

5-Fluorocytosine과 세포외 Cytosine Deaminase의 병용투여에 의한 항암효과의 발현

김 대 현 · 김 정 · 유 대 식
경북과학대학 약용식품학과, 전통발효연구소
¹계명대학교 자연과학대학 미생물학과
(접수 : 1998. 8. 17., 게재승인 : 1998. 11. 6.)

Revelation of Antitumor Effect in Combination with 5-Fluorocytosine and Extracellular Cytosine Deaminase

Tae Hyun Kim, Jung Kim¹, and Tae Shick Yu[†]

Department of Herbs Foods, Traditional Food Institute, Kyongbuk College of Science, Chilgok-Gun, Kyngbuk 718-850, Korea.

¹Department of Microbiology, College of Natural Science, Keimyung University,

Shindang Dong, Dalseo Ku, Taegu 704-701, Korea

(Received : 1998. 8. 17., Accepted : 1998. 11. 6.)

This study was carried out particularly focusing on the antitumor effect in combination with 5-fluorocytosine(5-FC), antifungal agent, and extracellular cytosine deaminase from *Chromobacterium violaceum* YK 391 against U-937, K-562 and SNU-C4 cells. While the addition of 10 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ of anticancer agent, 5-fluorouracil(5-FU), to U-937, K-562 and SNU-C4 caused the decrease of proliferation 90%, 75% and 93% respectively, the addition of 20 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ of the extracellular cytosine deaminase and 10 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ of antifungal agent 5-FC caused the decrease of proliferation 80%, 70% and 90%, respectively. These results, therefore, reveal that this enzyme has the similar clinical effect for considering of adjuvant antitumor effect. From the above results, the treatment of 5-FC and the cytosine deaminase was very effective and showed the possibility to remove side effects which easily occur by the treatment of 5-FU only. An extracellular cytosine deaminase from *C. violaceum* YK 391 is far more effective in the continuous large-scale production than intracellular cytosine deaminase.

Key Words : 5-fluorocytosine, 5-fluorouracil, extracellular cytosine deaminase, *Chromobacterium violaceum* YK 391.

서 론

Cytosine deaminase(cytosine aminohydrolase, EC 3. 5. 4. 1)는 핵산의 pyrimidine 염기 중의 하나인 cytosine의 4번 탄소에 위치한 아미노기를 가수분해하여 uracil과 암모니아로 전환시키는 가수분해 효소이다. 이 효소는 1923년에 처음 발견된(1, 2) 이래 세균(3, 4, 5), 효모(6, 7), 방선균(8), 곰팡이(9) 등 여러 종류의 미생물에서 세포내 효소로 발견되었다.

세포내 cytosine deaminase에 관한 연구로서, Kream와 Chargaff(10)는 cytosine deaminase의 효소학적 특성을 연구하였으며, Kaltwasser와 Kramer(11)는 cytosine을 함유한 배지에서 cytosine deaminase활성이 증가된다고 하였다. Ipata 등(6)은 빵효모에서 부분 정제한 cytosine deaminase의 효소학적 성질을 밝혔다. Sakai 등은 *Serratia marcescens*(3)와 *Pseudomonas*

aureofaciens(4)로부터 cytosine deaminase를 전기 영동적 분석법과 초원심 분리법에 의하여 단일 효소 단백질로 최초로 정제하였으며, West 등(5)은 *Salmonella typhimurium*으로부터 전기 영동적으로 단일 효소 단백질로 정제하였다. Yu 등(9)은 사상균인 *Aspergillus fumigatus*에서 단일 효소 단백질로 정제하고 효소학적 특성을 보고하였다.

그러나 고등 동·식물은 cytosine deaminase와 nucleoside phosphatase를 생합성하지 못하므로 cytidine을 uridine으로 전환시키는 cytidine deaminase의 촉매로 cytidine은 uridine으로만 전환되어 uracil로 대사된다. 이 때문에 고등 동·식물(12)에서는 핵산에서 분해되거나 섭취된 cytosine이 더 이상 대사될 수 없을 뿐만 아니라 Salvage 생합성될 수 없기 때문에 체외로 매설되기만 한다.

Cytosine의 유도체 중의 하나인 5-fluorocytosine에 대하여 Duschinsky 등(13)은 항증양 효과가 없다고 보고한 반면, Grunberg 등(14)은 진균 감염에 대하여 화학 요법 효과가 있다고 하였다. 진균에서 화학 요법의 효과가 나타나는 것에 대하여 Gege와 Weil(15)은 진균 체내에 5-FC를 5-fluorouracil로 탈아미노화시키는 효소인 cytosine deaminase가 존재하기 때문이라

[†] Corresponding Author : Department of Microbiology, Keimyung University, Taegu 704-701, Korea
Tel 82-53-580-5252, Fax 82-53-580-5164
e-mail : tsyu@kmucc.keimyung.ac.kr

고 하였다.

