

Actinomycins에 의한 Adenosine Deaminase의 억제

김경자* · 조성진

순천향대학교 자연과학대학 생명과학과

Inhibition of Adenosine Deaminase by Actinomycins. Kyoung-Ja Kim* and Sung-Jin Cho. Department of Life Science, Soonchunhyang University, Onyang, P.O. BOX 97, Chungnam, 336-600, Korea — Adenosine deaminase inhibitor was extracted from culture broth of *Streptomyces* sp. strain V-8 with ethylacetate. The ethylacetate extract showed the characteristic UV absorption spectrum of actinomycins at 440~450 nm. The ethylacetate extract was compared with respect to inhibitory behavior against adenosine deaminase from calf intestinal mucosa with actinomycin D, -C complex and actinomycin V. The K_i values for actinomycin D, -C complex, and actinomycin V against adenosine deaminase were determined to be 9.9×10^{-6} M, 9.6×10^{-6} M and 9.3×10^{-6} M, respectively. The K_i value for the ethylacetate extract of culture broth against adenosine deaminase was determined to be 5.7×10^{-6} M. The kinetic parameters of actinomycin D, -C complex, -V and ethylacetate extract of culture broth for adenosine deaminase were as follows: $I_{50} = 1.5 \times 10^{-5}$ M (actinomycin D), 2.7×10^{-5} M (actinomycin C complex), 3.5×10^{-5} M (actinomycin V), 8.9×10^{-6} M (ethylacetate extract of culture broth). The adenosine deaminase was inhibited noncompetitively by ethylacetate extract of culture broth as well as by actinomycin D, -C complex and actinomycin V.

항암제(1, 2)나 항바이러스제로 이용되고 있는 adenosine arabinoside(9- β -arabinofuranosyladenine, Ara-A), cordycepin(3-deoxyadenosine)과 tubercidin(7-deazaadenosine)과 같은 adenosine 유도체들(3, 4)이 adenosine deaminase(ADA, EC 3.5.4.4)(5, 6)(Fig. 1)에 의해 deamination 되어 활성이 떨어지게 된다. 이러한 문제점을 해결하기 위하여 adenosine deaminase 억제제(7, 8)를 검색하는 과정에서 선별한 토양균 V-8이 *Bacillus subtilis*와 *Mycobacterium smegmatis*에 큰 항균력을 갖는다는 것을 발견하고 전보에서 특성을 조사하여 *Streptomyces* sp. strain V-8로 보고하였다(9). 이 균주의 배양액을 원심분리한 상등액은 노란색을 띠고 있었으며, *Nocardia interforma*와 *Streptomyces antibioticus*에 의해 생산된 adenosine deaminase 저해제인 coformycin(10, 11)이나 *Streptomyces kanihardens*에 의해 생산된 deoxycoformycin(12-17)과는 달리 UV scanning을 하였을 때 440~450 nm에서 특징적인 흡수띠가 나타났는데(Fig. 2), 이는 phenothiazine chromophore를 가지는 actinomycin 계열 물질의 흡광 곡선과 매우 유사하여 시료의 구조가 actinomycin의 chromophore를 가질 것으로 추정하였다. 그 후 상등액을 ethylacetate로 추출한 다음 silica gel column에서 ethylacetate-hexane gradient로 용출시켜서 항균력과 adenosine deaminase 억제 활성을 가진 fraction을 HPLC(CN-bonded silica gel column, 250 \times 4 mm, Nucleosil C10-CN)로 분리하여 조사한 결과, 기존의 시판되는 actinomycin D, -C

complex와 actinomycin V와는 다른 actinomycin 계열의 화합물임을 보고하였다(18)(Fig. 3). Actinomycin 계열의 화합물이 adenosine deaminase 활성을 저해한다는 사실은 보고된 바가 없으므로, 본 연구에서는 시판되는 actinomycin D, C complex(C1, C2 and C3), V와 *Streptomyces* sp. strain V-8로부터 생산, 분리된 adenosine deaminase 억제제(CSE-1-133-23)의 adenosine deaminase에 대한 kinetics(19-21)를 조사하여 비교 분석하였다.

전보(9)에서 adenosine deaminase 저해제를 생산하는 것으로 보고된 토양균 *Streptomyces* sp. strain V-8을 실험 균주로 이용하였으며, adenosine deaminase 억제 활성은 spectrophotometric adenosine deaminase inhibitor test 방법으로 전체 1 ml의 반응액이 되도록 50 mM phosphate buffer(pH 7.5)에 균주 상등액 20 μ l과 adenosine deaminase 0.018 unit를 첨가한 후에 21 $^{\circ}$ C에서 30분간 preincubation 시켰다. control은 균을 심지 않은 배지의 상등액, 또는 ethanol을 시료 대신 이용하였다. 이어서 0.05 mM의 adenosine을 첨가한 후에 265 nm에서 흡광도 감소를 측정하였다. 이때

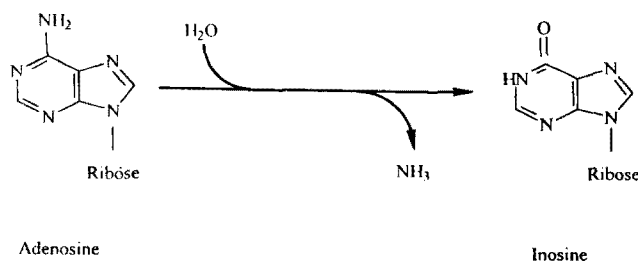


Fig. 1. Deamination of adenosine by adenosine deaminase.

