

Escherichia Coli의 各種 Isoenzyme에 關한 研究

—Escherichia Coli L-Asparaginase EC-1 및 EC-2의 部分精製와 그 安定性에 關한 研究—

A Study on the Various Isoenzymes of Escherichia Coli

—A study on partial purification of the L-asparaginases,
EC-1 and EC-2, from *Escherichia coli* and their stability—

서울大學 醫科大學 解剖學教室

金炳暉

<指導 李汎鎬·金昇元 副教授>

서 론

Kidd(1953 a, b)가 guinea pig 혈청이 Gardner 淋肥肉腫의 성장을 마우스에서 억제한다는 관찰을 보고하고 Broome(1961; 1963 a, b)이 또한 그 혈청중의 L-asparaginase(L-asparagine amidohydrolase, EC 3.5.1.1)가 이와 같은 현상을 가져 오는 抗癌因子라고 하는 증거를 제시한 아래, 이 L-asparaginase에 대한 관심은 날로 증가되어 가고 있다.

현재에 이르기까지 많은 연구자들이 이 사실을 확인 바 있으며 특히 Yellin과 Wriston(1966)은 guinea pig 혈청에서 얻은 매우 순도 높은 L-asparaginase가 실제로 C3H 마우스의 Gardner 임파육종의 성장을 억제한다는 결정적인 보고를 하였다. 이 밖에도 Mashburn과 Wriston(1964)은 *Escherichia coli*에서 얻은 L-asparaginase 역시 이와 같은 효과가 있음을 밝힌 바 있으며 *E. coli*의 L-asparaginase는 그 후 EC-1 및 EC-2로 명명된 2종으로 나누어지며 그 중 후자만이 항암작용이 있고 전자에는 없음이 또한 밝혀졌다(Campbell 등, 1967).

이와 같은 항암작용은 마우스의 배혈병(Boyse 등, 1963; Mashburn & Wriston, 1964)을 비롯해서 Murphy-Sturm 임파육종(Ainis 등, 1958; Kidd, 1953)과 흰쥐의 Walkar 256 carcinoma(Kwak 등, 1961)등에서도 발견

되었으나 같은 L-asparaginase라도 Broome(1965)나 *Bacillus coagulans*(Mashburn & Wriston, 1964)에서 분리한 것은 항암작용이 없으며 *E. coli*의 EC-1 역시 그러하다는 것도 아울러 밝혀져 있다(Campbell 등 1967).

특히 *E. coli*의 L-asparaginase에 대한 그 후의 輯文에 의하면(Boyse 등, 1967; Mashburn 등, 1967)이 *E. coli*의 EC-1 및 EC-2는 ammonium sulfate 용액에 의 용해도, 크로마토그리피적 특성, 그리고 pH에 의한 활성변화 등에서도 차이가 있으며朴(1973)에 의하면 기질이나 산물에 대한 태도는 동일하나 尿素에 대하여 EC-2가 EC-1에 비해 더 저항력이 있다고 한다.

그러나 아직도 이 L-asparaginase가 갖는 항암작용의 기전에 대해서는 만족할만한 답이 없는 형편이다. 이 효소로 말미암아 L-asparagine의 함량이 저하하고 따라서 종양성장이 억제된다는 설명은 부적당한 것 같다. 왜냐하면 이 효소로 처리한 정상 조직에서나 또한 이 효소에 저항력이 있는 종양조직에서도 같은 정도의 L-asparagine의 감소는 일어나고 있기 때문이다. 따라서 L-asparagine의 농도와 조직손상 간에는 하등의 상관관계를 찾아 볼 수가 없기 때문인 것이다(Broome, 1968). 오히려 L-asparaginase에 susceptible 한 종양조직에서만 특이적으로 감소하는 아미노산은 glycine임이 밝혀졌고(Ryan & Sornson, 1970) 따라서 해산생합

성에 필요한 이 glycine의 결핍을 초래하는 까닭에 종 양성장이 불가능해질 수 있다는 추측은 할 수 있는 것이다. 실제로 Ryan과 Sornson(1970)은 glycine이나 L-asparagine의 복강내 투여를 C3H/HE 마우스에서 실시한 결과 L-asparaginase 투여로 오는 임파육종성장의 억제 현상을 없게 할 수 있었다고 보고하고 있다.

저자는 이러한 현재의 추세를 감안하고 본 논문에서 우선 *E. coli*에서 L-asparaginase EC-1 및 EC-2를 각각 분리정제하고 이 양자간의 큰 생물학적 작용의 차이 즉 전자에는 없지만 후자에는 있는 이 항암적 작용이 그 효소분자의 안정성의 차에도 기인할 것이 아닌가 추측하고 *in vitro*에서 *E. coli* L-asparaginase EC-1 및 EC-2의 안정성에 관한 실험을 하여 몇가지 흥미있는 결과를 얻었으므로 발표하는 바이다.

실험 방법

I. 실험재료 및 분석

1. 균주

본 실험에 사용한 균주는 *Escherichia coli* 0112로서 서울대학교 의과대학 미생물학교실에서 분양 받은 것이다.

2. 세균배지 및 배양

배양에 사용한 배지는 peptone을 0.5% 그리고 L-asparagine 0.1%를 함유하도록 만든 것이다. 이 배지를 미리 pH가 6.9~7.0이 되도록 맞추어 121°C에서 20분간 멸균하여 사용하되 24시간 전탕 배양하였다.

3. 세균세포의 수확과 그 처리

배양된 약 5l 정도의 *E. coli*를 1,500×g로 20분간 원심분리하여 얻은 세균을 寒冷 0.25M sucrose 용액으로 2회 씻어서 packed cell을 얻고 여기에 pH 8.4인, 0.05M Tris buffer를 20%(W/V) suspension이 되도록 가하여 氷漕上에서 20분간 Branson sonifier를 사용하여 30초 간격으로 20분 동안 sonicate 하였다.

