

## 세포외 Cytosine Deaminase 생산균의 분리 및 동정

유대식\* · 김대현<sup>1</sup>

계명대학교 자연과학대학 미생물학과, <sup>1</sup>동국전문대학 외식산업과

**Isolation and Identification of Bacterium Producing Extracellular Cytosine Deaminase. Tae-Shick Yu\* and Tae-Hyun Kim<sup>1</sup>.** Department of Microbiology, College of Natural Science, Keimyung University, Taegu, 704-701, Korea. <sup>1</sup>Department of Food Service Industry, College of Tongkuk, Chilgok-Gun, Kyungpook, 718-850, Korea. - A bacterium, strain YK 391 producing extracellular cytosine deaminase, has been isolated from soil sample collected near Taegu City and identified. The strain YK 391 was observed to be a motile Gram-negative rod, and did not produced capsule nor spore. The bacterium produced acid from glucose and trehalose, not from arabinose. Esculine was not hydrolyzed. The isolate could grow anaerobically at 37°C, but not at 4°C. Palmitoleic and palmitic acids comprised over 80% of the fatty acid composition of the strain. The strain YK 391 was identified as *Chromobacterium violaceum* YK 391 based on its morphological and physiological characteristics, and on the fatty acid composition. The extracellular cytosine deaminase produced by *Chromobacterium violaceum* YK 391 is believed to be unique because it was active not only on cytosine and 5-fluorocytosine but also on cytidine.

1879년에 pus cell의 핵으로부터 핵산을 분리한 이후, 생명 현상을 규명하기 위한 일환으로 핵산에 관한 많은 연구가 진행되고 있다. 그 중 DNA와 RNA의 구성 단위인 nucleotide는 유전 정보와 단백질 생합성, 에너지 운반체, 전자 및 수소 수용체 등 여러 생체 기능을 수행하는데 주요한 역할을 담당하므로 이에 대한 생화학적, 생리적 연구를 비롯하여 임상학적인 연구 등 다양한 측면에서의 연구가 이루어지고 있다.

미생물에 있어서 nucleotide의 구성 성분인 purine 및 pyrimidine 염기들은 일반적으로 nucleoside 형태로 존재하기보다는 nucleotide 형태로 존재하며(1), 이들 nucleotide는 두 가지 경로를 따라 생합성 된다. 즉, 하나는 *de novo* 경로이며 다른 경로는 *Salvage* 경로로서 핵산의 분해로 생성된 염기나 세포외에서 흡수된 염기로부터 nucleoside를 거쳐 nucleotide로 생합성되는 경로이다.

미생물 세포에서 nucleotide의 분해 경로 중 pyrimidine nucleotide에서 uracil 염기까지의 대사 경로를 살펴보면, 5'-UMP는 CMP로 일부 전환되며, 대부분의 5'-UMP는 탈인산화되어 uridine을 거쳐 uracil로 대사된다. 5'-CMP는 탈인산화되어 cytidine을 거쳐 cytidine deaminase(EC 3. 5. 4. 5)에 의하여 nucleoside 단계(2)에서 탈아미노화되어 uridine으로 전환된 후, uracil로 대사된다. 또한 cytidine은 nucleoside hydrolase(EC 3. 2.

2. 3)에 의하여 cytosine과 D-ribose로 분해 대사되기도 한다. Cytosine은 cytosine deaminase에 의하여 탈아미노화되어 uracil로 대사된다. Pyrimidine nucleotide 대사계의 최종 분해 산물인 uracil은 UMP로 ribosyl화되어 *Salvage* 대사계로 재합성되든지, 산화 또는 개환되어 완전히 분해되기도 한다.

그러나 고등 동·식물은 cytosine deaminase와 nucleoside phosphatase를 생합성하지 못하므로 cytidine을 uridine으로 전환시키는 cytidine deaminase의 촉매로 cytidine은 uridine으로만 전환되어 uracil로 대사된다. 이 때문에 고등 동·식물(3)에서는 핵산에서 분해되거나 섭취된 cytosine이 더 이상 대사될 수 없을 뿐만 아니라 *Salvage* 생합성될 수도 없어서 체외로 배설되지만 한다.

Pyrimidine nucleotide의 *Salvage*합성 경로에서 cytosine은 다른 염기와는 달리 *Salvage* 합성계로 재합성될 수 없으며 cytosine에 대한 산화 효소가 존재하지 않으므로 직접 산화되어 분해될 수도 없는 특이적인 염기이다. 일부 미생물에서는 nucleotide 분해에 의하여 생성되는 cytosine을 탈아미노화시켜 uracil로 전환시키는 cytosine deaminase가 존재하여 uracil을 거쳐 *Salvage*합성계로, 또는 urea와 acetyl-CoA로 분해하므로 이 cytosine deaminase는 pyrimidine nucleotide 대사계에서 cytosine의 생리적 기능을 나타내는 데에 중요한 의의를 가지고 있다.

