

## 세포의 Adenosine Deaminase Inhibitor를 생산하는 방선균의 분리 및 특성

김경자\* · 박귀례\*

순천향 대학교 유전공학과, \*국립보건안전 연구원 독성부

(Received February 23, 1994)

### Isolation and Characterization of Actinomycetes Producing Extracellular Adenosine Deaminase Inhibitor

Kyoung-Ja Kim\* and Kui-Lea Park\*

Depart. of Genetic Engineering, Soonchunhyang University, Onyang, 337-880, Korea

\*National Institute of Safety Research, Seoul 122-020, Korea

**Abstract**—A strain of actinomycetes producing extracellular adenosine deaminase inhibitor, strain V-8, was isolated from soil. Strain V-8 was gram positive and its cell wall chemotype was decided as cell wall chemotype I from analysis of diamino pimelic acid isomers and sugar pattern. This strain had a wide range of sugar utilization as carbon sources. The optimal pH and temperature for growth were 6.8~7.0 and 28~30°C, respectively. From the morphological, chemotaxonomical characteristics and analysis of various physiological characteristics, the strain V-8 was identified *Streptomyces* sp.

**Keywords** □ Adenosine deaminase inhibitor, Actinomycetes, Streptomyces.

Adenosine deaminase(ADA, EC 3.5.4.4)는 포유동물의 각 조직에 널리 분포되어 있으며,<sup>1)</sup> 핵산합성의 전구체로 이용되는 adenosine<sup>2)</sup>과 deoxyadenosine의 세포내 농도를 조절하는데 관여한다.<sup>3)</sup> Lymphocyte와 적혈구에서 adenosine deaminase가 결핍된 경우에 심각한 면역결핍증<sup>4)</sup>이 되는 것으로 보아, ADA는 lymphocyte의 성숙과 기능에 필수적임을 알 수 있다. 암치료,<sup>5)</sup> 면역학<sup>6)</sup>과 바이러스학에서 중요한 adenosine 유도체로 adenosine arabinoside(9-β-arabino-furanosyladenine, Ara-A)는 virus-carcinostatic agent로 HSV-1, HSV-2, varicella-, vaccinia virus, cytomegalovirus에 효과가 있는 것으로 보고되었으며, 핵산에 incorporate되거나 DNA polymerase를 억제함으로써 DNA합성을 저해하는 것으로 알려져 있다. 또 다른 adenosine유도체로 cordycepin(3-deoxyadenosine)<sup>7)</sup>과 tubercidin(7-deazaadenosine)이 있는데, 전자는 L-1210에 cytotoxic한 효과를 나타내

며, nuclear RNA 합성을 억제하는 것으로 알려져 있고, 후자는 미생물과 포유동물 세포에 cytotoxic한 것으로 보고되어 있다. 또한 후자의 triphosphate유도체가 phosphofructokinase를 방해함으로써 세포의 glucose이용을 억제하는 것으로 알려져 있다.<sup>8)</sup> 이러한 adenosine 유도체는 ADA의 기질이며, 가끔 이 효소에 의해 불활성화 된다. 그래서 adenosine deaminase 저해제는 adenosine과 adenosine deaminase level을 변화시키고<sup>9)</sup> lymphocyte의 성장과 기능을 변화시켜 adenosin 유도체의 화학요법적 효과를 높인다.

Adenosine deaminase의 강력한 저해제<sup>10)</sup>로 알려진 coformycin<sup>11,12)</sup>은 *Nocardia interforma*와 *Streptomyces kanihardens*에 의해 생성되며, deoxycoformycin<sup>13,14,15)</sup>은 *Streptomyces antibioticus*에 의해 생성됨이 보고되었다.<sup>16)</sup> 이러한 DNA 저해제들은 virus에 의한 질병과 암치료에 효과가 있음이 밝혀졌으며, 특히 coformycin은 arabinosyl adenosine(ara-A)의 herpes simplex virus(HSV) type I에 대한 항바이러스 효과

\*본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로.

