

*Streptomyces tubercidicus*에서 Glutamine Phosphoribosylpyrophosphate Amidotransferase의 정제 및 특성

하영철 · 유진철

서울대학교 자연과학대학 미생물학과
조선대학교 약학대학 약학과*

Purification and Characterization of Glutamine Phosphoribosylpyrophosphate Amidotransferase from *Streptomyces tubercidicus*

Hah, Yung-Chil and Jin-Cheol Yoo*

Department of Microbiology, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea
Department of Pharmacy, Chosun University*

ABSTRACT: Glutamine phosphoribosylpyrophosphate amidotransferase of *Streptomyces tubercidicus* was purified and characterized. Molecular weight of the isolated enzyme was determined to be approximately 230,000 and was composed four identical subunits having a molecular weight of 58,000. This enzyme was strongly inhibited by AMP while considerably inhibited by ATP and GTP. Inhibition effect of enzyme activity by AMP was antagonized by increased concentration of substrate, PRPP, and metal ion (especially, Mg^{++}) was essential in both catalytic activity and nucleotide inhibition of this enzyme. Therefore, it was confirmed that end product inhibition of glutamine phosphoribosylpyrophosphate amidotransferase by adenine participated in the regulation of tubercidin biosynthesis from *Streptomyces tubercidicus*.

KEY WORDS □ Glutamine phosphoribosylpyrophosphate amidotransferase, purification, characterization, tubercidin, biosynthesis, *Streptomyces tubercidicus*

Glutamine phosphoribosylpyrophosphate amidotransferase (=amidotransferase, EC 2.4.2.14)는 생체내의 de novo purine ribonucleotide synthesis 과정의 첫 단계인 glutamine + phosphoribosylpyrophosphate (PRPP) → 5-phosphoribosylamine + pyrophosphate + glutamate 반응을 촉매하는 효소이며 (Magasanik, 1962), 또한 purine ribonucleotide 생합성 과정의 조절에 있어서도 주요한 역할을 수행하는 조절효소 (allosteric enzyme)로 알려져 있다 (Nishikawa 등, 1967; Holms 등, 1973; Meyer와 Switzer, 1979).

이러한 중요성 때문에 amidotransferase는 bacteria, yeast, avian, mammalian cells 등을 재료로하여 많은 연구가 진행되어 왔으며, 대부분의 경우에서, 분리된 이 효소는 최종산물인 purine ribonucleotides에 의하여 feedback 저해되는 것으로 보고 되었다 (Hartman, 1963; Rowe 등, 1970; Buchanan, 1973; Wong 등 1981; Stefano 등, 1985). 그러나 *E. coli*를 제외한 재료들에서는 이 효소에 들어있는 non-heme iron에

기인하는 산소에 대한 불안정성으로, 순수분리에는 많은 어려움이 따르기 때문에 (Itakura와 Holms, 1979), 고도로 정제된 이 효소를 사용하여 특성 및 조절기능을 연구한 경우는 현재까지 pigeon liver, *E. coli*, *Bacillus subtilis* 등의 몇몇 종류에 국한되어 있으며, 특히 *Bacillus subtilis*에서는 이 효소의 유전자 클로닝 등의 활발한 연구가 진행되어 왔다 (Mantsala와 Zalkin, 1984; Saxild와 Nygaard, 1988; Strauch 등, 1988).

그러나 *Streptomyces*를 재료로 사용하여 amidotransferase의 분리 및 특성에 대한 연구는 아직 보고된 바가 없었으며, 본인 등 (1989)은 *Streptomyces tubercidicus*에서 생성되는 항생물질인 tubercidin의 생합성 과정이 일차대사물질인 adenine과 histidine에 의하여 조절되며, 특히 adenine은 tubercidin 생합성에 필요한 전구물질인 GTP 생합성을 de novo purine ribonucleotide synthesis 과정의 첫 효소인 amidotransferase 수준에서 feedback 조절함으로써 결과적으로 tubercidin 생합성 과정을 조절한다고 제안한 바 있다. 따라서 본 연구에서는 *Streptomyces tubercidicus* 균주를

사용하여 amidotransferase를 분리정제하고 여러특성들을 조사하여 다른 재료에서 보고된 amidotransferase와 비교 분석함으로써 *Streptomyces*에서 나타나는 이 효소의 특성들을 밝히고자 하며, 나아가 분리된 이 효소의 여러 대사물질들에 의한 저해정도를 조사함으로써, 본인 등이 제안한 바 있는 adenine에 의한 tubercidin 생합성조절에 amidotransferase의 feedback 저해작용이 관여하는지를 확인하고자 한다.

