

## *Serratia marcescens* Purine Nucleoside Phosphorylase의 정제와 특성

방선권 · 신종란 · 최병범\*  
호서대학교 생명과학과, \*신흥대학 식품영양과

**Purification and Properties of *Serratia marcescens* Purine Nucleoside Phosphorylase.** Bang, Son Kwon, Jong Ran Shin, and Byung Bum Choi\*. Department of Life Science, College of Natural Science, Hoseo University, Asan 337-795, Korea, \*Department of Food and Nutrition, Shin Heung College, Euijungbu 480-701, Korea - *Serratia marcescens* purine nucleoside phosphorylase (PNP) was purified to homogeneity by streptomycin sulfate treatment, Sephacryl HR S-200 gel filtration chromatography and AMP-agarose affinity chromatography. The specific activity of the enzyme was increased 49-fold during purification with an overall yield of 7.0%. The molecular weight was 168 kD as estimated by Sephadex G-150 gel filtration chromatography. The *S. marcescens* enzyme was composed of six identical subunits with subunit molecular weight of 28 kD, as estimated by SDS-PAGE. The  $K_m$  values of *S. marcescens* enzyme for inosine and deoxyinosine were 0.38 and 1.20 mM, respectively. The pH optimum was near 8.0, and the enzyme was relatively heat-stable protein. The enzyme was inactivated completely by 0.5 mM of  $Cu^{2+}$ .

**Key words:** purine nucleoside phosphorylase, purification, properties, *Serratia marcescens*

세균, 포유동물 등에서 광범위하게 발견되는 purine nucleoside phosphorylase(PNP; EC 2.4.2.1)는 orthophosphate (deoxy)ribosyltransferase라고도 하며, inosine, guanosine의 오탄당인 ribose의 가인산 분해를 촉매하는 효소이다. 또한, PNP는 한 purine 염기에서 다른 purine 염기로 오탄당 부분의 인산기 의존 전달 반응을 촉매 한다.

PNP는 퓨린 분해 대사 과정에서 inosine과 guanosine을 각각 hypoxanthine과 guanine으로 전환시켜 최종적으로 uric acid 생성에 참여하며 purine nucleoside 합성에도 관여하여 세포내 핵산 수준의 조절에 작용한다(Fig. 1).

Kalckar(1947)에 의해 쥐의 간 추출물에서 PNP의 활성을 처음으로 발견한 이후[9], PNP는 주로 *Escherichia coli*나 *Salmonella typhimurium* 등의 세균들과 사람 적혈구, 소, 돼지, 쥐, 토끼 그리고 햄스터 등의 척추 동물들로부터 정제와 특성 등이 보고되었다[1,7,8,10,11,14,15,16,23,24,26,29]. PNP는 세균과 척추 동물에 따라 물리적, 화학적 그리고 효소학적 성질이 서로 상이하다는 것이 보고되었는데, 특히 PNP는 subunit 형태가 monomer, dimer, trimer 또는 hexamer 등 다양하게 존재한다고 보고되었다[1,7,8,10,11,14,15,16,23,24,26,29]. 분자량 또한 다양하게 존재하는데 척추 동물의 PNP는 분자량이 48,000-92,000 달톤의 범위인 반면, 세균 PNP의 분자량은 두 개의 그룹으로 분류할 수 있는데 130,000~140,000 달톤의 고분자량

형태인 *E. coli*, *S. typhimurium*, *Micrococcus*의 PNP이고 80,000-95,000 달톤의 저분자량 형태는 *Bacillus cereus*, *Enterobacter cloacae*, *Proteus vulgaris*의 PNP이다[1,7,8,10,11,14,15,16,23,24,26,29].

PNP는 다양한 원핵 세포와 진핵 세포로부터 분리되어 상세한 반응론적 연구와 작용 기작에 대해서도 논의되어 왔다. *E. coli*와 *S. typhimurium* PNP는 빠른 평형 루우프 작용 기작[13], 닭 간과 비둘기 간 PNP는 빠른 random bi bi 작용 기작[15,23] 이고 사람 적혈구, 토끼 간, 소 골수 그리고 돼지 갑상선 PNP는 ordered bi bi 작용 기작에 대해 알려진 바 있다[4,10,19,24,29]. 여러 PNP의 반응론적 연구는 인산에 의해 억제 효과의 비 쌍곡선 형태를 나타내고 동위효소 형태의 PNP는 다른 자리 입체적 조절을 받는다고 보고되었다[4,12].

PNP는 원래 purine 분해 대사 과정의 조절을 이해하기 위하여 연구가 시작되었지만, PNP의 결핍이 면역 질환과 연관이 있다는 사실이 알려진 후[18], 그 중요성이 대두되면서 근래에 여러 연구실에서 많은 연구가 진행되고 있다[20,22]. PNP 결핍은 B 세포에서 정상 면역 기능을 가지는 반면, T 세포에서는 면역 약화를 초래한다. 이러한 PNP 결핍과 면역 질환과의 관계에서 PNP를 표적 효소로서 연구하고 있다. PNP 결핍이 B 세포 면역과는 무관한 반면, 심각한 T 세포 면역 결핍을 야기시킨다는 사실에 착안해 PNP 억제인자는 면역 질환 치료제로 주목을 끌기 시작하였고[6,21], 인체 면역에 전혀 손상을 주지 않고 T 세포의 백혈병 등의 치료제로 사용될 수 있다고 보고되었다[26,27]. PNP 억제 인자는 임상학적으로 유용한 adenosine 같은

