

Streptomyces sp. J-350 P가 생산하는 세포외 Adenine Deaminase의 효소학적 성질

전홍기*·박정혜·김태숙

부산대학교 자연과학대학 미생물학과

The Enzymatic Properties of Extracellular Adenine Deaminase from *Streptomyces* sp. J-350P

Jun, Hong-Ki*, Jeong-Hae Park and Tae-Sook Kim

Department of Microbiology, College of Natural Sciences,
Pusan National University, Pusan 607, Korea

The apparent Michaelis constant K_m of extracellular adenine deaminase from *Streptomyces* sp. J-350P was $5.8 \times 10^{-5} M$. The activation energy of the enzyme was calculated from Arrhenius plots for adenine and the value was 3.13 Kcal/mole. The purine analogues, 6-chloropurine, 2,6-diaminopurine, 6-bromopurine, 4-aminopyrazolo[3,4-d]pyrimidine, 6-iodopurine, and 8-bromoadenine were substrates for the enzyme. 6-Dimethylaminopurine was a competitive inhibitor of the enzyme. The enzyme was inhibited by 0.1mM of Fe^{3+} , Ag^+ , and Hg^{2+} and 1 mM of α, α' -dipyridyl, pentachlorophenol, and *p*-chloromercuribenzoate.

Adenine을 포함한 purine 화합물들은 일반적으로 미생물의 생육을 저해하는 것으로 알려져 있다(1, 2). *E. coli* K 12 W 3110의 경우에는 adenine 첨가 배지에서 균의 생육과 DNA, RNA, 단백질의 합성이 저해되었으며 이러한 저해는 pyrimidine nucleotide의 *de novo* 합성의 저해에 의하고, orotic acid의 uridine monophosphate로의 전환단계에서 작용한다고 한다(3). Newell과 Tucker(4, 5)는 *E. coli*에서의 adenine 및 purine 화합물에 의한 생육저해는 purine 생합성의 feedback inhibition에 의한다고 보고하였다.

미생물에 대한 adenine과 purine의 생육저해 및 분해산물의 생체내 축적(6, 7)으로 인한 부작용을 해결하기 위해서는 purine 관련물질의 생체내에서의 대사경로 및 조절기구가 더욱 명확히 밝혀져야 할

것이다.

전보(8, 9)에서는 세포외 adenine deaminase를 생산하는 방선균인 *Streptomyces* sp. J-350 P의 분리 및 효소의 정제 등에 관하여 보고하였다.

본 연구에서는 *Streptomyces* sp. J-350 P가 생산하는 세포외 adenine deaminase의 부분정제된 효소를 사용하여 그 효소학적인 성질을 검토한 결과를 보고한다.

재료 및 방법

시 약

Adenine, hypoxanthine 및 purine 관련물질은 Sigma Chemical Co. 제품을 사용하였으며, 기타 시약은 시판 특급품을 사용하였다.

Key words: Extracellular adenine deaminase, enzymatic properties

* Corresponding author

효 소

전보 (9)에서와 같은 방법으로 부분정제한 *Streptomyces* sp. J-350 P의 세포의 adenine deaminase 를 사용하여 효소의 성질을 검토하였다.

효소의 활성 측정

Adenine deaminase의 활성은 기질과 반응 생성물과의 흡광도의 차이에 의하여 생기는 265 nm에서의 흡광도의 감소를 이용한 Kalckar의 방법 (10)을 응용하여 초속도를 측정하였다. Standard assay는 0.1 M potassium phosphate buffer(pH 7.0)와 0.1 mM의 기질 및 적당량의 효소액을 첨가하여 final volume을 3 ml로 한 반응 system에서 측정하였다. 효소 1 unit는 standard assay condition에서 1분 동안 1 μmole의 adenine을 탈 아미노화하는데 필요한 효소의 양으로 정하였다.

Adenine deaminase의 Km 값은, 0.02~0.1 mM의 adenine에 대한 초속도를 구하여 측정하였으며, adenine의 각 농도에 대하여 3번의 반복된 실험을 행하여 그 평균값을 구하여 결과를 얻었다.

