



(19)대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) 。 Int. Cl.		(45) 공고일자	2007년08월09일
<i>C12Q 1/25</i> (2006.01)		(11) 등록번호	10-0748234
<i>C12Q 1/00</i> (2006.01)		(24) 등록일자	2007년08월03일
(21) 출원번호	10-2006-0041501	(65) 공개번호	
(22) 출원일자	2006년05월09일	(43) 공개일자	
심사청구일자	2006년05월09일		

(73) 특허권자 충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 궁동 220번지 충남대학교

(72) 발명자 석대은
대전 유성구 신성동 대림두레아파트 101-20

황룡쌍
대전 유성구 궁동 충남대학교 약학대학 기숙사 503-3

김미리
대전 유성구 신성동 대림아파트 101-201

(74) 대리인 김원준

(56) 선행기술조사문헌

심사관 : 허주형

전체 청구항 수 : 총 3 항

(54) 수용성 기질을 사용한 l i p o x y g e n a s e 의 활성분석법

(57) 요약

본 발명은 수용성 기질을 사용하여 lipoxxygenase 활성을 분석하는 방법에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 lipoxxygenase에 의해 l-linoleoyl lysophosphatidylcholine가 산화되어 생성된 물질의 흡광도를 측정함으로써 lipoxxygenase활성을 간편하게 분석하는 분석법에 관한 것이다.

본 발명에 의해 lipoxxygenase의 활성 분석 시 계면활성제를 사용할 필요가 없어 보다 신속하고 정확하게 lipoxxygenase활성을 분석할 수 있는 분석방법을 제공할 수 있다.

대표도

도 2

특허청구의 범위

청구항 1.

lipooxygenase의 활성을 분석하는 방법에 있어서,

A) 1-linoleoyl lysophosphatidylcholine, 1-linolenyl lysophosphatidylcholine 및 1-arachidonyl lysophosphatidylcholine으로 이루어진 군에서 선택된 하나 또는 둘 이상의 기질과 lipooxygenase를 반응시키는 단계;

B) 단계 A)에서 얻어진 혼합액의 흡광도를 측정하는 단계;

를 포함하는 것을 특징으로 하는 lipooxygenase 활성 분석 방법.

청구항 2.

제 1 항에 있어서,

단계 A)의 반응은 pH 5~11의 완충액에서 이루어지는 것을 특징으로 하는 lipooxygenase 활성 분석 방법.

청구항 3.

제 1 항에 있어서,

단계 B)의 흡광도 측정은 단계 A)에서 얻어진 혼합액의 흡광도를 시간 경과에 따라 234nm에서 측정하는 것임을 특징으로 하는 lipooxygenase 활성 분석 방법.

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 lipooxygenase의 활성을 간편하면서도 정확하게 측정하는 방법에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 lipooxygenase에 의해 1-linoleoyl lysophosphatidylcholine가 산화되어 생성된 물질의 흡광도를 측정함으로써 lipooxygenase활성을 간편하게 분석하는 방법에 관한 것이다.

lipooxygenase(linoleate:oxygen oxidoreductase, EC 1.13.11.12; 이하에서는 "**LO**"라 약칭함)는 동·식물체 세포 내에 널리 분포하여 염증반응 매개, 신호 전달 매개 등 여러 가지 생물 활성을 나타내는 효소로서[G. Cirino, *Biochem. Pharmacol.* **55** (1998), p. 105; A.A. Farooqui et al., *J. Neurochem.* **69** (1997), p. 889), linoleic acid, linolenic acid, arachidonic acid, eicosapentaenoic acid 등 불포화지방산 구조 내의 1,4-(Z,Z)-pentadiene에 산소 분자를 도입시켜 hydroperoxides를 생성하는 것으로 알려져 있다[S. Yamamoto, *Biochim. Biophys. Acta* **1128** (1992) pp. 117~131; G. Began et al. *Biochemistry* **38** (1999) pp. 13920~13927]. 이와 같이 LO에 의해 1,4-(Z,Z)-pentadiene이 산화되는 것은 lipooxygenation이라고 한다.

