

*Pseudomonas putida*에서 부분정제한 Guanosine Triphosphate Cyclohydrolase의 특성에 관한 연구

김 완 기·임 정 빈

(서울대학교 자연과학대학 미생물학과)

Partial purification and some properties of Guanosine Triphosphate Cyclohydrolase from *Pseudomonas putida*.

—GTP Cyclohydrolase from *Pseudomonas*—

KIM, Wan Kee and Jeong Bin YIM

(Department of Microbiology, College of Natural Sciences, SNU)

ABSTRACT

An enzyme, named GTP cyclohydrolase, that catalyzes the hydrolytic removal of carbon No. 8 of GTP has been partially purified from extracts of *Pseudomonas putida* (IAM 1506). The enzyme exists in two molecular weight forms: a high molecular weight form (150,000) and a low molecular weight form (40,000).

The high molecular weight form has been purified 25-fold. Some of the properties of the enzyme are as follows: It functions optimally at pH 8.0, and at 52°C. The Km value for GTP is 20 μ M. Divalent cations (Cd²⁺ and Hg²⁺) at a concentration of 5mM inhibit completely the enzyme activity. No metal ion including Mg²⁺ is needed for the catalysis. The enzyme is heat labile; its half life at 57°C is 1.5 min. Of a number of nucleotides tested, only GDP was used to any extent as substrate in place of GTP. One of the products of the enzyme is determined to be a dihydro-neopterin compound.

緒 論

1975년 Brown과 Yim이 *Escherichia coli*에서 GTP로부터 8번 탄소를 가수분해시키는 GTP cyclohydrolase I을 순수분리하여 이 효소의 특성과 함께 최종생성물이 formate와 dihydroneopterin triphosphate임을 밝혔다. 이 효소는 folic acid의 pterin부분을 합성하는 첫번째 단계를 촉매하는 효소이다. 한편 Foor와 Brown (1975)은 같은 균주에서 GTP cyclohydrolase I

과 매우 유사한 효소를 분리하여 GTP cyclohydrolase II라 명명하였는데 이 효소는 최종생성물로 formate외에 pyrophosphate와 2,5-diamino-6-hydroxy-4-(ribosylamino) pyrimidine-5'-phosphate을 생성하며 후자는 여러가지 증거들 (Burrows *et al.*, 1978)에 의해 riboflavin의 생합성에 직접 관여하리라 믿어지고 있다.

원핵세포 생물중에서 pteridine생합성에 관한 연구는 근래에 Suzuki와 Goto(1971)에 의해서 이루어졌다. 이들이 사용한 균주는 *Pseudomonas putida*로서 casein을 산 가수분해한 배양액에서

이 균주를 키운후 배양액으로부터 pteridine들을 분리하여 화학적인 분석을 하였다. 분리된 4가지의 pteridine들은 구조상 8-(1-D-ribityl)-2, 4, 7-trioxohexahydro pteridine의 6번 탄소가 각각 indole기, hydroxyphenyl기, methyl기, 2-carboxyethyl기로 치환되어 있다. 이들은 계속해서 1972년 같은 배양액에서 *D-erythro-neopterin*을 분리하여 화학적 분석으로 구조를 밝혀내었다. (Suzuki *et al.*, 1972)

한편 Takeda와 Hayakwa(1968)의 실험에 의하면, *Achromobacter petrophilum*에서도 여러 종류의 purine화합물들을 전구물질로 사용하여 구조가 밝혀지지 않은 몇 종류의 녹황, 녹청 형광물질을 생합성하는데, 그 가운데 guanine에 의한 형광물질의 생합성은 다른 것의 2배 이상에 달함을 보여주었다. 이러한 간접적인 형광물질의 생합성에 관한 시사와는 달리 보다 직접적으로 전구물질과 유래된 물질에 관하여 연구한 이는 Levenberg와 Linton(1968)이다. 이들은 *Pseudomonas cocovenenans*를 사용하여 toxoflavin(an azapteridine antibiotic)의 생합성에 관한 연구를 하였는데 동위원소 추적실험을 통하여 (1) toxoflavin의 pyrimidine부분은 GTP에서 유래하며 (2) 2개의 N-methyl치환기는 S-adenosylmethionine의 methyl기로부터 (3) purine전구물질의 8번 탄소가 생합성중 떨어져 나가고 glycine의 aminomethyl기가 합입되어 toxoflavin을 합성함을 밝혀내었다.

이상의 미생물군에서 pteridine 생합성에 purine염기가 관여하는 것과 생합성과정에서 purine ring의 8번 탄소가 떨어져 나간다는 결과 등은 전술한 GTP cyclohydrolase와 유사한 효소가 여기에 관여함을 간접적으로 시사하여 준다. 따라서 여러종류의 pteridine들을 배양액속으로 배출하는 *Pseudomonas* species에는 pterin을 합성하는 효소가 큰 활성을 가질것으로 판단하고 이 논문에서는 보다 직접적으로 이 효소의 유무를 밝혀냄과 동시에 효소의 특성과 그 최종 생성물에 관하여 연구하였다.

