

Bacillus subtilis ED 213 Cytidine Deaminase 활성에 미치는 핵산관련물질의 영향

박정문 · 유대식[†] · 서태수* · 김정배** · 윤종국***

계명대학교 미생물학과, *대구보건대학 물리치료과

계명대학교 환경과학과, *공중보건학과

Effects of Nucleic Acid Related Compounds on Cytidine Deaminase Activity Produced by *Bacillus subtilis* ED 213

Jung-Moon Park, Tae-Shick Yu[†], Tae-Soo Suh*, Jung-Bae Kim** and Chong-Guk Yoon***

Dept. of Microbiology, Keimyung University, Taegu 704-701, Korea

*Dept. of Physical Therapy, Taegu Health College, Taegu 702-260, Korea

**Dept. of Environmental Science, and

***Dept. of Public Health, Keimyung University, Taegu 704-701, Korea

Abstract

This study was carried out to investigate the effects of nucleic acid related compounds and metal ions on activities of cytidine deaminase from *Bacillus subtilis* ED 213. The purified cytidine deaminase was weakly inhibited by 1mM GMP, IMP and ATP, but not affected by other nucleic acid related compounds such as CMP and UDP. The apparent *K_m* values for cytidine, deoxycytidine, 5-methylcytidine, fluorodeoxycytidine, and 5-bromocytidine were calculated to be 6.6×10^{-4} M, 6.0×10^{-4} M, 0.9×10^{-4} M, 0.8×10^{-4} M, and 2.0×10^{-3} M, respectively. The cytidine deaminase was completely inhibited by 1mM Hg^{2+} , and mildly inhibited over 40% by metal ions such as Na^+ and Fe^{2+} . However the enzyme activity was activated more than 40% by 1mM Mg^{2+} .

Key words: cytidine deaminase, *Bacillus subtilis* ED 213

서 론

Purine 및 pyrimidine nucleotide는 핵산의 구성 성분일 뿐 아니라 생체 대사를 수행 또는 촉매하고 여러 종류의 조효소의 구성 성분도 되며, 호르몬 분비를 촉진시키는 등 다양한 생체내 기능 수행에 필수적인 물질이다.

일반적으로 미생물 세포내에서 purine 및 pyrimidine 염기들은 nucleoside로 존재하지 않고, nucleotide 형태로 존재하므로(1), nucleotide는 핵산 분해 대사계에서도 중요한 중간 대사산물이다. 특히 nucleoside인 cytidine은 pyrimidine nucleotide의 분해와 salvage 합성계의 중요한 중간 산물이다.

Cytidine deaminase(cytidine/deoxycytidine aminohydrolase, EC 3. 5. 4. 5)는 cytidine과 deoxycytidine

을 탈아미노화하여 uridine과 deoxyuridine으로 전환시키는 비가역적인 가수분해 효소이며(2), 동물이나 미생물에 널리 분포되어 있다.

미생물 기원 cytidine deaminase(CDDase)는 *Escherichia coli*에서 처음으로 발견되었으며(3), *E. coli*(4-6), *Salmonella typhimurium*(7,8), 빵효모(9) 등으로부터 부분 정제된 효소의 효소학적 성질이 보고되었으며, Vita 등(10)은 *E. coli*로부터 전기영동 단일 효소 단백질로 정제하였다. *E. coli*는 겔 여과에 의해 측정된 분자량은 56,000 Da이며, SDS-polyacrylamide disc 전기영동에 의하여 측정된 분자량은 두개의 동일한 subunit로 구성된 33,000 Da의 효소 단백질이라고 보고되었다. 그러나 서당 농도 구배 원심분리법으로 측정된 *E. coli* B의 CDDase의 침강계수는 4.4s였으며 분자량은 73,000 Da이었다(11).

[†]To whom all correspondence should be addressed

동물 기원의 cytidine deaminase의 효소활성은 정상 세포에 비하여 암세포에서 현저히 증가한다는 사실이 보고되었으며(12), cytosine- β -D-arabinofuranoside (Ara-C)를 사람의 정맥에 투여할 경우, 간의 cytidine deaminase 활성이 현저히 저하되므로 항종양제로서 사용되기도 한다(13,14). 더우기 5-iodo-2-deoxycytidine (15)과 2-fluoro-5-iodo-1- β -D-arabinofuranosylcytosine(FIAC)(16)에 의해서도 deoxycytidine deaminase의 활성은 저하된다고 보고되었다. 그리고 5-azacytidine은 항종양제로서 백혈병의 치료에 이용되기도 하며, 3-deazauridine이나 thymidine을 5-azacytidine과 함께 투여하면 효소활성을 현저히 저하시켜 5-azacytidine의 항백혈성 효과가 증대된다(17).

