

Serratia marcescens Purine Nucleoside Phosphorylase의 생합성에 대한 글리옥실산의 대사적 역할

신종란 · 방선권 · 최병범*

호서대학교 자연과학대학 생명과학과, *신홍대학 식품영양과

Metabolic Role of Glyoxylate on the Biosynthesis of *Serratia marcescens* Purine Nucleoside Phosphorylase

Jong-Ran Shin, Son-Kwon Bang and Byung-Bum Choi*

Dept. of Life Science, College of Natural Science, Hoseo University, Asan 337-795, Korea

*Dept. of Food and Nutrition, Shinheung College, Euijeongbu 480-741, Korea

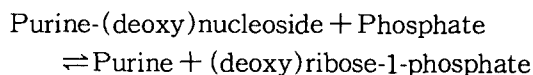
Abstract

The effects of purine catabolites in growth media on the *Serratia marcescens* purine nucleoside phosphorylase activity were examined. The enzyme activity was decreased above 60% by guanosine (5 to 15mM). The enzyme activity was decreased approximately by 30% in the presence of high concentrations of inosine (7~15mM), but was not affected at low concentration of inosine (0.1~1mM). The enzyme activity was decreased approximately by 40~50% in the presence of high concentrations of adenosine, hypoxanthine, and xanthine (5~15mM), but was not affected at low concentration of adenosine, hypoxanthine, and xanthine (0.1~0.5mM). However, the enzyme activity was increased by 20% with low concentrations of uric acid (0.5mM), but was decreased by 80% with high concentrations of same purine catabolite (15mM). Also, the enzyme activity was increased by 20% with low concentrations of glyoxylate (0.5mM), final degradative product of uric acid, but was decreased by 30~50% with high concentrations of glyoxylate (3~15mM). The enzyme activity was decreased approximately by 20% by the simultaneous addition of inosine, hypoxanthine and uric acid at 5mM each, whereas it was increased by 22 and 33% by the combination of inosine and uric acid, three purine catabolites at 0.5 mM, respectively. These data suggest that *S. marcescens* purine nucleoside phosphorylase is positively regulated by a glyoxylate concentration, and then may play a regulatory role in a purine catabolism.

Key words : *Serratia marcescens*, purine nucleoside phosphorylase, biosynthesis, glyoxylate.

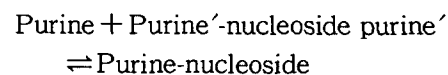
서 론

세균, 포유동물 등에서 광범위하게 발견되는 purine nucleoside phosphorylase (PNP ; EC 2.4.2.1, 퓨린 뉴클레오시드 가인산 분해 효소)는 ortho-phosphate (deoxy)ribosyltransferase라고도 하며, 이노신, 구아노신의 오탄당인 리보오스의 가인산 분해를 촉매하는 효소이다.



Corresponding author : Byung-Bum Choi

또, 한 퓨린염기에서 다른 퓨린염기로 오탄당 부분의 인산기 의존 전달반응을 촉매하기도 한다.



Kalckar(1947)는 쥐의 간 추출물에서 PNP의 활성을 처음으로 발견하였으며 PNP가 쥐의 간 수용성 단백질의 0.2% 정도를 차지한다고 보고하였다¹⁾. PNP는 퓨린 분해대사 과정에서 이노신을 히포크산틴으로, 구아노신을 구아닌으로 전환시켜 요산을 생