*Corresponding author.

Key words: Adenosine deaminase inhibitor, actinomycins, *Streptomyces* sp.

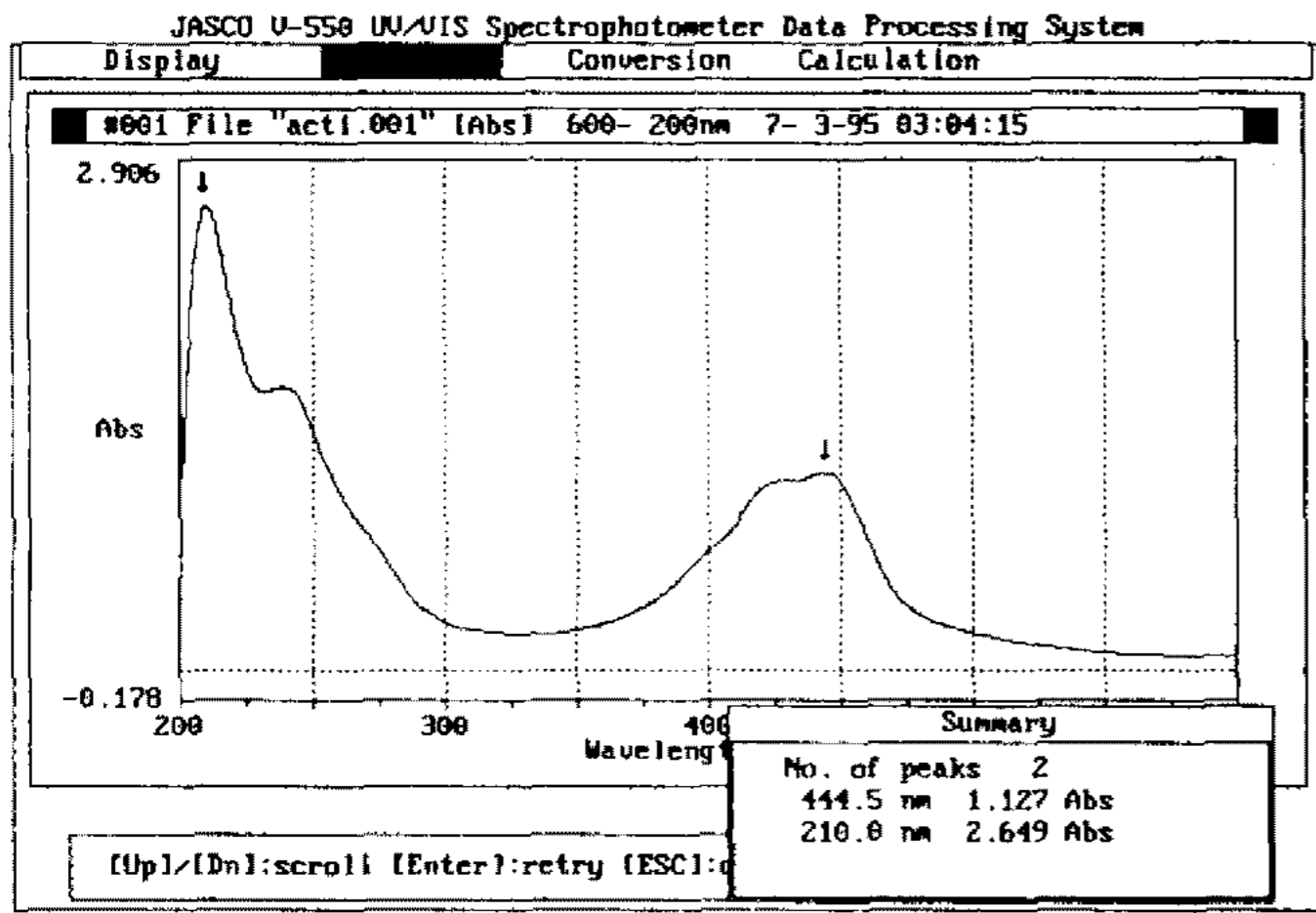


Fig. 2. UV Spectrum of CSE-1-133-23 (1 mg/20 ml ethanol).