위와 같은 연구 결과에 따라 최근에 nucleoside나 nucleotide의 유도체가 항종양제로서의 연구가 수행되면서 임상학적 측면에서도 각광을 받기 시작하였다. *E. coli*의 cytidine deaminase는 단일 효소단백질로 정제되어 효소학적 특성이 밝혀져 있으나, 동물 기원 cytidine deaminase와 *B. subtilis* 효소의 높은 상동성과 암세포에서 효소활성이 높은 점으로부터 본 연구와 관련한 *B. subtilis*가 생산하는 효소는 최근까지 정제된 것이 보고된 적이 없었으나, Park 등(18)에 의하여 *B. subtilis* ED 213으로부터 전기 영동적으로 단일 효소단백질로 정제되었다. 일반적으로 *Bacillus* sp.는 다른 속의 세균과 그 생리적 특성이 매우 다르며 여러 가지 가수분해 효소와 항생물질을 생산하며, 곤충에게는 병원성을 나타내지만 인체에는 비병원성이므로 유용한 세균이다. *Bacillus* sp.는 많은 종류의 기질에서 잘 생육할 뿐만 아니라 증식 속도가 빨라서 배양학적 특성도 다른 세균보다 우수한 Gram 양성 세균이다. 특히, *Bacillus subtilis*는 강력한 세포외 protease를 생산하므로 대두 발효식품인 간장과 된장 등의 제조용 유용세균이다. 위와 같은 특성을 갖는 *Bacillus subtilis* ED 213 균주를 실험균주로 사용하여 실험균주의 정제 cytidine deaminase의 효소 활성에 미치는 핵산관련 물질과 금속이온의 영향을 검토하여 결과를 얻었기에 보고하고자 한다.

재료 및 방법

시약

실험에 사용한 효소 기질은 Sigma Co.(USA)제품의 cytidine(cytosine β -D-riboside, free base)을 사용했으며, 효소 정제에 사용한 DEAE-cellulose, Sephadex G-100, DEAE-Sephadex A-50과 Phenyl-Sepharose CL-4B은 Sigma Co.(USA)제품을 구입 사용하였다.

Cytidine 유사체인 5-iodocytidine, 2-thiocytidine, 5-aza-2'-deoxycytidine과 2'-fluorodeoxycytidine은 Sigma Co.(USA)제품을 사용했으며, 그의 시약들은 시판 특급품을 구입하여 사용하였다.

실험균주

본 실험에 사용된 균주는 경북대학교 생물교육학과 미생물 연구실로부터 *B. subtilis* ED 213 균주를 분양 받아 사용했다.

B. subtilis ED 213(19)은 *B. subtilis* ED 40을 숙주 세포로 plasmid pSO100으로 형질전환 시킨 균주로서 배지 내에 cytidine이나 uracil을 첨가해야만 생육할 수 있다. *B. subtilis* ED 40은 재조합 균주의 숙주 세포로 pyrimidine nucleotide의 *de novo* 생합성 대사계의 *pyr-2* gene과 *salvage* 대사계의 *cdd-1* gene, 그리고 *lys* gene의 결손변이주이다(19).

또한 plasmid pSO100은 *B. subtilis* *cdd* gene을 포함하는 pSO21의 Puv1/EcoR1 fragment를 절단하여 *Bacillus-E. coli* shuttle vector인 PGB215-110 Δ B의 Puv1/EcoR1 site에 결합한 약 9.5kb의 plasmid이다(19).

