

아데노신 탈아미노화 효소 억제제를 생산하는 *Streptomyces* sp. V-8의 변이종으로부터 페녹사지논 합성효소의 분리 및 특성

김경자[#] · 조성진

순천향대학교 자연과학대학 생명과학부

(Received May 8, 1998)

Purification and Characterization of Phenoxazinone Synthase from *Streptomyces* sp. V-8 Mutant Producing Adenosine Deaminase Inhibitor

Kyoung-Ja Kim and Sung-jin Cho

Department of Life Science, Soonchunhyang University, Onyang, 336-600, Korea

Abstract—Phenoxazinone synthase catalyzes the oxidative condensation of two molecules of substituted *o*-aminophenol to the phenoxazinone chromophore of actinomycin. Mutant strain, *Streptomyces* sp. V-8-M-1 producing higher phenoxazinone synthase, was obtained from *Streptomyces* sp. V-8 by treatment of *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine. The phenoxazinone synthase was purified from extract of mutant strain of *Streptomyces* sp. V-8-M-1 by successive steps of streptomycin sulfate, ammonium sulfate precipitation, DEAE-cellulose and Sephadex G-200 column chromatography. Molecular weight of the enzyme was 360,000 daltons. The enzyme was composed of octamer of a single subunit of 45,000 daltons. The *K_m* value and *V_{max}* value for 3-HAA were 14.9 μ M and 9.5 mg/U, respectively. The optimal pH and temperature for the enzyme activity were 9.0 and 25~30°C, respectively. Treatment of the enzyme with group specific reagents, phenylglyoxal, *p*-hydroxymercury-benzoate, *N*-bromosuccinimide, 5,5'-dithiobis-nitrobenzoic acid and ethylmaleimide resulted in loss of enzyme activity, which shows arginine and cysteine residues are at or near the active site.

Keywords □ Phenoxazinone synthase, adenosine deaminase inhibitor.

항바이러스제¹⁾나 항암제로 이용되고 있는 adenosine 유도체들^{2,3)}이 adenosine deaminase⁴⁾에 의해 deamination 되어 활성이 떨어지고 독성이 증가된다. 이러한 문제점을 해결하기 위하여 adenosine deaminase 억제제^{5,6,7,8)}를 생산하는 균주를 screening하는 과정에서 *B. subtilis*와 *M. smegmatis*에 대해 강한 항균력을 가지며 adenosine deaminase에 강한 억제 활성을 보이는 물질^{9,10)}을 분리하는 균주를 토양으로부터 분리하여 *Streptomyces* V-8로 동정하여 전보¹¹⁾에 보고하였다. 또한

이 adenosine deaminase 억제제가 actinomycin complex임을 전보¹²⁾에 보고하였다. Actinomycin은 phenoxazine 유도체인 actinocin을 heterocyclic chromophore로 가지고, 이 chromophore에 pentapeptide lactone ring이 결합된 구조를 가진 peptolide 항생물질 균이다. Actinomycin의 생합성¹³⁾에 관여하는 중요한 속도 결정단계를 촉매하는 효소인 페녹사지논 합성효소 (phenoxazinone synthase)^{14,15,16)}는 2 분자의 *o*-aminophenol과 그 유도체를 산화적 축합 반응에 의해 phenoxazinone 고리를 형성하는 과정을 촉매하는 효소이다. 이 효소는 actinomycin의 생합성 과정^{17,18)}에서는 2 분자의 4-methyl-3-hydroxyanthranilic acid¹⁹⁾를 촉

[#] 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 0418-530-1352 (팩스) 0418-530-1350

합하여 actinomycin의 발색단인 actinocin을 생성하는 반응을 촉매한다. 그리고 이 효소^{20,21,22)}는 actinomycin의 생산과 마찬가지로 glucose에 의해 catabolic repression²³⁾을 받는 것으로 알려져 있으며 actinomycin이 생산되지 않는 배양 초기의 이 효소의 분자량과 actinomycin이 생산되는 배양 후기의 분자량이 다른 것으로 보고되었다.²⁴⁾ 본 연구에서는 폐녹사지는 합성효소(phenoxazinone synthase)의 활성^{25,26,27)}을 증폭하기 위하여 변이원인 N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine(NTG)를 이용하여 *Streptomyces* sp. V-8의 변이종을 선별하였으며 이 변이종(V-8-M-1)으로부터 폐녹사지는 합성효소를 분리, 정제하여 특성을 조사하여 보고하는 바이다.

실험방법

사용 균주 및 배지 - Adenosine deaminase 억제제를 생산하는 것으로 판명된 *Streptomyces* sp. V-8균과 이 균을 NTG로 돌연변이 시킨 변이주 V-8-M-1을 사용하였으며, adenosine deaminase 억제제의 구조를 조사한 결과 전보¹¹⁾에서 보고한 바와 같이 actinomycin complex였으므로 actinomycin 생산에 사용한 배지 No. 7 최소 배지(glucose 0.5%, MgSO₄ · 7H₂O 1.0%, sodium citrate, 2H₂O 1.0%, KNO₃ 0.3%, NaCl 0.5%, CaCl₂ 0.05%, KH₂PO₄ 0.05%, trace metal solution* 0.1%, * = FeSO₄ · 7H₂O 0.2%, MnSO₄ · 7H₂O 0.1%, CuSO₄ · 5H₂O 0.1%, ZnSO₄ · 7H₂O 0.1%, Na₂MoO₄ 0.01%)를 폐녹사지는 합성 효소의 분리에도 사용하였다.

