

***Arthrobacter* sp. JH-13이 생산하는 세포외 Cytosine Deaminase의 성질**

이 인 · 박정혜 · 전흥기
부산대학교 자연과학대학 미생물학과

Properties of Extracellular Cytosine Deaminase from *Arthrobacter* sp. JH-13

Yeeh, Yeehn, Jeong-Hae Park and Hong-Ki Jun

*Department of Microbiology, College of Natural Science,
Pusan National University, Pusan 607, Korea*

Some properties of an extracellular cytosine deaminase produced from *Arthrobacter* sp. JH-13 were examined after 20-80% of ammonium sulfate fractionation. Among some substrates, this enzyme utilized cytosine and 5-fluorocytosine as a substrate. The optimum pH and temperature for the activity of this enzyme were found to be near 8.0 and 40°C, respectively. The enzyme was more stable in 0.2M of Tris-HCl buffer than 0.2M of potassium phosphate buffer. The enzyme was generally stable below 50°C, but inactivated completely at 70°C. 1 mM of Fe³⁺, K⁺ and Na⁺ increased the enzyme activity, but 0.01mM of Co²⁺, Cu²⁺, Ni²⁺, Hg²⁺, Ag²⁺, Zn²⁺, Ba²⁺, and Mg²⁺ markedly inactivated the enzyme activity. 0.1 mM of *p*-chloromercuribenzoate, trichloroacetic acid, and N-ethylmaleimide completely inhibited the enzyme activity, but 0.1mM of 2-mercaptoethanol slightly increased the enzyme activity.

생체내 purine 및 pyrimidine 화합물의 대사는 그 관련효소의 성질 및 생성산물의 동정을 통하여 규명되어 왔다. 이 가운데 pyrimidine 염기인 cytosine을 분해하여 uracil로 전환시키는 효소인 cytosine deaminase에 관한 연구는 많지 않다 (Crawford 등, 1957; Hayaishi 등, 1952; Ipata 등, 1971; Kream 등, 1952; Neu-hard, 1968; Sakai 등, 1975a, 1975b). 한편 single cell protein이 식품 또는 사료로 이용될 경우 생체내의 uric acid의 축적, 혹은 발암 과정 동안에 조직내에서 특이적인 핵산계 관련 효소의 활성이 증대하는 등의 결과는 생화학적인 측면이나 응용분야에서 관심의 대상이 되고 있다. 지금까지 알려져 있는 pyrimidine계 항종양 물질로는 5-fluorouracil, FT207, 6-

azauridine, 5-fluoro-2'-deoxyuridine, cytosine arabinoside 및 cyclocytidine 등이 있다. 이 중에서 5-fluorouracil은 생체내에서 uridine kinase에 의하여 5-fluoro-deoxyuridine monophosphate로 되어 thymidine 산 합성반응을 저해하며 결과적으로 DNA 합성반응을 저해하는 것으로 보고되어 있다 (Macmillan 등, 1978; Diasio 등, 1978). 5-Fluorouracil을 항암제로 사용한 임상연구 (Ullman 등, 1978b; Reymann, 1979)도 알려져 있으나, 5-fluorouracil을 인체내에 장기간 투여할 경우 면역억제 작용 및 간, 신장에 부작용을 유발하는 것으로 알려져 있어서 (Berenbaum, 1979; Diasio 등, 1978a) 이러한 부작용을 없애기 위해 현재 많은 연구가 진행되고 있다. 5-fluorocytosine은 사람에 있

어서 항종양 효과가 없으나, 5-fluorocytosine 을 5-fluorouracil로 전환시키는 효소인 cytosine deaminase를 함께 투여함으로써 생체내에서 부작용 없이 항종양 효과를 얻었다는 최근의 보고가 있어 (Nishiyama 등, 1981, 1982, 1985) 더욱 이 효소의 중요성을 보여주고 있다.

본 연구는 항진균제이며 인체에 무해한 5-fluorocytosine (Diasio 등, 1978; Koechlin 등, 1966)을 탈아미노화하여 5-fluorouracil을 생성하는 세균의 세포의 cytosine deaminase의 기본적인 성질을 cytosine을 기질로 하여 검토하였다.