Cytosine deaminase(cytosine aminohydrolase, EC 3. 5. 4. 1)는 핵산의 pyrimidine 염기 중의 하나인 cytosine의 4번 탄소에 위치한 아미노기를 가수분해하여 uracil과 암모니아로 전환시키는 가수분해 효소이다. 이

\*Corresponding author

Tel. 82-53-580-5252, Fax. 82-53-580-5164

Key words: Extracellular cytosine deaminase, *Chromobacterium violaceum*, Cytosine deaminase, 5-Fluorocytosine

효소는 1923년에 처음 발견된(4, 5)이래 세균(6~10), 효모(11, 12), 곰팡이(13) 등 여러 종류의 미생물에서 연구되기도 했지만 대부분 세포내 효소에 관한 연구였다.

더욱이 세포외 cytosine deaminase에 관한 연구도 몇편 이루어졌었다. 즉, *Arthrobacter* sp. JH-13(14, 15)와 *Bacillus polymyxa* YL38-3(16, 17)에 의하여 세포외 효소를 생성한다는 보고도 있었으나 간단한 효소학적 성질을 규명하는데 그쳤다.

Cytosine의 유도체인 5-fluorocytosine(5-FC)은 인체 내에서는 항종양 효과가 없으나, 진균 감염에 대하여 화학 요법 효과가 있다고 하였다. 진균에서 화학 요법의 효과가 나타나는 것은 진균 체내에 5-FC를 항종양 효과가 큰 5-fluorouracil(5-FU)로 탈아미노화시키는 효소인 cytosine deaminase가 존재하기 때문이다.

특히 5-FC를 5-FU로 전환시키는 *E. coli*의 cytosine deaminase와 5-FC를 병행 투여하면 Hela 세포와 EA-285 glioma 배양세포의 증식이 현저하게 저해될 뿐 아니라 Fisher계 쥐의 뇌종양내에 전환 5-FU에 의한 뇌종양의 괴사소가 형성됨으로써 특이적으로 뇌종양에 항암 효과를 나타낸다고 하였다(18~20).

Cytosine deaminase는 미생물 균체내에서 극미량 생성되며 안정성이 매우 낮으므로 임상적으로 이용하기에는 어려움이 많았다. 아울러 5-FC 병행 투여법, enzyme capsule법, 항체 접합법 등의 cytosine deaminase와 관련된 새로운 항암 요법 개발 분야에 이 효소를 활용하려면 안정성이 높은 효소의 개발이 선행되어야 하므로 효소의 안정성 및 대량생산 등의 산업화에 유리한 세포외 cytosine deaminase의 연구가 요구되고 있다.

본 연구는 지금까지 보고되지 않은 균주가 생산하는 세포외 cytosine deaminase를 대상으로 하여 토양으로부터 세포외 cytosine deaminase 생산 균주를 직접 분리·선별하고 세균학적인 특성을 검토하여 세포외로 다량의 cytosine deaminase를 생산하는 세균을 동정했기에 보고하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 사용 시약

Cytosine, uracil, cytidine, 5-CMP, 5-fluorocytosine 및 5-fluorouracil 등은 Sigma Co. St. Louis, (U.S. A.) 제품을 사용했으며, 그 이외의 시약은 시판 특급 시약을 사용했다.

### 세포외 cytosine deaminase 생산균의 분리

세포외 cytosine deaminase 생산균을 분리하기 위하여 유기물 함량이 높은 산흙이나 밭흙, 퇴비 등을 3~5g 씩 random 하게 채취하였다.

채취한 토양 시료를 12시간 풍건한 후, 가압 증기 살균한 멸균수가 든 시험관에 1g의 시료를 넣어 현탁하였다. 현탁액을 약 3분간 방치한 후, 상등액을 1백금이 취해 분리용 배지(1.0% soluble starch, 1.0% peptone, 0.05%  $K_2HPO_4$ , 0.05%  $NH_4Cl$ , 1.5% agar, pH 7.0.)에 평판도 말하여 30°C에서 2~3일간 배양하였다. 모든 실험은 3회 이상의 반복 실험을 거쳐 실시하였다.

생성된 colony로부터 분리된 균은 희석법에 의하여 평판도말법으로 순수분리 했다. 순수분리된 세균은 보존용 배지(1.0% dextrose, 0.1% yeast extract, 0.1% meat extract, 0.2% peptone, 1.5% agar, pH 7.0.)에 1 백금이 접종하여 30°C에서 1~2일간 사면배양 했으며, 4°C에서 보관하여 사용했다.

