

포유동물 1,4-벤조퀴논 환원효소에 의한 아릴니트로소 화합물의 생변환

김경순* · 신해용

명지대학교 화학과

Biotransformation of Arylnitroso Compound by Mammalian 1,4-Benzoquinone Reductase

Kyungsoon Kim* and Hae-Yong Shin

Department of Chemistry, Myong Ji University, Yongin, 449-728

Abstract

Quinone reductase was purified to homogeneity from bovine liver and the purified enzyme catalyzed the reduction of phenanthrenequinone as well as benzo- and naphthoquinones. The enzyme catalyzed the biotransformation of arylnitroso nitroso compound and the reaction product was identified by TLC, GC, GC-MS and NMR. The reaction was almost entirely inhibitable by Cibacron blue 3GA or dicumarol, potent inhibitors of mammalian quinone reductase.

Key words – arylnitroso nitroso compound, biotransformation, enzyme

서 론

Quinone은 식물, 곰팡이 등 자연계에 널리 존재하며 생체에서 독성을 나타내는 것으로 알려져 있다[6,10,16,21]. 유기체 내에서 quinone은 일-전자 환원되어 semiquinone radical을 생성하며 이 semiquinone은 O₂에 의해 산화되어 superoxide anion radical(O₂⁻)을 생성하고 quinone을 재생시킨다. Superoxide는 H₂O₂로 전환되고 이 H₂O₂는 고도로 활성이 큰 hydroxyl radical을 생성시킨다. Quinone이 재생됨으로써 redox cycling이 계속되어 oxidative stress가 야기되고 활성산소종(O₂⁻, H₂O₂, HO[·])이 생성된다[14, 16,19]. 또한 퀴논은 단백질 또는 GSH 같은 nonprotein

sulphydryl compound 등의 세포내 nucleophile과 직접 반응함으로써 독성을 나타내기도 한다 [16,18].

Quinone reductase는 quinone의 two-electron reduction을 촉매하여 hydroquinone을 생성시킨다[17,22-25]. 이-전자 환원에 의하여 유기체 내에서 electrophilic quinone이 제거되며, 더욱이 quinone의 one-electron reduction에 의한 semiquinone radical의 형성을 방지함으로써 aerobic condition에서 reactive oxygen species의 형성을 막아준다. Liu 등은 quinone reductase를 유발시키면 menadione의 일-전자 환원에 의한 cytotoxic effect를 감소시킬 수 있으며, quinone reductase는 toxicity로부터 세포를 보호하는데 중요한 역할을 한다고 보고하였다[16]. Quinone의 two-electron reduction 생성물인 hydroquinone은 glucuronide와 conjugation되어 배설될 수 있으므로 quinone reductase는 detoxification에 관여하는 것으로 생각된다[8,18,19,26].

*To whom all correspondence should be addressed
Tel : 031-330-6183, Fax : 031-335-7248
E-mail : kskim@mju.ac.kr

Quinone reductase는 polycyclic aromatic hydrocarbon, azo dye, 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin 등의 다양한 화합물에 의하여 유발된다[9-11,20,21].

Prochaska 등은 2(3)-*tert*-butyl-4-hydroxyanisole에 노출시키면 mouse liver에서 quinone reductase 활성이 증가된다고 보고하였으며 [19], Bayney 등은 β -naphthoflavone과 같은 planar aromatic compound에 의해 quinone reductase mRNA가 induction 된다고 보고하였다[2]. 최근에 유기합성을 위하여 *Saccharomyces cerevisiae*의 사용이 시도되고 있으며 본 연구실에서는 *S. cerevisiae*를 사용하여 방향족 니트로소 화합물로부터 선택적으로 방향족 아미노 화합물을 합성하고 quinone reductase가 이 반응에 관여하였다고 보고하였다[1,12].

Quinone reductase는 포유동물에서 xenobiotic metabolizing enzyme으로 알려져 있으며 xenobiotic metabolizing enzyme들은 일반적으로 간에서 함유량이 높고 broad한 기질 특이성을 갖는다. 방향족 니트로소 화합물들은 섬유와 염료 산업에서 광범위하게 사용되며 식품첨가물로 섭취되기도 한다. 본 연구에서는 포유동물에서 quinone reductase 가 퀴논 화합물들 뿐만 아니라 니트로소 화합물의 생변환에도 관여하는지 여부를 확인하기 위하여 포유동물인 소의 간으로부터 quinone reductase를 정제한 후 정제된 효소를 사용하여 방향족 니트로소기 변환을 조사하였다.

