

화학적수식에 의한 *Bacillus subtilis* ED 213 Cytidine Deaminase의 활성부위에 관한 연구

박정문 · 박상원 · 서태수¹ · 김 정² · 유대식^{2*}

계명대학교 환경과학과, 미생물학과^{2*}, 대구보건대학 물리치료과¹

Bacillus subtilis ED 213의 cytidine deaminase의 활성부위에 존재하는 필수 아미노산잔기를 화학수식 방법으로 측정하였다. 본 효소는 1 mM *o*-phenanthroline에 의하여 효소활성이 43% 저해되어 효소활성 발현에 Fe²⁺가 요구된다고 추정되며, 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid에 의해서는 효소활성이 오히려 28%정도 촉진되었다. 본 효소는 1 mM *N*-bromosuccinimide, 1 mM chloramine-T와 1 mM *p*-chloromercuribenzoic acid(*p*-CMB)에 의하여 100% 저해되었으며, 그의 저해 양상은 경쟁적 저해 양상을 나타내었다. 본 효소의 효소활성은 1 mM pyridoxal-5'-phosphate에 의하여 36% 저해되었으며, 1 mM 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide와 1 mM glycine methylester에 의하여 효소활성이 31% 저해되었다. 본 효소활성은 1 μM *p*-CMB에 의하여 68% 저해되었으며, 1 μM *p*-CMB에 의해 저해된 효소활성이 5 mM cysteine에 의해 완전히 회복되었다. 이상의 결과로부터 *Bacillus subtilis* ED 213 cytidine deaminase의 활성부위에는 tyrosine, methionine, cysteine과 serine잔기가 관여할 뿐만 아니라 lysine과 glycine도 효소활성에 관여하는 것으로 추정된다.

KEY WORDS □ *Bacillus subtilis* ED 213, chemical modification, cytidine deaminase

일반적으로 미생물 세포내에 purine 및 pyrimidine염기들은 nucleoside형태 보다 nucleotide형태로 존재(17)하므로 nucleotide인 cytidine monophosphate의 분해대사계의 중간산물 nucleoside인 cytidine은 cytidine deaminase에 의하여 uridine으로 분해되어 nucleoside hydrolase, 혹은 nucleoside phosphorylase에 의하여 uracil로 쉽게 분해되므로 세포내의 nucleoside의 농도는 매우 낮게 유지된다. cytidine은 cytidine deaminase (CDDase)에 의하여 촉매반응되기도 하지만 nucleoside hydrolase에 의하여 cytosine과 D-ribose로 분해되기도 한다.

Cytosine을 탈아미노화시키는 cytosine deaminase는 하등 미생물에만 존재하고, 고등 미생물과 동물에는 존재하지 않기 때문에 cytidine으로부터 생성된 cytosine은 세포외로 배설된다(22)

대부분의 생물계에서 cytidine은 nucleoside hydrolase의 촉매보다 cytidine deaminase의 촉매로 uracil로 분해된다. 더우기 cytidine은 pyrimidine염기의 nucleotide에로의 Salvage 생합성 대사계의 중간대사물질로서 pyrimidine nucleotide의 생합성과 분해대사계의 중요한 물질이다.

Cytidine deaminase(cytidine/deoxycytidine aminohydrolase, EC 3. 5. 4. 5)는 cytidine과 deoxycytidine을 uridine과 deoxyuridine으로 탈아미노화시키는 비가역적인 가수분해 효소이며(18), 동물이나 미생물에 널리 분포되어 있다.

미생물 기원 CDDase는 *Escherichia coli*에서 처음으로 발견되었으며(27), 대부분의 미생물에 존재하나(22), *Pseudomonas acidovorans*와 *Neisseria meningitidis*는 이 효소가 결손되어 있다(16).

*Bacillus subtilis*의 경우 cytosine deaminase가 결손되어 있든지, cytoplasmic membrane을 통한 cytosine의 수송계가 결손되어 있으며(16), 정상세포에서 CDDase활성은 상대적으로 매우 약하므로 효소학적 연구가 거의 이루어지지 않은 상태이다.

