

## *Bacillus stearothermophilus*에서 부분 정제한 Cytosine Deaminase의 특성

유대식 · 김대현

계명대학교 자연과학대학 미생물학과

*Bacillus stearothermophilus*의 cytosine deaminase(EC 3.5.4.1)를 수율 52.7%로 7.2배 부분정제했다. 부분정제된 cytosine deaminase는 cytosine을 유일한 기질로 이용하였으며 5-methylcytosine과 5-fluorocytosine은 기질로 이용되지 못했으며 cytosine에 대한 Michaelis정수 Km 값은 5.9 mM이었다. 본 효소는 pH 4.0에서 7.0까지 폭 넓은 pH영역에서 안정했으며, 80°C에서 10분간 열처리하여도 75%이상의 효소활성이 잔존하여 높은 내열성 효소였다. 본 효소의 반응 최적 pH는 7.0~7.5였으며 반응 최적 온도는 35-37°C였다. 그리고 Arrhenius plot에 의하여 계산된 활성화 에너지 값(Ea value)은 26 Kcal/mol이었다. 본 효소는 중금속인 1 mM의 Cd<sup>2+</sup>, Hg<sup>2+</sup> 및 Cu<sup>2+</sup>에 의하여 완전히 실활되었으며 1 mM의 o-phenanthroline과 p-chloromercuribenzoate에 의해서도 완전히 실활되었으며 GMP와 CMP에 의해서는 효소활성이 촉진되었다. 특히 본 효소는 p-chloromercuribenzoate에 의하여 효소활성이 강하게 저해되어 thiol효소임을 추정할 수 있었다.

KEY WORDS □ Cytosine deaminase, *Bacillus stearothermophilus*

Cytosine deaminase(cytosine aminohydrolase, EC 3.5.4.1.)는 핵산의 pyrimidine염기중의 하나인 cytosine의 6번 탄소에 위치한 아미노기를 가수분해하여 uracil과 암모니아로 전환시키는 효소로서 Hahn과 Schäfer(4)에 의하여 발견되었다.

이 효소는 하등 미생물에만 존재하며 세균의 진화와의 관련성이 검토되고 있으며(2), 항종양보조제로서 임상학적인 연구도 활발히 이루어지고 있다.(7-9).

Cytosine deaminase는 효모(5), 세균(10, 11, 14, 15, 17)과 곰팡이(16)로부터 분리, 정제되어 그의 효소학적 연구가 보고되었다. 이 효소는 미생물 세포내에서 극미량 생합성되며 열 안정성이 매우 낮아 효소학적 측면 뿐만 아니라 단백질 화학적 측면에서의 연구가 거의 불가능하다. 더욱이 제압보조제로서 임상학적 연구에 직접 이용할 수 없기 때문에 안정성이 높은 cytosine deaminase의 개발이 절실히 요구된다.

일반적으로 내열성 세균은 열에 안정한 효소를 생합성하므로 내열성 세균인 *Bacillus stearothermophilus*의 cytosine deaminase가 내열성이 높을 것이라는 가정하에 이 균을 공시균으로 하여 cytosine deaminase의 생성조건을 규명하고 (3), 이 내열성 세균으로부터 추출한 효소를 부분정제하여 효소학적 특성을 규명하고자 했다.

### 재료 및 방법

#### 실험균주 및 배양방법

실험균주는 경북대학교에서 분양받은 *Bacillus st-*

*earothermophilus* KPU를 사용했다.

공시균의 배양조건은 유 와 이(3)와 같이 행했다. 즉, 배지는 1.0% peptone, 0.2% 효모추출물, 0.5% 가용성전분, 0.1% NaCl, 0.3% MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O와 0.01% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>를 함유한 배지를 pH 7.5로 조절하여 사용했다. 배양조건은 55°C에서 5시간 120 rpm의 회전식 진탕배양시켰다. 균의 생육도는 분광광도계(Hitachi UV 100-40)을 사용하여 660 nm의 흡광도를 측정하여 생육도로 표시했다.

#### 조 효소액 제조

배양된 균체를 원심분리하여 집관하고 증류수로 2회 세척했다. 세척된 균체를 2-mercaptoethanol 1 mM을 함유한 0.02 M Tris-HCl 완충액 (pH 6.5)에 현탁시켜 110 Hz에 10분간 초음파 파쇄시켰다. 파쇄된 균체 현탁액을 16,400×g에서 20분간 원심분리하여 균체를 제거하고 그 상등액을 조 효소액으로 사용했다.