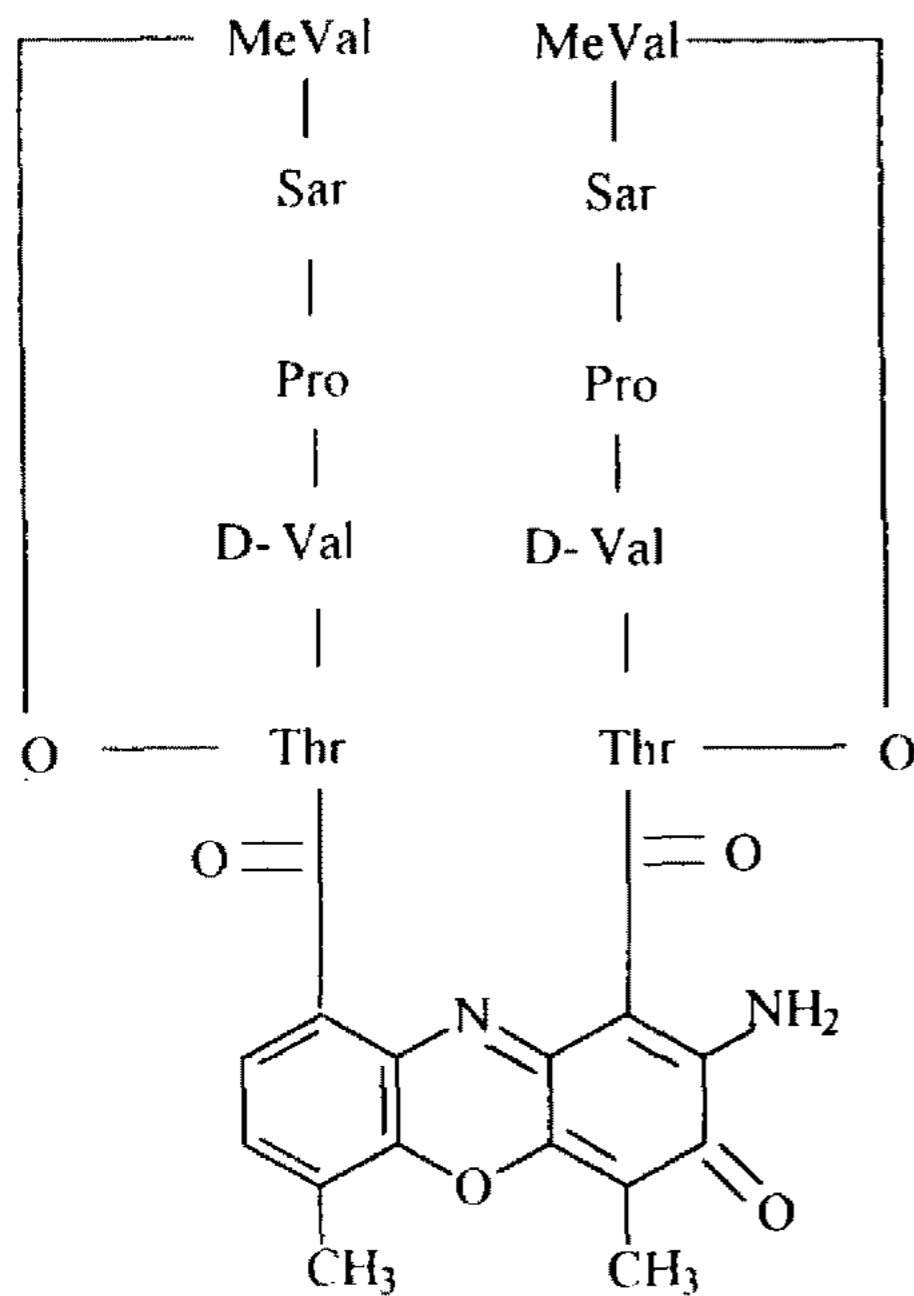


Fig. 3. Structure of actinomycin D.

$$\text{Inhibitory activity} = \frac{\Delta A_{\text{control}} - \Delta A_{\text{sample}}}{\Delta A_{\text{control}}} \times 100(\%)$$

으로 정하였다.

배양 시간에 따른 adenosine deaminase 억제제의 생산을 조사하기 위하여 Glucose 0.1%, soluble starch 2.4%, meat extract 0.5%, bacto-tryptone 0.5%, yeast extract 0.5%, CaCO₃ 0.2%, pH 7.2의 배지에 균주를 배양후 24시간 간격으로 배지 상등액을 취해 동량의 ethylacetate로 추출후 감압증류한 다음 1 mg/ml의 농도로 absolute ethanol에 녹여 adenosine deaminase 억제 정도를 측정된 결과, 7~8일째에 최대 활성이 나타났다(Fig. 4). Adenosine deaminase와 adenosine deaminase 억제제와의 상호 반응(23, 24)을 알아보기