재료 및 방법

사용시약

Cytosine은 Kohjin Co. 제품을 사용하였으며, Ammonium sulfate는 Wako Pure Chemical Industries 제품을 사용하였다. 이 외의 시약도 1급 이상의 공증된 제품을 사용하였다.

사용균주 및 배양조건

실험에 사용한 균주는 전보 (Jun 등, 1984)에서 보고한 *Arthrobacter sp.* JH-13 균주를 사용하였다. Soluble starch 0.5%, peptone 0.5%, meat extract 0.5% 및 KCl 0.1%를 첨가한 배지 (pH 8.0)를 10ml씩 분주한 시험관 (25mm×200mm)에 균체를 1백금이 접종하고 30℃에서 24시간 동안 진탕배양 (왕복 진탕 배양기: 110 rev. × 6cm stroke)한 것을 전배양액으로 하였다. 본배양은 전배양액과 같은 조성의 배지 90ml/씩을 500ml 용량의 진탕 flask에 전배양액 3ml/씩을 접종하여 30℃에서 약 55시간 동안 진탕하여 행하였다.

효소액의 조제

30℃에서 진탕배양한 배양액을 10,000×g에서 10분동안 냉동 원심분리한 후 그 상등액을 조효소액으로 사용하였다.

기질 특이성

Cytosine, 5-fluorocytosine, citidine, thymidine을 기질로 하여 효소반응을 시킨 후 paper chromatography를 이용하여 기질의 분해 유무를 확인하였다. 5-fluorocytosine을 기질로

하였을 때 효소의 활성은 Kalcker (1947)의 방법에 따라 특정파장에서 기질과 반응 생성물의 흡광도의 차이를 이용하여 측정하였다. Cytosine을 기질로 사용하였을 때는 290nm에서, 5-fluorocytosine을 기질로 하였을 때는 300 nm에서 흡광도를 측정하였다 (Fig. 1).

단백질의 정량

단백질의 측정은 Lowry 등 (1951)의 방법을 이용하였으며, 표준 단백질은 egg albumin을 사용하였다.

황산암모늄 분획

조효소액의 pH를 8.0으로 유지하면서 황산암모늄 분말을 첨가하여 20%로 포화시키고 냉장고에서 1일간 방치한 후 12,000×g에서 10분 동안 냉동 원심분리 (Hitachi 20, PR-5: Japan)하여 침전물을 버렸다. 원심분리한 상등액에 다시 황산암모늄 분말을 80%로 포화시켜 1일간 방치한 후 12,000×g에서 20분 동안 냉동 원심분리하였다. 분리된 침전물을 0.2M의 potassium phosphate 완충액 (pH 8.0) 혹은 tris-HCl 완충액에 녹인 후 동일 완충액을 사용하여 4℃에서 2일 투석하면서 완충액을 3번 교환하였다. 투석한 효소액에 남아 있는 고형물은 원심분리하여 제거한 다음 실험에 사용하였다.

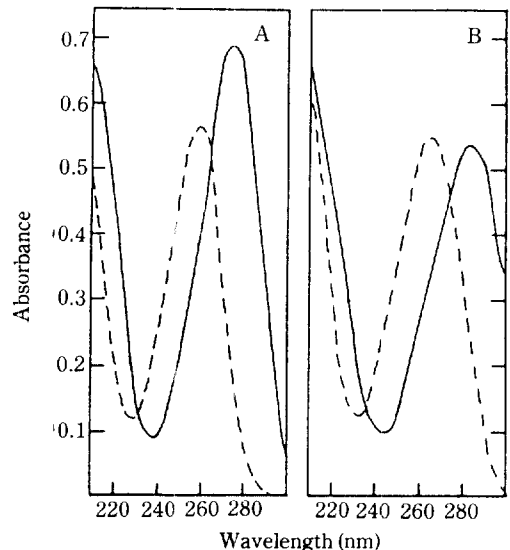


Fig. 1. Absorption spectra of substrates and products in 0.1N HCl. A: —, 0.06 mM cytosine; - - -, 0.06 mM uracil. B: —, 0.06 mM 5-fluorocytosine; - - -, 0.06 mM 5-fluorouracil.