*E. coli*와 *Salmonella typhimurium*의 CDDase는 cytidine에 의해 유도 합성되나, *E. coli*의 CDDase결손 변이주들은 cytidine을 질소원으로 이용하지 못하며 fluorodeoxycytidine에 내성을 나타내고 fluorocytidine에는 감수성을 나타낸다. *B. subtilis*의 효소는 cytidine에 의하여 유도 합성되나(26), fluorocytidine에 내성을 나타내므로 *B. subtilis*, *E. coli*와 *S. typhimurium*의 CDDase의 효소학적 특성이 매우 다르다고 보고되었다(16).

그리고 암세포에서의 CDDase의 활성은 정상세포의 효소활성에 비하여 현저히 증가하며(15), 항종양제인 1-β-D-arabinofuranosylcytosine을 정맥에 투여하면 간의 CDDase의 효소활성은 현저히 저해된다(14, 19). 더우기 5-iodo-2-deoxycytidine (5)과 2-fluoro-5-iodo-1-β-arabinofuranosylcytosine(4)에 의해서도 CDDase의 활성이 저해된다. Cytidine유도체인 5-azacytidine은 백혈병 항종양제로서 백혈병 치료에 이용되며, 3-deazauridine이나 thymidine을 병용사용하면 CDDase활성을 현저히 저하시켜 5-azacytidine의 항백혈성 효과가 증대된다(1, 2).

이상과 같은 특성을 나타내는 CDDase는 주로 동물기원 효소에 집중되어 연구되었으며, 미생물기원 효소에 관한 연구는 거의 없는 실정이다.

최근 *E. coli*의 CDDase가 전기영동적으로 단일 효소 단백질로 정제되어 효소학적 특성이 규명되었으나(17), *B. subtilis* CDDase의 효소학적 특성은 규명되지 않았다. 그러나 본인 등(20)에 의하여 *B. subtilis* ED 213의 CDDase가 정제되고 약간의 효소학적 특성이 규명되었다.

*To whom correspondence should be addressed
Tel : 82-053-580-5252, Fax : 82-053-580-5164
E-mail : tsyu@kmacc.keimyung.ac.kr

본 연구는 *B. subtilis* ED 213의 CDDase의 활성부위에 관여하는 아미노산잔기가 밝혀져 있지 않으므로 화학수식 방법으로 활성부위의 아미노산잔기를 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

실험균주

본 실험에 사용된 균주 및 plasmid는 경북대학교 생물교육학과 미생물 연구실로부터 분양받아 사용했다.

B. subtilis ED 213은 Song과 Neubard(23)에 의해서 *B. subtilis* ED 40을 숙주세포로 plasmid pSO100으로 형질전환 시킨 균주로서, 배지 내에 cytidine이나 uracil을 첨가하여야만 생육할 수 있다. *B. subtilis* ED 40은 재조합 균주의 숙주세포로 pyrimidine nucleotide의 *de novo* 생합성 대사제의 *pyr-2* gene과 Salvage 대사제의 *cdd-1* gene, 그리고 *lys* gene의 결손변이주이다.

또한 plasmid pSO100은 *B. subtilis* *cdd* gene을 포함하는 pSO21의 *PuvI/EcoRI* 절편을 절단하여 *Bacillus-E. coli* shuttle vector인 PGB215-110ΔB의 *PuvI/EcoRI* site에 결합한 약 9.5 kb의 plasmid이다.

배지 조성

실험균주의 생육을 위하여 20 µg/ml kanamycin을 첨가한 Luria broth(LB액체배지)(1% peptone, 0.5% 효모추출액, 0.5% 식염)를 사용하였다. Spizien minimal medium(SMM배지)(1.4% K₂HPO₄, 0.6% KH₂PO₄, 0.2% (NH₄)₂SO₄, 0.1% Na-citrate, 0.02% MgSO₄ · 7H₂O, 0.00002% MnSO₄ · 4H₂O, 0.5% 포도당)은 실험균주의 보존에 사용했으며, 실험균주의 배양에는 SMM배지에 50 µg/ml lysine, 2% casamino acid와 20 µg/ml cytidine, 20 µg/ml kanamycin을 첨가하여 사용하였다. 포자형성배지(0.8% Nutrient broth, 0.025% MgSO₄ · 7H₂O, 0.1% KCl, 0.1% 0.5 M Ca(NO₃)₂, 0.01% 0.1 M MnCl₂, 0.1% 1 mM FeSO₄, 1.7% Agar, pH 7.0)는 2 µg/ml cytidine과 20 µg/ml kanamycin을 첨가하여 사용하였다.