### 균의 생육도 측정

실험균의 생육도는 분광 광도계(Shimadzu Model UV-120-02, Japan)를 사용하여 660 nm에서의 배양액의 흡광도를 측정하여 생육도로 표시했다.

### 조효소액의 조제

실험균을 30°C에서 24시간 배양한 종배양액 2%를 효소 생산 배지(1.0% soluble starch, 1.0% peptone, 0.1% meat extract, 0.1% yeast extract, 0.05%  $K_2HPO_4$ , 0.01% NaCl, 0.01%  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , pH 7.0)에 접종하여 30°C, 36시간 배양한 후, 9,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 그 상등액을 세포외 조효소액으로 사용하였다.

### 세포외 cytosine deaminase의 활성 측정

Cytosine deaminase의 활성(6)은 산성 조건(pH 2.0) 하에서 기질인 cytosine과 효소 반응 생성물인 uracil이 나타내는 290 nm에서의 흡광도 차를 분광 광도계(Shimadzu Model UV-120-02, Japan)로 측정하였다.

효소 반응계는 5 mM cytosine용액 0.2 ml와 적당히 희석한 조효소액 0.2 ml 및 20 mM Tris-HCl 완충액(pH 7.5) 0.6 ml로 전 용량이 1 ml되게 하여 37°C에서 30분간 효소 반응시킨 후, 0.1 N HCl 4 ml를 첨가하여 효소 반응을 정지시켰다. 효소 반응을 정지시킨 후, 침전물이 생기면 원심 분리하여 측정하였다.

이 반응 조건에서 1시간에 1  $\mu$ mole의 cytosine을 uracil로 전환시키는 효소량을 1 unit로 하였다.

### 세포외 cytosine deaminase 생산균의 검색

실험 균주의 세포외 cytosine deaminase 생산 유무는 5 mM cytosine 용액 0.2 ml와 조효소액 0.8 ml를 혼합하여 37°C의 진탕 수조(100 strokes/min, amplitude 2.5 cm)에서 진탕하면서 3시간 반응시킨 후, paper chromatography법으로 확인하였다.

효소 반응액의 100  $\mu$ l를 동양여지(Toyo NO. 50)에 적적하고 상층법으로 상온에서 18시간 전개시켰다. 전개제로서 tert-butanol : methyl ethyl ketone : water : formic acid (44 : 44 : 11 : 0.26 v/v)를 사용하였다(21). 각 반응 생성물의 검출은 자외선 등(short wave)을 이용하여 자외선 흡수 물질을 표준 물질과 비교 검정하였다.

### 단백질 정량

단백질 정량은 Bradford의 방법에 준하여 protein assay kit(Bio-rad Co. Hercules, Cal. U.S.A)를 사용하여 측정하였으며(22), 표준 단백질로 bovine serum albumin (Sigma Co.)을 사용하였다.

### 기질 특이성

Cytosine, 5-fluorocytosine, cytidine 및 CMP를 기질로 하여 효소반응을 시킨 후 paper chromatography로 기질에 대한 분해물의 생성 유무를 확인했다. Cytidine을 기질로 사용할 시 조효소액에 cytidine deaminase에 의한 cytidine의 탈아미노화가 일어날 수 있을 가능성을 배제하기 위하여 일반적으로 cytidine deaminase의 저해제인 3, 4, 5, 6-tetra hydrouridine(23)을 효소반응액에 1 mM 되게 첨가하여 cytosine deaminase의 효소반응을 시켰다.

### Cellular fatty acid 조성 측정

YK 391 균주의 cellular fatty acid 조성을 측정하기 위하여 trypticase soy broth agar(TSBA) 배지(3.0% trypticase soy broth, 1.5% agar)에서 배양한 세포들을 집균하고, 이들 세포의 지질로부터 fatty acid를 유리시키기 위해 배양균체 약 50 mg(wet weight)에 50% methanol과 15% NaOH를 첨가하여 100°C에서 30분간 가열하여 lysis 시켰다. Fatty acid에 methyl ester를 형성시키고 수용상에서 유기상으로 fatty acid를 추출한 후, 유기 추출물을 수용상으로 세척하였다(24).

추출된 시료의 fatty acid methyl esters는 gas chromatography에 의해 분석되었으며, 이의 profile은 Microbial Identification System Software (Microbial ID, Inc., Delaware, USA)를 이용했다.

### 균주 동정

분리균은 長谷川 武治의 방법(25)에 준하여 분류학적인 성질을 조사하였으며, KIST 유전자 은행실에 보관 중인 600여 Microbial Identification System(MIS). Aerobe Library (version 3.5, Microbial ID, Inc., Delaware, USA)내 표준 균주의 지방산 조성과의 비교 조사 등으로 Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (26)에 준하여 동정하였다.