세포내에서는 phospholipase A2(PLA2)에 의해 생체막으로부터 유리된 불포화지방산이 LO의 기질로 이용되는(G. Cirino, *Biochem. Pharmacol.* **55** (1998), p. 105; A.A. Farooqui et al., *J. Neurochem.* **69** (1997), pp. 889~901; E.A. Dennis, *J. Biol. Chem.* **269** (1994), p. 13057) 등, 일반적으로 다중 불포화지방산(polyunsaturated fatty acids)이 좋은 기질로 알려져 있으나, 일부 LO는 인지질 또는 지방을 직접 산화하는 것으로도 보고 되어 있다.

일부 조직, 특히 포유동물의 심장 조직에서 LO에 의한 생체막 또는 인지질의 산화가 보고 되어(R.L. Henrikson et al, *J. Biol. Chem.* **252** (1977), p. 4913; C. Schalkwijk et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **174** (1991), p. 268; K. Petit et al., *J. Neurochem.* **64** (1995), p. 139), LO가 reticulocytes의 성장에도 관여하여 세포막 구조의 변화에 따른 생체반응에 개입할 것으로 기대된다(Brash AR et al., *Biochemistry.* 1987; 26: 5465~5471; Murray JJ et al., *Arch Biochem Biophys.* 1988; 265: 514~523).

또한 최근 연구에서 LO는 저밀도 지단백질 내 인지질의 산화에도 관여하는 것으로 보고 되었으며, 콩류 LO를 비롯한 15-LO 역시 LDL(저밀도 지단백질)을 산화시키는 것으로 알려져 있다(C.D. Funk and T.Cyrus, *Trends Cardiovasc Med.* 2001; 11, 116).

Deoxycholate의 존재 하에 LO는 phosphatidylcholine 구조 내에 함유된 arachidonyl기 및 linoleoyl기를 각각 산화시켜 15-hydroperoxyeicosatetraenoic acid와 13-hydroperoxyoctadecadienoate 유도체로 전환시킨다(M. Perez-Gilabert et al., *Arch. Biochem. Biophys.* 1998; 354, 18). 이는 ester 형태로 인지질에 결합된 지방산들이 LO에 의해 선택적으로 산화됨을 의미한다.

이런 관점으로 살펴보면 ester기가 2개인 dilinoleoyl phosphatidylcholine의 lipoygenation 속도는 linoleic acid의 lipoygenation 속도와 비교하여 빨라야 하지만, 실제적으로는 약 4 배나 느린 편이다(M. Perez-Gilabert et al., *Arch. Biochem. Biophys.* 1998; 354, 18). 이는 dilinoleoyl phosphatidylcholine은 LO의 기질로 사용될 수가 있으나, 구조 자체가 bilayer에 해당되어 반응속도가 제한되기 때문이다.

Lipoygenation은 불포화지방산 기질의 가용성에 따른 기질 공여성에 크게 좌우되는데, 불포화지방산은 지용성으로서 완충액에 녹지 않기 때문에 salt form 즉, sodium form 이나 ammonium form으로 전환되어 사용된다. salt form의 불포화지방산으로는 Tween 20, deoxycholate 같은 계면활성제가 일반적으로 사용된다(G. Began et al. *Biochemistry* (1999) 38; 13920;). 이러한 방법은 계면활성제를 미셀화 농도 이상으로 사용해야 하며 경우에 따라서는 용해시키는 데 장시간이 요구된다는 단점이 있다. 더욱이 조직이나 세포내에 LO가 존재할 경우에는 부정확한 결과를 초래할 수도 있다.

최근 연구에서는 dilinoleoyl phosphatidylcholine를 기질로 사용 PLA2의 활성을 측정할 바가 있으나(M. Jimenez-Ateinsaer et al., *Lipids.* 2003; 38, 677; M. Jimenez et al., *Anal Biochem.* 2003; 319, 131), 이는 콩류 LO는 dilinoleoyl phosphatidylcholine에서 유리된 linoleic acid만 산화시키고 다른 분해산물인 linoleoyl lysophosphatidylcholine은 산화시키지 않는다는 가정 하에 이루어진 것이다.

