

## 곰팡이의 Cytosine Deaminase에 관한 연구

俞大植 · 金在根\*\* · 坂井拓夫\* · 外材健三\*

啓明대학교 自然科学大学 生物学科

\*\*信一実業專門大学 食品加工科

\*大阪府立大学 農学部 農芸化学科

(1986년 2월 3일 수리)

## Cytosine Deaminase of Fungus

Tae Shick Yu, Jae Kuen Kim\*\*, Takuo Sakai\* and Kenzo Tonomura\*

Department of Biology, College of Natural Science, Keimyung University, Taegu, Korea

\*\*Department of Food Technology, Shinil Junior College, Taegu, Korea

\*Department of Agricultural Chemistry, College of Agriculture, University of Osaka Prefecture, Osaka, Japan

(Received February 3, 1986)

Cytosine deaminase was partially purified about 10 fold from the cell-free extract of *Aspergillus fumigatus*. The partially purified enzyme was relatively stable in a pH 5.5 to 8.0, but thermo-unstable. The enzyme activity was found in a pH optimum of 7.0 and temperature optimum of 30 to 35°C. The activation energy calculated to be 13,240 cal/mol. The apparent Michaelis constants  $K_m$  for cytosine was found to be 1.53 mM and the molecular weight was determined to be approximately 32,000. The enzyme was strongly inhibited by 0.1 mM of  $Hg^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$  and  $Fe^{2+}$ , furthermore inhibited by 1 mM of ATP, UTP,  $\alpha$ -phenanthroline and  $p$ -chloromercuribenzoate.

Cytosine deaminase (cytosine aminohydrolase, EC 3.5.4.1)는 cytosine의 탄소 6 위치의 아미노기를 가수분해하여 uracil과 암모니아를 생성시키는 가수분해 효소이다. 이 효소는 1923년 Hahn과 Lintzel<sup>(1)</sup>에 의하여 효모로부터 처음 확인되었으며 1925년 Hahn과 Schäfer<sup>(2)</sup>에 의하여 *E. coli*로부터도 확인되었다.

Cytosine을 제외한 핵산 염기는 생체내에서 산화로 분해되든지, nucleoside phosphorylase 혹은 U-MP pyrophosphorylase의 촉매에 의하여 nucleotide로 재합성되든지 한다. 그러나 cytosine은 cytosine 으로서는 분해 혹은 nucleotide로 재합성될 수 없는 특이한 핵산 염기 성분이다. Cytosine은 반드시 cytosine deaminase의 촉매에 의하여 uracil을 거쳐 분해되든지, nucleotide로 재합성되든지 한다. 그러므로 cytosine의 대사에는 cytosine deaminase의 촉매가 필수적으로 작용해야 한다. 이러한 대사 경로에 있어서의 cytosine의 운명을 결정지우는 cytosine deaminase는 pyrimidine계 핵산 염기 대사에 중요한

효소이다.

세포내 cytosine deaminase의 효소학적 연구는 빵 효모<sup>(3,4)</sup>, *Serratia marcescens*<sup>(5,6)</sup>, *Pseudomonas aureofaciens*<sup>(7,8)</sup>, *Salmonella typhimurium*<sup>(9)</sup>에서 이루어졌으며 세포의 효소에 관하여는 *Arthrobacter* sp. JH-13<sup>(10,11)</sup>에서 연구되었다. 그러나 효모와 세균보다 생물 진화가 진행된 곰팡이에서는 전혀 연구되어 있지 않다.

최근에 본 효소에 의한 제암 효과가 보고되면서 임상학적 측면에서도 관심의 대상이 되고 있다. 항진균제인 5-fluorocytosine은 항종양 효과가 없으나 5-fluorocytosine을 5-fluorouracil로 전환시키는 *E. coli*의 cytosine deaminase를 5-fluorocytosine과 함께 투여하므로 EA-285 glioma세포의 증식을 저해하며, Fischer계 쥐의 뇌종양내에 뇌종양 괴사소(壞死巢)를 확인하므로 뇌종양 효과를 나타낸다는 사실이 밝혀졌다<sup>(12,13,14)</sup>.