재료 및 방법

시약

Bovine serum albumin, NADH, glycine, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine (TEMED), acrylamide, sucrose, N,N'-methylenebisacrylamide, CM-sepharose, Sephadryl S-200-HR, bromophenol blue, Coomassie brilliant blue R-250, lauryl sulfate, ammonium persulfate, Tris[hydroxymethyl]aminomethane, ammonium sulfate, TCA 등은 Sigma사 제품을 사용하였다. 1,4-benzoquinone, methyl-1,4-benzoquinone, 1,4-naphthoquinone, 5-hydroxy-1,4-naphthoquinone, 2-hydroxy-1,4-naphthoquinone, dicumarol, methyl orange, anthraquinone, Cibacron blue 3GA, 1-aminoanthraquinone,

phenanthrenequinone, 4-nitrosophenol, nitrosobenzene, 4-nitroacetophenone, cyclohexanone, pyruvic acid, 2-benzoylpyridine, *p*-anisaldehyde, 4-(dimethylamino)benzaldehyde 등은 Aldrich사에서 구입하였으며 Coomassie brilliant blue G-250은 Bio-rad사에서 구입하였다. 기타 시약은 특급 내지 일급 시약을 사용하였다.

효소 활성도 측정

Assay tube에 25 mM Tris-HCl (pH 8.0), 200 μ M NADH, 250 μ M 1,4-benzoquinone, 효소액을 첨가하여 Shimadzu model 3100 UV-NIR spectrophotometer를 사용하여 340 nm에서 NADH 산화에 의한 흡광도 감소를 측정하였다. Quinone reductase의 1 unit는 1 분당 1 μ mol의 NADH의 산화를 촉매하는 양으로 정의하였다.

단백질 정량 및 전기영동법

단백질 정량은 bovine serum albumin (BSA)을 표준물질로 하여 Bradford법 [3]으로 정량하였다. Polyacrylamide gel electrophoresis는 Laemmli법 [15]에 따라 수행하였다.

효소 정제

1,4-benzoquinone reductase를 Kim and Shin 방법 [13]으로 정제하였다. 소 간에 1 mM EDTA를 포함하는 50 mM potassium phosphate 완충액 (pH 7.5)를 가한 다음 4°C에서 균질화시키고 균질액을 10,000×g에서 15분간 원심분리하였다. 상층액을 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 로 50% 포화시켜 20,000×g에서 15분간 원심분리하여 침전물을 제거한 후 상등액에 다시 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 로 75 % 포화시켜 20,000×g에서 15분간 원심분리하여 침전물을 얻었다. 이 침전물을 1 mM EDTA를 포함하는 10 mM potassium phosphate 완충액 (pH 7.0, 완충액 A)에 녹인 후 4°C에서 투석한 효소 용액을 완충액 A로 평형시킨 CM-Sepharose 컬럼에 loading 하였다. 같은 완충액으로 충분히 씻어준 후 0~0.5 M NaCl 상승 농도 기울기로 단백질을 용출시켰다. 효소 활성부분을 모아 놓축하여 완충액 A로 평형화한 Sephadryl S-200 컬럼에 가해 같은 완충액으로 전개시킨 후 효소 활성이 있는 분획을 모아 다음 실험에 사용하였다. 이상의 과정은 모두 0~4°C에서 수행하였다.

Thin layer chromatography (TLC)

Silica gel 60F-254 plate를 사용하여 TLC를 수행하였으며 hexane/ethylacetate (6:4) 용액을 전개액으로 사용하였다.

Gas chromatography (GC)

HP5 column과 flame ionization detector (FID)가 장착된 Hewlett-Packard 6890 Plus gas chromatograph system을 사용하였다. Oven temperature는 15°C/min로 100-300°C로 프로그램 하였으며 injection port temperature는 200°C, detector temperature는 300°C로 조절하였다. Gas flow rate는 질소 1 ml/min, 수소 20 ml/min, 공기 200 ml/min이었다.