폐녹사지는 합성 효소 활성 측정²⁸⁾ - 0.1 M Tris. HCl buffer(pH 9.0)에 3-hydroxyanthranilic acid (3-HAA)를 0.2 mM 농도로 첨가하고 무세포 추출액 50 μl을 넣고 30°C, 452 nm에서 10분간 흡광도의 변화를 측정하고 5분간의 흡광도 변화 1을 효소 활성 단위 1로 정하였다. 효소의 specific activity는 단백질 mg당 효소 활성 단위로 정하였다.

단백질 정량 - 가용성 단백질의 함량은 Bradford 방법²⁹⁾에 의해 실시하였다. 표준 물질로는 bovine serum albumin(Sigma 사)을 사용하였으며, 578 nm에서 흡광도 변화로 단백질 농도를 측정하였다.

NTG에 의한 돌연 변이 - Tryptic soy agar(TSB) 배지에 균주를 도말하여 2주간 배양하여 포자를 형성시

키고 그 표면에 0.1% tween 80을 처리하여 포자를 긁어 모아 -20°C에 냉동보관하고 필요에 따라 해동하여 사용하였다. 해동한 포자를 원심분리하여 상등액을 버리고 TM buffer(0.05 M Tris.HCl, 0.05 M maleic acid, pH 8.0)에 포자를 현탁한 후 NTG를 1 mg/ml로 첨가하였다. 30°C에서 30 분간 정지한 후 원심분리하여 포자를 모으고 TM buffer를 1 ml 가하여 원심분리하여 NTG를 제거하였다. 이 과정을 두 번 반복하고 No. 7 최소 배지 50 ml에 접종하여 1일간 28°C에서 배양하였다. 이를 멸균한 지면으로 막은 syringe를 통과하여 여과한 후 통과한 액을 TSA 배지에 도말하여 28°C에서 2~3일간 배양하여 형성된 colony를 무작위로 선별하여 최소 배지에 5일간 배양후 원심분리한 다음 상등액을 443 nm에서 흡광도를 측정하여 actinomycin생산을 야생종과 비교하여 증가된 것을 골랐다. 그중에서 7종을 골라 최소 배지에 4일간 28°C에서 배양 후 무세포 추출액을 만들어 폐녹사지는 합성 효소의 활성이 야생종의 0.22 U/mg · protein보다 2배 증가된 0.45 U/mg · protein의 활성을 가진 변이주를 V-8-M-1으로 명명하였다.

변이주 V-8-M-1의 특성 조사 - 변이주의 생리적 특성을 야생종과 비교하여 조사하기 위하여 ISP No. 4 배지(Difco의 Bacto ISP medium 4)에 2주간 키운 후 전자 현미경으로 관찰하고, ampicilline, cephalothine, neomycin, streptomycin, tetracycline 등의 항생제에 대한 감수성 조사를 하였다. 또한 No. 7 최소 배지에 5일간 28°C에서 키운 상등액을 에틸아세테이트로 추출하고 감압증류후 에탄올에 일정 농도로 녹인 후 *B. subtilis*, *M. smegmatis*, *C. albicans*에 대한 항균력을 조사하였다.

폐녹사지는 합성 효소의 분리 - No. 7 최소 배지에 30°C에서 4일간 배양한 v-8 균액을 8,000 rpm에서 10분간 원심 분리한 후 균체를 0.85% NaCl로 두 번 씻은 후 0.1 M potassium phosphate buffer(pH 6.9)에 현탁시켜 0.1 mm glass bead 로 3분간 4번 처리한 후 원심분리후 상등액을 무세포 추출액으로 사용하였다. 이 무세포 추출액에 단백질 분해 효소 억제제인 phenylmethanesulfonyl fluoride(PMSF)를 1 mM 농도로 첨가하고 황산스트렙토마이신을 1.25% 되게 첨가하여 핵산을 제거하였다. 원심분리한 상등액에 황산 암모니움을 25~50% 되게 첨가하여 얻은 침전을 0.1 M potassium phosphate buffer(pH 6.9)

에 현탁한 후 같은 완충액에 4°C에서 하룻밤 투석시켰다. 투석한 액을 ultrafiltration(Amicon PM 10)법으로 농축하여 DEAE-Cellulose(2.5 cm×20 cm)에 흡착시킨 후 0~1.0 M NaCl을 함유한 완충액 A(10 mM potassium phosphate, pH 7.0/1 mM β-mercaptoethanol/0.5 mM EDTA)로 4 ml씩 분획하여 시간당 15 ml의 유속으로 용출시킨 후 폐색사지는 합성 효소 활성 분획을 모아 ultrafiltration시켜 농축한 후에 Sephadex G-200(2.5×25 cm, 완충액 A)을 사용하여 시간당 8 ml의 유속으로 3 ml씩 용출시켰으며 다시 활성 분획을 ultrafiltration으로 농축한 후에 SDS-PAGE를 이용하여 순도 및 분자량을 확인하였다.

