

방선균 J-144K가 생산하는 Adenosine Deaminase Inhibitor에 관한 연구

전홍기[†] · 김삼웅 · 조영배 · 이 인*

부산대학교 자연과학대학 미생물학과
*인제대학교 기초과학연구소

Studies on the Adenosine Deaminase Inhibitor Producing Actinomycetes J-144K

Hong-Ki Jun[†], Sam-Woong Kim, Young-Bae Jo and Yeehn Yeeh*

Department of Microbiology, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea
*Institute of Basic Sciences, Inje University, Obang-dong 18-3, Kimhae, 621-749, Korea

Abstract

In the screening of actinomycetes' culture filtrate for inhibitor of adenosine deaminase, a novel inhibitor was found in a cultured broth of strain J-144K. The optimum conditions for the adenosine deaminase inhibitor production from the isolated strain J-144K were evaluated. This strain showed the maximum yield of adenosine deaminase inhibitor when grown at pH 7.0 and 30°C for 60 hours in the medium of 1.0% dextrose, 0.5% yeast extract, 0.5% peptone and 0.1% KH₂PO₄ under the aerobic condition. Through the activated charcoal extraction, methanol fractionation, Dowex 50 H⁺ X-8 ion exchange column chromatography, Dowex Cl⁻ X-8 ion exchange column chromatography, and Sephadex G-15 gel filtration procedures, this inhibitor was purified with three materials.

Key words : adenosine deaminase inhibitor, purification, isolated strain J-144K

서 론

Salvage pathway에 관여하는 여러 효소들 중에서, adenosine deaminase(adenosine aminohydrolase, EC 3.5.4.4)는 hypoxanthine을 IMP로 전환시키는데 있어서 중요한 기능을 수행하는 효소로서, adenosine과 2'-deoxyadenosine을 inosine과 2'-deoxyinosine으로 각각 탈아미노시키는 과정을 촉매한다. Adenosine deaminase는 동물과 미생물

에 널리 분포하고 있으며, 특히 포유동물의 면역계의 기능에 요구되는 필수적인 효소로서, 효소의 활성이 유전적으로 결여된 사람은 임파구 감소증과 심각한 면역결핍증(SCID ; severe combined immunodeficiency disease)을 초래한다¹⁾는 사실이 밝혀짐에 따라 인체의 adenosine deaminase에 대해 많이 연구되었다²⁻⁴⁾. 또한 adenosine deaminase의 작용기작을 밝히기 위해 adenosine deaminase의 저해제를 이용한 연구가 활발히 진행중에 있다⁵⁻⁷⁾.

[†] Corresponding author

효소저해제는 효소의 작용기작 연구, 미생물에 의해 야기 되는 동식물의 질병에 대한 생화학적 기작 연구, 새로운 효소저해제의 분리 및 저해양식 등의 연구에 이용되고 있으며⁶⁾, 기질특이성 및 촉매기작을 이해하는데 매우 중요한 역할을 한다⁹⁾. 이러한 효소저해제에 관한 연구를 통해 질병에 대한 새로운 치료법의 개발과 생물학적 기능 및 병리학적 현상을 생화학적인 측면에서 이해할 수 있다⁸⁾.

지금까지 발표된 미생물 기원의 adenosine deaminase의 저해제는 *Streptomyces kaniharaensis* SF-557이 생산하는 coformycin¹⁰⁻¹²⁾, *Aspergillus nidulans* Y-176-2가 생산하는 cordycepsin과 2'-deoxycoformycin^{6,7)} 등이 있으며, *Streptomyces* sp. J-568S가 생산하는 저해제의 성질이 보고되어 있다¹³⁾. Adenosine deaminase에 대해 저해작용을 나타내는 물질로 8-azaguanine¹⁴⁾, urea¹⁵⁾, guanidine¹⁶⁾ 및 adenine nucleoside 유래의 alcohol류¹⁷⁾ 등 여러 종류가 알려져 있으며, 이러한 저해물질을 이용하여 adenosine deaminase의 작용 및 조절기작을 밝히고자 많은 연구가 수행되고 있다.

본 연구는 adenosine관련제의 탈아미노 효소와 그의 조절기구를 구명하기 위한 연구의 일환으로, adenosine deaminase의 새로운 저해제를 검색하기 위해 먼저 분리균의 배양액을 사용하여 동물기원의 효소와 미생물기원의 효소를 함께 저해하는 균을 선택한 다음 기존 저해물질과 기본적인 성질이 다른 저해제 생산균을 선택함으로써 새로운 저해제를 얻을 수 있다는 가정하에서 시작하였다. 따라서 본 연구에서는 토양에서 분리한 방선균을 대상으로 adenosine deaminase의 활성을 저해하는 저해제를 생산하는 균주를 검색하였으며, 저해제의 생산조건을 검토하고 일련의 과정을 통해 본 분리균이 생산하는 adenosine deaminase 저해제를 정제하였다.