#### 효소활성 측정

Cytosine deaminase의 활성은 0.1 N HCl용액에서 기질인 cytosine과 효소반응 생성물인 uracil의 290 nm의 흡광도 차를 분광광도계로 측정했다(10). 효소 반응계는 5 mM cytosine용액 0.2 ml와 효소액 및 0.05 M Tris-HCl완충액(pH 6.5)을 혼합하여 전용량이 1.0 ml되게 하여 35°C에서 24시간 효소반응 시켰다. 효소 반응액에 4 ml의 0.1 N HCl을 첨가하여 효소 반응을 정지시키고 290 nm에서 효소반응 전후의 흡광도의 감소를 측정하여 효소활성으로 계산했다.

이 반응조건에서 24시간 1 μM의 cytosine을 ura-

**Table 1.** Partial purification of cytosine deaminase from *Bacillus stearothermophilus*

Step	Total protein (mg)	Total activity (units)	Specific activity (units/mg)	Fold	Yield (%)
Cell free extract	3,400	216.0	0.063	1	100
Ammonium sulfate	800	119.9	0.149	2.4	55.5
Heat treatment	262	113.9	0.45	7.2	52.7

**Table 2.** Substrate specificity of cytosine deaminase

Compound	Relative activity (%)
Cytosine	100
5'-Methylcytosine	0
5'-Fluorocytosine	0
Cytidine	0
CMP	0
Adenine	0
Adenosine	0
AMP	0

The reaction mixture contained 0.4 ml of the partial purified enzyme solution, 4 mM of the substrate and 0.05 M Tris-HCl buffer(pH 6.5) in final volume of 1ml and then incubated at 35°C for 24 hr. The activity was calculated from the stoichiometric changes during the reaction in the concentration of the substrate and the product, which were separated by paper chromatography and assayed spectrophotometrically as described elsewhere (10).

cil로 전환시키는 효소량을 1 단위로 했다.

**황산암모늄 분획**

조 효소액에 황산암모늄을 첨가하여 35%로 포화시켜 4°C에서 12시간정도 정치하여 효소단백질을 침전시켰다. 침전물을 16,000×g에서 30분간 원심분리하여 상등액은 버리고 침전된 효소단백질은 2-mercaptoethanol 1mM 이 함유된 0.02 M Tris-HCl 완충액(pH 6.5)에 용해시켰다.

**열처리 분획**

황산암모늄으로 분획한 효소액을 80°C에서 5분간 열처리하여 4°C로 급 냉각시킨후, 16,000×g에서 30분간 원심분리하여 열변성 단백질을 제거했다.

**활성화 에너지 값 (Ea)**

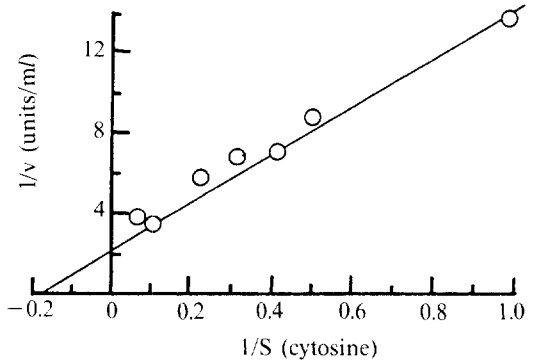
Cytosine deaminase의 활성화 에너지 값(Ea)은

$$\text{Arrhenius 방정식 } (\log k = \frac{Ea}{2.3R} \cdot \frac{1}{T} \times \log a) \quad (12)$$

으로 부터 27°C에서 35°C사이의 온도에서 Arrhenius plot에 의하여 계산했다.

**단백질 정량**

조 효소액중의 단백질 정량은 Lowry 등(6)의 방



**Fig. 1.** Double-reciprocal plot for cytosine concentration and initial reaction velocities.

The enzyme activity was assayed under the standard reaction conditions. Velocity(V) was expressed as an units and substrate concentration (S) in mM of cytosine.

법을 사용했으며 표준 단백질은 ovalbumin을 사용했다.

**시약**

시약은 Sigma Chemical Co.(U.S.A.)제품을 사용했다.

