

세균의 5-Fluorocytosine Deaminase의 분포와 기질 특이성

전홍기·김동완

부산대학교 자연과학대학 미생물학과
(1985년 9월 5일 수리)

Distribution and Substrate Specificity of 5-fluorocytosine Deaminase in Bacteria

Hong-Ki Jun and Dong-Wan Kim

Department of Microbiology, College of Natural Science,
Pusan National University, Pusan 607, Korea
(Received September 5, 1985)

Distribution and substrate specificity of 5-fluorocytosine deaminase were studied in various genera of bacteria. 5-Fluorocytosine deaminase was produced by various bacteria independent of genus and species and it catalyzed the deamination of cytosine, 5-fluorocytosine and 5-methylcytosine. *Xanthomonas campestris* IAM 1671 produced relatively large amount of 5-fluorocytosine deaminase. The composition of optimum culture medium for enzyme production was glycerine 0.5%, peptone 1%, yeast extract 0.5%, NaCl 0.5% and the initial pH of the medium was 7.5. The highest enzyme formation was observed after 24 hours of cultivation in 500 ml shaking flask containing 90 ml of medium at 30°C on a reciprocal shaker.

Pyrimidine 화합물은 세포의 여러가지 기능에 관여하는 중요한 대사물질로서 생물계에 널리 분포하며, 이에 관한 연구는 생화학적인 측면에서 또는 응용분야에서 많이 진행되어 왔다. Cytosine deaminase는 1925년 Hahn과 Schäfer⁽¹⁾에 의해서 효모와 *E. coli*의 균체내에서 처음으로 발견된 이후, 많은 미생물의 세포에서 발견되었다^(2,3,4,5). Cytosine deaminase는 pyrimidine nucleotide의 생합성의 salvage 합성에 중요한 역할을 가지고 있는 효소로서 생각되고 있으며, cytosine을 특이적으로 탈아미노하여 uracil로 전환시킨다.

최근에 발표된 뇌종양의 치료목적에 5-fluorocytosine과 cytosine deaminase (*E. coli* K-12의 균체내 효소)를 병용하는 국소화학 요법⁽⁶⁾의 개발은 5-fluorocytosine (5-FC)를 5-fluorouracil (5-FU)로 전환시키는 cytosine deaminase에 대한 응용분야에 관심을 집중시키고 있다. 항진균 작용을 가지고 있

는 5-FC의 진균에 대한 작용기작은 아직 충분히 해명되어 있지 않지만, Koechlin⁽⁷⁾등은 5-FC-2¹⁴C를 첨가한 배지에서 *Candida albicans*를 배양하여 5-FC-2¹⁴C의 활성을 추적한 결과 RNA분획 중에서 그 활성이 존재하는 것으로 밝혀져, 진균세포내에서의 5-FC는 cytosine deaminase에 의해서 탈아미노되어 5-FU로 전환되기 때문에, 핵산합성이 저해되면서 항진균 작용이 발휘되는 것으로 고찰하였다. 그러나 항진균 작용을 가지고 있는 5-FC는 인체내에서는 5-FU로의 전환효소인 cytosine deaminase가 존재하지 않기 때문에 항종양 작용은 없으며, 인체에 투여된 5-FC는 대부분 대사변환되지 않고 체외로 배설된다^(7,8).

본 연구는 5-FC를 5-FU로 전환할 수 있는 기질 특이성을 가진 효소의 분포 관계를 세균을 사용하여 조사함으로써 5-fluorocytosine과 cytosine deaminase의 사용에 의한 뇌종양의 국소화학요법에 대

한 기초 자료를 마련하기 위해서 실시한 것이다.

재료 및 방법

사용시약 및 기기

5-fluorocytosine과 5-methylcytosine은 Sigma 제품을, cytosine과 thymine은 Kohjin Co., Ltd.(Japan) 제품을 사용하였다. 또한 uracil은 Merk 제품을, 5-fluorouracil은 Nakarai Chemicals Ltd.(Japan) 제품을 사용하였으며, 기타 일반시약은 특급 및 일급시약을 사용하였다. 균체과피에 사용한 초음파 발생기는 Lab-Line ultratip Labsonic System model No. 9100 (U. S. A)을 사용하였으며, 효소 활성 측정 등에는 Shimadzu Recording Spectrophotometer U. V.-240 (Japan)을 사용하였다.