재료 및 방법

Adenosine deaminase 저해제 생산균주의 분리

Adenosine deaminase 저해제를 생산하는 균주를 분리하기 위해 부산 근교의 각 지역에서 채집한 토양시료 약 1g을 멸균수 10ml에 현탁시켜 약 20분간 방치한 후 그 상등액을 희석평판법으로 방선균 분리용 평판배지(Table 1, A)에 도말, 30°C 항온기에서 7일간 배양하여 생성된 방선균 colony를 순수분리하였다. 순수분리된 colony를 보존용 사면

배지(Table 1, B)에 이식하여 30°C에서 7일간 배양한 다음, adenosine deaminase 저해제 생성유무 실험에 사용하였다. Adenosine deaminase 저해제 생성 유무확인 실험은 10ml의 adenosine deaminase 저해제 생성용 배지(Table 1, C)에 분리균주를 1백금이 접종하고, 30°C에서 2일간 진탕배양(Vision Co. LTD, 220rpm)하여 그 배양상등액을 대상으로 adenosine deaminase 저해활성을 측정하였으며, 이 중에서 adenosine deaminase 저해활성이 우수한 J-144K 균주를 선택하여 본 실험의 공시균주로 사용하였다.

Table 1. Compositions of media for cultivation

A. Medium for isolation of Actinomycetes	
Soluble starch	1.0 %
K ₂ HPO ₄	0.05 %
NH ₄ Cl	0.05 %
Agar	1.8 %
pH 7.0	
B. Stock culture medium	
Dextrose	1.0 %
Yeast extract	0.1 %
Meat extract	0.1 %
Pepton	0.2 %
Agar	1.8 %
pH 7.5	
C. Adenosine deaminase inhibitor production medium	
Dextrose	1.0 %
Yeast extract	0.2 %
Meat extract	0.2 %
Peptone	0.2 %
KH ₂ PO ₄	0.05 %
MgCl ₂ · 6H ₂ O	0.01 %
pH 7.3	
D. Adenosine deaminase production medium	
Dextrose	0.5 %
Peotone	0.5 %
Yeast extract	1.0 %
NH ₄ Cl	0.5 %
pH 7.0	

효소액의 조제와 활성측정법

본 실험에 사용한 동물기원 adenosine deaminase(Sigma ; St. Louis, 63178, U.S.A)는 소의 장점막으로부터 분리한 type VII의 동결건조 효소였으며 동결건조된 효소에 potassium phosphate buffer(pH 7.0)를 3ml을 첨가한 다음 여기에서 50 μ l를 취하여 이것을 적당량 희석하여 효소 반응에 이용하였다. 그리고 미생물 기원의 효소는 *Nocardioidea* sp. J-326TK를 adenosine deaminase 생성용 배지 (Table 1, D)에 배양해서 그 상등액을 조효소액으로 사용하였다. 효소의 활성은 Kalckar의 방법¹⁸⁾에 의해서 측정하였다. 5 μ mole의 adenosine, 50 μ mole potassium phosphate buffer(pH 7.0)와 적당량의 효소액을 넣은 반응혼합물(최종용량 1.0ml)을 37 $^{\circ}$ C water bath에서 30분간 반응시킨 후, 100 $^{\circ}$ C에서 4분간 반응을 중지시킨 다음, 100배 희석하여 265nm에서 흡광도 차로써 측정하였다.

효소활성의 1 unit는 상기 조건에서 1시간에 1 μ mole의 inosine을 생성하는 효소의 양으로 나타내었다.

Adenosine deaminase inhibitor의 저해활성 측정

저해제의 저해활성은 adenosine deaminase의 탈아미노 작용을 저해하는 저해물로부터 구하였다. 즉 효소의 표준활성치와 저해제를 첨가하였을 때의 효소 활성치의 차로부터 저해율을 계산하였다. 효소의 활성측정에는 약 17-26 units/ml 효소량을 사용하였으며, 저해제의 농도는 adenosine deaminase 활성의 저해율이 70% 이하가 되게 조절하였다.