**결과 및 고찰**

**Cytosine deaminase의 부분 정제**

*Bacillus stearothermophilus*가 생성하는 cytosine deaminase의 성질을 규명하기 위하여 부분정제 했다. 조 효소액에 황산암모늄을 35%되도록 포화시켜 효소단백질을 분획하고, 80°C에서 10분간 열처리하여 불순 단백질을 열변성시켜 제거했다.

그 결과는 Table 1에 나타난 바와 같이 수율 52.7%로 비활성은 약 7.2배로 부분 정제되었다.

**기질 특이성**

Cytosine deaminase는 cytosine 뿐 아니라 5'-fluorocytosine(6, 14) 및 5'-methylcytosine(5, 12)을 기질로 이용할 수 있다.

본 실험균주가 생성하는 효소는 Table 2에 나타난 바와 같이 cytosine을 유일한 기질로 이용하여 *Serratia marcescens*의 효소(10)와 같이 기질 특이성이

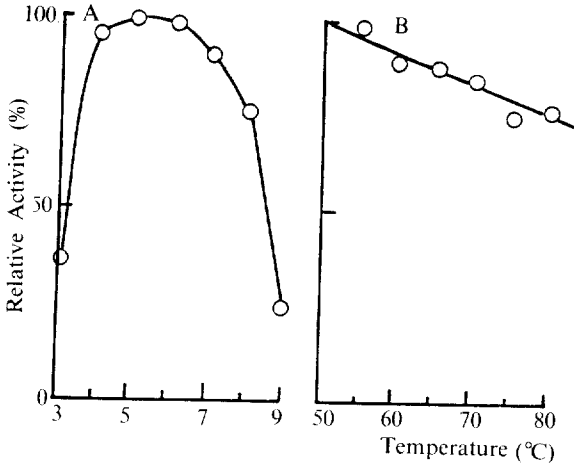


Fig. 2. Effect of pH (A) and temperature (B) on the enzyme stability.

A: The enzyme solutions were diluted 2-fold with the McIlvaine buffer(pH 3.0 to 8.0) and Tris-HCl buffer(pH 7.0 to 9.0). And then incubated at 50°C for 10 min and dialyzed at 4 for 5 hr against 2 changes of 20 volumes of 0.05 M Tris-HCl buffer (pH 6.5). The residual activity was assayed under the standard conditions.

B: The enzyme solution in 0.05 M Tris-HCl buffer (pH 6.5) was incubated at the indicated temperatures ranged from 50 to 80°C for 10 min. After cooled, the residual activity was assayed under the standard conditions.

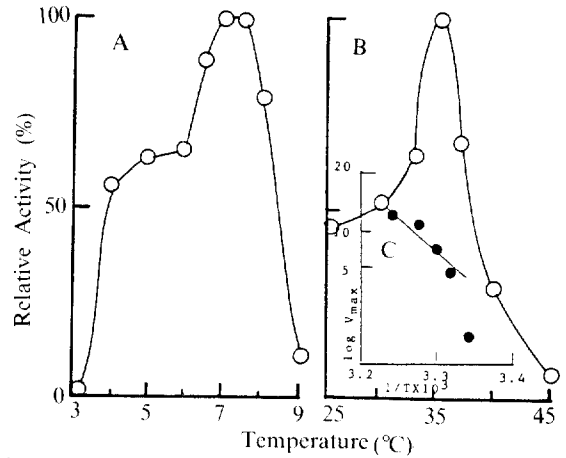


Fig. 3. Effect of pH (A), and temperature (B), and Arrhenius plot of the effect of temperature (C) on the enzyme activity.

The enzyme activity was assayed under the standard conditions except that pH (A) was varied using a reaction mixture containing 0.05 M buffer pH's from 3.0 to 9.0, and reaction temperature (B) was varied from 25 to 40°C. Buffer used were Mallvaine buffer (pH 3.0 to 8.0) and Tris-HCl buffer (pH 7.0 to 9.0). The data of Arrhenius plot (C) of the enzyme activity include initial velocity determinations at temperature 27 to 35°C, expressed  $V_{max}$ , plotted against reciprocal temperatures.

매우 높은 효소였다.

기질인 cytosine에 대한 Lineweaver-Burk double reciprocal plot에 의하여 본 효소의  $K_m$ 값은 5.9 mM이었으며,  $V_{max}$ 값은  $0.04 \text{ mole hr}^{-1} \text{ ml}^{-1}$ 이었다 (Fig. 1). 특히 효소반응속도 형식은 전형적인 Michaelis-Menten형식이였다.