본 연구에서는 현재까지 발견되어 있지 않은 곰팡이의 cytosine deaminase를 검색한 결과, 효소 활

성이 비교적 높은 *Aspergillus fumigatus* 로 부터 분리한 cytosine deaminase의 효소학적 특성을 보고하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 재료 및 시약

DEAE-cellulose (Brown, 0.91 meq/g)는 半井 화학약품주식회사, 京都市로 부터 구입했으며, Sephadex G-100 (fine)은 Pharmacia Fine Chemical, Uppsala로 부터 구입하여 사용했다. 분자량 측정과 단백질 정량에 사용한 myoglobin (from whale skeletal muscle type III, 분자량 (Mr.) : 17, 200),  $\alpha$ -chymotrypsinogen A (Mr. : 25, 000), ovalbumin (from egg, Mr. : 45, 000), bovinealbumin (fraction V, Mr. : 68, 000), glucose oxidase (Mr. : 154, 000)와 blue dextran (Mr. : 3, 000, 000)의 표준단백질을 Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri로 부터 구입·사용했다. Cytosine과 uracil은 Yamasa 장유주식회사, 銚子市の 제품을, 5-fluorocytosine과 5-fluorouracil은 Sigma의 제품을, 핵산 관련물질은 Kohjin Co., Ltd., 東京市로 부터 구입·사용했다. 그 이외의 시약은 특급시약을 사용했다.

### 사용균주 및 배양조건

Cytosine deaminase를 많이 생산하는 *Aspergillus fumigatus* IFO 5840의 증식용 배지는 2% 포도당, 1% 효모 추출물 및 0.1% peptone의 조성의 배지 (pH 5.6)를 사용했다. 균배양은 4l의 상기 배지를 넣은 5l mini jar fermentor에 중균배양액 400 ml를 첨가하여 28°C, 20~22시간 통기배양시켰다. 중균배양은 500 ml 진탕 플라스크에 100 ml의 상기 조성의 배지를 넣어 상기균을 1백금이 접종한 후 28°C, 5 일간 진탕배양 (120 strokes/min) 하므로 충분히 포자를 형성시켜 사용했다.

### 조효소액의 조제

Mini jar fermentor (5 l)에서 배양된 균체를 진공 펌프를 사용하여 여과지로 여과하여 집균한 다음, 생리 식염수로 3회 세척했다. 세척 균체는 1 mM

2-mercaptoethanol을 함유한 0.02 M Tris-HCl 완충액 (pH 6.5)에 현탁시킨 균체 20% (v/v)와 glass bead ( $\phi$  0.3~0.5 mm) 80% (v/v)를 혼합하여 Warning blender에서 4분간 처리하여 균체를 파쇄한 후, 수분간 정치하므로 glass bead를 침전시켜 상등액은 모아 12, 000×g, 20분간 원심분리하여 상등액을 조효소액으로 사용했다.

### 효소 활성 측정

Cytosine deaminase 활성은 산성 조건하에서 cytosine과 uracil의 흡광도의 차이에 의하여 측정했다<sup>(8)</sup>. 효소 반응계는 3  $\mu$ moles의 cytosine, 200  $\mu$ moles Tris-HCl 완충액 (pH 6.5) 및 적당한 량의 조효소액으로 1 ml 용량으로 하여 35°C에서 30분간 반응시켰다. 효소 반응액에 4 ml의 0.1N HCl을 가하여 반응을 정지시키고 효소 반응 전후에서의 290 nm의 흡광도의 감소를 측정하였다. 효소 반응후에 침전물이 생기면 원심분리하여 측정했다. 상기 반응 조건에서 1시간 동안에 1  $\mu$ mole의 cytosine을 탈아미노화하는 효소량을 1 단위로 했다. 비활성은 단백질 mg당 효소량으로 표시했다.

### Paper chromatography

효소 반응액의 50  $\mu$ l를 동양여지 (No. 50)를 사용하여 상승법으로 상온에서 18시간 전개시켰다. 전개제로서는 n-butanol-acetic acid-water (4:1:1, v/v)를 사용했으며 각 반응 생성물의 검출은 자외선등 (short wave)을 이용하여 자외선 흡수물질을 검정했다.

### 활성화 에너지 값 (Ea)

Cytosine deaminase의 활성화 에너지 값 (Ea)은 Arrhenius 방정식 ( $\log k = -\frac{E_a}{2.3R} \frac{1}{T} + \log A$ )<sup>(15)</sup>으로 부터 25°C에서 35°C 사이에서 계산했다.