저해율 50%를 나타내는 검액 1ml의 저해활성을 1 unit로 정하였다. 저해율과 저해활성은 다음 식에 따라서 구하였다.

$$\text{저해율} = \left[\frac{(\text{효소의 활성} - \text{검액의 활성})}{\text{효소의 활성}} \right] \times 100(\%)$$

$$\text{저해활성} = \text{저해율} / 50 \times \text{희석배수}(\text{units/ml})$$

균의 생육도에 따른 저해제 생산

순수분리된 adenosine deaminase 저해제 생산균을 100 ml의 저해제 생성용 배지가 들어 있는 500ml 진탕 플라스크에 접종하여 30 $^{\circ}$ C에서 진탕배양하면서 일정한 시간별로 생육도와 저해제 생산성을 검토하였다. 이때 사용한 방법은 배양액을 3,000rpm에서 20분간 원심분리하여 상등액은 버리고 남은 균체를 증류수와 0.85% NaCl로 세척한

후 이 균체를 105 $^{\circ}$ C에서 12시간 동안 건조하여 균체량을 측정하였다.

Adenosine deaminase 저해제의 생산조건

공시균의 adenosine deaminase 저해제 생산을 위한 최적 조건을 설정하기 위해 탄소원, 질소원, 무기염, 초발 pH, 배양온도 및 통기량 등의 영향을 30 $^{\circ}$ C에서 60시간 배양한 후 그때의 adenosine deaminase 저해활성을 측정하여, 서로 비교 검토하였다. 집중 균체량은 adenosine deaminase 저해제 생산배지에서 2일간 전배양한 배양액 1% 씩을 100 ml의 배지에 일정하게 접종하였다.

Adenosine deaminase 저해제의 정제

분리균주 J-144K의 배양액을 원심분리(3,000rpm \times 20 mins)하여 균체를 제거한 상등액을 adenosine deaminase 저해제원으로 사용하였다.

활성탄 흡착 및 추출

배양액중의 저해물질은 활성탄 흡착에 의해서 추출하였다. 즉, 배양상등액의 pH를 HCl로서 7.0이 되도록 조정 한 후 활성탄을 배양액에 대해 2w/v%를 첨가하였다. 10 분간 교반시켜 저해물질이 충분히 활성탄에 흡착되도록 한 후에 흡인 여과하였으며 여과후의 활성탄은 배양액에 대해 1/4배 용량의 증류수로 2회 수세하였다. 활성탄에 흡착된 저해제를 추출하기 위해 각종 유기용매를 사용하여 예비실험한 결과 methanol이 저해제의 추출에 가장 적합한 유기 용매로 나타나 배양상등액의 액량에 대해 동량의 95% methanol을 첨가하여 10분간 교반한 후 흡인여과하였다. 여과액을 감압농축하여 methanol을 제거하고 원심분리(3,000rpm, 20분)한 후 0.2 μ m membrane filter로 잔여 활성탄을 제거하였다.

Methanol fractionation

활성탄으로 추출하여 모은 시료에 cold methanol을 95% 되도록 첨가하고 4 $^{\circ}$ C에서 24시간 방치한 후, 원심분리(3,000rpm, 20분)하여 침전물을 제거하고 감압농축하여 다음 실험에 사용하였다.

Dowex 50 H⁺ X-8 column chromatography

3차 증류수로 충분히 평형화시킨 Dowex 50 H⁺ X-8 column(2 \times 45cm)에 유기용매로 추출·농축한 저해제를 흡착시키고 3차 증류수로 용출하였으며 이때 용출유속은 0.54ml/min이었으며 분취량은 fraction당 20ml였다.

Dowex 1 Cl⁻ X-8 column chromatography

3차 증류수로 충분히 평형화시킨 Dowex 1 Cl⁻ X-8 column(2×45cm)에 Dowex 50 H⁺ X-8 column을 거쳐 농축한 활성분획을 흡착시키고 3차 증류수로 세척하였다. 0.5N NH₄OH를 사용하여 용출하였으며 이때 용출유속은 0.54ml/min이었으며 분취량은 fraction당 20ml였다.

Sephadex G-15 gel filtration chromatography

3차증류수로 충분히 평형화시킨 Sephadex G-15 gel filtration column(2×75cm)에 Dowex 1 Cl⁻ X-8 column에서 얻은 활성분획을 loading한 후, 3차증류수를 사용하여 용출하였다. 이때의 유속은 0.46ml/min이었으며의 분취량은 fraction당 3ml였다.

결과 및 고찰

Adenosine deaminase 저해제 생산균주의 선정

토양을 분리원으로 하여 평판배양법에 의해 약 300주의 방선균을 분리하였다. 이들 분리균을 대상으로 adenosine deaminase에 대한 저해활성을 나타내는 8균주를 분리하였으며, 이들 균주중에서 가장 높은 활성을 나타내는 J-144K 균주를 공시균주로 선정하여 본 실험에 사용하였다.

Adenosine deaminase 저해제의 생산조건

분리균주 J-144K에 의한 adenosine deaminase 저해제의 생산 최적조건을 설정하기 위해 adenosine deaminase 저해제 생성용 배지(Table 1. C)를 기본배지로 사용하였다.