여기에서 그 용량의 1/20이 되는 1.0M MnCl₂를 1시간에 걸쳐서 滴下하여 해산성분을 첨전 제거하고 20,000×g로 30분간 원심분리하고 그 상청액을 효소 부분 정제의試料로 삼은 것이다.

4. 단백질 정량

효소부분정제의 과정에서 필요한 단백질 정량은 Folin의 phenol 시약을 사용하는 Lowry 법(1951)을 수정한 Oyama와 Eagle(1956)의 변법을 이용하였다.

5. L-asparaginase 활성측정

L-asparaginase의 활성은 Campbell(1967)등이 이용한 방법을 따르되 반응계의 용량을 수정하였다. 즉 L-

asparaginase 활성의 standard assay는 pH 8.4의 0.1M sodium borate buffer 2.0ml와 0.04M L-asparagine 0.5ml에다 試料 0.2ml를 가하여 37°C에서 30분간 incubate 하여 생성된 ammonia를 Caraway 법(1966)으로 정량하였다.

한편 EC-1과 EC-2가 공존하는 시료에서 L-asparaginase 활성을 측정할 때는 sodium borate buffer 대신에 pH 5.0의 0.1M sodium acetate buffer 2.0ml 사용하는 또 하나의 assay system으로 효소 활성을 측정하였다. 즉 EC-1의 최적 pH가 8.4인데 EC-2는 5.0이기 때문에 그러한 측정을 한 것이며 그 결과는 역시 Campbell(1967)의 다음과 같은 실험식을 이용해서 산출하고 각각 EC-1과 EC-2의 활성을 얻은 것이다.

① (pH 2.4에서의 EC-1의 활성)

$$= 1.047 \times (\text{pH } 8.4\text{에서의 총활성}) - 1.18 \times$$

(pH 5.0에서의 총활성)

② (pH 8.4에서의 EC-2의 활성)

$$= 1.18 \times (\text{pH } 5.0\text{에서의 총활성}) - 0.047 \times$$

(pH 8.4에서의 총활성)

한편 Caraway 법(1966)에 의한 ammonia의 정량은 먼저 L-asparaginase 활성측정을 위한 incubation이 끝나는 대로 2/3 N H₂SO₄ 0.4ml와 10% sodium tungstate를 0.2ml 가하여 반응을 종결시키는 除蛋白을 실시하여 원심분리해서 얻은 상청액에 phenol 정색시약과 alkaline hypochlorite 용액을 가하고 역시 37°C에서 15분간 빛반응을 일으키고 그色調를 spectronic 20 spectrophotometer를 사용하여 630nm에서 측정하여 비색정량하였다.

L-asparaginase의 활성 1 unit는 1분간 기질과 더불어 incubate 하였을 적에 생성된 ammonia의 1μ mole로 삼고 결과를 표시하였다.

II. L-asparaginase EC-1 및 EC-2의 부분정제

전기한 바와 같이 sonicate된 세균시료에서 해산을 제거한 상청액에 ammonium sulfate를 2M의 종말농도가 되도록 서서히 氷漕上에서 가하면서 鹽析된 단백질의 침전물을 얻고 이를 13,000×g로 20분간 냉동 원심분리하여 AS-1 分割으로 삼았다. 다음에 그 상청액에 또 다시 ammonium sulfate를 4M의 종말농도에 이르도록 같은 요령으로 포화시켜 염석된 단백질을 다시 13,000×g로 20분간 냉동원심분리하여 AS-2 分割으로 삼았다. 상기 과정에서 ammonium sulfate를 가함으로써 pH의 변동이 일어날 때는 알칼리를 가해서 pH가 계속 8.0을 유지하도록 노력하였다. 그리고 AS-2 역시 AS-1과 같이 13,000×g로 20분간 냉동원심분리하였다.

양 분획을 다음과 같이 pH 8.0의 0.1M sodium phosphate buffer 소량에 용해하고 난 다음 중류수와 pH 8.0의 0.2M sodium phosphate buffer로 번갈아 냉동실에서 24시간 투석하고 이 투석액을 pH 8.0의 0.02M sodium phosphate buffer로 미리 평행을 이루어 놓은 DEAE-cellulose의 column에 흡착시켰다.

흡착시키고 난 다음에는 같은 pH의 0.02M sodium phosphate buffer와 또 이 buffer에 NaCl을 0.35M 되도록 용해한 두 buffer를 사용하여 NaCl의 농도 gradient 즉 0~0.35M 사이의 농도에서 gradient elution을 실시하고 얻어진 전형적인 L-asparaginase의劃分, 즉 AS-1에서는 EC-1을 AS-2에서는 EC-2를 각각 다시 pool하여 이를 다시 ammonium sulfate로 鹽析하였는데 EC-1의 경우는 0~2M로, 그리고 EC-2는 2~4M의 포화로써 전기한 바와 같이 염석하고 이를 소량의 pH 8.0의 0.02M sodium phosphate buffer에 용해한 다음 중류수와 pH 8.0의 0.02M sodium phosphate buffer로 번갈아서 24시간 냉동실에서 투석하고 얻어낸 투석액을 각각 EC-1 및 EC-2의 부분정제 시료로 삼은 것이다.

II. 안정성 실험

1. 소혈청 알부민 첨가균

소혈청 알부민(Nutritional Biochemicals 社製品)을 7g/100ml의 농도로 용액을 만들고, pH 8.4인 0.2M sodium phosphate buffer와 1:1로 혼합하여 이를 incubation 용으로 삼았다. 대조군에서는 buffer만을 사용하면서 일정량의 EC-1과 EC-2를 각각 이 혼합 buffer와 함께 37°C의 항온조에서 4시간 incubate 하였

으며 매 1시간마다 채취하여 그 활성을 측정하였다.

2. 사람혈청 단백 첨가균

정상성인의 혈청을 pool하여 前項과 같이 역시 같은 buffer와 동비율로 혼합하고 일정량의 EC-1과 EC-2에 첨가하여 37°C에서 4시간 항온처리 하였다. 그리고 매 1시간마다 그 활성을 측정하고 활성의 안정성에 미치는 영향을 관찰하였다.