사용균주 및 배양조건

세포내 5-fluorocytosine deaminase 생성유무는 44주의 세균을 대상으로 하여 검색하였다. 균의 보존배지는 peptone 3.0%, glycerin 1.0%, yeast extract 0.01%, meat extract 0.01%, KH_2PO_4 0.1%, K_2HPO_4 0.15%를 포함하고 있는 고체배지 (pH 7.0)를 사용하였다. 효소 생성에 사용한 검색배지는 meat extract 1.0%, peptone 1.0%, NaCl 0.5%, yeast extract 0.3%를 포함하고 있는 액체배지 (pH 7.0)로서, 액체배지 100ml가 들어 있는 500ml용 진탕 플라스크에 보존균주 1백금이를 접종하여, 30°C에서 48시간 동안 진탕배양하였다.

조효소액의 조제

진탕배양된 균체는 냉동원심분리기를 사용하여 집진한 다음, 0.85% NaCl용액으로 2회 세척하여 0.1M tris-HCl 완충액 (pH 7.0)에 현탁하였다. 현탁된 균체는 5°C 이하를 유지하면서 초음파 발생기를 사용하여 파쇄하였으며, 세포 및 세포파쇄물은 냉동원심분리기에서 원심분리 (10,000×g, 30분)하여 제거하고 상등액을 조효소액으로 이용하였다.

효소의 활성 검출방법

각 균주의 세포내 5-fluorocytosine deaminase 생성유무는 paper chromatography법으로 확인하였다. 즉 5-fluorocytosine (혹은 cytosine, methylcytosine) 3μmole, tris-HCl 완충액 (pH 8.0) 100μmole과 적당량의 공시액을 포함하는 효소반응액 1ml를 37°C에서 30분간 반응시킨 다음, 그 반응액 50μl를 Whatman No. 1 filter paper에 spot 하여 실온에서 상승법으로 전개하였다. 전개액은 methyl alcohol : ethyl alcohol : Conc.-HCl : H_2O (50 : 25 : 6 : 19,

v/v/v/v)를 사용하였으며, 각 spot의 검출은 ultraviolet light (short wave)를 이용하였다. Paper chromatography법에 의해서 확인된 5-fluorouracil 및 uracil과 thymine의 정량은 전개지 상의 각 spot를 잘라서 5ml의 0.1N HCl 용액으로 6시간 동안 추출한 다음, 각각 270nm와 260nm에서 흡광도를 측정하였다.

5-fluorocytosine deaminase의 활성 측정방법

효소반응은 3μmole의 기질과 100μmole의 tris-HCl 완충액 (pH 8.0)과 적당량의 효소액이 포함된 1ml의 반응액에서 행하였다. 즉, 기질을 첨가하기 전의 반응액을 37°C에서 10분간 예온시킨 후, 기질을 첨가하여 30분간 반응시킨 다음, 5ml의 0.1N HCl에 반응액 0.1ml를 첨가하여 반응을 정지시킨 후 특정 파장에서 기질과 반응 생성물의 흡광도의 차를 이용하여 측정하였다. 5-fluorocytosine과 5-methylcytosine⁽⁹⁾을 기질로 사용하였을 때는 300nm에서 흡광도를 측정하였으며, cytosine⁽⁴⁾을 기질로 사용하였을 때에는 290nm에서 흡광도를 측정하였다. 5-FU과 5-FC가 갖는 흡광곡선은 Fig. 1과 같

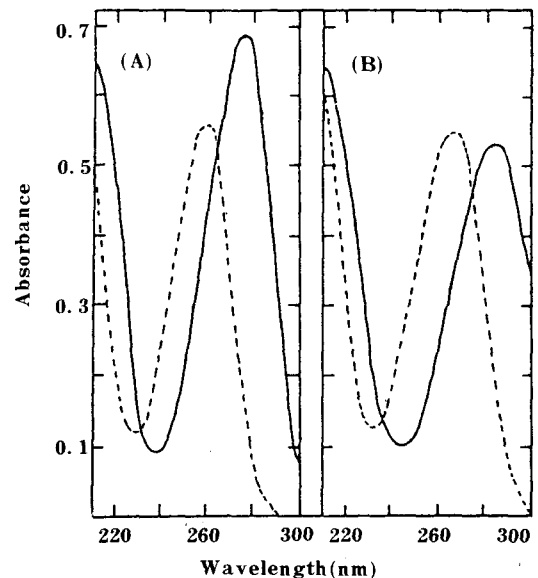


Fig. 1. Absorption spectra of substrates and reaction products in 0.1N HCl.