탄소원

기본배지의 dextrose대신에 각종 탄소원을 1.0%씩 첨가하여 30℃에서 60시간 진탕배양한 후 원심분리(3,000 rpm×20mins)하여 얻은 상등액으로 저해활성을 측정하여 각종 탄소원의 영향을 조사하였다. Table 2에서와 같이 탄소원으로 arabinose, dextrose, maltose, xylose 등을 사용했을 경우 우수한 저해제 생성을 나타내었으며, 그중 저해제 생성이 가장 높은 dextrose를 탄소원으로 선택하였다. Lactose의 경우 균체의 생육은 양호하였으나 저해제 생성은 매우 저조하였다.

질소원

기본배지에서 0.2% yeast extract, 0.2% meat extract 및 0.2% peptone 대신 여러 가지 다른 유·무기 질소원들을 1%씩 첨가하여 adenosine deaminase 저해제의 생성

Table 2. Effect of carbon sources on the production of adenosine deaminase inhibitor

Carbon source	Growth	Inhibitory activity (units/ml)
Arabinose	++	19,266.0
Cellobiose	+	6,205.5
Dextrose	+	20,500.0
Fructose	+	7,619.2
Inositol	+/-	4,857.0
Inulin	+/-	9,276.0
Lactose	++	5,861.7
Maltose	++	17,348.0
Mannitol	+/-	8,877.0
Raffinose	+/-	8,058.0
Saccharose	+	9,554.0
Sorbose	+	5,468.1
Trehalose	+/-	9,211.0
Xylose	++	18,375.0
Basal only	+/-	1,889.0

+/- : Poor, + : Normal, ++ : Good

Each carbon source was added to the basal medium containing 0.2% Yeast extract, 0.2% Meat extract, 0.2% Peptone, 0.05% KH₂PO₄, and 0.01% MgCl₂ · 6H₂O (pH 7.3). Seed culture(3ml) was inoculated into a 500ml shaking flask containing 100ml of medium and cultivated at 30℃, for 60 hours on a reciprocal shaker.

에 미치는 질소원의 영향을 검토하였다. Table 3에 나타난 것과 같이 사용한 모든 유기질소원과 무기질소원 가운데 sodium nitrate가 균의 성장과 저해활성이 비교적 양호한 결과를 나타내었다. 유기질소원들을 2가지 이상 조합하여 첨가한 경우 0.5% peptone과 0.5% yeast extract를 동시에 첨가했을 때 가장 양호한 저해활성을 나타내어 이를 질소원으로 선택하였다.

무기염류

저해제 생성에 미치는 각종 무기염류의 영향을 검토하기 위해 이미 탄소원 및 질소원으로 결정된 1.0% dextrose, 0.5% yeast extract, 0.5% peptone을 포함하는 기본배지에 각종 무기염류를 0.1% 되도록 첨가하여 균체 증식과

Table 3. Effect of nitrogen sources on production of adenosine deaminase inhibitor

Nitrogen source	Concentration (%)	Growth	Inhibitory activity (units/ml)
Ammonium sulfate	1.0	+/-	5,112
Malt extract	1.0	+	14,316
Meat extract	1.0	++	14,901
Peptone	1.0	+	15,876
Potassium nitrate	1.0	+	7,092
Sodium nitrate	1.0	+	10,720
Urea	1.0	+	8,692
Yeast extract	1.0	+	17,037
Meat extract	0.5	++	19,857
+ Peptone	0.5		
Yeast extract	0.5	+	23,524
+ Peptone	0.5		
Meat extract	0.3		
+ Yeast extract	0.3	++	22,026
+ Peptone	0.4		
Basal only		+/-	6,757

+/- : Poor, + : Normal, ++ : Good

Each nitrogen source was added to the basal medium containing 1.0% Dextrose, 0.05% KH_2PO_4 , and 0.01% $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ at pH 7.3. The culture conditions are the same as Table 2.

Table 4. Effect of inorganic salts on production of adenosine deaminase inhibitor

Inorganic salt	Concentration (%)	Growth	Inhibitory activity (units/ml)
CaCl_2	0.1	+	13,004
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.1	+	15,262
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.1	+	12,065
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.1	+	16,501
HgSO_4	0.1	+	14,231
KClO_4	0.1	+	18,924
KH_2PO_4	0.1	++	24,895
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.1	+	15,272
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.1	+	17,326
NaCl	0.1	+	19,203
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.1	+	16,306
KH_2PO_4	0.5	+	23,274
+ $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.5		
KH_2PO_4	0.5	+	22,329
+ $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.5		
Basal only		+	17,069

+ : Normal, ++ : Good.