Koechline 등(12)은 5-fluorocytosine-2 ¹⁴C의 투여 후, 그 소체를 추적한 결과, RNA 분획 중에 존재한다고 밝혔다. 진균 체내에서의 5-FC는 cytosine deaminase에 의하여 탈아미노화되어 5-FU로 전환되기 때문에 핵산 생합성이 저해되면서 항진균 작용을 나타내게 된다고 추측했다.

Pyrimidine계 유도체로서 항종양 물질로는 5-FU, 5-fluoro-2'-deoxyuridine, 1-(2-tetrahydrofuryl)-5-fluorocytosine, cyclocytosine, 1-β-D-arabinofuranosylcytosine, thymosine, FT-207, 6-azauracil 및 6-azauridine 등이 있다. 이들 중 5-fluorouracil은 생체 내에서 uridine kinase에 의하여 5-fluorodeoxyuridine monophosphate로 되어 thymine산 생합성 반응을 저해함으로써 DNA 생합성을 억제하여 항종양 효과를 나타내게 된다(16). 5-FU를 직접 항암제로 사용한 임상 연구도 알려져 있으나, 5-FU를 인체 내로 장시간 투여할 경우, 면역 억제 반응 및 간, 위장 등에 부작용을 유발하는 것으로 알려져 있다. 이러한 부작용을 최소화하기 위해 1984년 Bertino(17)는 methotrexate(MTX)와 5-FU의 시간차 투여법을 이용한 화학 요법(18)을 연구하였다. 항진균 작용을 나타내는 5-FC를 인체 내로 투여하였을 때, 인체 내에 cytosine deaminase가 존재하지 않으므로 항종양 효과가 나타나지 않는다고 했으며(19) 쥐(rat)나 인체에 삽취된 대부분의 5-FC는 체외로 배설된다고 하였다(12). 특히 Nishiyama 등(20, 21, 22)은 5-FC를 5-FU로 전환시키는 *E. coli*의 cytosine deaminase와 5-FC를 병행 투여하면 HeLa 세포와 EA-285 췌장암 세포의 증식이 현저하게 저해되며 Fischer S 344F DUCRJ 쥐의 뇌종양 피사소가 형성됨으로써 특이적으로 뇌종양에 항암 효과를 나타낸다고 하였다. 또한 cytosine deaminase enzyme capsule을 이용한 암 화학 요법 가능성을 시사하였다(23, 24). 1994년 cytosine deaminase를 항체와 결합시키는 새로운 항암 요법(25)을 시도하는 등 cytosine deaminase와 관련된 임상학적인 측면에서의 연구가 활발히 진행되므로 의학계에서 항암 보조제로서의 cytosine deaminase에 대한 중요성이 증대되고 있다.

재료 및 방법

사용시약

5-Fluorocytosine, 5-fluorouracil, fetal bovine serum, diphenylloxazole(ppo)와 1,4-bis[5-phenyl-2-oxazolyl] benzene-2,2'-p-phenylene-bis[5-phenyl-2-oxazolyl] (poppo)는 Sigma Co.(U.S.A.)의 제품을 사용했으며, peptone과 효모추출물은 Difco Co.(U.S.A.)의 제품을, Dulbecco's modified Eagle medium(DMEM)와 minimum essential medium (MEM)은 Gibco BRL(Canada)의 제품을 구입하여 사용했다.

³H-thymidine는 Amersham Co.(U.S.A.)로부터 구입하여 사용했다.

사용균주 및 세포주

실험에 사용될 cytosine deaminase생성균주는 본인 등(26)이 분리한 세포의 cytosine deaminase를 강력히 분비하는 *Chromobacterium violaceum* YK 391을 사용했다.

세포주는 계명대학교 의과대학의 liquid nitrogen storage vessel에 보관중인 인간 조직구성 림프종 세포계(human histi-

ocytic lymphoma cell line)인 U-937 세포(27), 인간 만성 골수성 백혈병 세포계(human chronic myelogenous leukemia cell line)인 K-562 세포(28)와 서울 대학교에서 분리한 인간 결장암 세포계인(human colon cancer cell line)인 SNU-C4 세포(29)를 cell line으로 사용했다.

세포주의 배양

세포주의 배양은 액화질소 저장 vessel에서 cryogenic vial을 37°C 수조에 넣어 녹인 후, phosphate-buffered saline으로 1,600 rpm에서 원심 분리하여 상등액을 제거하는 방법으로 2회 세척하고, 75cm² tissue culture flask(Corning Co.)에 10% fetal bovine serum(FBS, Gibco BRL Co.)이 든 Eagle의 최소 배지(MEM)에 대한 Dulbecco 변법으로 약간 수정된 배지(DMEM) 20 ml를 넣어 세포주 부유액을 조제하였다.

조제된 U-937, K-562 및 SNU-C4 cell을 10% FBS가 든 DMEM 배지에 2×10⁶cell/ml 농도로 세포를 부유시키고 96 well cell culture용 plate에 100 μl씩 분주하였다. 세포주의 배양은 가슴된 4.5% CO₂배양기(Nap Co. 6200)에서 37°C로 48시간 정치배양하였다.