材料 및 方法

시약: 본 실험에서 사용한 시약은 다음 곳에서 구입했다. 비방사성 nucleotides, 여러종류의 Sephadex, PIPES(piperazine N, N'-bis(2-ethane sulfonic acid), bovine serum albumin, alkaline phosphatase 등은 Sigma에서, Blue Dextran 2000, CNBr, Sepharose 4B는 Pharmacia Fine Chemicals에서, ϵ -aminocaproic acid methyl ester는 Cyclo Chemical에서, hydrazine hydrate는 Metheson, Coleman and Bell에서, BBOT (2,5-bis-2(5-ter-butylbenzoxazolyl) thiophene)는 Packard에서, (8-³H) GTP, (8-¹⁴C) GTP는 New England Nuclear에서 각각 구입했다.

균배양과 수확: 본 실험에서 사용한 균주는 *Pseudomonas putida*(IAM 1506)로서 일본 동경대학 IAM(Institute of Applied Microbiology)의 Dr. K. Yamasato로부터 얻었다. 균주를 배양조(총 8 liters)에서 공기를 넣어주면서 30°C로 24시간 배양한다. 배양액의 조성은 다음과 같다. peptone(Oxoid L34), 80g; glucose, 8g; NaCl, 44.8g; KH₂PO₄, 2g; MgSO₄·7H₂O, 0.8g; Fe SO₄·7H₂O, 40mg; CaCl₂, 11.52mg; H₂O to 8 liters. 배양액의 pH는 7.0으로 멸균하기 전에 NaOH로 맞춘다. 배양된 균의 수확을 위해 10,000 xg에서 20분간 원심분리한다. (Sorval GS-3 rotor 사용)

효소반응 및 분석: GTP cyclohydrolase의 활성도를 측정하기 위하여 사용한 방법은 Burg와 Brown(1968)이 개발한 방법과 근본적으로 유사하나 표준반응혼합물에는 최종부피가 0.5ml로서 다음의 물질이 들어있다. 0.1M PIPES (pH 7.2), 0.1M NaCl, 10mM EDTA (pH 7.2), 0.1mM (8-¹⁴C) GTP or (8-³H) GTP, 효소용액. 혼합물의 반응온도는 42°C로 시간에 따라 일정하게 유지시켜 주었다. 일정시간후 0.1ml의 1.0M formic acid를 넣어 반응을 중지시킨다. 다음 80mg의 활성탄을 넣어 ring compounds를 흡착시킨후 솜을 넣은 Pasteur pipette에 반응혼합물을 거른다. 0.5ml의 H₂O로 시험관의 여액을 닦아 Pasteur pipette에 옮긴후 다시 0.4ml의 H₂O

로 씻는다. 이상의 여과액 1.5ml을 scintillation vial에 받아 15ml의 scintillation cocktail(0.4% BBOT in toluene, triton X100; 2:1)을 넣은 후 radioactivity를 측정한다. (Liquid Scintillation Counter, Packard Model 3385 사용)

GTP-coupled Sepharose 4B의 제조: Jackson *et al.* (1971)의 방법을 사용 GTP-Sepharose를 준비하였다. 즉, 10ml의 settled sepharose 4B를 총 40ml이 되게 물에 풀후 2.4g의 CNBr를 넣고 5N NaOH로 pH 11.0을 유지시켜 주면서 반응시킨다. pH의 변화가 없을때 gel을 Buchner갈때기에 거르고 0°C의 0.1N NaCO₃ (pH9.0) 완충용액으로 씻은후 같은 완충용액 16ml에 다시 푼다. Gel을 4°C에서 저어주면서 4ml의 NaCO₃ (0°C, 0.1N) 완충용액에 녹아있는 0.5g의 ϵ -amino caproic acid methyl ester를 넣어준 후 4°C에서 16~18시간 흔들여 준다. 이것을 거른 뒤 400ml의 H₂O(0°C)로 씻은다음 물에 풀어 총 6ml이 되게 한다. 여기에 28ml의 hydrazine hydrate(98~100%)를 넣고 천천히 저어주면서 혼합물의 온도를 70°C로 올린뒤 15분간 가열한 후 실온으로 내려간 hydrazide gel을 물(약 500 ml)로 씻는다.

GTP 7.3mg을 2.5ml의 0.1M citrate-phosphate 완충용액(pH6.8)에 녹인뒤 새로 만든 0.2 ml의 0.1M NaIO₄를 넣고 30분동안 암실에서 반응시킨다. 10ml의 40% ethylene glycol을 넣고 다시 10분간 반응시킨 후 5분동안 질소 gas로 bubbling시킨다. 여기에 0.1M citrate-phosphate (pH6.8) 용액을 넣어 총 5ml로 만든 다음 위에서 제조한 hydrazide gel 5ml을 섞는다. 혼합물을 실온에서 2시간 동안 흔들여 준뒤 이 gel을 EDTA (5mM)를 포함한 phosphate buffer(pH 5.0)로 닦는다.