Each inorganic salt was added to the basal medium containing 1.0% Dextrose, 0.5% Yeast extract, and 0.5% Peptone (pH 7.3). The culture conditions are the same as Table 2.

저해활성을 검토하였다. Table 4에서와 같이 KCl, KH₂PO₄, NaCl 등을 첨가했을 때와 2가지 이상의 무기염류를 조합하여 첨가했을 때 균체 증식과 저해활성이 비교적 양호한 결과를 나타내었다. 이 중에서도 저해활성이 가장 높은 0.1% KH₂PO₄를 무기염으로 선택하였다.

초발 pH

이상의 배지조성을 검토한 결과를 토대로 배지의 초발 pH가 저해제 생성에 미치는 영향을 검토하기 위해 1.0% Dextrose, 0.5% Yeast extract, 0.5% Peptone, 0.1% KH₂PO₄를 기본배지로하여 배지의 초발 pH를 4-10 까지 단계적으로 조절한 다음 30℃에서 60시간 진탕배양하였다. 그 결과 Table 5에 나타난 것과 같이 pH 7.0부근에서 가장 양호한 저해활성을 나타내었다.

Table 5. Effect of initial pH of medium on the production of adenosine deaminase inhibitor

Initial pH	Final pH	Inhibitory activity (units/ml)
4.0	4.5	1,962.4
5.5	7.2	15,524.0
7.0	7.2	22,919.6
8.5	6.9	17,391.2
10.0	9.0	3,546.6

The culture medium is the same as Table 8. The pH of medium was adjusted with 1.0 N HCl and 1.0 N NaOH prior to sterilization. The culture conditions are the same as Table 2.

Table 6. Effect of culture temperature on the production of adenosine deaminase inhibitor

Cultivation temperature(℃)	Inhibitory activity (units/ml)
20	8,204.6
30	25,009.0
40	10,613.7
50	7,208.1

The culture medium is the same as Table 8. Culture temperature was adjusted to each temperature as indicated.

배양온도

Adenosine deaminase 저해제 생산 최적배지에서 배양온

도를 20~50℃ 범위의 온도별로 배양하여 저해활성을 검토한 결과 Table 6에서와 같이 30℃에서 가장 높은 저해활성을 나타내어 이 온도를 adenosine deaminase 저해제 생성을 위한 최적 배양온도로 설정하였다.

통기량

공시균주의 저해제 생산에 미치는 통기량의 영향을 검토하기 위하여 500ml 진탕 플라스크에 배지를 50ml에서 200ml까지 첨가하여 저해활성을 측정하였다. Table 7에서 보는 바와 같이 배지를 100ml 첨가 했을 때 가장 높은 저해활성을 나타내었으며, 50ml를 첨가했을 때도 상당히 높은 저해활성을 나타내어 본 공시균주는 호기적인 조건에서 adenosine deaminase 저해제를 보다 효율적으로 생산하는 것으로 사료되었다.

Table 7. Effect of aeration on the production of adenosine deaminase inhibitor

Volume of medium(ml)	Inhibitory activity (units/ml)
50	23,060
75	22,391
100	24,637
125	20,431
150	21,079
175	18,323
200	13225

The culture medium is the same as Table 8. The volume of medium was adjusted to each volume as indicated.

Table 8. Optimum culture condition for the production of adenosine deaminase inhibitor

Medium	Dextrose	1.0%
	Yeast extract	0.5%
	Peptone	0.5%
	KH ₂ PO ₄	0.1%
	pH	7.0

Culture temperature 30℃
 Culture time 60hours
 Culture type Reciprocal (120Rev. X 6cm stroke)
 100ml of medium per 500ml shaking flask

이상과 같은 결과부터 분리균주 J-144K의 adenosine deaminase 저해제 생산을 위한 최적조건을 Table 8과 같이 설정하였다.

배양시간에 따른 균의 증식 및 저해제 생성

Table 8과 같은 adenosine deaminase 저해제 생성 최적 배지 100ml가 들어 있는 500ml진탕 플라스크에 전배양액을 1% 되도록 접종하여 경시적으로 배양한 후, 그때의 균체량과 저해활성을 검토하였다. Fig. 1에서와 같이 균체의 증식은 배양 36시간 이후에 정지기에 들어 갔으며, 저해제의 생산은 대수증식기 증반부터 서서히 증가하다가 생육정지기인 배양 60시간에서 최대의 생산을 나타내었다. 그 이후부터는 급격히 감소하는 경향을 나타내어 저해제 생산에는 60시간 배양이 최적인 것으로 판단되었다. 이러한 결과는 2차대사산물(secondary metabolite)의 전형적인 생산 pattern으로서 본 저해제 역시 2차대사의 산물로서 생산되는 것으로 사료되었다.