재료 및 방법

균주 및 배양

실험에 사용한 균주는 *Streptomyces tubercidicus* ATCC 25502를 돌연변이 유발에 의하여 획득한 adenine 요구주인 *S. tubercidicus* 115 균주 (Yoo등, 1986) 이었으며, 포자를 균체 성장용 배지 (peptone-yeast extrat-glucose broth; Williams와 Cross, 1971)에 접종하여 27°C에서 72시간 진탕 배양 한 후 원심분리하여 균사체를 획득하였다. Amidotransferase를 다량 얻기 위하여, 균체성장용 배지에서 수확한 균사체를 0.85% (w/v) NaCl용액으로 2차례 세척한후 본인등이 고안한 amidotransferase 유도배지 (glucose 8g, K₂HPO₄ 1.5g, KH₂PO₄ 1.5g, MgSO₄ 7H₂O 0.5g, FeSO₄ 7H₂O 0.005g, histidine 0.4g, thiamine 50 µg, adenine 0.05 g/L)에 접종하여 24-28시간 배양하였다.

Amidotransferase의 활성도 측정

Meyer와 Switzer (1979)의 2단계 측정법을 수정하여 수행하였으며 표준반응 조건은 다음과 같다. 제 1반응: glutamine 20 mM, MgCl₂ 2 mM, Tris 50 mM (pH 8.0), PRPP 1.5 mM이 들어있는 용액에 효소를 넣어 총 200 µl로 되게 하여 37°C에서 20-30분 동안 반응을 시킨후 100°C에서 1분 동안 끓였다. 제 2반응: phosphate buffer 100 mM (pH 7.5), AcPyDPN 0.3 mM, glutamate dehydrogenase 10 Unit가 들어있는 용액에 제 1반응 용액 100 µl를 넣어서 총 600 µl가 되게하여 37°C에서 1시간 반응 시킨후 363 nm에서 O. D. 값을 측정하였다. Amidotransferase 1 unit는 1분

동안에 1 n mole의 glutamic acid를 생성시키는 효소량으로 정하였으며, 정제과정중의 단백질 정량은 bovine serum albumine을 표준시료로 하여 Bradford (1976)의 방법으로 행하였다.

Amidotransferase의 정제

균사체를 원심분리하여 수확한 후 washing buffer A (Tris 50 mM, pH 8.0; MgCl₂ 10 mM)로 세척한 후 2-3배의 buffer A (Tris 50 mM, pH 8.0; MgCl₂ 10 mM; 2-mercaptomethanol 1% (v/v); AMP 1 mM) 용액에 현탁하여 온도 상승을 방지하면서 조금씩 분쇄하고 원심분리하여 상등액을 조효소 용액으로 사용하였으며, 모든 정제과정은 2-4°C에서 행하여졌다. Protamine sulfate 처리: 질소 가스를 용액위로 계속 통과 시키면서, 조효소 용액 300 ml에 protamine sulfate 2%(w/v)용액 0.045 volume을 서서히 가하고 30 분 동안 더 교반하여준 후 원심분리하여 상등액을 취하였다. DEAE-cellulose chromatography: Protamine sulfate 상등액을 DEAE-cellulose column (2.5 × 8 cm)에 적하한후 0.05 M KCl이 들어있는 buffer B용액 (Tris 50 mM, pH 8.0; 5 mM; AMP 1 mM) 60 ml로 세척하고 각각 0.05 M과 0.35 M KCl이 들어있는 buffer B 용액 120 ml씩으로 농도구배를 만들어서 용출하였으며, 이때 buffer B 용액은 질소가스로 포화시킨 상태로 유지시켰다. Ammonium sulfate 분획: DEAE-cellulose chromatography에서 효소활성이 있는 분획들을 모아 A. sulfate 처리하여 33-40%에서의 침전물을 1.5 ml의 buffer B용액에 녹인후 Sephadex G-25를 통과시켜 A. sulfate를 제거하였다. Gel permeation chromatography (GPC): Sephadex G-200을 column (2.2 × 80 cm)에 충전하여 A. sulfate과정에서 얻은 시료 2 ml를 얹은후 질소로 충전시킨 buffer B 용액으로 용출시켰다. Sulfopropyl sephadex chromatography: SP sephadex G-50을 column (1.5 × 11 cm)에 충전하여 buffer C (Tris/Malate, pH 5.6; MgCl₂ 5 mM; AMP 1 mM; DTT 5 mM)로 세척하고 GPC 분획용액 1 ml를 얹은후 질소로 포화시킨 buffer C 용액으로 용출하였다.