3. 產物抑制 실험

전기 소혈청 알부민 및 사람혈청 단백이 EC-1과 EC-2의 산물억제에 미치는 영향을 보기 위하여 0~40μmole의 L-aspartic acid를 시험관내의反應系에 첨가하여 그 활성이 억제됨을 관찰하는 한편 같은 조건하에서 0.2M sodium phosphate buffer(pH 8.4) 소혈청 알부민을 1:1로 혼합한 혼합 buffer를 사용하였을 때를 비교하여 산물 억제현상이 소혈청 알부민 첨가로써 받는 영향을 관찰하였다.

1~3項에서 L-asparaginase 활성의 측정을 1項에 기록한 바와같이 시행하였다.

결 과

1. L-asparaginase, EC-1 및 EC-2의 부분정제 :

수회에 걸쳐 되풀이 부분정제해본 실험성적 중 대표적인 것을 제 I, II 표에 각각 요약하였다.

EC-1의 경우는 제 I 표에서 보는 바와 같이 17배 이상의 정제율을 보였고 회수율은 42.4%, 그리고 EC-2는 전자가 약 11배이었고 후자는 47.3%로서 양자가 비슷한 부분정제율을 보이고 있다. 그러나 *E. coli*에는

Table I. Summary of partial purification of the L-asparaginase EC-1 from *E. coli*.

Purification Steps	Total Activity (U*)	Total protein (mg)	Specific Activity (u/mg) × 10 ⁻³	Yield (%)	Purification (fold)
Cellfree extract(sonicate)	1.3755	2512.0	0.55	100.0	1.00
AS-1 dialyzate	1.2404	351.0	3.53	90.2	6.42
AS-2 dialyzate	0.0289	504.3	0.06	2.1	0.10
DEAE-Cellulose Column Eluate	0.5832	61.1	9.54	42.4	17.34

Table II. Summary of partial purification of the L-asparaginase EC-2 from *E. coli*.

Purification Steps	Total Activity (unit*)	Total Protein (mg)	Specific Activity (u/mg) × 10 ⁻³	Yield (%)	Purification (fold)
Cellfree extract(sonicate)	0.9445	2512.0	0.38	100.0	1.00
AS-1 dialyzate	0.0097	351.0	0.03	1.0	0.07
AS-2 dialyzate	0.8172	504.3	1.62	86.5	4.26
DEAE-Cellulose Column Eluate	0.4467	106.1	4.21	47.3	11.08

EC-1이 항암작용이 있는 EC-2의 활성보다 높아서 약 1.5배임을 알 수 있다. 즉, 같은 양의 종균에서 얻은 EC-1의 활성은 1.3755 units인데 비해 EC-2는 0.9445 unit이었기 때문이다.

제 I, II 표에서 분명하듯이 EC-1은 AS-1 분획에 총 활성의 98%에 해당하는 1,2404 units가, 그리고 AS-2 분획에는 불과 2%인 0.0289 unit가 함유되어 있는 점으로 보아 EC-1 L-asparaginase는 2M ammonium sulfate 포화용액으로 그 대부분이 염석되고 만다는 것을 알 수 있으며, 한편 EC-2는 EC-1과는 반대로 AS-2 분획에 역시 98%가 넘는 0.8172 unit가 함유된데 반해서 AS-1에는 나머지 2%에 불과한 활성이 0.0097 unit인 점으로 보아 확실히 EC-1과는 달리 AS-2 분획, 즉 2~4M의 ammonium sulfate 포화용액으로 대부분이 염석되는 것을 알 수 있었다.

회수율은 EC-1이 42.4 EC-2가 47.3%로서 거의 1/2의 활성을 회수할 수 있었는데 반해서 비교적 단순한

부분정제의 과정만을 거쳤기 때문에 정제율은 EC-1이 17.34, EC-2가 11.08배로서 약간 낮은 편이었으나 본 논문에서 처럼 안정성에 관한 사항을 시행하는 데는 아무런 지장이 없는 것이었다.

한편 제I, II 도에서 알 수 있듯이 NaCl의 gradient를 가지고溶出하면 먼저 EC-2가 용출되고 다음 EC-1이 용출됨을 알 수 있었고 동시에 대부분의 단백질은 AS-1이나 AS-2 분획에서 다같이 EC-2 분획 이전이나 EC-2 분획과 함께 용출된다. 제I, II 도에서 보듯이 EC-1 분획의 단백질이 EC-2의 단백질 보다 낮고 따라서 그比活性이 높은 것이 분명하였고 실제로 제I, II 표의 결과에 표시되어 있듯이 EC-1의 비활성은 3.53×10^{-3} units/mg 단백질이었고 EC-2는 1.62×10^{-3} units/mg 단백질로서 전자는 후자보다 높은 것으로 나타났다.

이로써 확실히 된 사실은 EC-1이나 EC-2 양 L-asparaginase가 분명히 그鹽析 태도가 판이하다는 사실이다. 다시 말하자면 전자는 0~2M의, 그리고 후자는

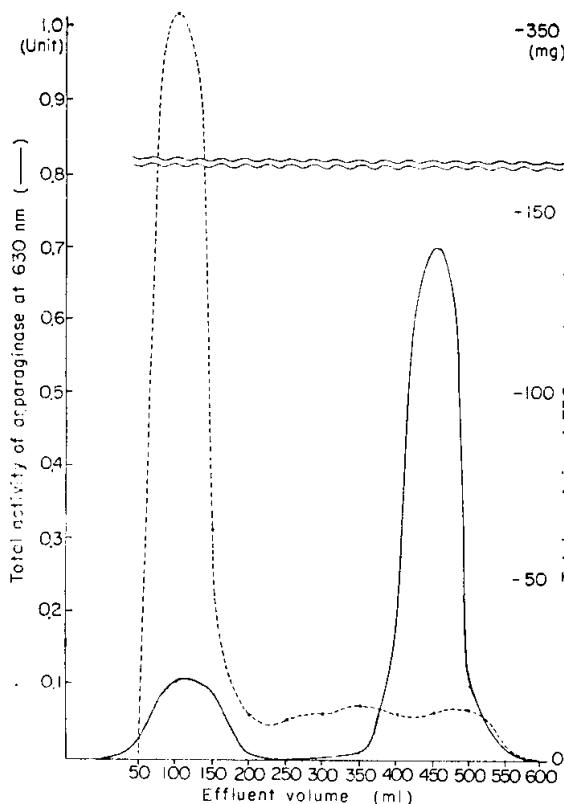


Fig. 1. Gradient elution profile of EC-1 from AS-1 fraction obtained from *E. coli*.