를 20배나 증가시키는 것으로 보고되었다. Omura 등은 ADA저해제로 adecorin과 adecypenol을 *Actinomyces sp.*와 *Streptomyces sp.*<sup>17)</sup>에서 분리하였으며, adechlorin이 Ara-A의 L-1210 leukemia에 대한 항암효과를 증진시키는 것으로 밝혔다. 항바이러스제나 항암제로 이용되는 adenosine 유도체들<sup>18)</sup>이 adenosine deaminase에 의해 deamination 되어 효과가 떨어지고 독성이 증가되는 문제점이 보고되었다. ADA 저해제들은 virus에 의한 질병과 암치료를 효과가 있음이 밝혀졌으며, 항바이러스제나 항암제의 치료효과를 증진시키기 위하여, deamination을 억제하는 새로운 adenosine deaminase 저해제(ADI)를 생산하는 균주를 찾아 adenosine deaminase 저해제를 분리, 정제하는 일이 요구되고 있다. 몇가지 알려진 ADI의 경우 간 독성, 오심, 구토, 설사 등의 문제가 보고되고 있으므로 이러한 부작용이 적은 새로운 ADI를 찾는 일이 시급한 실정이다. 또한 새로운 ADI의 병리학적 생리활성과 cytotoxicity를 조사하여 항바이러스제나 항암제로 개발하는 일이 중요하다. 본 연구에서는 토양에서 방선균을 선별하여, 그중에서 항생물질을 생산하는 균주를 1차 검색하였다. 그후 1차 검색된 균주들의 adenosine deaminase 저해제 생산 여부를 조사하여 ADI생산 균주를 분리후 특성을 조사하였다.

### 실험방법

**토양으로부터 방선균의 분리**—충남 근교의 토양을 채취하여 일주일간 응달에 잘 퍼서 말린다음, 멸균 증류수로 희석후, Actinomycetes 분리배지(1% soluble starch, 0.05% NH<sub>4</sub>Cl, 0.05% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.5% agar), Starch-casein-nitrate agar배지와 AS-1(0.1% yeast extract, 0.02% L-alanine, 0.02% L-arginine, 0.05% L-asparagine, 0.5% soluble starch, 0.25% NaCl, 1.0% Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2.0% agar, pH 7.5)배지에 도말후 28℃에서 5~7일간 배양하였다. 각 배지에서 자란 집락을 외적 집락 모양, 색깔 또는 agar 배후색에 따라 분류하여 agar plug에 옮겨 순수 배양하였다.

**항생물질을 생산하는 균주의 분리**—순수 배양된 Actinomycetes를 Trytic soy agar와 V-8 agar plug에 심어 28℃에서 10~14일 정도 배양 후 *Bacillus subtilis* ATCC 6633을 test균으로 사용하여 항균력을

나타내는 균주를 1차 검색하였다.

**Adenosine deaminase 저해제(ADI)생산 배지에 배양**—순수 배양된 항생물질 생산균주들을 adenosine deaminase 저해제 생산 배지 A와 B에 4~8일간 키운 후, 원심분리하여(12,000 rpm, 10분) 상등액을 취하였다.

ADI생산 배지 A<sup>17)</sup>: glucose 0.1%, soluble starch 2.4%, meat extract 0.5%, bacto-tryptone 0.5%, yeast extract 0.5%, CaCO<sub>3</sub> 0.2%, pH 7.2 ADI생산 배지 B: glucose 2.0%, peptone 0.5%, meat extract 0.5%, yeast extract 0.1%, NaCl 0.5%, CaCO<sub>3</sub> 0.3% pH 8.0.