GC-mass spectrometry (GC-MS)

HP6890 Plus gas chromatograph에 연결된 HP 5973 mass spectrometer로 70 eV에서 수행하였다. Oven temperature는 15°C/min로 100-250°C로 프로그램 하였다.

Nuclear magnetic resonance spectrometry (NMR)

Jeol-LA-300 NMR spectrometer를 사용하여 300 MHz에서 CDCl₃를 사용하여 proton NMR spectra를 얻었다.

결과 및 고찰

소 간으로부터 정제된 1,4-benzoquinone reductase를 disc polyacrylamide gel 전기영동 한 결과 단일 band로 나타났으며 이 효소액을 사용하여 기질특이성을 조사하였다 (Table 1). 정제된 1,4-benzoquinone reductase는 *Phanerochaete chrysosporium*으로부터 정제된 quinone reductase [5]와 마찬가지로 NADH와 NADPH를 모두 electron donor로 사용할 수 있었다. 또한 치환된 benzoquinone들과 naphthoquinone들 뿐만 아니라 phenanthrenequinone에 대해서도 높은 활성을 나타내었다. Constan 등은 *P. chrysosporium* quinone reductase가 methylbenzoquinone, 2,3-dimethoxy-5-methyl-1,4-benzoquinone 등 다양한 benzoquinone들에 대하여 활성을 나타낸다고 보고하였으며 [7], Brock 등도 *P. chrysosporium*으로부터 정제된 1,4-benzoquinone reductase가 2-methoxy-1,4-benzoquinone, 1,4-naphthoquinone

Table 1. Substrate specificity of the 1,4-benzoquinone reductase purified from bovine liver

Substrate (100μM)	Relative enzyme activity (% of control)	
	NADH (200μM)	NADPH (200μM)
1,4-Benzoquinone	100	72.2
Methyl-1,4-benzoquinone	5.3	30.4
1,4-Naphthoquinone	10.5	
5-Hydroxy-1,4-naphthoquinone (Juglone)	5.2	1.9
2-Hydroxy-1,4-naphthoquinone (Natural Orange 6)	1.4	13
Methyl orange	1.8	
Anthraquinone	0	1.1
1-Amino-anthraquinone	0	
Phenanthrenequinone	61.6	36.6
4-Nitrosophenol	3.9	4.1
4-Nitroacetophenone	3.2	
Cyclohexanone	0.6	
Pyruvic acid	1.5	0.6

Reaction rates are expressed relative to the rate with 1,4-benzoquinone (100 μM) and NADH (200 μM) as equal to 100. 100 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0) was used. All substrates were assayed at a final concentration of 100 μM.

등을 기질로 사용한다고 보고하였다[4]. 소 간에서 정제된 1,4-benzoquinone reductase는 4-nitrosophenol, 4-nitroacetophenone 등에 대하여도 활성을 나타내었으며 생성물의 구조를 확인하기 위하여 TLC, GC, GC-MS, NMR을 시행하였다. 효소액에 4-nitrosophenol과 NADH를 혼합하여 실온에서 30분간 반응시킨 후 ethyl acetate로 추출하여 MgSO₄로 수분을 제거한 다음 TLC, GC, GC-MS를 수행하였으며 추출액을 silica column으로 분리한 후 NMR로 생성물의 구조를 확인하였다. 반응 추출액을 thin layer chromatography (TLC) 한 결과는 Fig. 1과 같다. Hexane/ethylacetate (6:4) 용액을 전개액으로 사용하였으며 생성물은 4-aminophenol의 Rf 값인 0.12에서 spot을 나타내었다. 반응 추출액을 gas chromatography (GC)한 결과는 Fig. 2와 같으며 retention time 8.829 min에서 생성물인 4-aminophenol의 큰 peak가 나타났다. GC-MS spectrum을 Fig. 3에 나타내었으며 Mass (EA 70V) 109로 나타났고