Cytosine deaminase의 정제

C. violaceum YK 391은 세포의 효소 생성용 배지 [1% soluble starch, 1% peptone, 0.1% meat extract, 0.1% yeast extract, 0.05% K₂HPO₄, 0.01% NaCl, 0.01% MgCl₂·7H₂O와 0.1% Silicone KM-70 (Sim-etsu Chemical Industry Co., Tokyo, pH 7.5)]에서 30°C, 3일간 통기 배양하여 배양액을 원심 분리하여 상등액을 조효소액으로 사용했다(30).

세포의 cytosine deaminase의 조효소액은 Yu와 Kim의 방법(31)에 의하여 유안분획, Sephadex G-100과 DEAE-cellulose와 Ultrogel A6 column chromatography하여 정제했다.

Radioactivity 측정

CO₂ 배양기에서 배양된 세포주 200 μl에 ³H-thymidine(Amersham Co.)을 1 μCi/well로 첨가하여 12 시간 더 배양한 후, cell harvester(Dynatech Co.)로 세포를 수거하여 toluene 1 l에 2,5-diphenylloxazole(ppo Sigma Co.) 4 g과 1,4-bis[5-phenyl-2-oxazolyl] benzene-2,2'-p-phenylene-bis[5-phenyl-2-oxazolyl] (poppo) 0.1 g이 들어 있는 cocktail solution에 넣은 후, liquid scintillation counter LS7800 (Beckman, U.S.A.)로 radioactivity를 측정하였다.

Cancer cell line에 대한 항암 효과 측정

종양세포에 대한 5-FU 및 5-FC와 cytosine deaminase를 함께 사용하였을시의 항암효과를 측정하기 위하여 5-FU 및 5-FC와 효소혼합액을 종양세포주의 배양액에 각각 첨가하여 가슴된 CO₂ 배양기에서 배양하였다.

즉, 5-FU를 0, 0.1 μg/100 μl, 1 μg/100 μl, 10 μg/100 μl씩 각 농도별로 종양세포주 배양액에 첨가한 경우와 10 μg/100 μl 5-FC에 cytosine deaminase용액을 0, 10 μg/100 μl, 20 μg/100 μl, 40 μg/100 μl씩 각 농도별로 병행 첨가한 경우, 그리고 20 μg/100 μl 5-FC를 첨가한 경우 등을 실험구로 하여 total volume이 200 μl되게 배양액을 조제하였다. 조제된 배양액에 세포주 부유액을 분주하여 배양하였다.

결과 및 고찰

U-937 cell에 대한 항암 효과

C. violaceum YK 391이 분비하는 세포의 cytosine deaminase와 5-FC를 병행하여 인간 조직구성 림프종 세포제인 U-937 cell 배양액에 첨가하였을 때 U-937 cell의 증식에 미치는 영향을 검토하기 위하여 DMEM 배지 100 μ l에 5-FC와 cytosine deaminase, 5-FU를 각각 다른 농도별로 100 μ l 첨가하여 총 부피 200 μ l 되게 하고, 37°C에서 가습된 45% CO₂ 배양기에서 48시간 배양한 결과는 다음과 같다.

항암제인 5-FU에 대한 U-937 cell의 증식 억제 정도를 검토하기 위해 5-FU를 각 농도별로 단독으로 처리한 결과, U-937 cell의 증식은 Figure 1 (A)와 같이 5-FU 1 μ g/100 μ l 이상에서 45%의 증식이 억제되었으며 10 μ g/100 μ l에서 90%의 증식이 억제되었다. 항진균제로서 항암 효과가 없는 5-FC 10 μ g/100 μ l와 본 세포의 cytosine deaminase를 각 농도별로 병행 처리하므로 Figure 1 (B)와 같이 cytosine deaminase 10 μ g/100 μ l에서 U-937 cell의 증식을 45%이상 억제시켰으며 20 μ g/100 μ l에서는 약 80%의 증식이 억제되었다 이는 본 세포의 cytosine deaminase와 항진균제인 5-FC를 병행 투여함으로써 항암제인 5-FU 단독 처리시와 같은 항암효과를 나타내어 5-FU의 부작용을 최소화하는 화학 요법으로 이용 가능성을 시사하는 것으로 여겨진다.

동물세포에는 cytosine deaminase의 활성을 나타내지 않으므로(12) 5-FC에 의한 항암효과는 나타내지 않는다고 사료된다. 그러나 종양세포주에서의 5-FC의 항암성의 발현이 어떻게 나타

나는지를 규명하기 위하여 U-937 cell에 5-FC를 단독 투여하여 생육정도를 측정하였다. 위의 실험에서 5-FC 20 μ g/100 μ l는 U-937 cell의 증식에 아무런 영향을 미치지 않으므로 U-937 cell에 대한 5-FC의 항암효과는 나타나지 않았다(결과 미기재)

K-562 cell에 대한 항암 효과

항암제 5-FU 10 μ g/100 μ l를 단독 처리한 경우와 항진균제 5-FC 10 μ g/100 μ l에 본 세포의 cytosine deaminase를 병행 처리하므로 인간 만성적인 골수성의 빈혈을 유발하는 백혈병 세포제인 K-562 cell의 증식에 미치는 영향을 검토한 결과는 다음과 같다.