**Adenosine deaminase 저해제 생산여부 조사**—균을 ADI생산 배지에 키운 후, 원심 분리한 상등액으로 다음과 같은 두가지 방법으로 ADI test를 하였다.

방법 A<sup>19)</sup>: 50 mM의 potassium phosphate buffer (pH 7.0)에 균주 상등액(control은 균을 심지않은 배지의 상등액) 0.1 ml과 adenosine deaminase(from calf intestinal mucosa) 1 unit를 첨가하여 20℃에서 10분간 preincubation하였다. 그후 5 mM의 adenosine을 첨가하고 다시 20℃에서 30분간 반응시켰다. 이어 50% trichloroacetic acid 0.1 ml을 첨가하여 반응을 중지시킨 후, 원심분리한 상등액을 Whatman No. 1 여지 혹은 cellulose plate에 점적하여 전개시킨 후 UV로 관찰하였다. 표준물질로 adenosin과 inosine을 같이 점적하여 Rf치를 비교하였다. 전개액으로는 1 N NH<sub>4</sub>OH로 pH 10을 맞춘 증류수를 사용하거나, isoamylalcohol로 포화된 5% Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 용액을 사용하였다. Adenosine을 inosine으로 변화시키지 않았거나 소량변화시킨 균주를 ADI생산 균주로 간주하였다.

방법 B<sup>20)</sup>: Spectrophotometric ADI test-50 mM의 potassium phosphate buffer(pH 7.5)에 균주상등액 20 μl과 adenosine deaminase 0.018 unit를 첨가한 후 21℃에서 30분간 preincubation 하였다. 이어서 0.05 mM의 adenosine을 첨가 후 265 nm에서 흡광도 감소를 측정하였다.

이때

$$\text{inhibitory activity} = \frac{\Delta A_{\text{control}} - \Delta A_{\text{sample}}}{\Delta A_{\text{control}}} \times 100(\%)$$

으로 정하였다.

**분리주 V-8의 형태학적 특성 관찰**—분리주 V-8을

ISP No. 4배지에 도달하여 28°C에 14일간 배양한 후에 생긴 집락을 광학 현미경으로 관찰하고, 주사현미경으로 포자의 사슬형태, 포자표면 형태와 포자크기 등을 관찰하였다.

**분리주 V-8의 배양학적 특성 조사**—분리주 V-8을 ISP배지, nutrient agar 배지에 배양하면서 7일, 14일, 21일 간격으로 성장 정도, 기균사의 색깔, 배면색깔, 가용성 색소 생성 여부 및 펠라닌 생성 유무를 관찰하였다.

**분리주 V-8의 생리학적 특성조사**—당 이용성과 젤라틴 액화력, 전분 분해력 등을 Shirling and Gottlieb(1964)의 방법<sup>20,21)</sup>을 사용하여 조사하였으며, 황화수소 생성은 Kuster and Williams의 방법에 따라 행하였다.<sup>22)</sup> 그외의 특성은 잘 알려진 일반적인 방법에 따라 행하였다.<sup>23,24)</sup>

**세포벽의 diaminopimelic acid(DAP) isomer와 아미노산 분석**<sup>25)</sup>—Brain Heart Infusion 배지에 균을 28°C에서 2일간 배양 후, 균체를 회수하여 건조시키고, 건조세포 20 mg을 6 N HCl 5 ml과 같이 시험관에 넣고 밀봉한 후에 110°C에서 18시간 가수분해 후 냉각하여 Whatman No. 1여지로 여과하였다. 그 여액을 끓는 물속에 넣고 끓여 증발시키고, 잔유물을 1 ml의 증류수에 녹여 다시 한번 증발시킨 뒤에 최종적으로 0.3 ml의 증류수에 녹였다. 이 농축액을 cellulose plate에 점적하여 methanol : water : 6 N HCl : pyridine(80 : 26 : 4 : 10)으로 전개시킨 다음, alcoholic ninhydrin(0.2% ninhydrin in ethanol)으로 발색시켜 확인하였다.