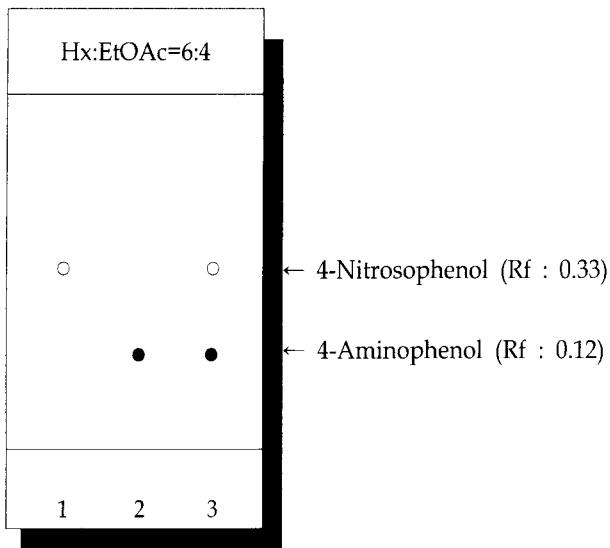


Fig. 1. TLC chromatogram of the reaction mixture of 4-nitrosophenol, NADH and the purified 1,4-benzoquinone reductase.

1: 4-nitrosophenol (standard), 2: 4-aminophenol (standard), 3 : reaction mixture

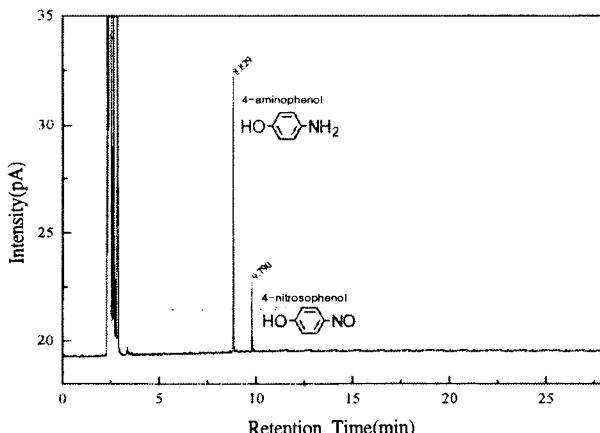


Fig. 2. GC chromatogram of the reaction mixture of 4-nitrosophenol, NADH and the purified 1,4-benzoquinone reductase.

Wiley 275 Database를 사용하여 생성물을 확인하였다. 정제된 생성물을 proton NMR spectrometer (300 MHz, CDCl₃)를 사용하여 분석한 결과는 다음과 같다. δ 3.92 (1H, bro S), 6.50 (2H, d, 8.6 Hz), 6.57 (2H, d, 8.6 Hz), 8.24 (2H, bro S). 이상의 결과로부터 4-nitrosophenol을 기질로 사용하였을 때 생성물은 4-aminophenol임이 확인되었다. 또한 정제된 소간 1,4-benzoquinone reductase는

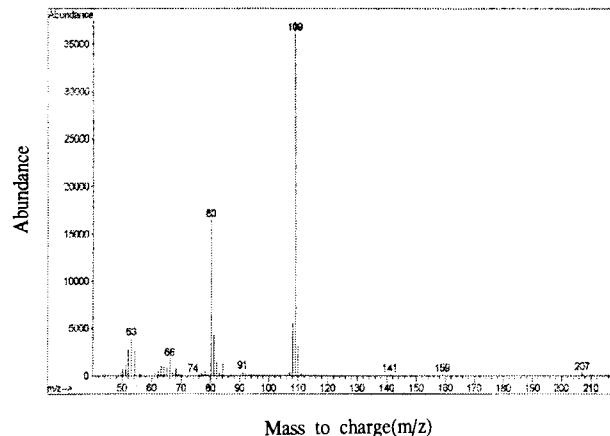


Fig. 3. GC-MS spectrum of the reaction product of 4-nitrosophenol, NADH and the purified 1,4-benzoquinone reductase.