여러 기질에서의 효소의 활성을 구하기 위하여 6-chloropurine은 245 nm, 6-iodopurine은 275 nm, 6-bromopurine은 250 nm, 2, 6-diaminopurine은 245 nm, 8-bromo adenine과 4-aminopyrazolo[3, 4-d] pyrimidine은 275 nm의 파장에서 각각 초속도를 측정하였다.

특별한 설명이 없는 한 실험재료와 방법은 전보 (9)에서 설명한 방법대로 진행하였다.

결 과

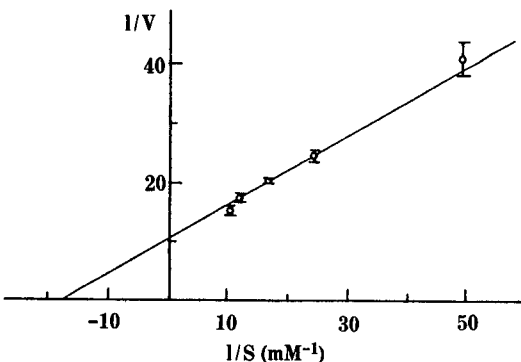


Fig. 1. Effect of substrate concentration on adenine deaminase

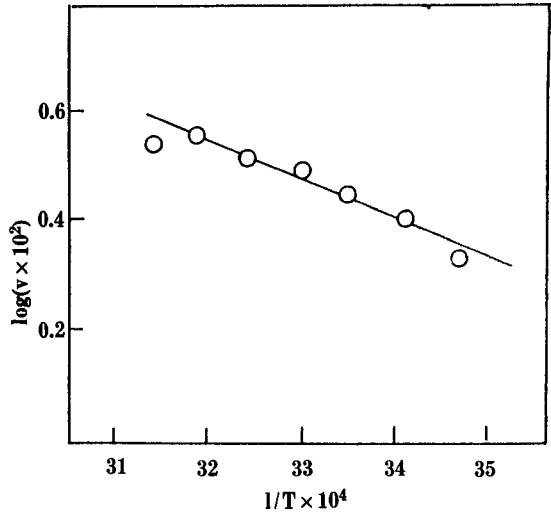


Fig. 2. Effect of temperature on the reaction rate of adenine deaminase from J-350P

The data are plotted as log vs. the reciprocal of the absolute temperature (°K).

기질농도의 영향

Streptomyces sp. J-350 P가 생산하는 세포의 adenine deaminase의 활성에 미치는 기질농도의 영향을 검토하였다. 0.1 M potassium phosphate buffer(pH 7)에서 adenine에 대한 Km 값을 Lineweaver and Burk plot(11)으로 부터 측정된 결과, 본 효소의 adenine에 대한 Km 값은 5.8×10^{-5} M이었다(Fig. 1).

Activation energy

0.1 M potassium phosphate buffer(pH 7.0)에서 효소의 활성과 온도와의 영향을 검토하였다. Fig. 2에 나타낸 바와 같이 Arrhenius plot을 실시한 결과 adenine deaminase의 activation energy는 3.13 Kcal/ mole로 계산하였다.

기질 특이성

여러가지 purine 관련물질에 대한 효소의 활성을 검토하여 Table 1에 그 결과를 나타내었다. 검토한 화합물 중 본 효소는 6-chloropurine, 6-iodopurine, 6-bromopurine, 2, 6-diaminopurine, 8-bromo adenine, 4-aminopyrazolo[3, 4-d] pyrimidine을 기질로 이용하였으나, 6-mercaptapurine, 6-dimethylaminopurine, 6-benzyladenine, 8-azaadenine에 대하여는 활성을 나타내지 않았다.

Table 1. Adenine deaminase activity on purine analogues

Compound	V _{max} (Relative)	K _m (mM)
Adenine	100	0.058
6-Mercaptopurine	not reacted	
6-Chloropurine	20	1.0
6-Iodopurine	17	1.0
6-Bromopurine	7.6	1.1
6-Dimethylaminopurine	not reacted	
6-Benzyladenine	not reacted	
2,6-diaminopurine	11	0.67
8-Azaadenine	notreacted	
8-Bromoadenine	25	1.0
4-Aminopyrazolo[3,4,-d]pyrimidine	20	0.5

Enzyme activity was determined by standard assay method except that the substrate was changed as indicated. Maximum velocities and K_m values were obtained from Lineweaver-Burk plots.