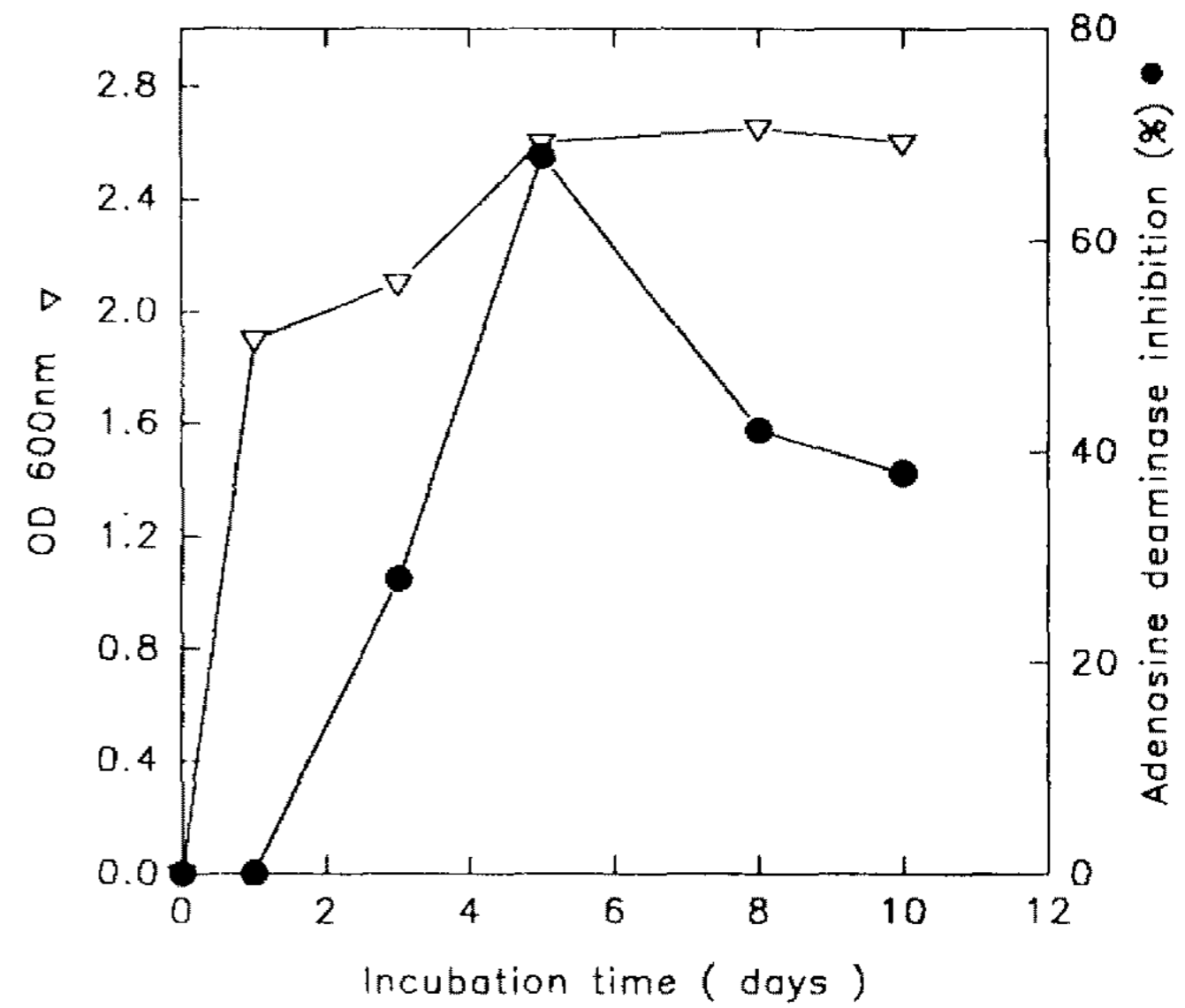


Fig. 4. Relation of growth and adenosine deaminase inhibition activity.

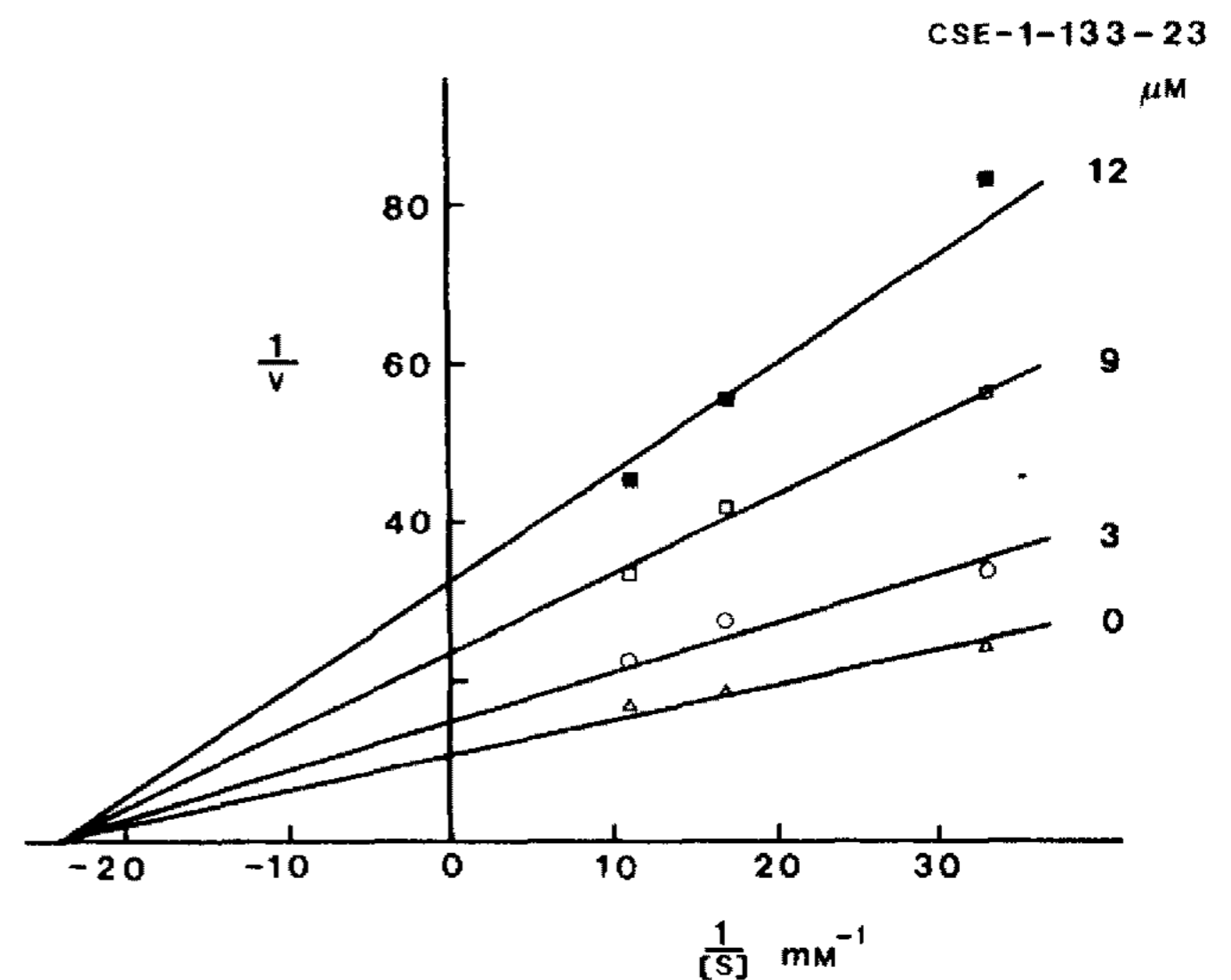


Fig. 5. Double reciprocal plot of adenosine deaminase reaction in the presence of CSE-1-133-23.