산하는데 관여하며 퓨린 뉴클레오시드 합성에도 관여하여 세포내 핵산 수준의 조절에 작용한다. PNP의 결핍이 면역 질환과 연관이 있다는 사실이 알려진 후²⁾ 많은 연구가 진행되고 있다^{3,4)}. PNP 결핍이 B 세포 면역과는 무관한 반면, 심각한 T 세포 면역 결핍을 야기시킨다는 사실이 밝혀져 PNP 억제인자는 면역 질환 치료제로 주목을 끌기 시작하여^{5,6)}, 인체 면역에 전혀 손상을 주지 않고 T 세포의 백혈병 등의 치료제로 사용될 수 있다고 보고되었다^{7~10)}. PNP 억제인자는 임상학적으로 유용한 아데노신 같은 뉴클레오시드 유사체를 발견하는데 많은 노력과 관심이 집중되고 있다. PNP를 다량 생산하는 세균을 찾으면 PNP 억제인자 연구에 많은 도움을 줄 것이다. 최근 아데닌 아라비노시드(araA)와 같은 선택적 항바이러스 치료제의 효소 생산에 대한 PNP 이용이 개발되었는데¹¹⁾ 토양으로부터 탄소와 질소원으로 아데노신을 사용하여 PNP를 생산하는 *Klebsiella* sp. LF1202를 분리하였다. *Klebsiella* PNP는 아데노신, 이노신, 구아노신 등과 같은 퓨린 뉴클레오시드에 기질에 대한 특이성을 가지며 유리된 아라비노시드나 아데닌으로부터 항바이러스 치료제인 아데닌 아라비노시드의 합성을 촉매한다고 보고되었다¹²⁾. PNP는 주로 *Escherichia coli*나 *Salmonella typhimurium* 등의 세균과 사람 적혈구, 소, 돼지, 쥐, 토끼 그리고 Chinese hamster 등의 척추 동물들로부터 정제와 특성이 보고되었다^{13~22)}. PNP는 세균과 척추 동물에 따라 물리적, 화학적, 효소학적 성질이 서로 다른 것으로 보고되었다. PNP는 모노머, 다이머, 트리머 또는 핵사머 등 다양한 서브유닛 구조를 가진다고 보고되었다^{13~22)}. 분자량도 다양하여 척추 동물의 PNP는 분자량 48,000에서 92,000인 반면, 세균 PNP는 130,000에서 140,000 달톤의 고분자량 형태인 *E. coli*, *S. typhimurium*, *Micrococcus*의 PNP와 80,000에서 95,000 달톤의 저분자량 형태인 *Bacillus cereus*, *Enterobacter cloacae*, *Proteus vulgaris*의 PNP가 있다^{13~22)}. PNP는 많은 원핵 세포와 진핵 세포로부터 분리되어 작용메카니즘과 성질에 대하여 연구가 논의되어 왔다. 그 결과 무기 인산에 의해 비쌍곡선 형태의 협동적 저해성을 나타내며, 아이소자임 형태의 PNP는 다른 자리 입체성 조절을 받으며 효소 활성에 의한 대사 조절에 관여한다고 보고되었다²³⁾.

본 연구는 *Serratia marcescens* ATCC 25419에서 퓨린 분해 대사 과정의 조절에 관한 정보를 얻기 위하여 성장 배지에 첨가한 아미노산과 퓨린 분해 대사 산물이 PNP 생합성에 미치는 영향을 조사한 결과이다.

실험 재료 및 방법

1. 균 주

Serratia marcescens ATCC 25419는 미국 Louisiana 주립 대학교의 Braymer 교수로부터 분양 받아 brain heart infusion (BHI) 사면 배지에 옮긴 다음 배양하였다.

2. 시 약

Potassium phosphate, dithiothreitol (DTT), ethylenediamine tetraacetate (EDTA), inosine, xanthine oxidase, glucose, ammonium sulfate, magnesium sulfate, tryptophan, tyrosine, proline, alanine, aspartate, leucine, lycine, glutamine, glycine, serine, uric acid, adenosine, xanthine, guanosine, hypoxanthine, guanine, urea, glyoxylate 및 bovine serum albumin (BSA) 등은 Sigma사 제품을, brain heart infusion (BHI)는 Difco사 제품을 사용하였고 다른 시약은 일급 내지 특급 제품을 사용하였다.

3. *Serratia marcescens* ATCC 25419의 배양

사면 배지에 보존된 균주의 종균은 BHI 배지 10ml에 접종한 다음 하룻밤 동안 배양하여 최소 배지 30ml가 들어 있는 100ml 삼각 플라스크에 1ml씩 넣어 30°C에서 12시간 진탕 배양하였다. 최소 배지는 변형한 Davis-Mingioli 최소 배지²⁴⁾ (0.5% glucose, 51mM K₂HPO₄, 22mM KH₂PO₄ (pH 7.0), 8mM (NH₄)₂SO₄, 0.4mM MgSO₄ · 7H₂O)를 사용하였다.