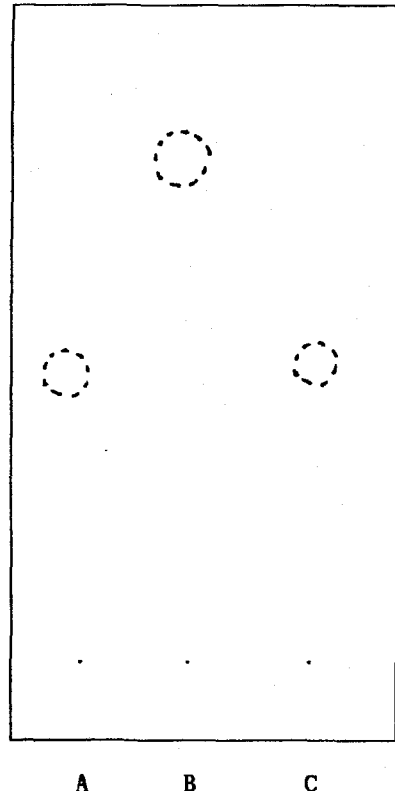
**세포내의 당분석**<sup>26)</sup> 건조시킨 세포 25 mg을 1 N HCl 15 ml와 함께 끓는 물속에 담구어 약 2시간 동안 가수분해 시키고, 포화 Ba(OH)<sub>2</sub>로 pH 5~6이 되게 중화시킨 후 원심분리하여 상등액을 농축시켰다. 이 농축액을 0.3 ml의 증류수에 녹여 TLC시료로 사용하였다. 위의 시료를 cellulose TLC plate에서 n-butanol : pyridine : water : toluene(10 : 6 : 6 : 1)이 포함된 용매로 전개시킨 후 aniline phthalate로 발색시켜 세포내의 당을 확인하였다.

### 결과 및 고찰

**항생물질을 생산하는 토양균의 분리**—3종류의 Actinomycetes 선별 배지에 토양 시료를 도달하여 토

양균을 배양한 후에, 성장한 콜로니를 선택하여 한천 디스크(V-8, TSA)에 도달하여 배양하여 *B. subtilis* ATCC 6633에 대한 항균 효력을 조사한 결과, 1000여개의 콜로니중에서 67개의 콜로니가 *B. subtilis*에 대하여 항균효력을 나타내었다. 항균효력과 adenosine deaminase저해 활성과 서로 관계있는지 여부는 보고된 바가 없으나, 기존의 adenosine deaminase 저해제들이 항생물질을 screening하는 과정에서 발견되었으므로 1차 screening방법으로 항균효력을 조사하였다.

**Adenosine deaminase 저해제 생산여부 조사**—항균효력을 가진 Actinomycetes균주들을 Adenosine deaminase 저해제 생산배지에 배양 후, 상등액을 취하여 adenosine deaminase 활성을 저해하는지 여부



**Fig. 1**—Cellulose thin layer chromatogram of adenosine deaminase inhibitor assay of strain V-8(C) and standard Adenosine(A) and Inosine(B). Solvent: 5% Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, saturated with isoamylalcohol. Spots were detected by UV long and short waves.

를 조사하였다. 즉, adenosine이 adenosine deaminase에 의하여 deamination되어 inosine으로 변화되는지, 균주 상등액에 의하여 deamination 과정이 억제되는지 여부를 TLC plate에 점적한 반응액을 UV로 관찰하여 adenosine, inosine 표준품과 Rf치를 비교하여 조사하였다. 그 중에서 adenosine을 inosine으로 변화시키지 않았거나 약간 변화시킨 균주를 adenosine deaminase 저해제 생산균주로 간주하고 선별하였다(Fig. 1).