Table 2. Effect of purine compounds on adenine deaminase activity

Compound (0.1 mM)	Relative activity
8-Azaadenine	85
6-Dimethylaminopurine	67
6-Benzyladenine	103
6-Iodopurine	113
6-Mercaptopurine	103
Urea	86
Theophylline	90
Theobromine	81
5-Fluorocytosine	89
Thymine	82
Inosine	91
Uric acid	94
Uracil	85
Cytosine	93
Xanthosine	94
Hypoxanthine	91
Guanine	90

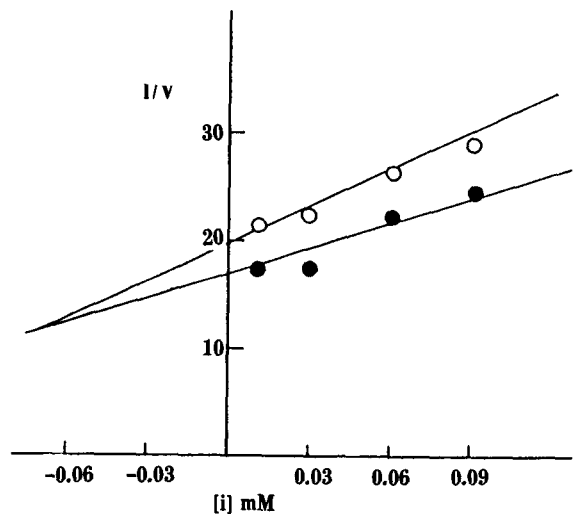
The reaction was carried out under standard assay condition except that purine compound was added as indicated.

Purine analogue의 영향

0.02~0.1 M의 adenine 농도에 대하여 purine analogue의 농도를 달리하여 첨가한 후 standard assay method에 따라 효소반응을 행하였다. Adenine에 대한 본 효소의 활성에 미치는 여러가지 purine 화합물의 영향을 검토하고 그 결과를 Table 2에 나타내었다. 표에 나타낸 바와 같이 6-dimethylaminopurine과 8-azaadenine에 의해 본 효소의 활성이 크게 저해되었다. Dixon plot(12)을 실시한 결과 6-dimethylaminopurine은 adenine에 대한 경쟁적 저해제로 작용하였으며 그 K_i 값은 0.08 mM로 측정되었다(Fig. 3).

금속이온의 영향

여러가지 금속이온이 효소의 활성에 미치는 영향을 검토하여 그 결과를 Table 3에 나타내었다. 본 효소는 Fe³⁺, Hg²⁺, Ag⁺, Zn²⁺ 등의 몇가지 금속이온에 의해 활성이 저해되었다. Ag⁺, Zn²⁺, Cu²⁺에 의해 저해된 효소의 활성은 ethylenediamine-tetraacetate(EDTA)에 의해 회복되었으나(Table 4), Hg²⁺에 의해 저해된 본 효소의 활성은 EDTA와 sodium cyanide에 의해 회복되지 않았다. Ag⁺와 Zn²⁺에 의한 저해는 sodium cyanide에 의해 부분적으로 회복되었다.

**Fig. 3. Inhibition of adenine deaminase by 6-dimethylaminopurine**

The reaction mixture and conditions were those of the standard assay system described in the text.

○, Rate with 0.06mM of adenine; ●, rate with 0.09mM of adenine.

Table 3. Effect of metal ions on adenine deaminase activity

Metal ion	Relative activity			
	1mM	0.5mM	0.1mM	0.01mM
None	100	100	100	100
BaCl ₂	92		108	
CaCl ₂	100		100	
CoCl ₂	93		98	
CuCl ₂	71		75	
FeCl ₃	0	24	73	
Pb(NO ₃) ₂	95		93	
MgCl ₂	120		115	
HgCl ₂	0		0	12
NiCl ₂	93		100	
KCl	99		99	
SnCl ₂	99		94	
AgNO ₃	0		8	25
ZnCl ₂	95		60	
Li ₂ SO ₄	120		115	

The enzyme was preincubated with each metal ion in 0.01M potassium phosphate buffer, pH 7.0 at 37°C for 10 min. After then, the activity was measured by standard assay method.