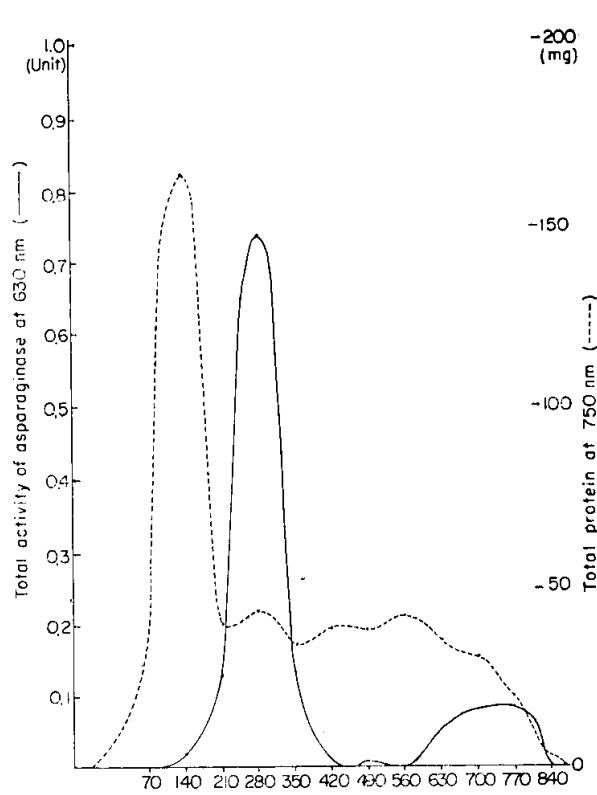


Fig. 2. Gradient elution profile of EC-2 from AS-2 fraction obtained from *E. coli*.

Table III. *In vitro* enhancement of the L-asparaginase EC-1 by the addition in the incubation mixture of bovine serum albumin and human serum diluted with equal amount of 0.2M sodium phosphate buffer, pH 8.4.

Incubation period (hr)	0	1	2	4
Buffer alone	8.50*(100%)	7.37(86.7%)	6.05(71.2%)	4.67(54.8%)
BSA; Buffer	9.53 (112%)	8.56 (101%)	7.83(92.1%)	7.02(82.6%)
Human, Serum: Buffer	10.2 (120%)	8.67 (102%)	6.44(75.8%)	4.72(55.6%)

* Figures denote activities in units/l and mean values obtained through triplicated determinations.

Table IV. *In vitro* enhancement of the L-asparaginase EC-2 by the addition in the incubation mixture of bovine serum albumin and human serum diluted with equal volume of 0.2M sodium phosphate buffer, pH 8.4

Incubation period (hr)	0	1	2	4
Buffer alone	15.6*(100%)	14.2(91.0%)	12.6(80.7%)	9.85(63.1%)
BSA; Buffer	16.4 (106%)	15.7 (101%)	15.3(97.8%)	14.6(93.3%)
Human, Serum: Buffer	18.2 (114%)	14.9(95.5%)	13.3(85.4%)	11.2(71.8%)

* Figures denote activities in units/l. and mean values obtained through triplicated determinations.

2-4M의 ammonium sulfate에 의해서 염석되는 특성을 가지고 있음을 알 수 있다.

I. 소 및 사람 혈청의 영향

L-asparaginase의 시험관 내의 안정성을 관찰하기 위하여 우선 pH 8.4의 0.2M phosphate buffer만으로 27°C에서 incubate 하였을 때의 활성변화를 관찰하였다. 이와 아울러 소혈청용액(7g 단백질/100ml)을 전기 buffer와 동비율로 희석한 용액, 그리고 정상인 사람 혈청을 역시 전기 buffer와 동비율로 희석하여서 이를 각각 buffer 대신에 사용하였을 경우 매우 뜻있는 활성의 증가를 볼 수 있었는 바 그 결과를 요약하면 EC-1의 경우는 제III표와 같고 EC-2의 경우는 제IV표와 같다.

즉 EC-1을 buffer만으로 37°C에서 4시간 incubate 하면 원래의 활성의 8.50 units/l에서 4.67 units/l로 떨어져서 약 55%의 활성으로 되지만 buffer에다 소혈청 알류민을 가한 실현에서는 첨가하자마자 활성이 9.53 unit/l로 증가, 즉 12%의 증가를 보이고 incubate 한 4시간 동안 계속 그 활성이 감소하는 추세는 대조인 buffer 군과 같으나 incubate 시작한지 1.2.4시간만에 각각 대조보다는 항시 14.3, 20.9, 27.8%가 많은 활성인 8.56, 7.83, 7.02 units/l의 활성을 유지하였다.

또 한편 사람혈청을 첨가하였을 때도 역시 같은 현상을 보였는 바 첨가하자 즉시 20%의 증가가 있었으며 incubate 후 1.2.4시간 경과와 더불어 8.67, 6.44 그리고 4.72 units/l의 활성을 보여 각각 대조활성에 비해 16.3, 4.6 그리고 0.8%의 증가를 보였다.