\*Corresponding author  
Tel. 82-31-870-3397, Fax. 82-31-870-3397  
E-mail: bulamsan@unitel.co.kr

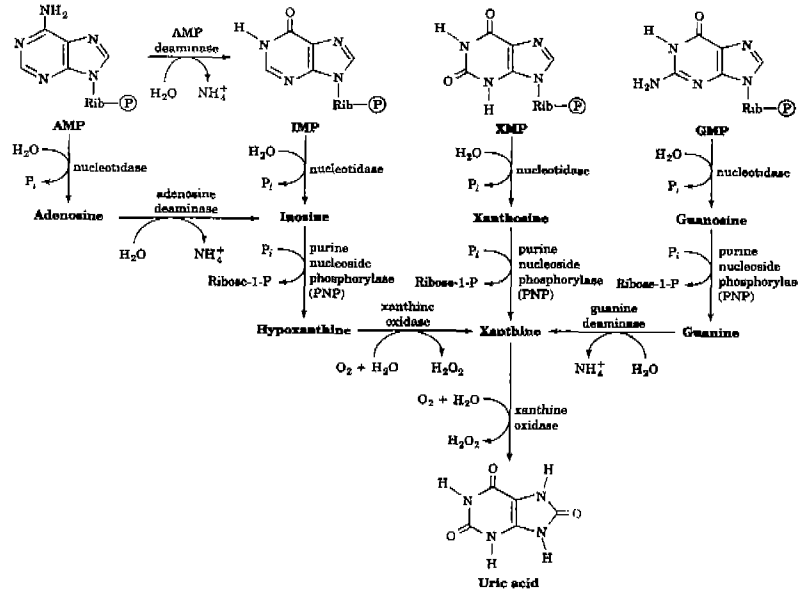


Fig. 1. The major pathway of purine catabolism.

nucleoside의 유사체를 발견하는데 많은 노력과 관심이 집중되고 있다. Acyclovir(9-(2-hydroxyethoxymethyl)guanine)는 PNP의 bisubstrate 유사체로 강력한 PNP 억제 인자 중 하나이며[26,27], 9-(3,4-dioxopentyl) hypoxanthine은 PNP의 site-specific inactivator로 활성 부위의 arginine 잔기를 화학적으로 변형시켜 불활성화되며[13], quinazoline에 기인한 유사체는 촉매적으로 교차 결합에 필수적인 잔기를 불활성화시킨다고 보고되었다[5]. 한편, adenine arabinoside (araA)같은 선택적 항바이러스 치료제의 효소 생산에 대한 PNP 이용이 개발되었는데 토양으로부터 탄소와 질소원인 adenosine을 사용하여 PNP를 생산하는 *Klebsiella* sp. LF1202를 분리하였다[28]. *Klebsiella* PNP는 adenosine, inosine, guanosine 등과 같은 purine nucleoside에 기질에 대한 특이성을 가지며 uridine arabinoside나 adenine으로부터 항바이러스 치료제인 araA의 합성을 촉매한다고 보고되었다[16].

본 연구에서는 enteric bacteria중에서 아직 효소 수준에 관한 연구가 잘 알려지지 않은 *Serratia marcescens* ATCC 25419에서 PNP를 정제하여 이 효소의 구조 및 효소학적 특성을 조사하고자 한다.

재료 및 방법

실험 균주

실험 균주인 *Serratia marcescens* ATCC 25419는 Luria-Bertani(LB) 사면 배지에 옮긴 다음 혐기성 조건으로 배양했다.

시약

Inosine, deoxyinosine, xanthine oxidase, glucose, ammonium phosphate, mangan sulfate, uric acid, adenosine, xanthine, guanosine, hypoxanthine, tyrosine, tryptophan, proline, alanine, aspartate, leucine, lysine, glutamine, glycine, streptomycin sulfate, Sephacryl S-200, Sephadex G-150, potassium phosphate, AMP, AMP-agarose, dithiothreitol (DTT), N,N,N,N-tetramethylethylenediamine(TEMED), N,N'-methylene-bis-acrylamide, acrylamide, ammonium persulfate, trisma base, coomassie brilliant blue R-250, sodium dodecyl sulfate(SDS), bovine serum albumin(BSA) 그리고 molecular weight marker는 Sigma사 제품을 사용하였고, BHI 배지는 Difco사 제품을 사용했다. 그 밖의 다른 시약은 시중에서 구입한 특급 내지 일급 제품을 사용하였다.

Purine nucleoside phosphorylase(PNP)의 활성도 측정

Purine nucleoside phosphorylase(PNP)의 활성도는 xanthine oxidase를 이용하여 coupled enzyme assay로 생성된 uric acid의 양을 측정하는 Kalckar의 방법을 사용하였다[9]. Assay tube에 20 mM potassium phosphate(pH 7.0), 1 mM inosine, 0.02 U xanthine oxidase 그리고 효소를 첨가하여 전체 반응액 부피를 1 ml이 되게 한 다음 30°C에서 1분 동안 반응시킨 후 UVIKON 930 spectrophotometer를 이용하여 293 nm에서 형성된 uric acid의 흡광도값을 측정하였다. PNP의 1 unit(U)는 30°C에서 1분당 흡광도 0.1의 증가로 정의하였다. 비활성도는 unit/mg protein 으로 표시하였다.