Table 1. Purification of amidotransferase from the *S. tubercidicus*

Fraction	Vol. (ml)	Protein (mg/ml)	Tot. activity (unit = n mol min)	Sp. activity (unit/mg)	Yield (%)	X-fold purification
Crude ex. ^{a)}	300	5.1	4980	3.25	(100)	(1)
P. sulfate	306	3.0	4865	5.29	97	1.63
DEAE	80	1.45	3583	30.9	72	9.5
A. sulfate	2	5.7	2513	220.4	50.5	67.7
GPC	17	0.13	1974	893.2	39.6	285
S.P.	8	0.11	466	529.5	9.4	163

^{a)} From 100g (wet weight) of mycelium.

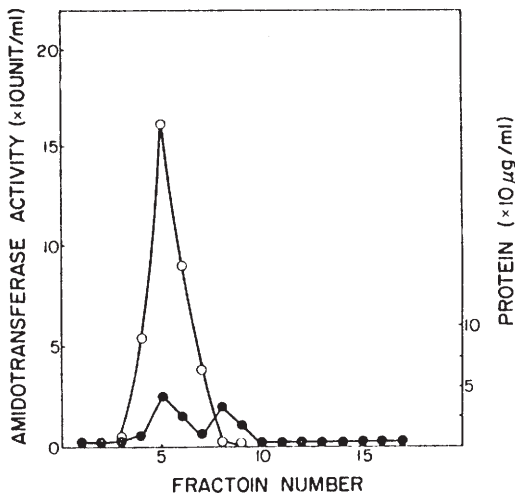


Fig. 1. Ion exchange chromatography of amidotransferase on sulfopropyl sephadex G-50. (●: protein content, ○: enzyme activity).

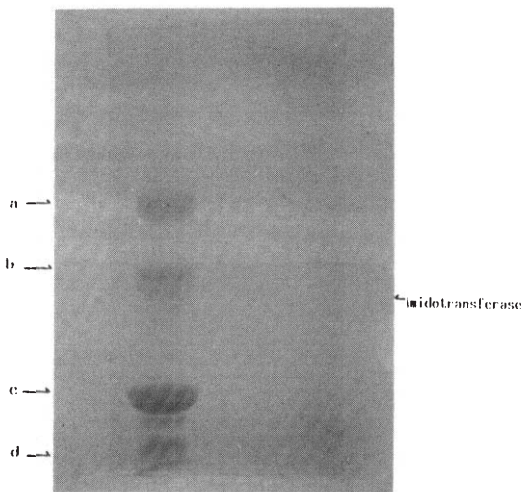


Fig. 2. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. Gel composition: T=10%, C=2.7% M.W. size marker; a: β -galactosidase (116,000), b: bovine serum albumin (66,000), c: ovalbumin (45,000), d: carbonic anhydrase (29,000).

Amidotransferase의 특성분석

SDS-polyacrylamide gel 전기영동: Smith (1984)의 방법으로 행하였으며, 분자량 측정시 β -galactosidase (116,000), phosphorylase (97,400), bovine serum albumin (66,000), ovalbumin (45,000), carbonic anhydrase (29,000)을 표준시료로 사용하였다. GPC에 의한 분자량 측정: Column (1.3×78 cm), 용출용액 (Tris 50 mM pH 8.0; $MgCl_2$ 10 mM)을 사용하여 효소정제시의 GPC 방법으로 수행하였으며,

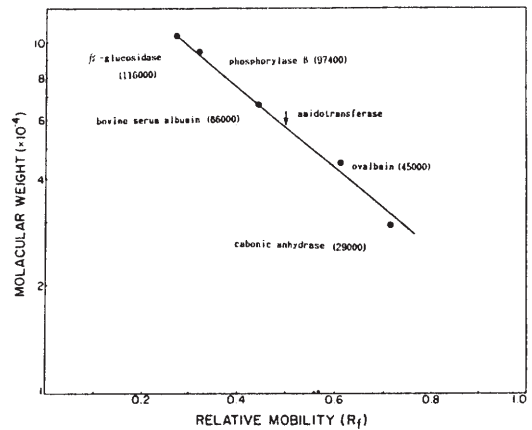


Fig. 3. Molecular weight estimation of amidotransferase by 10% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis.