4. 세포 추출물의 제조

배양물을 10,000×g로 4°C에서 20분 동안 원심분리하여 수확한 세포를 2 내지 3배의 파쇄 완충 용액 (50mM potassium phosphate, pH 8.0, 1mM EDTA, 1mM DTT)에 현탁시켜 초음파 파쇄기로 40mA에서 1분 30초 동안 (파쇄 30초마다 2분 휴식) 세포를 파쇄한 다음 12,000×g로 20분 동안 원심분리하여 상정액을 취하여 효소 활성 측정에 사용하였다.

5. Purine nucleoside phosphorylase (PNP)의 활성 측정

Purine nucleoside phosphorylase (PNP)의

활성은 xanthine oxidase를 이용한 coupled enzyme 방법에 따라 생성된 요산의 양을 Kalckar 방법¹⁾에 따라 측정하였다. 측정용 시험관에 20mM potassium phosphate (pH 7.5), 1mM inosine, 0.02 unit의 xanthine oxidase 및 효소를 첨가하여 전체 반응액 부피를 1ml가 되게 한 다음 UVIKON 930 spectrophotometer를 이용하여 293nm, 30°C에서 1분 동안 반응시킨 후, 요산의 형성에 따른 흡광도를 측정하였다. PNP 1unit (U)는 30°C에서 1분당 증가 흡광도 1로 정의하였다. 비활성은 unit/mg protein으로 표시하였다.

6. 단백질 정량

단백질은 bovine serum albumin (BSA)을 표준 단백질로 하여 Lowry 방법으로 정량하였다²⁵⁾.

7. 여러 아미노산과 퓨린 분해대사 산물이 효소 활성에 미치는 영향

최소 배지에 각각 5mM의 티로신, 트립토판, 프롤린, 알라닌, 아스파르트산, 루신, 리신, 글루타민 그리고 글리신 등의 아미노산과 아데노신, 이노신, 구아노신, 히포크산틴, 크산틴 그리고 요산 등의 퓨린 분해 대사 산물을 가한 다음 30°C에서 12시간 동안 진탕 배양시킨 후 PNP의 활성을 측정하였다.

8. 이노신, 히포크산틴, 요산의 동시 첨가가 효소 활성에 미치는 영향

최소 배지에 이노신과 히포크산틴, 히포크산틴과 요산, 이노신과 요산 그리고 세 퓨린 분해 대사 산물을 함께 0.5, 5mM의 농도로 가한 다음 30°C에서 12시간 동안 진탕 배양시킨 후 PNP의 활성을 측정하였다.

9. 여러 농도의 퓨린 분해 대사 산물이 효소 활성에 미치는 영향

최소 배지에 아데노신, 이노신, 구아노신, 히포크산틴, 크산틴 그리고 요산을 각각 0.1, 0.5, 1, 3, 5, 7, 10 및 15mM이 되도록 가한 다음 30°C에서 12시간 동안 진탕 배양시킨 후 PNP의 활성을 측정하였다. 한편, 요산의 분해 산물인 요소와 글리옥실산에 대한 영향을 살펴보기 위하여 최소 배지에 요소와 글리옥실산을 각각 0.1, 0.5, 1, 3, 5, 7, 10, 15mM 농도가 되도록 가한 다음 30°C에서 12시간 동안 진탕 배양시킨 후 PNP의 활성을 측정하였다.