단백질 정량

단백질 양은 bovine serum albumin(BSA)을 표준 단백

질로 하여 Lowry 방법으로 정량하였다[17].

#### *Serratia marcescens* ATCC 25419의 배양

사면 배지에 보관된 균주의 single colony를 멸균된 BHI 배지 30 ml이 들어 있는 100 ml 삼각 플라스크에 접종한 후, 하룻밤 동안 30°C에서 진탕 배양한 후, 다시 이것을 2 l의 BHI배지가 들어있는 배양 플라스크에 옮긴 다음 15시간 동안 30°C에서 진탕 배양하였다.

#### 세포 추출물의 제조

배양에 의해 얻어진 세포는 10,000 × g로 4°C에서 30분간 원심 분리하여 세포를 수확한 후, 수확한 세포를 2~3배 부피의 sonication 완충 용액인 20 mM potassium phosphate 완충용액(pH 7.0, 1 mM EDTA, 1 mM DTT)에 현탁시켰다. 이 용액을 초음파 파쇄기를 이용하여 약 10분간 동안 세포를 파쇄한 다음, 10,000 × g에서 30분 동안 원심 분리한 후 상층액을 취하여 효소 활성에 사용하였다.

#### 황산 스트렙토마이신 처리

초음파로 파쇄하여 얻은 상층액을 3%(w/v) 황산 스트렙토마이신을 가한 후 10,000 × g에서 30분간 원심 분리하여 상층액을 취하였다. 이것을 sample volume의 100배 정도의 20 mM potassium phosphate 완충용액(pH 7.0)에 4°C에서 하룻밤 동안 투석하였다.

#### Sephacryl S-200 gel filtration chromatography

앞의 과정에서 얻은 효소 용액을 1 mM DTT가 포함된 20 mM potassium phosphate 완충용액(pH 7.0)으로 미리 평형에 이르게 한 Sephacryl S-200 gel filtration column (2.2 × 96 cm)에 효소용액을 loading하여 동일 완충용액으로 시간당 18 ml의 속도와 3 ml의 분획으로 용출시켰다.

#### AMP-agarose affinity chromatography

앞의 과정에서 얻은 효소 용액을 농축시킨 다음 AMP-free 완충용액에 미리 평형에 이르게 한 AMP-agarose affinity column(1.5 × 6 cm)에 이것을 loading한 후 동일 완충용액으로 280 nm에서 단백질의 흡광도가 0이 될 때까지 씻어주고 다시 10 mM AMP가 들어있는 20 mM potassium phosphate 완충용액(pH 7.0, 1 mM DTT가 포함)으로 흡착된 단백질을 용출시켜 시간당 10 ml의 속도로 2 ml의 분획으로 받았다. 위에서 얻은 효소용액을 모든 실험에서 사용하였다.

#### Nondenaturing polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)

정제된 PNP를 8% acrylamide running gel과 4% acry-

lamide stacking gel로 만든 vertical slab gel에 loading하여 전개시켰다. 전개가 끝난 후 Coomassie blue R-250이 들어 있는 염색 용액에 약 1시간 동안 담가 염색시킨 후 탈색시켜 단일 band를 확인하였다.

#### SDS-PAGE를 이용한 subunit 분자량 측정

정제된 PNP에 sample buffer를 넣고 100°C 물 증탕에서 10분간 가열하여 단백질을 완전히 변성시켜 molecular weight marker와 함께 전기 영동을 하였다. 이때 stacking gel은 4%, running gel은 15%의 acrylamide를 사용하였고, 완충용액과 gel에 모두 0.1% SDS를 포함하도록 하였다. 표준 단백질로는 bovine serum albumin(66 kD), egg albumin(45 kD), glyceraldehyde-3-P-dehydrogenase(36 kD), bovine carbonic anhydrase(29 kD), bovine panceas trypsinogen(24 kD), soybean trypsin inhibitor(20 kD)의 혼합물을 사용하였다. Gel상에 나타난 단백질 띠의 이동 거리를 측정하여 표준 단백질과 비교하여 subunit의 수와 크기를 계산하였다.

#### Sephadex G-150 gel filtration을 이용한 분자량 측정

PNP의 분자량은 Sephadex G-150 gel filtration을 이용하여 표준 단백질로  $\beta$ -amylase(200 kD), alcohol dehydrogenase(150 kD), albumin bovine serum(66 kD), carbonic anhydrase(29 kD)를 사용하여 용출되는 부피를 측정하였다. 측정 결과로부터 계산하여 직선을 그린 후 이 직선에 의해 분자량을 결정하였다.

#### Inosine과 deoxyinosine에 대한 Km값 결정

Inosine과 deoxyinosine에 대한 Km값은 phosphate의 농도를 고정시키고 기질의 농도를 변화시켜 가며 PNP의 활성도를 측정 한 후, Lineweaver-Burk plot을 그려 결정하였다.

