

## Flavobacterium meningosepticum이 생산하는 Nucleoside Oxidase의 효소학적 특성

최양문\* · 조홍연<sup>1</sup> · 양한철<sup>2</sup>

고려대학교 생물공학연구소, <sup>1</sup>고려대학교 생명공학원 및 연세대학교 생물산업소재연구센터,  
<sup>2</sup>고려대학교 생명공학원

**Characterization of Nucleoside Oxidase from *Flavobacterium meningosepticum*. Yang-Mun Choi\*, Hong-Yon Cho<sup>1</sup> and Han-Chul Yang<sup>2</sup>.** Institute of Biotechnology, Korea University, Seoul 135-075, Korea, <sup>1</sup>Graduate School of Biotechnology, Korea University and Bioproducts Research Center of Yonsei University, Seoul 120-749, Korea, <sup>2</sup>Graduate School of Biotechnology, Korea University, Seoul 135-075, Korea - The molecular weight of the purified nucleoside oxidase estimated by gel filtration column chromatography was 480,000 and the enzyme protein was composed of four nonidentical subunits (81,000, 69,000, 32,000 and 16,000). On the basis of the visible absorption spectra and the enzymatic determination of the purified enzyme, the enzyme was supposed as a hemoprotein and also a flavoprotein containing 3 moles of FAD per 1 mole of enzyme. The isoelectric point of the enzyme was pH 5.1. Addition of metal salts such as 1 mM SnCl<sub>2</sub> and PbCl<sub>2</sub> into an enzyme reaction solution inhibited the enzyme activity by 94 and 90%, respectively. The enzyme activity was also lost significantly by hemoenzyme inhibitors such as NaCN and NaN<sub>3</sub> and flavoenzyme inhibitor, acriflavine and quinacrine. The maximal nucleoside oxidase activity was observed at pH 7.0 and 55°C. The nucleoside oxidase was relatively stable in the range of pH 5.5~9.0 and below 55°C.

Nucleoside oxidase는 nucleoside를 이에 상응하는 nucleoside 5'-carboxylic acid로 산화시키는 효소로 *Flavobacterium meningosepticum*(1)과 *Pseudomonas maltophilia*(2-7)로부터 생산된다는 보고가 있었다. 이들 미생물이 생산하는 두 효소는 nucleoside를 산화시 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 생성유무에 차이가 있으나 nucleoside만을 특이적으로 산화시키는 점에 있어서는 동일하다.

본 효소의 용도개발 중의 하나는 기질 특이성을 이용하여 nucleoside를 기질로 하는 반응계 또는 nucleoside를 생성하는 반응계의 성분을 측정하는 효소로서의 사용이다. 즉 nucleoside phosphorylase(8-11), adenosine kinase(12) 및 5'-nucleotidase(13, 14)의 활성을 nucleoside oxidase와 공역반응계에서 생성된 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 수소공여체인 4-aminoantipyrine-phenol, peroxidase system에서 간단히 측정할 수 있다. 또한 의학용 유용물질의 생물유기합성으로 5'위치에 CH<sub>2</sub>OH기를 갖는 nucleoside계의 항종양제, 항바이러스제 및 항생제의 유도체를 효소학적으로 용이하게 합성할 수 있을 것으로 기대된다.

저자들은 이미 *Flavobacterium meningosepticum*이 생산하는 nucleoside oxidase의 정제와 stoichiometry에 관하여 보고(1)한 바 있고 본 연구에서는 이 효소의 일부 효소학적 특성을 보고하고자 한다.

### 재료 및 방법

#### Nucleoside oxidase

본 연구에 사용된 Nucleoside oxidase는 전보(1)에서 보고한 바 있는 *Flavobacterium meningosepticum*의 세포내 효소를 전기영동적으로 균일하게 정제하여 사용하였으며, 정제된 효소의 비활성도는 93.4 units/mg이었다.

#### 효소활성 측정 및 단백질 정량

전보(1)의 방법에 따라 기질로부터 생성된 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>량을 정량하여 효소활성을 측정하였다. 1.0 μmol adenosine, 1.5 μmol 4-aminoantipyrine, 2.0 μmol phenol, 4.5 units peroxidase, 40 mM Tris-HCl 완충용액(pH 7.0)으로 구성된 1 ml의 효소반응계에 효소용액 50 μl를 첨가하고 37°C에서 5분간 반응시킨 후 0.5% SDS 용액을 2.0 ml 첨가하여 반응을 정지시킨 다음 500 nm에서 생성된 quinoneimine 색소의 양을 정량하였다. 효소활성 단위는 표준효소 반응계에서 1분간 1 μmol의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 생성하는 효소량을 1 unit로 하였으며 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>량은 quinoneimine 색소의 분자흡광계수(ε=1.32×10<sup>4</sup> l·mol<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>)로부터 환산하였다.

단백질은 Bradford(15)법에 의한 Bio-Rad protein assay kit를 사용하였으며 표준단백질로서는 bovine serum albumin을 사용하였다.

\*Corresponding author.