**Adenosine deaminase 저해제 생산균주의 분리**— 토양에서 분리된 약 1000종의 actinomycetes 중에서 6종이 adenosine deaminase 저해제를 생산하는 것으로 나타났다. 그 중에서 UV하에서 관찰시 adeno-

sine이 inosine으로 변화하지 않고 남아 있는 정도가 가장 강한 균종을 adenosine deaminase 저해 효과가 가장 큰 것으로 간주하고 이 균종을 strain V-8로 명명하고 이 균주의 형태학적, 생화학적, 생리적 특성을 조사하였다. Strain V-8은 기존의 adenosine deaminase 저해제 생산 균주와는 달리, 배양액에서 흡광도가 430 nm에서 관찰되는 약한 노란색을 띠는 물질을 생산하고 이 물질을 ethylacetate와 chloroform과 같은 유기용매로 추출할 수 있었으며, spectrophotometric ADI test에서 12 µg/ml 농도로 조사한 결과 68% 정도의 adenosine deaminase 저해 효과를 나타내었다. 기존의 adenosine deaminase 저해제 중에서 adecypenol<sup>27)</sup>은 279 nm에서, 2'-chloropentostatatin<sup>28)</sup>은 284 nm에서 최대 흡광도를 나타내었다. 또한 adecypenol이나 adechlorin과 같은 adenosine deaminase 저해제들은 ethylacetate와 chloroform에 녹지 않는 것으로 알려져 있다.

**V-8균주의 형태학적 특성 관찰**—분리주 V-8을 inorganic salts-starch agar 배지에 14일간 키운 후 전자현미경으로 관찰한 결과는 Fig. 2와 같다. 포자 형태는 타원형 모양이었으며, 포자표면은 우툴우툴하였다.

**세포벽의 diaminopimelic acid(DAP) isomer와 아미노산 및 세포내 당분석**—분리주 V-8의 세포벽 DAP isomer는 LL-DAP였으며, 아미노산은 alanine, glutamic acid와 glycine이 검출되었으며(Fig. 3), 세포내

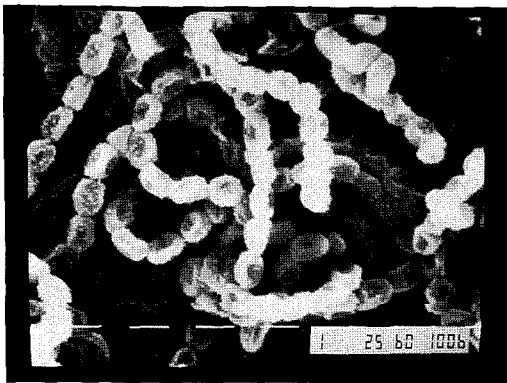


Fig. 2—Scanning electron micrograph of the isolated Strain V-8 cultured on ISP No. 4 medium for 14 days.

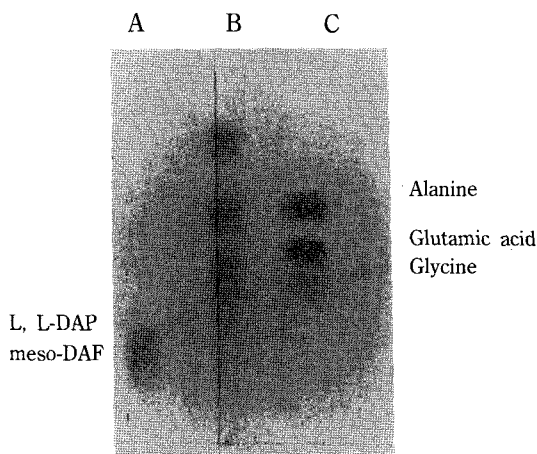


Fig. 3—Cellulose thin layer chromatogram of cell wall diaminopimelic acid(DAP) isomers and amino acids of the isolated Strain V-8(B) and standard acids(A,C).