이 외의 방법은 전보 (Jun 등, 1984) 에서 행한 방법에 따랐다.

결과 및 고찰

황산암모늄 분획

세포의 cytosine deaminase의 성질을 검토하기 위하여 효소액에 황산암모늄 분말을 가하여 20~80% 사이에서 분획하였다. 그 결과 비활성은 약 1.5배 증가하였고, 수율은 약 38%로 나타났다 (Table 1).

Table 1. Partial purification of extracellular cytosine deaminase

Step	Total protein (mg)	Total activity (units)	Specific activity (units/mg)	Yield (%)
Culture filtrate	8.4	120	14.2	100
Ammonium sulfate (20~80%)	2.1	45	21.4	38

기질 특이성

Cytosine, 5-fluorocytosine, cytidine, thymidine을 사용하여 분해유무를 검토한 결과, 본 효소는 cytosine과 5-fluorocytosine을 기질로

Table 2. Substrate specificity of an extracellular cytosine deaminase.

Compound	Relative activity (%)
Cytosine	100
5-Fluorocytosine	88
Cytidine	0
Thymidine	0

Activities were determined under standard assay conditions except that cytosine was replaced by other compounds as indicated. All substrates were added to a concentration of 3 mM.

사용하였으며, 효소의 활성을 비교해 본 결과 cytosine을 기준으로 하였을 때 5-fluorocytosine에 대한 효소의 상대활성은 88%로 나타났다 (Table 2).

효소의 안정성

효소의 온도에 대한 안정성을 검토한 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 본 효소는 50°C 이하에서는 대체로 안정하나, 60°C 부근에서 약 18%의 활성을 잃었고, 70°C 부근에서는 거의 완전히 실활되었다. 한편 *Serratia marcescens* (Sakai 등, 1975a)의 세포내 cytosine deaminase

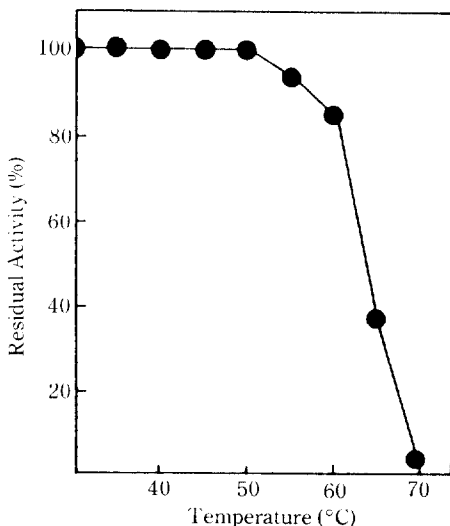


Fig. 2. Effect of temperature on the stability of an extracellular cytosine deaminase. The enzyme solution in 0.2M tris-HCl buffer, pH 8.0 was incubated at the indicated temperatures for 10 min. After being cooled, the activity was determined.

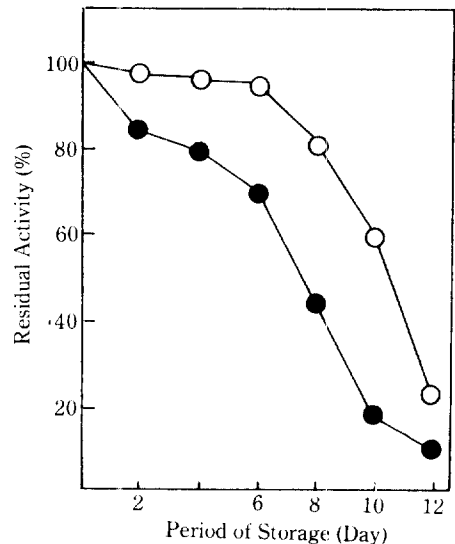


Fig. 3. Effect of the periods of storage on the stability of an extracellular cytosine deaminase. The enzyme was stored at 4°C and then the residual activity was assayed by standard assay conditions. ○, 0.2 M tris-HCl buffer, pH 8.0; ●, 0.2M potassium phosphate buffer, pH 8.0.