## 결과 및 고찰

### 세포의 cytosine deaminase 생산균의 분리·선별

대구시와 경상군에서 20개, 밀양군에서 8개, 거창군에서 5개, 울주군에서 6개, 영일군에서 5개, 청송군에서 4개, 안동군에서 5개, 상주군에서 2개, 성주군에서 5개 지역 등 60개 지역의 토양을 분리원으로 하여 약 1,000주를 분리하였다. 분리 균주는 효소생산배지에 접종하여 30°C에서 48시간 진탕배양하여 배양액을 조효소액으로 사용하여 세포의 효소의 생성 유무를 290 nm의 흡광도에 의한 spectrophotometric method(6)로 측정 한 후, paper chromatography로 확인 했다. 분리 균주 중 8균주에서 세포의 cytosine deaminase의 활성이 확인되었다. Paper chromatography에 의하여 효소 활성을 확인한 결과, 8균주 중에서 3균주만 비교적 강한 효소 활성을 나타내었고 나머지 5균주는 아주 미약한 효소 활성을 나타내었다. 세포의 cytosine deaminase 활성이 높은 균주 YK 391을 선별하여 본 실험에 사용하였다.

### 기질 특이성

Cytosine deaminase는 일반적으로 cytosine 뿐만 아니라 5-fluorocytosine, 5-methylcytosine, cytidine과 5'-cytidine monophosphate(CMP)를 기질로 이용할 가능성이 있다. 그러나 이들은 효소의 기원 생물에 의하여 다양한 기질 특이성을 나타내므로 각 기질 물질에 대한 본 세포의 효소의 기질 특이성을 paper chromatography에 의하여 반응 생성물을 확인 했다.

분리균이 생산한 세포의 효소는 cytosine 뿐 아니라 cytidine과 5-fluorocytosine을 기질로 탈아미노화 시키며, CMP는 탈아미노화 시키지 못하여 기질로 이용하지 못했다(Table 1).

*Serratia marcescens*(6), *Pseudomonas aureofaciens*(7), *Salmonella thyphimurium*(10), *Escherichia coli*(27)와 *Aspergillus fumigatus*(13)의 세포내 효소는 cytidine을 기질로 탈아미노화 시키지 못하며 세포의 효소인 *Arthrobacter* JH-13(15)과 *Bacillus polymyxa*(17)의 효소도 cytidine을 기질로 이용하지 못했다. 그러나 본 분리균 YK 391이 생산하는 세포의 cytosine deaminase의

**Table 1. Substrate specificity of extracellular cytosine deaminase**

Substrate (5 mM)	Relative activity (%)
CMP	0
Cytidine	45
5-Fluorocytosine	55
Cytosine	100

The enzyme activity was assayed by paper chromatography and spectrophotometric method.

기질 특이성은 cytosine 뿐 아니라 cytidine을 기질로 이용하는 특성을 나타냈다. 최근까지 발표된 cytosine deaminase에 관한 연구에서 cytidine을 기질로 하는 효소는 처음 발견되었으며, 본 효소가 cytosine 뿐 아니라 cytidine을 기질로 이용한다는 점이 효소학적 특이성 뿐 아니라 분리균의 pyrimidine nucleotide 대사계의 분해 및 Salvage 생합성에 어떤 역할을 하는지 앞으로 계속 연구할 필요성이 요구되어 계속 연구를 진행하고 있다.