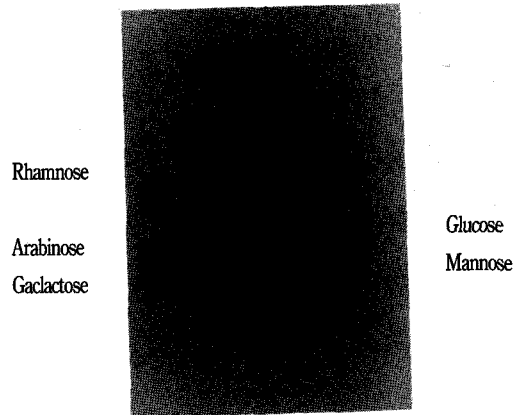
Table 1—Physiological Characteristics of Strain V-8

Test	Result
Indole formation	negative
Catalase	positive
Oxidase	negative
Methyl-Red test	negative
Voges-Proskauer test	negative
Urease	negative
Hydrolysis of starch	negative
Degradation Test: Casein	positive
Tyrosine	positive
Xanthine	negative
Gelatin liquefaction	negative
H <sub>2</sub> S Formation	negative
Temperature range of growth	12~38°C (Opt. Tem.: 28~30°C)
Growth pH	pH 6~pH 8

의 당은 없는 것으로 나타났다(Fig. 4).

**V-8균주의 생리적 특성 조사**—분리주 V-8균주의 성장 최적온도는 28~30°C로 나타났으며 casein, tyrosine, starch 등을 분해하고 catalase test에서는 양성을 나타냈다. H<sub>2</sub>S는 생산하지 않는 것으로 나타났으며, indole; oxidase; methyl red test, Voges-Proskauer test에서는 음성을 나타냈다(Table I).

**V-8균주의 탄소원 이용도**—분리주 V-8은 L-arabinose, D-glucose, D-xylose, D-rhamnose, raffinose, inositol 등 많은 당류를 탄소원으로 이용하였으나 sucrose를 탄소원으로 첨가한 배지에서는 성장이 부



**Fig. 4**—Cellulose thin layer chromatogram of whole cell sugar extract of the isolated Strain V-8(B) and standard sugar(A,C).

**Table II**—Utilization of carbon source by Strain V-8

Carbon source	Utilization
L-Arabinose	positive
D-xylose	positive
D-Glucose	positive
L-Rhamnose	positive
D-Galactose	positive
D-Mannitol	positive
Raffinose	positive
Inositol	positive
D-Fructose	positive
Salicin	positive
Sucrose	doubtful

진한 것으로 나타났다(Table II).

**V-8균주의 배양학적 특성조사**—V-8균주는 actinomycetes를 포함한 박테리아의 배양에 이용되는 일반 배지에 잘 자랐다. 멜라닌 색소는 peptone-yeast extract-iron agar 배지에서 생산되었으며, 그의 glycerol-asparagine-agar, inorganic salts-starch agar, nutrient agar와 oatmeal agar 등에서는 모두 노란색

**Table III**—Cultural Characteristics of Strain V-8

Medium	Growth	Aerial mycelium	Reverse side pigment	Soluble pigment
Typtone-yeast extract agar(ISP No.1)	moderate	yellow	yellow	yellow
Glycerol-asparagine agar (ISP No.5)	abundant	white	yellow	yellow
Inorganic salts-starch agar (ISP No.4)	abundant	purplish balack	pinkish yellow	yellow
Nutrient agar	abundant	white	yellow	yellow
Yeast ext.-malt ext. agar (ISP No.2)	moderate	white	yellow	yellow
Oatmeal agar (ISP No. 3)	abundant	purplish balck	pinkish yellow	yellow
Peptone-yeast ext. iron agar (ISP No.6)	moderate	whitish yellow	whitish yellow	blackish blue
Tyrosine agar (ISP No. 7)	moderate	whitish yellow	yellowish brown	yellow

색소를 생산하였다. 호기균사체(aerial mycelium)의 색은 yellow, white, pink 등으로 나타났다(Table III).

위와 같은 형태학적, 생리적특성 등과 탄소원 이용도를 조사한 결과, 분리주 strain V-8을 *Streptomyces* sp.로 동정하였다.