5-FU를 각 농도별로 단독 처리하였을 때 K-562 cell의 증식은 Figure 2 (A)와 같이 5-FU 1 μ g/100 μ l 이상에서는 50%이상의 증식이 억제되었으며 10 μ g/100 μ l에서는 75%의 증식이 억제되었다. 5-FC 10 μ g/100 μ l와 cytosine deaminase를 병행 처리하였을 때 Figure 2 (B)와 같이 cytosine deaminase 10 μ g/100 μ l에서 K-562 cell의 증식이 40% 억제되었으며 20 μ g/100 μ l에서는 50%의 증식이 억제되었다. 이는 U-937 cell에 비해 K-562 cell은 5-FU에 대한 증식 억제 정도가 다소 낮은 경향을 나타내나 5-FU 단독 처리 시와 거의 유사한 경향을 보임에 따라 항암제 5-FU의 부작용을 최소화하는 화학 요법으로 5-FC와 cytosine deaminase를 병행 투여하는 방법을 적용함에 있어서 긍정적이라 여겨진다.

5-FC 20 μ g/100 μ l는 K-562 cell의 증식에 아무런 영향을 미치지 않았다(결과 미기재).

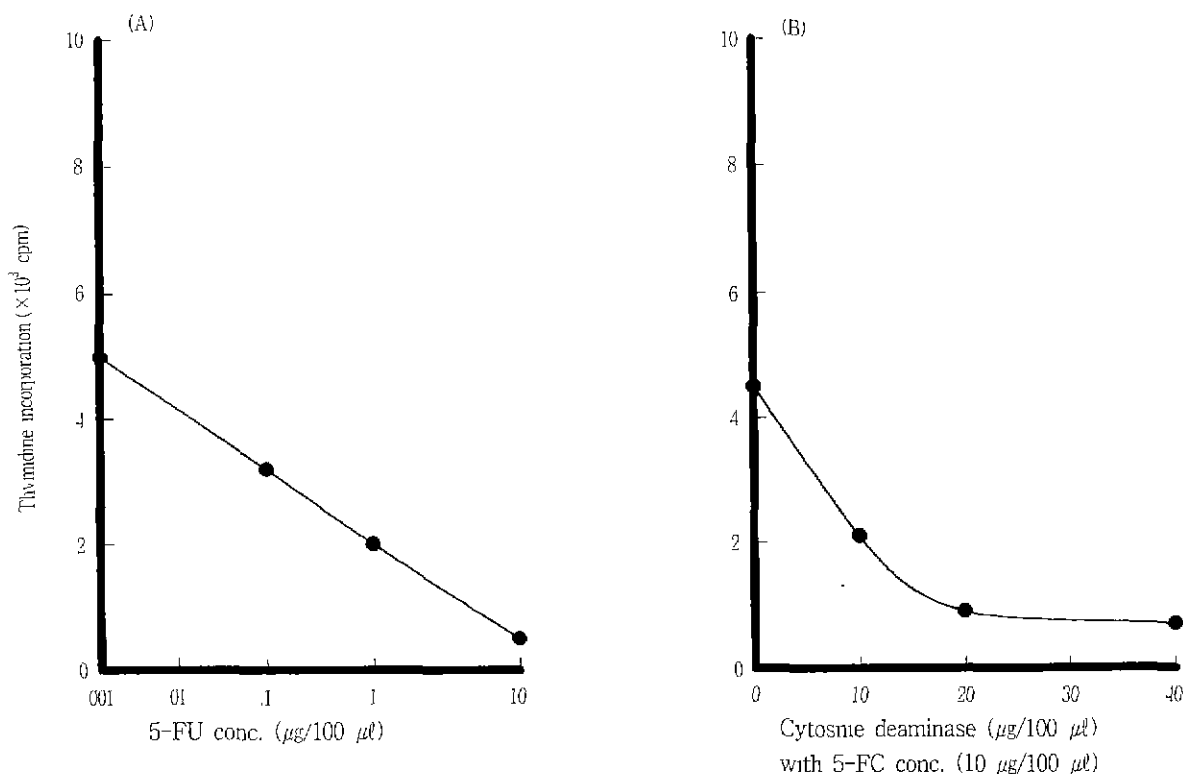


Figure 1 Antitumor effects of 5-fluorouracil (A) and 5-fluorocytosine with the cytosine deaminase (B) on human histiocytic lymphoma cell line U-937.