위하여 기질과 억제제를 넣은 후에 adenosine deaminase를 넣어 반응을 시작한 것과 adenosine deaminase와 억제제를 일정 시간동안 preincubation 시킨 후에 기질을 넣어 반응을 시작한 것을 서로 효소 활성을 비교해 보았다. Actinomycin D, C-complex, -V 및 *Streptomyces* sp. V-8로 부터 생산된 adenosine deaminase 억제제의 경우는 1,6-dihydro-6-hydroxymethyl purine ribonucleoside(DHMPR)와 마찬가지로 preincubation 시간이나 반응물의 첨가 순서에 관계없이 adenosine deaminase 활성이 동일한 것으로 보아 효소와 억제제와의 steady state 상태가 빠르게 형성됨을 알 수 있다. Erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl)adenine(EHNA)의 경우는 2~3분 후에 steady state 상태가 형성되는 반면에

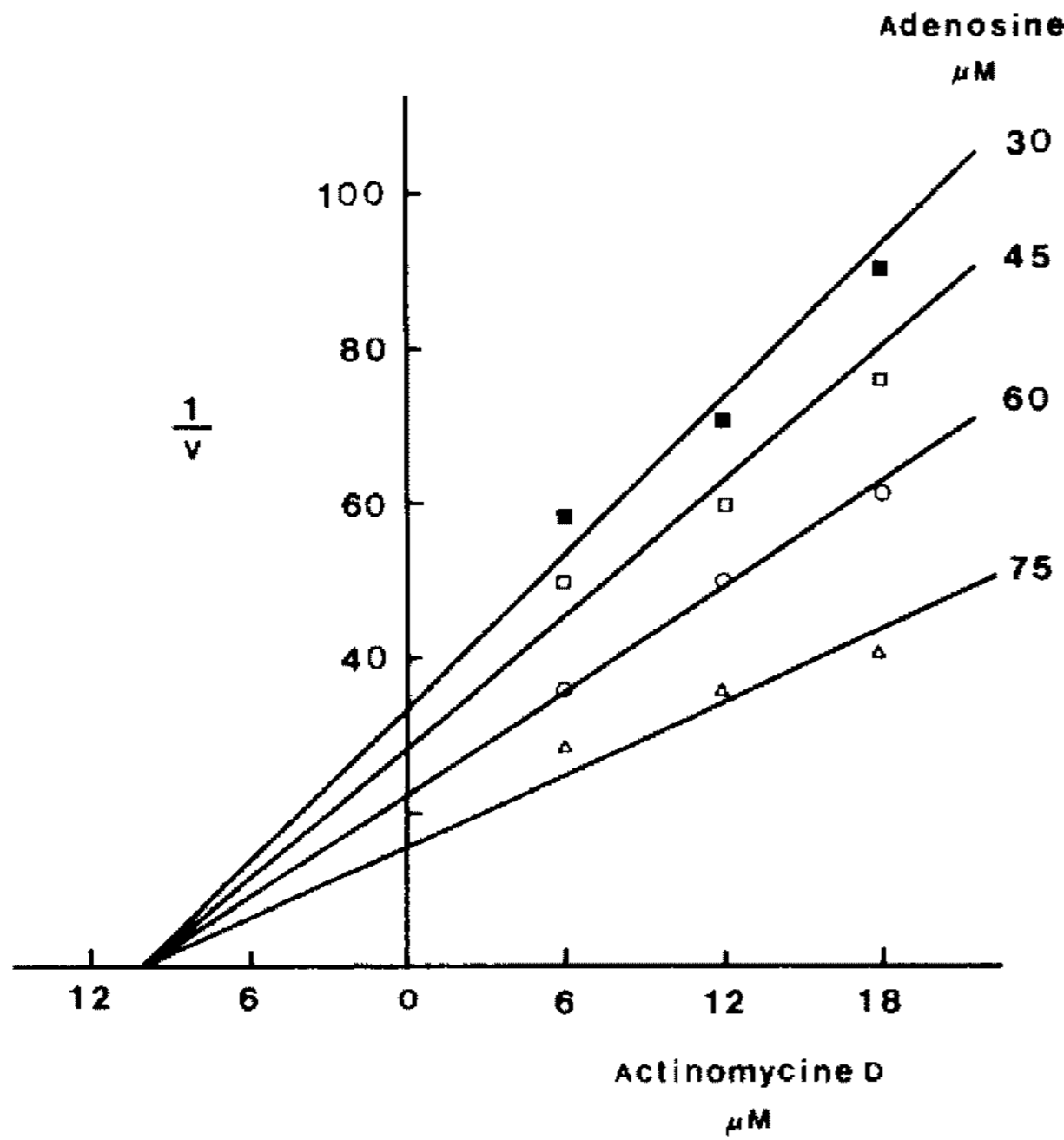


Fig. 6. Determination of K_i value of actinomycin D.