따라서, dilinoleoyl phosphatidylcholine에서 유리된 linoleoyl lysophosphatidylcholine도 LO에 의해 산화될 수 있는지에 대한 연구가 필요하다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명은 상기와 같은 종래 기술의 문제점을 해결하기 위한 것으로, linoleoyl lysophosphatidylcholine을 사용하여 LO의 활성을 간편하고도 정확하게 분석하는 신규 분석 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

발명의 구성

전술한 목적을 달성하기 위한 본 발명은 A) 1-linoleoyl lysophosphatidylcholine, 1-linolenyl lysophosphatidylcholine 및 1-arachidonyl lysophosphatidylcholine으로 이루어진 군에서 선택된 하나 또는 둘 이상의 기질과 lipoygenase를 반응시키는 단계; B) 단계 A)에서 얻어진 혼합액의 흡광도를 측정하는 단계;를 포함하는 lipoygenase 활성 분석 방법에 관한 것이다.

이하 설명의 편의를 위해 lipoygenase를 "LO"로, lysophosphatidylcholine을 "LPC"로 약칭한다.

본 발명의 실시예에서는 LO의 수용성 기질로서 가장 흔히 사용되고 있는 1-linoleic acid의 유도체인 1-linolenyl lysophosphatidylcholine를 사용하였으나, 이중 결합이 두 개 이상 함유된 구조, 즉 1,4-(Z,Z)-pentadiene 구조를 함유하는 불포화지방산 역시 LO의 기질에 해당하므로 LO의 수용성 기질로 사용할 수 있는 것은 당업자에게 당연하다. 보다 구체적으로 linoleic acid, linolenic acid, arachidonic acid, eicosapentaenoic acid 같은 불포화 지방산기를 함유한 LPC 역시 LO의 수용성 기질로 사용될 수 있다.

1-linoleoyl LPC는 실시예에 기재한 바와 같이 공지 방법에 따라 제조하여 사용할 수도 있으며(M. Jimenez-Ateinsaer et al., Lipids. 2003; 38, 677; M. Jimenez et al., Anal Biochem. 2003; 319, 131), 시판 중인 것을 구입하여 사용할 수도 있다.

상기에서 얻은 1-linoleoyl LPC 일정량(30~100 μ M)을 50 mM borate 완충액(pH 9)에 녹인 후에 LO (5 units/mL)를 넣고 시간대에 따른 UV 스펙트럼의 변화를 측정하였다(도 2의 A). 도 2의 B는 최대 흡광도를 나타낸 234nm에서의 시간 경과에 따른 1-linoleoyl LPC의 산화 후 흡광도를 나타낸 것으로, 곡선 (1)은 1-linoleoyl LPC와 LO의 반응액의 흡광도를, (2)는 LO가 없는 1-linoleoyl LPC 용액만의 흡광도를 도시한 것이다. 도 2의 B에서 확인할 수 있듯이 곡선 (1)은 반응 시간이 경과함에 따라 LO와 1-linoleoyl LPC의 반응에 의해 흡광도가 증가된 반면에 곡선 (2)는 흡광도의 변화가 없음을 알 수 있는데, 이와 같이 흡광도의 변화는 LO에 의해 1-linoleoyl LPC가 산화되어 1-linoleoyl LPC 구조 내로 -OOH기가 도입됨을 의미한다. 또한, 초기 3 분간은 비교적 직선형으로 증가하였으나 이후에는 서서히 감소하는 경향을 보였는데 이는 반응이 진행됨에 따라 반응 초기에 생성되는 peroxide 증가에 따른 LO 저해로 해석되었다.

lipoxygenase에 의해 산화된 1-linoleoyl lysophosphatidylcholine의 산화물의 구조를 LC/MS를 통하여 분석하였다(도 3). 분석 결과 1-(peroxyllinoleoyl) lysophosphatidylcholine의 특징적인 MH^+ (m/z 552.3), $[M+Na]^+$ (m/z 574.3) 및 $[M+K]^+$ (m/z 590.3)의 peak를 확인하였다. 따라서 상기 반응은 LO에 의해 1-linoleoyl lysophosphatidylcholine 구조 내에 peroxide가 도입되는 특징적인 산화반응임을 확인할 수 있었다.