Key words: *Flavobacterium meningosepticum*, nucleoside oxidase

### Nucleoside oxidase의 분자량과 등전점의 결정

정제된 nucleoside oxidase의 분자량은 Sephacryl S-300 permeation chromatography를 사용하여 측정하였으며, 표준단백질은 thyroglobulin(669,000), ferritin(440,000) 및 catalase(232,000)를 분자량 marker로 사용하였다. Subunits의 분자량 측정과 구조적인 특성을 조사하기 위하여 수행한 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis는 Laemmli법(16)에 준하여 행하였으며, 표준단백질로는 phosphorylase b(94,000), albumin(67,000), ovalbumin(43,000), carbonic anhydrase(30,000), trypsin inhibitor(20,100), 및  $\alpha$ -lactalbumin(14,400)을 사용하였다. 정제효소단백질의 pI는 Winter와 Karlsson법(17)에 준하여 2.0% ampholine(LKB, pH rage 3.5~10)이 포함된 sucrose density gradient(0~50%)를 사용하여 다음과 같이 측정하였다. Nucleoside oxidase(10 units)을 sucrose gradient가 약 1/2 정도 형성되었을 때 column(120 ml)에 첨가하고 4°C, 4 mA에서 48시간 전기영동한 후 2.2 ml씩 분획하고 각 분획의 pH 및 nucleoside oxidase의 활성을 측정하였다.

### Nucleoside oxidase의 absorption spectra

산화형은 0.08 mg/ml nucleoside oxidase 효소액(1 ml)을 spectrophotometer로 300~600 nm에서 scanning하고 환원형은 10 mM adenosine 용액 30  $\mu$ l을 첨가하여 산화형과 같은 방법으로 흡광도를 측정하였다.

### Flavin adenine dinucleotide(FAD)의 정량

Nucleoside oxidase에 결합된 FAD를 정량하기 위해

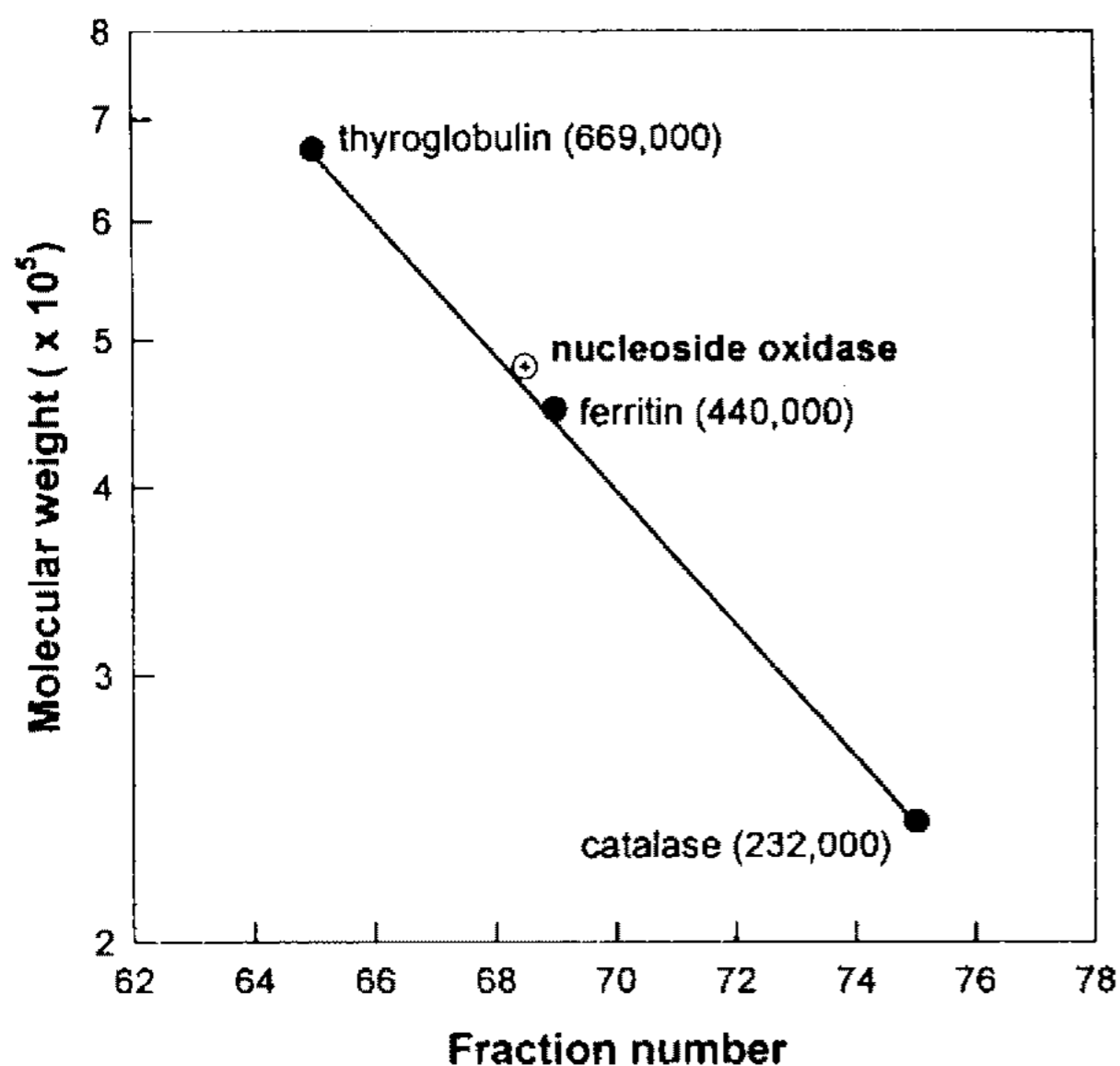


Fig. 1. Molecular weight determination of nucleoside oxidase by Sephacryl S-300 gel permeation chromatography. The enzyme was eluted with 10 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0) containing 0.2 M NaCl. The flow rate and fraction volume were 12 ml/h and 6 ml, respectively.

