액을 동일한 완충액으로 균형화시킨 DEAE-cellulose 칼람에 걸고 같은 완충액 100 ml로 칼람을 씻어준 후 0.3M KCl을 함유한 동일한 완충액 150 ml로 농도구배를 걸어 분획(8~33번)을 취했다. 상기와 같은 조작을 다시 되풀이하여 DEAE-cellulose 칼람 한번 더 시행하였다. 효소활성분획(10~26번)을 모아 5 mM 인산완충액(pH 7.0) 1 L로 2회 투석하고 같은 완충액으로 균형화시킨 hydroxyapatite 칼람에 걸었다. 이것을 역시 같은 완충액으로 씻어준 후에 200 mM 인산완충액 200 ml로 농도구배를 걸어 분획을 취했다. 효소활성분획만(12~32번)을 모아 30 mM imidazole-acetate 완충액(pH 7.0) 1 L로 2회 투석시키고 같은 완충액으로 균형화시킨 chromatofocusing 칼람에 걸었다. 이것에 polybuffer 250 ml를 흘려주어 pH 7에서 4로 pH 구배를 걸어 주고 분획을 취하였다. 다시 효소활성분획만(16~30번)을 모아 25 mM 인산완충액(pH 7.0) 1 L로 2회 투석시키고 같은 완충액으로 균형화시킨 silica PAE 칼람에 걸었다. 이것을 동일한 완충액 100 ml로 씻어준 후 1M KCl을 포함한 같은 완충액 200 ml로 농도구배를 걸어 분획을 취하였다. 효소활성분획만(10~24번)을 모아 약 2 ml로 농축시키고 50 mM 인산완충액(pH 7.0)으로 균형화시킨 Sephacryl S-300 칼람을 시행하여 효소활성분획(37~40번)을 취해 효소액으로 사용하였다.

황산전이효소의 고정화

공유결합방법 - AH-Sepharose 4B (또는 CH-Sepharose 4B)의 현탁액을 1.5 ml 취한후 0.5M NaCl로 세척하고 0.05M boric acid-HCl 완충액 (pH 4.5)로 다시 세척해 주었다. 세척한 것을 carbodiimide 15 mg을 함유한 2.5 ml의 완충액에 옮기고 7°C에서 15분동안 부드럽게 교반하였다. 교반후에 효소액 3 ml (0.165 unit)를 가하고 7°C에서 2~4시간동안 다시 부드럽게 교반하였다. 이것을 0.5M NaCl을 함유한 0.1M tris-HCl 완

충액(pH 8.3)로 세척하고, 0.5M NaCl을 함유한 0.1M 초산완충액(pH 4.5)로 다시 세척한후, 0.05M tris-HCl 완충액(pH 7.0)에 보관하였다.

이온결합 방법—DEAE-cellulose 현탁액 3 ml를 효소액 3 ml, 그리고 0.25 ml의 0.1M tris-HCl 완충액(pH 7.0)와 섞었다. 7°C에서 1시간동안 교반하고 난 후 5 ml의 0.1M tris-HCl 완충액(pH 7.0)으로 세척 (3회 반복)하였다.

고정화효소의 안정성실험

각각의 고정화효소와 효소액을 30°C에서 보관하며 2일에 한번씩 활성을 측정했다.

각각의 고정화효소와 효소액을 4°C, 30, 37, 40, 45, 55 그리고 65°C에서 1시간 동안 방치후 활성을 측정했다.

각각의 고정화효소와 효소액을 pH 2.5에서 pH 12.0까지 0.5간격으로 만들어놓은 완충액과 섞어 10분 동안 37°C에서 미리 배양한후 활성을 측정했다.

DEAE-cellulose에 고정화된 효소를 각각 0.1M 인산완충액(pH 7.0)과 0.1M glycine-NaOH 완충액(pH 10.0)으로 균형화시킨 후 0.2 ml씩 나누어 보관하면서 효소반응액에서 효소액만을 제외한 나머지 혼합액을 가하여 효소반응을 시키고 원심분리 후 상등액만을 취하여 흡광도 측정을 하였다. 같은 방법으로 각각 15회, 13회의 고정화효소반응을 실시하여 고정화효소의 사용횟수에 따른 활성유지정도를 측정하였다.