각각 1600 unit와 380 unit를 포함하는 정제과정의 GPC 분획용액 (Table 1)을 모아서 효소시료로 사용하였다. 효소에 미치는 산소의 영향: Tris buffer (50 mM, pH 7.4)로 충전시킨 sephadex G-25를 통과시킨 효소시료 200 μ l를 시험관에 넣고 밀봉하여 각각 질소와 산소가스로 충전시킨후 37°C에서 흔들어 주면서 시간에 따른 효소 활성도 소실을 측정하였다.

결과 및 고찰

Amidotransferase 분리 정제

예비실험 결과 *S. tubercidicus* 115 균주는 야생형균주에 비하여 조효소 용액내의 amidotransferase 비활성 (specific activity)이 1.3-1.5배 높았기 때문에 이후의 효소분리목적에 사용하였다. Amidotransferase는 Table 1에 나타낸것 처럼 6 단계의 정제과정을 거쳐 분리되었는데, 최종단계인 SP-sephadex 결과 단백질 peak와 효소활성 peak이 일치하였음에도 불구하고 (Fig. 1), 전 단계인 GPC 분획물에서 보다 효소의 비활성에 다소 감소하였는데, 이는 SP-sephadex과정의 용출용액의 pH가 5.6으로 낮아서 정제과정중에 효소가 다소 불활성화 되었기 때문임을 분리된 효소의 pH에 따른 안정도 조사에 의하여 알수 있었다 (Fig. 6). 이처럼 비활성에서의 감소에도 불구하고 SP-sephadex 분획 효소용액은 SDS-polyacrylamide gel 전기영동 (SDS-PAGE)의 결과 단일종류의 단백질임을 확인할 수 있었다 (Fig. 2).

Amidotransferase의 특성

표준단백질을 사용하여 SDS-PAGE에 의하여 산출된 이 효소의 분자량은 약 58,000이었다 (Fig. 2.3). 천연효소 (native enzyme)의 분자량을 결정하기 위하여 고농도 (1,600 units)의 효소를 적하하여 GPC

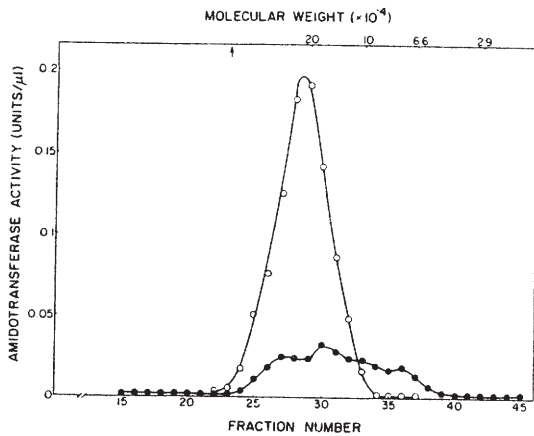


Fig. 4. M.W. estimation of amidotransferase by gel permeation chromatography on sephadex G-200. Enzyme solutions contained 1600 unit (O) and 380 units (●) were loaded in 1 ml each. Arrow indicate void volume.

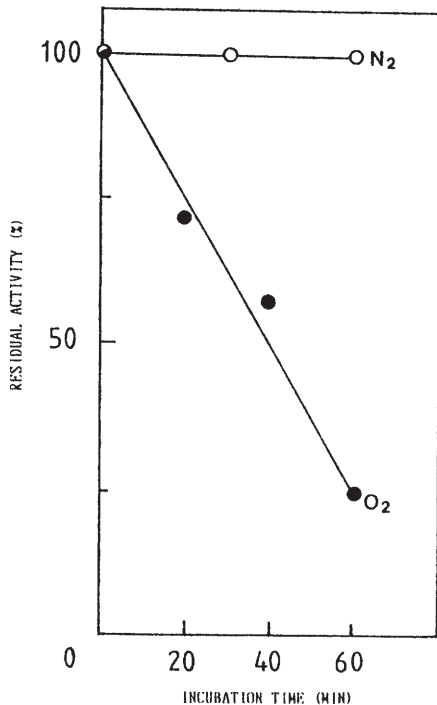


Fig. 5. Inactivation of amidotransferase activity by oxygen.