는 70°C에서 10분간 처리할 경우 75%의 활성이 잔존하여 열에 매우 안정한 것으로 보고되어 있으며, *Pseudomonas aureofaciens* (Sakai 등, 1975b)의 세포내 cytosine deaminase는 60°C에서 5분간 처리하였을 때 70%의 활성을 잃는 것으로 보고되어 있으나, 본 효소의 경우는 60°C 부근까지는 대체로 안정한 것으로 나타났다. 또한 효소를 4°C에서 pH 8.0의 tris-HCl 및 potassium phosphate 완충액 속에 보존하면서 효소의 안정성을 검토한 결과 (Fig. 3) tris-HCl 완충액에서 본 효소는 대체로 안정하여 6일간 보관하였을 때 잔존활성은 90% 이상 유지되었으며, 그 이후는 급격하게 실활되었다. Potassium phosphate 완충액을 사용하였을 때는 8일째의 잔존활성이 50%로서, tris-HCl 완충액이 본 효소의 안정성에 더욱 효과적인 것으로 나타났다.

효소의 활성에 대한 pH 및 온도의 영향

효소활성에 대한 pH의 영향을 몇가지 완충액을 사용하여 검토하였다 (Fig. 4). 세포내 효소

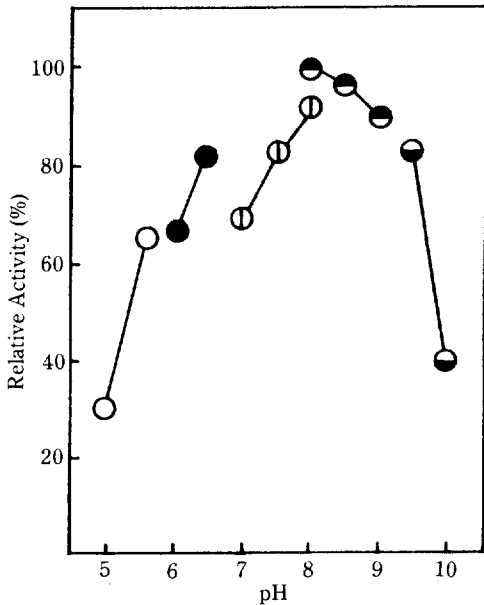


Fig. 4. Effect of pH on the activity of an extracellular cytosine deaminase. The enzyme activity was determined by the standard method except that pH value was varied. 0.2M of each buffer was used. o, sodium acetate buffer; •, sodium phosphate buffer; o, potassium phosphate buffer; o, tris-HCl buffer; •, sodium carbonate buffer.

인 경우, yeast의 cytosine deaminase (Kream 등, 1952)는 최대 활성을 나타내는 pH가 6과 9 이었고, *Serratia marcescens* (Sakai 등, 1975a)와 *Pseudomonas aureofaciens* (Sakai 등, 1975b)의 cytosine deaminase는 각각 pH 10.0 및 9.5에서 최대 활성을 보인 것에 비해, 본 균주의 세포의 cytosine deaminase는 pH 8.0~8.5 사이에서 최대 활성을 보였다.

효소의 활성에 대한 온도의 영향을 검토한 결과, 최적온도는 37~40°C 부근으로 나타났다. *Pseudomonas aureofaciens* (Sakai 등, 1975b)의 경우 효소의 활성은 40~45°C 사이에서, *Serratia marcescens* (Sakai 등, 1975a)는 45°C 부근에서 최대로 나타나 있으므로 본 효소의 경우와 비슷한 결과를 보여주고 있다 (Fig. 5).