결과 및 고찰

1. 여러 아미노산과 퓨린 분해 대사 산물이 효소 활성에 미치는 영향

*Serratia marcescens*의 purine nucleoside phosphorylase (PNP) 생합성에 대한 아미노산의 영향을 알아보려고 퓨린 고리의 C-4, C-5, N-7 원자의 공급원인 글리신, N-1 원자의 공급원인 아스파르트산, N-3, N-9의 공급원인 글루타민과 티로신, 트립토판, 프롤린, 루신, 알라닌, 리신 및 세린을 사용하였다. 최소 배지에 5mM의 여러 아미노산을 첨가시킨 후 세포 추출물의 PNP의 활성을 조사한 결과, Table 1과 같이 5mM의 티로신, 트립토판 그리고 프롤린은 25% 정도 감소되었다. 5mM의 알라닌, 루신, 리신, 글루타민, 글리신 및 세린은 대조군에 비해 거의 영향을 주지 못한 반면, 아스파르트산은 10% 정도 증가시켰다. 퓨린 분해 대사 산물의 첨가 실험에서 이노신의 전구체인 아데노신, PNP의 기질인 이노신과 구아노신, PNP의 생성물이자 요산 생성의 중간체인 크산틴과 히포크산틴, 그리고 퓨린 분해 대사의 최종 산물인 요산을 사용하여 PNP의 활성을 측정하였다. Table 2와 같이 5mM의 이노신, 구아노신 그리고 요산은 대조군보다 활성이 25% 정도 감소되었으며 아데닌, 히포크산틴 그리고 크산틴은 40~45% 정도 감소되었고, 구아노신은 60% 감소되었다.

Table 1. Effects of various amino acids in growth media on the specific activity of purine nucleoside phosphorylase (PNP)

Addition to minimal medium (5mM)	Specific activity of PNP (units/mg)	Relative activity (%)
None	0.054 ± 0.003	100
Tyrosine	0.041 ± 0.002	76
Tryptophan	0.040 ± 0.002	74
Proline	0.041 ± 0.002	76
Alanine	0.052 ± 0.003	96
Aspartate	0.059 ± 0.003	109
Leucine	0.046 ± 0.002	85
Lycine	0.047 ± 0.002	87
Glutamine	0.047 ± 0.002	87
Glycine	0.052 ± 0.003	96
Serine	0.049 ± 0.002	91

Experiments were carried out in modified Davis-Mingioli medium supplemented with each of amino acids. The concentration of each amino acid added to the medium was 5 mM. Values are mean ± range of variation for three experiments.

Table 2. Effects of several purine base catabolites in growth media on the specific activity of purine nucleoside phosphorylase (PNP)

Addition to minimal medium (5mM)	Specific activity of PNP (units/mg)	Relative activity (%)
None	0.054 ± 0.003	100
Adenosine	0.033 ± 0.002	61
Inosine	0.021 ± 0.001	74
Guanosine	0.040 ± 0.002	39
Hypoxanthine	0.032 ± 0.002	59
Guanine	0.041 ± 0.002	75
Xanthine	0.030 ± 0.002	56
Uric acid	0.041 ± 0.002	76

Experiments were carried out in modified Davis-Mingioli medium supplemented with each of purine base catabolites. The concentration of each purine base catabolite added to the medium was 5 mM. Values are mean ± range of variation for three experiments.

2. 이노신, 히포크산틴, 요산의 동시 첨가가 효소 활성에 미치는 영향

최소 배지에 PNP 기질인 이노신과 PNP 생성물과 요산 생성의 중간체인 히포크산틴 또는 퓨린 분해 대사의 최종 생성물인 요산을 저농도 (0.5mM)와 고농도 (5mM)로 조합하여 활성을 조사한 결과, Table 3과 같이 0.5mM의 이노신과 요산, 세 퓨린 분해 대사 산물을 동시 첨가했을 경우 PNP의 활성은 22, 33%씩 증가된 반면, 5mM의 이노신과 요산,

Table 3. Effects of inosine (I), hypoxanthine (H) and uric acid (U) on the specific activity of purine nucleoside phosphorylase (PNP) when added together in growth media

Addition to minimal medium (5mM)	Specific activity of PNP (units/mg)	Relative activity (%)
None	0.054 ± 0.003	100
I(0.5)+H(0.5)	0.058 ± 0.003	107
I(0.5)+U(0.5)	0.066 ± 0.003	122
H(0.5)+U(0.5)	0.056 ± 0.003	104
I(0.5)+H(0.5)+U(0.5)	0.072 ± 0.004	133
None	0.054 ± 0.003	100
I(5)+H(5)	0.046 ± 0.002	85
I(5)+U(5)	0.044 ± 0.002	81
H(5)+U(5)	0.040 ± 0.002	74
I(5)+H(5)+U(5)	0.045 ± 0.002	83

Experiments were carried out in modified Davis-Mingioli medium supplemented with combination of I, H and U. The concentrations of each I, H and U added to the medium were 0.5 and 5 mM. Values are mean ± range of variation for three experiments.