조효소액의 조제

L-자형 시험관에서 LB액체배지 10 ml에 30 °C에서 15-18시간 진탕배양한 종배양액을 2%되게 100 ml의 최소배지에 접종하여 24시간 진탕배양한 후, 9,000 rpm(Kontron, A8.24 rotor)으로 10분간 원심분리하여 집균하였다.

집균된 균체는 생리식염수로 2회 세척한 후, 5 mM mercaptoethanol을 함유한 50 mM 인산완충액(pH 7.0)에 균체를 현탁시켜 10 °C이하에서 120 Hz로 초음파 파쇄기(Lab-line Co. USA)로 파쇄시켰다. 세포 파쇄시 파쇄시간은 균체농도에 따라 조정하였으며, 현미경하에서 완전히 세포가 파쇄될 때까지 파쇄하였다. 파쇄된 균체는 9,000 rpm으로 20분간 원심분리하여 상등액을 조효소액으로 사용하였다.

효소의 정제

실험에 사용한 CDDase는 Park 등(20)의 방법에 따라 정제했다.

조효소액을 유안침전(40-75%), DEAE-cellulose column chromatography, Sephadex G-100 column chromatography, DEAE-Sephadex A-50 column chromatography와 Phenyl-Sepharose CL-4B column chromatography에 의하여 정제하여 사용했다.

Cytidine deaminase의 활성 측정

CDDase의 활성은 Hammer-Jespersen 등(7)의 방법에 준하여 측정하였다. 희석한 조효소액 혹은 정제된 효소액 100 µl에 0.2 M MgCl₂가 함유된 50 mM Tris-HCl 완충액(pH 7.0) 250 µl를 혼합하여 37 °C에서 2분간 전처리했다. 전처리된 효소액에 기질인 50 mM cytidine을 10 µl 넣어 2, 4, 6분 간격으로 반응시켰다. 효소 반응액 100 µl를 취하여 0.5 N perchloric acid 900 µl에 혼합하여 반응을 정지시킨 다음, UV-spectrophotometer(Shimadzu Co., UV 120-02)로 290 nm 흡광도 감소로 계산하였다. 효소활성 단위는 37 °C에서 1분간 1 nmole의 cytidine을 uridine으로 전환시키는데 필요한 효소량을 1 unit로 정의하였다.

효소활성 측정과 효소활성에 미치는 재인자에 관한 실험은 3반복한 평균값(unit)을 상대값으로 나타내었다.

화학수식제에 의한 효소의 화학수식

B. subtilis ED 213의 CDDase의 아미노산잔기의 화학수식은 Lundblad와 Noyes의 방법(12)에 따라 행했다. 즉, 효소 단백질의 아미노산잔기를 수식하기 위하여 정제된 CDDase를 1 mM cytidine을 함유한 50 mM Tris-HCl 완충액과 혼합한 효소반응액에 1 mM되게 화학수식제를 첨가하여 37 °C에서 5분간 반응시켰다. 그 반응을 정지시킨 후, 잔존 효소활성을 화학수식제를 첨가하지 않은 효소반응의 효소활성과 비교하여 측정했다.

N-Bromosuccinimide(NBS)에 의한 tryptophan잔기의 산화는 Spande와 Witkop(24)의 방법과 Kronman 등(8)의 방법에 따라 화학수식 했다. 특별히 NBS와 phenylglyoxal로 화학수식할 때에는 광분해를 방지하기 위하여 암실에서 효소반응시켰다.

환원제에 의한 효소활성의 회복

p-CMB에 의해 실활된 실험균주의 CDDase에 dithiothreitol, 2-mercaptoethanol과 cysteine과 같은 환원제를 첨가하여 효소활성을 측정하므로 저해된 효소활성이 어느정도 회복되는지를 검토했다. p-CMB와 환원제를 첨가하지 않은 효소반응액과 p-CMB와 환원제를 첨가한 효소반응액의 효소활성을 비교하여 측정했다.