Peak abundances are reported versus mass to charge (m/z).

nitrosobenzene의 환원도 촉매하였으며 quinone reductase의 inhibitor인 Cibacron blue 3GA를 1 μM 첨가하면 낮은 활성을 나타내었고 2.5 μM 첨가하면 활성이 완전히 저해되어 환원 반응이 전혀 진행되지 않았다 (Fig. 4). 소간 1,4-benzoquinone reductase에 의한 nitrosobenzene 환원은 quinone reductase의 저해제인 dicumarol에 의해서도 저해되었으며 dicu-

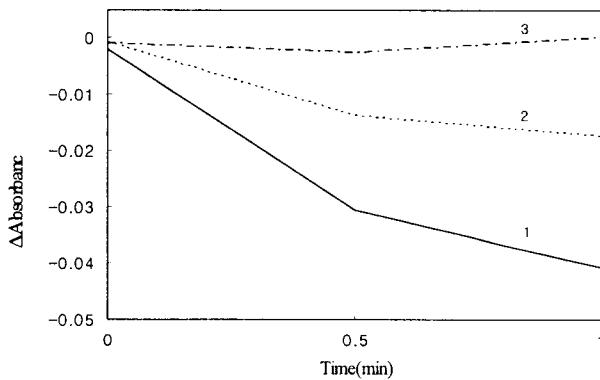


Fig. 4. Effect of Cibacron blue 3GA on the nitrosobenzene reduction by purified bovine liver 1,4-benzoquinone reductase.

The reaction mixture contained 100 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0), 100 μM nitrosobenzene, 200 μM NADH and purified enzyme in the absence or in the presence of Cibacron blue 3GA. The concentrations of Cibacron blue 3GA are 0(1), 1 μM (2) and 2.5 μM (3).

marol 1 μM 침가 시에 88.6 %의 활성을 나타내었고 5 μM 침가하면 22.5 %의 활성을 나타내었다(Fig. 5). 소 간 1,4-benzoquinone reductase는 N,N-dimethyl-4-nitrosoaniline의 환원도 촉매하였으며 다양한 농도의 N,N-dimethyl-4-nitrosoaniline을 사용하여 실험한 결과 dicumarol이 비경쟁 억제물로 작용함을 보여주었다(Fig. 6). 정제된 효소 용

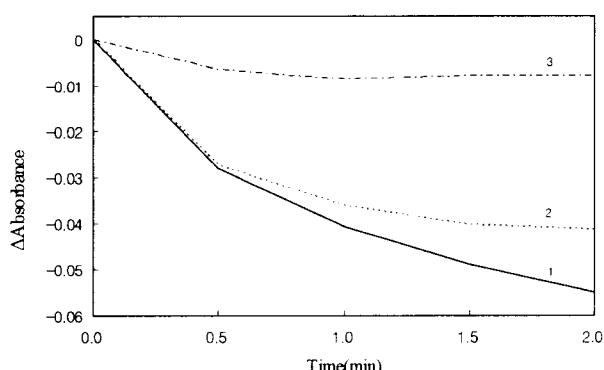


Fig. 5. Effect of dicumarol on the nitrosobenzene reduction by purified bovine liver 1,4-benzoquinone reductase. The reaction mixture contained 100 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0), 100 μM nitrosobenzene, 200 μM NADH and purified enzyme in the absence or in the presence of dicumarol. The concentrations of dicumarol are 0 (1), 1 μM (2) and 5 μM (3).

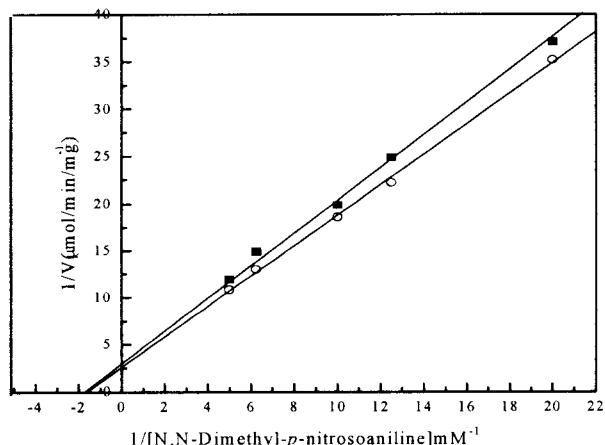


Fig. 6. The effect of dicumarol on the N,N-dimethyl-4-nitrosoaniline reduction by purified bovine liver 1,4-benzoquinone reductase. The reaction mixture contained 100 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0), 200 μM NADH, purified enzyme and varied concentrations of N,N-dimethyl-4-nitrosoaniline in the absence (1) or in the presence of 40 μM dicumarol (2).