효소의 분자량 측정

변성되지 않은 단백질의 분자량은 Sepharose 6-B column을 이용하여 측정하였으며, carbonic anhydrase(29,000 dalton), bovine serum albumin(66,000 dalton), yeast alcohol dehydrogenase(150,000 dalton), sweet potato β-amylase(200,000 dalton), horse spleen apoferritin(443,000 dalton), bovine thyroglobulin(669,000 dalton)을 기준으로하여 폐색사지는 합성효소의 분자량을 결정하였다.

SDS-PAGE는 0.5% SDS가 포함된 10% polyacrylamide gel을 사용하였으며, 전기 영동후 Coomassie Brilliant Blue R-250으로 염색하고, 7% acetic acid-5% methanol 조성의 용액으로 탈색하여 단일체의 분자량을 측정하였다.

효소의 특성

기질 특이성³⁰⁾ 효소의 기질 특이성을 알아보기 위하여 여러 가지 기질에 대한 효소 활성을 조사하였다. 기질로는 o-aminophenol, 3-hydroxyanthranilic acid, 3-hydroxy-DL-kynurenine을 효소 반응액의 최종 농도가 0.2 mM이 되도록하여 효소 활성을 측정하였다.

pH 및 온도 - pH 4-6 구간은 sodium acetate buffer(50 mM), pH 6-8 구간은 potassium phosphate buffer(50 mM), pH 8-9구간은 Tris-HCl buffer(50 mM), pH 9-10 구간은 Glycine-NaOH buffer(50 mM)를 사용하여 효소반응액을 각각의 pH 로 맞추어 준 후에 효소의 활성을 측정하였다. pH 에 대한 효소의 안정성 실험은 각각의 pH에서 24 시간동안 4°C에 방치

한 후에 잔존하는 효소활성을 조사하였다. 온도에 대한 영향은 20~80°C 구간에서 효소 반응을 수행하여 최적 반응 온도를 조사하였고, 온도에 대한 안정성 검사는 각각의 온도에서 30분간 열처리한 후에 잔존하는 효소 활성을 조사하였다.

금속 이온 - 여러 금속 이온들의 효소에 미치는 영향을 조사하기 위하여 금속이온들을 효소 반응액에 최종 농도 0.1 mM과 1 mM로 첨가한 후에 효소 활성을 측정하였다. Buffer로는 10 mM Tris-HCl(pH 7.0)을 사용하였다.

효소 활성에 미치는 환원제의 영향 - cystein, sodium thiosulfate, sodium sulfite, sodium citrate 등의 환원제를 최종 농도가 10 mM 되도록 5 μl의 효소액에 첨가하고 30분간 30°C에서 반응후 잔여 효소 활성을 측정하여 효소 활성에 미치는 환원제의 영향을 조사하였다.

화학적 수식^{6,18)} - 활성이 25.6 unit/mg protein인 정제 폐색사지는 합성 효소 5 μl에 특정 완충용액을 이용한 각종 modifier 일정량을 첨가하고 30°C에서 30 분간 반응시킨 후 잔여 효소 활성을 측정하여 효소 활성에 필수적인 역할을 하는 아미노산 잔기를 식별하였다.

결과 및 고찰

변이주 V-8-M-1의 특성 조사 - 전자 현미경으로 관찰한 결과 야생종 V-8의 경우에는 짧고 둥근 형태이나 변이종 V-8-M-1의 경우는 포자가 길고 가는 형태를 띠고 있었다(Fig. 1). V-8 균주의 폐색사지는 합성 효소 활성은 0.22 U/mg · protein인데 V-8-M-1은 2배 정도 증가한 0.45 U/mg · protein 으로 나타났다. 항생제 감수성 검사에 있어서 V-8은 ampicilline, cephalothine, streptomycin에 저항성을 나타내었으나 V-8-M-1은 이들에 대하여 감수성을 나타내었다(Table I). V-8 균주와 V-8-M-1 균주의 배양 상등액을 에틸아세테이트로 추출후 감압 증류한 다음 에탄올에 녹인 후 *B. subtilis*, *M. smegmatis*, *C. albicans*에 대한 항균력을 비교한 결과, V-8 균주에 비하여 V-8-M-1의 경우 항균력이 1.5배 정도 증가하였다.

효소 정제

폐색사지는 합성 효소의 분리 - *Streptomyces* sp.