#### PNP의 최적 pH 및 pH 안정성

100 mM sodium citrate 완충용액(pH 4.0, 5.0, 6.0), 100 mM sodium phosphate 완충용액(pH 6.0, 7.0, 8.0) 그리고 100 mM Tris-HCl 완충용액(pH 8.0, 9.0)에서 PNP의 활성도를 측정하였다. 한편, PNP와 100 mM sodium citrate 완충용액(pH 4.0, 5.0, 6.0), 100 mM sodium phosphate 완충용액(pH 6.0, 7.0, 8.0) 그리고 100 mM Tris-HCl 완충용액(pH 8.0, 9.0)과 30°C에서 10분간 먼저 반응시킨 뒤 일정양을 취해 남아 있는 PNP의 활성도를 측정하였다.

#### PNP의 최적 온도 및 열 안정성

10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80°C에서 PNP의 활성도를 측정하였다. 한편, 정제된 PNP 용액을 water bath를 사용하여 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80°C에서 각각 60분

간 열처리한 후, 일정량을 취해 남아 있는 PNP의 활성도를 측정하였다.

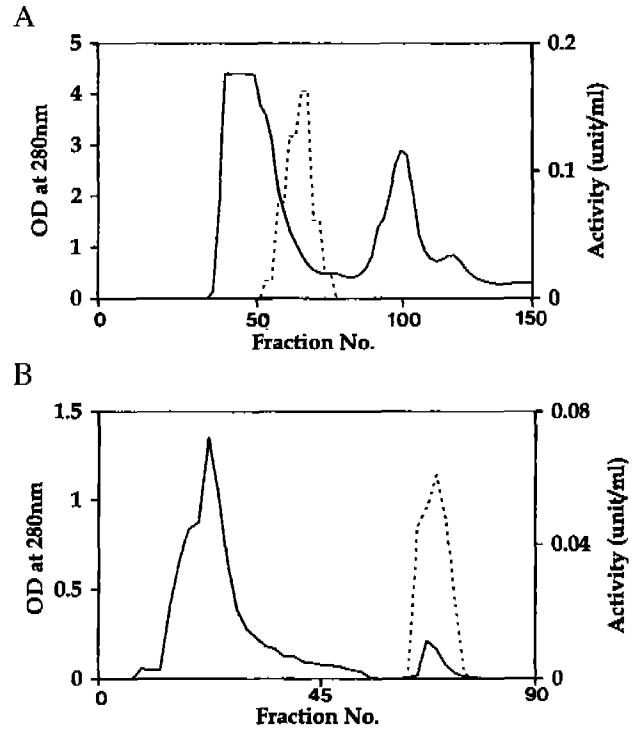
**여러 금속이온이 PNP의 활성에 미치는 영향**

정제한 PNP 용액에 0.5 mM의 일가 이온인 Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> 그리고 0.5 mM의 이가 이온인 Mg<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup> 그리고 삼가 이온인 Al<sup>3+</sup>를 첨가한 후 PNP의 활성도를 측정하였다.

**결과 및 고찰**

***S. marcescens* PNP의 정제**

정제 과정에서의 온도는 4°C를 유지하였다. 2의 BHI배지에 배양하여 수확한 세포 19 g을 초음파로 파쇄하여 모두 1850 mg의 단백질을 얻었으며 이 세포 추출물에 황산 스트렙토마이신을 3%(1.5 g/ml) 포화가 될 때까지 천천히 가한 후 10,000×g에서 원심 분리하여 상층액 부분을 모았다. 이 상층액 부분의 단백질(1,178 mg)을 10배 부피의 완충용액(20 mM potassium phosphate, pH 7.0)에 하룻밤 동안 투석하였다. 황산 스트렙토마이신 처리 단계에서 비활성도가 0.3 unit/mg 이었으며 회수율은 83%이었고 1.5배 정제되었다. 회수된 단백질을 미리 표준 완충용액으로 평형화시킨 Sephacryl S-200 gel filtration column(2.2×96 cm)에 효소용액을 loading하여 동일 완충용액으로 시간당 18 ml의 속도와 3 ml의 분획으로 용출시켰다(Fig. 2A). Sephacryl S-200 gel column 단계에서 비활성도가 2.9 unit/mg 이었으며 회수율은 73%이었고 14.7배 정제되었다. 효소 활성이 나타나는 분획을 모아 speed vac으로 농축한 다음 AMP-free 완충용액에 미리 평행에 이르게 한 AMP-agarose affinity column(1.5×6 cm)에 loading한 후 동일 완충용액으로 280 nm에서 단백질의 흡광도가 0이 될 때까지 씻어주고 다시 10 mM AMP가 들어있는 20 mM potassium phosphate 완충용액(pH 7.0, 1 mM DTT가 포함)으로 흡착된 단백질을 용출시켜 시간당 10 ml의 속도로 2 ml의 분획으로 받았다(Fig. 2B). 최종 affinity chromatography 단계에서 비활성도가 9.8 unit/mg 이었으며 회수율은 7%이었고 49배 정제되었다. *S. marcescens* purine nucleoside phosphorylase (PNP)의 정제 결과는 Table 1에 표시하였다. 정제한 단백질의 순도는 4°C에서 전기영동 하여 나타난