배지조성

본 실험에 사용된 균주의 생육을 위하여 LB배지(1% peptone, 0.5% yeast extract, 0.5% NaCl)에 20 μ g/ml kanamycin을 첨가하였고 Spizizen minimal medium (SMM)(1.4% K₂HPO₄, 0.6% KH₂PO₄, 0.2%(NH₄)₂SO₄, 0.1% Na-citrate, 0.02% MgSO₄ · 7H₂O, 0.00002% Mn-SO₄ · 4H₂O, 0.5% 포도당, pH 6.8)은 최소배지로서 균주의 보존과 증배양에 사용했으며, 생육배지로서는 SMM 배지에 50 μ g/ml lysine, 2% casamino acid와 20 μ g/ml cytidine, 20 μ g/ml kanamycin을 첨가하여 사용하였다. 포자 형성 배지는 0.8% nutrient broth, 0.025% MgSO₄ · 7H₂O, 0.1% KCl, 0.1ml 0.5M Ca(NO₃)₂, 0.01ml 0.1M MnCl₂, 0.1ml 1mM FeSO₄, 1.7% agar, pH 7.0에 2 μ g/ml cytidine, 20 μ g/ml kanamycin을 첨가하여 사용하였고, 고체배지는 1.5% 환천을 첨가하여 사용하였다.

조효소액의 조제

L-자형 시험관에서 LB배지 10ml에 30°C, 15~18시간 배양한 종 배양액을 2%되게 100ml의 SMM 최소배지에 접종하여 24시간 진탕배양한 후, 9,000rpm(Kontron, A8.24 rotor)으로, 10분간 원심분리로 배양균체를 집균했다.

집균된 균체는 생리 식염수로 2회 세척한 후, 5mM

mercaptoethanol을 함유한 50mM 인산 완충액(pH 7.0)에 균체를 현탁시켜 10°C이하에서 초음파 파쇄기(Lab-line Co., model No. 9100, USA)를 사용하여 120 Hz로 파쇄시켰다. 세포 파쇄시간은 균체농도에 따라 조정하였으며, 현미경하에서 세균 세포의 형태가 나타나지 않을 때까지 파쇄시켰다. 파쇄된 균체를 9,000rpm으로 10분간 원심분리하여 상등액을 조효소액으로 사용하였다.

효소의 정제

실험에 사용한 cytidine deaminase의 조효소액을 Park 등(18)의 방법에 따라 정제했다. 즉, 조효소액을 ammonium sulfate 침전(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 사용하였다. 즉, 이 방법에 의하여 조효소액으로부터 10% 수율로 87배 정제되어 단일 효소단백질로 정제된 cytidine deaminase였으며, 열안정성이 비교적 낮은 효소였다.

Cytidine deaminase의 활성 측정

Cytidine deaminase의 활성은 Hammer-Jespersen 등(20)의 방법에 준하여 측정하였다. 희석한 조효소액 100 μ l에 0.2M MgCl₂가 함유된 50mM Tris-HCl 완충액(pH 7.0) 250 μ l을 혼합하여 37°C에서 2분간 전처리하였다. 전처리된 효소액에 기질인 50mM cytidine을 10 μ l 넣어 2, 4 및 6분 간격으로 반응시켰다.

효소 반응액 100 μ l를 취하여 0.5N perchloric acid 900 μ l에 혼합하여 반응을 정지시킨 다음, UV-spectrophotometer(Shimadzu Co., UV 120-02)로 290nm에서의 흡광도를 측정하여 계산하였다. 효소의 활성 단위는 37°C에서 1분간 1nmole의 cytidine을 uridine으로 전환시키는데 필요한 효소량을 1 unit로 하였다.

생육도

Spizizen minimal medium(SMM) 배지 100ml를 L-자형 시험관에서 30°C에서 15~18시간 배양한 *B. subtilis* ED 213의 종배양액 2%를 100ml 최소배지에 접종하여 30°C에서 진탕 배양하면서 경시적으로 배양액을 채취하여 660nm에서 흡광도를 측정하였다.

결과 및 고찰

효소 활성에 미치는 cytidine analogue의 영향

본 CDDase 활성에 미치는 cytidine 유사체의 저해

유무를 검토하기 위하여 1mM의 cytidine을 기질로 각 cytidine 유사체를 1mM되게 첨가하여 효소 반응을 시켜 효소 활성을 측정하였다.

Table 1에 나타난 바와 같이, cytidine 유사체인 cytosine- β -D-arabinofuranoside, thiocytidine과 azadeoxycytidine은 본 효소 활성에 아무런 영향을 미치지 않았으나, iodocytidine은 111%의 효소활성을 촉진시켰다.