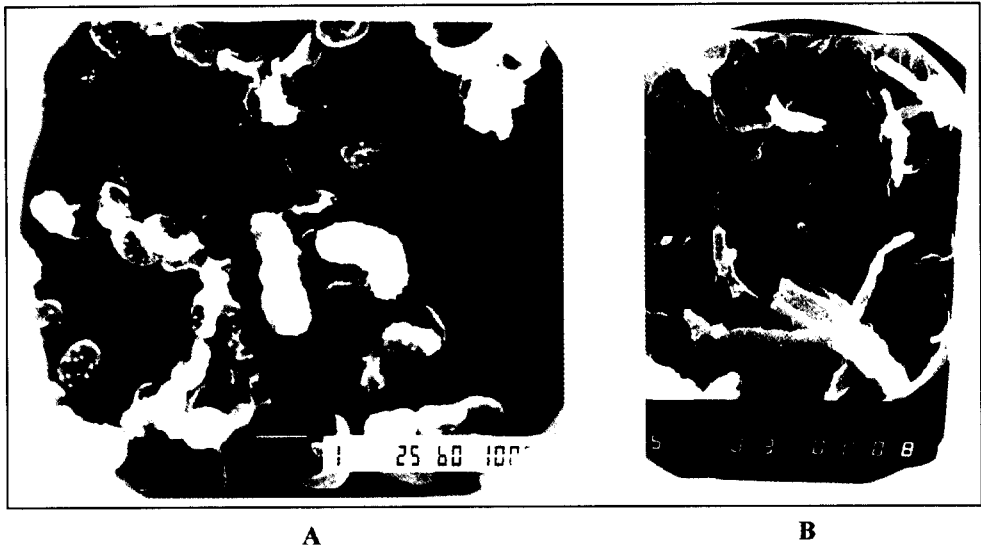


Fig. 1 — Scanning electron microscopy of *Streptomyces* sp. V-8 (A) and mutant V-8-M-1(B). Bar represents 1 μm.

Table I — Antibiotic-sensitivity of *Streptomyces* sp. V-8 and mutant V-8-M-1

Antibiotics#	V-8		V-8-M-1	
	Inhibition diameter*	Result	Inhibition diameter*	Result
CF30	0	resistant	50	sensitive
Am10	0	resistant	27	sensitive
S10	0	resistant	22	sensitive
N30	16	medium	18	sensitive
Te30	15	medium	20	sensitive

#: 6 mm paper disk, CF30: cephalothin 30 μg, Am10: ampicillin 10 μg, S10: streptomycin 10 μg, N30: neomycin 30 μg, Te30: tetracycline 30 μg.
*: mm

V-8-M-1의 무세포 추출액을 황산스트렙토마이신 침전, 25~50% 황산 암모니움 침전과정후 투석시켜 ultrafiltration시켜 농축한 액을 DEAE-Cellulose에 흡착시킨 후 0~1.0 M NaCl 을 함유한 완충액 A(10 mM potassium phosphate, pH 7.0/1 mM β-mercaptoethanol/0.5 mM EDTA)로 4 ml씩 분획하여 시간당 15 ml의 유속으로 용출시킨 결과 0.6 M~0.8 M의 범위에서 페녹사지논 합성 효소가 용출되었다 (Fig. 2). 효소 활성이 있는 분획을 모아 농축한 후에 완충액 A에 대하여 투석시킨 다음 Sephadex G-200을 사용하여 시간당 8 ml의 유속으로 3 ml씩 용출시켰으며 (Fig. 3) 다시 활성 분획을 ultrafiltration으로 농축한 후에 SDS-PAGE를 실행하여 효소의 단일 band를

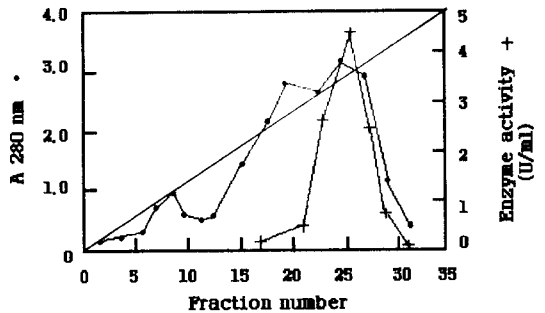


Fig. 2 — Chromatogram of the *Streptomyces* sp. V-8-M-1 phenoxazinone synthase on DEAE-cellulose.

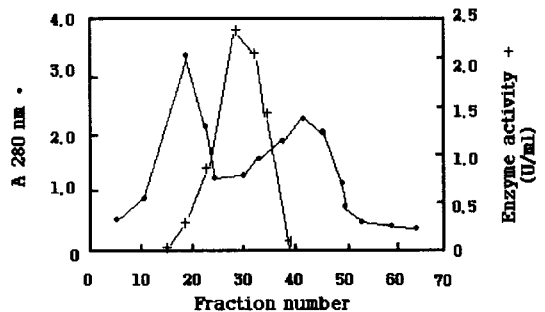


Fig. 3 — Gel filtration of the *Streptomyces* sp. V-8-M-1 phenoxazinone synthase on Sephadex G-200.

확인하였다. 최종 수율은 137%였으며 정제 배수는 57%였다 (Table II).