The change in molar absorbance in 0.1N HCl was calculated to be $5,000\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ for 5-fluorocytosine and $5,300\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ for cytosine.

(A) : —, 0.06 mM cytosine; ---, 0.06 mM uracil
(B) : —, 0.06 mM 5-fluorocytosine; ---, 0.06 mM 5-fluorouracil

다. 효소 활성의 1unit는 상기 표준 반응 조건에서 1시간에 1 μ mole의 기질을 분해하는 효소량으로 나타냈으며, 비활성은 단백질 1mg에 대한 unit의 수로 나타내었다.

균의 생육도 측정 및 단백질의 정량방법

균의 생육은 분광 광도계를 사용하여 660nm에서의 배양액의 흡광도를 측정하였으며, 단백질은 egg albumin을 표준 단백질로 하여 Lowry 등⁽¹⁰⁾의 방법으로 측정하였다.

결과 및 고찰

5-fluorocytosine deaminase의 검색과 기질특이성

항진균 작용을 가지는 5-fluorocytosine (5-FC)를 항종양 작용을 가지는 물질인 5-fluorouracil (5-FU)로 전환시킬 수 있는 효소의 분포 관계를 세균의 무세포 추출액을 사용하여 검토한 결과는 Table 1에서 보는 바와 같다.

5-fluorocytosine deaminase (5-FC deaminase)의 생산성은 속, 종에 관계없이 다양하게 나타났다. 44균주 중에서 21균주가 5-FC의 분해능이 있는 것으로 나타났으며, 5-FC를 분해하는 경우는 cytosine과 5-methylcytosine을 분해하는 것으로 나타났다. 이와 같은 실험 결과는 세균에 존재하는 cytosine deaminase에는 cytosine뿐 아니라 5-FC와 5-methylcytosine도 다 함께 기질이 될 수 있다는 것으로 사료된다.

Chromatograph paper 상에 나타난 uracil, 5-FU, thymine의 spot의 크기와, 이들을 0.1N HCl로 용출한 용액의 흡광도를 측정하여 비교한 결과, 검토된 균주 중에서 *Achromobacter aceris* (Edson & Carp) IFO 3166은 5-FC에 대하여 높은 활성을 보였고, *Pseudomonas fluorescens* Tanaka & Knox와 *Bacillus subtilis* IFO 3007은 5-FC와 5-methylcytosine에서 높은 활성을 나타내었으며, *Corynebacterium rathayi* IFO 12162, *Brevibacterium incertum* IFO 12145, *Xanthomonas campestris* IAM 1671은 cytosine, 5-FC, 5-methylcytosine을 모두 강하게 분해하였다.

이상의 검토 결과에서 밝혀진 5-FC deaminase 생산 균주들 중에서 활성이 비교적 높다고 인정되는 균주를 선택하여 동일 배양 조건에서 35시간 배양하여 cytosine과 5-FC에 대한 효소의 활성을 검토한 결과, *Xanthomonas campestris* IAM 1671이 5-

Table 1. Distribution and substrate specificity of 5-fluorocytosine deaminase in bacteria.

Strain	Cytosine	5-fluorocytosine	5-methylcytosine
<i>Pseudomonas fragi</i>			
IFO 3458	+	+	+
<i>Pseudomonas polycolor</i>			
IFO 3918	-	-	-
<i>Pseudomonas</i> MA E.E. Snell	-	-	-
<i>Pseudomonas iodinum</i>			
IFO 3558	-	-	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i> Tanaka & Knox	+	++	++
<i>Xanthomonas campestris</i> IAM 1671	++	++	++
<i>Escherichia coli</i> Crookes, Ajinomoto	+	+	+
<i>Escherichia coli</i> K12 IFO 32-8	+	+	+
<i>Escherichia coli</i> B L. I. Pizer	+	+	+
<i>Aerobacter cloacae</i> IAM 1221	+	+	+
<i>Aerobacter aerogenes</i> IFO 3317	+	+	+
<i>Erwinia aroideae</i> IFO 3830	+	+	+
<i>Serratia marcescens</i> IFO 3504	+	+	+
<i>Serratia plymuthicum</i> IFO 3055	+	+	+
<i>Proteus vulgaris</i> IFO 3851	+	+	+
<i>Achromobacter aceris</i> (Edson & Carp) IFO 3166	+	++	+
<i>Bacillus natto</i> Swamura IFO 3013	-	-	-
<i>Bacillus natto</i> U.U. Shimane Agricult. College	-	-	-
<i>Bacillus subtilis</i> IFO 3007	+	++	++
<i>Bacillus subtilis</i> var. <i>aterrimus</i>	-	-	-