최종생성물 분석: 반응액의 부피가 2.0ml이 되게 다음의 물질을 넣는다. 0.1M PIPES (pH 7.2), 0.1M NaCl, 10mM EDTA (pH 7.2), 0.1 mM (8-¹⁴C) GTP, *Pseudomonas putida*에서 정제한 효소. 대조용으로 dihydroneopterin triphosphate을 얻기 위해 반응 혼합물이 2.0ml이 되게 다음의 물질을 넣는다. 0.1M Tris-HCl (pH 8.5), 0.1M NaCl, 10mM EDTA (pH 8.0), 0.1

mM GTP, *E. coli*에서 순수정제한 GTP cyclohydrolase I (Yim *et al.*, 1976).

위의 두 반응액들을 각각 42°C에서 3시간 반응시킨후 반응액 0.5ml을 따내어 0.1ml의 1.0M formic acid가 들어있는 시험관에 옮겨 반응 진행 정도를 측정하고 나머지 반응 혼합물(1.5ml)에 0.1ml의 MgCl₂ (0.1M)와 5 μ l의 alkaline phosphatase를 넣고 다시 30분간 반응시킨다. 분석용과 대조용의 반응 혼합물에 환성탄을 넣은 뒤 Pasteur pipette에 거른 다음 0.75ml의 H₂O로 두차례 닦아낸다. Ethanol (50%) 2ml로 GTP를 씻어 없애고 다시 2ml의 50% ethanol을 포함한 8% ammonia수로 닦아 환성탄에 흡착되어 있는 반응생성물을 elute시킨후 형광 spectrum을 측정하였다. (spectrofluorometer, Farrand MK-1 사용).

結 果

생장단계에 따른 효소 specific activity의 변화: Mid-log, late-log, stationary phase 생장단계에 있는 균주 5g(wet weight)에 각각 20ml의 0.1M PIPES (pH 7.2) 완충용액과 소량의 alumina를 넣고 균질액의 온도가 8°C를 넘지 않도록 하며 60초 동안 초음파를 파괴시킨다. (sonicator, Lab Line Model 9100 사용.) 이 용액을 10,000 \times g에서 60분간 원심분리하여 얻은 상층액을 고체 황산암모늄을 사용 60%까지 포화시킨후 침전물을 원심분리하여 제거한다. 상층액을 다시 고체 황산암모늄으로 80%까지 포화시켜 12,000 \times g에서 30분간 원심분리하여 얻은 침전물을 KCl(20mM)이 들어있는 50mM PIPES (pH 7.2) 완충용액으로 씻은 후 같은 완충용액 1ml에 녹인것을 효소용액으로 사용했다. 생장단계에 따른 GTP cyclohydrolase의 specific activity는 Table 1에 나타난 바와같이 stationary phase보다 mid-log 와 late-log phase에서 효소활성도가 높음을 보여준다.

표준반응 조건의 결정: (1) 완충용액에 따른 효소의 안정도 측정: 완충용액의 종류에 따른 효소 활성도의 변화를 알아보기 위해 PIPES(pH 7.2, 7.5), Tris HCl(pH 7.5, 7.9, 8.5), phosphate

Table 1. Specific activity of GTP cyclohydrolase at different growth phases.

Growth phase	Specific activity (Units/mg protein) ⁺
Mid-log	50
Late-log	49
Stationary	38

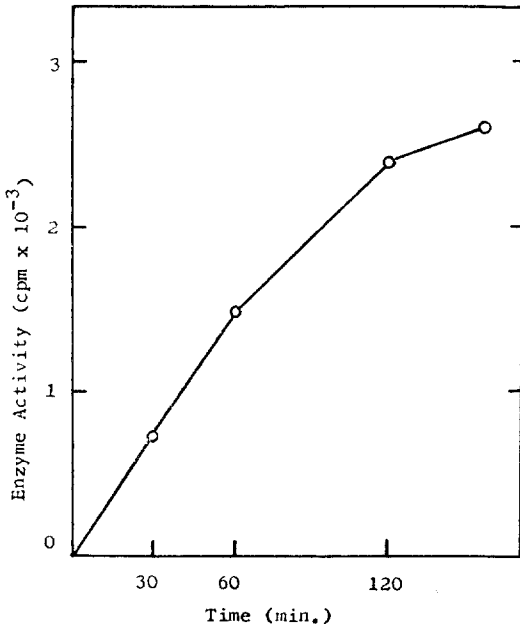
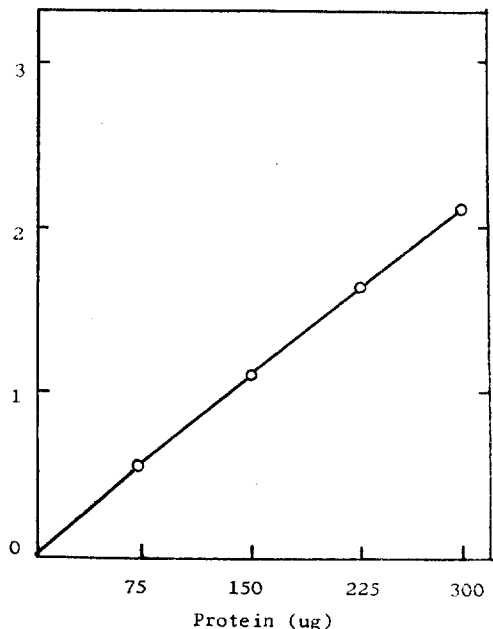
⁺ One unit of activity is the amount of enzyme needed for the production of 1 pmole of formate per min at 42°C.