효소의 단백질 부분을 가수분해하여 FAD를 단백질로부터 유리시킨 후 phosphodiesterase로 처리하면 adenosine monophosphate(AMP)가 생성되며, AMP는 다시 adenosine triphosphate(ATP) 존재하에 myokinase에 의해 adenosine diphosphate(ADP)를 생성하며 이 ADP는 phosphoenolpyruvate(PEP) 존재하에서 pyruvate kinase에 의해 pyruvate를 생성한다. 이렇게 생성된 pyruvate는 NADH 존재하에서 lactate dehydrogenase에 의해 lactate가 생성되기 때문에 수반되는 NADH의 감소를 340 nm에서 흡광도 저하로 측정하여 일련의 효소반응으로부터 FAD를 정량하였다(18).

- 1) Nucleoside oxidase  $\xrightarrow{\text{pronase}}$  Peptide + FAD
- 2) FAD  $\xrightarrow{\text{phosphodiesterase}}$  AMP + FMN
- 3) AMP + ATP  $\xrightarrow{\text{myokinase}}$  2ADP
- 4) PEP + ADP  $\xrightarrow{\text{pyruvate kinase}}$  Pyruvate + ATP

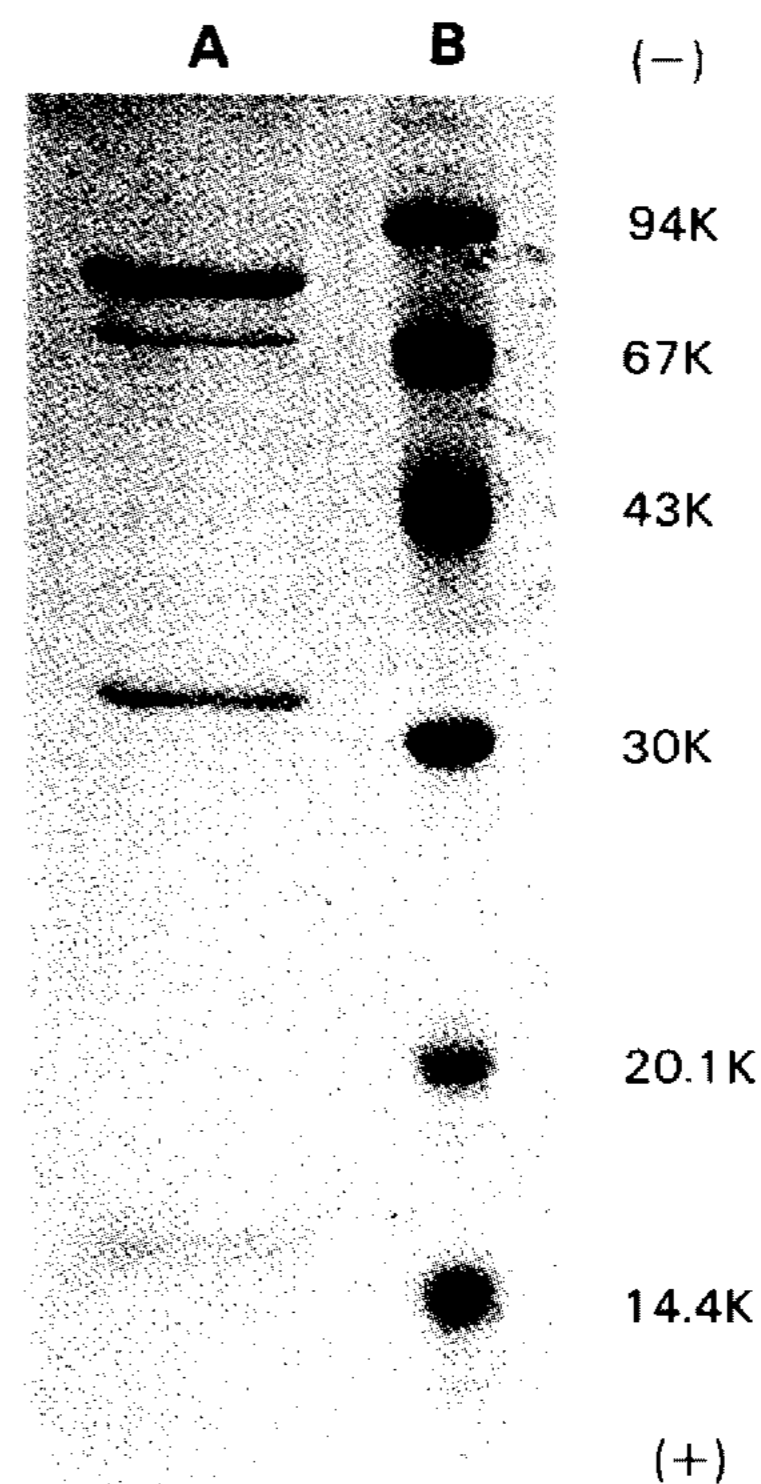
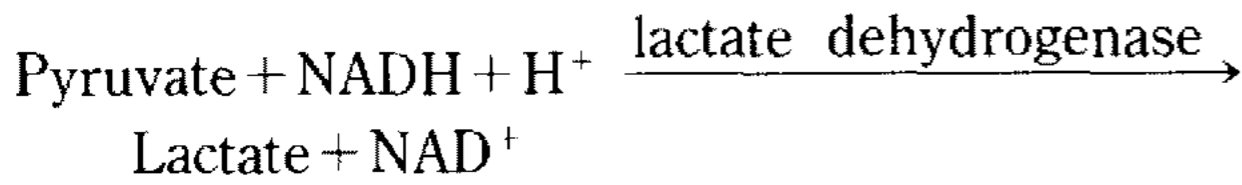