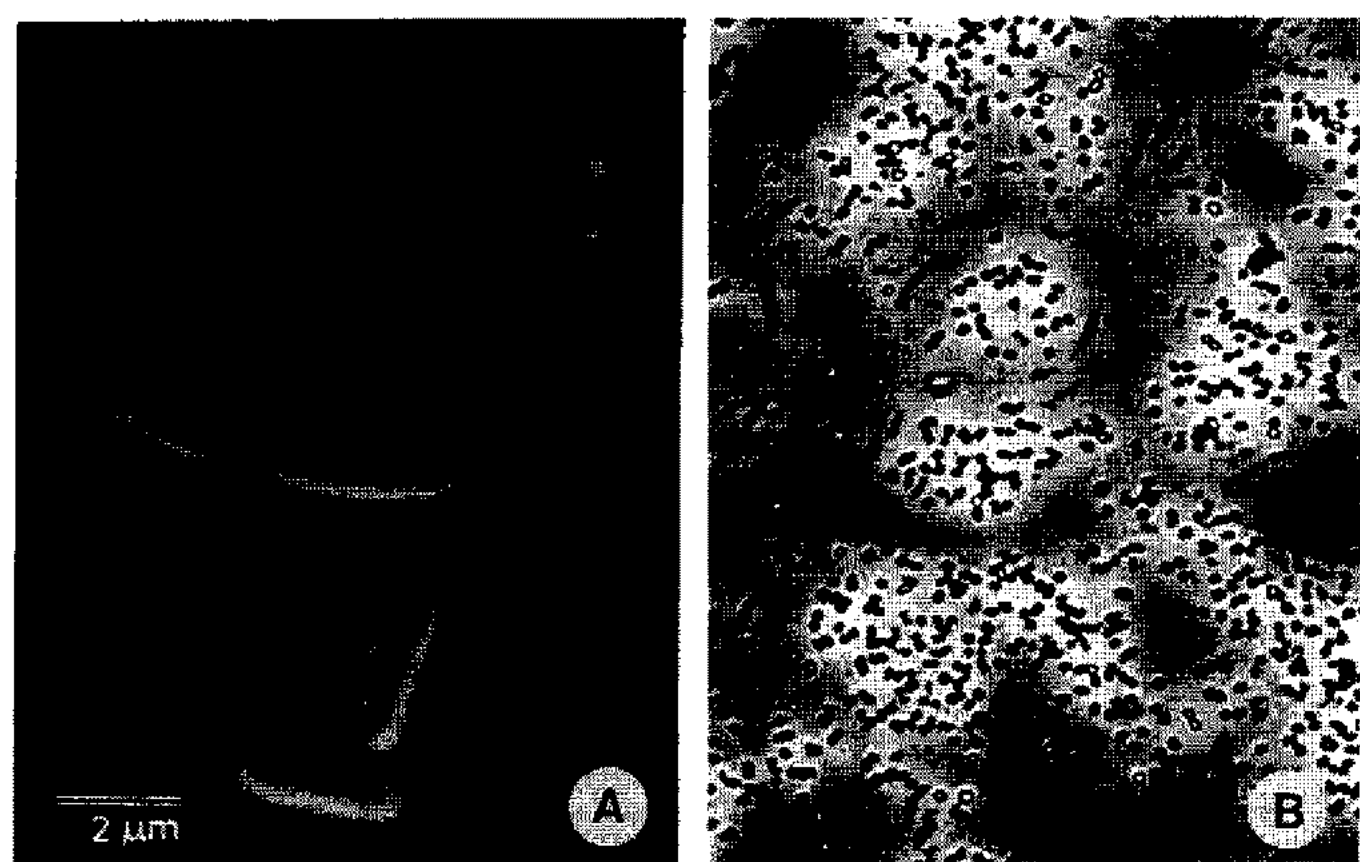
**분리균 YK 391의 동정**

토양으로부터 분리한 세포의 cytosine deaminase를 생산하는 균주 YK 391의 분류학적인 위치를 확인하기 위하여 배양 특성, 형태적 및 생리적 특성을 조사하여 Table 2와 Fig. 1에 나타내었다. 그 결과 형태적으로는