생육도

SMM배지 10 ml를 L-자형 시험관에서 30 °C에서 15-18시간 배양한 *B. subtilis* ED 213의 종배양액 2%를 100 ml 최소배지에 접종하여 30 °C에서 진탕 배양하면서 경시적으로 배양액을 채취하여 660 nm에서 흡광도를 측정하였다.

단백질 정량

Lowry 등(11)의 방법에 준하여 측정하였으며, 표준 단백질로는 bovine serum albumin(Sigma Co., USA)을 사용하였다.

Table 1. Effects of inhibitors on the cytidine deaminase activity

Inhibitors (1 mM)	Relative activity (%)
EDTA ^a	128
Monoiodoacetate	100
α, α' -Dipyridyl	71
<i>o</i> -Phenanthroline	57
Trichloroacetate	71
Sodium azide	64
Sodium cyanide	64
Sodium fluoride	71
None	100

The enzyme activity was assayed under standard reaction conditions in the presence of inhibitors at indicated concentrations. ^aEDTA, ethylenediaminetetraacetic acid.

그리고 정제 과정중의 단백질량은 흡광도 280 nm에서 측정하였다.

결과 및 고찰

효소활성에 미치는 저해제의 영향

일반적으로 효소활성의 저해제로 알려진 물질들에 대한 본 CDDase의 효소활성에 미치는 영향을 검토하기 위하여 저해제의 최종농도가 1.0 mM되게 효소액에 첨가하여 효소활성을 측정할 결과를 Table 1에 제시하였다.

본 효소는 1 mM *o*-phenanthroline에 의하여 효소활성이 43% 저해되었으며, 1 mM sodium azide와 sodium cyanide에 의하여 효소활성이 약 36% 저해되었으며, 1 mM α, α' -dipyridyl, trichloroacetate 및 sodium fluoride에 의하여 효소활성이 29% 저해되었다. 그러나 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid(EDTA)에 의해서 오히려 효소활성이 28% 촉진되었다. 반면에 *S. typhimurium* CDDase(9)는 1 mM EDTA에 의하여 아무런 영향을 받지 않지만 *B. stearothermophilus* CDDase(3)는 1 mM EDTA에 의하여 효소활성이 26% 저해되어 미생물기원에 따라 효소활성에 미치는 EDTA의 영향은 다르게 나타났다. 또한 동물 기원인 쥐 비장의 CDDase(13)는 1 mM EDTA에 의해 효소활성이 183% 증대되어 실험균주의 CDDase의 특성과 유사한 것으로 추정된다. 그리고 *E. coli* cytosine deaminase는 금속이온, 특히 Fe^{2+} 의 킬레이터제인 *o*-phenanthroline에 의해 저해되어 효소활성 발현에 필수금속이온으로 Fe^{2+} 가 요구되며(21) 실험균주의 CDDase의 활성도 *o*-phenanthroline에 의해 저해되므로 Fe^{2+} 가 효소활성 발현에 깊이 관여한다고 추정할 수 있다.

화학수식제에 의한 효소활성 변화

Bacillus subtilis ED 213이 생성하는 CDDase의 활성 부위에 관여하는 아미노산잔기를 규명하기 위하여 화학수식의 방법으로 검토하였다.

효소 단백질의 구조는 변화하지 않고 특이적으로 아미노산 잔기에만 반응하는 화학수식시약에 의하여 효소활성 부위의 아미노산잔기를 화학수식하여 효소활성을 측정함으로써 본 CDDase의 활성 부위에 관여하는 아미노산잔기를 규명하고자

Table 2. Effects of several modifiers on the cytidine deaminase activity

Chemical modifiers (1 mM)	Relative activity (%)
1,2-Cyclohexanedione	135
Phenylglyoxal	100
Glyoxal	104
PMSF ^a	31
Hydroxylamine	114
<i>N</i> -Bromosuccinimide	0
Iodine	0
Acetylimidazole	58
Pyridoxal-5-phosphate	64
Diethylpyrocarbonate	82
Chloramine-T	0
Ethylacetimidate	114
EDC ^b +glycine methyl ester	69
ρ -CMB ^c	0
None	100

The cytidine deaminase activity was assayed under standard reaction conditions in the presence of several modifiers at indicated concentrations and expressed the relative activity to that of the none ^aPMSF, phenylmethylsulfonyl fluoride. ^bEDC, 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide. ^c ρ -CMB, ρ -chloromercuribenzoic acid.