Fig. 2. Molecular weight determination of nucleoside oxidase subunits by SDS polyacrylamide gel electrophoresis. The purified enzyme solution containing 15  $\mu$ g protein was electrophoresed on a 14% SDS-polyacrylamide gel. A: Nucleoside oxidase of *Flavobacterium meningosepticum* B: The standard proteins used and their M.W were phosphorylase b (94K), albumin (67K), ovalbumin (43K), carbonic anhydrase (30K), trypsin inhibitor (20.1K) and lactalbumin (14.4K)



결과 및 고찰

효소의 분자량과 subunits의 구조 및 등전점

Nucleoside oxidase의 분자량을 Sephacryl S-300으로 측정된 결과 효소의 native 분자량은 480,000으로 추정되었으며(Fig. 1), subunits의 구성을 알아보기 위하여 SDS-PAGE를 행한 결과 Fig. 2에 나타낸 바와 같이 81,000, 69,000, 32,000과 16,000인 크기가 각기 다른 4 종류의 subunits로 확인되었다. 이상의 결과로부터 69,000, 32,000과 16,000의 subunit가 각각 한 개씩 존재한다고 가정 시 최소한 본 효소는 8개 이상의 subunit로 구성되었을 것으로 추정된다. *Pseudomonas maltophilia* 기원의 nucleoside oxidase은 분자량이 130,000, subunits가 76,000, 33,000, 18,000 및 14,000의 4개였다는 보고(5)와 비교해 볼 때 본 효소는 분자량이 훨씬 크고 subunits 구조가 복잡함을 알 수 있었다.

Nucleoside oxidase의 등전점은 pH 5.1로 염기성 아미노산보다 산성아미노산의 구성비가 높음을 나타내었다.

Absorption spectra

정제 nucleoside oxidase은 8.0 mg/ml 농도에서 진한 rose-red의 colour protein이었다. 0.08 mg/ml 효소액은 visible absorption spectra의 solet band를 420 nm에서,

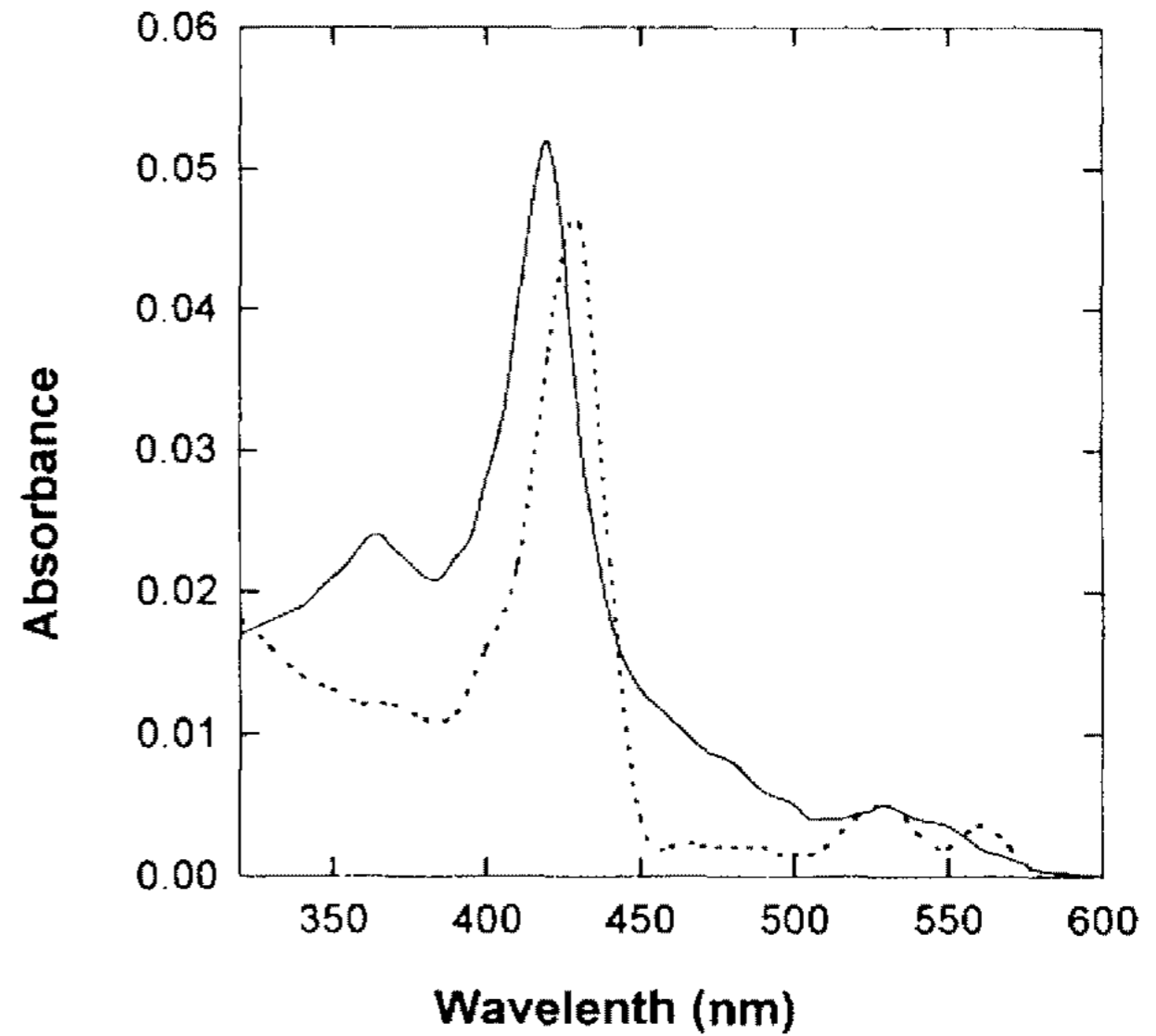


Fig. 3. Absorption spectra of the purified nucleoside oxidase. Solid line: oxidized form, Broken line: reduced form