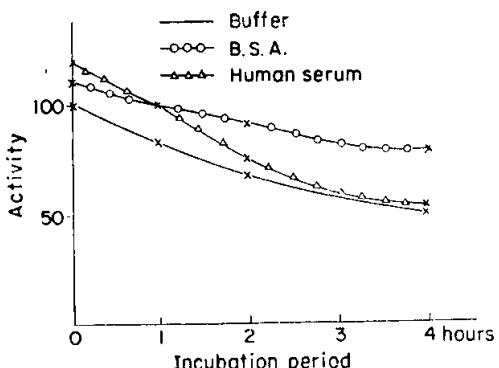


Fig. 3. Comparison of *in vitro* enhancement of activities in percentage by the addition of the bovine serum albumin and human serum to the EC-1 L-asparaginase.

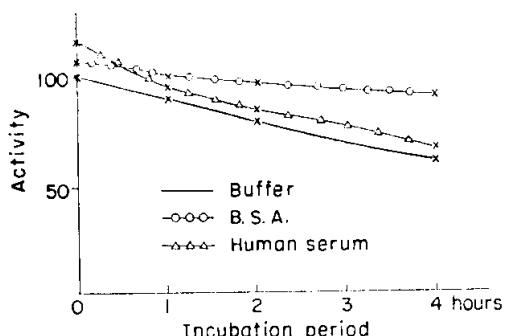


Fig. 4. Comparison of *in vitro* enhancement of activities in percentages by the bovine serum albumin and human serum to the EC-2 L-asparaginase.

Table V. Protection of stability of the L-asparaginase EC-1 from the product inhibition by the addition of bovine serum albumin (see text for the detail)

Concentration of Aspartic acid (μ mole)	0	10	20	30	40
Composition					
EC-1+ASP	8.50*(100%)	5.56(65.4%)	3.45(40.6%)	2.49(29.3%)	2.02(23.8%)
EC-1+ASP+BSA	9.53 (112%)	6.48(76.2%)	4.18(49.2%)	3.29(38.7%)	2.64(31.1%)

* Figures denote units/l and triplicated mean values.

Table VI. Protection of stability of the asparaginase EC-2 from the product inhibition by the addition of bovine serum albumin (see text for the detail)

Concentration of Aspartic acid (μ mole)	0	10	20	30	40
Composition					
EC-2+ASP	15.6*(100%)	9.66(62.1%)	5.85(37.5%)	3.99(25.6%)	2.56(16.4%)
EC-2+ASP+BSA	16.4 (106%)	10.8(69.5%)	7.38(47.3%)	5.66(36.3%)	4.62(29.6%)

* Figures denote units/l and triplicated mean values.

이것을 서로의 감소율과 함께 그 증가율을 비교하면 제3도와 같다.

한편 EC-2의 경우도 EC-1과 흡사하였으며 제VI 표에서 보는 바와 같이 대조의 buffer 군에서는 15.6 units/l 이던 것이 incubate 시작 1, 2, 4시간 후에는 각각 14.2, 12.6, 9.85 units/l로 감소하여 EC-1과 비슷한 약 63%의 활성만 남는 것이다. 소혈청알부민이나 사람혈청을 첨가하면 역시 EC-1과 비슷하게 활성이 감소는 되나 buffer 만의 경우보다는 늘 증가하고 있었다. 즉 이 양자를 가하자마자 각각 6.14%의 증가를 보인 16.4, 18.2 units/l의 활성을 보이고 1, 2, 4시간의 incubate를 시행하면 소혈청알부민첨가의 경우는 각각 15.7, 15.3, 14.6 units/l로서 대조군보다 각각 10.0, 17.1, 30.2%나 증가된 활성을 유지하였고 사람혈청첨가군에서는 incubate 한지 1, 2, 4시간만에 각각 14.9, 13.3, 11.2 units/l로서 역시 대조군에 비해 4.5, 4.7, 그리고 8.7%의 증가를 보이면서 감소하고 있었다. 이와 같은 관계를 비교하면 제4도와 같다.

III. 산물억제에 대한 소혈청 알부민의 영향

산물인 L-aspartic acid에 의한 억제효과가 매우 크기 때문에(朴, 1973) 전기의 실험에서 안정성을 크게 증가시키는 것으로 밝혀진 소혈청 알부민을 가하여 산물억제를 보호하는지의 여부를 검토한 결과는 제V, VI 표에 요약한 바와 같다.

제V 표에서 보듯이 EC-1은 L-aspartic acid를 가하

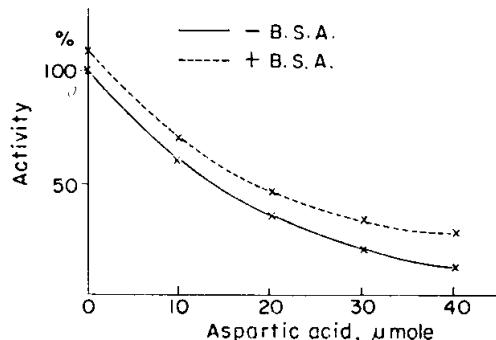


Fig. 5. Enhanced L-asparaginase EC-1 activity by the addition of bovine serum albumin in the presence of L-aspartic acid.

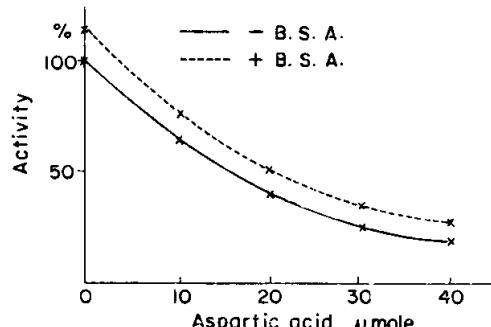


Fig. 6. Enhanced L-asparaginase EC-2 activity by the addition of bovine serum albumin in the presence of L-Aspartic acid.