상에서 결정된 이 효소의 분자량은 약 230,000 이었으며, 저농도 (380 units)의 효소용액을 사용하여 측정된 분자량은 230,000-50,000으로 넓은 영역에 걸쳐서 나타났다 (Fig. 4). 이러한 결과는 Wong 등 (1980)이 보고한 *B. subtilis*의 amidotransferase처럼 *S. tubercu-*

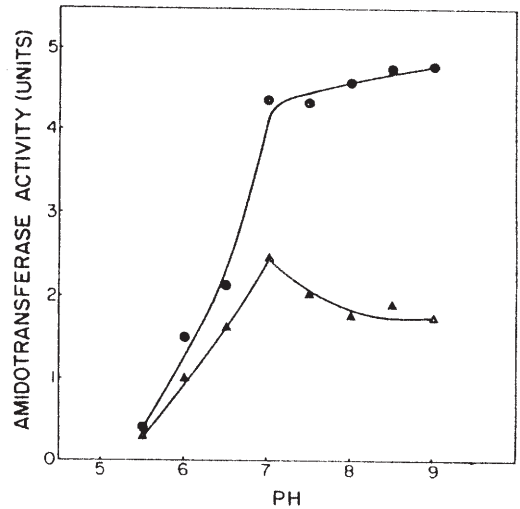


Fig. 6. Dependence of amidotransferase activity and inhibition by AMP on pH. (▲ 5 mM AMP, ●: none).

Standard assay conditions were used except that the buffers were 50 mM Tris/Malate.

Table 2. Effects of metal ions on amidotransferase activity.

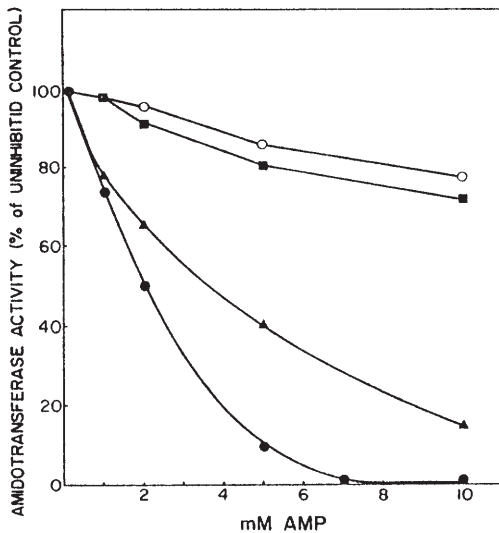
Metal ions (5 mM)	% activity of amidotransferase
Mg ⁺⁺	(100)
Mn ⁺⁺	80
Co ⁺⁺	52
Fe ⁺⁺	37
Ca ⁺⁺	26
Zn ⁺⁺	20
Hg ⁺⁺	0
Cu ⁺⁺	0
K ⁺⁺	0

Standard assay conditions were used except that the buffer was 50 mM Tris/Malate, pH 7.0.

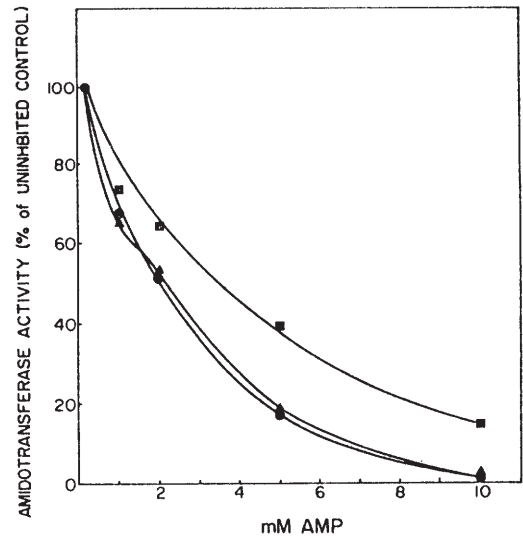
*dicus*에서도 amidotransferase가 고농도로 존재시에는 tetramer로 존재하나, 저농도에서는 monomer, dimer, tetramer로 상호전환되면서 존재하기 때문으로 사료되었으며, 이로부터 이 효소는 지금까지 보고된 다른 재료에서처럼 분자량이 동일한 4개의 subunit로 구성되어 있음을 알수 있었고, 각 subunit의 분자량은 *E. coli*의 57,000과는 비슷하였으며, *B. subtilis*의 50,000 보다는 다소 큰것임을 알수 있었다 (Rowe등, 1970; Messenger와 Zalkin, 1979; Wong등, 1981). 이 효소는 산소에 노출된후 60분 후에 약 80%의 활성이 소실된 반면 질소에 의하여는 거의 활성손실이 나타나지 않았는데 (Fig. 5), 이로부터 *B. subtilis*, human liver등 (Itakura와 Holmes, 1979)에서와 마찬가지로

Table 3. Inhibition of amidotransferase by purine & pyrimidine derivatives.