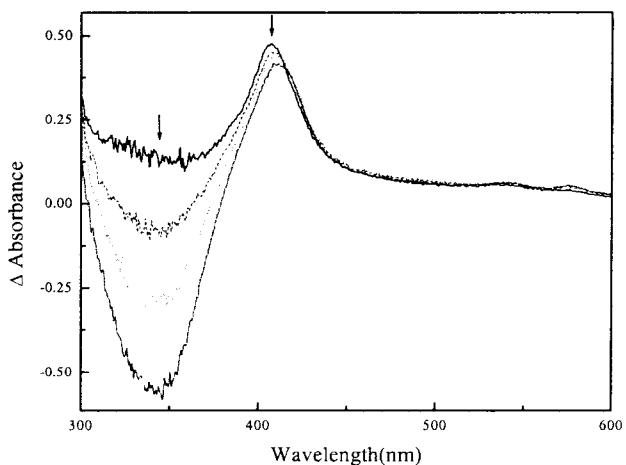


Fig. 7. Changes in absorption spectra during the reaction of Natural orange 6 with 1,4-benzoquinone reductase.

Reaction conditions were as follows : 100 μM Natural orange, 200 μM NADH, 25 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) and purified bovine liver 1,4-benzoquinone reductase. Spectra were recorded at 20-min intervals. The decrease of the absorption bands of NADH and Natural orange are indicated by arrows.

액에 Natural orange 6 (2-hydroxy-1,4-naphthoquinone)를 혼합한 후 absorption spectra 변화를 측정한 결과는 Fig. 7과 같으며 가시광선 영역에서 다소 흡광도 감소를 보여주었으나 Naphthol yellow, Alizarin을 사용하였을 경우에는 absorption spectra에 변화를 나타내지 않았다. 본 연구에서는 포유동물에서 퀴논 환원효소가 퀴논 화합물들의 환원을 촉매할 뿐만 아니라 아릴니트로소 화합물의 생변환에도 관여하는지 여부를 밝히기 위하여 포유동물인 소의 간으로부터 quinone reductase를 정제한 후 정제된 효소를 반응에 직접 사용하여 quinone reductase가 xenobiotic metabolizing enzyme으로서 퀴논류의 화합물들 뿐만 아니라 아릴니트로소 화합물의 생변환에도 관여한다는 사실을 확인하였으며 반응의 특성에 관하여 조사하였다.

요 약

소 간으로부터 퀴논 환원효소를 정제하였으며 정제된 효소는 벤조퀴논과 나프토퀴논 뿐만 아니라 폐난트렌 퀴논의 환원도 촉매하였다. 소 간으로부터 정제된 퀴논 환원효소는 아릴니트로소 화합물의 생변환을 촉매하였으며 반

옹 생성물은 TLC, GC, GC-MS, NMR을 사용하여 확인되었다. 이 반응은 포유동물 귀논 환원효소의 강력한 저해제인 Cibacron blue 3GA나 dicumarol에 의하여 크게 저해되었다.