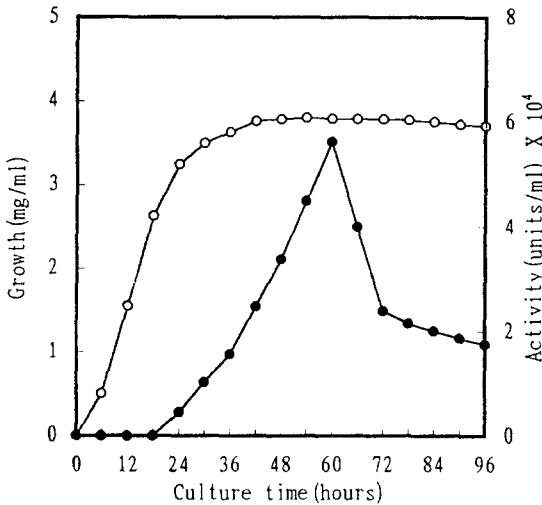


Fig. 1. Effect of cultivation time on the cell growth and production of adenosine deaminase inhibitor. The culture medium is the same as Table 8. The culture conditions are the same as Table 2. -○- : growth, -●- : Inhibitory activity

Adenosine deaminase 저해제의 정제

활성탄 흡착 및 추출

활성탄에 흡착된 저해제를 추출하기 위해 활성탄을 수세

한 후, 2,000ml의 배양상등액에 대해 동량의 95% methanol로 4회 나누어 추출하였다. 추출액을 100ml로 감압농축하여 저해활성을 검토한 결과, 배양상등액은 83,800,000units의 저해활성을 나타내었으며, 활성탄 추출 후 저해활성은 21,646,000units로 나타나 배양상등액에 대한 수율은 25.8%였다.

Methanol fractionation

활성탄 추출 시료에 cold methanol을 95% 되도록 첨가하고 4°C에서 24시간 방치한 후, 원심분리(3,000rpm, 20분)하여 침전물을 제거하고 100ml로 감압농축한 시료의 저해활성은 19,754,000units였으며 배양상등액에 대한 수율은 23.6%였다.

Dowex 50 H⁺ X-8 column chromatography

Methanol추출후 농축한 시료를 Dowex 50 H⁺ X-8 column chromatography한 결과 Fig. 2와 같은 용출pattern을 나타내었다. 분획 36번에서 57번까지의 활성분획을 모아 농축하여 다음 실험에 사용하였다. 이때 활성분획의 저해활성은 1,897,446units였으며 배양상등액에 대한 수율은 2.26%였다.

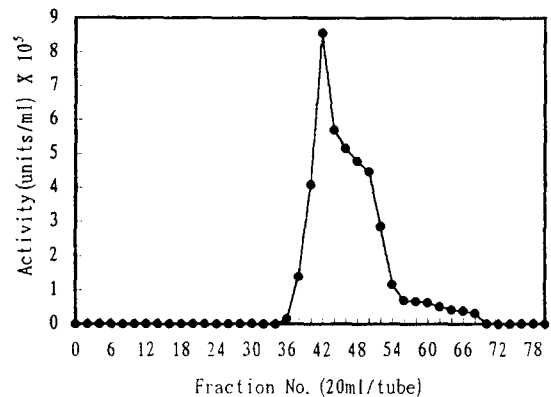


Fig. 2. Elution pattern of adenosine deaminase inhibitor on Dowex 50 H⁺ X-8 column chromatography. Methanol extract of the culture broth of isolated strain J-144K was applied to the Dowex 50 H⁺ X-8 column and eluted with distilled water. Column dimension was 2×45 cm and the flow rate was 0.54ml/min with 20ml fraction.

Dowex 1 Cl⁻ X-8 column chromatography

Dowex 50 H⁺ X-8 column chromatography에서 얻은

농축시료를 Dowex 1 Cl⁻ X-8 column chromatography를 수행한 결과 Fig. 3과 같이 3가지 이상의 물질이 혼재되어진 양상을 나타내었다. 분획 6번부터 22번까지의 활성분획을 ADI-I, 분획 36번부터 66번까지의 활성분획을 ADI-II라 명명하고 이를 농축하여 다음 실험에 사용하였다. 이때 ADI-I과 ADI-II분획의 저해활성은 각각 455,387units/ml와 683,081units/ml였으며 배양상등액에 대한 수율은 각각 0.54%와 0.8%였다.