했다. 1 mM cytidine을 기질로 하여 화학수식시약을 각각 1 mM 되게 첨가하여 반응시켜 효소활성을 측정하였다.

Table 2에 나타난 바와 같이, tyrosine의 phenol기를 산화시켜 효소활성을 저해하는 *N*-bromosuccinimide(NBS), methionine을 산화시켜 효소활성을 저해하는 chloramine-T와 cysteine의 -SH기에 관여하는 ρ -chloromercuribenzoic acid(ρ -CMB)와 iodine에 의해 본 효소는 완전히 저해되었으며, serine의 -OH기에 특이적으로 반응하는 phenylmethylsulfonyl fluoride(PMSF)에 의하여 효소활성은 약 69% 저해되었다.

이상의 결과로 본 효소의 활성 부위는 극성이며, 전하를 띠지 않는 tyrosine, methionine, cysteine과 serine잔기가 깊이 관여한다고 추정할 수 있다. 그리고 lysine에 특이적으로 반응하는 pyridoxal-5-phosphate는 효소활성을 약 36% 저해하였으며, glycine잔기에 특이적으로 반응하는 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide(EDC)와 glycine methyl ester는 본 효소활성을 31% 저해시켜, 본 효소의 활성 부위에는 염기성 아미노산인 lysine이 효소활성에 관여하며 극성이며 전하를 띠지 않는 glycine도 본 효소활성에 관여하는 것으로 사료된다.

Histidine에 특이적으로 반응하는 diethylpyrocarbonate는 효소활성을 약하게 저해하였으며, arginine의 guanidyl기에 작용하는 phenylglyoxal, 1,2-cyclohexanedione와 glyoxal 뿐만 아니라 carboxyl기에 반응하는 hydroxyl amine 등에 의해서는 효소활성에 아무런 영향을 미치지 않았다

화학수식제에 의한 저해 양상

효소의 활성 발현에 관여하는 NBS, chloramine-T와 ρ -CMB들은 본 효소활성을 저해하므로 각 물질들의 농도에 의한 저해양상을 검토하기 위하여 1 mM cytidine을 기질로 하

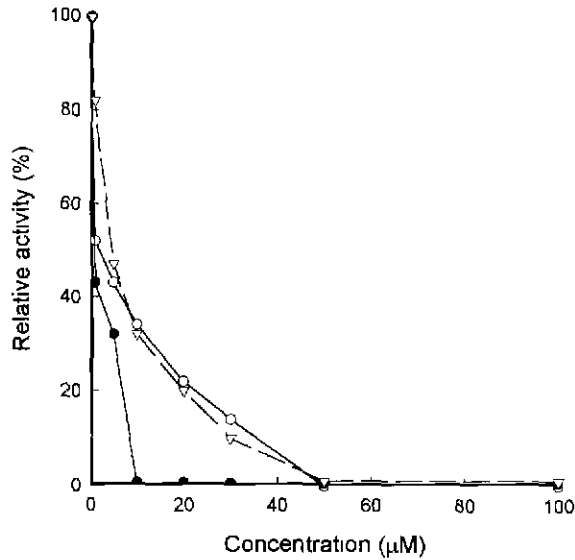


Fig. 1. Effects of chloramine-T, NBS, and p-CMB concentrations on the cytidine deaminase activity. ●, Chloramine-T; ○, NBS; ▽, p-CMB.

여 NBS, chloramine-T와 p-CMB의 농도를 1 μM에서 100 μM까지 조절하여 효소활성을 측정하였다.

Fig. 1에 나타난 바와 같이, NBS와 p-CMB는 50 μM이상의 농도에서, chloramine-T는 10 μM이상의 농도에서 효소활성이 완전히 저해되었으며, 1 μM NBS, 1 μM chloramine-T와 5 μM p-CMB에 의하여 본 CDDase의 활성은 50% 저해되었다. 더우기 NBS 및 chloramine-T의 최종농도를 1 μM로 고정하고, p-CMB는 5 μM로 고정하여 cytidine의 농도를 0.2 mM에서 1 mM까지 조절하여 효소 반응시켜 그 결과를 Lineweaver-Burk(10)의 방법에 따라 plot한 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 본 CDDase는 NBS, chloramine-T와 p-CMB에