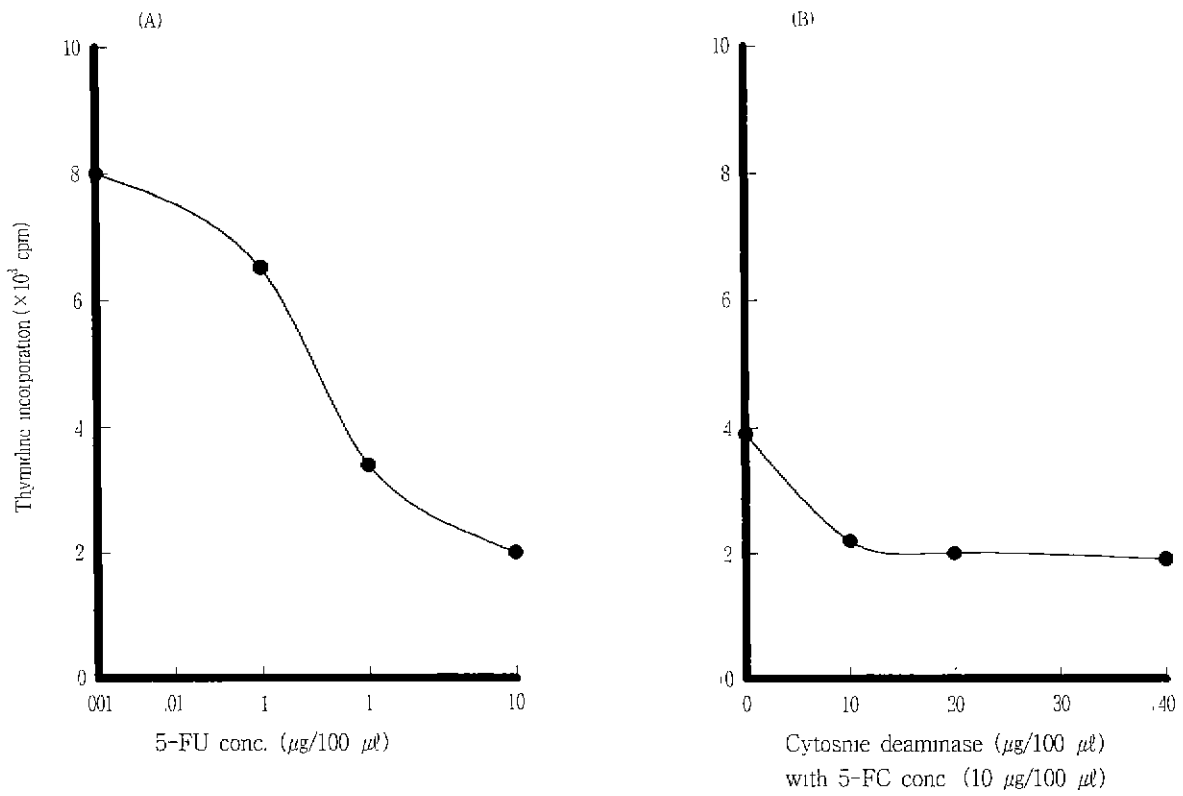


Figure 2. Antitumor effects of 5-fluorouracil (A) and 5-fluorocytosine with the cytosine deaminase (B) on human myelogenous leukemia cell line K-562.