Table 1. Substrate specificity of nucleoside oxidase

Substrate	Relative activity (%)	Structure
1) Adenosine	100	(1) <chem>Nc1ncnc2c1ncn2[C@@H]3O[C@H](CO)[C@@H](O)[C@H]3O</chem>
2) Inosine	91	(2) <chem>Oc1ncnc2c1ncn2</chem>
3) Guanosine	94	(3) <chem>Oc1nc2c(ncn2C)[C@@H]3O[C@H](CO)[C@@H](O)[C@H]3O</chem>
4) Thymidine	98	(4) <chem>Cc1c[nH]c(=O)[nH]1</chem>
5) Uridine	88	(5) <chem>O=c1cc[nH]1</chem>
6) Cytidine	50	(6) <chem>Nc1cc[nH]1</chem>
7) Kinetin riboside	89	(7) <chem>Cc1c[nH]c(=O)[nH]1</chem>
8) Formycin B	76	(8) <chem>Oc1ncnc2c1ncn2</chem>
9) Ribavirin	14	(9) <chem>Nc1nc2c(ncn2C)[C@@H]3O[C@H](CO)[C@@H](O)[C@H]3O</chem>
10) Adenosine 2'-monophosphate	52	(10) <chem>Nc1ncnc2c1ncn2[C@@H]3O[C@H](COP(=O)([O-])[O-])[C@@H](O)[C@H]3O</chem>
11) Adenosine 3'-monophosphate	0	(11) <chem>Nc1ncnc2c1ncn2[C@@H]3O[C@H](CO)[C@@H](COP(=O)([O-])[O-])[C@H]3O</chem>
12) Psicofurannine	0	
13) Acroguanosine	0	
14) Neplanosine A	0	
15) Adenine	0	
16) Guanine	0	
17) Thymine	0	
18) Uracil	0	
19) Cytosine	0	
20) D-Ribose	0	
21) 2-Deoxy-D-ribose	0	
22) 5'-AMP	0	
23) 5'-CMP	0	
24) 5'-UMP	0	

최대흡수를 각각 365, 530 nm에서 나타내었다. 또한 기질로서 첨가한 adenosine에 의해 환원된 효소단백질에서는 soret band가 428 nm로 이동하였으며 365 nm peak는 사라지고 560 nm에서 새로운 peak를 나타내었다(Fig. 3). 이상의 흡수 spectra의 결과로부터 본 nucleoside oxidase는 전형적인 hemoprotein인 것으로 판명되었다.

#### Prosthetic group

정제된 nucleoside oxidase의 native PAGE gel의 단일밴드 및 SDS-PAGE의 두 밴드(81,000, 69,000)를 3% acetic acid에 침적시켜 UV 조사(366 nm) 한 결과 노란 형광색을 나타내어 본 효소는 flavin을 포함하고 있음을 추측할 수 있었다. 이에 Machida 등의 방법(19)을 사용하여 flavin의 존재상태를 확인하였다. 정제 nucleoside oxidase를 5% trichloroacetate 용액에 넣고 100°C에서 10분 처리 후 원심분리(10,000g×10분)한 상등액은 노란색을 띠지 않으므로써 nucleoside oxidase 분자속에는 flavin이 공유결합을 하고 있음을 나타내었으며, 본 효소를 pronase로 가수분해하고 phosphodiesterase 처리하여 paper chromatography 상에서 AMP를 확인함으로써 flavin이 FMN이 아닌 FAD로 존재함을 알 수 있었다. 또한 Nucleoside oxidase에 결합된 FAD를 효소학적 방법으로 정량한 결과 1 mole nucleoside oxidase에 3 mole의 FAD가 결합되어 있음을 알 수 있었다.

#### 효소의 기질특이성

Nucleoside oxidase의 기질로서 nucleoside, nucleotide, base 및 nucleoside 관련물질들에 대한 기질특이성을 검토하였다. Table 1에서와 같이 adenosine, inosine, guanosine 등의 purine nucleoside와 thymidine, uridine 및 cytidine 등의 pyrimidine nucleoside에 대하여 모두 활성을 나타내었으나, 5'-AMP, 5'-GMP, 5'-CMP와 5'-UMP 등의 nucleotide와 guanosine, thymine, uracil과 cytosine 등의 base와 D-ribose, 2-deoxy-D-ribose 등의 당에 대해서는 활성을 나타내지 않았다. Base moiety가 변형된 kinetin riboside, formycin B, ribavirin 등에 대한 상대활성이 각각 89, 76, 14%로 나타났으나, sugar moiety가 변형된 psicofuranine, acycrogusine 및 nephanosine A에 대해서는 전혀 활성을 나타내지 않았다. 또한 adenosine 2'-monophosphate에 대해서는 52%의 상대활성을 나타내었으나, phosphate 기의 위치가 바뀐 adenosine 3'-monophosphate에 대해서는 효소활성을 보이지 않으므로써 높은 기질특이성을 나타내었다.