(pH 6.8) 완충용액에서 저장된 효소의 활성도를 각각 측정하였는데 PIPES(pH 7.2, 7.5.)나 Tris HCl(pH 7.9) 용액은 거의 같은 수준의 높은 활성도를 나타내나 phosphate 완충용액은 앞의 두 완충용액에 비하여 약 60%의 활성도를 보여주었다. 다음에는 황산암모늄 분획까지 부분정제한 효소를 사용하여 이 효소를 50mM PIPES (pH 7.2)에 녹인후 효소를 안정화시키는데 도움을 주는 물질들을 저장 완충용액에 넣은뒤 시간의 경과에 따른 효소활성도를 측정하였다. 저장 효소용액 1ml속에는 다섯가지 물질을 다음과 같

은 최종농도가 되도록 각각 넣었다. glycerol(25%), mercaptoethanol(8mM), EDTA(pH 7.0, 5mM), MgCl₂(5mM), KCl(50mM). 이상의 5가지 물질들은 효소를 안정화시키는데 큰 효과는 없었으나 50mM KCl이 포함된 PIPES 완충용액에서 이 효소는 -20°C에서 16일이 지날때까지 활성도의 변화가 거의 없는 것으로 나타났다.

(2) 시간에 따른 활성도의 변화: 최종 반응 혼합물의 부피가 2.5ml되게 다음의 조성을 포함시킨다. 0.1M PIPES(pH 7.2), 0.1M NaCl, 10mM EDTA(pH 7.6) 0.1mM (8-¹⁴C) GTP, gel-filtered enzyme. 10분, 30분, 60분, 120분, 180분에 0.5ml의 반응혼합물을 따내어 반응속도를 측정한 결과는 Fig. 1A와 같다. 30분 동안에는 거의 직선적으로 1분당 60 pmoles의 formate이 형성된다.

(3) 효소 농도에 따른 활성도의 변화: 최종 반응 혼합물의 부피가 0.5ml이 되게 다음 성분을 포함시킨다. 0.1M PIPES(pH 7.2), 0.1M NaCl, 10mM EDTA(pH 7.6), 0.1mM(8-¹⁴C) GTP, 각기 다른 양의 gel-filtered enzyme. 반응액속의 protein의 양이 0.3mg이 될때까지 일정한 기울

**Fig. 1A.** Time Course vs. Enzyme Activity.**Fig. 1B.** Enzyme Conc. vs. Activity.

The production of radioactive formate was found to be linear with incubation time up to 30 minutes Fig. 1A, and Fig. 1B shows that enzyme activity is linear with protein concentration.

기로 효소의 활성이 증가함을 볼수 있다. (Fig. 1B)

GTP Cyclohydrolase의 부분 정제: Crude extract 10gr(wet weight)의 stationary phase cell을 40ml의 PIPES buffer(0.1M, pH 7.2)에 풀어 sonication시킨후 원심분리하여 얻은 상층액을 crude extract로 사용한다.

Ammonium Sulfate Fractionation: Crude extract를 30분간 4°C에서 천천히 저어주면서 고체 황산암모늄으로 60%까지 포화시킨후 원심분리하여 얻은 상층액을 다시 80%까지 포화시킨다. 원심분리하여 얻은 침전물을 50mM KCl이 들어있는 50mM PIPES(pH 7.2) 완충용액으로 닦은 후 같은 buffer에 녹인다. 0에서 100%까지 10% 간격으로 황산암모늄 분획실험을 한 결과는 60~80% 분획속에 전체 효소활성의 80% 이상이 포함되어 있다.

Fractionation on Sephadex G200-120: 60~80% 황산암모늄분획을 20mM KCl이 들어있는 50mM PIPES 완충용액(pH 7.2)으로 평형시킨 Sephadex G200-120 column(1×100cm)에 걸고 같은 완충용액으로 전개시킨다. 전개모형은 Fig. 2와 같다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 GTP cyclohydrolase의 활성도가 두개의 다른 molecular weight forms로 나누어지는 것을 볼 수 있다. 이상의 3단계의 정제도를 수치로 나타낸 결과는 Table 2와 같다.

물리적 및 화학적 성질: (1) 최적 pH: 두가지 완충용액(PIPES와 Tris HCl)을 사용하여 각기 다른 pH에서 효소 활성도를 측정 한 바에 의하면 Fig. 3에 나타낸 것과 같이 PIPES 완충용액의 완충 범위내에서는 pH가 높을수록 활성도가 증가한다. Tris HCl의 경우는 PIPES에 비해 낮은

활성도를 보여주며 pH8.0에서 제일 높은 활성도를 갖는다.