Inhibitor tested	% of control activity at	
	2 mM	5 mM
adenine	108	86
adenosine	106	91
AMP	43	33
ADP	83	82
ATP	70	48
cyclic AMP	102	100
guanosine	101	90
GMP	65	62
GDP	61	59
GTP	73	44
inosine	101	87
IMP	98	86
UMP	99	99
XMP	99	82
CTP	99	105
histidine	105	97

**Fig. 7.** Effect of PRPP conc. on inhibition of amidotransferase by AMP. (●: 0.05 mM, ▲: 1.5 mM, ■: 4 mM, ○: 10 mM).

*S. tubercidicus*의 amidotransferase도 산소에 대하여 극히 불안정함을 알수 있었고, 실제로 효소정제과정중 buffer 용액을 질소가스로 포화시켜 줌으로써 대부분의 효소활성을 유지할수 있었다. 이 효소의 반응 최적 온도는 37-42°C이었고, pH 7.0-9.0 에서 최대 효소활성을 보였으며, pH 7.0 이하에서는 효소활성이 급격히 감소하였다 (Fig. 6). Lineweaver-Burk 도표에 의하여 산출된 이 효소의 기질인 PRPP 및 glutamine에 대한 Km값은 각각 60 μ M, 4.8 mM이었다. 이 효소의 금

**Fig. 8.** Effect of glutamine conc. (mM) on inhibition of amidotransferase by AMP. (●: 5, ▲: 10, ■: 20).

속이온 요구도를 조사한바, Table 2와 같이 2가 양이온이 효소활성에 필수적이었으며, 특히 Mg^{++} 이 최대 활성을 보여주었다. 또한 Mn^{++} , Co^{++} , Fe^{++} , Zn^{++} 등도 나열순으로 활성에 필요하였으나 Hg^{++} , Cu^{++} , K^{++} 은 전혀 활성을 보여주지 못하였다. Zn^{++} 은 Mg^{++} 에 비하여 약 20%의 효소활성을 나타내게 해주었는데, 이는 *B. subtilis* 효소에서 Zn^{++} 이 Mg^{++} 을 대신하지 못하였던 보고 (Meyer와 Switzer, 1979)와는 달랐으며, pigeon liver 효소의 경우와는 일치하였다 (Buchnan, 1973).

Amidotransferase의 purine 유도체들에 의한 저해

Table 3에서 처럼 다양한 purine 유도체들에 의하여 효소활성이 저해되었는데, AMP가 5 mM에서 약 70%의 효소활성을 저해하여 가장 강한 저해기능을 보였으며 ATP, GTP, GDP, GMP들도 40-60% 정도의 저해효과를 보여주었다. 이러한 결과는 *E. coli* 효소에서 AMP보다 GMP에 의하여 더욱 강한 저해를 받았던 사실과는 달랐으며, 또한 *B. subtilis* 효소에서 나타났던 AMP 수준의 ADP의 강한 저해효과는 볼수 없었다 (Meyer와 Switzer, 1979). AMP의 효소활성 저해효과는 pH에 따라서 변화되어, pH 7.0-9.0에서는 정상적인 저해현상이 나타났으나 pH 6.5이하에서는 저해효과가 거의 소실됨을 볼수 있었는데 (Fig. 6), 이런 결과는 AMP가 GMP, XMP등의 유사구조물질들에 비하여 특이하게 이 효소활성을 강하게 저해하였던 사실 (Table 3)과 함께, AMP가 이 효소의 촉매부위에서 기질과 상경적길항을 하는것이 아니라, 조절부위 (allosteric site)에 결합하여 저해효과를 나타내기 때문이라 사료되었다. 기질농도와 AMP의 효소

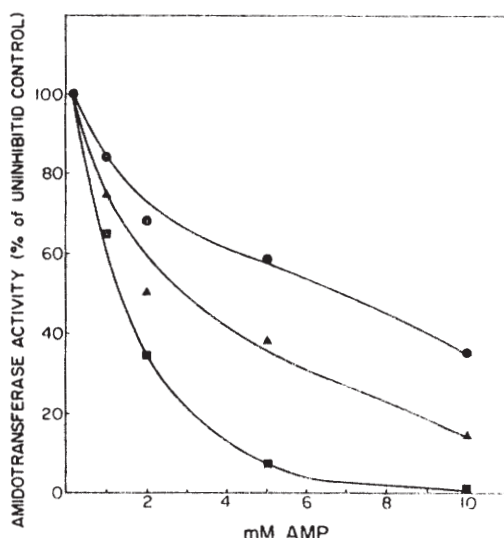


Fig. 9. Effect of Mg^{++} conc. on inhibition of amidotransferase by AMP. (●: 1 mM, ▲: 2 mM, ■: 5 mM).