결과 및 고찰

Arylsulfate sulfotransferase의 고정화

K-12균주로 부터 부분정제한 황산전이효소를 AH-Sepharose 4B, CH-Sepharose 4B 그리고 DEAE-

Table I—Yield of immobilization of arylsulfate sulfotransferase

Immobilized enzyme	Bound enzyme of added enzyme(%)
AH-Sepharose 4B-enzyme	57
CH-Sepharose 4B-enzyme	18
DEAE-Cellulose	95.7

cellulose에 각각 고정화시킨 결과를 Table I에 나타냈다. 지지체에 대한 결합율은 DEAE-cellulose를 이용한 이온결합방법이 95.7%, AH-Sepharose-4B에 결합시킨 경우 57%, CH-Sepharose 4B에 결합시킨 경우 15%로 나타났으며 DEAE-cellulose 에 결합시킨 경우가 가장 좋았다.

고정화효소의 기질특이성

AH-Sepharose 4B, CH-sepharose 4B, DEAE-cellulose 등이 고정화시킨 효소와 고정화시키지않은 유리효소에 대해 수용체 기질특이성을 조사한 결과를 Table II에 나타냈다. 고정화효소와 유리효소사이에 수용체 기질특이성에는 차이가 없는 것으로 보아 산업적으로 응용함에 있어서 K-12 균주의 유리효소를 대신하여 사용할 수 있을 것으로 생각된다.

고정화효소의 저장시간에 따른 안정성

AH-Sepharose 4B, CH-Sepharose 4B, DEAE-cellulose 등에 고정화시킨 효소와 고정화시키지 않은 유리효소를 30°C에서 보관하면서 2일에 1번씩 총 30일간 활성을 측정하여 고정화효소의 활성보존과 안정성을 조사한 결과 유리효소가 6일째에 거의 활성을 소실한 것에 비하여 나머지 고정화효소들은 측정이 끝나는 날 까지 50%이상의 활성을 유지했으며 이 중에서도 AH-Sepharose 4B에 고정화된 효소가 조금 더 안정함을 나타냈다(Fig. 1).

Table II— Substrate specificity of immobilized arylsulfate sulfotransferases

Acceptor substrate	Activity ¹⁾ (%)			
	Free ²⁾	AH-Sepharose 4B ³⁾	CH-Sepharose 4B ⁴⁾	DEAE-cellulose ⁵⁾
Phenol	100 ^{b)}	98	98	101
p-Acetaminophen	5	4.5	5.1	4.9
α-Naphthol	363.5	350	335	340.2

¹⁾Acceptor substrate specificity was measured by using PNS as a donor substrate. ²⁾Free enzyme: ³⁾Enzyme immobilized onto AH-Sepharose 4B: ⁴⁾Enzyme immobilized onto CH-Sepharose 4B: ⁵⁾Enzyme immobilized onto DEAE-cellulose. ^{b)}Activity (PNS+phenol) was taken as 100%.

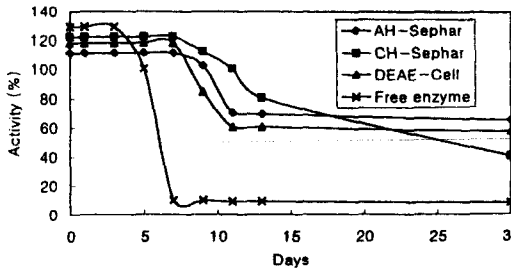


Fig. 1—Stabilities on time of free and immobilized K-12 arylsulfate sulfotransferases. Each enzyme preparation was stored at 30°C at pH 7.0. The activity assay of these enzymes was according to the experimental method. All experiments were performed in triplicate.

고정화효소의 온도에 따른 안정성

AH-Sepharose 4B, CH-Sepharose 4B, DEAE-cellulose 등에 고정화시킨 효소와 고정화시키지 않은 유리효소를 각각 4, 30, 37, 40, 45, 55, 65°C에서 1시간 동안 방치후 그 활성을 측정해본 결과 AH-Sepharose 4B나 CH-Sepharose 4B보다는 DEAE-cellulose에 고정화시킨 효소가 조금 더 안정함을 나타냈다(Fig. 2).