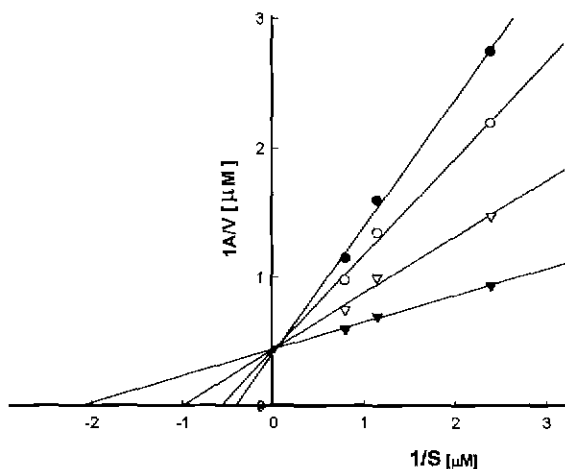


Fig. 2. Inhibitory effects of chloramine-T, NBS, and p-CMB on the cytidine deaminase activity. The enzyme activity was assayed in the presence or in the absence of chloramine-T, NBS, and p-CMB. Velocity(v) was expressed by decrease of absorbance at 290 nm for 5 min at 37 °C ●, 1 μM chloramine-T; ○, 1 μM NBS; ▽, 5 μM p-CMB; ▼, none.

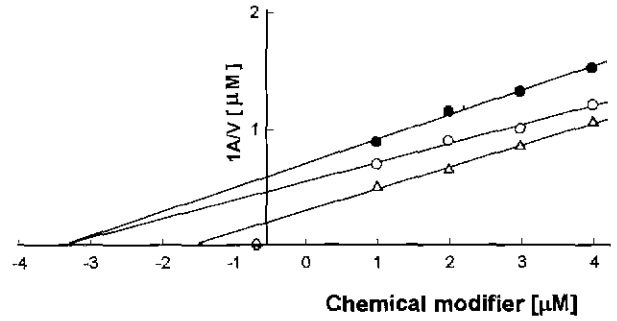


Fig. 3. Graphical determination of inhibition constant of chemical modifiers ●, Chloramine-T; ○, NBS; △, P-CMB.

의하여 최대속도(Vmax)값은 변화되지 않고, cytidine에 대한 Michaelis 상수(Km)값이 변화되므로 본 CDDase활성은 화학수식제에 의하여 경쟁적으로 저해되었다.

본 효소에 대한 저해제들의 저해상수(Ki)를 계산하기 위하여 NBS, chloramine-T와 p-CMB의 농도를 1 μM에서 5 μM까지 조절하여 효소 반응시켜 Dixon과 Webb법(6)에 의해 plot하여 계산했다. 본 효소에 대한 NBS와 chloramine-T의 Ki값은 3.5×10^{-6} M이었으며, p-CMB의 Ki값은 1.4×10^{-6} M이었다(Fig. 3).

환원제에 의한 효소활성의 회복

Table 2에 나타난 바와 같이, -SH기에 특이적으로 반응하는 p-CMB에 의하여 본 효소의 활성이 저해되므로 -SH기 보호제인 thiol 화합물의 첨가에 의하여 효소활성의 저해가 회복되는지를 검토했다. p-CMB에 의해 효소활성이 저해된 본 효소활성을 회복시키기 위하여 환원력이 강한 thiol 화합물인 1 mM dithiothreitol(DTT), 5 mM 2-mercaptoethanol과 5 mM cysteine의 최종농도가 되도록 첨가하여 효소 반응시켜 활성을 측정했다.

Table 3에 나타난 바와 같이, 본 CDDase는 1 μM p-CMB에 의해서 본 효소는 68% 정도 저해되었지만, 5 mM cysteine을 첨가하므로 효소활성이 완전히 회복되었으며, 1 mM DTT와 5 mM 2-mercaptoethanol을 첨가하므로 효소활성이 약 14%와 34% 회복되었다.