*Salmonella typhimurium*의 CDDase는 iodocytidine과 bromocytidine에 의하여 효소 활성이 저해되었으며(21) *E. coli* CDDase는 thiocytidine과 azadeoxycytidine에 의하여 효소 활성이 억제되지만(22), 본 효소의 활성은 thiocytidine과 azadeoxycytidine에 의하여 아무런 영향을 미치지 않았을 뿐 아니라 *S. typhimurium*의 효소 활성을 저해하는 iodocytidine에 의하여 본 효소 활성을 오히려 촉진시켜 *B. subtilis* ED 213의 CDDase의 효소학적 특성이 다른 미생물의 CDDase의 특성과 다른 특성을 보였다.

효소 활성에 미치는 핵산 관련 물질의 영향

본 CDDase의 활성에 미치는 핵산 관련 물질의 영향을 검토하기 위하여 1mM cytidine을 기질로 하여 핵산 관련 물질을 각 1mM되게 첨가하여 효소 활성을 측정하였다.

Table 2에 나타난 바와 같이, 1mM GMP, ATP와 IMP는 CDDase활성을 35%, 20%와 13% 저해하였으며 그 이외의 핵산 관련 물질은 효소 활성에 아무런 영향을 미치지 않았다. 특히, 동물성 식품의 정미 성분인 GMP와 IMP에 의하여 본 CDDase 활성을 저해하며, 본 CDDase 활성을 저해하는 IMP는 동물근육의 AMP로부터 AMP deaminase의 촉매로 생성되므로 AMP와 IMP는 동일 계열의 핵산 관련 물질이다. 더욱이 pyrimidine

Table 1. Effects of cytidine analogues on the cytidine deaminase activity

Cytidine analogue(1mM)	Relative activity(%)
Ara-C ¹⁾	101
Iodocytidine	111
Thiocytidine	97
Azadeoxycytidine	93
Fluorodeoxycytidine	91
None	100

The cytidine deaminase activity was assayed by standard reaction conditions in the presence of cytidine analogues at indicated concentrations and the results were expressed as relative activity to that of none.

¹⁾Ara-C, cytosine- β -D-arabinofuranoside.

Table 2. Effects of nucleic acid related compounds on the cytidine deaminase activity

Purine		Pyrimidine	
Compounds (1mM)	Relative activity(%)	Compounds (1mM)	Relative activity(%)
ATP	80	UDP	119
GMP	65	CMP	107
IMP	87	UMP	121
Adenosine	104	Cytosine	90
Guanine	97	Uracil	121
Adenine	121	Thymine	124
None	100	None	100

The cytidine deaminase activity was assayed by standard reaction conditions in the presence of nucleic acid related compounds at indicated concentrations and the results were expressed as relative activity to that of none.

계 핵산 관련 물질은 이 효소 활성에 아무런 영향을 미치지 않고 핵산 조미료의 구성 성분인 purine계 핵산 관련 물질에 의하여 효소 활성이 저해된다는 것은 식품 화학적 측면에서 매우 흥미있는 결과였다.

E. coli CDDase는 pyrimidine ribonucleosides 혹은 purine ribonucleosides보다 pyrimidine deoxyribonucleosides에 의해 더 강하게 저해되며(5), 빵효모의 CD-Dase는 CMP에 의해 저해되고, ATP, ADP, ITP, IDP, IMP, XMP, CTP, UDP, adenosine과 cytosine은 빵효모 효소의 활성에 아무런 영향을 미치지 않았다(9). 그리고 동물 기원인 면양의 간의 CDDase는 dTTP와 dUTP에 의해 저해되는 반면, dCTP는 오히려 효소 활성을 촉진시켰다(23). 본 실험에서는 pyrimidine nucleotide에 의하여 저해를 받지 않고, purine nucleotide에 의하여 저해를 받아 위의 결과와는 상반된 결과를 나타내었다.

Ipata 등(9)과 Wisdom과 Orsi(23)가 제안한 CDDase의 효소 활성의 조절은 효소에 기질이 결합하는 부위를 제외한 다른 부위에 pyrimidine nucleotide가 결합하므로 효소 단백질의 구조 변화에 의한 효소 활성이 저해된다는 allosteric 조절 기작과 본 효소활성의 조절 기작이 일치되는 것으로 추정된다.