고정화효소의 pH에 따른 안정성

각각의 고정화된 효소와 유리효소를 pH 3.0에서 pH 12.0까지 0.5간격으로 제조한 완충액과 섞어 10분간 37°C에서 미리 배양하여 활성을 측정한 결과를 Fig. 3과 4에 나타냈다. AH-Sepharose 4B에 고정화된 효소가 다른 지지체에 고정화된 효소나 유리효소보

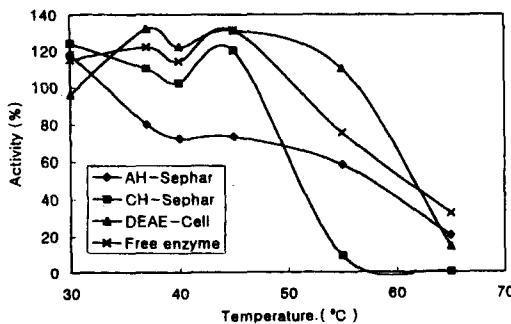


Fig. 2—Stabilities on temperature of free and immobilized K-12 sulfotransferases. Each enzyme preparation was stored at 37°C for 1h. The activity assay of these enzymes was according to the experimental method. All experiments were performed in triplicate.

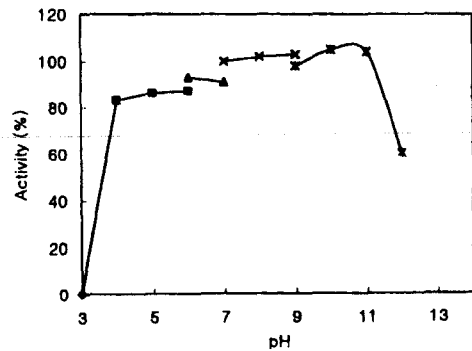


Fig. 3—Stability on pH of free K-12 sulfotransferase. Each enzyme preparation was adjusted to several pHs (pH 2.5-12.0) and then incubated at 37°C for 10 min. The activity assay of these enzymes was according to the experimental method. pH 2.5-4, tartaric acid; pH 4-6, acetate buffer; pH 6-7, phosphate buffer; pH 7-9, tris-HCl buffer; pH 9-12, glycine-NaOH buffer. All experiments were performed in triplicate.

다 더 안정한 것으로 나타났다. 여기에는 나타내지 않았지만, DEAE-cellulose에 고정화시킨 효소를 각각 pH 7.0과 pH 10.0에 나누어 보관하면서 10회 이상 겹쳐 반복 사용하면서 활성을 측정한 결과 pH 10.0에서 보관한 고정화효소가 더 안정하였으며 남아있는 효소활성은 40%정도였다. 그러나, AH-Sepharose 4B에 고정시킨 효소로 pH 7.0에서 보관하면서 10회이상 반복하면서 활성을 측정한 결과 사용횟수에 따른 효소활성의 변화는 거의 없었으며 90%이상의 활성이 남아있는 것으로 나타났다.

고 활

Haemophilus K-12균주로 부터 분리한 arylsulfate sulfotransferase(EC 2.8.2.22)를 고정화하였다. 고정화효소의 안정성실험에서 pH안정성, 온도안정성 등의 모든 항목에서 고정화효소가 유리효소보다 안정한 것으로 나타났으며, 특히 시간에 따른 안정성실험에서는 AH-Sepharose 4B에 고정화된 효소가 가장 우수한 것으로 나타났다. 그러나, CH-Sepharose 4B에 고정화시킨 경우에 급격히 활성이 낮아지는 것으로보아 K-12에서 분리한 황산전이효소는 활성부위 또는 활성에 영향을 미치는 부위에 아민기를 갖는것으로 생각된다. 온도에 따른 안정성실험에서는 DEAE-cellulose에 고정화시킨 효소가 가장 안정한 것으로 나타났다. 한편