면 농도에 비례해서 억제되어 $40 \mu\text{mole}$ 존재하에서는 8.50 units/l 이던 것이 2.02 units/l , 즉 23.8% 에 불과한 활성으로 억제되나 buffer 와 소혈청 알부민을 동량 혼합하여 L-aspartic acid에 의한 억제를 보면 어느 농도의 L-aspartic acid 존재하에서 전자에 $7.3\sim11.4\%$ 의 활성이 보호되고 있어 $40 \mu\text{mole}$ 의 L-aspartic acid 존재하의 경우는 대조에 비해 7.3% 높은 2.64 units/l 로 되어 있음을 알 수 있었다. 이와 같은 관계는 EC-2의 경우도 흡사하여 제Ⅱ표에 요약한 바와 같다.

즉 L-spastic acid의 농도에 관계없이 $6.0\sim13.2\%$ 의 활성보호를 하고 있다. 즉 소혈청 알부민을 가하기만 하여도 6.0% 높은 16.4 units/l 이던 것이 비록 L-aspartic acid의 농도가 증가함으로써 그 활성의 감소가 일어나고 있으나, $10, 20, 30, 40 \mu\text{mole}$ 의 L-aspartic acid 존재하에 각각 $9.69, 5.85, 3.99$, 그리고 2.56 units/l 이던 억제현상이 소혈청 알부민첨가로써 각각 $10.8, 7.38, 5.66$ 그리고 4.62 units/l 가 되었으므로 그 산물억제에 대한 보호작용은 EC-1의 경우와 같았으며 이를 도시하면 제5, 6도와 같았다.

고 칠

세균이 L-asparaginase의 좋은 자원이라는 것은 널리 알려진 바 있으나, 특히 비교적 독소생산이 없는 세균이 더욱 그러하다. 물론 *E. coli*는 상업적으로도 개발의 대상이 되고 있으려니와 *Serratia marcescens* (Rowley & wriston 1·67)나 *Mycobacterium tuberculosis*(Jagaran 등, 1968) 그리고 *Erwinia carotovora* (Wate 등 1968)에서도 항암작용있는 L-asparaginase가 논의되고 있는 점등을 감안할 때, *E. coli*의 항암작용 있는 L-asparaginase EC-2의 연구는 더욱 앞으로 진전되어야 할 것이다. 본 실험에서 부분정제한 EC-1 및 EC-2는 그 회수율은 고사하고라도 순도에 있어 아직 임상용에 이용될 것은 못될지언정 항암성 EC-2와 비항암성 EC-1을 나누어, 특별히 구명할 수 있었다는데 큰 의의가 있다고 보께다. Bilimoria(1969)가 그 보고에서 지적하였듯이 부분정제는 L-asparaginase의 활성이 매우 높은 균주를 사용해서 약하게 진탕하면서 배양하지 않을 경우 즉 강한 진탕으로는 세균성장의 성적은 좋으나 L-asparaginase의 활성이 높지 않음으로 우선 배양 조건부터 검토가 있어야 하겠다.

그러나 본 논문에서 분명한 사실은 Campbell 등(1967)이 제안한 솔식으로 EC-1과 EC-2가 상호 공존하는 상태에서도 각자의 pH에 대한 태도의 차이 즉 EC-1의 최적 pH는 8.4인데 반해 EC-2는 5.0이라는 사실을 이

용한 분리정량법은 본 실험에 큰 도움을 준 것이라고 본다.

L-asparaginase의 활성은 식물을 비롯해서(Kretovich, 1958) 동물에서도 발견된다는 오래이며 (Clementi 1922; Greenstein & Price 1949; Meister 등, 1955) 세균에서도 認知된다는 오래이다. (Kirchheimer & Whittaker, 1954; Manning & Campbell, 1957; Miller 등 1955; Ramadan 등 1964) 한편 헌주의 간에서 2종의 L-asparaginase가 발견된바 있는데 (Greenstein & Price 1949) 그 중의 하나는 phosphate에 의해서는 賦活되나 α -keto 산에 의해서는 그렇지 아니하는 반면, 다른 하나는 α -keto 산이 있어야만 활성을 나타낸다는 것이었고 Campbell 등(1967)이 *E. coli*에서 분리한 EC-1 및 EC-2는 그 어느 것도 phosphate에 영향받지 않을 뿐만 아니라 α -keto 산도 요구하지 아니하는 것이다. 다만 그 pH 변화에 따른 활성 profile이 각각 다르고 ammonium sulfate에 의한 염석태도가 다른 것은 본 논문에서도 확인된 바이지만 Park(1973)의 연구에 의하면 그 기질이나 산물에 대한 태도에서 전혀 큰 차이를 발견할 수는 없다. 다만 그의 尿素억제 실험에 의하면 양자간에 약간의 차이를 인정할 수 있다고 한다.

또 하나의 중요한 관찰로는 Ryan과 Sorson(1970)의 연구인 바 그들은 6C3HED 임파육종을 갖는 C3H/HE 마우스에 *E. coli* L-asparaginase나 guinea pig의 혈청 L-asparaginase를 투여한 바 이 효소의 종양성장을 억제할 수 있었다는 것이요 또한 이 효소로 처리하면 L-asparaginase에 susceptible 한 종암조직에서는 glycine의 결핍이 일어나지만 정상이나 resistant 한 종암조직에서는 glycine의 결핍은 일어나지 않는다는 사실이라 하겠다. 이로써 제기된 흥미있는 항암기전의 하나는 L-asparaginase 처리로 일어나는 purine 전구물질인 glycine 결핍 때문에 핵산생합성에 차질이 생겨서 종양은 성장하지 못하여 regress하게 되지 않는가하는 이론이다. 그렇다면 EC-1의 경우는 항암작용이 없기 때문에 그러한 현상이 없어야 하겠으나 아직 실험적 근거가 없어 속단은 못하나 L-asparagine 함량과 세포손상 간에는 하등의 상관 관계가 없다는 보문(Broome 1968)과 아울러 고찰컨대, susceptible 한 종암의 glycine 결핍은 매우 흥미있는 일이라 하겠다.