본 발명에 있어서 LO에 의한 1-linoleoyl LPC 산화 반응의 최적 pH를 확인하기 위해, pH 변화에 따른 LO에 의한 반응액의 흡광도의 변화를 측정하여 그 결과를 도 4에 도시하였다. 이때, LO의 원래 기질인 linoleic acid와의 비교를 위하여, pH 변화에 따른 linoleic acid와 LO 반응액의 흡광도 변화를 측정하여 도 4에 함께 기재하였다. 도 4에서 확인할 수 있듯이 1-linoleoyl LPC의 산화 반응에서의 흡광도는 linoleic acid의 경우와 마찬가지로 pH 9~10에서 최대값을 나타내었다. 또한, soybean LPC (42%의 linoleoyl LPC 함유)를 사용한 실험에서도 유사한 결과를 획득하였다.

이어서, 기질의 농도에 따른 LO의 활성을 알아보기 위하여 1-linoleoyl LPC를 농도별(5~100 μ M)로 pH9의 완충액에 넣고, LO를 넣은 후 234nm에서 흡광도 변화를 측정하였다(도 5의 A). 흡광도는 1-linoleoyl LPC 50 μ M 까지는 기질 농도가 증가함에 따라 함께 증가하다가 더 이상 증가하지 않았다. 기질로서 soybean LPC(42%의 linoleoyl LPC 함유)를 사용한 경우에도 유사한 결과를 얻을 수 있었다(도 5의 B). 또한, 계면활성제 (Tween 20, 0.025 mM)의 존재하에 LO의 원래 기질인 linoleic acid를 사용하여 동일한 실험을 수행하여 흡광도 변화를 측정하였다.

상기 3가지 기질(1-linoleoyl LPC, soybean LPC, linoleic acid)을 사용한 산화 반응액의 흡광도 값으로부터 Lineweaver Burk plot에 의해 K_m 값과 V_m 값을 각각 산출하여 비교하였으며 최종적으로 LO의 기질로서 1-linoleoyl LPC의 우수성을 확인하였다.

[표 1]

	K_m μ M	V_m $\Delta 234/min$	V_m/K_m
linoleic acid	12 ± 0.70	0.284 ± 0.015	0.0237 ± 0.0013
soybean LPC	16 ± 0.66	0.423 ± 0.027	0.0251 ± 0.0025
1-linoleoyl LPC	12.85 ± 1.64	0.416 ± 0.026	0.0329 ± 0.0063

LO에 의한 1-linoleoyl LPC 및 linoleic acid의 산화반응에서 K_m 값과 V_m 값을 각각 비교한 결과, K_m 값은 1-linoleoyl LPC와 linoleic acid간에 유사한 것으로 파악된 반면에 V_m 값은 1-linoleoyl LPC의 경우 linoleic acid 보다 약 1.5배 이상 더 높은 것으로 파악되었다. 이와 같이 1-linoleoyl LPC은 linoleic acid 보다 더 효과적인 기질로 사용될 수 있음을 알 수 있다.

이하 실시예를 통하여 본 발명을 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 예시적인 목적일 뿐 본 발명이 이에 한정되는 것은 아니다.

실시예

실시예 1 : 1-linoleoyl LPC의 제조

공지된 방법 M. Jimenez-Ateinsaer et al., *Lipids*. 2003; 38, 677; M. Jimenez et al., *Anal Biochem*. 2003; 319, 131에 의해 1-linoleoyl LPC를 제조하였다. 더욱 자세하게는 Chloroform에 녹인 dilinoleoyl LPC(Avanti Polar Lipid Inc, Alasbaster, AL, USA) 2 mg을 유리용기에 필름화하고, 2.5 mL의 Tris 완충액(pH 8.0, Sigma, Saint Louis, MO, USA)을 넣고 현탁시킨 후에 PLA2(15 units /mL, Sigma, Saint Louis, MO, USA) 효소를 차례로 넣고 1 시간 동안 25℃에서 교반하여 반응하였다. 반응 1시간 경과 후 TLC(25 TLC plates, 20×20 cm silica gel 60 F254; Merck, Darmstadt, Germany)에서 1-linoleoyl LPC의 생성을 확인한 후에(Chloroform:methanol:ammonia:water=65:30:8:2) 1-linoleoyl LPC가 전개된 부분의 실리카겔을 긁어 TLC Plate에서 분리해 낸 후 메탄올 10 mL를 넣고 25℃에서 sonication(30 min, on ice) 후 원심분리(8,000 rpm, 5 min)하여 상정액을 감압 여과하여 실리카겔을 제거한 후 메탄올 용액을 농축하였다.