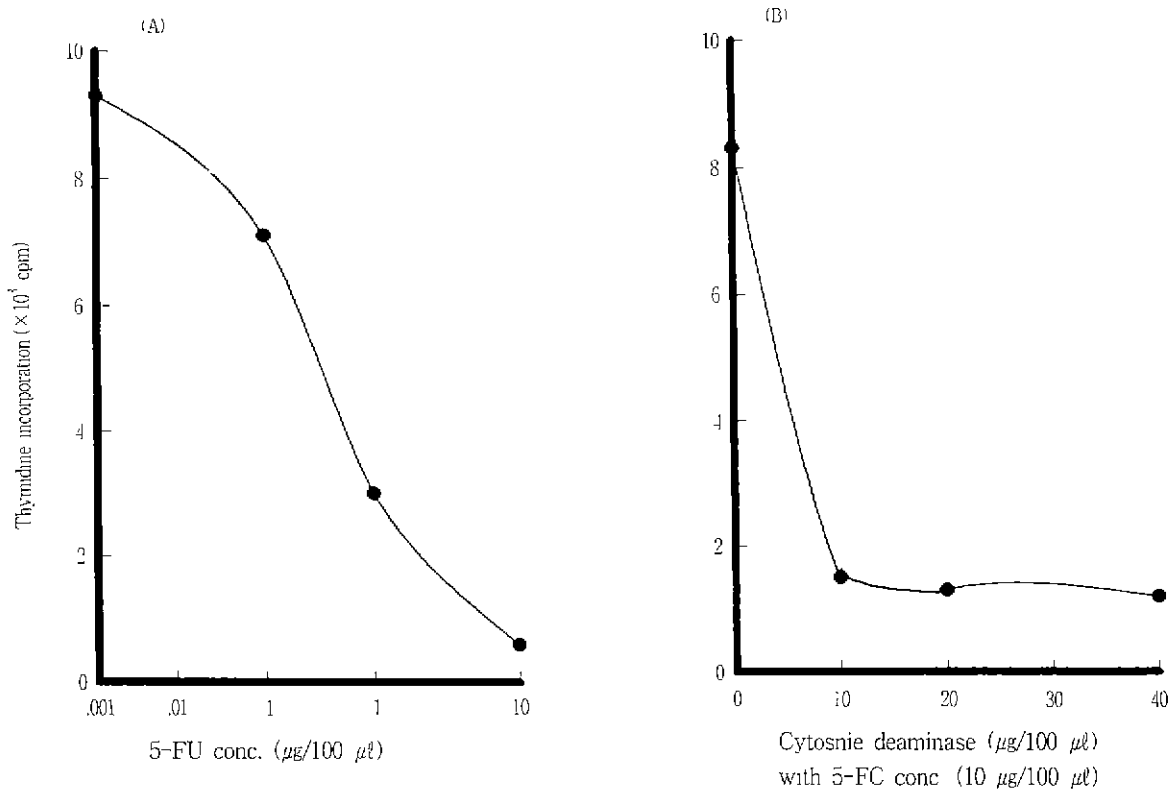


Figure 3. Antitumor effects of 5-fluorouracil (A) and 5-fluorocytosine with the cytosine deaminase (B) on human colon cancer cell line SNU-C4.

SNU-C4 cell에 대한 항암 효과

5-FU 단독 처리 경우와 5-FC에 세포외 cytosine deaminase를 병행 처리하였을 경우 인간 결장암 세포계인 SNU-C4 cell의 증식에 미치는 영향을 검토한 결과는 다음과 같다.

5-FU를 각 농도별로 단독으로 처리하였을 때 SNU-C4 cell의 증식은 Figure 3 (A)와 같이 5-FU 1 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ 이상에서는 70%의 증식이 억제되었으며 10 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ 에서는 약 93%의 증식이 억제되었다. 5-FC 10 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ 와 cytosine deaminase를 병행 처리하였을 때 Figure 3 (B)와 같이 cytosine deaminase 10 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ 에서 SNU-C4 cell의 증식이 90% 이상 억제되었다. 이는 U-937 cell과 K-562 cell에 비해 현저히 증식이 억제되어 5-FU 단독 처리한 경우 뿐만 아니라 5-FC에 cytosine deaminase를 병행 처리한 경우 모두 높은 감수성을 나타내어 5-FU에 대한 부작용을 최소화하기 위하여 5-FC와 cytosine deaminase를 병행 처리하는 화학 요법을 임상적으로 적용하기에 타당성이 높다고 사료된다.

5-FC 20 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ 는 SNU-C4 cell의 증식에 아무런 영향을 미치지 않았다(결과 미기재).

이상의 결과들로부터 *C. violaceum*이 분비하는 세포외 cytosine deaminase 20 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ 와 항진균제인 5-FC 10 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ 를 병행하여 3종의 cancer cell line 배양액에 각각 첨가하였을 때, 인간 조직구성 림프종 세포계인 U-973 cell, 인간 만성적인 골수성의 빈혈을 유발하는 백혈병 세포계인 K-562 cell 및 인간 결장암 세포계인 SNU-C4 cell에 항암제인 5-FU 10 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ 를 단독 처리했을 경우 각각 90%, 75%, 93%의 증식이 억제되지만, 본 세포외 cytosine deaminase 20 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ 와 항진균제인 5-FC 10 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ 를 병행 투여한 경우는 각각 80%, 50%, 90%이상의 증식이 억제되어 항암효과가 없는 항진균제인 5-FC를 본 세포외 cytosine deaminase와 병행 사용하므로 항암 효과면에서 항암제 5-FU와 거의 같은 정도의 항암 효과를 나타냈다.

그리고 U-937과 SNU-C4에 있어서 5-FU 10 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ 의 증식억제 효과는 90%이상이며, 5-FC 10 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ 와 cytosine deaminase 20 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ 를 병용 사용할 때도 5-FU 단독사용시와 같은 항암효과를 나타내었다. 그러나 K-562에 있어서는 5-FU 10 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ 의 증식억제 효과는 75%였지만 5-FC 10 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ 와 cytosine deaminase 20 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ 를 병용 사용할 때에는 5-FU단독사용보다 50% 정도의 활성을 나타내어, 50%의 K-562의 증식억제 효과만 나타내었다.

HeLa 세포에서 저농도의 5-FU(0.1 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$)에서 증식억제 효과가 나타나며 5-FU 1 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ 이상의 농도에서 현저한 증식 억제 현상을 나타낸다는 결과(20)와 5-FC 0.1 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ 와 *E. coli*의 cytosine deaminase(0.4 IU)를 병용 투여했을 때 EA-285 glioma cell의 증식이 50%이상 억제 되었다(21).

위의 두 연구결과와 본인들의 연구결과에서 연구에 사용한 세포주가 다르기 때문에 직접적으로 비교할 수는 없으나, *C. violaceum* YK 391의 세포외 cytosine deaminase와 5-FC의 병용사용한 본인들의 연구결과를 고려해볼 때 항암효과의 발현 측면에서는 위의 연구결과와 유사한 경향을 나타내었다.