**Fig. 2. Purification of purine nucleoside phosphorylase from *Serratia marcescens* ATCC 25419.**

A: Sephacryl HR S-200 gel filtration chromatography, B: AMP-agarose affinity chromatography. Protein profile, (—); activity profile, (---)

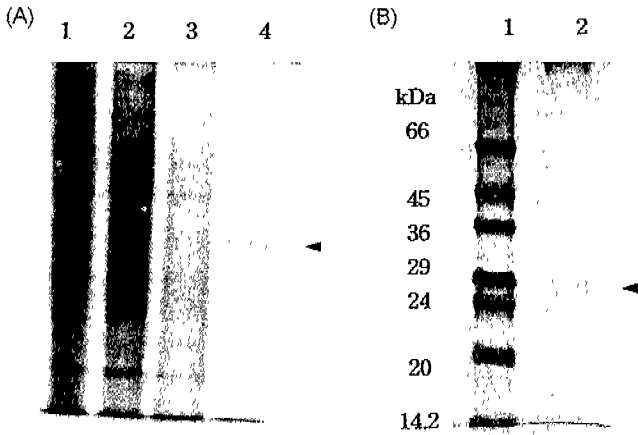
단일 단백질 띠로 확인할 수 있었다(Fig. 3A). 이렇게 얻은 PNP 용액을 모든 실험에서 사용하였다.

***S. marcescens* PNP의 분자량**

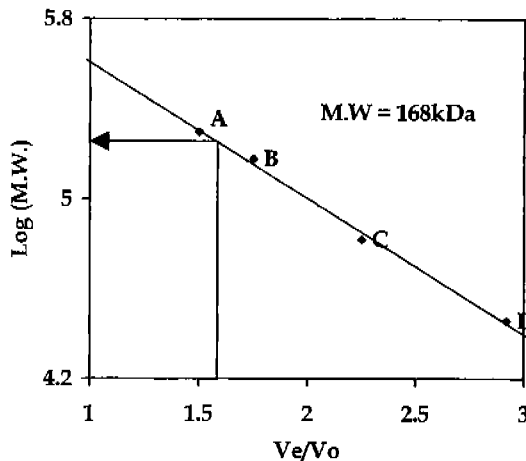
*S. marcescens* PNP의 분자량을 결정하기 위하여 정제한 PNP 용액을 Sephadex G-150 gel filtration을 수행한 결과, 표준 단백질과 비교하여 분자량을 계산한 바 168,000 달톤이었다(Fig. 4). 또한, *S. marcescens* PNP는 SDS-PAGE상에서 단일 단백질 띠를 얻을 수 있었으며 표준 단백질과 비교하여 측정된 subunit 분자량 크기가 28,000 달톤이었다(Fig. 3B). 대부분의 세균 PNP는 subunit 분자량이 25,000-28,000 달톤의 hexamer 형태로 존재하는 반면 척추동물 PNP는 dimer 또는 trimer로 보고되었다[1,7,8,10,11,14,15,16,23,24,26,29]. *E. coli*와 *S. typhimurium* PNP

**Table 1. Purification of *Serratia marcescens* ATCC 25419 purine nucleoside phosphorylase**

Step	Total volume (ml)	Total activity (unit)	Total protein (mg)	Specific activity (unit/mg)	Purification (-fold)	Recovery (%)
Crude extract	50	442.5	1850	0.2	1	100
Streptomycin sulfate	39	366.6	1178	0.3	1.5	83
Sephacryl HR S-200	21	323.4	110	2.9	14.7	73
AMP-agarose	8	30.7	3.1	9.8	49	7



**Fig. 3. Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) of *S. marcescens* purine nucleoside phosphorylase.**  
 A: Nondenaturing PAGE (8%); lane 1. crude extract, lane 2. streptomycin sulfate, lane 3. Sephacryl S-200 gel filtration, lane 4. AMP-agarose affinity chromatography, B. SDS-PAGE (15%); lane 1. molecular markers, lane 2. the purified enzyme. The position of purine nucleoside phosphorylase is indicated by an arrow

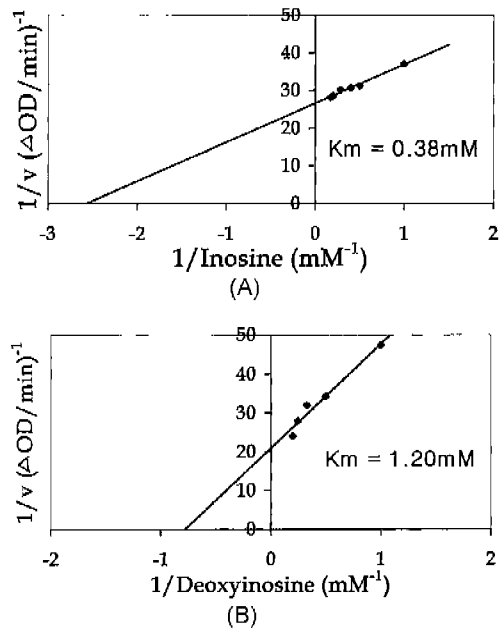


**Fig. 4. Determination of the molecular weight of *S. marcescens* purine nucleoside phosphorylase by Sephadex G-150 gel filtration chromatography.**  
 A:  $\beta$ -amylase (200 kD); B, alcohol dehydrogenase (150 kD); C, bovine serum albumin (66 kD); D, carbonic anhydrase (29 kD). The position of purine nucleoside phosphorylase is indicated by an arrow

는 native 분자량과 subunit 분자량이 각각 138,000, 23,700 달톤 그리고 141,000, 23,500 달톤으로 보고되었다. 본 실험에서 정제한 *S. marcescens* PNP의 native와 subunit 분자량 크기가 이들 *E. coli*와 *S. typhimurium* PNP보다 약간 크고 구성 subunit는 hexamer 형태임을 알 수 있었다.