deoxycoformycin의 경우는 여러 시간이 걸리는 것으로 보고되었다(19). Adenosine deaminase에 대한 K_m 치를 구하기 위하여 여러 농도의 adenosine 하에서 반응을 측정후 x축에 adenosine의 몰농도의 역수를, y축에 반응 속도의 역수를 취하여 도식화하여 K_m 치를 구하였다. Adenosine과 deoxyadenosine의 adenosine deaminase from calf intestinal mucosa에 대한 K_m 치를 조사한 결과, 각각 $8.67 \times 10^{-5} M$, $1.43 \times 10^{-4} M$ 로 나타났다 (Fig. 8). Dixon graphic method로 Determination of inhibition constants(21) K_i 값을 구하기 위하여 각 농도의 효소 저해제에서 adenosine deaminase 활성을 측정하여 x축을 저해제 농도, y축을 반응 속도의 역수로 도식화 하였다. 또 다른 방법으로는 $I_{50} = 1/2E_t + K_i$ 식에서 y축을 I_{50} 로 하고 x축을 E_t 로 하면 K_i 값은 y축과 그래프가 만나는 점의 x축 값이 되므로 I_{50} 로부터 K_i 값을 구하였다. Actinomycin C의 K_i 치는 $9.6 \times 10^{-6} M$, actinomycin V와 D의 경우는 각각 $9.3 \times 10^{-6} M$, $9.9 \times 10^{-6} M$ 인 것으로 나타났다(Fig. 6, 7). *Streptomyces* sp. V-8에서 생산된 adenosine deaminase 억제제의 K_i 치는 $5.7 \times 10^{-6} M$ 로 나타났다(Fig. 8). Tight binding inhibitor에 속하는 coformycin(3-β-D-ribofuranosyl-6,7,8-trihydroimidazo [3,4-d][1,3] diazepin-8(R)-ol)은 *Nocardia interforma*와 *Streptomyces kaniharaensis*에 의해 생산되며, K_i 치는 $2.1 \times 10^{-10} M$ 인 것으로 알려져 있으며 (10), (2'-deoxycoformycin((R)-3-(2-deoxy-β-D-erythro-pento-furanosyl)-3,6,7,8-tetrahydroimidazo[4,5-d][1,3-diazepin-8-ol])과 adechlorin은 각각 *Streptomyces antibioticus*와 *Actinomadura* sp. OMR-37에 의해 생산되며 K_i 치는 $7.6 \times 10^{-11} M$ 과 $5.3 \times 10^{-10} M$ 로 보고되었다(12). Coformycin의 diazepine 고리의 8-hydroxy의 tetrahed-

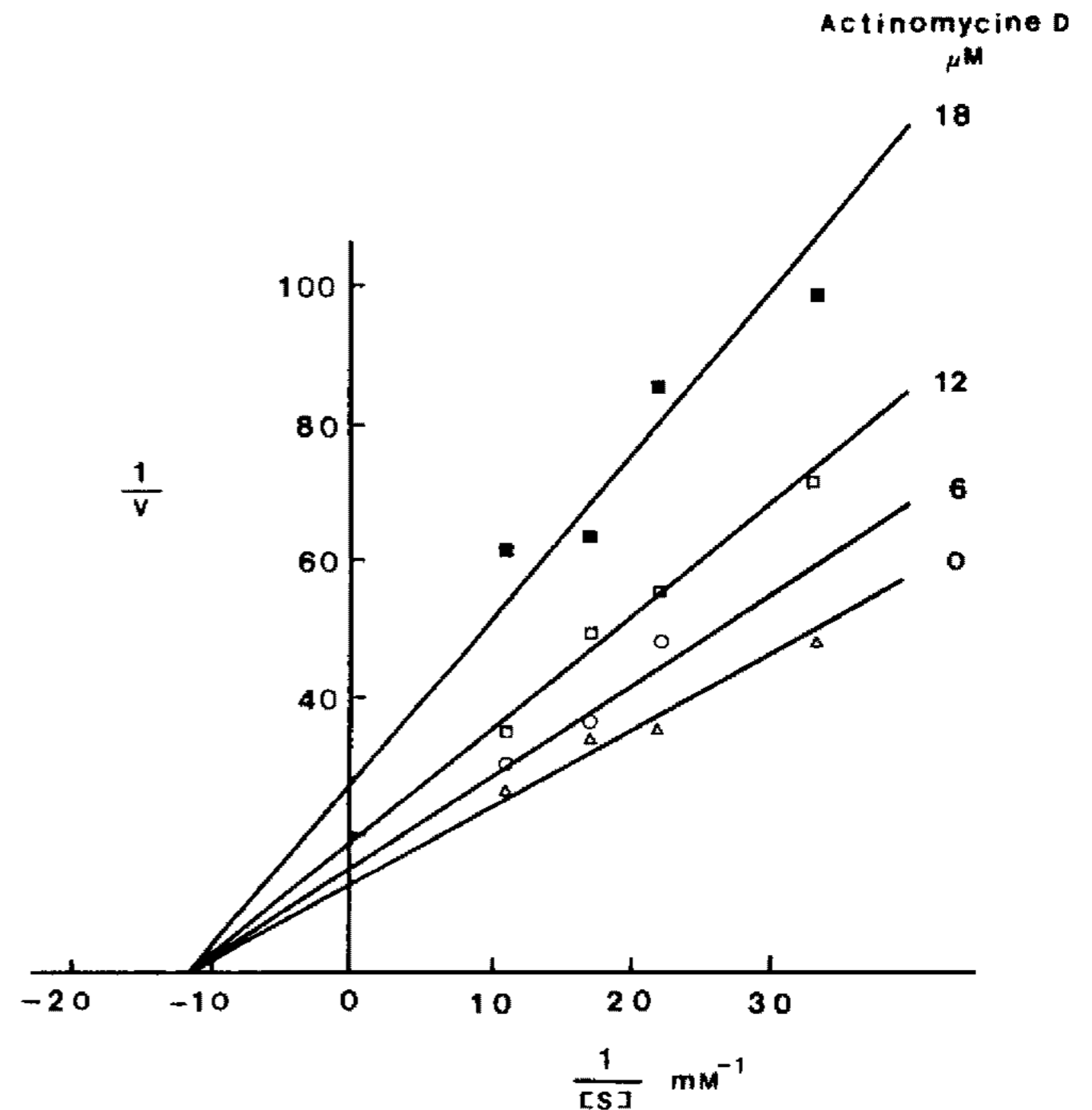


Fig. 7. Double reciprocal plot of adenosine deaminase reaction in the presence of actinomycin D.