이상의 결과로부터 5-FC와 cytosine deaminase의 병용 투여법은 인간 만성적인 골수성 백혈병보다 인간 조직구성 림프종과 인간 결장암의 항암 치료에 유리하다고 사료된다.

요 약

인간 조직구성 림프종 세포계인 U-937, 인간 만성적인 골수성의 빈혈을 유발하는 백혈병 세포계인 K-562 및 인간 결장암 세포계인 SNU-C4의 cancer cell line 배양액에 항암제인 5-FU 10 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ 를 처리하므로 각각 90%, 75%, 93%의 증식을 억제시켰다. *Chromobacterium violaceum* YK 391이 생성하는 세포외 cytosine deaminase 20 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ 와 항진균제인 5-FC 10 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ 를 3종의 cancer cell line 배양액에 병용투여하므로 각각 80%, 50%, 90% 이상의 증식이 억제되어 항암 효과면에서 항암제 5-FU와 유사한 결과를 얻었다. 이는 cytosine deaminase와 항진균제인 5-FC를 병용 투여함으로써 항암제인 5-FU 단독 처리시 야기될 수 있는 부작용을 최소화하는 화학 요법에 본 세포외 cytosine deaminase의 이용 가능성을 시사하는 것이다. 특히 SNU-C4는 U-937과 K-562에 비하여 항암제인 5-FU 단독 처리한 경우 뿐만 아니라 5-FC계열 항암제에 높은 감수성을 나타내므로 임상적으로 적용하기에 타당성이 높다고 추정된다.

이상과 같이 *Chromobacterium violaceum* YK 391의 세포외 cytosine deaminase는 인간 cancer cell line에 대한 항암 보조 효과 등을 검토한 결과, 항암보조제로서 임상적인 이용성이 매우 높은 효소이며 특히, 세포외 효소이므로 연속적인 대량생산과 산업화 측면에서도 세포내 효소보다 유리한 특징을 지니고 있었다.

참 고 문 헌

- Hahn, A. and W. Lentzel (1923), Über das verhalten von pyrimidinderivaten in den organismen. I. Einfluss von hefe auf pyrimidinderivate. *Z. Biol.* 79, 179-190.
- Hahn, A. and L. Schafer (1925), Über das verhalten von pyrimidine derivaten in den organismen. II. Einwirkung von *Bacterium coli* auf uracil und cytosin *Z. Biol.* 83, 511-514
- Sakai, T., T S Yu, H. Tabe, and S Omata (1975), Purification of cytosine deaminase from *Serratia marcescens*. *Agr Biol. Chem.* 39, 1623-1629.
- Sakai, T., T S. Yu, K. Tamguchi, and S. Omata (1975), Purification of cytosine deaminase from *Pseudomonas aureofaciens*. *Agr. Biol. Chem.* 39, 2015-2020.
- West, T., M. S. Shanly, and G. A. O'Donovan (1982), Purification and some properties of cytosine deaminase from *Salmonella typhimurium* *Biochim. Biophys. Acta.* 719, 251-258.
- Ipata, P. L., F. Marmocchi, G. Magni, R. Felicioli, and G. Polidoro (1971), Baker's yeast cytosine deaminase. Some enzymic properties and allosteric inhibition by nucleosides and nucleotides. *Biochem.* 10, 4270-4276.
- Katsuragi, T, T Sonoda, K Matsumoto, T. Sakai, and K Tonomura (1989), Purification and some properties of cytosine deaminase from baker's yeast. *Agr. Biol. Chem.* 53, 1313-1319.
- Jun, H. K., J H. Park, and Y. Yeeh (1985), Properties of extracellular cytosine deaminase from *Athrobacter* sp.