***S. marcescens* PNP의 성질**

Lineweaver-Burk plot를 이용하여 결정한 inosine과



**Fig. 5. Km values for inosine (A) and deoxyinosine (B) of *S. marcescens* purine nucleoside phosphorylase.**

deoxyinosine에 대한 Km값은 각각 0.38, 1.20 mM이었다 (Fig. 5). *E. coli*와 *S. typhimurium* PNP의 Km값은 inosine을 기질로 사용한 경우 각각 0.09, 0.17 mM이고 deoxyinosine을 사용한 경우에는 0.07, 0.18 mM이라고 보고되었다[8]. *S. marcescens* PNP는 inosine과 deoxyinosine에 대한 Km값에서 *E. coli*와 *S. typhimurium* PNP보다 각각 4, 7배정도 높은 정도로 미루어 보아 이들 기질의 친화도는 낮았다. 한편, *Saccharomyces cerevisiae* PNP는 inosine보다 deoxyinosine에 대한 효소 활성이 40% 정도 높다고 보고되었다[2]. Inosine, guanosine 그리고 adenosine과 이들의 deoxynucleotide는 PNP의 가인산 분해 반응에 의하여 대응 염기를 생성한다. *Micrococcus luteus* PNP는 기질인 inosine과 guanosine과는 정상적으로 반응하지만, adenosine과는 아주 천천히 반응하고 inosine 유사체인 formycin B를 분해하지 못하며 pyrimidine nucleoside 중에서 thymidine은 기질로 작용하나 uridine은 작용하지 않는다고 보고되었다[3]. 대부분의 포유동물 PNP는 1-methylinosine, 1-methylguanosine, 7-methylinosine 그리고 7-methylguanosine은 기질로 작용한다고 보고되었다[2]. 이러한 결과들은 기질의 고리 N-7과 N-1 원자는 세균 PNP와의 결합 자리에 포함되지 않는다고 추측된다. 기질 특이성 면에서 *E. coli* PNP는 adenine과 그 유사체를 기질로 사용하지만, 포유동물 PNP는 adenine과 그 유사체를 유리 염기로 분해하지 못하는 등, 이러한 PNP의 광범위한 분포와 다양한 기질 특이성은 nucleoside 합성의 촉매가 널리 퍼져 있다는 것을 보여 준다.

4.0에서 9.0까지 pH를 변화시켜가며 PNP의 활성을 측정하

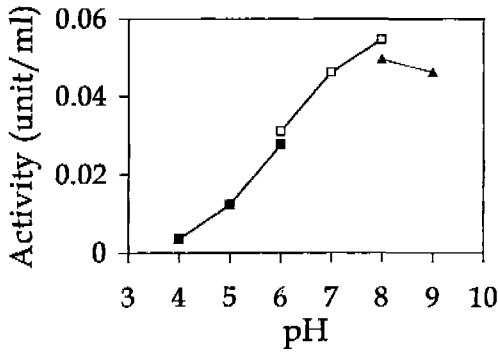


Fig. 6. Optimum pH of *S. marcescens* purine nucleoside phosphorylase.

Enzyme activity was assayed ranging pH 4 to 9 as Material and Method. (■-■), 100 mM Sodium citrate buffer; (□-□), 100 mM Sodium phosphate buffer; (▲-▲), 100 mM Tris-HCl buffer

결과, pH 8.0에서 PNP의 최대 활성을 나타냈으며 *E. coli*와 *S. typhimurium* PNP의 최적 pH는 7.0~7.5라고 보고되었다 [8] (Fig. 6). 이러한 결과는 PNP의 최적 pH는 assay 용액의 pH인 7.0보다 약간 높은 약알칼리성이었다. 또한 같은 구간의 완충용액에 대한 pH 안정성 조사에서도 pH인 7.0부터 9.0까지의 약알칼리성 조건에서 가장 안정하였다. 10에서 80°C까지 온도를 변화시켜 가며 *S. marcescens* PNP의 활성도를 측정하였을 때 효소 활성의 측정 온도인 30°C를 포함한 50°C 구간까지는 온도가 증가함에 따라 PNP의 활성이 증가하여 비례 형태를 나타냈으며, 50°C에서 최대 활성을 보여 주었다 (Fig. 7). 한편, 정제된 PNP를 4에서 70°C까지의 온도 범위에서 열처리 한 후 PNP의 활성도를 측정하였는데 4에서 40°C까지는 PNP의 활성이 최대 43% 감소되는 정도로 열에 안정하였으며 60°C에서는 PNP의 활성이 절반 이상인 60% 정도 감소되었다(Fig. 7). 이러한 결과들로부터 *S. marcescens* PNP는 비교적 열에 안정한 단백질임을 알 수 있었다.

Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, 그리고 Ca<sup>2+</sup>은 *S. marcescens* PNP의 활성도를 25~30% 정도 감소시켰고 Mn<sup>2+</sup>과 Al<sup>3+</sup>는 45% 정도 감소시켰다. 그리고 Cu<sup>2+</sup>는 PNP의 활성도를 98% 감소시키는 것으로 보아 효소의 작용을 억제하는 것을 알 수 있었다(Table. 2). 또한, *S. cerevisiae* PNP도 Cu<sup>2+</sup>에 의해 효소 활성이 93% 감소된다고 보고되었다[2]. *S. typhimurium* PNP는 Fe<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup> 그리고 Ni<sup>2+</sup>을 첨가하여도 PNP의 활성도에는 영향을 주지 않는다고 보고되었다[23].

위의 사실들을 종합해 볼 때 세 enteric bacteria인 *E. coli*, *S. typhimurium* 그리고 *S. marcescens* PNP의 일반적인 특성들이 서로 유사할 지라도 *S. marcescens* PNP는 *E. coli*, *S. typhimurium* PNP와 비교하여 native와 subunit 분자량, inosine과 deoxyinosine에 대한 Km값, 금속 이온의 영향 등에서 서로 다르다는 것을 보여주었으며 이러한 사실은 세 enteric bacteria의 PNP가 서로 작은 차이점이 있다는 것을 반영하며 이러한 사실을 규명하기 위해서는 반응론과 활성 부위 등에 관한 보

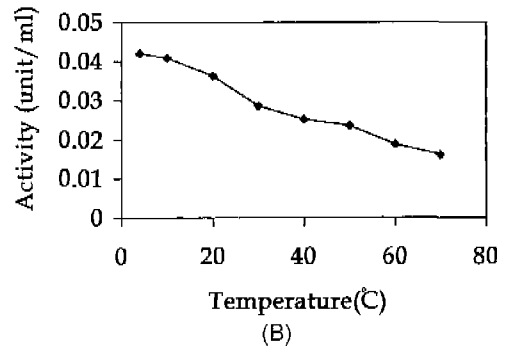
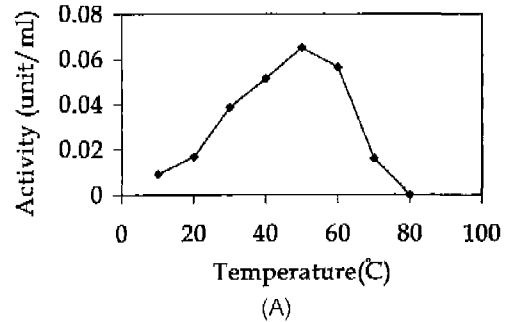


Fig. 7. Optimum temperature (A) and heat stability (B) of *S. marcescens* purine nucleoside phosphorylase.

Enzyme activity was assayed ranging 4 to 80 as Material and Method

Table 2. Effects of various metals on activity of *S. marcescens* purine nucleoside phosphorylase

Metals	Conc. (mM)	Relative activity (%)
Control	0	100
NaCl	0.5	69
KCl	0.5	73
MgCl <sub>2</sub>	0.5	65
CuCl <sub>2</sub>	0.5	2
CaCl <sub>2</sub>	0.5	76
MnCl <sub>2</sub>	0.5	57
AlCl <sub>3</sub>	0.5	54

다 심층적인 연구를 수행하여야 할 것으로 사료된다.

요 약

*Serratia marcescens* ATCC 25419의 purine nucleoside phosphorylase(PNP)는 streptomycin sulfate treatment, Sephacryl S-200 gel filtration, AMP-agarose affinity chromatography 등의 방법으로 정제하였는데 최종 단계에서 9.8 unit/mg 이었으며 회수율은 7%이었고 49배 정제되었다. *S. marcescens* PNP는 native 분자량이 Sephadex G-150을 이용한 gel filtration 방법으로 168,000 달톤, SDS-PAGE에 의한 subunit의 분자량이 28,000 달톤이었으며, 동일한 subunit로 구성된 homer-hexamer 형태이었다. *S. marcescens*

PNP의 inosine과 deoxyinosine에 대한  $K_m$ 값은 각각 0.38, 1.20 mM이었다. *S. marcescens* PNP의 최적 pH와 최적 온도는 각각 8.0, 50°C이었으며 또한, 50°C에서 PNP의 활성이 절반 정도 감소되는 것으로 보아 비교적 열에 안정한 단백질이었다. *S. marcescens* PNP는  $Cu^{2+}$ 에 의해 효소 활성이 완전히 억제되었다.