## 결 론

토양으로부터 순수 분리된 acinomyces 중에서 *B. subtilis*에 대하여 항균 효력을 가진 균주를 선별 하여서 adenosine deaminase 저해제 생산 배지에 4~8일간 배양하였다. 그후 배양 상등액을 취하여 adenosine을 기질로 사용하여 deamination을 억제 하는지를 조사하였다. 가장 억제효과가 큰 균주를 strain V-8로 명명하고, 이 균주의 생리적, 생화학적 특성 등을 조사하였다. 분리주 V-8은 그람양성, 비항산성균으로, 세포벽 구성성분을 조사한 결과, L, L-diaminopimelic acid를 함유하는 cell wall type I이었으며, 당은 함유하고 있지 않는 것으로 나타났다. 형태학적, 화학적 분석 결과들과 여러가지 생리적 특성들을 조사한 결과, 분리주 strain V-8을 *Streptomyces* sp.로 동정하였다.

## 감사의 말씀

본 연구는 1992년도 보건사회부 신약개발 연구비 지원에 의해 이루어졌으며, 연구비 지원에 감사드립니다.

## 문 헌

- 1) Smith, J. F. and Harrap, K. R.: Adenosine Deaminase Acidity in Leukemia.: *Br. J. Cancer* **31**, 544 (1975).
- 2) Wolberg, G., Zimmerman, T. P., Hienstra, K., Winston, M. and Chu, L. -C.: *et al.*: Adenosine Inhibition of lymphocyte-Mediated Cytolysis. Possible Role of Cyclic Adenosine Monophosphate. *Science*, **187**, 957-959 (1975).
- 3) Conner, J. D. Sweetman, L., Carey, S., Stuckey, M. A. and Buchman, R.: Effect of Adenosine Deaminase upon the Antiviral Activity, *In vitro* of Adenosine Arabinoside for vaccinia virus. *Antimicrob. Ag. Chemother*, **6**(5), 630-636 (1974).
- 4) Giblett, E. R. and Anderson, J. E.: Adenosine Deaminase Deficiency in two patients with severely impaired cellular Immunity. *The Lancet*, Nov. **18**, 1067-1069 (1972).
- 5) Gloth, A.: Antimetabolites in Cancer Chemotherapy: Past, Present and Future. in FEBS vol. 57, Skoda, J. and Langen, P.(eds) Pergamon press p. 163-313 (1978).
- 6) Twomey, J. J. Laughter, A. H. and Steinberg, A.: A Serum Inhibitor of Immune Regulation in Patients with Systemic lupus Erythematosus. *J. Clin. Invest.* **62**, 713-715 (1978).
- 7) Glazer, R. I. and Knode, M. C.: Neoplanocin a, A cyclopentenyl analog of Adenosine with Specificity for inhibiting RNA methylation. *J. Biol. Chem.* **259**(21), 12964-12969 (1984).
- 8) Fox, I. H. and Kelly, W. N. The Role of Adenosine and 2'-deoxyadenosine in mammalian cells. *Ann. Rev. Biochem.* **47**, 655-686 (1978).
- 9) Agarwal, R. P. Spector, t. and Parks, R. E.: Tight-Binding Inhibitor-IV. Inhibition of Adenosine Deaminase by vaious Inhibitors. *Biochem. Pharm.* **26**, 359-367 (1977).
- 10) Cha, S.: Tight-binding Inhibitors-III. A new Approach for the Determination of Competition between Tight-binding Inhibitors and Substrates-Inhibition of Adenosine Deaminase by Coformycin. *Biochem. Pharmacol.* **25**, 2595-2702 (1976).
- 11) Cha, S. Agarwal, R. P. and Parks, R. E.: Tight-binding Inhibitors-II, Non-steady State nature of Inhibition of milk Xanthine Oxidase by Allopurinol and Alloxanthine and of Human erythrocytic Adenosine Deaminase by Coformycin. *Biochem. Pharm.* **24**, 2187-2197 (1975).
- 12) Ballet, J. J. Insel, R. Merler E and Rosin, F.: Inhibition of maturation of Humman Precursor Lymphocytes by Coformycin, An Inhibitor of the Enzyme Adenosine Deaminase. *J. exp. med.* **143**, 1271 (1976).
- 13) Poplack, D. G. Sallan, S. E. and Johns, D.: Phase I Study of 2'-Deowyciformacin in Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancer Res.*, **41**, 3343-3346 (1981).
- 14) Siaw, M. F. E. and Coleman, M. S.: *In vitro* Metabolism of Deoxycoformacin in Human T Lym-