실시예 2 : 1-linoleoyl LPC와 LO 반응액의 흡광도 측정

실시예 1에서 얻어진 1-linoleoyl LPC (100 µM)을 50 mM borate 완충액 (pH 9, Sigma, Saint Louis, MO, USA) 0.5 mL에 녹인 후에 LO (840 units/mL, Sigma, Saint Louis, MO, USA) 25℃에서 반응시킨 후 반응 시작 직후부터 1분 간격으로 15분 동안 UV 스펙트럼을 측정하여 도 2의 A에 나타내었다.

최대 흡광도값을 나타낸 234nm에서의 1-linoleoyl LPC와 LO 반응액의 흡광도 변화를 시간 경과에 따라 측정하여 도 2의 B에 곡선 (1)로, LO가 없는 1-linoleoyl LPC 용액만의 흡광도를 도 2의 B에 곡선 (2)로 나타내었다.

실시예 3 : 산화물의 LC/MS 분석

실시예 2에서 반응 시작 10분 후 반응액을 채취하여 충남대 기초과학 연구소에 비치된 MSDI spectrometer(HP 1100 series LC/MSD, Hewlett Packerd, USA)를 사용하여 LC/MS로 질량을 분석하였다. 분석에 사용한 컬럼은 ZORBAX Eclipse XDB C18(5 µm, 4.6 × 50 mm, Agilent, USA)이며, 용리액은 0.1% formic acid를 함유한 물(용리액 A)과 acetonitrile(용리액 B)을 사용하였다. 분석시작부터 10분까지 용리액 B를 전체 용리액 중 0%에서 45%까지 비율(v/v)을 변화시키면서 분석하였으며, 이후 55분까지 용리액 B를 45% 비율로 유지하면서 분석하였다.

실시예 4 : pH에 따른 산화반응의 흡광도 측정

실시예 1에서 얻은 1-linoleoyl LPC(100 µM)을 표 2와 같이 여러 가지 pH의 완충액(Sigma, Saint Louis, MO, USA) 0.5 mL에 각각 넣은 후에 LO (840 units/mL, Sigma, Saint Louis, MO, USA)을 넣고서 25℃ 에서 30 초간 반응시킨 후 234 nm에서의 흡광도의 초기변화 속도를 측정하여 도 4 에 나타내었다. 그 외에 LO의 기질로서 soybean LPC(42% 의 1-linoleoyl LPC 함유, Avanti Polar Lipid Inc, Alasbaster, AL, USA), linoleic acid(Sigma, Saint Louis, MO, USA)를 사용하여 동일한 방법에 의해 흡광도 변화를 측정하여 도 4에 함께 나타내었다. linoleic acid를 기질로 사용할 때에는 계면활성제(Tween 20, 0.025 mM)를 함께 사용하였다.

[표 2]

pH	1-linoleoyl LPC	soybean LPC	linoleic acid
6	O	O	×
6.5	×	×	O
7	O	O	O
7.5	O	×	O
8	O	O	O
8.5	O	O	O
9	O	O	O
9.5	×	O	O
10	O	O	O
10.5	×	×	O
11	O	O	O

실시예 5 : 기질 농도에 따른 흡광도 측정

실시예 1에서 얻어진 1-linoleoyl LPC를 농도별(5~100 μ M)로 50 mM borate 완충액(pH 9)에 넣은 후에 LO(Sigma, Saint Louis, MO, USA)를 840 units/mL 농도로 넣고서 25 $^{\circ}$ C에서 반응시킨 후 반응 시작 30초 후 234nm에서의 흡광도를 측정하여 도 5의 A에 나타내었다.