**pH 및 열 안정성**

공시균인 *Bacillus stearothermophilus*의 cytosine deaminase의 pH에 대한 안정성을 검토하기 위하여 효소액을 pH 3.0에서 9.0까지 다르게 조절하여 50°C에서 10분간 열처리 한 후, 잔존 효소활성을 측정하였다.

Fig. 2A에 나타난 바와 같이 pH 8.0에서도 75%의 효소활성이 잔존했다.

*Pseudomonas aureofaciens*의 효소(11)는 pH 5.0에서 효소활성이 완전히 실활되며 *Serratia marcescens*의 효소(10)는 10%의 효소활성이 잔존하였으며 *Aspergillus fumigatus*의 효소(16)는 pH 5.0에서 50%의 효소활성이 실활된다.

이상의 결과들로 부터 본 효소의 pH안정성을 다른 효소와 비교하면 비교적 폭넓은 pH영역에서 안정했으며 특히, pH 4.0에서 효소의 안정성이 매우 높아

현재까지 연구된 cytosine deaminase보다 내 산성 효소임을 알 수 있었다. 본 효소의 열 안정성은 각 온도에서 10분간 열처리한 후, 급냉각시켜 잔존효소 활성을 측정했다. Fig. 2B에 나타난 바와 같이 80°C에서 10분간 열처리하므로 약 75%이상의 효소활성이 잔존했다.

*Serratia marcescens*의 효소(10)는 70°C에서 10분간 열처리로 75%의 효소활성이 잔존했으며 본 효소는 80°C에서 10분간 열처리로 75%의 효소활성이 잔존하므로 내열성이 높은 효소임을 알 수 있었다.

**반응 최적 pH 및 온도**

본 효소의 활성에 미치는 pH의 영향을 규명하기 위하여 pH 3.0에서 9.0사이에서 효소반응을 시켜 그 활성을 측정했다. Fig. 3A에 나타난 바와 같이 본 효소의 반응최적 pH는 7.0-7.5였다. 이 결과는 *Salmonella typhimurium*(17)의 효소의 반응 최적 pH인 7.3-7.5와 비슷한 경향이었다. 효소반응 최적 온도는 Fig. 3B에 나타난 바와 같이 35-37°C였으며, 40°C에서도 54%의 효소활성을 나타냈다.

공시균인 *Bacillus stearothermophilus*의 cytosine deaminase의 활성화 에너지 값( $E_a$ )는 26 Kcal/mol 이었다.  $E_a$ 값 측정 온도는 27°C에서 35°C사이의

**Table 3.** Effect of metal ions on enzyme activity

Compound	Relative activity (%)	
	1.0 mM	0.1 mM
CaCl <sub>2</sub>	100	—
CdCl <sub>2</sub>	0	0
CuCl <sub>2</sub>	0	0
FeCl <sub>3</sub>	63	94
FeSO <sub>4</sub>	70	94
HgCl <sub>2</sub>	0	0
MgCl <sub>2</sub>	100	—
MnCl <sub>2</sub>	100	—
PbCl <sub>2</sub>	100	—
ZnCl <sub>2</sub>	75	—
KCl	100	—
NaCl	100	—
None	100	100

The enzyme activity was assayed under the standard reaction conditions in the presence of metal ions at the indicated concentration and expressed as relative activity to that of control.  
 -; not determined.

**Table 4.** Effect of inhibitors on enzyme activity

Compound	Relative activity (%)	
	1 mM	0.1 mM
EDTA	90	95
2-Mercaptoethanol	100	97
NaN <sub>3</sub>	100	—
NaCN	109	—
<i>o</i> -Phenanthroline	0	0
<i>p</i> -Chloromercuribenzoate	0	47
Trichloro acetate	110	90
Mono iodoacetate	35	39
None	100	100

The conditions were in accordance with those described in Table 3.  
 -; not determined.

온도였다. 본 효소의 *Ea* 값은 Ipata 등(5)의 빵 효모의 *Ea* 값인 7.74 Kcal/mol과 West 등(13)의 *Salmonella typhimurium*의 *Ea* 값인 4.45 Kcal/mol보다 높은 값을 나타냈다.