효소 저해제의 영향

일반적 효소 저해제들이 본 효소의 활성화에 미치는 영향을 검토하였다. Table 5에 나타낸 바와 같이, α, α'-dipyridyl, o-phenanthroline 등의 착염형성 시약은 1 mM의 농도에서 효소의 활성화는 크게 저해하였다. 그 외에 pentachlorophenol, p-CMB 등도 1 mM과 0.1 mM에서 효소의 활성을 크게 저해하였다. 0.1 mM의 α, α'-dipyridyl과 pentachlorophenol에 의해 저해된 효소에 몇가지 금속이온을 가하여 효소의 활성을 측정하였다(Table 6). 착염형성 시약인 α, α'-dipyridyl에 의해 저해된 효소의 활성화는 Mg²⁺ 0.2 mM과 Cu²⁺ 0.2 mM에 의해 각각 회복되었다.

Sulphydryl compound의 영향

0.05 mM의 p-CMB에 의해 저해된 효소에 0.1 mM의 sulphydryl compound를 가하여 잔존 활성을 측정하였다. Table 7에서 보는 바와 같이 2-mercaptoethanol을 제외한 다른 시약은 효소의 활성회복에 아무런 영향도 주지 못하였다.

Table 4. Effect of some reagents on the adenine deaminase inhibited by metal ion

First incubation	Second incubation	Relative activity
None	None	100
None	EDTA 0.2mM	101
"	NaCN "	109
HgCl ₂ 0.01mM	None	12
"	EDTA 0.2mM	12
"	NaCN "	8
AgNO ₃ 0.01mM	None	22
"	EDTA 0.2mM	100
"	NaCN "	115
ZnCl ₂ 0.1 mM	None	58
"	EDTA 0.2mM	114
"	NaCN "	87
CuCl ₂ 0.01mM	None	58
"	EDTA 0.2mM	98
"	NaCN "	54

The enzyme was preincubated with each metal ion at 37°C for 10 min, and then with each reagent for further 10 min. The enzyme activity was measured by standard assay method.

Table 5. Effect of some reagents on adenine deaminase activity

Reagent	Relative activity		
	1mM	0.1mM	0.05mM
None	100	100	100
α, α'-Dipyridyl	0	82	
NaCN	88	107	
o-Phenanthroline	10	114	
EDTA*	99	105	
Pentachlorophenol	6	63	
Monoiodoacetate	101	88	
Na ₂ AsO ₂	138	131	
N-Ethylmaleimide	93	100	
p-CMB**	0	16	67
NaF	91	101	
NaN ₃	97	98	
Trichloroacetate	98	100	

After incubation with the reagent at 37°C for 10 min, the enzyme activity was measured immediately.

* Ethylenediaminetetraacetic acid;

** p-chloromercuribenzoic acid.

Table 6. Effect of metal ions on the adenine deaminase inhibited by some reagents

First incubation	Second incubation	Relative activity
None	None	100
None	BaCl ₂ 0.2mM	108
	MgCl ₂ "	110
	CaCl ₂ "	100
	Li ₂ SO ₄ "	116
α, α -Dipyridyl 0.1mM	None	72
	BaCl ₂ 0.2mM	73
	MgCl ₂ "	104
	CaCl ₂ "	103
	Li ₂ SO ₄ "	72
Pentachlorophenol 0.1mM	None	69
	BaCl ₂ 0.2mM	104
	MgCl ₂ "	99
	CaCl ₂ "	62
	Li ₂ SO ₄ "	70

The enzyme was preincubated with each reagent for 10 min, and then with each metal ions for further 10 min.

Table 7. Effect of sulphhydryl compounds on adenine deaminase inhibited by *p*-CMB

First incubation	Second incubation	Relative activity
None	None	100
<i>p</i> -CMB 0.05mM	None	81
"	Glutathione 0.1mM	86
"	Cystein "	81
"	2-Mercaptoethanol "	95

Reaction conditions are the same as those in table 6.

Alkylating agent의 영향

0.05mM의 *p*-CMB에 의해 저해된 본 효소에 alkylating agent를 가하여 효소의 활성을 측정하였다. Table 8에서와 같이 *p*-CMB에 의해 실패된 효소의 활성은 회복되지 않았다. 0.1 mM의 monoiodoacetate와 *N*-ethylmaleimide로 전처리한 효소에 *p*-CMB를 가하였을 경우에도 효소의 활성은 전처리하지 않고 *p*-CMB만 가했을 경우와 비슷한 잔존활성을 나타내었다.