### 분자량 측정

부분정제 cytosine deaminase의 분자량은 Sephadex G-100 column (1.2×102 cm)을 사용하여 gel 여과에 의한 Andrews의 방법<sup>(16)</sup>에 준하여 측정했다. 사용한 완충액은 0.02 M Tris-HCl 완충액 (pH 6.5)을 사용했으며, 유속은 3 ml/hr로서 2 ml씩 분획했다.

Table 1. Partial purification system of cytosine deaminase from *Aspergillus fumigatus*

Fraction	Total protein (mg)	Total activity (units)	Specific activity (units / mg of protein)	Fold	Yield (%)
Cell-free extract	7, 468	23, 760	3. 18	-	100
Salt out (35-60%)	1, 544	17, 952	11. 62	3. 65	75. 5
DEAE-cellulose	544	8, 248	15. 16	4. 76	34. 7
Sephadex G-100	83	2, 522	30. 38	9. 55	10. 6

**단백질 정량**

효소액 중의 단백질은 ovalbumin을 표준 단백질로 하여 Lowry 등의 방법<sup>(17)</sup>으로 정량했다.

**결과 및 고찰**

**Cytosine deaminase의 부분 정제**

본 효소는 대단히 불안정하므로 모든 정제 공정은 5 °C 이하에서 행하였으며, DEAE-cellulose column chromatography 공정까지는 48시간 이내에 완료하도록 했다.

**공정 I ; 유안 침전 분획**

조효소액에 유안을 첨가하여 35%로 포화시켜 3 시간 정치한 후 12,000×g, 30분간 원심분리하여 침전물은 제거했다. 상등액에 유안을 65%로 포화시켜 5 시간 정치후 위와 같은 방법으로 원심분리하여 침전된 효소 단백질은 1 mM 2-mercaptoethanol을 함유한 0.02 M Tris-HCl 완충액 (pH 6.5)에 용해시켰다. 유안 침전 효소액은 효소액의 20배 량의 상기 완충액으로 3 회 반복하면서 5°C에서 10시간 투석시켰다. 유안 침전 분획의 공정중 pH는 6.5로 유지시켰다.

**공정 II ; DEAE- cellulose column chromatography**

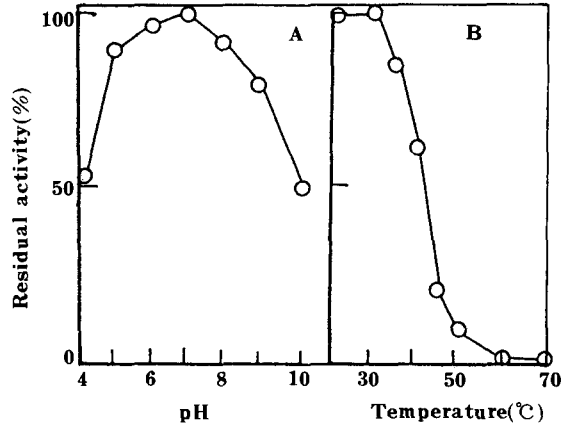
음이온 교환 chromatography는 1 mM 2-mercaptoethanol을 함유한 0.02 M Tris-HCl 완충액 (pH 6.5)으로 평형화시킨 DEAE- cellulose column (2.5×20 cm)으로 행했다. 충분히 투석한 효소액을 DEAE-cellulose column에 충전시켜 상기 완충액으로 비활성 단백질을 씻어낸 후 1 mM 2-mercaptoethanol과 0.3 M NaCl을 함유한 0.05 M Tris-HCl 완충액 (pH 6.5)으로 씻어 활성 단백질 분획을 얻었다. 효소 단백질 분획은 투석막에 넣어 냉풍에 의하여 농축시켜 투석하지 않고 gel여과 시켰다. Elution 조건은

**Table 2. Substrate specificity**

Compound	Deamination
Cytosine	+
5-Methyl cytosine	+
5-Fluoro cytosine	+
Cytidine	-
5'-CMP*	-

\*5'-CMP; cytidine monophosphate.

Each reaction mixture contained 0.1 ml of partially purified enzyme solution, 5 μmoles of the substrate and 200 μmoles of Tris-HCl buffer (pH 6.5) in a final volume of 1 ml and incubated at 35°C for 60 min. The incubated reaction mixture was assayed by paper chromatography.