- phoblastoid cells. *J. Biol. Chem.*, **259**(15), 946-9433 (1984).
- 15) Lofters, W. Campbell, M. Gibbs, W. N., and Cheson, B. D.: 2'-Deoxycoformycin Therapy in Adult T-Cell leukemia. Lymphoma. *Cancer*, **60**, 2605-2608 (1987).
  - 16) Hanvey, J. C. Hardman, J. K, Suhadolnik, R. J. and Baker, D.C.: Evidence for the Conversion of Adenosine to 2'-Deoxycoformycin by *Streptomyces antibioticus*. *Biochemistry*, **23**, 904-907 (1984).
  - 17) Omura, S. Imamura, N. Kuga, H. and Ishikawa, H.: Adechlorin, a new adenosine Deaminase Inhibitor containing Chlorine Production, Isolation and Properties. *J. Antibiot.* **38**(8), 1008-1015 (1985).
  - 18) Plunkett, W. and Cohen, S. S. Two Approaches that Increase the Activity of Analogs of Adenosine Nucleosides in Animal Cells. *Cancer Res.* **35**, 1547-1554 (1975).
  - 19) Tanaka, H. and S. Omura: New adenosine deaminase inhibitors, adechorin and adecypenol. In Novel microbial products for Medicine and Agriculture. A. L. Demain, G. A. Somkuti, J. C. Hunter-Cerera and H. W. Rossmore. ed. SIM. 67-72 (1989).
  - 20) Shirling, E. B. and D. Gottlieb.: *Streptomyces* Type Culture Projector. *Methods manual.*, pp. 1-27 (1964).
  - 21) Pridham, T. G. and D. Gottlieb: The utilization of carbon compounds by ab aid for species determination. *J. Bacteriol.* **56**, 107-114 (1948).
  - 22) Kuster, E. and S. T. Williams. Selection of media for isolation of streptomycetes. *Nature*, **202**, 928-929 (1964).
  - 23) Holding, A. J. and J. G. Cole: Routine biochemical tests, p. 2-23. In J. R. Norris and D. W. Ribbons(ed), *Methods in microbiology*, vol. 6A. Academic press, Inc., New York (1971).
  - 24) Skerman, V. B. D.: Abstracts of microbiological methods. Wiley-Interscience, New York (1969).
  - 25) Becker, B., Lechevalier, M. P., Gordon, R. E. and H. A. Lechevalier: Rapid differentiation between *Nocardia* and *Streptomyces* by paper chromatography of whole cell hydrolysate. *Appl. Microbiol.* **12**(5), 421-423 (1964).
  - 26) Staneck, J. L. and G. D. Roberts: Simplified approach to identification of aerobic actinomycetes by thin layer chromatography. *Appl. Microbiol.* **120**, 281 (1974).
  - 27) Hotta, M., Hayakawa, Y., Furihata, K., Shimazu, A., Seto, H. and Otake, N. Adecylpenol, A unique Adenosine deaminase inhibitor containing homopurine and cyclopentene Rings. *J. Antibiot.* **34**(2), 309-313 (1985).
  - 28) Schaumberg, J. P., Hokanson, G. C. and French, J. C. 2'-Chloropentostatin, a new Inhibitor of Adenosine Deaminase. *J. Org. Chem.* **50**, 1652-1656 (1985).