참 고 문 헌

- Baik, W., J. Rhee, S. Lee, N. Lee, B. Kim and K. Kim. 1995. Selective reduction of aromatic nitroso compounds with baker's yeast under neutral condition. *Tetrahedron Lett.* **36**, 2793-2794.
- Bayney, R. M., M. R. Morton, L. V. Favreau and C. B. Pickett. 1989. Rat liver NAD(P)H: quinone reductase. *J. Biol. Chem.* **264**, 21793-21797.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* **72**, 248-254.
- Brock, B. J. and M. H. Gold. 1996. 1,4-Benzoquinone reductase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*: Spectral and kinetic analysis. *Arch. Biochem. Biophys.* **331**, 31-40.
- Brock, B. J., S. Rieble and M. H. Gold. 1995. Purification and characterization of a 1,4-benzoquinone reductase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 3076-3081.
- Chung, J. H., Y. N. Cha and R. J. Rubin. 1994. Role of quinone reductase in *in vivo* ethanol metabolism and toxicity. *Toxi. Appl. Pharm.* **124**, 123-130.
- Constam, D., A. Muheim, W. Zimmermann and A. Fiechter. 1991. Purification and partial characterization of an intracellular NADH : quinone oxidoreductase from *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Gen. Microbiol.* **137**, 2209-2214.
- De Long, M. J., P. Dolan, A. B. Santamaria and E. Bueding. 1986. 1,2-Dithiol-3-thione analogs: effects on NAD(P)H : quinone reductase and glutathione levels in murine hepatoma cells. *Carcinogenesis* **7**, 977-980.
- Favreau, L.V. and C.B. Pickett. 1995. The rat quinone reductase antioxidant response element. *J. Biol. Chem.* **270**, 24468-24474.
- Gordon, G. B., H. J. Prochaska and L. Y.-S. Yang. 1991. Induction of NAD(P)H : quinone reductase in human peripheral blood lymphocytes. *Carcinogenesis* **12**, 2393-2396.
- Højeborg, B., K. Blomberg, S. Stenberg and C. Lind. 1981. Biospecific adsorption of hepatic DT-diaphorase on immobilized dicoumarol. *Arch. Biochem. Biophys.* **207**, 205-216.
- Kim, K. and H. Suk. 1999. Reduction of Nitrosoarene by purified NAD(P)H-quinone oxidoreductase. *J. Biochem. Mol. Biol.* **32**, 321-325.
- Kim, K. and H.-Y. Shin. 2000. Reduction of azobenzene by purified bovine liver quinone reductase. *J. Biochem. Mol. Biol.* **33**, 321-325.
- Kitamura, S., A. Terada, H. Kamio, K. Sugihara, N. Koga and S. Ohta. 1999. DT-diaphorase-like quinone reductase in rat plasma. *Biol. Pharm. Bull.* **22**, 883-885.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Liu, R. -M., D. W. Nebert and H. G. Shertzer. 1993. Menadione toxicity in two mouse liver established cell lines having striking genetic differences in quinone reductase activity and glutathione concentrations. *Toxi. Appl. Pharm.* **122**, 101-107.
- Prestera, T., H. J. Prochaska and P. Talalay. 1992. Inhibition of NAD(P)H : (quinone-acceptor) oxidoreductase by Cibacron blue and related anthraquinone dyes: a structure-activity study. *Biochemistry* **31**, 824-833.
- Prestera, T., W. D. Holtzclaw, Y. Zhang and P. Talalay. 1993. Chemical and molecular regulation of enzymes that detoxify carcinogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 2965-2969.
- Prochaska, H. J. and P. Talalay. 1986. Purification and characterization of two isofunctional forms of NAD(P)H: quinone reductase from mouse liver. *J. Biol. Chem.* **261**, 1372-1378.
- Ramchandani, S., M. Das and S. K. Khanna. 1994. Effect of metanil yellow, orange II and their blend on hepatic xenobiotic metabolizing enzymes in rats. *Fd. Chem. Toxic.* **32**, 559-563.
- Shaw, P. M., A. Reiss, M. Adesnik, D. W. Nebert, J. Schembri and A. K. Jaiswal. 1991. The human dioxin-inducible NAD(P)H: quinone oxidoreductase cDNA-encoded protein expressed in COS-1 cells is identical to diaphorase 4. *Eur. J. Biochem.* **195**, 171-176.
- Trost, P., P. Bonora, S. Scagliarini and P. Pupillo. 1995. Purification and properties of NAD(P)H : quinone-acceptor oxidoreductase of sugarbeet cells. *Eur. J.*

- Biochem.* **234**, 452-458.
23. Valli, K., B. J. Brock, D. K. Joshi and M. H. Gold. 1992. Degradation of 2,4-dinitrotoluene by the lignin-degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Micro.* **58**, 221-228.
24. Valli, K., H. Wariishi and M. H. Gold. 1992. Degradation of 2,7-dichlorodibenzo-*p*-dioxin by the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Bacterio.* **174**, 2131-2137.
25. Valli, K. and M. H. Gold. 1991. Degradation of 2,4-dichlorophenol by the lignin-degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Bacterio.* **173**, 345-352.
26. Zhang, Y., P. Talalay, C. -G. Cho and G. H. Posner. 1992. A major inducer of anticarcinogenic protective enzymes from broccoli: isolation and elucidation of structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 2399-2403.

(Received March 25, 2002; Accepted May 15, 2002)