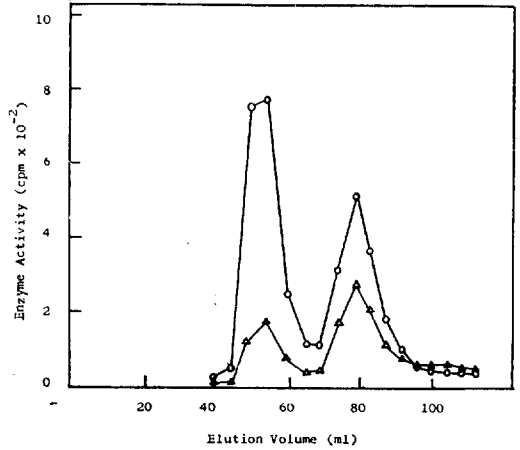


Fig. 2. Chromatography on Sephadex G-200 of Ammonium Sulfate fraction of *Pseudomonas putida*. The sample was applied to a column (1×100cm) of Sephadex G-200 that had been equilibrated with 50mM PIPES buffer (pH7.2) containing 20mM KCl. The column was developed with the same buffer. Fractions of 0.8ml were collected at a rate of 5ml per hour. For enzyme activity, 0.2ml portions of the fractions were assayed in the presence, $\triangle-\triangle$; and absence, $\circ-\circ$ of $MgCl_2$.

(2) 최적온도: 52°C에서 가장 높은 활성도를 갖는다. 그러나 52°C 이상의 고온에서도 비교적 높은 활성도를 보여준다.

(3) 열안정도: Sephadex G200에서 부분 정제한 효소 150 μ l를 일정온도에서 일정시간동안 열처리한 후 0°C의 얼음물에 넣어 열 효과를 중지

Table 2. Partial purification of GTP cyclohydrolase from extracts of *Pseudomonas putida*.

Enzyme Preparation	Volume of fraction (ml)	Total protein (mg)	Total activity (units)	Specific activity (units/mg)	Yield (%)	Purification factor (fold)
Crude extract	41	1,025	4,920	4.8	100	1.0
Ammonium sulfate fraction	2.2	110	4,004	36.4	81	7.6
Eluates from Sephadex G-200 (High MW form)	9.0	27	3,132	116	64	24.2

시킨다. 10분동안 원심분리 한후 상층액 100 μ l 를 따내어 활성도를 측정한다. 활성도의 반감기는 57°C에서 약 1.5분이다.

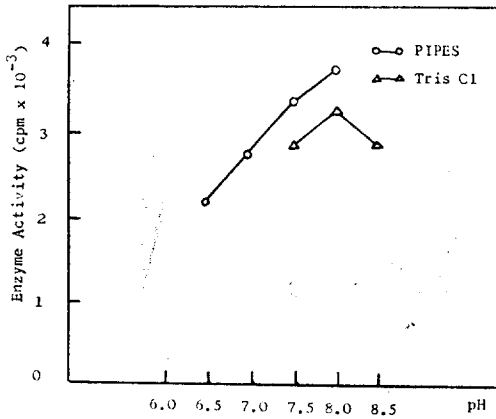


Fig. 3. Effect of pH on the reaction catalyzed by partially purified GTP cyclohydrolase.

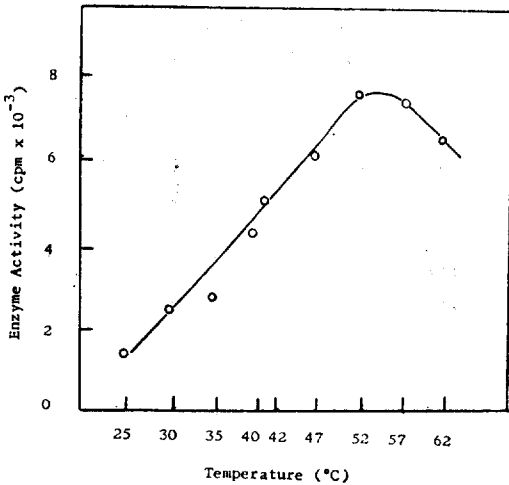


Fig. 4. Effect of temperature on the reaction catalyzed by partially purified GTP cyclohydrolase.

(4) 금속이온 효과 : GTP cyclohydrolase의 활성도에 미치는 금속이온의 효과를 조사하였다. 여기서 사용한 금속이온의 농도는 각각 5mM이다. Cd²⁺와 Hg²⁺에 의해서는 활성도가 완전히 저해 받으며, Mn²⁺, Zn²⁺, Co²⁺, Mg²⁺, Ni²⁺에 의해서는 각각 38%, 55%, 63%, 65%, 73%의 활성도를 나타낸다. 여기에서 조사한 어느 금속이온에 의해서도 효소의 활성도는 증가하지 않는다.

Table 3. Effect of metal ions on the activity of GTP cyclohydrolase.

Metal ion	Relative activity(%)
None	100
Cd ²⁺	0
Hg ²⁺	2
Mn ²⁺	38
Zn ²⁺	55
Co ²⁺	63
Mg ²⁺	65
Ni ²⁺	73

The reaction mixture contains 0.1M PIPES buffer (pH 7.2), 0.1M NaCl, 5mM EDTA(pH 7.6), 100 μ M (8-¹⁴C) GTP, gelfiltered enzyme, and 5mM each of metal ion. Incubation was at 42°C for 2 hrs.