Table 1. 계속

Strain	Cytosine	5-fluoro-cytosine	5-methyl-cytosine
<i>Bacillus subtilis</i> var. niger IFO 3214	+	+	+
<i>Bacillus subtilis</i> K. Wild. Ajinomoto	-	-	-
<i>Bacillus pumilus</i> IFO 3030	+	+	+
<i>Bacillus circulans</i> IFO 3329	-	-	-
<i>Bacillus licheniformis</i> IAM 11054	+	+	+
<i>Bacillus sphaericus</i> IFO 3341	-	-	-
<i>Bacillus sphaericus</i> IFO 3525	-	-	-
<i>Bacillus sphaericus</i> IFO 3526	-	-	-
<i>Bacillus sphaericus</i> IFO 3528	-	-	-
<i>Agrobacterium radiobacter</i> IAM 1526	-	-	-
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> IAM 1037	-	-	-
<i>Micrococcus flavus</i> IFO 3242	-	-	-
<i>Micrococcus luteus</i> IFO 3763	-	-	-
<i>Micrococcus roseus</i> IFO 3764	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> IFO 3060	-	-	-
<i>Sarcina lutea</i> IAM 1099	-	-	-
<i>Sarcina lutea</i> IFO 3232	-	-	-
<i>Sarcina marginata</i> IFO 3066	-	-	-
<i>Sarcina variabilis</i> IFO 3067	+	+	+
<i>Corynebacterium rathayi</i> IFO 12162	++	++	++
<i>Brevibacterium ammoniagenes</i> IFO 12071	-	-	-
<i>Brevibacterium sp.</i> P145N. Kato	-	-	-
<i>Brevibacterium incertum</i> IFO 12145	++	++	++

++; The high activity of the enzyme (above 0.2 of OD value of the spot eluate).

Table 2. Specific activity of 5-fluorocytosine-deaminase for 5-fluorocytosine and cytosine.

Strain	Specific activity (units/mg)	
	Cytosine	5-fluorocytosine
<i>Pseudomonas fluorescens</i> Tanaka & Knox	0.11	0.13
<i>Xanthomonas campestris</i> IAM 1671	0.16	0.18
<i>Escherichia coli</i> IFO 3208	0.10	0.11
<i>Serratia marcescens</i> IFO 3504	0.08	0.09
<i>Acheromobacter aceris</i> (Edson & Carp) IFO 3166	0.09	0.14
<i>Bacillus subtilis</i> IFO 3007	0.12	0.13
<i>Corynebacterium rathayi</i> IFO 12162	0.10	0.12
<i>Brevibacterium incertum</i> IFO 12145	0.09	0.11

The microorganism was grown in a 500ml shaking flask containing 100ml of the medium described above under aeration at 30°C for 35hr.

FC에 대한 활성이 비교적 높은 것으로 나타났다 (Table 2).

Xanthomonas campestris에 의한 5-FC deaminase의 생산조건 검토

효소의 최적 생성 조건을 설정하기 위하여 탄소원, 질소원, 초발 pH, 및 배양시간 등을 검토하였다. 먼저 각종 탄소원, 즉 당과 유기산염을 대상으로 하여 설정된 배지에서는 mannose와 glycerin이 효소의 생산에 좋은 효과를 나타내었다 (Table 3).