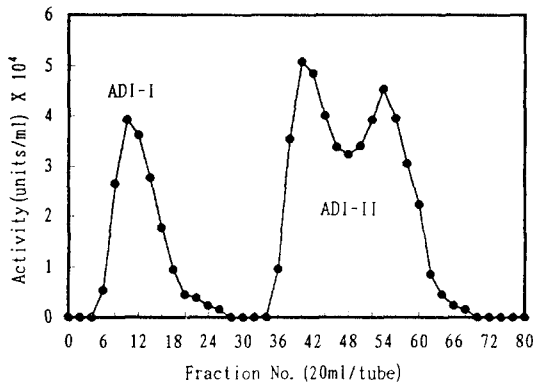


Fig. 3. Elution pattern of adenosine deaminase inhibitor on Dowex 1 Cl⁻ X-8 column chromatography. Column dimension was 2/45 cm and the flow rate of the eluent(0.5N NH₄OH) was 0.54ml/min with 20ml fraction.

Sephadex G-15 gel filtration

Dowex 1 Cl⁻ X-8 column chromatography에서 얻어진 ADI-I의 농축시료를 Sephadex G-15 gel filtration 한 결과 Fig. 4와 같이 단일한 peak를 얻을 수 있었다. 이때 ADI-I의 저해활성은 91,077units였으며 배양상등액에 대한 수율은 0.1%였다. 또한 ADA-II 분획을 gel filtration한 결과 Fig. 5와 같이 2개의 peak를 얻었으며 이를 각각 ADI-II-I, ADI-II-II로 명명하였다. ADI-II-I과 ADI-II-II의 저해활성은 각각 37,949units, 75,898units였으며, 배양상등액에 대한 수율은 각각 0.04%와 0.09%였다.

이상과 같이 분리균주 J-144K가 생산하는 저해제를 활성탄 흡착 및 methanol fractionation, Dowex 50 H⁺ X-8 column chromatography, Dowex 1 Cl⁻ X-8 column chromatography, Sephadex G-15 gel filtration과정을 거쳐

정제된 결과, 3가지 종류의 저해제가 존재함을 알 수 있었다. 현재 본 연구실에서는 정제된 3가지의 저해제에 대해 분자량 측정, 물성 검토 및 구조분석을 위한 준비실험을 수행하고 있으며, 향후 보다 양호한 결과를 얻을 수 있을 것으로 생각된다.

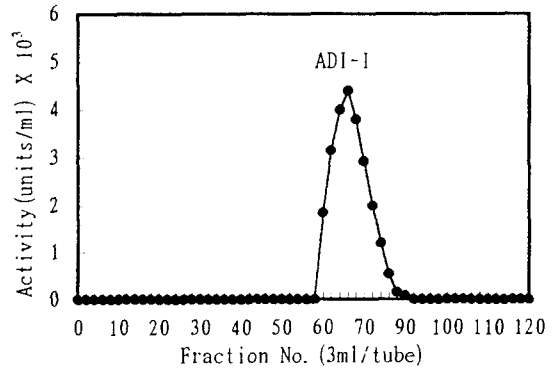


Fig. 4. Elution pattern of adenosine deaminase inhibitor I(ADI-I) on Sephadex G-15 column chromatography.

Column dimension was 2×75 cm and the flow rate of the eluent(distilled water) was 0.46ml/min with 3ml fraction.

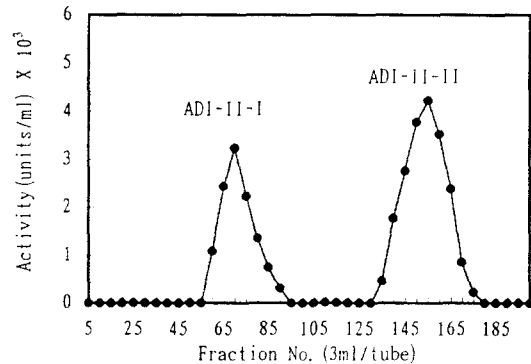


Fig. 5. Elution pattern of adenosine deaminase inhibitor II(ADI-II) on Sephadex G-15 column chromatography.

Column dimension was 2×75 cm and the flow rate of the eluent(distilled water) was 0.46ml/min with 3ml fraction.

요 약

Adenosine deaminase의 새로운 저해제를 검색하기 위해 토양으로부터 adenosine deaminase 저해제를 생산하는 8 균주의 방선균을 분리하였으며, 그중에서 저해활성이 가장 우수한 J-144K균주를 공시균주로 선정하였다. Adenosine deaminase 저해제 생산을 위한 최적배지 조성은 1.0% dextrose, 0.5% yeast extract, 0.5% peptone, 0.1% KH₂PO₄ 이었으며, 최적온도와 pH는 각각 30°C와 7.0이었다. 이러한 조건에서 500ml용 진탕플라스크에 최적배지 100ml를 넣어 배양했을 경우 정지기인 배양 60시간째에 adenosine deaminase 저해활성이 가장 높게 나타났다. 분리균주 J-144K의 배양상등액으로부터 활성탄 흡착 및 유기용매 추출, Dowex 50 H⁺ X-8 column chromatography, Dowex 1 Cl⁻ X-8 column chromatography, Sephadex G-15 gel filtration 등의 과정을 거쳐 adenosine deaminase 저해제를 정제한 결과, 3가지 종류의 저해제가 존재함을 알 수 있었다.