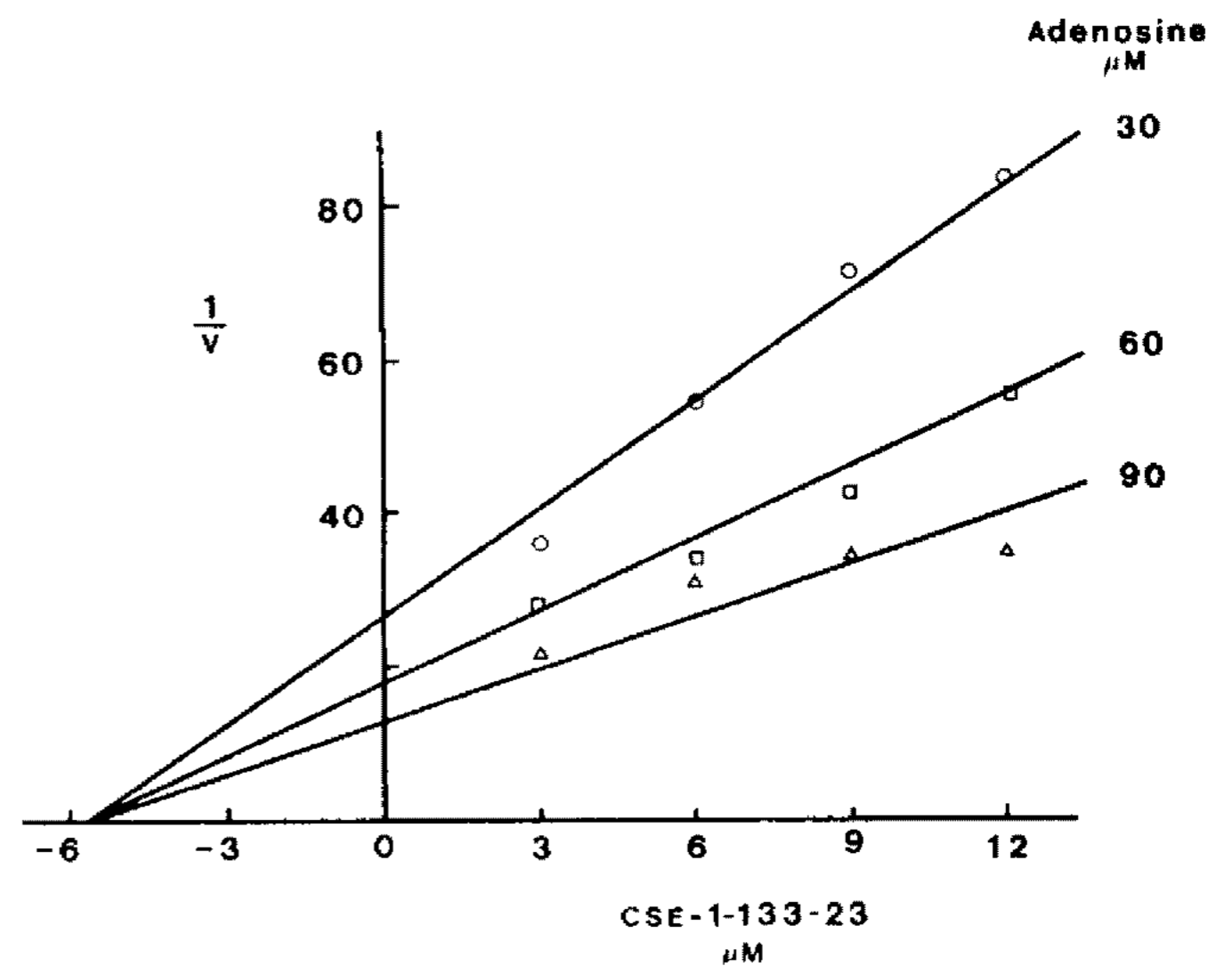


Fig. 8. Determination of K_i value of CSE-1-133-23.

ral configuration은 adenosine의 transition state intermediate 구조와 유사하며, ribose와 deoxyribose moieties가 adenosine deaminase-coformycin 화합물의 안정성에 기여하는 것으로 알려져 있다. I_{50} 는 효소 반응의 50%가 억제되는 inhibitor의 농도이므로 V_i/V_0 가 1/2 즉 V_0/V_i 가 2가 될 때의 inhibitor의 농도로 구하였다. Actinomycin C, actinomycin V와 actinomycin D의 I_{50} 는 각각 $2.7 \times 10^{-5} M$, $3.5 \times 10^{-5} M$ 과 $1.5 \times 10^{-5} M$ 로 나타났다. *Streptomyces* sp. V-8에서 생산된 adenosine deaminase 억제제의 I_{50} 는 $8.9 \times 10^{-6} M$ 인 것으로 나타났다. Type of Inhibition(19)을 조사한 결과, *Streptomy-*

ces sp. V-8에서 생산 분리된 adenosine deaminase 억제제는 actinomycin D, C complex 및 actinomycin V와 같이 calf intestinal mucosa의 adenosine deaminase에 대하여 noncompetitive inhibition을 하는 것으로 나타났다(Fig. 6, 8).