**Fig. 1. The pH(A) and thermal (B) stability of cytosine deaminase**

(A) Enzyme solution was stored in 0.05M buffers of pH's ranged from 4.0 to 10.0 at 4 °C for 24 hours. The residual activities were assayed under the standard conditions. Buffers used were citric acid-phosphate buffer (pH 4.0 to 5.0), potassium phosphate buffer (pH 6.0 to 8.0) and Tris-HCl buffer (pH 7.0 to 10.0).

(B) Enzyme solution in 0.02M Tris-HCl buffer (pH 7.0) was incubated at the indicated temperatures ranged from 30 to 70°C for 10min. After cooled, the reaction mixtures were added a cytosine and assayed for residual activities.

30 ml/hr의 유속으로 5 ml씩 분획했다.

**공정 III ; Sephadex G-100 column chromatography**

Sephadex G-100을 사용하여 본 효소를 gel 여과 시켰다. Gel여과 조건은 2 ml/hr의 유속으로 2 ml씩 분획했다. 공정 II로 처리된 농축 효소액을 1mM 2-mercaptoethanol을 함유한 0.02 M Tris-HCl 완충액 (pH. 6.5)으로 평형화시킨 Sephadex G-100 column (2×80 cm)에 충전시켜 상기 완충액으로 elution 시켰다. 이상의 정제 공정에 의하여 수율 10.6%로서 약 10배 정제되어 비활성 30.38인 부분정제 cytosine deaminase를 얻을 수 있었다 (Table 1).

**기질 특이성**

본 효소의 기질 특이성을 측정하고자 cytosine, 5-methylcytosine, 5-fluorocytosine과 cytidine등에 대한 효소 반응 전후의 각 반응액을 paper chromatography에 의하여 전개시키고 자외선등으로 반응 생성물을 검정했다. Table 2에 명시된 바와 같이 본 효소는 cytosine 뿐 만 아니라 5-methylcytosine과 5-fluorocytosine을 기질로 탈아미노화 시켰다.

뺑효모<sup>(3,4)</sup>와 *Pseudomonas aureofaciens*<sup>(7)</sup>의 효소는 cytosine과 5-methylcytosine을 기질로 사용하며 *Serratia marcescens*<sup>(8)</sup>와 *Salmonella typhi*

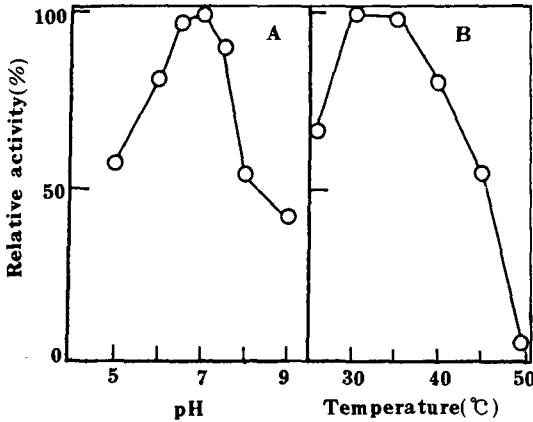


Fig. 2. Effect of pH (A) and temperature (B) on cytosine deaminase activity

The enzyme activity was assayed under the standard conditions except that pH (A) was varied using a reaction mixture containing 0.05 M buffer of pH's from 5.0 to 9.0 and reaction temperature (B) was varied from 25 to 50 °C. (A) Buffers used were potassium phosphate buffer (pH 5.0 to 7.5) and Tris-HCl buffer (pH 7.0 to 9.0).

*murium*<sup>(9)</sup>의 효소는 5-methylcytosine을 기질로 이용할 수 없다. 본 효소는 진핵생물의 효사이므로 빵효모의 효소와 같이 cytosine 뿐만 아니라 5-methylcytosine도 기질로 하며, *Salmonella typhimurium*<sup>(9)</sup>의 효소와 *Arthrobacter* sp. JH-13<sup>(11)</sup>의 세포의 효소의 기질 특이성과 같이 5-fluorocytosine도 기질로 이용할 수 있었다. 이러한 기질 특이성은 이미 보고된 어느 균주보다 폭 넓은 기질을 갖고 있는 효소이다.

**pH 및 열 안정성**

효소액의 pH를 4에서 10까지 다르게 조절하여 4 °C에서 24시간 저장한 후 잔존 효소 활성을 측정한 결과, Fig. 1A와 같이 pH 5.5에서 8.0사이에 안정한 효소이다. 열 안정성은 대단히 낮아서 45 °C에서 10분간 열 처리하므로 85% 효소 활성이 실패되었다 (Fig. 1B).