기질에 대한 K_m value

실험균주가 생산하는 cytidine deaminase는 cytidine 뿐만 아니라 deoxycytidine, methylcytidine, fluorodeoxycytidine과 bromocytidine을 기질로 이용한다(18).

이 효소가 기질에 대한 친화력은 Lineweaver와 Burk의 방법(24)에 의하여 기질에 대한 효소활성을 plot한 결과는 Fig. 1과 같았다.

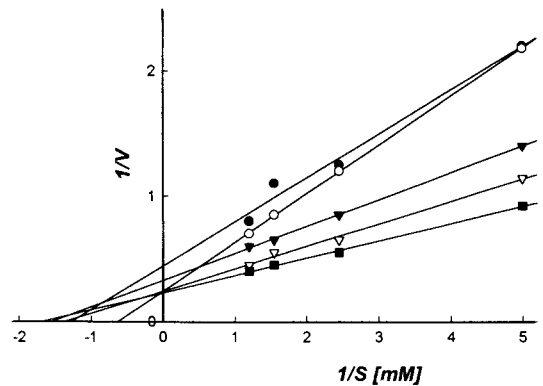


Fig. 1. Determination of K_m value for the cytidine deaminase by Lineweaver-Burk plot.

The plot is based on the rearrangement of the Michaelis-Menten equation into a linear form. Reaction mixture of purified cytidine deaminase and various concentrations of substrate were incubated at 37°C for determination of the conversion of cytidine deaminase. ▲: deoxycytidine, ●: cytidine, △: fluorodeoxycytidine, ○: methylcytidine, ×: bromocytidine.

Fig. 1에 나타난 바와 같이, cytidine, deoxycytidine, fluorodeoxycytidine, 5-methylcytidine과 5-bromocytidine에 대한 실험균주의 효소의 K_m 값은 각각 $6.6 \times 10^{-4}M$, $6.0 \times 10^{-4}M$, $0.8 \times 10^{-4}M$, $0.9 \times 10^{-4}M$ 과 $2.0 \times 10^{-3}M$ 이었다. 이 효소의 기질에 대한 친화력은 deoxycytidine, cytidine, fluorodeoxycytidine, 5-methylcytidine, 5-bromocytidine의 순으로 나타났으며, 이 순서는 이미 발표한 결과(18)의 기질 특이성의 상대적 효소 활성도와 일치하였다.

Vita 등(10)에 의한 *E. coli* B의 CDDase의 K_m 값은 cytidine에 대하여 $1.8 \times 10^{-4}M$, deoxycytidine에 대하여 $0.9 \times 10^{-4}M$, 5-methylcytidine에 대하여 $12.5 \times 10^{-4}M$ 인 결과와 비교할 때, 본 실험균인 *B. subtilis* ED 213 CDDase의 cytidine에 대한 친화력은 *E. coli* B CDDase보다 낮지만, *E. coli* B의 CDDase가 기질로 이용할 수 없는 fluorodeoxycytidine과 5-bromocytidine을 본 효소는 기질로서 이용하여, 본 효소는 *E. coli* B의 효소와는 기질 특이성에서 다른 특성을 나타내었다.

효소 활성에 미치는 금속이온의 영향

실험균주의 CDDase의 효소 활성에 미치는 금속이온의 영향을 검토한 결과는 Table 3과 같다.

공시균의 CDDase의 효소 활성은 0.1mM Hg^{2+} 에 의하여 완전히 저해되며 1mM Na^+ 와 Fe^{2+} 에 의하여 효소 활성은 40% 이상 저해되었으나, 1mM의 Mg^{2+} 는 본 효소 활성을 오히려 40% 이상 촉진시켰다. Mg^{2+} 은 본 효

Table 3. Effects of metal ions on the cytidine deaminase activity

Metal ion	Relative activity(%)	
	0.1mM	1mM
Ca ⁺⁺	106	89
Mn ⁺⁺	96	83
Mg ⁺⁺	107	142
Fe ⁺⁺	89	42
Hg ⁺⁺	0	0
Na ⁺	89	57
K ⁺	92	84
None	100	100

The enzyme activity was assayed under standard reaction conditions in the presence of metal ions at indicated concentrations.