참고문헌

1. Poplack, D.G., S.E. Sallen, G. Rivera, J. Holcenberg, S.B. Murphy, J. Blatt, J.M. Lipton, P. Venner, D.L. Glaubiger, R. Ungerleider and D. Johns. 1981. Phase I Study of 2'-Deoxycoformycin in Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancer Res.* **41**: 3343-3346.
2. Hanvey, J.C., J.K. Hardman, R.J. Suhadolnik and D.C. Baker. 1984. Evidence for the conversion of adenosine to 2'-Deoxycoformycin by *Streptomyces antibioticus*. *Biochemistry* **23**: 904-907.
3. Siaw, M.F.E. and M.S. Coleman. 1984. *In vitro* Metabolism of deoxycoformacin in human T lymphoblastoid cells. *J. Biol. Chem.* **259**(15): 9426-9433.
4. Lofters, W., M. Campell, W.N. Gibbs and B.D. Chesson. 1987. Deoxycoformycin therapy in adult T-Cell leukemia. *Lymphoma. Cancer* **60**: 2605-2608.
5. Omura, S., N. Imamura, H. Kuga, and H. Ishikawa. 1985. Adechlorin, a new adenosine deaminase inhibitor containing Chlorine. Production, Isolation and Properties. *J. Antibiot.* **38**(8): 1008-1015.
6. Conner, J.D., L. Sweetman, S. Carey, M.A. Stuckey and R. Buchanan. 1974. Effect of adenosine deaminase upon the antiviral Activity, *In vitro* of adenosine Arabinoside for vaccinia virus. *Antimicrob. Ag. Chemother* **6**(5): 630-636.
7. Agarwal, R.P. et al. 1977. Tight-Binding Inhibitor-IV. Inhibition of adenosine deaminases by various Inhibitors. *Biochem. Pharm.* **26**: 359-367.
8. Cha, S., R.P. Agarwal and R.E. Parks. 1975. Tight-binding Inhibitors-II, Non-steady State nature of Inhibition of milk Xanthine Oxidase by Allopurinol and Alloxanthine and of Human erythrocytic Adenosine Deaminase by Coformycin. *Biochem. Pharm.* **24**: 2187-2197.
9. 김경자, 박귀례. 1994. 세포외 adenosine deaminase inhibitor를 생산하는 방선균의 분리 및 특성. *약학회지* **38**(3): 274-280.
10. Giblett, E.R. and J.E. Anderson. 1972. Adenosine deaminase deficiency in two patients with severely impaired cellular Immunity. *The Lancet*, Nov. **18**: 1067-1069.
11. Bloth, A. 1978. Antimetabolites in cancer chemotherapy: Past, Present and Future. in FEBS vol. 57. Skoda, J. and Langen, P. (eds) Pergamon press p. 163-313.
12. Twomey, J.J. 1978. A Serum Inhibitor of Immune Regulation in Patients with Systemic lupus Erythematosus. *J. Clin. Invest.* **62**: 713-715.
13. Wobberg, G. 1975. Adenosine Inhibition of lymphocyte-Mediated Cytolysis. *Possible Role of Cyclic Adenosine Monophosphate*. *Science* **187**: 957-959.
14. Plunkett, W. and S.S. Cohen. 1975. Two approaches that increase the activity of analogs of adenosine Nucleosides in animal Cells. *Cancer Res.* **35**: 1547-1554.
15. Smyth, J.F. and K.R. Harrap. 1975. Adenosine Deaminase activity in leukemia. *Br. J. Cancer* **31**: 544.
16. Ballet, J.J., Insel, R., Merler, E. and F.S. Rosen. 1976. Inhibition of maturation of human precursor lymphocytes by coformycin, An inhibitor of the Enzyme Adenosine Deaminase. *J. exp. med.* **143**: 1271.
17. Cha, S. 1976. Tight-binding Inhibitors-III. A new Approach for the determination of competition between Tight-binding inhibitors and substrates-Inhibition of Adenosine deaminase by coformycin. *Biochem. Pharmacol.* **25**: 2695-2702.
18. S.-E. Cho, Y.M. Goo and K.J. Kim. Identification of Actinomycins by high performance liquid chromatography and Fast Atom Bombardment Mass Spectrometry. *Arch. Pharm. Res.*
19. Lepage, G.A., L.S. Worth, and A.P. Kimball. 1976. Enhancement of the antitumor activity of arabinofuranosyladenine by 2'-deoxycoformycin. *Cancer Research* **36**: 1481-1485.
20. Dearden, C., E. Matutes, and D. Catovsky. 1991. Deoxycoformycin in the treatment of mature T-cell leukaemias. *Br. J. Cancer* **64**: 903-906.
21. Dixon, M. 1953. The determination of enzyme inhibitor constants. *Biochem. J.* **55**: 170-171.
22. Williams, B.B. and A.M. Lerner. 1975. Antiviral activity of an adenosine deaminase inhibitor: Decreased replication of Herpes simplex virus. *J. Infect. Diseases* **131**: 673-677.
23. Glazer, R.I. and M.C. Knode. 1984. Neoplanocin a, A cyclopentenyl analog of Adenosine with Specificity for inhibiting RNA methylation. *J. Biol. Chem.* **259** (21): 12964-12969.

(Received 10 December 1995)