Table 8. Effect of alkylating agents on adenine deaminase inhibited by *p*-CMB

First incubation	Second incubation	Relative activity
None	None	100
<i>p</i> -CMB	None	81
"	Monoiodoacetate 0.1mM	67
"	<i>N</i> -Ethylmaleimide 0.1mM	78
Monoiodoacetate 0.1mM	<i>p</i> -CMB 0.05mM	69
<i>N</i> -Ethylmaleimide 0.1mM	"	84

Reaction conditions are the same as those in table 7.

Adenine에 대한 *Streptomyces* sp. J-350 P 효소의 Km 값은 5.8×10^{-5} M로 측정되었다. *Saccharomyces cerevisiae*의 효소는 7.1×10^{-5} M로 보고되어 있으며(13), 그 외 *Candida utilis*와 *Azotobacter vinelandii*의 효소도 10^{-5} M의 수준에서 측정되었다(14). *Pseudomonas*의 효소는 10^{-4} M(15), 원생동물인 *Crithidia*의 경우에는 10^{-3} M의 수준에서 측정되어 있어(16) 본 효소의 Km 값은 효모기원의 세포내 효소와 가장 비슷한 것을 알 수 있었으며, 원생동물 기원의 세포내 효소보다 기질에 대한 친화력이 더 큰 것으로 나타났다.

여러가지 purine analogue에 대한 기질특이성은 *Pseudomonas*속의 세포내 효소와 대체로 일치되는 결과를 보였으나, *Pseudomonas*속의 경우에는(17) 4-aminopyrazolo[3, 4-*d*]pyrimidine을 기질로 이용하지 않은 반면 *Streptomyces* sp. J-350 P의 효소는 기질로 이용하였다. Purine analogue의 adenine에 대한 저해효과는, 6-dimethylaminopurine의 경우 *P. synxantha* A 3와 마찬가지로 경쟁적인 저해양식을 보였으나, Ki 값은 본 효소의 경우 훨씬 낮은 값으로 측정되었다.

금속이온에 의한 영향을 알아보면, *P. synxantha* A 3의 효소는 0.15mM의 Cu²⁺, Hg²⁺, Zn²⁺, Co²⁺ 등에 의해 저해되었으며(17), Co²⁺, Cd²⁺, Hg²⁺에 의한 저해는 EDTA에 의해 회복되는 것으로 보고되어 있다. *Azotobacter vinelandii*의 효소는 Mn²⁺ 0.01%에 의해 효소활성이 크게 저해되었으나(18), 본 효소는 Fe³⁺, Hg²⁺, Ag⁺, Zn²⁺ 등의 금속이온에 의해 크게 저해되었고, Ag⁺, Zn²⁺, Cu²⁺에 의한 저해

는 EDTA에 의해 회복되었으나, Hg^{2+} 과 Zn^{2+} 에 의해 저해된 효소의 활성은 EDTA에 의해 회복되지 않았다.

일반적인 효소저해제의 영향을 살펴 본 결과 *P. synxantha* A 3의 효소(17)와 본 효소는 다 함께 α , α' -dipyridyl, *o*-phenanthroline 등의 착염형성 시약과 *p*-CMB에 의해 크게 저해되었으며, *p*-CMB에 의해 저해된 효소의 활성은 monoiodoacetate, *N*-ethylmaleimide 등으로 먼저 전처리한 효소에 *p*-CMB를 가하였을 때에도 효소를 보호하지 못하는 것으로 나타났다. Ronca(19)는 adenosine deaminase의 경우 *p*-CMB에 의해 실패되며, alkylating agent인 iodoacetamide, iodoacetate, *N*-ethylmaleimide 등은 효소의 활성에 별다른 영향을 주지 못하였으며, 이들 화합물로 전처리한 효소에 *p*-CMB를 가하였을 때에도 *p*-CMB에 의한 효소의 실패를 막지 못하였다고 한다. Ronca는 adenosine deaminase의 활성부위에 관여하는 SH-group이 있으나 alkylating agent와 반응하지 않는 것은 이 group이 효소분자의 hydrophobic region에 있기 때문인 것으로 보고 있다(19). Wolfenden 등은 Hg^{2+} 에 의한 adenosine deaminase의 저해양식은 경쟁적 저해이며 이러한 현상은 몇 가지 adenosine deaminase와 cytosine deaminase에서도 보고되었고, 효소의 기질 결합부위에 SH-group이 관여하는 것이 이러한 효소의 일반적인 현상인 것으로 보고 있다(20). *Streptomyces* sp. J-350 P의 세포의 효소와 지금까지 보고된 세균과 효모기원의 세포내 효소는 기질친화력, 기질특이성, 금속이온과 일반적인 효소저해제에 의한 영향에 있어서 차이점이 발견되었고, 특히 *p*-CMB와 Hg^{2+} 이온에서의 저해양식에 있어서 *P. synxantha* A 3의 세포내 효소(17)와 뚜렷한 차이를 보여 공시균이 생산하는 세포의 효소와 효소의 활성부위에 있어서도 세포내 효소와 그 작용양식이 다른 것으로 생각되었다.