소 활성을 촉진시키므로 Mg²⁺의 농도에 의한 효소 활성의 변화를 검토했다.

Fig. 2에 나타난 바와 같이, 10mM Mg²⁺의 농도에서 최대 효소 활성을 나타내었다. 그러나 본 CDDase의 활성은 30mM 이상의 Mg²⁺에 의하여 저해되었다.

*S. typhimurium*의 CDDase는 Hg²⁺에 의하여 효소 활성이 저해되며(21), *E. coli* CDDase 역시 Zn²⁺, Fe³⁺, Cu²⁺, Fe²⁺, Hg²⁺ 등에 의하여 효소 활성이 저해되어(5) 금속 이온에 대한 본 CDDase의 특성과 유사했다. 그러나 *E. coli*의 CDDase(5)는 오히려 Mg²⁺ 등에 의하여 효소 활성이 저해되었으나, 본 효소는 Mg²⁺에 의하여 효소 활성이 촉진되어 Mg²⁺은 본 효소의 효소 활성에 필수적인 인자로 사료된다.

효소 활성에 미치는 Hg²⁺ 이온의 저해 양상

B. subtilis ED 40(25)과 *E. coli*(5,22,26)의 CDDase는 저농도의 ρ-chloromercuribenzoic acid(ρ-CMB)와

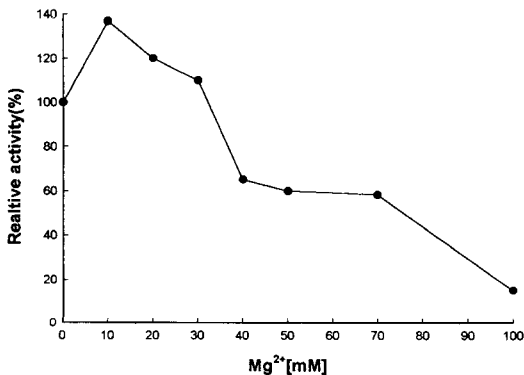


Fig. 2. Effects of various Mg²⁺ concentrations on the cytidine deaminase activity.

HgCl₂에 의하여 효소활성이 강하게 저해되며, 이들 효소의 활성부위에는 thiol-group을 갖는 cysteine잔기가 존재할 뿐 아니라, 실험에 사용된 CDDase는 1μM ρ-CMB에 의하여 불활성화된 효소활성이 5mM cysteine을 효소반응계에 첨가하므로 불활성화된 효소활성이 완전히 활성화되어 CDDase의 활성부위에는 cysteine잔기가 존재하는 thiol-효소임이 앞 논문에서 밝혀졌다(27). *B. subtilis* ED 213의 CDDase활성이 Hg²⁺에 의하여 어떤 영향을 받으며 저해양상과 Ki값을 규명하고자 한다.

Table 3에 나타난 바와 같이, Hg²⁺에 의하여 본 CDDase가 강하게 저해되는 결과로부터 Hg²⁺에 의한 본 CDDase 활성의 저해 양상을 검토하기 위하여 cytidine의 농도를 0.2mM에서 1.0mM까지 조절하여 Hg²⁺의 최종농도를 1μM되게 첨가하여 37°C에서 반응시킨 결과를 Lineweaver와 Burk(24)의 방법으로 plot하였다.

Fig. 3에서 보는 바와 같이, 실험군의 CDDase에 대한 Hg²⁺의 저해형태는 Km값은 변화시키지 않고, cytidine에 대한 Vmax가 변화하므로 본 CDDase는 Hg²⁺

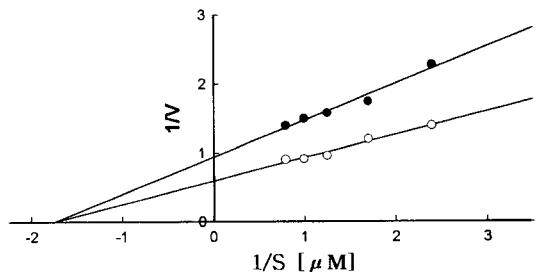


Fig. 3. Inhibitory effects of Hg²⁺ on the cytidine deaminase activity.

The enzyme activity was assayed in the presence or absence of Hg²⁺. Velocity(v) was expressed by decrease of absorbance at 290 nm for 5 min at 37°C. ●: 1μM Hg²⁺, ○: none.