**금속 이온의 영향**

금속 이온이 본 효소의 활성에 미치는 영향을 검토한 결과, Table 3에 나타난 바와같이 본 효소는 1 mM의 Cd<sup>2+</sup>, Hg<sup>2+</sup> 및 Cu<sup>2+</sup>의 중금속 이온에 의하여 강하게 저해를 받으며 더욱이 0.1 mM에서도 완전히 저해되었다. 특히 1 mM의 Fe<sup>3+</sup>과 Fe<sup>2+</sup>에 의하여 본 효소 활성이 37% 및 30% 저해되었다.

본 효소는 1 mM의 Fe<sup>3+</sup>와 Fe<sup>2+</sup>에 의하여 효소활

**Table 5.** Effect of nucleotides on enzyme activity

Compound (1 mM)	Relative activity (%)
CMP	298
UDP	119
GMP	242
ATP	115
IMP	100
None	100

The conditions were in accordance with those described in Table 3.

성이 저해되었으며 West 등(17)의 *Salmonella typhimurium* 효소 역시 1 mM의 Fe<sup>3+</sup>에 의하여 70% 저해되며, Yu 등(16)의 *Aspergillus fumigatus*의 효소도 Fe<sup>2+</sup>에 의하여 완전히 저해되었다.

이상의 결과로 본 효소의 활성은 Fe<sup>2+</sup>와 Fe<sup>3+</sup>에 의하여 강하게 저해되는 효소임을 알 수 있었다.

**저해제의 영향**

효소활성을 저해하는 화합물이 본 효소활성에 미치는 영향을 검토한 결과, Table 4에 나타난 바와 같이 1 mM *p*-chloromercuribenzoate와 *o*-phenanthroline에 의하여 효소활성이 완전히 실패되었으며, 1 mM monoiodoacetate에 의하여 65% 저해 되었다. 2-Mercaptoethanol과 EDTA (ethylenediaminetetraacetate)는 본 효소활성에 아무런 영향을 미치지 못했다. 본 효소는 Yu 등(16)의 *Aspergillus fumigatus*의 효소와 같이 *p*-chloromercuribenzoate와 *o*-phenanthroline에 의하여 완전히 실패되어 저해제에 대한 영향은 본 효소의 특성과 같은 특성을 나타냈다.

이상의 결과로 본 *Bacillus stearothermophilus*의 cytosine deaminase는 1 mM *p*-chloromercuribenzoate에 의하여 완전히 실패되므로 thiol 효소로 추정할 수 있다.

**Nucleotides의 영향**

Nucleotide가 본 효소활성에 미치는 영향을 검토한 결과, Table 5에 나타난 바와 같이 본 효소는 1 mM의 CMP와 GMP에 의하여 각각 298%와 242% 활성화되었으며, UDP, ATP 및 IMP는 별다른 효소활성에 영향을 미치지 못했다.

Ipata 등(5)의 빵 효모의 효소는 GMP에 의하여 효소활성이 저해 당하며 *Pseudomonas aureofaciens* (14)의 효소와 *Aspergillus fumigatus*(16)의 효소는 GTP에 의하여 아무런 효소활성의 변화가 없었다. 그러나 *Serratia marcescens*(15)의 효소는 GDP와 ATP에 의하여 효소활성이 촉진되었으며 본 효소도 CMP와 ADP에 의하여 활성이 촉진되었다. 이상의 결과로 *Bacillus stearothermophilus*의 내열성 cytosine deaminase는 *Serratia marcescens*의 효소와 유사한 효소생리적 특성을 나타냈다.

## 사 사

본 연구는 1990년도 교육부 학술 연구 조성비(지방대학 육성 연구비)에 의하여 수행된 논문으로 이에 깊은 감사를 표시하는 바입니다. 그리고 이 연구를 수행함에 처음부터 끝까지 도와준 이 정수 대학원생에게도 깊은 감사를 표시합니다.