그러므로 우선 두 EC-1과 EC-2 양자의 특성차의 구명이 시급하나 아직 몇가지 분리상의 基準으로서 본 논문에서 확인된 바 있는 최적 pH의 차이라던가 중성염류에 대한 용해도 차이 등(Campbell 1967)을 제외하고

는 동력학적 차이는 별로 없고(朴, 1973) glycine 결핍 역시 EC-1 및 EC-2를 따로이 투여하여 얻어진 결과가 아님으로兩者가 glycine 결핍에 차이를 보일 것인지 분명치 않다. 그 안정성에 어떤 차이가 있을 것인가를 연구한 본 논문에 의해서도 역시 양자간에 큰 차이를 보이지 않았으며, 다만 흥미있는 사실로서 양자 다같이 소혈청 알부민이나 사람 혈청의 첨가로서 시험판내의 활성이 증가된다는 사실이요 또한 산물인 L-aspartic acid에 의한 억제현상도 이 소혈청 알부민 첨가로써 약화된다는 사실이라 하겠다.

본 실험에 의하면 EC-1, EC-2 공히 이러한 단백질 첨가로써 약 10%에 달하는 활성증가를 초래하고 있었으며 산물억제에 있어서도 그만큼의 약화를 가져 오고 있다. 이것으로써 L-asparaginase의 활성은 반응계에 존재하는 단백질 농도에 영향 받는다는 것을 알 수 있는 것이다. 그리고, Mashburn과 Landis(1970)에 의하면, 사람혈청을 가하여 시험판내에서 전처리해두면 *E. coli* L-asparaginase의 isoelectrofocussing pattern에 변화가 오며, 이 효소가 마우스體內를循環하고난 후에도 같은 변화가 온다는 것임으로 혈청 단백질에 의해서 안정성이 높아지는데 기인할 것이라고 보겠고 이와 같은 이론은 본 연구중의 안정도 실험에서 분명히 확인되었다고 할 수 있을 것이다. 즉, 소혈청 알부민이나 사람혈청 같은 단백질이 EC-1 및 EC-2分子의 非特異的安定性을 높이기 때문에 활성이 증가하는 것이요 또 그 만큼 산물억제도 방지되는 것으로 해석할 수 있겠다. 그러나 EC-1과 EC-2의 양자사이에 역시 이 단백질에 의한 활성 안정화에도 차이는 없었으며 산물억제 방지에서도 차는 없었음으로 이러한 특성이 EC-2에는 있고 EC-1에는 없는 항암성과는 관련지울 수 없는 것이다.

결 론

1. 최적 pH 및 ammonium sulfate에 대한 용해도 차이와 DEAE-cellulose에 흡착용출되는 특성 차이를 이용하여 *Escherichia coli* 0112에서 EC-1 및 EC-2로 불리우는 L-asparaginase를 각각 부분 정제하였다.

2. 상기의 *E. coli*에서 부분정제한 EC-1 및 EC-2는 양자 공히 37°C에서 4시간만에 그 활성이 약 1/2로 감소하는 불안정성을 보였다.

3. 이러한 EC-1 및 EC-2는 공히 시험판내에서 소혈청 알부민이나 사람혈청 같은 단백질로써 비특의적으로 10% 정도 안정화할 수 있었다.

4. 산물인 L-aspartic acid의 농도에 비례해서 EC-1 및 EC-2가 공히 억제를 받으나 역시 소혈청 알부민과 사람혈청 단백질은 이 억제를 어느 정도 보호하였다.

5. 상기의 비특의적인 소혈청 알부민이나 사람혈청 단백질의 시험판내의 활성증가 현상에 있어서 EC-1 및 EC-2간에는 차이가 없었으므로 이것이 항암성과 결부될 수는 없다.

ABSTRACT

A Study on the Various Isoenzyme of *Escherichia coli*

—A Study on Partial Purification of the
L-asparaginases, EC-1 and EC-2, from
Escherichia coli and their Stability—

Byung-Yeop Kim

Department of Anatomy, College of Medicine,
Seoul National University
Sung Wun Kim

1. Based on the differences in their pH optimas, in solubilities in ammonium sulfate solution, and in the adsorption and elution properties to and from th1 DEAE-cellulose, L-asparaginases, EC-1 and EC-2, were partially purified from *Escherichia coli* 0112 Strain.

2. Both partially purified *E. coli* L-asparaginases, EC-1 and EC-2, showed such an instability as to have their activities decreased to almost one-half of the original activities during 4 hours incubation at 37°C

3. Activities of the *E. coli* L-asparaginases, EC-1 and EC-2, could be enhanced about ten percent by the addition *in vitro* of the bovine serum albumin and human serum.

4. Activities of the L-asparaginases, EC-1 and EC-2, were inhibited by the product L-aspartic acid, in proportion to its concentration, which was protected by the addition of the bovine serum albumin and human serum protein.

5. Since there was observed no difference in their enhancement of activities between EC-1 and EC-2 brought by the non-specific reaction of bovine serum albumin and human serum protein, the protein enhancement of L-asparaginase activities could not be involved in antitumor effect of the enzyme.