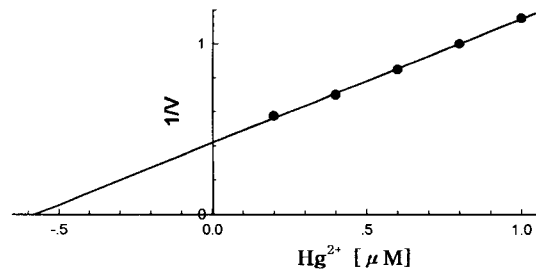


Fig. 4. Graphical determination of inhibition constant of Hg²⁺.

The enzyme activity was assayed under standard reaction conditions in the various concentrations of Hg²⁺. Velocity(v) was expressed in mM of uridine formed for 5 min.

에 의하여 비경쟁적으로 저해 되었다.

Hg^{2+} 의 저해상수(K_i)의 값을 검토하기 위하여 Hg^{2+} 의 농도를 $0.2\mu M$ 에서 $1.0\mu M$ 까지 조절하여 효소 반응을 시켜 Dixon과 Webb의 방법(28)에 의해 plot하여 K_i 값을 계산했다. Fig. 4에 나타난 바와 같이, Hg^{2+} 에 대한 K_i 값은 $5.5 \times 10^{-7} M$ 이었다.

요 약

Bacillus subtilis ED 213을 lysine, casamino acid와 cytidine과 kanamycine을 첨가한 Spizizen 최소배지에서 $30^\circ C$ 에서 24시간 진탕배양하여, 집균한 균체를 초음파 파쇄시켜 조효소액을 조제후, 조효소액으로부터 cytidine deaminase를 정제하였다. 정제된 효소의 활성은 핵산계 조미료의 정미 성분인 $1mM$ GTP, IMP와 ATP에 의하여 약하게 저해되며, cytidine, deoxycytidine, 5-methylcytidine, fluorodeoxycytidine과 5-bromocytidine에 대한 K_m 값은 각각 $6.6 \times 10^{-4} M$, $6.0 \times 10^{-4} M$, $0.9 \times 10^{-4} M$, $0.8 \times 10^{-4} M$, $2.0 \times 10^{-3} M$ 로 계산되었다. 이 효소의 활성은 $1mM$ Hg^{2+} 에 의하여 완전히 저해되었으며, Na^+ 와 Fe^{2+} 에 의해서는 약하게 저해되었다. 그러나 $1mM$ Mg^{2+} 에 의하여 이 효소의 활성은 약 40% 이상 촉진되었으며 $10mM$ Mg^{2+} 에 의하여 최고값의 효소 활성의 촉진을 나타냈다.