## 참 고 문 헌

1. 유대식, 1987. Pyrimidine nucleotide 대사계와 세균 진화, 계명대 기초과학 연구논집, 6, 25-30.
2. 유대식, 김대현, 박정문, 송형익, 정기택, 1988. 세포 외 cytosine deaminase의 효소학적 성질, *Kor. Jour. Microbiol.*, 26, 368-374.
3. 유대식, 이정수, 1991. *Bacillus stearothermophilus*의 cytosine deaminase 생성의 최적 배지 조성, 계명대 기초과학 연구논집, 10, 203-207.
4. Hahn A. and L. Schäfer, 1925. Über das Verhalten von Pyrimidinderivaten in den Organismen. *Z. Biol.*, 83, 511-514.
5. Ipata P.L., F. Marmocchi, G. Magni, R. Felicioli and G. polidoro, 1971. Baker's yeast cytosine deaminase. Some enzymatic properties and allosteric inhibitor by nucleosides and necleotides. *Biochemistry*, 10, 4270-4276.
6. Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Barr and R.J. Randall, 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, 13, 265-275.
7. Nishiyama, T., Y. Kawamura, K. Kawamoto, H. Matsumara, N. Yamamoto, T. Ito, A. Ohyama, T. Katsuragi and T. Sakai, 1981. New antineoplastic chemotherapy without systemic side effects to the host. Current chemotherapy and immunotherapy, 1269-1270.
8. *Idem.*, 1982. Antineoplastic effects of 5-fluo-

- rocytosine and cytosine deaminase on brain tumor, *Neural. Med. Chir.*, 22, 344-352.
9. *Idem.*, 1985. Antineoplastic effects in rats of 5-fluorocytosine in combination with cytosine deaminase capsules, *Cancer Res.*, 45, 1753-1761.
  10. Sakai T., T.S. Yu, H.Tabe and S.Omata, 1975. Purification of cytosine deaminase from *Serratia marcescens*, *Arg. Biol. Chem.*, 39, 1623-1629.
  11. Sakai T., T.S. Yu, K. Taniguchi and S. Omata, 1975. Purification of cytosine deaminase from *Pseudomonas aureofaciens*, *Agr. Biol. Chem.*, 39, 2015-2020.
  12. Sakai S., T.T. Katsuragi, K. Tonomura, T. Nishiyama and Y. Kawamura, 1985. Implantable encapsulated cytosine deaminase having 5'-fluorocytosine-deaminating activity. *J. Biotechnol.*, 2, 13-21.
  13. Segal I.H., 1976. *Biochemical Calculations*, 2nd ed., Wiley, 278.
  14. Yu T.S., T. Sakai and S. Omata, 1976. Kinetic properties of cytosine deaminase from *Pseudomonas aureofaciens*, *Agr. Biol. Chem.*, 40, 551-557.
  15. Yu, T.S., T. Sakai and S. Omata, 1976. Kinetic properties of cytosine deaminase from *Serratia marcescens*, *Agr. Biol. Chem.*, 40, 543-549.
  16. Yu T.S., J.K. Kim, T. Katsuragi, T. Sakai and K. Tonomura, 1991. Purification and properties of cytosine deaminase from *Aspergillus fumigatus*, *J. Ferment. Bioeng.*, 72, 266-269.
  17. West T.P., M.S. Shanley and G.A. O'Donovan, 1982. Purification and some properties of cytosine deaminase from *Salmonella typhimurium*, *Biochem. Biophys. Acta.* 719, 251-258.

(Received July 15, 1992)

(Accepted August 3, 1992)

**ABSTRACT: Some Properties of Partially Purified Cytosine Deaminase from *Bacillus stearothermophilus***

Yu, Tae Shick and Tae Hyun Kim (Department of Microbiology, College of Natural Science, Keimyung University, Taegu, Korea)

Cytosine deaminase (EC 3.5.4.1) from *Bacillus stearothermophilus* was partially purified 7.2-fold with an overall yield of 52.7%. The partially purified enzyme deaminated cytosine only, but not 5-methylcytosine and 5-fluorocytosine. The apparent Michaelis constant,  $K_m$  value for cytosine was 5.9 mM. The enzyme was relatively stable in the range of pH 4.0 to 7.0, furthermore extremely thermo-stable : more than 75% of the activity was remained after heating at 80°C for 10 min at pH 6.5. The enzyme had a pH optimum at around pH 7.0 to 7.5, and temperature optimum at 35 to 37°C. And the activation energy ( $E_a$  value) determined from an Arrhenius plot was 26 Kcal/mol. The enzyme activity was strongly inhibited by heavy metal ions such as  $Cd^{+2}$ ,  $Hg^{+2}$ ,  $Cu^{+2}$  at 1 mM, and by *o*-phenanthroline, and *p*-chloromercuribenzoate at 1 mM. But the enzyme activity was activated increased by GMP, and CMP at 1 mM.