*Aspergillus fumigatus*의 cytosine deaminase는 p-CMB에 의해 효소활성이 저해되지만, 5 mM dithiothreitol 첨가에 의

Table 3. Reactivation of the inhibited cytidine deaminase activity with p-CMB by reducing agents

Reducing agent	Relative activity (%)
1 μM p-CMB	32
1 μM p-CMB+ 1 mM dithiothreitol	46
1 μM p-CMB+ 5 mM 2-mercaptoethanol	66
1 μM p-CMB+ 5 mM cysteine	107
None	100

The cytidine deaminase activity was assayed under standard reaction conditions by the addition of reducing agents such as dithiothreitol, 2-mercaptoethanol and cysteine at indicated concentrations, and the results were expressed as relative activity to that of none

하여 저해된 효소활성이 약 90% 회복되었으며, 5 mM cysteine과 glutathione첨가에 의하여 저해된 효소활성이 완전히 회복되는 특성과 비교할 때(25) 본 CDDase의 효소활성의 회복 현상과 유사한 결과를 나타내었다.

이상의 결과들로 *Bacillus subtilis* ED 213이 생성하는 CDDase의 활성발현에 tyrosine, methionine, cysteine과 serine 뿐만 아니라 lysine과 glycine도 깊이 관여한다고 추정할 수 있었다.

참고문헌

1. Chabner, B.A., J. Drake, and D.G. Johns. 1973. Deamination of 5-azacytidine by a human leukemia cell cytidine deaminase. *Biochem. Pharmacol.* **22**, 2763-2765.
2. Chabot, G.G., J. Bouchard, and R.L. Momparler. 1983. Kinetics of deamination of 5-aza-2-deoxycytidine and cytosine arabinoside by human liver cytidine deaminase and its inhibition by 3-deazaauridine, thymine or uracil arabinoside. *Biochem. Pharmacol.* **32**, 1327-1328.
3. Chang, J.S., B.H. Song, J.G. Kim, and S.D. Hong. 1989. Molecular cloning of *Bacillus stearothermophilus* *cdd* gene encoding thermostable cytidine/deoxycytidine deaminase. *Kor J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **17**, 334-342.
4. Cheng, Y.C., R.S. Tan, J.L. Ruth, and G. Dutschman. 1983. Cytotoxicity of 2-fluoro-5-iodo-1- β -arabinofuranosylcytosine and its relationship to deoxycytidine deaminase. *Biochem. Pharmacol.* **32**, 726-729.
5. Creasey, W.A. 1963. Studies on the metabolism of 5-iodo-2-deoxy cytidine *in vitro*. *J. Biol. Chem.* **238**, 1772-1776.
6. Dixon, M. and E.C. Webb. 1975. *Enzymes*, 3rd ed., p. 345, Longman group Ltd., London
7. Hammer-Jespersen, K., A. Munch-Petersen, P. Nygaard, and M. Schwartz. 1971. Induction of enzymes involved in the catabolism of deoxyribonucleosides and ribonucleosides in *Escherichia coli* K-12. *Eur. J. Biochem.* **19**, 533-538.
8. Kronman, M.J., F.M. Bobbins, and R.E. Andreotti. 1967. Reaction of *N*-bromosuccinimide with lysozyme. *Biochim. Biophys. Acta*, **147**, 462-472.
9. Lee, S.M. 1990. Cloning and expression of *cdd* gene encoding cytidine deaminase of *Salmonella typhimurium*. Ph. D. thesis. Kyungpook National University, Taegu.
10. Lineweaver, H. and D. Burk. 1934. The determination of enzyme dissociation constants. *J. Amer. Chem. Soc.* **56**, 658.
11. Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
12. Lundblad, R.L. and L.M. Noyes. 1984. *Chemical Reagents for Protein Modification*. Vol. 1, chapter 6 and Vol. 2, chapter 1, 2, CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida.
13. Malathi, V.G. and R. Sillser. 1971. Effect of murine viral leukemia on spleen nucleoside deaminase. *Biochim. Biophys. Acta.* **238**, 377-387.
14. Mejer, J.N., B.T. Mortensen, and I.J. Christensen. 1990. Modulation of the effect of 1- β -D-arabinofuranosylcytosine based on changes of cytidine deaminase activity in HL-60 cells. *Med Oncol. Tumor. Pharmacother.* **7**, 25-31.
15. Momparler, R.L. and J. Laliberte. 1990. Induction of cytidine deaminase in HL-60 myeloid leukemic cells of 5-aza-2-deoxycytidine. *Leuk. Res.* **14**, 751-756.
16. Neuhard, J. 1983. Metabolism of nucleotides, nucleosides and nucleobases in microorganism. p.95-148. Academic Press, London.
17. Neuhard, J. and P. Nygaard. 1987. Purines and pyrimidines. 1, p. 445-473. In Neuhard, F. C., (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. American Society, for Microbiology, Washington, D. C.
18. O'Donovan, G.A. and J. Neuhard. 1970. Pyrimidine metabolism in microorganism. *Bacteriol. Rev.* **34**, 278-343.
19. Onish, H., P. Pithayanukul, and T. Nagai. 1990. Antitumor characteristics of the conjugate of N4-(4-carboxybutyryl)-ara-C with ethylenediamine-introduced dextran and its resistance to cytidine deaminase. *Drug Des. Deliv.* **6**, 273-277.
20. Park, J.M., T.H. Kim, and T.S. Yu. 1994. Purification and Characteristics of cytidine deaminase from *Bacillus subtilis* ED 213. *Kor. Jour. Microbiol.* **32**, 545-551.
21. Porter, D.J.T. and E.A. Austin. 1993. Cytosine deaminase, The roles of divalent metal ions in catalysis. *J. Biol. Chem.* **268**, 24005-24011.
22. Sakai, T., T.S. Yu, and S. Omata. 1976. Distribution of enzymes related to cytidine degradation in bacteria. *Agric. Biol. Chem.* **40**, 1893-1985.
23. Song, B.H. and J. Neuhard. 1989. Chromosomal location, cloning and nucleotide sequence of the *Bacillus subtilis* *cdd* gene encoding cytidine/deoxycytidine deaminase. *Mol. Gen. Genet.* **216**, 462-468.
24. Spande, T.F. and B. Witkop. 1967. Determination of the tryptophan content of proteins with *N*-bromosuccinimide. *Methods Enzymol.* **11**, 498-506.
25. Yu, T.S., J. Kim, and H.S. Kim. 1998. Chemical modification of cytosine deaminase from *Aspergillus fumigatus*. *J. Microbiol.* **36**, 39-42.
26. Yu, T.S. and J.M. Park. 1996. Induction of cytidine deaminase from recombinant *Bacillus subtilis* ED 213 by cytidine. *J. Inst. Nat. Sci. Keimyung University.* **15**, 243-252.
27. Wang, T.P., H.Z. Sable, and J.O. Lanpen. 1950. Enzymatic deamination of cytosine nucleosides. *J. Biol. Chem.* **184**, 17-28.