분자량 측정 — 변성되지 않은 페녹사지논 합성 효소

Table II— Summary of purification of the phenoxazinone synthase from *Streptomyces* sp. V-8-M-1

Steps	Volume (ml)	Total Protein (mg)	Total activity (units)	Specific activity	Recovery (%)	Purification (fold)
Crude extract	30	360	162	0.45	100	—
Streptomycin sulfate	52	290	194	0.67	119	1.5
Ammonium sulfate	13	100	243	2.43	150	5.4
DEAE-sepharose	5	16.9	232	13.7	143	30.4
Sephadex-G-200	3	8.67	222	25.6	137	56.8

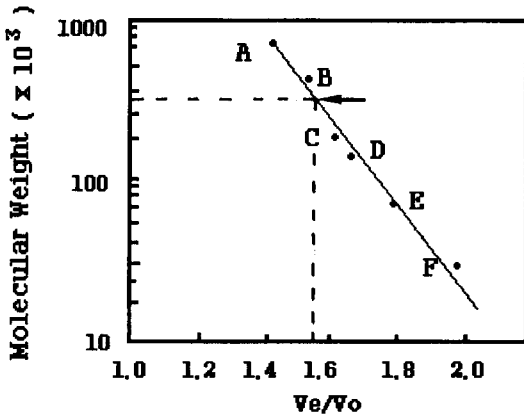


Fig. 4— Native molecular weight determination of phenoxazinone synthase by Sepharose 6-B gel filtration. Molecular standards were A: bovine thyroglobulin (669,000 dalton), B: horse spleen apoferritin (443,000 dalton), C: sweet potato β -amylase (200,000 dalton), D: yeast alcohol dehydrogenase (150,000 dalton), E: bovine serum albumin (66,000 dalton), F: carbonic anhydrase (29,000 dalton).

의 분자량을 Sepharose 6-B column chromatography를 이용하여 측정한 결과, 약 360 kDa인 것으로 나타났으며(Fig. 4), SDS-PAGE를 통해 분자량을 측정한 결과 약 45 kDa(Fig. 5)으로 8개의 동일한 subunit로 구성된 팔량체(octamer)인 것으로 추정되었다. *S. antibioticus*의 페록사지는 합성 효소의 경우에는 88 kDa의 소단위체로 구성된 175 kDa, 530 kDa의 분자량을 가진 것으로 악티노마이신을 생산하지 않는 초기에는 175 kDa의 작은 효소로 존재하나 악티노마이신을 생산하는 후반부에는 530 kDa의 큰 효소의 형태로 존재하는 것으로 보고되었다.¹⁴⁾ 175 kDa의 작은 형태의 효소는 효소 활성이 낮고 530 kDa의 큰 형태의 효소는 활성이 높은 것으로 보고되었으며, 작은 형태의 효소가 어떠한 역할을 하는지는 아직 밝혀지지 않고 있다. 본 효소의 경우 성장 초기에는 효소활성이 나타나지 않았으며 지수기 중반부터 나타나 *S. antibioticus*와는 다른 양상을 보였다.

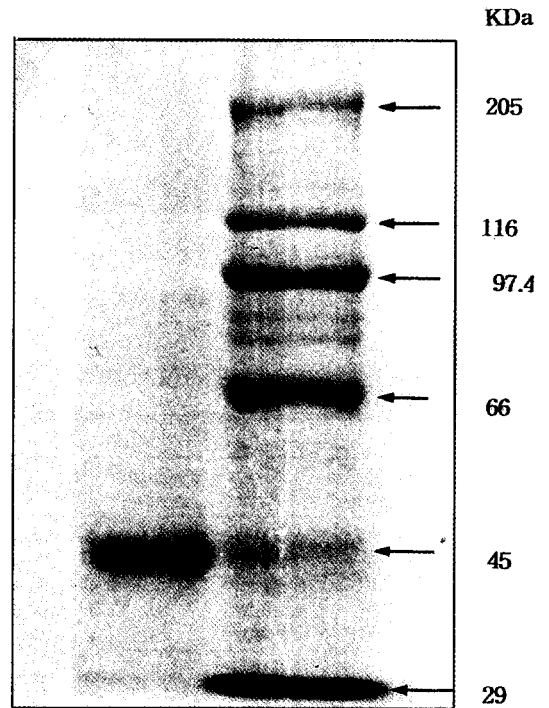


Fig. 5— SDS-PAGE of the *Streptomyces* sp. V-8-M-1 phenoxazinone synthase.

A: Purified phenoxazinone synthase, B: Molecular weight marker

효소의 특성

Km값과 Vmax 값의 결정— Lineweaver-Burk plot(Fig. 6)에 의해 페록사지는 합성 효소에 대한 Km값을 계산해본 결과 14.9 μ M로, Vmax는 9.5 U/mg protein으로 나타났다. 보고된 페록사지는 합성 효소에 대한 Km값과 Vmax값으로는 *Streptomyces antibioticus*의 경우 *o*-aminophenol에 대해 26 μ M과 11.1 μ mol/mg \cdot min 이었다.²⁰⁾

기질 특이성— 분리된 효소의 기질 특이성을 조사해본 결과 넓은 기질 특이성을 갖는 것으로 나타났다. *Streptomyces antibioticus*의 phenoxazinone syntha-