활성 저해와의 관계성을 조사한 바에 의하면, PRPP는 농도가 증가함에 따라 AMP의 저해효과는 감소되어 4 mM PRPP 이상의 농도에서는 AMP에 의한 저해 효과가 대부분 상실되는 antagonism 현상을 볼 수 있었으나 (Fig. 7), glutamine의 경우에는 뚜렷한 관계성은 볼 수 없었다 (Fig. 8). 금속이온인 Mg^{++} 은 농도가 증가함에 따라 AMP의 저해효과는 증대하여 5 mM Mg^{++} 첨가시 5 mM AMP에 의하여 효소활성이 90% 이상 소실되었는데 (Fig. 9), 이로부터 *B. subtilis*처럼 (Meyer와 Switzer, 1979), *S. tubercidicus*의 amidotransferase 경우에도 효소의 촉매활성뿐만 아니라 purine ribonucleotide에 의한 효소활성 저해에도 금속이온 즉 Mg^{++} 은 필수적임을 알 수 있었다.

이상의 *S. tubercidicus*에서 분리한 amidotransfe-

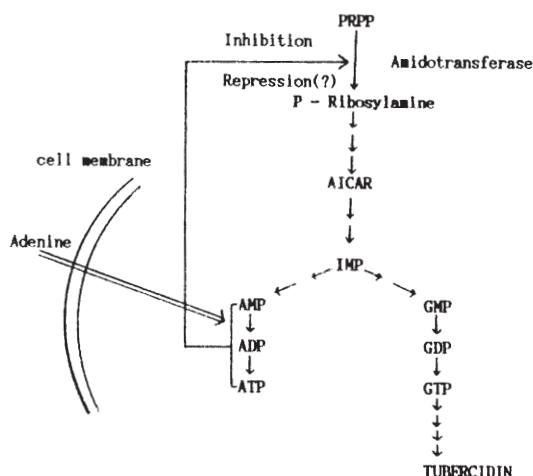


Fig. 10. Feedback regulation of adenine on tubercidin biosynthesis of *S. tubercidicus*.

rase에 대한 특성 조사결과들은 *Streptomyces*속의 다른 종의 본 효소 연구에 도움이 되리라 사료되며, 특히 이효소의 대사물질들에 의한 저해정도 조사결과 AMP에 의한 강력한 저해현상이 밝혀졌기 때문에, Yoo (1989)가 보고한 *S. tubercidicus*균주에서 일차대 사산물인 adenine에 의한 tubercidin 생합성과정의 조절은, 배지내의 adenine이 균체내에서 adenine ribonucleotides (특히, AMP)형태로 변환되어 (Hochstadt-ozar와 Stadtmann, 1971), de novo purine ribonucleotide synthesis 과정의 첫 효소인 amidotransferase에 대한 feedback inhibition을 함으로써 일어난다고 규명할 수 있었다 (Fig. 10). 그러나 본 연구에서는 adenine ribonucleotide에 의한 amidotransferase의 feedback repression기작이 존재하는지는 조사되지 않았기 때문에, 앞으로 이에 대한 연구가 수행되어야 할 것이다.

적 요

*Streptomyces tubercidicus*에서 glutamine phosphoribosylpyrophosphate amidotransferase를 분리 정제하고 특성들을 분석하였다. 분리된 이 효소의 분자량은 약 230,000이었으며, 동일한 분자량 (58,000)을 가지는 4개의 subunit으로 구성되어 있었다. AMP에 의하여 효소활성은 가장 강하게 저해되었으며, ATP, GTP에 의하여도 저해되었다. AMP에 의한 효소활성 저해효과는 기질인 PRPP 농도증가에 의하여 길항되었으며, Mg^{++} 존재는 이효소의 촉매활성뿐만 아니라 AMP에 의한 효소활성 저해에도 필수적이었다. 이로부터 *S. tubercidicus*에서 일차대사물질인 adenine에 의한 tubercidin 생합성 조절은 de novo purine ribonucleotide synthesis 과정의 첫 효소인 amidotransferase inhibition 기작이 관여함을 알 수 있었다.