- JH-13 *Kor. J. Microbiol.* **23**, 177-183.
- 9 Yu, T. S., J. K. Kim, T. Katsuragi, T. Sakai, and K. Tonomura (1991), Purification and some properties of cytosine deaminase from *Aspergillus fumigatus*. *J. Ferment. Bioeng.* **72**, 266-269
 10. Kream, J. and E. Chargaff (1952), On the cytosine deaminase of yeast. *J. Amer. Chem. Soc.* **73**, 5157-5150.
 11. Kaltwasser, H. and J. Kramer (1968), Verwertung von cytosin und uracil durch *Hydrogenomonas facilis* und *Hydrogenomonas* H-16. *Archiv für Mikrobiologie*, **60**, 172-181.
 12. Koechlin, B. A., F. Rubio, S. Palmer, T. Gabrel, and R. Duschinsky (1966), The metabolism of 5-fluorocytosine- ^{14}C and of cytosine- ^{14}C in the rat and the disposition of 5-fluorocytosine- ^{14}C in man. *Biochem. Pharmacol.* **15**, 435-446.
 13. Duschinsky, R., E. Plevan, and C. Heidelberger (1957), The synthesis of 5-fluoropyrimidines. *J. Am. Chem. Soc.* **79**, 4559-4560
 14. Grunberg, E., E. Titsworth, and M. Bennett (1964), Chemotherapeutic activity of 5-fluorocytosine. In 'Antimicrobial Agents and Chemotherapy' *Ann. Arbor Mich.* 566-568
 15. Giege, R. and J. H. Weil (1970), Elude des t-RNA de levure avant incorpore du 5-fluorouracile provenant de la 5-fluorocytosine. *Bull. Soc. Chim. Biol.* **52**, 135-144.
 16. Akazawa, S. (1986), Effect of methotrexate on 5-fluorouracil metabolism and clinical studies with methotrexate and 5-fluorouracil sequential therapy. *Protein, Nucleic acid and Enzyme*, **31**, 571-578.
 17. Bertino, J. R. (1984), The chemotherapy of breast, gastrointestinal and head & neck cancer, Current status and potential role of methotrexate and 5-fluorouracil. *Pharma Libri* **21**, 300-303.
 18. Tsai, C. M., A. F. Gazdar, R. P. Perng, and B. S. Kramer (1991), Schedule-dependent in vitro combination effects of methotrexate and 5-fluorouracil in human tumor cell lines. *Int. J. Cancer*, **47**, 401-407.
 19. Diasco, R. B., B. E. Lakings, and J. E. Bennett (1978), Evidence for conversion of 5-fluorocytosine to 5-fluorouracil in humans. Possible factor in 5-fluorocytosine clinical toxicity. *Antimicrob. Agents Chemother.* **14**, 903-908.
 20. Nishiyama, T., Y. Kawamura, K. Kawamoto, H. Matsumura, N. Yamamoto, T. Ito, A. Ohya, T. Katsuragi, and T. Sakai (1981), New antineoplastic chemotherapy without systemic side effects to the host. *Current Chemotherapy and Immunotherapy. Proc. 12th International Congr. of Chemotherapy, Florence*, 1269-1270.
 21. Nishiyama, T., Y. Kawamura, K. Kawamoto, H. Matsumura, N. Yamamoto, T. Ito, A. Ohya, T. Katsuragi, and T. Sakai (1982), Antineoplastic effect of 5-fluorocytosine al cytosine deaminase on brain tumor. *Neurol. Med Chir.* **22**, 344-352.
 22. Nishiyama, T., Y. Kawamura, K. Kawamoto, H. Matsumura, N. Yamamoto, T. Ito, A. Ohya, T. Katsuragi, and T. Sakai. (1985), Antineoplastic effects in rats of 5-fluorocytosine in combination with cytosine deaminase capsules. *Cancer Research*, **45**, 1753-1761.
 23. Sakai, T., T. Katsuragi, K. Tonomura, T. Nishiyama, and Y. Kawamura (1985), Implantable encapsulated cytosine deaminase having 5'-fluorocytosine deaminating activity *J. Biotechnol.* **3**, 13-21
 24. Katsuragi, T., T. Sakai, and K. Tonomura (1987), Implantable enzyme capsules for cancer chemotherapy from bakers' yeast cytosine deaminase immobilized on epoxy-acrylic resin and urethane prepolymer. *Appl. Biochem Biotechnol.* **16**, 61-69.
 25. Wallace, P. M., J. F. MacMaster, V. F. Smith, D. E. Kerr, P. D. Senter, and W. L. Cosand (1994), Intratumoral generation of 5-fluorouracil mediated by an antibody-cytosine deaminase conjugate in combination with 5-fluorocytosine. *Cancer Res.* **54**, 2719-2723.
 26. Yu, T. S. and T. H. Kim (1997), Isolation and identification of bacterium producing extracellular cytosine deaminase. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **25**, 9-14.
 27. Kataoka, S., M. Naito, A. Tomida, and T. Tsuruo (1994), Resistance to antitumor agent-induced apoptosis in a mutant of human myeloid leukemia U-937 cells. *Exp. Cell. Res.* **215**, 199-205
 28. Zheng, B., T. C. Chambers, R. L. Raynor, P. N. Markham, H. M. Gebel, W. R. Vogler, and J. F. Kuo (1994), Human leukemia K-562 cell mutant (K562/OA200) selected for resistance to okadaic acid (protein phosphatase inhibitor) lacks protein kinase C-epsilon, exhibits multidrug resistance phenotype, and expresses drug pump P-glycoprotein. *J. Biol. Chem.* **269**, 12332-12338.
 29. Grem, J. L., D. M. Voeller, F. Geoffroy, E. Horak, P. G. Johnston, and C. J. Allegra (1994), Determination of trimetrexate lethality in human colon cancer cells. *Br. J. Cancer*, **70**, 1075-1084.
 30. Yu, T. S. and T. H. Kim (1997), Optimization of extracellular cytosine deaminase production from *Chromobacterium violaceum* YK 391. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **12**, 89-95
 31. Yu, T. S. and T. H. Kim (1998), Purification and properties of extracellular cytosine deaminase from *Chromobacterium violaceum* YK 391. *J. Microbiol. Biotechnol.* **8**, in press.