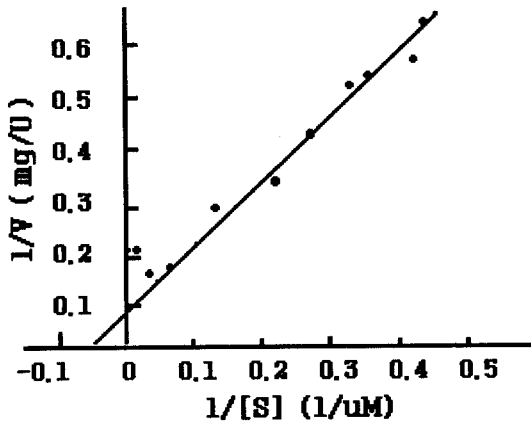


Fig. 6 — Lineweaver-Burk plot of the *Streptomyces* sp. V-8-M-1 phenoxazinone synthase.

se의 경우 치환된 2-aminophenol을 상응하는 2-aminophenoxazinone으로 변화시키는 것으로 알려져 있으며, V-8-M-1에서 분리한 본 효소의 경우 기질로 사용한 *o*-aminophenol, 3-hydroxyanthranilic acid,³¹⁾ 3-hydroxy-DL-kynurenine등이 모두 유사한 효소 활성을 나타내었다. 3-HAA는 human hemoglobin에 의해 cinnabarinic acid와 같은 phenoxazinone으로 변화되는 것으로 보고되었다. 또한 *o*-aminophenol은 human hemoglobin에 의해 2-aminophenoxazinone-3-one로 변화되었으며 phenoxazinone은 곤충의 ommochrome이라 불리는 색소, actinomycin과 어떤 mold의 대사물등에서 중간체로 *o*-quinoneimine을 형성한 후에 생성되는 것으로 알려져 있다. *o*-aminophenol로부터 화학적인 방법에 의해 phenoxazinone생성을 할 수 있는 것으로 보고되었으나 methyl 기를 가진 *o*-aminophenol로부터 phenoxazinone생성을 하는 것은 화학적인 방법이나 생물학적 방법 모두 거의 보고된 바가 없었으나 최근에 human hemoglobin에 의해 2-amino-5-methylphenol의 산화적 축합이 보고되었다.²⁷⁾

pH 및 온도 - pH를 달리하여 효소 활성 정도를 조사한 결과 pH 9.0에서 효소가 최대의 활성을 보였으며, pH 7.0-10 범위에서 비교적 안정하였다. 효소는 25~30°C에서 높은 활성을 보였으며 50°C이상에서는 활성이 급격히 감소하였다.

금속 이온 - 효소를 1 mM의 금속 이온으로 처리한 후 효소 활성을 조사한 결과 Mn²⁺, Co²⁺와 Cu²⁺에 의해 효소 활성이 증가되었으며, Fe²⁺에 의해 효소 활성

Table III — Effect of metal ions on the phenoxazinone synthase from *Streptomyces* sp. V-8-M-1

Metal*	Relative activity (%)
None	100
Co ²⁺	230
Mn ²⁺	260
Ni ²⁺	110
Zn ²⁺	120
Mg ²⁺	97
Fe ²⁺	62
Cu ²⁺	300
Ca ²⁺	97

* Metal ions were used as chloride salts except for Fe²⁺(sulfate) and Cu²⁺(sulfate). Concentration of metal ions : 1.0 mM.

이 억제되었다(Table III). *Streptomyces antibioticus*의 폐녹사지는 합성효소의 경우 효소의 단일체당 4~5개의 구리 원자가 필요한 것으로 보고되었으며,^{30,31)} 그 이상의 구리양에서는 효소 활성이 억제되는 것으로 나타났으나 그이유는 밝혀져 있지 않다. 또한 3개의 기능성 구리를 함유하고 있으며 하나는 기질에서 전자를 받아들이는 역할을 하나 나머지 2개의 기능은 아직 밝혀지지 않은 것으로 보고되었다. 본 효소의 경우 구리에 의해 효소 활성이 증가되는 것으로 나타났으며 10 mM이상의 농도에서도 억제 효과는 나타나지 않았다.

각종 modifier에 의한 효소 활성의 수식 효과 - 정제 phenoxazinone synthase에 12종의 특정 modifier를 작용시켜 효소 활성에 미치는 modifier의 효과를 조사하여 효소 활성에 관련된 아미노산 잔기의 종류를 알아보았다. Table IV에 표시되어 있는 바와 같이 본 효소는 Phenylglyoxal, σ -Hydroxymercury-benzoate, N-Bromosuccinimide, 5,5'-dithiobis-nitrobenzoic acid와 N-ethylmaleimide등 5 종의 modifier에 의해서만 효소 활성이 저해되었을 뿐 다른 modifier에 의해서는 전혀 영향을 받지 않았다. N-Bromosuccinimide는 cysteine뿐만 아니라 tryptophan이나 tyrosine에도 작용할 수 있는 modifier로 알려져 있는데 본 효소의 활성이 tryptophan과 tyrosine에 특이적으로 작용하는 2-Hydroxy-5-nitro-benzylbromide와 N-Acetylimidazole에 의해서는 전혀 활성에 영향을 받지 않는 것으로 보아 N-Bromosuccinimide의 저해 효과는 cysteine잔기의 수식에서 비롯됨을 알 수 있다. 이상의 결과를 종합하여 보면 cysteine과 arginine잔기가 본 효소의 활성에 중요한 역할을 하는 필수 아미노산 잔기라는 결론을 얻을 수 있다.