REFERENCES

- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method of the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Chem.*, **72**, 248-254.
- Buchmann, J.M., 1973. The amidotransferase. *Adv. Enzymol.*, **39**, 91-183.
- Hartman, S.C., 1963. Phosphoribosylpyrophosphate amidotransferase. Purification and general catalytic properties. *J. Biol. Chem.*, **238**, 3024-3035.

4. Hochstadt-Ozer, J. and E.R. Stadtman, 1971. The regulation of purine utilization in bacteria. III. The involvement of purine phosphoribosyltransferase in the uptake of adenine and other nucleic acid precursors by intact resting cells. *J. Biol. Chem.*, **246**, 5313-5320.
5. Holmes, E.W., J.A. McDonald and J.M. McDonald, 1973. Human glutamine phosphoribosylpyrophosphate amidotransferase. Kinetics and regulatory properties. *J. Biol. Chem.*, **238**, 144-150.
6. Itakura, M. and E.W. Holmes, 1979. Holmes amidophosphoribosyltransferase. *J. Biol. Chem.*, **254**, 333-338.
7. Magasanik, B., 1962. Biosynthesis of purine and pyrimidine nucleotides. The bacteria. vol. 3, 295-333. ed. by Gunsalus, I.C. and R.Y. Stanier. Academic Press, New York.
8. Mantsala, P. and H. Zalkin, 1984. Glutamine amidotransferase function. *J. Biol. Chem.*, **259**, 14230-14236.
9. Messenger, L.J. and H. Zalkin, 1979. Glutamine phosphoribosyl pyrophosphate amidotransferase from *Escherichia coli*. Purification and properties. *J. Biol. Chem.*, **254**, 3382-3392.
10. Meyer, E. and R.L. Switzer, 1979. Regulation of *Bacillus subtilis* phosphoribosylpyrophosphate amidotransferase activity by end products. *J. Biol. Chem.*, **254**, 5397-5402.
11. Nishikawa, H., H. Momose and I. Shiio, 1987. Regulation of purine nucleotide synthesis in *Bacillus subtilis*. II. Specificity of purine derivatives for enzyme repression. *J. Biochem.*, **62**, 92-98.
12. Rowe, P.B., M.D. Coleman and J.B. Wyngaarden, 1970. Glutamine phosphoribosylpyrophosphate amidotransferase. Catalytic and conformational heterogeneity of the pigeon liver enzyme. *Biochemistry*, **9**, 1498-1505.
13. Saxild, H.H. and P. Nygaard, 1988. Gene-enzyme relationship of the purine biosynthetic pathway in *Bacillus subtilis*. *Mol. Gen. Genet.*, **211**, 160-167.
14. Smith, B.J., 1984. SDS polyacrylamide gel electrophoresis of proteins. Methods in Molecular Biology, vol. 1, 41-56. ed. by J.M. Walker, Human Press, Colifton.
15. Stefano, A.D., M. Pizzichini, A. Paffetti and E. Marinello, 1985. Hepatic glutamine-5-phosphoribosyl-1-pyrophosphate amidotransferase and glucocorticoid. *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.* **61**, 671-676.
16. Strauch, M.S., H. Zalkin and A.I. Aronson, 1988. Characterization of the glutamyl-tRNA^{Gln}-to-glutamyl-tRNA^{Gln} amidotransferase reaction of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, **170**, 916-920.
17. Williams, S.T. and T. Cross, 1971. Actinomycetes. Methods in Microbiology. vol. 4, 295-334. ed. by C. Booth, Academic Press, New York.
18. Wong, J.Y., D.A. Bernlohr, C.L. Turnbough and R. L. Switzer, 1981. Purification and properties of glutamine phosphoribosylpyrophosphate amidotransferase from *Bacillus subtilis*. *Biochemistry*, **20**, 5669-5674.
19. Yoo, J.C., Y.C. Hah and S.W. Hong, 1986. Protoplast fusion of *Streptomyces tubercidicus*. *Kor. J. Microbiol.*, **28**, 364-369.
20. Yoo J.C., 1989. Regulation mode of tubercidin biosynthesis in *Streptomyces tubercidicus*. Ph.D. Thesis, Seoul National University, Korea.

(Received April 8, 1991)

(Accepted April 23, 1991)