**Table 2. Morphological and physiological characteristics of the YK 391 strain**

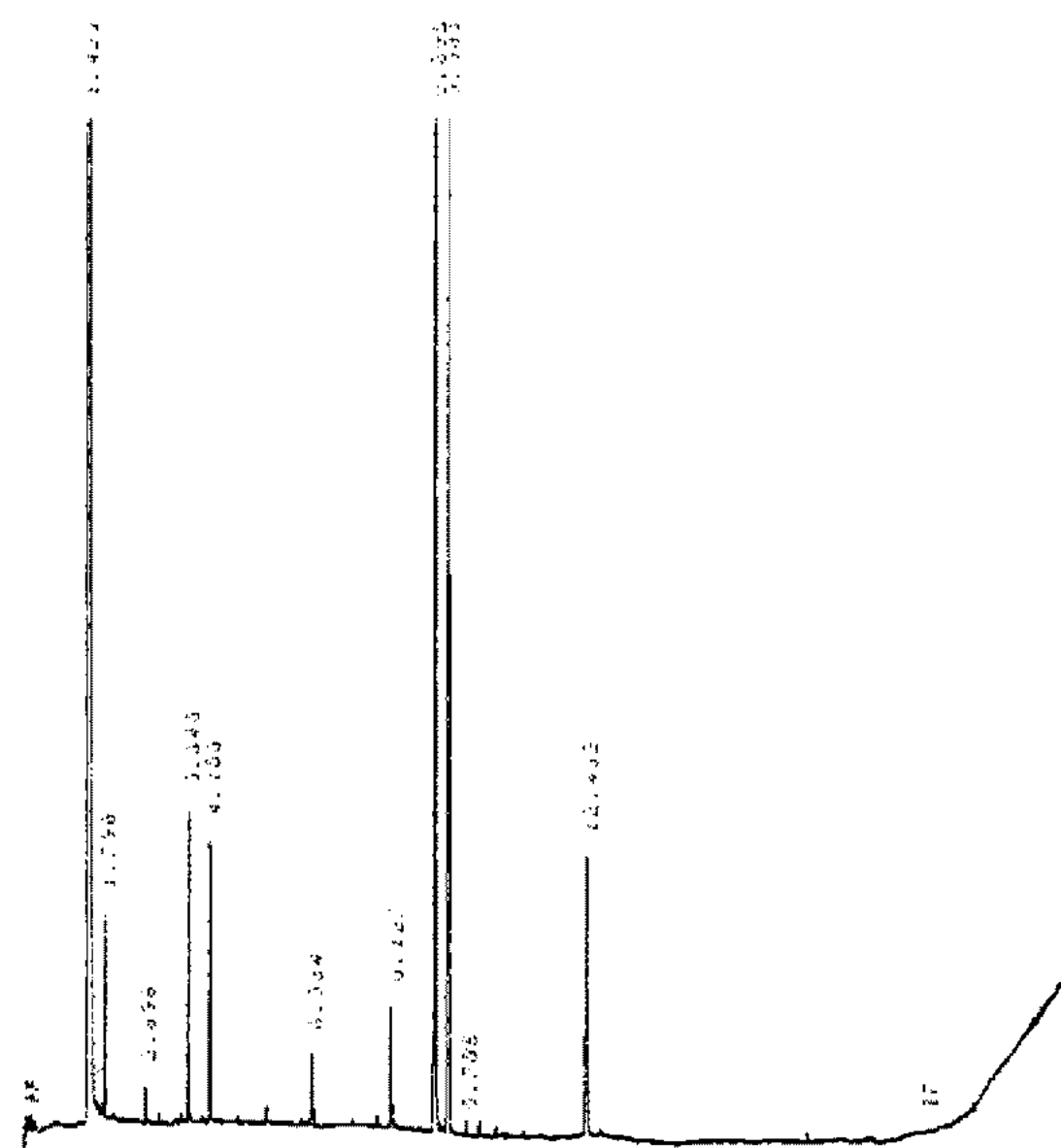
Tests	Characteristics
Shape	rod
Size	2.8~3.3×0.7~0.9 μm
Motility	+
Sporulation	-
Capsule	-
Gram staining	-
Catalase	+
O/F Test	F
Oxidase	+
Growth at 4°C	-
Growth at 37°C	+
Anaerobic growth	+
Esculine hydrolysis	-
Acid From	
Glucose	+
Trehalose	+
L-arabinose	-

+ ; positive, - ; negative, F ; fermentation



**Fig. 1. Morphology of the isolated strain YK 391.** (A) Scanning electron micrograph of YK 391. (B) Photomicrograph of YK 391(×960).

간균으로 운동성을 나타내며, 협막을 형성하지 않으며 그람 음성 세균이었다. 생리적 특성은 catalase와 oxidase에 양성이며 4°C에서 생육하지 않으나 37°C에서는 생육하며, 혐기적 조건에서도 증식하였다. 그리고 esculin을 가수분해하지 않으며 trehalose와 포도당으로부터 산을 생성하나 arabinose로부터 산을 생성하지 않았다. 그리고 MIS를 이용한 지방산 분석에서는 Fig. 2와 같이 iso-branched fatty acid인 palmitoleic acid C<sub>16:1w7</sub> cis와 palmitic acid C<sub>16</sub>가 대부분으로 전 지방산의 80.31%를 차지하였다. 이는 KIST 생명 공학 연구소 유전자 은행실에서 보관 중인 600여 library의 표준 균주와 비교할 때 본 실험 균주는 62.9%의 fatty acid homology를 보이는 *Chromobacterium*속과 *Janthinobacterium*속으로 분류되었다. 이들 *Chromobacterium*속과 *Janthinobacterium*속은 동일 속으로 분류되다가 1974년 이후부터 다른 속으로 구별하기 시작될 만큼 유사한 세균이다. 분리균 YK 391은 포도당과 trehalose로 부터 산을 생성하나 arabinose로 부터는 산을 생성하지 않고 escu-