효소활성에 대한 금속이온의 영향

각종 금속이온을 이용하여 효소의 활성에 대한 영향을 검토한 결과는 Table 3의 결과에서 보는 바와 같이 1mM의 Fe³⁺, K⁺ 및 Na⁺ 이온의 존재하에서는 효소의 활성이 증가하였으나, 0.1mM과 0.01mM의 농도에서는 거의 영향이

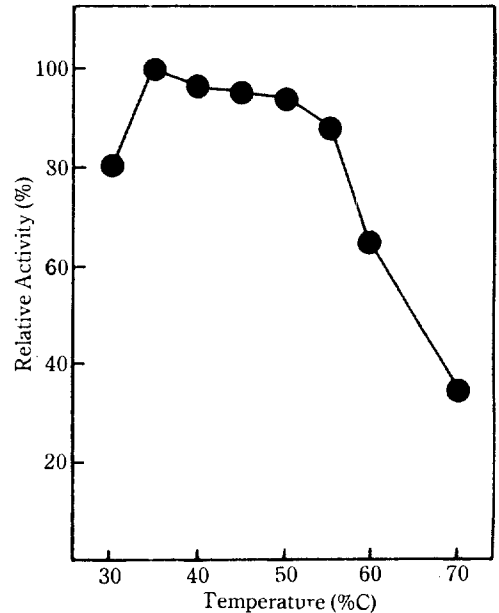


Fig. 5. Effect of temperature on the activity of an extracellular cytosine deaminase. Buffers used were 0.2M of tris-HCl buffer, pH 8.0. The enzyme activity was determined under standard assay conditions except that reaction temperature was varied.

Table 3. Effect of metal ions on cytosine deaminase activity

Metal ion	Relative activity (%)		
	1 mM	0.1 mM	0.01mM
None	100	100	100
Cr(NO ₃) ₃ ·3H ₂ O	73	46	35
CoCl ₂ ·6H ₂ O	58	- ^a	-
Cu(NO ₃) ₂ ·3H ₂ O	60	-	-
NiCl ₂	60	-	-
FeCl ₃ ·6H ₂ O	124	110	90
HgCl ₂	-	-	-
CaCl ₂ ·2H ₂ O	90	83	42
MnCl ₂ ·4H ₂ O	94	79	30
AgNO ₃	-	-	-
SnCl ₂ ·2H ₂ O	-	74	25
KCl	115	100	80
NaCl	135	110	100
Zn(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	-	-	-
Pb(NO ₃) ₂	20	20	20
BaCl ₂ ·2H ₂ O	88	80	-
MgCl ₂ ·6H ₂ O	84	80	-

^aNot detected.

없었다. 또한 0.01mM의 Co²⁺, Cu²⁺, Ni²⁺, Hg²⁺, Zn²⁺, Ba²⁺ 및 Mg²⁺ 이온에 의해서 효소의 활성은 완전히 저해되는 것으로 나타났다.

Serratia marcescens (Sakai 등, 1975a)의 효소는 0.1mM의 Hg²⁺, Zn²⁺, Cu²⁺, Co²⁺ 및 Cd²⁺에 의해 저해되며, 1.0mM의 Fe³⁺ 및 Sn²⁺에 의해서는 다소 그 활성이 증가된다고 보고되어 있으며, *Pseudomonas aureofaciens* (Sakai 등, 1975 b)의 경우는 1.0mM의 Cu²⁺, Hg²⁺, Mn²⁺, Zn²⁺, Cd²⁺, Ni²⁺ 및 Co²⁺ 등의 이온이 효소활성을 강력하게 저해하였다고 보고되어 있는 것을 볼 때에, 본 효소의 성질은 이들 세포내 효소와 약간의 차이를 보여주고 있다.

효소의 활성에 미치는 각종 저해제의 영향

각종 저해제를 효소와 함께 10분간 37°C에서 예온한 후 기질을 넣어 반응시킨 후 효소의 활성을 비교하여 Table 4와 같은 결과를 얻었다. 효소의 활성은 0.1mM의 *p*-chloromercuribenzoate, trichloroacetic acid, N-ethylmaleimide

등에 의해 완전히 저해되었고, 2-mercaptoethanol의 경우는 10mM과 1mM에서는 15% 이상 저해되었지만 0.1mM의 농도에서는 효소의 활성이 약간 증가되었다. Sakai 등(1975b)이 보고한 *Pseudomonas*의 세포내 효소는 *p*-chloromercuribenzoate에 의해 강하게 저해되는 것으로 나타나 있으며 다른 저해제에 의해서는 거의 저해되지 않는 것으로 보고되어 있고, Sakai 등(1975a)이 보고한 *Serratia*의 효소도 저해제에 크게 영향을 받지 않는 것으로 나타나 있으나 *Arthrobacter* JH-13 균주가 생산하는 세포외 cytosine deaminase는 대체로 각종 저해제의 영향을 크게 받는 것으로 나타났다.