#### 금속이온 및 화학수식제의 영향

효소활성에 미치는 각종 금속이온의 영향을 검토하기

Table 2. Effect of metals and chemicals on nucleoside oxidase activity

Metal ion (1 mM)	Relative activity (%)
None	100
EDTA	100
NiCl <sub>2</sub>	100
SnCl <sub>2</sub>	6
MgSO <sub>4</sub>	92
CaCl <sub>2</sub>	104
PbCl <sub>2</sub>	10
AlCl <sub>3</sub>	78
MnCl <sub>2</sub>	101
CuSO <sub>4</sub>	100
ZnSO <sub>4</sub>	101
Ag <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	123
NaCl	100
CoCl <sub>2</sub>	103
CdCl <sub>2</sub>	100
HgCl <sub>2</sub>	99
8-Hydroxyquinoline	100
O-Phenanthline	100
α,α'-Dipyridyl	97
NaCN	92
NaCN (10 mM)	52
NaN <sub>3</sub>	88
NaN <sub>3</sub> (10 mM)	48
NH <sub>2</sub> OH	95
Phenylhydrazine	72
Semicabazide	98
Iodoacetate	99
p-Chloromercribenzoate	100
Acriflavine	60
Acriflavine (10 mM)	32
Quinacrine	88
Quinacrine (10 mM)	53

위하여 nucleoside oxidase 효소반응액에 각 금속이온과 저해제를 1 mM 되게 첨가하여 반응시킨 후 각각의 활성을 측정하였다(Table 2). 검토한 금속이온 중 SnCl<sub>2</sub>와 PbCl<sub>2</sub>에 의해 각각 94 및 90%의 효소활성이 저해되었으며 hemoenzyme 저해제인 NaCN 및 NaN<sub>3</sub>의 10 mM 농도에서 78과 67%의 효소활성 저해를, flavoenzyme 저해제인 acriflavine 및 quiancrine의 10 mM 농도에서도 68 및 47%의 효소활성이 저해되었다. 8-Hydroxyquinoline, o-phenanthroline, α,α'-dipyridyl 등의 chelating reagent와 iodoacetate, p-chloromercuribenzoate의 sulfhydryl reagent 등에 의해서는 효소활성이 거의 저해되지 않았다. Tryptophan 잔기와 결합하여 활성을 저하시키는 N-bromosuccinate에 의해 *Pseudomonas maltophilia* nucleoside oxidase는 1 mM 농도

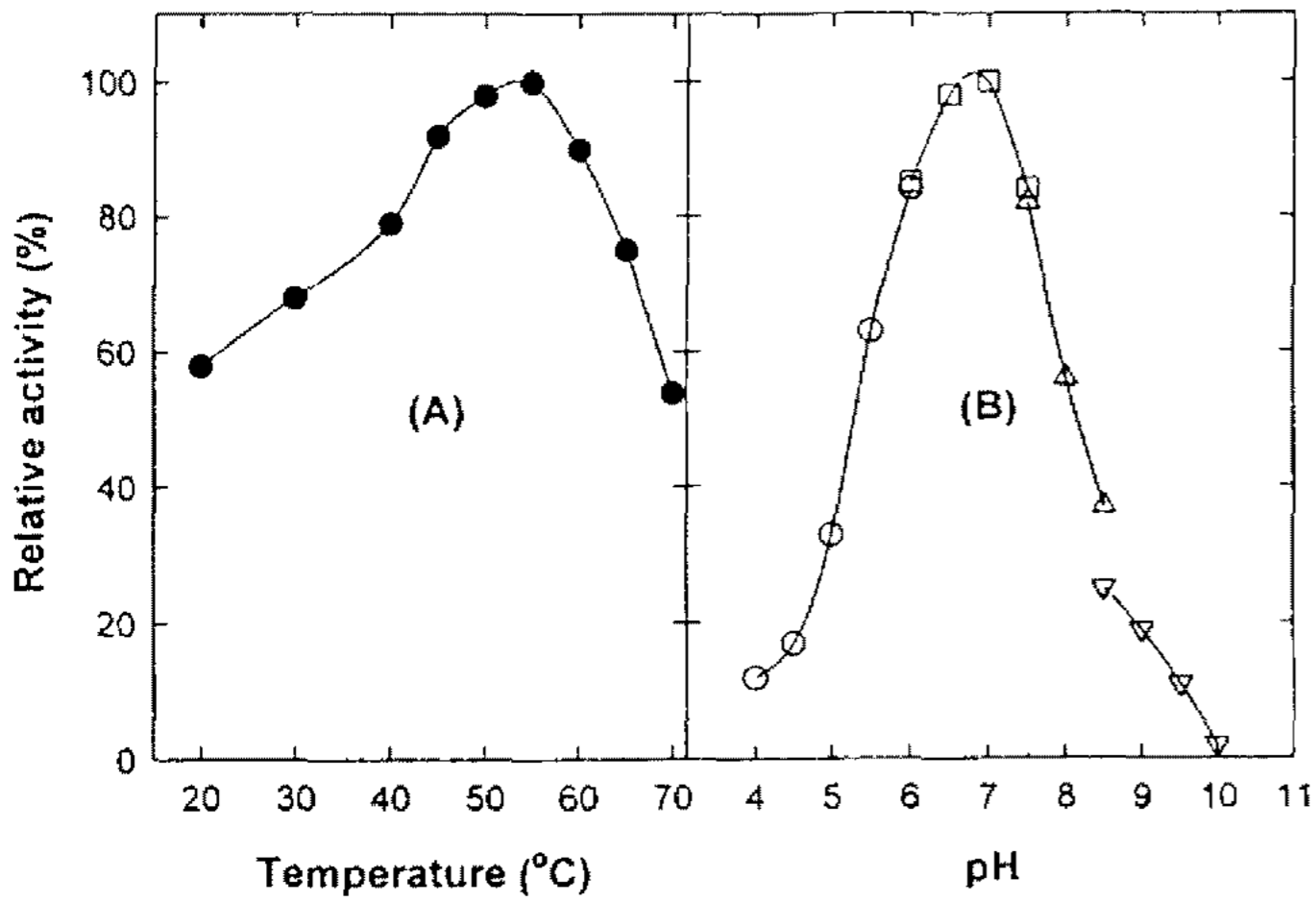


Fig. 4. Effect of pH and temperature on enzyme activity. A: Each enzyme activity was assayed at various temperatures under the standard condition.