RT	Area	Ar/Ht	Reapon	ECL	Name	%	Comment 1	Comment 2
1.439	388923648	0.028		7.050	SOLVENT PEAK		< min rt	
1.800	3808	0.026		7.888			< min rt	
2.708	808	0.030	1.140	9.998	10:0	0.59	ECL deviates -0.002	Reference -0.012
3.649	8840	0.029	1.062	11.423	10:0 30H	4.61	ECL deviates -0.000	
4.118	6400	0.029	1.038	12.003	12:0	4.22	ECL deviates 0.003	Reference -0.004
6.394	2200	0.037	0.979	14.000	14:0	1.37	ECL deviates 0.000	Reference -0.005
8.139	4176	0.041	0.960	15.200	14:0 20H	2.55	ECL deviates -0.005	
9.105	82376	0.040	0.953	15.814	Sum In Feature 4	49.88	ECL deviates -0.003	16:1 w7c/15 iso 20H
9.395	50344	0.041	0.952	15.999	16:0	30.43	ECL deviates -0.001	Reference -0.004
12.443	10640	0.046	0.942	17.821	Sum In Feature 7	6.36	ECL deviates -0.001	18:1 w7c/w9t/w12t
*****	82376				SUMMED FEATURE 4	49.88	16:1 w7c/15 iso 20H	15:0 ISO 20H/16:1w7c
*****	10640				SUMMED FEATURE 7	6.36	18:1 w7c/w9t/w12t	18:1 w9c/w12t/w7c
*****							18:1 w12t/w9t/w7c	
Solvent Ar	Total Area	Named Area	% Named	Total Amt	Nbr Ref	ECL Deviation	Ref ECL	Shift
388923648	163784	163784	100.00	157455	4	0.003		0.007

**Fig. 2. Gas chromatogram of cellular fatty acids of the isolated strain YK 391.** Column; 25×0.2 mm methyl phenyl silicone fused silica capillary column(Hewlett-Packard Co.), detector; flame ionization detector, injector temperature; 250°C, detector temperature; 250°C, column temperature; 180°C, carrier gas; N<sub>2</sub> (30 ml/min.)



line을 가수분해하지 않는 생리적 특성으로 부터 *Chromobacterium*속으로 분류되었다. *Chromobacterium*속에는 *C. violaceum*과 *C. fluviatle*의 2 종의 세균이 분류되어 있다. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology에 준하여 생리적 성질을 검토하였다.

*Chromobacterium*속으로 분류된 분리균 YK 391은 4°C에서 생육하지 않으며 37°C에서는 생육하므로 *Chromobacterium violaceum* 혹은 그 유연군으로 분류되었으며, 분리균 YK391을 *Chromobacterium violaceum* YK 391로 동정하였다.

## 요 약

토양으로부터 세포의 cytosine deaminase를 다량 생산하는 YK 391 세균을 분리하였다. 이 세균의 형태적 특징은 포자를 형성하지 않고 운동성을 가지는 그람음성 간균으로서 통성혐기성 세균이었다.

생리적 특징은 esculine을 가수분해하지 않으며 포도당과 trehalose로부터 산을 생성하나 arabinose로부터는 산을 생성하지 않으며, 세포의 지방산은 palmitoleic acid와 palmitic acid가 80.31였으며 4°C에서 생육하지 않고 37°C에서 생육하므로, *Chromobacterium violaceum* YK 391로 동정했다.

*Chromobacterium violaceum* YK 391이 생산하는 세포의 cytosine deaminase는 cytosine과 5-fluorocytosine 뿐 아니라 cytidine도 탈아미노화 시켰다.

## 감사의 말

세포의 fatty-acid 조성측정에 도움을 주신 KIST 생명공학 연구소 유전자 은행실 배경숙 박사님과 이문수 선생님께 감사드립니다.

## 참고문헌

1. Neuhard, J. and P. Nygaard, 1987. Purines and pyrimidines. In: Neihardt F. C., (ed) *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium.*, Washington: American Society for Microbiol. 1: 445-506.
2. Tatibana, M., 1969. Interrelationship of nucleotide metabolism in mammalian tissues. *Protein, Nucleic acid, Enzyme*, 14: 1316-1318.
3. Koechlin, B. A., Rubio, F., Palmer, S., Gabriel, T. and R. Duschinsky, 1966. The metabolism of 5-fluorocytosine-<sup>2</sup><sup>14</sup>C and of cytosine-<sup>14</sup>C in the rat and the disposition on 5-fluorocytosine-<sup>2</sup><sup>14</sup>C in man. *Biochem. Pharmac.*, 15: 435-446.
4. Hahn, A. and W. Lentzel, 1923. Uber das verhalten von pyrimidinderivat in den organismen. I. Einfluss von