질소원의 영향은 1% glycerin과 0.5% NaCl (pH 7.0)을 포함하는 기본 배지에서 여러가지 무기 및 유기 질소원을 첨가하여, 각 질소원이 효소 생성능에 미치는 영향을 검토하였다 (Table 4). 무기 질소원에서는 균이 거의 생육하지 않았으며, 유기질소원 중에서는 yeast extract가 효소 생산에 좋은 효과를 나타내었다. 균의 생육과 효소의 생산면에서는 peptone 1%와 yeast extract 0.5%를 함께 함유한 배지가 적합한 것으로 나타났다.

glycerin의 농도가 효소 생산에 미치는 영향을 검토하기 위하여 1% peptone, 0.5% yeast extract, 0.5% NaCl (pH 7.0)을 함유하는 배지에 glycerin의 농도를 달리하여, 효소의 생산성을 검토하였을

Table 3. Effect of carbon sources on enzyme formation.

Carbon sources (1%)	Final pH	Growth (OD at 660 nm)	Total activity (units)	Specific activity (units/mg)
Glucose	8.2	5.89	4.62	0.199
Sucrose	8.4	7.52	6.33	0.212
Fructose	8.0	6.53	4.06	0.155
Mannose	8.5	8.09	9.04	0.224
Xylose	8.0	5.49	4.39	0.205
Glycerin	8.2	9.41	9.67	0.224
Dextrin	8.2	6.88	1.60	0.075
Soluble starch	8.2	6.54	3.63	0.161
Sodium acetate	8.7	6.96	6.24	0.178
Sodium citrate	8.5	4.08	3.49	0.170
Sodium tartrate	8.2	5.77	3.11	0.103
Sodium succinate	8.2	6.10	2.16	0.060
None	8.0	6.16	4.03	0.130

Each carbon source was added to the basal medium containing 0.5% meat extract, 1% peptone, 0.5% NaCl and 0.1% yeast extract (pH 7.0). The cells were inoculated to a shaking flask (500 ml) containing 90 ml of medium and cultivated at 30°C, for 30 hours on a reciprocal shaker.

Table 4. Effect of nitrogen sources on enzyme formation.

Nitrogen sources	Conc. (%)	Final pH	Growth (OD at 660nm)	Total activity (units)	Specific activity (units/mg)
Peptone	1	7.5	2.04	0.67	0.083
Meat extract	1	7.3	3.09	4.03	0.22
Yeast extract	1	7.0	6.12	10.57	0.31
Peptone + Meat extract	1	7.5	5.26	5.45	0.24
Peptone + Yeast extract	1	8.0	9.14	11.69	0.27
Peptone + Meat extract + Yeast extract	1	8.2	8.09	10.28	0.23
Peptone + Meat extract + Yeast extract	1	8.4	9.70	11.89	0.19
Urea	1	9.0	0.30	0	0

Table 4. 계속

Nitrogen sources	Conc. (%)	Final pH	Growth (OD at 660nm)	Total activity (units)	Specific activity (units/mg)
Ammonium chloride	0.8	6.8	0.56	0.99	1.05
Ammonium sulfate	0.8	6.8	0.63	0.50	0.49
Sodium nitrate	0.8	7.2	0.64	0.35	0.43
None		6.8	0.45	0	0

Each nitrogen source was added to the basal medium containing 1% glycerin and 0.5% NaCl (pH 7.0).

Table 5. Effect of concentration of glycerin on enzyme formation

Concentration (%)	Final pH	Growth (OD at 660nm)	Total activity (units)	Specific activity (units/mg)
0	8.5	7.26	9.50	0.22
0.5	8.3	9.85	18.09	0.35
1.0	8.2	9.70	18.37	0.33
2.0	8.1	9.41	14.72	0.31
3.0	8.1	8.91	13.36	0.32

Besides glycerin, all media contained 1% peptone, 0.5% yeast extract and 0.5% NaCl (pH 7.0).

Table 6. Effect of initial pH on enzyme formation

Initial pH	Final pH	Growth (OD at 660nm)	Total activity (units)	Specific activity (units/mg)
6.5	8.0	8.79	10.63	0.21
7.0	8.0	9.31	13.80	0.25
7.5	8.1	9.98	13.92	0.26
8.0	8.2	10.06	7.90	0.13
8.5	8.2	10.48	2.16	0.04

Cultural medium contained 1% glycerin, 1% peptone, 0.5% yeast extract and 0.5% NaCl.

때 0.5%와 1.0%에서 좋은 결과를 나타내었다 (Table 5). 효소 생산을 위한 본배양 배지의 초발 pH를 검토한 결과, 배지의 초발 pH를 높여줌에 따라 균의 생육은 증가하였으나, 효소의 생산은 pH 7.5 부근이 비교적 좋은 것으로 나타났다 (Table 6).