**반응 최적 pH 및 온도**

본 효소의 활성은 pH 6.5에서 pH 7.5사이에 효소 활성이 높았으며 pH 7.0에서 가장 높았다 (Fig. 2 A).

반응 최적 온도는 30 °C에서 35 °C였다 (Fig. 2 B). 세균의 cytosine deaminase의 반응 최적 온도는 45 °C<sup>(6)</sup> 혹은 40~45 °C<sup>(8)</sup> 이나 본 효소의 반응 최적 온도는 Fig. 2 B에 나타난 바와 같이 세균의 온도보다 낮은 30~35 °C였다.

*Aspergillus fumigatus*의 cytosine deaminase의 활성화에너지 값 (Ea)은 Arrhenius<sup>(12)</sup>의 plot에 의

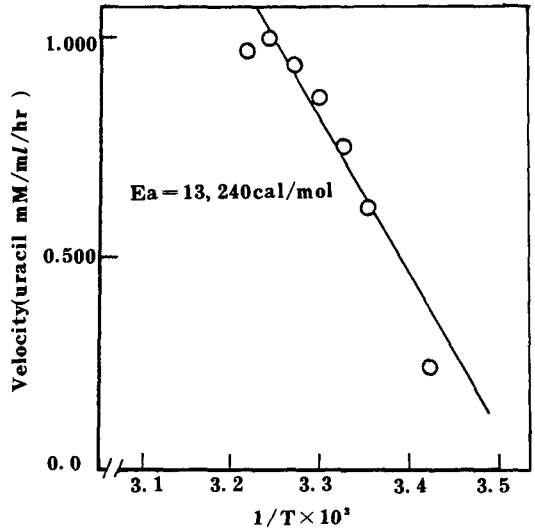


Fig. 3. Arrhenius plot of the effect of temperature on cytosine deaminase

The data include initial velocity determinations at temperatures between 25 to 35 °C, plotted against reciprocal temperatures. Velocity was expressed in mM of uracil formed per 1.0 ml of the enzyme solution for 60 min.

하여 25 °C에서 35 °C에서의 측정된 결과, 13,240 cal/mol이었다 (Fig. 3). 이 값은 Kream의 빵효모의 효소의 값 (19,500 cal/mol)<sup>(3)</sup> 보다 낮으며 Iyata의 빵효모의 효소 활성화에너지 값 (7,740 cal/mol)<sup>(4)</sup> 과 West의 *Salmonella typhimurium*의 값 (4,450 cal/mol)<sup>(9)</sup> 보다 높은 값을 나타냈다.

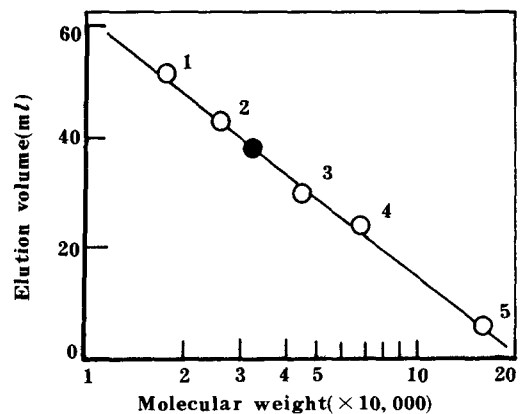


Fig. 4. Molecular weight determination of cytosine deaminase by Sephadex G-100 gel filtration

The standard protein used and their molecular weight were: 1; myoglobin (17,200), 2;  $\alpha$ -chymotrypsinogen A (25,000), 3; ovalbumin (45,000), 4; bovine albumin (68,000), 5; glucose oxidase (154,000). ○; standard protein, ●; cytosine deaminase.

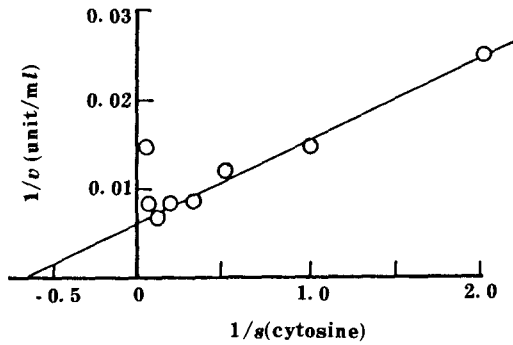


Fig. 5. Effect of cytosine concentration on cytosine deaminase activity

The reaction mixture contained 0.2ml of the enzyme solution and indicated amounts of cytosine in the standard reaction mixture. Velocity ( $v$ ) was expressed in units per ml of enzyme solution at 35 °C for 30 min and substrate concentration ( $s$ ) in mM of cytosine.