감사의 글

본 논문은 1993년도 한국학술진흥재단의 대학부설연구소 연구과제 연구비 및 1995년도 기초과학연구소 학술연구 조성비(과제번호 : BSRI-95-4410)에 의한 연구결과의 일부로서 지원하여 주심에 감사드립니다.

참 고 문 헌

- Giblett, E. R., Anderson, J. E., Cohen, F., Pollara, B. and Meuwissen, H. J. : Adenosine deaminase deficiency in two patients with severely impaired cellular immunity, *Lancet*, **2**, 1067(1972).
- Philips, A. V., Robbins, D. J., Coleman, M. S. and Barkley, M. D. : Immunoaffinity purification and fluorescence studies of human adenosine deaminase, *Biochemistry*, **26**, 2893(1987).
- Wiginton, D. A., Coleman, M. S. and Hutton, J. J. : Purification and radioimmunoassay of adenosine deaminase from human leukaemic granulocytes, *Biochem. J.*, **195**, 389(1981).
- Van der Weyden, M. B. and Kelley, W. N. : Human adenosine deaminase, Distribution and properties, *J. Biol. Chem.*, **251**, 5448(1976).
- Kurz, L. C. and Frieden, C. : Adenosine Deaminase : Solvent Isotope and pH Effects on the Binding of Transition-State and Ground-State Analogue Inhibitors, *Biochemistry*, **22**, 382(1983).
- Frick, L. F., Smal, E., Baker, D. C. and Wolfenden, R. : Transition-State Stabilization by Adenosine Deaminase : Structural Studies of Its Inhibitory Complex with Deoxycoformycin, *Biochemistry*, **25**, 1616(1986).
- Schramm, V. L. and Baker, D. C. : Spontaneous Epimerization of (S)-Deoxycoformycin, and Interaction of (R)-Deoxy-Coformycin, (S)-Deoxycoformycin, and 8-Keto-deoxycoformycin with Adenosine Deaminase, *Biochemistry*, **24**, 641(1985).
- Umezawa, H. : *Enzyme Inhibitors of Microbial Origin*, pp. 107-110, University of Tokyo Press(1972).
- Wolfenden, R., Wentworth, D. F. and Mitchell, G. N. : Influence of Substituent Ribose on Transition State Affinity in Reactions Catalyzed by Adenosine Deaminase, *Biochemistry*, **16**, 5071(1977).
- Ohno, M., Yagisawa, N., Kondo, S., Maeda, K. and Umezawa, H. : Synthesis of Coformycin, *J. American Chemical Society*, **96**, 4326(1974).
- Sawa, T., Fukagawa, Y., Homma, I., Takeuchi, T. and Umezawa, H. : Mode of Inhibition of Coformycin on Adenosine Deaminase, *J. Antibiotics*, **20**, 227(1967).
- Umezawa, H., Sawa, T., Fukagawa, Y., Homma, I., Ishizuka, M. and Takeuchi, T. : Studies on Formycin and Formycin B in Cells of Ehrlich Carcinoma and E. coli, *J. Antibiotics*, **20**, 308(1967).
- Jun, H. K. : Adenosine deaminase inhibitor of microbial origin, (Part 2) Partially purification of adenosine deaminase inhibitor from *Streptomyces* sp. J-568S, *J. Science*, **35**, 253(1983).
- Feigelson, P. and Davidson, J. D. : The Inhibition of Adenosine Deaminase by 8-Azaguanine in vitro, *J. Biol. Chem.*, **223**, 65(1956).
- Ronca, G. and Ronca-Testoni, S. : Competitive Inhibition of Adenosine Deaminase by Urea and Amidine Derivatives, *Biochim. Biophys. Acta*, **178**, 577(1969).
- Ronca, G. : Competitive Inhibition of Adenosine Deaminase by Urea, Guanidine, Biuret and Guanylurea, *Biochim. Biophys. Acta*, **132**, 214(1967).
- Lerner, L. M. and Ross, R. R. : Inhibition of Adenosine Deaminase by Alcohols Derived from Adenine Nucleosides, *Biochemistry*, **11**(15), 2772(1972).
- Kalckar, H. M. : Differential spectrophotometry of purine compounds by means of specific enzymes, II. Determination of adenine compounds, *J. Biol. Chem.*, **167**, 445(1951).