문 헌

1. Neuhard, J. and Nygaard, P. : Purines and pyrimidines. In "Escherichia coli and Salmonella typhimurium" Neihardt F. C.(ed.), American Soc. for Microbiol. Washington, Vol. 1, p.445(1987)
2. O'Donovan, G. A. and Neuhard, J. : Pyrimidine metabolism in microorganism. *Bacteriol. Rev.*, **34**, 278(1970)
3. Wang, T. P., Sable, H. Z. and Lanpen, J. D. : Enzymatic determination of cytosine nucleosides. *J. Biol. Chem.*, **184**, 17(1950)
4. Cohen, R. M. and Wolfenden, R. : Cytidine deaminase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, **246**, 7561(1971)
5. Hosono, H. and Kuno, S. : The purification and properties of cytidine deaminase from *Escherichia coli*. *J. Biochem.*, **74**, 797(1973)
6. Ashley, G. W. and Bartlett, P. A. : Purification and properties of cytidine deaminase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, **259**, 13615(1984)
7. Neuhard, J. and Ingraham, J. : Mutants of *Salmonella typhimurium* requiring cytidine for growth. *J. Bacteriol.*, **95**, 2431(1968)
8. Kelien, R. A., Kinahan, J. J., Folterman, K. F. and O'Donovan, G. A. : Pyrimidine biosynthetic enzymes of *Salmonella typhimurium* repressed specifically by growth in the presence of cytidine. *J. Bacteriol.*, **124**, 764(1975)
9. Ipata, P. L., Cercignani, G. and Balestreri, E. : Partial purification and properties of cytidine deaminase from baker's yeast. *Biochem.*, **9**, 3390(1970)
10. Vita, A., Amici, A., Cacciamani, T., Lanciotti, M. and Magni, G. : Cytidine deaminase from *Escherichia coli* B : Purification and enzymatic and molecular properties. *Biochem.*, **24**, 6020(1985)
11. Magni, G., Vita, A. and Amici, A. : Pyrimidine nucleoside-catabolizing enzymes in *Escherichia coli* B. *Current Topics in Cellular Regulation*, **26**, 433(1985)
12. Momparler, R. L. and Laliberte, J. : Induction of cytidine deaminase in HL-60 myeloid leukemic cells of 5-aza-2-deoxycytidine. *Leuk. Res.*, **14**, 751(1990)
13. Onish, H., Pithayanukul, P. and Nagai, T. : 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**, 274(1990)
14. Mejer, J. N., Mortensen, B. T. and Christensen, I. J. : Modulation of the effect of 1-β-D-arabinofuranosylcytosine based on changes of cytidine deaminase activity in HL60 cells. *Med. Oncol. Tumor. Pharmacother.*, **7**, 25(1990)
15. Creasey, W. A. : Studies on the metabolism of 5-iodo-2-deoxycytidine *in vitro*. *J. Biol. Chem.*, **238**, 1772(1963)
16. Cheng, Y. C., Tan, R. S., Ruth, J. L. and Dutschman, G. : Cytotoxicity of 2-fluoro-5-iodo-1-β-D-arabinofuranosylcytosine and its relationship to deoxycytidine deaminase. *Biochem. Pharmacol.*, **32**, 726(1983)
17. Chabner, B. A., Johns, D. G., Coleman, N. C., Drake, J. C. and Evans, W. H. : Purification and properties of cytidine deaminase from normal and leukemic granulocyte. *J. Clinical Invest.*, **53**, 922(1974)
18. Park, J. M., Kim, T. H. and Yu, T. S. : Purification and characteristics of cytidine deaminase from *Bacillus subtilis* ED 213. *Kor. Jour. Microbiol.*, **32**, 545(1994)
19. Song, B. H. and Neuhard, J. : Chromosomal location, cloning and nucleotide sequence of the *Bacillus subtilis* *cdd* gene encoding cytidine/deoxycytidine deaminase. *Mol. Gen. Genet.*, **216**, 462(1989)
20. Hammer-Jespersen, K., Munch-Petersen, A., Nygaard, P. and Schwartz, M. : Induction of enzymes involved in the catabolism of deoxyribonucleosides and ribonucleotides in *Escherichia coli* K-12. *Eur. J. Biochem.*, **19**, 533(1971)
21. Lee, S. M. : Cloning and expression of *cdd* gene encoding cytidine deaminase of *Salmonella typhimurium*. *Ph. D. Thesis*, KyungPook National University(1990)
22. Kwon, T. K., Song, B. H. Kim, J. G. and Hong, S. D. : Purification and properties of *Escherichia coli* cytidine deaminase by amplification of the *cdd* gene. *Mol. Cells*, **1**, 281(1991)
23. Wisdom, G. B. and Orsi, B. A. : The purification and properties of cytidine aminohydrolase from sheep liver. *Eur. J. Biochem.*, **7**, 223(1969)
24. Lineweaver, H. and Burk, D. : The determination of enzyme dissociation constants. *J. Amer. Chem. Soc.*, **56**, 658(1934)

25. Song, B. H., Yoon, M. S., Kim, K. H., Yeo, J. S. and Neuhard, J. : Enzymatic properties of cytidine deaminase encoded by *cdd* gene in *Bacillus subtilis*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **16**, 468(1988)
26. Yang, C., Carlow, D., Wolfenden, R. and Short, S. A. : Cloning and nucleotide sequence of the *Escherichia coli* cytidine deaminase(*cdd*) gene. *Biochem.*, **31**, 4168 (1992)
27. Park, J. M., Park, S. W., Suk, T. S., Kim, J. and Yu, T. S. : Effects of chemical modifiers on *Bacillus subtilis* ED 213. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, **14**, in press(1999)
28. Dixon, M. and Webb, E. C. : *Enzymes*. 2nd ed., John Wiley and Sons, New York, p.332(1975)

(1998년 9월 4일 접수)