Table 4. Effect of substrate analogues on the utilization of GTP by GTP cyclohydrolase.

Substrate Analogue	Enzyme Activity(%)
None	100
ATP	89
ADP	99
AMP	98
GDP	37
GMP	108

The reaction mixture in the final volume of 0.5ml contains 0.1M PIPES(pH 7.2), 0.1M NaCl, 10mM EDTA(pH 7.6), 100 μ M (8-¹⁴C) GTP, gel-filtered enzyme(140 units), and 1mM each of substrate analogue. Incubation was at 42°C for 2hrs. Enzyme activity is expressed as per cent of activity observed in the absence of analogues.

(5) Km값 : GTP농도의 변화에 따른 반응의 initial velocity를 측정 한 결과 이 효소의 GTP에 대한 친화상수는 약 20 μ M로 측정되었다.

(6) 기질특이성 : GTP와 비슷한 구조의 purine compounds 5가지를 비교 실험한 값에 의하면 ATP, ADP, AMP, GMP는 효소활성도에 큰 영향을 미치지 않으나 GDP는 1mM농도에서 효소 활성도를 약 37%로 감소시킨다(Table 4).

(7) 분자량 : 이 효소의 분자량을 측정하기 위하여 calibrate된 Sephadex G200-120 Column(1

×100cm)을 사용하였다. 표준단백질 Catalase (MW 250,000), Aldolase(MW 61,000), Ovalbumin(MW 45,000)과 RNase A(MW 13,700) 등의 전개속도와 비교하여 peak I과 peak II는 각각 150,000, 40,000의 분자량을 갖는 것으로 측정되었다.

(8) GTP-Sepharose에 대한 친화도 : Sephadex G200분획에서 효소활성도를 나타내는 peak I과 peak II를 모아 3mM EDTA가 들어 있는 50mM phosphate 완충용액 (pH 7.0)에 투석한 후 이중 200 μ l씩을 각각 같은 phosphate 완충용액으로 평형시킨 GTP-Sepharose(0.5ml) column에 건다. 이 column을 100ml의 3mM EDTA를 포함한 50mM phosphate 완충용액 (pH 7.0)으로 닦은후 이 완충용액 30ml에 6mg의 GTP를 녹여 GTP-Sepharose에 붙어있는 효소와 경쟁적으로 씻어낸뒤 각 fraction에 포함된 효소의 활성도를 측정한다(Fig. 5). 이 조건하에서 low MW(peak II) form은 불안정하여 그 수율이 peak I에 비해 많이 떨어졌으나 peak II의 모든 activity가 GTP를 사용경쟁적으로 전개시킨 fraction에 포함되어 있는 것으로 보아 GTP에 대한 친화도가 High MW form에 비해 크다고 추정된다.

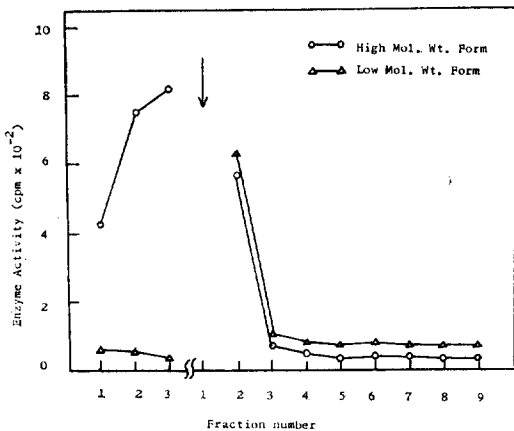


Fig. 5. Elution pattern of peak I and peak II activities from a column of GTP-Sepharose. The first three fractions were collected while the sample was loaded. The following fractions were the competing eluants with GTP. The arrow indicates the point of GTP elution.

최종 생성물 분석 : 재료 및 방법에서 기술한 대로 분석용(*Pseudomonas putida*)과 대조용(*E. coli*)의 최종 생성물을 얻는다. 대조용의 흡수 spectrum을 조사하면 265nm와 340nm에서 최대 흡수파장을 갖는다. 분석용과 대조용의 sample을 345nm에서 excitation시킨후 형광 spectrum을 측정하였다. Fig. 6에 나타난 바와 같이 분석용(peak I과 peak II)과 대조용은 모두 같은 형태의 형광 spectrum을 갖는 것을 알수 있다. 이것으로 보아 *Pseudomonas putida*에 존재하는 두 form의 GTP cyclohydrolase는 최종생성물이 *E. coli*의 그것과 같이 neopterin화합물임을 시사해준다. 한편 분석용(peak I) sample의 흡수 spectrum에는 340nm에 흡수 peak이 있는 것으로 보아 이 neopterin compound의 산화상태는 7,8-dihydro form임을 알수 있다.