이상의 실험 결과를 토대로 하여 0.5% glycerin, 1% peptone, 0.5% yeast extract, 0.5% NaCl

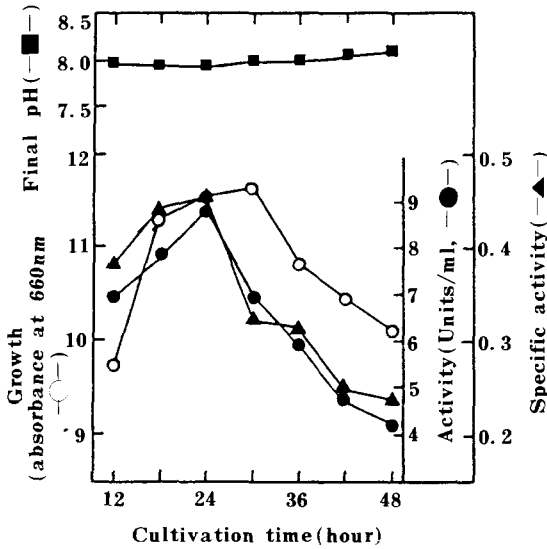


Fig. 2. Cultivation time and enzyme formation.

Enzyme activity was determined under standard assay conditions by addition of cytosine.

(pH 7.5)를 *Xanthomonas campestris* IAM 1671의 효소 생성 최적 배지로 선정하였다.

배양시간 경과에 따른 균의 증식 및 효소의 생성 관계를 검토한 결과는 Fig. 2와 같다. 효소 생성 최적 배지 90ml가 들어 있는 500ml 용 진탕 flask에 증배양액 3ml를 접종하여 30°C에서 진탕 배양한 결과 균의 증식은 배양 30시간에서 최대치를 나타내었고, 효소의 생산은 균증식의 극대 정지기 초기인 24시간에서 가장 높게 나타났다.

요 약

여러가지 속의 세균을 대상으로 5-fluorocytosine deaminase의 생산균과 기질 특이성을 검토한 결과, 5-fluorocytosine deaminase의 생산성은 중, 속에 관계없이 다양하게 나타났으며 기질로서는 cytosine, 5-fluorocytosine, 5-methylcytosine이 모두 이용될

수 있는 것으로 나타났다.

효소 생산균 중에서 비교적 활성이 높다고 인정되는 *Xanthomonas campestris* IAM 1671의 효소 생산을 위한 배지의 조성은 glycerin 0.5%, peptone 1%, yeast extract 0.5%, NaCl 0.5% (pH 7.0)로 설정하였다. 본 균의 효소 생산은 500ml용 진탕 flask에 효소생성 최적배지 90ml를 넣어 30°C에서 24시간 배양했을 때 최대로 나타났다.

사 사

본 연구는 1985년도 부산대학교 학술연구 조성에 의해서 수행된 연구논문임.

참고문헌

- Hahn, A. and Schäfer, L.E: *Biol. (München)*, **83**, 551 (1925)
- Hayashi, O. and Kornberg, A.: *J. Biol. Chem.*, **197**, 717 (1952)
- Ipata, P.L., F. Marmocchi, G. Magni, R. Felicioli and Polodoro: *Biochemistry*, **10**, 4270 (1971)
- Sakai, T., T. -S. Yu, H. Tabe and S. Omata.: *Agr. Biol. Chem.*, **39**, 1623 (1975)
- Sakai, T., T. -S. Yu, K. Taniguchi and S. Omata.: *Agr. Biol. Chem.*, **39**, 2015 (1975)
- Nishiyama, T., Y. Kawamura, K. Kawamoto, H. Matsumura, N. Yamamoto, T. Ito, A. Ohyama, T. Katsuragi and T. Sakai.: *Neurol. Med. Chir. (Tokyo)*, **22**, 344 (1982)
- Koehlin, B.A., F. Rubio, S. Palmer, T. Gabriel and R. Duschinsky.: *Biochem. Pharmacol.*, **15**, 435 (1966)
- Diasio, R.B., J.E. Bennet and C.E. Myers.: *Biochem. Pharmacol.*, **27**, 703 (1978)
- Yu, T.-S., T. Sakai and S. Omata.: *Agr. Biol. Chem.*, **40**, 551 (1976)
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall.: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951)