요 약

Streptomyces sp. J-350 P가 생산하는 세포의 adenine deaminase의 adenine에 대한 Km 값은 5.8×10^{-5} M로 측정되었으며 Arrhenius plots에 의한 효소의 활성화 에너지는 3.13 Kcal/mole로 측정되었다. 검토된 purine analogue중에서 6-chloropurine, 2, 6-diaminopurine, 6-bromopurine,

4-aminopyrazolo[3, 4-*d*]pyrimidine, 6-iodopurine, 그리고 8-bromoadenine은 본 효소에 의해 기질로 이용되었으며, 6-dimethylaminopurine은 adenine에 대한 경쟁적 저해제로 작용하였다. 본 효소는 0.1 mM의 Fe^{3+} , Ag^+ 등에 의해 저해되었으며, 1 mM의 α , α' -dipyridyl, pentachlorophenol, *p*-CMB 등에 의해 저해되었다.

사 사

본 연구는 '86년도 농원문화재단 연구비로 수행되었음.

참고문헌

1. Dalal, F.R., R.E. Gots, and J.S. Gots: *J. Bacteriol.*, **91**, 507 (1966).
2. De Repentigny, J., L.G. Mathieu, S. Turgeon, and S. Sonea: *J. Microbiol.*, **14**, 39 (1968).
3. Hosono, R. and S. Kuno: *J. Biochem.*, **75**, 215 (1974).
4. Newell, P.C. and R.G. Tucker: *Nature*, **215**, 1384 (1967).
5. Newell, P.C. and R.G. Tucker: *Biochem. J.*, **106**, 279 (1963).
6. Edozien, J.C., U.U. Udo, V.R. Young, N.S. Schrimshaw: *Nature*, **228**, 180 (1970).
7. Yokozaya, T., H. Oura, H. Nakagawa and T. Okada: *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, **56**, 655 (1982).
8. Jun, H.K. and J.H. Park: *J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **12**, 31 (1984).
9. Park, J.H. and H.K. Jun, 1987: *J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **15**, 306 (1987)
10. Kalckar, H.M.: *J. Biol. Chem.*, **167**, 445 (1947).
11. Lineweaver, H. and D. Burk: *J. Amer. Chem. Soc.*, **56**, 658 (1934).
12. Dixon, M.: *Biochem. J.*, **55**, 170 (1953).
13. Medhat, P.: Illinois Institute of Tech. Diss. Abster., **B27(6)**, 1785 (1966).
14. Hartenstein R.C. and I. Fridovich: *J. Biol. Chem.*, **242**, 740 (1967).
15. Sakai, T. and H.K. Jun: *J. Ferment. Technol.*, **56**, 257 (1978).
16. Kidder, G.W., V.C. Dewey, and L.L. Nolan: *Arch. Biochem. Biophys.*, **183**, 7 (1977).
17. Jun, H.K. and T. Sakai: *J. Ferment. Technol.*, **57**, 294 (1979).

18. Heppel, L.A., J. Hurwits and B.L. Horecker: *J. Amer. Chem. Soc.*, **79**, 630 (1957).
19. Ronca, G., C. Bauer, and C.A. Rossi: *European J. Biochem.*, **1**, 434 (1967).
20. Wolfenden, R., T.K. Sharpless, and R. Allan: *J. Biol. Chem.*, **242**, 977 (1967).

(Received July 28, 1987)