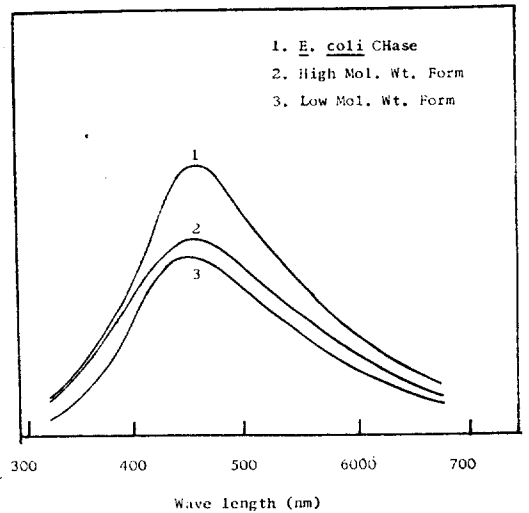


Fig. 6. Fluorescence spectrum of the product of GTP cyclohydrolase from *Pseudomonas putida*. The samples were prepared as described in the materials and methods and were excited at 345nm.

考 察

본 실험을 통해 최초로 *Pseudomonas putida* (IAM 1506)에서 *E. coli* GTP cyclohydrolase I (Yim and Brown, 1976)의 작용과 유사한 folic acid 생합성 과정중 첫번째 단계를 촉매하는데

필요한 효소를 분리 정제하여 그 성질을 밝혔다. 이 효소는 GTP를 기질로 사용하여 H_2 -neopterin compound를 만들어 내는데 이 최종생성물의 보다 정확한 구조 즉 몇개의 인산기가 붙어 있는지, 또 pteridine side chain의 입체구조등은(γ - ^{32}P) GTP를 사용하여 product에 포함된 인산기의 갯수를 확인하는 실험이나, D, erythro-neopterin aldolase (Mathis *et al.*, 1970)와 boric acid에 의한 side chain-OH group들의 입체구조를 확인하는 실험들을 통해 밝혀질 수 있을 것이다. 그러나 이 효소의 최종 생성물중 다른 하나는 formate인 것이 거의 확실하다고 추정된다. 왜냐하면 이 효소는 아무 산화제나 환원제를 필요로 하지 않기 때문에 이런 상태에서의 가수분해는 탄소의 산화상태를 변화시키지 못하고, 따라서 GTP imidazole ring의 8번 탄소의 산화수와 같은 one carbon compound는 formate이기 때문이다.

황산암모늄 분획중 본 실험에서 사용한 분획은 60~80%포화도 부분이다. 그것은 이 분획속에 75% 이상의 C-8 releasing activity가 포함되어 있기 때문이다. 그러나 황산암모늄 분획실험에 의하면 0~40%포화도 부분에서도 낮으나 마(약 20% 정도) GTP cyclohydrolase의 활성도를 보인다. Suzuki등(1972)의 실험에 의하면 *Pseudomonas putida*(IAM 1506)는 ribityl-lumazine을 합성해 세포 밖으로 배출한다. Riboflavin의 직접적인 전구물질인 ribityllumazine의 생합성을 위해서는 *E. coli*의 경우 GTP cyclohydrolase II (Foor and Brown, 1975)의 촉매작용을 필요로 한다. 따라서 황산암모늄 분획중 0~40% 포화도 부분의 GTP cyclohydrolase의 활성도가 과연 60~80% 포화도의 활성도와 같은 것인지 아니면 다른 효소인지를 밝혀봄은 앞으로 *Pseudomonas*에서 riboflavin생합성 경로를 연구하는데 가치가 있다고 생각된다. 그러나 riboflavin을 합성하는 모든 생물들은 *E. coli*에서 발견된 GTP cyclohydrolase II의 활성도를 가지고 있어야 하지만 현재까지 *E. coli*를 제외한 생체들에서 이 효소가 분리되지 않은 점을 고려할 때 이 확인은 더욱 중요한 의미를 갖는다.

부분 정제 실험중 gel-filtration 과정에서 Fig. 2에 보인바와 같이 분자량 150,000과 40,000을 갖는 두 가지 형태의 GTP cyclohydrolase가 존재함을 볼수 있다. 그러나 분자량 40,000을 갖는 형은 이 실험조건에서 매우 불안정하여 어떤 경우에는 gel-filtration 결과 150,000MW form만이 single peak으로 나타나기로 한다. 최종 생성물 분석을 한 결과로는 이 두가지 cyclohydrolase는 똑같이 H_2 -neopterin화합물을 합성하는 반응을 촉매한다. 따라서 peak II가 peak I을 구성하고 있는 subunit인지의 여부는 앞으로 밝혀보아야 할 흥미로운 과제로 남아있다. 이런 두가지 형태를 갖는 GTP cyclohydrolase는 다른 생물에서도 발견된 바 있다. Jackson과 Shiota (1971)는 *Lactobacillus plantarum*에서 GTP cyclohydrolase 활성도를 갖는 두 형태의 효소가 존재함을 발견하였으나 이 효소의 분자량의 차이에 의한 촉매적 성질의 차이는 밝혀지 못하였다. 또한 *Comamonas* sp.에서도 두가지 다른 형태의 GTP cyclohydrolase가 존재한다고 알려졌고(Cone *et al.*, 1974), 이와 비슷한 결과는 *Streptomyces rimosus*에서도 보고되었다(Elstner and Suhadolnik, 1971). 본 실험의 결과 *Pseudomonas*의 경우 두 가지 형태의 효소는 분자량 뿐만 아니라 GTP-Sepharose에 대한 친화도와 Mg^{2+} 에 의한 저해도에서도 차이를 나타낸다. Fig. 5에서 보인 바와 같이 큰 분자량을 갖는 형은 전체 효소활성도중 6%만이 affinity gel에 단단히 결합해 GTP를 사용한 경쟁적 elution시 gel로부터 떨어지고 나머지는 완충용액으로 씻을때 떨어져 나간다. 반면에 작은 분자량을 갖는 형은 전체효소가 gel에 붙으며 이중 17%는 GTP-Sepharose에 단단히 결합되고 나머지는 완충용액으로 씻을때 떨어져 나가는 것으로 사료된다. 한편 Mg^{2+} ion에 대한 효소활성의 저해도는 Fig. 2에 보인 바와같이 10mM Mg^{2+} 에 의해서 큰 분자량을 갖는 형은 23%, 작은 분자량을 갖는 형은 40%의 활성도를 나타낸다. 그러나 이 차이는 효소의 기질이 GTP인 관계로 peak I과 peak II fraction에 포함된 phosphatase activity 차이에서 기인할 가능성도 있다.