- hefe auf pyrimidinderivate. *Z. Biol.*, 79: 179-190.
5. Hahn, A. and L. Schafer, 1925. Uber das verhalten von pyrimidinderivat in den organismen. II. Einwirkung von *Bacterium coli* auf uracil und cytosin. *Z. Biol.*, 83: 511-514.
6. Sakai, T., T. S. Yu, H. Tabe and S. Omata, 1975. Purification of cytosine deaminase from *Serratia marcescens*. *Agr. Biol. Chem.*, 39: 1623-1629.
7. Sakai, T., T. S. Yu, K. Taniguchi and S. Omata, 1975. Purification of cytosine deaminase from *Pseudomonas aureofaciens*. *Agr. Biol. Chem.*, 39: 2015-2020.
8. Yu, T. S., T. Sakai and S. Omata, 1976. Kinetic properties of cytosine deaminase from *Serratia marcescens*. *Agr. Biol. Chem.*, 40: 543-549.
9. Yu, T. S., T. Sakai and S. Omata, 1976. Kinetic properties of cytosine deaminase from *Pseudomonas aureofaciens*. *Agr. Biol. Chem.*, 40: 551-557.
10. West, T., M. S. Shanly and G. A. O'Donovan, 1982. Purification and some properties of cytosine deaminase from *Salmonella typhimurium*. *Biochim. Biophys. Acta.*, 719: 251-258.
11. Kream, J. and E. Chargaff, 1952. On the cytosine deaminase of yeast. *J. Amer. Chem. Soc.*, 73: 5157-5150.
12. Ipata, P. L., F. Marmochii, G. Magni, R. Felio and G. Polidoro, 1971. Baker's yeast cytosine deaminase. Some enzymic properties and allosteric inhibition by nucleosides and nucleotides. *Biochem.*, 10: 4270-4276.
13. Yu, T. S., J. K. Kim, T. Katsuragi, T. Sakai and K. Tomomura, 1991. Purification and some properties of cytosine deaminase from *Aspergillus fumigatus*. *J. Ferment. Bioeng.*, 72: 266-269.
14. Jun, H. K. and J.H. Park, 1984. Isolation of extracellular cytosine deaminase producing strain *Arthrobacter* sp. JH-13 and cultural condition of it's enzyme production. *Kor. J. Microbiol.*, 22: 257-263.
15. Jun, H. K., J. H. Park and Y. Yeeh, 1985. Properties of extracellular cytosine deaminase from *Athrobacter* sp. JH-13. *Kor. J. Microbiol.*, 23: 177-183.
16. Yu, T. S., T. H. Kim, J. M. Park, H. I. Song and K. T. Chung, 1988. Optimum cultural conditions for production of extracellular cytosine deaminase by *Bacillus polymyxa* YL38-3. *Kor. J. Microbiol.*, 26: 362-367.
17. Yu, T. S., T. H. Kim, J. M. Park, H. I. Song and K. T. Chung, 1988. Enzymatic properties of extracellular cytosine deaminase. *Kor. J. Microbiol.*, 26: 368-374.
18. Nishiyama, T., Y. Kawamura, K. Kwamoto, H. Matsumura, N. Yamamoto, T. Ito, A. Ohyama, T. Katsaragi and T. Sakai, 1981. New antineoplastic chemotherapy without systemic side effects to the host. *Current Chemotherapy and Immunotherapy. Proc. 12th International. Congr. of Chemotherapy, Florence*, 1269-1270.
19. Nishiyama, T., Y. Kawamura, K. Kwamoto, H. Matsumura, N. Yamamoto, T. Ito, A. Ohyama, T. Katsaragi and T. Sakai, 1982. Antineoplastic effect of 5-fluorocytosine at cytosine deaminase on brain tumor. *Neu-*

- rol. Med. Chirs.*, **22**: 344-352.
20. Nishiyama, T., Y. Kawamura, K. Kwamoto, H. Matsumura, N. Yamamoto, T. Ito, A. Ohya, T. Katsuragi and T. Sakai, 1985. Antineoplastic effects in rats of 5-fluorocytosine in combination with cytosine deaminase. *Cancer Research*, **45**: 1753-1761.
21. Zweig, G. and J. Sherma, 1972. *Handbook of Chromatography*, Cleveland, Ohio, CRC Press, 323-326.
22. Bradford, B. M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing for the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-251.
23. Cohen, R. M. and R. Wolfenden, 1971. Cytidine deaminase from *Escherichia coli*, Purification, properties, and inhibition by the potential transition state analog 3,4,5,6-tetrahydrouridine. *J. Biol. Chem.*, **246**: 7561-7565.
24. Miller, L. T. 1982. Single derivatization method for routine analysis of bacterial whole cell fatty acid methyl esters, including hydroxy acid. *J. Clin. Microbiol.* **18**: 861-867.
25. 長谷川 武治, 1985. 『微生物の分類と 同定(下)』, 學會出版センター, p.99-161.
26. Holt, J. G., N. R. Krieg, P. H. A. Sneath, J. T. Staley and S. T. Williams, 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (9th ed.)* Williams and Wilkins, 197-198.
27. Katsuragi, T., T. Sakai, K. Matsumoto and K. Totonomura, 1986. Cytosine deaminase from *E. coli*-production, purification and some characteristics. *Agirc. Biol. Chem.*, **50**: 1721-1730.

(Received 18 November 1996)