세 퓨린 분해 대사 산물을 동시 첨가한 경우는 20% 정도, 히포크산틴과 요산을 동시 첨가한 경우는 25% 정도의 활성을 감소시켰다.

3. 퓨린 분해 대사 산물의 농도에 따른 효소 활성

퓨린 분해 대사산물이 PNP의 생합성에 미치는 영향을 분석하기 위해 최소배지에 퓨린 분해 대사 산물의 여러 농도로 세분화하여 조사하였다. PNP의 기질로 사용된 이노신은 대조군보다 0.1~1mM의 낮은 농도에서는 거의 변화를 보이지 않았으나, 5mM 이상의 농도에서는 30% 정도 활성을 감소시켰다 (Fig. 1). 역시 PNP의 기질인 구아노신은 이노신과 달리 0.1~3mM의 농도에서 활성을 20~40% 정도 감소시킨 반면, 5mM 이상의 농도에서는 60% 이상 크게 감소시켰다 (Fig. 1). 이노신의 전구체인 아데노신은 1~3mM에서 활성을 20% 정도 감소시키고, 7mM 이상의 농도에서는 절반 정도 감소시켰다 (Fig. 1). PNP의 생성물이면서 요산 생성의 중간체인 히포크산틴은 0.1~1mM의 낮은 농도에서는 대조군에 비해 비활성도에 거의 영향을 주지 않았으나, 3mM 이상의 농도에서는 40~50% 감소시켰다

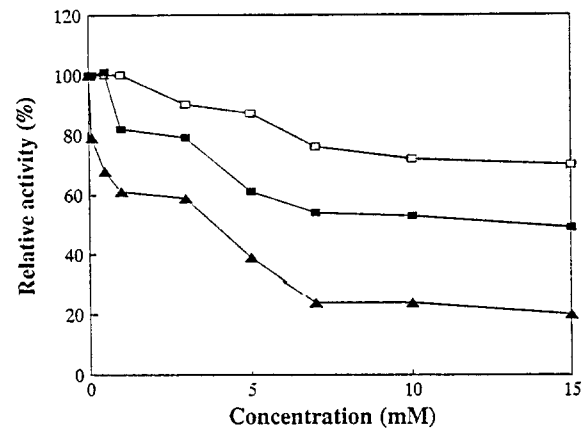


Fig. 1. Effect of varying concentration of adenosine (■-■), inosine (□-□) and guanosine (▲-▲) in growth media on specific activity of purine nucleoside phosphorylase (PNP). Cells were grown aerobically for 12h at 30°C in modified Davis-Mingioli medium. Crude extracts for enzyme assay were prepared by sonication of the harvested cells as described in materials and methods. Activities were expressed relative to the specific activities in the absence of adenosine, inosine and guanosine. Values are mean ± range of variation for three experiments.