본 균주의 세포외 cytosine deaminase를 완전정제하여 그 성질을 검토한다면 더욱 완전한 성질비교가 이루어질 것으로 생각되나, 이상의 연구 결과 특히 금속이온과 저해제의 영향을 비교해 볼 때에 세균기원의 세포외 cytosine deaminase와 세포내 cytosine deaminase는 그 성질이 상당히 다른 효소인 것으로 생각된다.

Table 4. Effect of some enzyme inhibitors on cytosine deaminase activity

Inhibitor	Relative activity (%)		
	10 mM	1 mM	0.1mM
NaF	46	39	-
<i>p</i> -CMB ^a	- ^b	-	-
TCA ^c	-	-	-
N-ethylmaleimide	-	-	-
EDTA ^d	-	-	-
NaCN	61	35	-
Pentachlorophenol	90	92	54
α , α' -dipyridyl	20	32	39
Monoiodoacetic acid	93	54	23
NaN ₃	23	77	85
2-Mercaptoethanol	79	84	110
I ₂	77	54	20
None	100	100	100

^a*p*-Chloromercuric benzoate. ^bNot detected.^cTrichloroacetic acid.^dEthylenediaminetetraacetic acid.

적 요

20~80%로 황산암모늄 분획한 효소액을 사용하여 *Arthrobacter* sp. JH-13균주가 생산하는 세포의 cytosine deaminase의 성질을 검토하였다. 검토한 기질 중, 본 효소는 cytosine과 5-fluorocytosine을 기질로 이용하였으며, 효소의 활성에 대한 최적 pH는 8.0 부근이었고, 최적 온도는 40°C 부근으로 나타났다. 본 효소는 0.2M의 potassium phosphate 완충액 (pH 8.0) 보다 0.2M의 tris-HCl 완충액 (pH 8.0)에서 더욱 안정하였다. 온도에 대한 안정성을 검토한 결과, 50°C 부근까지는 대체로 안정하였으나, 70°C에서는 완전히 활성을 잃었다. 또한 1mM의 Fe^{2+} , K^+ , Na^+ 이온은 효소의 활성을 증가시켰으나, 0.01mM의 Co^{2+} , Cu^{2+} , Ni^+ , Hg^{2+} , Ag^{2+} , Zn^{2+} , Ba^{2+} 및 Mg^{2+} 이온들은 효소의 활성을 강력하게 저해하였다. 0.1mM의 *p*-mercuribenzoate, trichloroacetic acid, N-ethylmaleimide 등은 효소의 활성을 완전히 저해하였으며, 0.1mM의 2-mercaptoethanol은 효소의 활성을 약간 증가시키는 것으로 나타났다.

사 사

본 연구는 1983년도 한국 과학재단의 학술 연구비 지원으로 수행되었으며, 이를 감사드립니다.