**분자량**

본 효소의 분자량을 Sephadex G-100에 의한 겔 여과법인 Andrews의 방법<sup>(16)</sup>에 준하여 측정했다. Fig. 4에 명시된 바와 같이 *Aspergillus fumigatus*의 cytosine deaminase의 분자량은 32,000이었다.

원핵생물인 세균의 cytosine deaminase의 분자량은 230,000<sup>(9)</sup>, 580,000<sup>(15)</sup>, 630,000<sup>(17)</sup>으로서 고분자 단백질로 보고되어 있으나 진핵생물인 빵효모에 있어서는 34,000<sup>(4)</sup>으로 보고되어 있다. 본 효소는 빵

Table 3. Effect of metal ions on cytosine deaminase activity

Metal ion	Relative activity (%)	
	1.0mM	0.1mM
Ca <sup>2+</sup>	98.0	-
Mg <sup>2+</sup>	98.2	-
Fe <sup>2+</sup>	12.4	26.5
Cu <sup>2+</sup>	43.5	-
Zn <sup>2+</sup>	7.9	56.4
Mn <sup>2+</sup>	113.2	-
Hg <sup>2+</sup>	0.0	0.0
Cd <sup>2+</sup>	4.0	25.6
Pb <sup>2+</sup>	0.0	0.0
Na <sup>+</sup>	98.5	-
K <sup>+</sup>	96.0	-
None	100.0	100.0

The enzyme activity was assayed under standard reaction conditions in the presence of metal ions at the indicated concentration and expressed as relative activity to that of control.

효모와 같이 진핵생물인 곰팡이의 효소로서 저분자인 32,000으로 계산되어서 위의 결과와 잘 일치하고 있다.

**기질 농도의 영향**

기질 농도에 의한 효소 활성의 변화를 측정하기 위하여 Fig. 5와 같은 기질 포화곡선을 얻었다. 본 효소의 효소활성은 20mM cytosine인 고농도에 의하여 기질 저해를 받으며 Lineweaver와 Burk의 plot에 의한 Km 값은 1.53mM이었다. 빵효모에 있어서의 Km 값<sup>(4)</sup>은 2.5mM cytosine으로서 본 효소는 이 값보다 친화력이 큰 값이었다. 그러나 *Salmonella typhimurium*<sup>(9)</sup>에 있어서의 값(0.74 mM cytosine)보다는 친화력이 낮았다.

**금속 이온의 영향**

금속 이온이 cytosine deaminase의 효소 활성에 미치는 영향을 검토한 결과를 Table 3에 정리했다. 본 효소는 1mM의 Fe<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Hg<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup>의 중금속 이온에 의해 강한 저해를 받으며, 더우기 Hg<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup>는 0.1mM의 존재로서 효소활성을 완전히 저해되는 것으로 나타났다. 그러나 그 이외의 2가 금속 이온과 1가 금속 이온은 본 효소 활성에 아무런 영향을 미치지 못했다.

**핵산 관련 물질의 영향**

핵산 관련 물질이 본 효소 활성에 미치는 영향을 규명하기 위하여 1mM의 각 물질의 존재하에서 효소 활성을 측정하여 각 물질이 존재하지 않는 조건과 비교 검토했다. Table 4에 명시된 바와 같이 1mM ATP와 UTP는 본 효소 활성을 34%, 25% 저해하며 그 이외의 핵산 관련 물질은 아무런 영향을 미치지 못했다.

Table 4. Nucleic acid related compounds on cytosine deaminase activity

Compound (1 mM)	Relative activity (%)
CTP <sup>(1)</sup>	102.7
UTP <sup>(2)</sup>	75.0
GTP <sup>(3)</sup>	97.2
Guanosine	111.1
ATP <sup>(4)</sup>	66.5
Cytidine	93.3
None	100.0

The reaction conditions were the same as those described in Table 3. Nucleic acid related compounds were added to the final concentration of 1.0 mM.

(1);cytidine triphosphate, (2);uridine triphosphate, (3);guanosine triphosphate, (4);adenosine triphosphate.