(Fig. 2). PNP의 생성물과 요산 생성의 중간체인 크산틴은 히포크산틴처럼 0.5mM의 저 농도에서는 활성에 거의 영향을 미치지 않았으나, 5mM 이상의 농도에서는 절반 정도 감소시켰다(Fig. 2). 한편, 퓨린 분해 대사의 최종 산물인 요산은 0.5mM의 농도에서 활성을 20% 정도 증가시킨 반면, 5~10mM의 농도에서는 20~40% 정도, 15mM의 농도에서는 80% 정도 감소시켰다(Fig. 3). 한편, 요산에 대한 영향을 자세히 살펴보기 위하여 요산의 최종 분해 산물인 요소와 글리옥실산을 성장 배지에 첨가한 결과 요소는 대조군에 비해 활성에 거의 영향을 미치지 않았으나, 글리옥실산은 0.5mM의 저 농도에서 20% 정도 증가된 반면 3~15mM의 농도에서는 30~50% 정도 감소되었다(Fig. 4). *S. typhimurium*을 퓨린 리보뉴클레오시드의 존재 하에서 성장시키면 PNP와 phosphodeoxyribomutase가 함께 유도되지만 데옥시리보오스 또는 데옥시리보뉴클레오시드의 존재하에서는 PNP, thymidine phosphorylase, phosphodeoxyribomutase 및 deoxyribose-5-phosphate aldolase의 네 효소가 함께 유도된다고 보고되었다²⁶⁾. PNP는 퓨린 리보뉴클레오시드나 퓨린 디옥시리보뉴클레오시드에 대해 특이성을 가진다는 것은 리보뉴클레오시드 또는 디옥시리보뉴클레오시드 유도체 등 한 개 이상의 효과 인자에 의해서 유전자가 조절된다는 것을 의미한다²⁶⁾. 이러한 결과는 저 농도

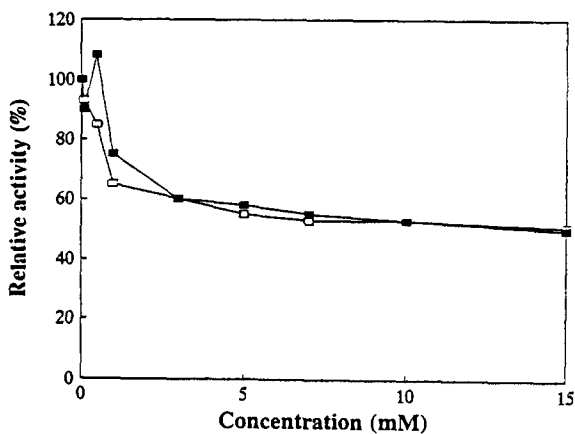


Fig. 2. Effect of varying concentration of hypoxanthine (■-■) and xanthine (□-□) in growth media on specific activity of purine nucleoside phosphorylase (PNP). Activities were expressed relative to the specific activities in the absence of hypoxanthine and xanthine. Values are mean range of variation for three experiments.

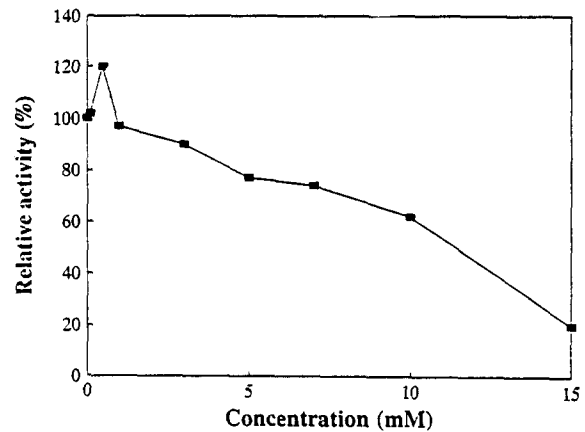


Fig. 3. Effect of varying concentration of uric acid (■-■) in growth media on specific activity of purine nucleoside phosphorylase (PNP). Activities were expressed relative to the specific activities in the absence of uric acid. Values are mean \pm range of variation for three experiments.

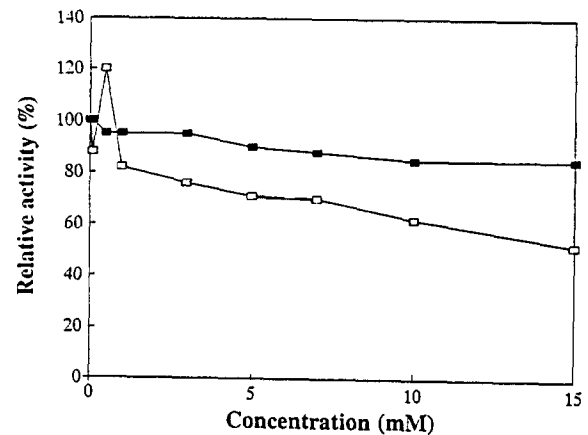


Fig. 4. Effect of varying concentration of urea (■-■) and glyoxylate (□-□) in growth media on specific activity of purine nucleoside phosphorylase (PNP). Activities were expressed relative to the specific activities in the absence of urea and glyoxylate. Values are mean \pm range of variation for three experiments.