이 효소는 낮은 온도에서는 비교적 안정된 상

태로 그 활성도가 유지되나 높은 온도에서는 매우 불안정하다. 즉, gel-filtered enzyme를 -20°C 에서 보관했을 경우 16일이 경과한 후에도 활성도를 처음 상태와 같게 유지하나, 57°C 의 경우 효소활성도의 반감기는 1.5분으로 줄어든다.

이 효소는 pH 8.0의 최적 수소이온 농도, 52°C 의 반응 최적온도를 가지며, $20\mu\text{M}$ 의 Km값을 나타낸다. 또한 GDP에 의해 효소활성도가 방해받으며, 어떠한 금속이온에 의해서도 활성도가 증가하지 않는다.

摘 要

Pseudomonas putida(IAM 1506)에서 최초로 GTP의 8번 탄소를 가수분해하는데 관여하는 효소를 부분정제하여 그 물리화학적 및 효소학적인 특성에 관하여 연구하였다. 이 효소는 Sephadex G-200 chromatography에 의해 2가지 형태, 즉 큰 분자량을 갖는형(분자량 150,000)과 작은 분자량을 갖는형(분자량 40,000)으로 분리된다.

큰 분자량을 갖는형은 약 25배로 부분 정제되었으며 최적 수소이온농도는 pH 8.0, 반응 최적온도는 52°C , Km 값은 약 $20\mu\text{M}$ 로 측정되었다. 이 효소는 Cd^{2+} 과 Hg^{2+} (5mM 농도)에 의해서 활성도가 완전히 저해받으며, Mg^{2+} 을 포함하여 어느 금속이온도 효소활성을 위해 필요하지 않다. 이 효소는 열에 매우 약하여 57°C 에서 약 1.5분의 반감기를 갖는다. 조사한 여러 nucleotide중 GDP에 의해서만 효소활성도가 저해받는다. 이 효소의 반응산물은 Dihydro neopterin화합물과 formate으로서 전자는 이 생체에서 folic acid 생합성을 위한 전구물질로 사용되리라 추정된다.

引 用 文 獻

1. Brown, G. M., J. Yim, Y. Suzuki, M. Heine, and F. Foor(1975) in Chemistry and Biology of Pteridines, W. Pfeleiderer ed., Walter de Gruyter Co., New York, 219~254.
2. Burg, A.W., and G.M. Brown(1968) *J. Biol. Chem.*, **243**; 2349~2358.
3. Burrows, R.B., and G.M. Brown(1978) *J. Bacteriol.* **136**; 657~667.
4. Cone, J.E., J. Plasman, and G. Guroff(1974) *J. Biol. Chem.*, **249**; 5551~5558.
5. Elstner, E.F., and R. Suhadolnik(1971) *J. Biol. Chem.* **246**; 6973~6981.
6. Foor, F., and G.M. Brown(1975) *J. Biol. Chem.*, **250**; 3545~3551.
7. Jackson, R.J., and T. Shiota(1971) *J. Biol. Chem.* **246**; 7454~7459.
8. Jackson, R.J., R. Wilcott, and T. Shiota(1973) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **51**; 428~435.
9. Levenberg, B., and S. Linton(1968) *J. Biol. Chem.*, **241**; 846~852.
10. Mathis, J.B., and G.M. Brown(1970) *J. Biol. Chem.*, **245**; 3015~3026.
11. Suzuki, A., and Goto, M.(1971) *Bull. Chem. Soci. Japan*, **44**; 1864~1872.
12. Suzuki, A., Miyagawa, T., and Goto, M.(1972) *ibid.*, **45**; 2198~2199.
13. Takeda, I., and S. Hayakawa(1968) *Agr. Biol. Chem.*, **32**; 873~878.
14. Yim, J.J., and G.M. Brown(1976) *J. Biol. Chem.*, **251**; 5087~5094.