(Received February 12, 1999/Accepted June 7, 1999)

ABSTRACT: A study on the Active Site of Cytidine Deaminase from *Bacillus subtilis* ED 213 by Chemical Modification

Jung Moon Park, Sang Won Park, Tae Soo Suh¹, Jung Kim² and Tae Shick Yu^{2*} (Department of Environmental Science, ²Department of Microbiology, Keimyung University, Taegu 704-701, Korea and ¹Department of Physical Therapy, Taegu Health College, Taegu 702-260, Korea)

Essential amino acids involving in the active site of the cytidine deaminase from *Bacillus subtilis* ED 213 were determined by chemical modification studies. The purified cytidine deaminase from *Bacillus subtilis* ED 213 required the reduced form of Fe(II)ion. since the enzyme was inhibited 43% by 1 mM *o*-phenanthroline. Whereas the enzyme activity was activated up to 28% by 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid. The cytidine deaminase activity was completely inhibited by 1 mM *N*-bromosuccinimide, chloramine-T, and *p*-chloromercuribenzoic acid (*p*-CMB), respectively. The enzyme activity was inhibited 36% by 1 mM pyridoxal-5'-phosphate, and 31% by 1 mM 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide and glycine methyl ester. The enzyme activity was strongly inhibited 68% by 1 μ M *p*-CMB and this inhibition of the enzyme activity with 1 μ M *p*-CMB was completely reactivated by 5 mM cysteine as a reducing agent. We speculated that tyrosine, methionine, cysteine and/or serine residues are located in or near the active site of the cytidine deaminase from *Bacillus subtilis* ED 213 and indirectly related to lysine and/or glycine.