REFERENCES

- 1) Ainis, H., Kurtz, H. M., Kramer, P. L., Weimer, H. M., Ryan, R. M., and Lamerson, E. (1958): *In vivo and in vitro studies of the action of guinea pig serum against the Ascites form of the Murphy-Sturm lymphosarcoma: Cancer Res.*, 18, 1809
- 2) Billimoria, M. H. (1969) *Conditions for the production of L-asparaginase 2 by coliform bacteria: Appl. Microbiol.*, 18, 1025
- 3) Boyse, E. A., Old, L. T., Campbell, H. A. and Mashburn, L. J. (1967) *Suppression of murine tumors by L-asparaginase: J. Exp. Med.*, 125, 17
- 4) Boyse, E. A., Old, L. J. and Stockert, E. (1963) *Inhibitory effect of guinea pig serum on a number of new leukemia in mice: Nature*, 198, 800
- 5) Broome, J. D. (1961) *Evidence that the L-asparaginase activity of guinea pig serum is responsible for its antilymphoma effects: Nature*, 191, 1114
- 6) Broome, J. D. (1963, a) *Evidence that the L-asparaginase of guinea pig is responsible for its antilymphoma effects, I. Properties of the L-asparaginase of guinea pig serum in relation to those of the antilymphoma substance: J. Exp. Med.*, 118, 99
- 7) Broome, J. D. (1963, b) *Evidence that the L-asparaginase of guinea pig serum is responsible for its antilymphoma effects, II. Lymphoma 6C-3HED cells cultured in a medium devoid of L-asparagine lose their susceptibility to the effects of guinea pig serum in vivo: J. Exp. Med.*, 118, 121
- 8) Broome, D. J. (1965) *Antilymphoma activity of L-asparaginase in vivo: clearance rates of enzyme preparations from guinea pig serum and yeast in relation to their effect on tumor growth: J. Nat. Cancer Inst.*, 35, 967
- 9) Broome, J. D. (1968) *L-Asparaginase: the evolution of a new tumor inhibitory agent: Trans. N. Y. Acad. Sci.*, 30, 690
- 10) Campbell, H. A., Mashburn, L. T., Boyse, E. A., and Old, L. J. (1967) *Two L-asparaginases from Escherichia coli B. Their separation, purification and antitumor activity: Biochemistry*, 6, 721
- 11) Caraway, W. T. (1966) *Colorimetric determination of serum guanase activity: Clin. Chem.*, 12., 187
- 12) Clementi, A. (1922) *Désamidination enzymatique de l'asparagine: Arch. Intern. Physiol.*, 18, 669
- 13) Greenstein, J. P. and Price, V. E. (1949) *α -Keto acid-activated glutaminase and asparaginase: J. Biol. Chem.*, 178, 695
- 14) Jayaram, H. N., Ramakrishnan, and Vaidyanathan, C. S. (1968) *L-Asparaginases from Mycobacterium tuberculosis strains H₃₇R_v and H₃₇R_a: Arch. Biochem. Biophys.*, 126, 165
- 15) Kidd, J. G. (1953, a) *Regression of transplanted lymphoma induced in vivo by means of normal guinea pig serum, I. Course of transplanted cancers of various kinds in mice and rats given guinea pig serum: J. Exp. Med.*, 98, 565
- 16) Kidd, J. G. (1963, b) *Regression of transplanted lymphoma induced in vivo by means of normal guinea pig serum, II. Studies on the nature of the active serum constituent: histological mechanism of the regression, tests for effects of guinea pig serum on lymphoma cells in vitro, discussion: J. Exp. Med.*, 98, 583
- 17) Kirohheimer, W. F. and Whittaker, C. K. (1954) *Asparaginase of mycobacteria: Am. Rev. Tuberc. Pulmon. Diseases*, 70, 920
- 18) Kretovich, V. L. (1958) *Biosynthesis of dicarboxylic amino acids and enzymic transformations of amides in plants: Advan. Enzymol.*, 20, 319
- 19) Kwak, K. S., Jameson, E., Rhan, R. M. and Kurtz, H. M. (1961) *The effect of varying implant cell numbers on the inhibitory activity of guinea pig serum on Walker carcinoma 256 in the rat: Cancer Res.*, 21, 44
- 20) Lowry, O. H., Rosenbrough, N. I., Farr, A. L. and Randall, R. T. (1951) *Protein measurement with the Folin phenol reagent: J. Biol. Chem.*, 193, 265
- 21) Manning, G. D. and Campbell, L. L. (1957) *Asparagine deamidase of Bacillus coagulans and Bacillus stearothermophilus: Can. J. Microbiol.*, 3, 1001
- 22) Mashburn, L. T., Boyse, E. A., Campbell, H. A. and Old, L. J. (1957) *A comparison of concurrent and delayed test for antitumor activity of L-asparaginase: Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, 124, 168
- 23) Mashburn, L. T. and Landin, L. M. (1970) *in Grundman, E. and Oettgen, H. Recent Results*

- in Cancer Research*, vol. 33, Springer, Berlin, p. 48
- 24) Mashburn, L. T. and Wriston, J. C. (1964) *Tumor inhibitory effect of L-asparaginase from Escherichia coli*: *Arch. Biochem. Biophys.*, 105, 450
 - 25) Meister, A., Levintow, L., Greenfield, R. E. and Abendschein, P. A. (1955) *Hydrolysis and transfer reactions catalyzed by ω -amidase preparations*: *J. Biol. Chem.*, 215, 441
 - 26) Miller, A., Neidle, A. and Waeluch, H. (1955) *Chemical stability and metabolic utilization of asparagine peptide*: *Arch. Biochem. Biophys.*, 56, 11
 - 27) Oyama, V. I. and Engle, H. (1956) *Measurement of cell growth in tissue culture with a phenol reagent (Folin-Ciocalteau)*: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 91, 305
 - 28) Pak, R. J. (1973) *Partial purification of the L-asparaginase from Escherichia coli and a study on its enzymatic properties*: *Korean J. Urol.*, 14, 3
 - 29) Ramdan, M. E. A., El Asmar, F., and Greenberg, D. M. (1964) *Arch. Biochem. Biophys.*: 108, 143 *in Howard et al.; L-asparaginase from Erwinia carotovora, suastrate specificity and enzymatic properties*; *J. Biol. Chem.*, 247, 1020
 - 30) Rowley, B and Wriston, J. C. (1967) *Partial purification and antilymphoma activity of Serratia marcescens Lasparaginase*: *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 28, 160
 - 31) Ryan, W. L. and Sorson, H. C. (1970) *Glycine inhibition of asparaginase*: *Science*, 167, 1512
 - 32) Wade, H. E., Elsworth, R., Herbert, D., Kepple, J. and Sargeant, K. (1968) *A new L-asparaginase with antitumor activity*: *Lancet*, 2, 776
 - 33) Yellin, T. O. and Wriston, I. C. (1966) *Purification and properties of guinea pig serum asparaginase*: *Biochemistry*, 5, 1605