**Table 5. Effect of inhibitors on cytosine deaminase activity**

Inhibitor (1 mM)	Relative activity (%)
EDTA <sup>(1)</sup>	52.7
p-CMB <sup>(2)</sup>	35.3
Monoiodo acetate	35.2
o-Phenanthroline	0.0
Trichloro acetate	70.3
Sodium azide	87.9
Sodium cyanide	96.7
None	100.0

The reaction conditions were the same as those described in Table 3. A inhibitors were added to the final concentration of 1.0 mM.

(1); ethylenediamine tetracetic acid,  
 (2); p-chloromercuribenzoate.

**저해제의 영향**

각종 효소 저해제가 본 효소 활성에 미치는 영향을 검토한 결과, Table 5에 명시된 바와 같이 1 mM의 o-phenanthroline이 완전히 효소 활성을 저해시켰다. 본 효소는 1 mM의 p-chloromercuribenzoate와 1 mM monoiodo acetate에 의하여 65% 효소 활성이 저해되었다.

**요 약**

Cytosine deaminase는 세균과 효모에서는 연구되었으나 비교적 진화가 진행된 생물인 곰팡이에서는 전혀 연구되어 있지 않았다. 곰팡이 중 특히, 효소 활성이 높은 *Aspergillus fumigatus*로부터 cytosine deaminase를 추출하여 부분 정제한 효소의 특성을 규명하였다.

곰팡이의 cytosine deaminase는 pH 5.5~8.0에서 비교적 안정하나, 열 안정성은 아주 낮은 효소였으며 pH 7.0과 30~35°C에서 반응 최적 조건을 나타내며 활성화 에너지 값(Ea)는 13,240 cal/mol이었다. 본 효소는 cytosine 뿐만 아니라 5-methylcytosine과 5-fluorocytosine을 기질로 이용하며 cytosine에 대한 Km 값은 1.53mM이며, 분자량은 32,000 이었

다. Cytosine deaminase의 효소 활성은 Hg<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>에 의하여 저해되며 1 mM ATP와 UTP에 의해서도 저해되었다. 더우기 본 효소는 o-phenanthroline, p-chloromercuribenzoate에 의하여 저해되기도 했다.

**참고문헌**

- Hahn, A. and W. Lintzel: *Z. Biol.* **79**, 179 (1923).
- Hahn, A. and L. Schäfer: *Z. Biol.* **83**, 511 (1925).
- Kream, J. and E. Chargaff: *J. Amer. Chem. Soc.* **74**, 5157 (1952).
- Ipata, P.L., F. Marmocchi, G. Magni, R. Felicioli and G. Polidoro: *Biochemistry*, **10**, 4170 (1971).
- Sakai, T., T.S. Yu, H. Tabe and S. Omata: *Agr. Biol. Chem.* **39**, 1623 (1975).
- Yu, T.S., T. Sakai and S. Omata: *Agr. Biol. Chem.* **40**, 543 (1976).
- Sakai, T., T.S. Yu, K. Taniguchi and S. Omata: *Agr. Biol. Chem.* **39**, 2015 (1975).
- Yu, T.S., T. Sakai and S. Omata: *Agr. Biol. Chem.* **40**, 551 (1976).
- West, T., M.S. Shanley and G.A. O'Donovan: *Biochim. Biophys. Acta*, **719**, 251 (1982).
- 전홍기, 박정혜 : 미생물학회지, **22**, 257 (1984).
- 이인, 박정혜, 전홍기 : 미생물학회지, **23**, 117 (1985).
- Nishiyama, T., Y. Kawamura, K. Kawamoto, H. Matsumura, N. Yamamoto, T. Ito, A. Ohyama, T. Katsuragi and T. Sakai: *Neurol. Med. Chir.* **22**, 344 (1982).
- Idem. Current Chemotherapy and Immunotherapy, Proc. 12th Internat'l. Congr. of Chemotherapy, Florence, 1269 (1981).
- Idem. *Cancer Res.* **45**, 1753 (1985).
- Segel, I.H.: *Biochemical Calculations*, 2nd edition, Wiley, p. 278 (1976).
- Andrews, P.: *Biochem. J.* **96**, 595 (1965).
- Lowry, O.H., N.J. Roserough, A.L. Farr and R.J. Randall: *Biochem. J.* **193**, 265 (1951).