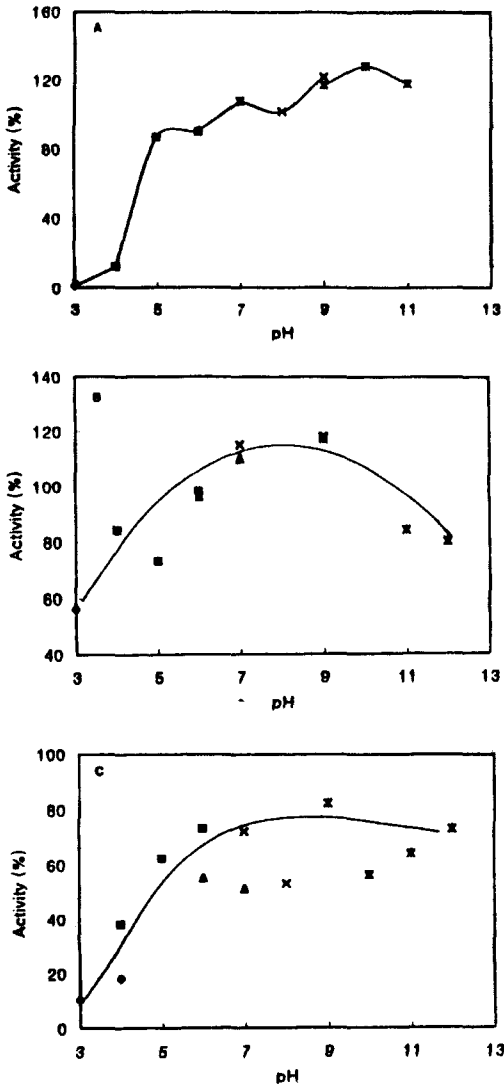


Fig. 4—Stability on pH of immobilized K-12 sulfotransferases. A, the enzyme immobilized onto DEAE-cellulose; B, the enzyme immobilized onto AH-Sepharose 4B; C, the enzyme immobilized onto CH-Sepharose 4B. Each enzyme preparation was stored at 30°C at pH 7.0. The activity assay of these enzymes was according to the experimental method. pH 2.5-4, tartaric acid; pH 4-6, acetate buffer; pH 6-7, phosphate buffer; pH 7-9, tris-HCl buffer; pH 9-12, glycine-NaOH buffer. All experiments were performed in triplicate.

DEAE-cellulose를 pH 7.0과 pH 10.0에서 나누어 보관하면서 사용 횟수를 10회 이상 실시한 결과 안정성과 잔류활성에서는 pH 10.0에 보관하는 것이 더욱 안정한 것으로 나타났으며, 남아있는 활성이 40% 정도였다.

그러나, AH-Sepharose 4B에 고정화시킨 경우에는 사용횟수에 영향이 거의 없는 것으로 나타났다. 이러한 결과로 이루어 보아 AH-Sepharose 4B에 고정화한 효소의 경우 반복 사용에 따른 실활을 방지할 수 있을 것으로 생각된다. 이미 *Eubacterium* A-44에서는 황산전이효소를 정제하여 고정화실험을 하였는데,¹⁰⁾ 그 결과와 비교해 볼 때 비슷하거나 더 안정한 결과를 보이고 있으며 특히 pH에 따른 안정성에서는 *Haemophilus* K-12균 주로 부터 정제된 황산전이효소가 훨씬 안정한 것으로 나타났으며, 기질특이성에도 변화가 없었다. 이 효소는 *Eubacterium* A-44의 효소와 상당한 기질특이성이 있다는 점을 감안한다면, 이 고정화효소 역시 산업적인 응용에도 응용할 수 있을 것으로 기대된다.

문헌

- 1) Banerjee, R. K. and Roy, A. B. : The sulfotransferase of guinea pig liver. *Mol. Pharmacol.*, **2**, 56 (1966).
- 2) Roy, A. B. : Sulfotransferase (Sulfation of Drugs and Related Compounds), CRC Press p.131 (1981).
- 3) Jakoby, W. B., Sekura, R. D., Lyon, E.S., Marrou, C. J. and Wang, J. L. : Sulfotransferases (Enzymatic Basis of Detoxification), Vol. 2, Academic Press, p.199 (1980).
- 4) 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).
- 5) Kim, D.-H., Kim, H.-S., and Kobashi, K. : Purification and characterization of novel sulfotransferase obtained from *Klebsiella* K-36, an intestinal bacterium of rat. *J. Biochem.* **112**, 796 (1992).
- 6) Lee, N.-S., Kim, B.-T., Kim, D.-H. and Kobashi, K. : Purification and reaction mechanism of arylsulfate sulfotransferase from *Haemophilus* K-12, a mouse intestinal bacterium *J. Biochem.* **118**, 796 (1995).
- 7) Baek, M.-C., Kim, S.-K., Kim, D.-H., Kim, B.-K. and Choi, E.-C. : Cloning and sequencing of the *Klebsiella* K-36 astA gene, encoding an arylsulfate sulfotransferase. *Microbiol. Immunol.* **40**,

- 531 (1996).
- 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) 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).
- 10) Kim, D.-H. and Kyoichi, K. : The role of intestinal flora in the metabolism of phenylsulfate esters. *Biochem. Pharmacol.* **30**, 350 (1986).