측정된 흡광도 값으로부터 Lineweaver Burk plot에 의해 Km 값과 Vm 값을 각각 산출하여 표 1에 나타내었다.

실시예 6

LO의 기질로서 soybean LPC(42%의 linoleoyl LPC 함유, Avanti Polar Lipid Inc, Alabaster, AL, USA)을 사용한 것을 제외하고는 실시예 5와 동일한 방법에 의해 흡광도를 측정하여 도 5의 B에 나타내었다.

측정된 흡광도 값으로부터 Lineweaver Burk plot에 의해 Km 값과 Vm 값을 각각 산출하여 표 1에 나타내었다.

실시예 7

LO의 기질로서 Linoleic acid(Sigma, Saint Louis, MO, USA)을 사용하고 계면활성제인 0.025 mM Tween 20(Sigma, Saint Louis, MO, USA)을 추가로 사용한 것을 제외하고는 실시예 5와 동일한 방법에 의해 흡광도 변화를 측정하였다.

측정된 흡광도 값으로부터 Lineweaver Burk plot에 의해 Km 값과 Vm 값을 각각 산출하여 표 1에 나타내었다.

발명의 효과

상기에서 살펴본 바와 같이, 본 발명에 의해 1-linoleoyl LPC를 수용성 기질로 사용하여 1-(hydroperoxyl)linoleoyl LPC가 생성되는 것에 따라 LO의 활성을 분석할 수 있다.

또한, 본 발명에 의해 LO의 활성 분석 시 계면활성제를 함께 사용하는 불편 없이 보다 정확하고 편리하게 LO의 활성을 분석할 수 있다.

도면의 간단한 설명

도 1은 본 발명에서 lipoxygenase의 기질로서 사용되는 1-linoleoyl lysophosphatidylcholine의 구조를 나타낸 모식도이다.

도 2는 1-linoleoyl lysophosphatidylcholine를 lipoxygenase로 처리한 후 흡광도를 분석한 그래프이다.

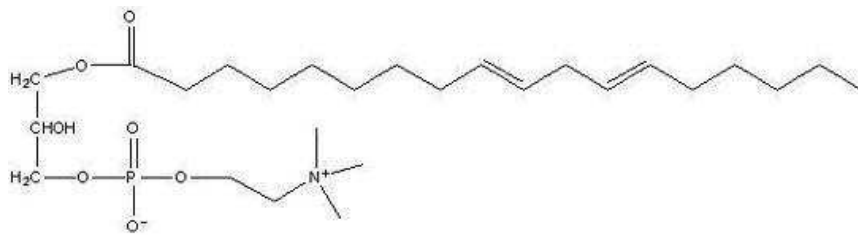
도 3은 1-linoleoyl lysophosphatidylcholine를 lipoxygenase로 처리한 후 생성된 물질의 LC/MS 분석 그래프이다.

도 4은 1-linoleoyl lysophosphatidylcholine를 여러 가지의 pH 완충액에서 lipoxygenase로 처리한 후 흡광도 증가를 분석한 그래프이다.