B: Each enzyme activity was assayed with 40 mM buffer of pHs as indicated under the standard condition. Buffers used were citrate-phosphate (○), potassium phosphate (□) Tris-HCl (▲) and glycine-NaOH (▽).

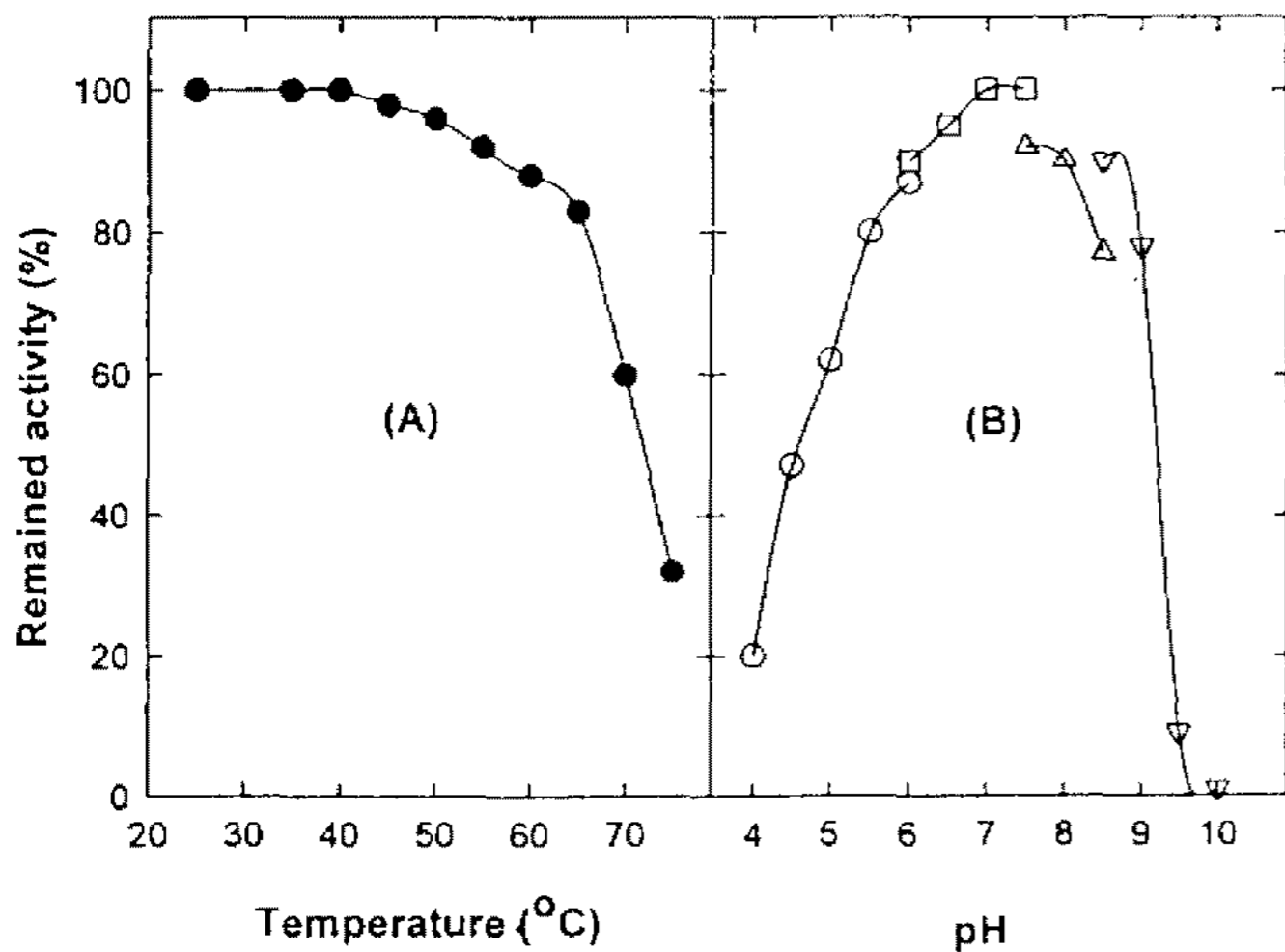


Fig. 5. Effect of pH and temperature on enzyme activity. A: Each enzyme in 50 mM phosphate buffer (pH 7.0) was in cubated for 10 min at various temperatures. The remaining activity was measured under the standard condition.

B: Each enzyme was in cubated in 100 mM buffers of various pHs as incubated for 30 min, and then the remaining activity was assayed at pH 7.0. Buffers used were citrate-phosphate (○), potassium phosphate (□) Tris-HCl (▲) and glycine-NaOH (▽).

에서 100% 활성이 저해된다는 보고(5)가 있으나 본 효소는 거의 저해받지 않았다.