## REFERENCES

- Cacciapuoli, G. and M. Porcelli. 1994. Purification and extremely thermophilic and thermostable 5'-methylthioadenosine phosphorylase from the archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *J. Biol. Chem.* **269**: 24762–24769.
- Choi, H. S. 1991. Partial purification and characterization of purine nucleoside phosphorylase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Kor. Microbiol.* **29**: 172–178.
- Choi, H. S. 1996. Purification and characterization of purine nucleoside phosphorylase in *Micrococcus luteus*. *Kor. J. Microbiol.* **31**: 82–89.
- David, J. and T. Porter. 1992. Purine nucleoside phosphorylase. *J. Biol. Chem.* **267**: 7342–7351.
- Ealick, S. E., Y. S. Babu, C. E. Bugg, M. D. Erion, W. C. Guida, J. A. Montgomery, and J. A. Secrist, 3rd. 1991. Application of crystallographic and modeling methods in the design of purine nucleoside phosphorylase inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88**: 11540–11544.
- Gilbertson, R. B., K. K. Dong, L. M. Kossarek, J. C. Sircar, C. R. Kostlan, and M. C. Conroy. 1991. Selective in vitro inhibition of human molt-4 lymphoblasts by the novel purine nucleoside phosphorylase inhibitor, CI-972. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **178**: 1351–1358.
- Ikezawa, Z., T. Nishino, K. Murakami, and K. Tsushima. 1977. Purine nucleoside phosphorylase from bovine liver. *Comp. Biochem. Physiol.* **60B**: 111–116.
- Jensen, K. F. 1978. Two purine nucleoside phosphorylase in *Bacillus subtilis*. *Biochim. Biophys. Acta.* **525**: 346–256.
- Kalckar, H. M. 1947. Differential spectrophotometry of purine compounds by means of specific enzyme. *J. Biol. Chem.* **167**: 429–443.
- Kamel, M. Y., and A. S. Fahmy. 1991. Purification and characterization of purine nucleoside phosphorylase from developing embryos of *Hyalomma dromedarii*. *Biochem. Cell Biol.* **69**: 223–231.
- Kim B. K., S. M. Cha, and R. E. Parks. 1968. Purine nucleoside phosphorylase from human erythrocytes. *J. Biol. Chem.* **243**: 1763–1770.
- Kremitsky, T. A., G. W. Koszalka, and J. V. Tuttle. 1981. Purine nucleoside synthesis, an efficient method employing nucleoside phosphorylase. *Biochemistry.* **20**: 3015–3021.
- Krenitsky, T. A., J. V. Tuttle, W. H. Miller, A. R. Moorman, G. F. Orr, and L. Beauchamp. 1990. Nucleoside analogue inhibitors of purine nucleoside phosphorylase. *J. Biol. Chem.* **265**: 3066–3069.
- Lewis, A. S. 1978. Rabbit brain purine nucleoside phosphorylase. *Arch. Biochem. Biophys.* **190**: 662–670.
- Lewis, A. S. and M. D. Glantz. 1976. Monomeric purine nucleoside phosphorylase from rabbit liver. *J. Biol. Chem.* **251**: 407–413.
- Ling, F., Y. Inoue, and A. Kimura. 1990. 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.
- Lowry, O. H., N. J. Rosenbrough, A. L. Farr, and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265–275.
- Martin, Jr., D. W., and E. W. Gelfand. 1981. Biochemistry of diseases of immunodevelopment. *Ann. Rev. Biochem.* **50**: 845–877.
- Moyer, T. P. and G. Fischer. 1976. Purification and characterization of purine nucleoside phosphorylase from bovine thyroid. *Arch. Biochem. Biophys.* **174**: 622–629.
- Osborne, W. R. A. 1986. Nucleoside kinases in T and B lymphoblasts distinguished by autoradiography. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **83**: 4030–4034.
- Pribe, T., O. Kandil, M. Nakic, B. F. Pan, and J. A. Nelson. 1988. Selective modulation of antibody response and natural killer cell activity by purine nucleoside analogues. *Cancer Res.* **48**: 4799–4803.
- Renout, J. A., A. Wood, I. H. Frazer, Y. H. Thong, and A. H. Chalmer. 1989. Depressed activities of purine enzymes in lymphocytes of patients infected with human immunodeficiency virus. *Clin. Chem.* **35**: 1478–1481.
- Robertson, B. C. and P. A. Hoffee. 1973. Purification and properties of purine nucleoside phosphorylase from *Salmonella typhimurium*. *J. Biol. Chem.* **25**: 2040–2043.
- Savage, B. and N. Spencer. 1978. Partial purification and of purine nucleoside phosphorylase from rabbit erythrocytes. *Biochem J.* **167**: 703–710.
- Stoeckler, J. D., J. B. Ryden, R. E. Parks, Jr., M. Y. Chu, M. L. Lim, W. Y. Ren, and R. S. Klein. 1986. Inhibitors of purine nucleoside phosphorylase: effects of 9-deazapurine ribonucleosides and synthesis of 5'-deoxy-5'-iodo-9-deazainosine. *Cancer Res.* **46**: 1744–1778.
- Surette, M., Gill, T., and S. MacLean. 1990. Purification and characterization of purine nucleoside phosphorylase from *Proteus vulgaris*. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 1435–1439.
- Tuttle, J. V. and T. A. Krenitsky. 1984. Effects of acyclovir and its metabolites on purine nucleoside phosphorylase. *J. Biol. Chem.* **259**: 4065–4069.
- Utagawa, T., H. Morisawa, F. Yoshinaga, A. Yamazaki, K. Mitsugi, and Y. Hirose. 1985. Microbiological synthesis of adenine arabinoside. *Agric. Biol. Chem.* **49**: 1053–1058.
- Zannis, V., D. Doyle, and D. W. Martin, Jr. 1978. Purification and characterization of human erythrocyte purine nucleoside phosphorylase and its subunits. *J. Biol. Chem.* **253**: 504–510.

(Received June 22, 2000)