(0.5mM) 글리옥실산은 *S. marcescens* purine nucleoside phosphorylase (PNP)의 활성을 증가시키고, 고 농도의 글리옥실산은 감소시키는 것을 나타내기 때문에 퓨린 분해 대사 과정에서 글리옥실산이 PNP 생합성의 조절 역할을 하는 것으로 분석된다.

요 약

최소 배지에 여러 퓨린 분해 대사 산물을 첨가하여 배양시킨 *Serratia marcescens* ATCC 25419 세포 추출물에서 purine nucleoside phosphorylase (PNP)의 활성을 조사한 결과, 구아노신은 대조군에 비해 효소의 활성을 5~15mM에서 60% 이상 감소시켰고, 이노신은 7~15mM에서 30% 정도 감소시켰으나 0.1~1mM에서 효소의 활성을 원래대로 회복시켰다. 아데노신, 히포크산틴 및 크산틴도 5~15mM에서 효소의 활성을 40~50% 정도 감소시켰으나 0.1~0.5mM에서는 원래대로 회복시켰다. 한편, 요산은 효소의 활성을 0.5mM에서 20% 증가시킨 반면 15mM에서 80% 감소시켰다. 요산의 최종 분해 산물인 글리옥실산도 효소의 활성을 0.5mM에서 20% 증가시킨 반면 3~15mM에서 30~50% 정도 감소시켰다. 5mM 농도의 이노신, 히포크산틴 및 요산을 동시에 첨가했을 경우 효소의 활성을 20% 정도 감소된 반면, 이노신과 요산, 세 퓨린 분해 대사 산물은 각각 0.5mM씩 동시 첨가했을 경우는 각각 22, 33%씩 증가시켰다. 이 결과는 낮은 농도 (0.5mM)의 글리옥실산이 *S. marcescens* purine nucleoside phosphorylase (PNP)의 활성을 증가시키고 고 농도의 글리옥실산은 감소시키는 것을 나타내기 때문에 퓨린 분해 대사 과정에서 글리옥실산이 PNP 생합성의 조절 역할을 하는 것으로 분석된다.