효소의 최적 반응조건 및 안정성

본 효소반응의 최적 pH와 온도는 각각 pH 7.0(potassium phosphate buffer)과 55°C이었다(Fig. 4). 효소의 pH 안정성을 검토하기 위해 pH를 조절한 각각의 완충용액에서 25°C, 30분 정치 후 pH 7.0 효소반응계에서

활성을 측정된 결과 완충용액의 종류에 따라 차이는 있었으나 pH 5.5부터 9.0사이에서 80% 이상의 잔존 효소활성을 나타내었다(Fig. 5). 또한 nucleoside oxidase의 열안정성은 0.1M phosphate buffer(pH 7.0)를 사용하여 20°C부터 75°C까지 각각 10분 처리한 후 37°C 효소반응계에서 활성을 측정된 결과 60°C까지 잔존효소활성이 80% 이상으로 안정하였으나, 그 이상의 온도에서는 급속히 효소활성이 실패되었다(Fig. 5).

요 약

Flavobacterium meningosepticum의 cell free extract로부터 정제된 nucleoside oxidase의 분자량은 480,000이었으며, subunits 구조는 SDS-PAGE에 의해 81,000, 68,000, 32,000과 16,000의 분자량을 갖는 8개 이상의 polypeptide로 구성되어 있었다. 본 효소의 등전점은 5.1이었으며 visible absorption spectra의 결과 전형적인 hemoprotein의 양상을 나타내었으며 효소학적 방법에 의해 정량한 결과 nucleoside oxidase 1 mole당 3 mole의 FAD을 함유하고 있는 flavohemoprotein으로 확인되었다. 본 효소는 1 mM의 SnCl<sub>2</sub>와 PbCl<sub>2</sub>에 의해 각각 94%와 90%의 효소활성이 저해되었으며, hemoenzyme 저해제(NaCN, NaN<sub>3</sub>)와 flavoenzyme 저해제(acriflavine, quinacrine)에 의해서도 효소활성이 저해되었다. 효소반응의 최적온도는 50°C, 최적 pH는 7.0이었으며, 60°C 이하의 온도와 pH 5.5~9.0 범위에서 효소단백질은 안정함을 나타내었다.

감사의 말

본 논문은 연세대학교 생물산업소재연구센터의 지원에 의해 수행된 결과입니다.

참고문헌

1. 최양문, 조홍연, 양한철. 1993. Flavobacterium meningosepticum이 생산하는 nucleoside oxidase의 정제 및 stoichiometry. 산업미생물학회지 21: 23-29.
2. Isono, Y., M. Hoshino and T. Sudo. 1988. Some characteristics of a new enzyme, nucleoside oxidase. Agric. Biol. Chem. 52: 2135-2136.
3. Hoshino, M., Y. Isono and T. Sudo. 1989. Production of a new enzyme, nucleoside oxidase, by Pseudomonas maltophilia LB-86. Agric. Biol. Chem. 53: 399-403.
4. Isono, Y., T. Sudo, and M. Hoshino and. 1989. Production and reaction of a new enzyme, nucleoside oxidase. Agric. Biol. Chem. 53: 1663-1669.
5. Isono, Y., T. Sudo and M. Hoshino. 1989. Properties of a new enzyme, nucleoside oxidase, from Pseudomonas maltophilia LB-86. Agric. Biol. Chem. 53: 1671-1677.
6. Isono, Y., H. Tsujimoto and M. Hoshino. 1989. A new

- kinetic method for assaying serum 5'-nucleotidase using nucleoside oxidase. *Agric. Biol. Chem.* **53**: 2667-2671.
7. Isono, Y. 1990. A new colorimetric measurement of fish freshness using nucleoside oxidase. *Agric. Biol. Chem.* **54**: 2827-2832.
  8. Sakai, T., T. Tochikura and K. Ogata. 1965. Metabolism of nucleoside in bacteria (Part II). *Agric. Bio. Chem.* **29**: 742-750.
  9. Sakai, T., T. Tochikura and K. Ogata. 1966. Metabolism of nucleoside in bacteria (Part III). *Agric. Bio. Chem.* **30**: 245-253.
  10. Sakai, T., T. Yorifuji, T. Tochikura and K. Ogata. 1967. Metabolism of nucleoside in bacteria (Part IV). *Agric. Bio. Chem.* **31**: 525-532.
  11. Sakai, T., T. Yorifuji, T. Tochikura and K. Ogata. 1967. Metabolism of nucleoside in bacteria (Part V). *Agric. Bio. Chem.* **31**: 533-539.
  12. Strominger, J.L., L.A. Heppel and E.S. Maxwell. 1959. *Biochim. Biophys. Acta* **32**: 412-421.
  13. Kowlessor, O.D., L.J. Haefter, E.M. Riley and M.H. Slesinger. 1961. Comparative study of serum leucine aminopeptidase, 5'-nucleotidase and non-specific alkaline phosphatase in diseases affecting the pancreas, hepatobiliary tree and bone. *Am. J. Med.* **31**: 231-237.
  14. Arkesteijn, C.L.M. 1976. A kinetic method for serum 5'-nucleotidase using stabilised glutamate dehydrogenase. *J. Clin. Chem. Biochem.* **14**: 155-158.
  15. Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of protein of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-251.
  16. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**: 680-685.
  17. Winter, A. and C. Karlsson. 1976. LKB Application note. Vol 219, LKB Produkter AB, Sweden.
  18. Bergmeyer, H.U. 1976. *Methods of Enzymatic Analysis* Vol. I. 486-490.
  19. Machida, Y. and T. Nakanishi. 1984. Purification and properties of pyranose oxidase from *Coriolus versicolor*. *Agric. Bio. Chem.* **48**: 2463-2470.

(Received 11 July 1996)