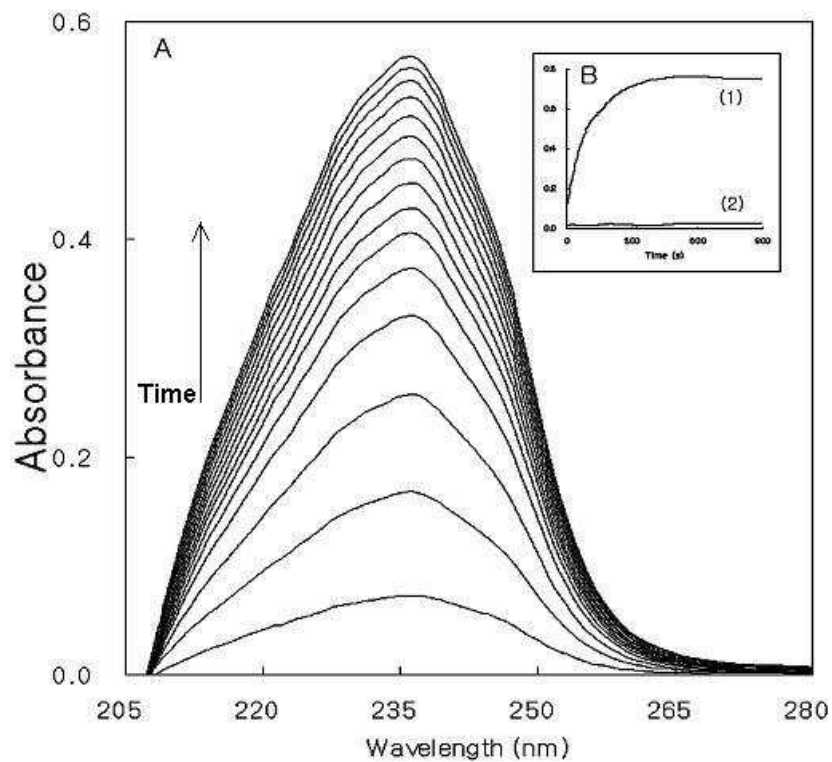
도 5는 1-linoleoyl lysophosphatidylcholine를 여러 가지 농도의 완충액에서 lipoxygenase로 처리하여 흡광도 증가를 분석한 그래프이다.

도면

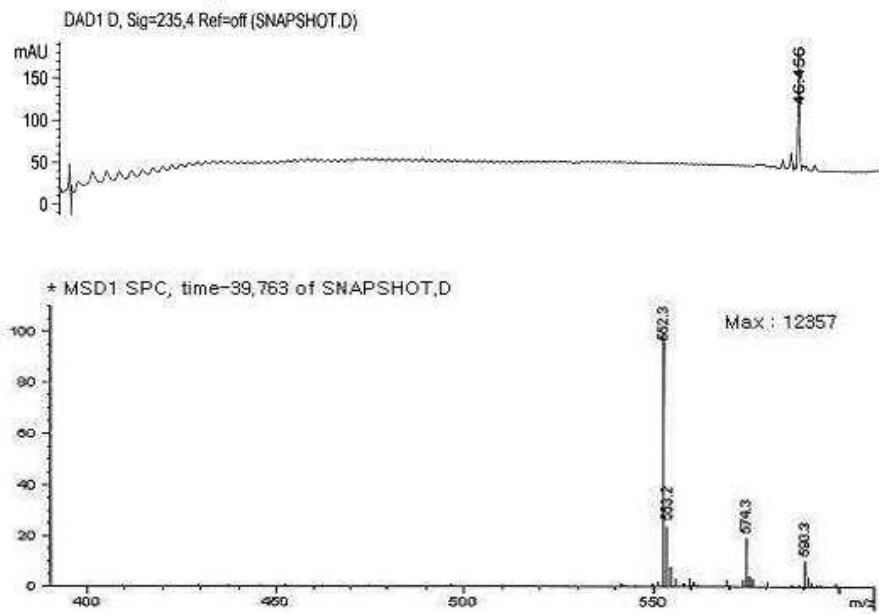
도면1



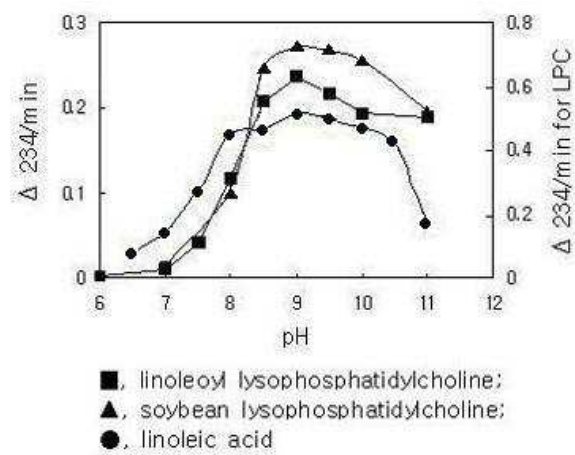
도면2



도면3



도면4



도면5