REFERENCES

1. Berenbaum, M.C., 1979. The immunosuppressive effects of 5-fluorocytosine and 5-fluorouracil. *Chemother.* **25**, 54-59.
2. Crawford, L., A., A. Kornberg, and S. Simms, 1957. Conversion of uracil and orotate to uridine 5-phosphate by enzymes in *Lactobacilli*. *J. Biol. Chem.* **226**, 1093-1101.
3. Diasio, R.B., B.E. Lakings, and J.E. Bennett, 1978a. Evidence for conversion of 5-fluorocytosine to 5-fluorouracil in humans; Possible factor in 5-fluorocytosine clinical toxicity. *Antimicrob Agents Chemother.* **14**, 903-908.
4. Diasio, R.B., J.E. Bennett, and C.E. Myers, 1978b. Mode of action of 5-fluorocytosine. *Biochem. Pharmacol.* **27**, 703-708.
5. Hayaishi, O. and A. Kornberg, 1952. Metabolism of cytosine, thymine, uracil, and barbituric acid by bacterial enzymes. *J. Biol. Chem.* **197**, 717-732.
6. Ipata, P.L., F. Marmochi, G. Magni, R. Felicioli, and G. Polidoro, 1971. Baker's yeast cytosine deaminase. Some enzymic properties and allosteric inhibition by nucleosides and nucleotides. *Biochem.*, **10**, 4270-4276.
7. Jun, H-K. and J.H. Park, 1984. Isolation of extracellular cytosine deaminase producing strain *Arthrobacter* sp. JH-13 and cultural conditions of its enzyme production. *Kor. J. Microb.*, **22**, 257-263.
8. Kalkar, H.M., 1947. Differential spectrophotometry of purine compounds by means of specific enzymes. I. Determination of hydroxypurine compounds. *J. Biol. Chem.* **167**, 429-442.
9. Koechlin, B.A., F. Rubio, S. Palmer, T. Gabriel, R. Duschinsky, 1966. The metabolism of 5-fluorocytosine-2 ¹⁴C and of cytosine-¹⁴C in the rat and the disposition of 5-fluorocytosine-2 ¹⁴C in man. *Biochem. Pharmacol.* **15**, 435-446.
10. Kream, J. and E. Chargaff, 1952. On the cytosine deaminase of yeast. *J. Amer. Chem. Soc.* **74**, 5157-5160.
11. Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J.L. Randel, 1951. The protein measurement with foline phenol method. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
12. Macmillan, W.E., W.H. Wolberg, and P.G. Welling, 1978. Pharmacokinetics of fluorouracil in humans. *Cancer Res.* **38**, 3478-3482.
13. Neuhard, J., 1968. Phrimidine nucleotide metabolism and pathways of thymidine triphosphate biosynthesis in *Salmonella typhymurium*. *J. Bacteriol.* **96**, 1519-1627.
14. Nishiyama, T., Y. Kawamura, K. Kawamoto, H. Matsumura, N. Yamamoto, T., Ito, A. Ohyama, T. Katsuragi, and T. Sakai, 1981. Antineoplastic chemotherapy without systemic side effects to the host. *Curr. Chemother. and Immunother. Proc.*, 12th Internat'l Congr. of Chemother. Florence, Italy, 19-24, July.
15. Nishiyama, T., Y. Kawamura, K. Kawamoto,

- H. Matsumura, N. Yamamoto, T. Ito, A. Ohyama, T. Katsuragi, and T. Sakai, 1982. Antineoplastic effect of 5-fluorocytosine and cytosine deaminase on brain tumor. *Neurolo. Med. Chir.* **22**, 344-352.
16. Nishiyama, T., Y. Kawamura, K. Kawamoto, H. Matsumura, N. Yamamoto, T. Ito, A. Ohyama, T. Katsuragi, and T. Sakai, 1985. Antineoplastic effects in rats of 5-fluorocytosine in combination with cytosine deaminase capsules. *Cancer Res.* **45**, 1753-1761.
17. Reymann, F., 1979. Treatment of basal cell carcinoma of the skin with 5-fluorouracil ointment: A 10-year follow-up study. *Dermatologica* (Basel). **158**, 368-372.
18. Sakai, T., T.S. Yu, and H. Tabe, 1975a. Purification of cytosine deaminase from *Serratia marcescens*, *Agr. Biol. Chem.* **39**, 1623-1629.
19. Sakai, T., T.S. Yu, K. Taniguchi, and S. Omata, 1975b. Purification of cytosine deaminase from *Pseudomonas aureofaciens*. *Agr. Biol. Chem.* **39**, 2015-2020.
20. Ullman, B. and J. Kirsch, 1979. Metabolism of 5-fluorouracil in cultural cells: Protection from 5-fluorouracil cytotoxicity by purines. *Mol. Pharmacol.* **15**, 357-366.

(Received July 19, 1985)