Table IV— Effects of chemical modifiers on the phenoxazinone synthase from *Streptomyces* sp. V-8-M-1

Chemicals	Target amino acid	Inhibitor concentration (mM)	Residual activity (%)
None			100
Diethyl pyrocarbonate	His	10	100
N-Acetylimidazole	Tyr	10	100
Phenylmethyl-sulfonyl fluoride	Ser	5	133
Phenylglyoxal	Arg	5	19
N-Bromosuccinimide	Trp, Cys, Tyr	1	10
Chloramine T	Met	5	100
2-Hydroxy-5-nitro-benzyl bromide	Trp	5	100
p-Hydroxymercury-benzoate	Cys	0.5	5
5,5'-dithiobis-nitro benzoic acid	Cys	0.5	3
N-ethylmaleimide	Cys	10	7
Woodward's Reagent K	Asp, Glu	10	100
Iodine	Tyr	10	100

Table V— Effect of reducing agents on the phenoxazinone synthase from *Streptomyces* sp. V-8-M-1

Reducing agent (10 mM)	Residual activity (%)
None	100
Cysteine	98
Sodium thiosulfate	92
Sodium thiosulfite	90

Each reducing agent was incubated with 5 μ l of the enzyme solution for 30 min. and then assayed for the residual activity.

효소 활성에 미치는 환원제의 영향 - 효소 용액에 각종 환원제를 첨가하여 30분간 반응시킨 후 잔여 효소 활성을 측정하여 효소에 미치는 환원제의 영향을 알아보았다. Table V에서 보는 바와같이 cysteine, sodium thiosulfate, sodium sulfite, sodium citrate 등 같은 환원제에 의해서는 효소 활성이 영향을 받지 않는 것으로 나타났다. 그러므로 cysteine에 특이적으로 작용하여 현저한 효소 불활성화 효과를 보였던 PHMB 및 N-ethylmaleimide 등의 modifier의 저해 효과는 disulfide bond 절단에 기인한 것이라기 보다는 cysteine 잔기 그 자체를 수식함으로써 효소 활성에 영향을 초래하는 것임을 반증해 주고 있다.

결 론

Adenosine deaminase 억제제를 생산하는 균주를 screening하는 과정에서 *Streptomyces* sp. V-8을 선별하여 억제제를 분리하여 구조를 조사한 결과 actinomycin임을 전보에 보고하였다. 이 actinomycin의 생산 속

도를 결정하는 단계에 관여하는 페녹사진은 합성효소를 *Streptomyces* sp. V-8의 NTG처리로 얻은 변이주 V-8-M-1의 무세포 추출액으로부터 황산 스트렙토마이신, 황산 암모니움 침전, DEAE-cellulose, Sephadex G-200 column chromatography를 이용하여 분리, 정제하였다. 최적 pH와 온도는 9.0와 25~30°C로 나타났으며 3-HAA에 대한 Km치와 Vmax는 14.9 μ M과 9.5 mg/U였다. 정제된 효소의 분자량은 45 KDa 단위체가 8개 모인 팔량체로 360 KDa 이고 효소의 활성 부위에는 arginine과 cysteine이 존재하고 구리, 코발트와 망간에 의해 활성이 증가되었다.

문 헌

- 1) Lofters, W. : M. Campell, W. N. Gibbs and B. D. Cheson : Deoxycoformycin Therapy in Adult T-Cell Leukemia. *Lymphoma. Cancer*, **60**, 2605 (1987).
- 2) Plunkett, W. and Cohen, S. S. : Two approaches that Increase the Activity of Analogs of Adenosine Nucleotides in Animal cells. *Cancer. Res.* **35**, 1547 (1975).
- 3) Glazer, R. I. and Knode, M. C. : Neoplanocin, A cyclopentenyl Analog of Adenosine with Specificity for Inhibiting RNA methylation. *J. Biol. Chem.* **259**(21), 12964 (1984).
- 4) Conner, J. D., L. Sweetman, S. Carey, M. A. Stuckey and R. Buchanan : Effect of Adenosine Deaminase upon the Antiviral Activity. In vitro of Adenosine Arabinoside for Vaccinia virus. *Ant-*