참고문헌

1. Kalckar, H. M. : Differential spectrophotometry of purine compounds by means of specific enzymes, *J. Biol. Chem.*, 167, 429~443 (1947).
2. Martin, Jr., D. W. and Gelfand, E. W. : Biochemistry of diseases of immunodevelopment, *Ann. Rev. Biochem.*, 50, 845~877 (1981).
3. Osborne, W. R. A. : Nucleoside kinases in T and B lymphoblasts distinguished by autoradiography, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 83, 4030~4034 (1986).
4. Renout, J. A., Wood, A., Frazer, I. H., Thong, Y. H., and Chalmer, A. H. : Depressed activities of purine enzymes in lymphocytes of patients infected with human immunodeficiency virus, *Clin. Chem.*, 35, 1478~1481 (1989).
5. Pribe, T., Kandil, O., Nakic, M., Pan, B. F. and Nelson, J. A. : Selective modulation of antibody response and natural killer cell activity by purine nucleoside analogues, *Cancer Res.*, 48, 4799~4803 (1988).
6. Gilbertson, R. B., Dong, K. K., Kossarek, L. M., Sircar, J. C., Kostlan, C. R. and Conroy, M. C. : Selective *in vitro* inhibition of human molt-4 lymphoblasts by the novel purin nucleoside phosphorylase inhibitor, CI-972, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 178, 1351~1358 (1991).
7. Tuttle, J. V. and Krenitsky, T. A. : Effects of acyclovir and its metabolites on purine nucleoside phosphorylase, *J. Biol. Chem.*, 259, 4065~4069 (1984).
8. Stoeckler, J. D., Ryden, J. B., Parks, R. E., Jr., Chu, M. Y., Lim, M. L., Ren, W. Y. and Klein, R. S. : Inhibitors of purine nucleoside phosphorylase : effects of 9-deazapurine ribonucleosides and synthesis of 5'-deoxy-5'-iodo-9-deazanosine, *Cancer Res.*, 46, 1744~1778 (1986).
9. Krenitsky, T. A., Tuttle, J. V., Miller, W. H., Moorman, A. R., Orr, G. F. and Beauchamp, L. : Nucleoside analogue inhibitors of purine nucleoside phosphorylase, *J. Biol. Chem.*, 265, 3066~3069 (1990).
10. Ealick, S. E., Babu, Y. S., Bugg, C. E., Erion, M. D., Guida, W. C., Montgomery, J. A. and Secrist III, J. A. : Application of crystallographic and modeling methods in the design of purine nucleoside phosphorylase inhibitors, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 88, 11540~11544 (1991).
11. Utagawa, T., Morisawa, H., Yoshinaga, F., Yamazaki, A., Mitsugi, K. and Hirose, Y. : Microbiological synthesis of adenine arabinoside, *Agric. Biol. Chem.*, 49, 1053~1058 (1985).
12. Ling, F., Inoue, Y. and Kimura, A. : Purification and characterization of novel nucleoside phosphorylase from a *Klebsiella* sp. and its use in the enzymatic production of adenine arabinoside, *Appl. Environ. Microbiol.*, 56, 3830~3834 (1990).
13. Kim, B. K., Cha, S. and Parks, R. E. : Purine nucleoside phosphorylase from human erythrocytes, *J. Biol. Chem.*, 243, 1763~1770 (1968).
14. Robertson, B. C. and Hoffee, P. A. : Purification and properties of purine nucleoside phosphorylase from *Salmonella typhimurium*, *J. Biol. Chem.*, 25, 2040~2043 (1973).
15. Jensen, K. F. and Nygaard, P. : Purine nucleoside phosphorylase from *E. coli* and *S. typhimurium*, *Eur. J. Biochem.*, 51, 253~265 (1975).
16. Lewis, A. S. and Glantz, M. D. : Monomeric purine nucleoside phosphorylase from rabbit liver, *J. Biol. Chem.*, 251, 407~413 (1976).
17. Moyer, T. P. and Fischer, G. : Purification and characterization of purine nucleoside phosphorylase from bovine thyroid, *Arch. Biochem. Biophys.*, 174, 622~629 (1976).
18. Ikezawa, Z., Nishino, T., Murakami, K. and Tsushima, K. : Purine nucleoside phosphorylase from

- bovine liver, *Comp. Biochem. Physiol.*, **60B**, 111~116 (1977).
19. Zannis, V., Doyle, D. and Martin, D., W. : Purification and characterization of human erythrocyte purine nucleoside phosphorylase and its subunits, *J. Biol. Chem.*, **253**, 504~510 (1978).
20. Jensen, K. F. : Two purine nucleoside phosphorylase in *Bacillus subtilis*, *Biochim. Biophys. Acta*, **525**, 346~256 (1978).
21. Savage, B. and Spencer, N. : Partial purification and of purine nucleoside phosphorylase from rabbit erythrocytes, *Biochem J.*, **167**, 703~710 (1978).
22. Surette, M., Gill, T. and MacLean, S. : Purification and characterization of purine nucleoside phosphorylase from *Proteus vulgaris*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**, 1435~1439 (1990).
23. Ropp, P. A. and Traut, T. W. : Allosteric regulation of purine nucleoside phosphorylase, *Arch. Biochem. Biophys.*, **288**, 614~620 (1991).
24. Davis, B. D. and Mingioli, E. S. : Mutants of *Escherichia coli* requiring methionine or vitamin B12, *J. Bacteriol.*, **60**, 17~28 (1950).
25. Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. : Protein measurement with the folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265~275 (1951).
26. Hoffee, P. A., May, R. and Robertson, B. C. : Purine nucleoside phosphorylase from *Salmonella typhimurium* and rat liver, *Methods in Enzymology*, **51**, 517~543 (1978).

(1999년 1월 7일 접수)