- timicrob. Agents. Chemother.*, **6**, 630 (1974).
- 5) Agarwal, R. P. : Tight binding inhibitor, IV. Inhibition of adenosine deaminase by various inhibitors. *Biochem. Pharm.*, **26**, 359 (1977).
 - 6) Tanaka, H. and Omura, S. : New adenosine deaminase inhibitors, adechlorin and adecypenol. In Novel microbial products for medicine and agriculture. Demain, A.L., Somkuti, G. A. and Rossmore, H. W. ed., SIM. 67 (1989).
 - 7) Omura, S., Imamura, N., Kuga, H. and Ishikawa, H. : Adechlorine, a new adenosine deaminase inhibitor containing chlorine : Production, Isolation and Properties. *J. Antibiot.*, **38**, 1008 (1985).
 - 8) 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 : Phase I Study of 2'-Deoxycoformycin in Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancer Res.*, **41**, 3343 (1981).
 - 9) Cha, S., Agarwal, R. P. and Parks, R. E. : Tight-binding Inhibitors, II., Non-steady state of inhibition of milk Xanthine oxidase by allopurinol and alloxanthine and of human erythrocyte adenosine deaminase by coformycin. *Biochem. Pharm.*, **24**, 2187 (1975).
 - 10) Hanvey, J. C., Hardman, J. K., Suhadolnik, R. J. and Baker, D. C. : Evidence for the conversion of adenosine to 2'-deoxycoformycin by *Streptomyces antibioticus*. *Biochemistry*, **23**, 904 (1984).
 - 11) 김경자, 박귀례 : 세포외 adenosine deaminase inhibitor를 생산하는 방선균의 분리 및 특성. 약학회지, **38**, 274 (1994).
 - 12) 김경자, 조성진 : Actinomycin에 의한 adenosine deaminase의 억제 : 약학회지, **24**, 380 (1996).
 - 13) Williams, W. K. and Katz, E. : Development of a chemically defined medium for the synthesis of actinomycin D by *Streptomyces parvulus*. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, **11**, 281 (1977).
 - 14) George, H. J. : Regulation of phenoxazinone synthase expression in *Streptomyces antibioticus*. *J. Bacteriol.*, **163**, 1215 (1985).
 - 15) Freeman, J. C., Nayar, P.G., Begley, T. P. and Villafranca, J. J. : Stoichiometry and spectroscopic identification of copper in phenoxazinone synthase : A new addition to blue copper oxidase family. *Biochemistry* **32**, 4826 (1993).
 - 16) George, H. J. and Hopwood. : Molecular cloning and expression of the phenoxazinone synthase gene from *Streptomyces antibioticus*. *J. Biol. Chem.*, **259**, 14151 (1984).
 - 17) Stindle, A. and Keller, U. : The initiation of peptide formation in the biosynthesis of actinomycin. *J. Biol. Chem.*, **268**, 10612 (1993).
 - 18) Kartz, E., Wise, M. and Weissbach, H. : Actinomycin biosynthesis. *J. Biol. Chem.*, **240**, 3071 (1965).
 - 19) Keller, U. Kleinkauf, H. and Zocher, R. : 4-Methyl-3-hydroxyanthranilic acid activating enzyme from actinomycin producing *Streptomyces chrysomallus*. *Biochemistry* **23**, 1479 (1984).
 - 20) Barry, C. E., Nayer, P. G. and Begley, T. P. : Phenoxazinone synthase : Mechanism for the formation of the phenoxazinone chromophore of actinocin. *Biochemistry*, **28**, 6323 (1989).
 - 21) George, H. J. and Weissbach, H. : RNA metabolism in *Streptomyces antibioticus* : Effect of 5-Fluorouracil on the appearance of phenoxazinone synthase. *Arch. Biochem. Biophys.*, **137**, 558 (1970).
 - 22) Hsieh, C.-J. and George, H. J. : Nucleotide sequence, transcriptional analysis, and glucose regulation of the phenoxazinone synthase gene from *Streptomyces antibioticus*. *J. Bacteriol.*, **177**, 5740 (1995).
 - 23) Gallo, M. and Katz, E. : Regulation of secondary metabolite biosynthesis : Catabolic repression of phenoxazinone synthase and actinomycin formation by glucose. *J. Bacteriol.*, **109**, 659 (1972).
 - 24) Choy, H. A. and George, H. J. : Phenoxazinone synthase from *Streptomyces antibioticus* : Purification of the large and small enzyme forms. *Arch. Biochem. Biophys.*, **211**, 55 (1981).
 - 25) Katz, E. and Weissbach, H. : Biosynthesis of the actinomycin chromophore : Enzymatic conversion of 4-methyl-3-hydroxyanthranilic acid to actinocin. *J. Biol. Chem.*, **237**, 882 (1962).
 - 26) George, H. J. and Hopwood, D. A. : Activation of phenoxazinone synthase expression in *Streptomyces antibioticus*.

- tomyces lividans* by cloned DNA sequences from *Streptomyces antibioticus*. *J. Biol. Chem.*, **259**, 14158 (1984).
- 27) Tomoda, A. Hamashima, H., Arisawa, M. Kikuchi, T. Tezuka, Y. and Koshmura, S. : Phenoxazinone synthesis by human hemoglobin. *Biochim. Biophys. Acta*, **1117**, 306 (1992).
- 28) Troost, T. and Kartz, E. : Phenoxazinone synthesis : Accumulation of a precursor, 4-methyl-3-hydroxyanthranilic acid, by mutant of *Streptomyces parvulus*. *J. Gen. Microbiol.*, **111**, 121 (1978).
- 29) Bradford, J. C. : A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248 (1976).
- 30) George, H. J. : Combined purification of actinomycin synthetase I and 3-hydroxyanthranilic acid 4-methyltransferase from *Streptomyces antibioticus*. *J. Biol. Chem.*, **268**, 6831 (1993).
- 31) Cheiaten, S., Peter, T. and Stocker, R. : Oxidation of 3-hydroxyanthranilic acid to the catalase. *Biochemistry* **31**, 8090 (1992).