

신규의 Aminopeptidase M 저해제 MR-387A와 B를 생산하는 균주의 동정 및 저해제의 생산

정명철 · 전효곤 · 이호재 · 고영희*
한국과학기술연구원 유전공학연구소

Taxonomic Characteristics of Strain Producing MR-387A and B, New Inhibitors of Aminopeptidase M, and their Production

Chung, Myung-Chul, Hyo-Kon Chun, Ho-Jae Lee and Yung-Hee Kho*

Genetic Engineering Research Institute, KIST P.O. Box 115 Yusong, Taejeon, 305-600, Korea

Abstract — The strain SL-387 which produces new inhibitors of aminopeptidase M, MR-387A and B, was isolated from a soil sample. The strain has branched substrate mycelia, from which aerial hyphae develop in the form of open spirals. Spore surface is smooth. Melanoid and soluble pigments were observed. The isolate contains LL-diaminopimelic acid in its cell wall hydrolysate, and has no pectinolytic activity. The strain SL-387 is closely related to *Streptomyces griseoruber* and *S. naganishii*, but is different from these strains in some cultural and physiological characteristics. This strain was, therefore, designated as *Streptomyces* sp. SL-387. The effects of several carbon and nitrogen sources on the production of the inhibitor were examined. Among them, glucose, galactose, mannose, and xylose were effective as a carbon source and soybean meal, soytone, fish meal, and gluten meal were effective as a nitrogen source. The maximum peak of the inhibitor production in jar fermentor was obtained on the fifth day of culture.

Aminopeptidase M(AP-M, 혹은 aminopeptidase N, EC 3.4.11.2)은 대뇌 등의 중추신경계 세포와 신장, 소장용털세포 등의 장상피세포(enterocytes) 또는 brush-border 등의 세포 표면에 존재하는 glycoprotein으로서 그 분포는 동물 뿐만 아니라 여러 미생물등에서도 발견되는 등 다양하다. Peptide의 N-말단 중성 아미노산을 제거하는 활성을 갖는 AP-M은 그 활성부위에 Zn을 갖는 일종의 metalloenzyme이다(1). 이 효소는 대뇌막에서 opioid peptide의 일종인 enkephalin을 불활화 하는 등 많은 생리적 및 병리작용에 관여하는 것으로 보고되었다(2). 최근에 Menrad 등(3)은 human melanoma 암세포 전이과정에서 암세포 침윤에 이 효소가 관여한다고 보고하였으며, Yoneda 등(4)은 그 저해제인 bestatin을 처리하였을 때 세포의 matrix에 암세포의 접촉은 저해하지 않지만 암세포의 침윤은 저해한다고 보고하여 AP-M에 대한 관심이

집중되고 있다. Aoyagi 등은 이러한 중요성을 갖는 AP-M에 대한 저해제를 미생물 배양액으로부터 탐색하여 amastatin(5), bestatin(6), actinonin(7), probestatin(8), 및 leuhistin(9) 등의 저해제를 발견하였다. 최근 저자들의 실험실에서도 이들 물질과 구조적으로 다른 신규의 저해제 MR-387A와 B를 분리하였다.

본 연구에서는 AP-M에 대한 강한 저해 활성을 보이는 물질 MR-387A와 B의 생산 균주 *Streptomyces* sp. SL-387을 분리 동정하고 저해제 생산의 여러 발효 조건등을 검토하여 보고하고자 한다.

재료 및 방법

재료

본 연구에 사용된 무기염류는 시약 특급을 사용하였고, 배양에 사용된 배지류는 Difco 제품을 사용하였다. 효소 aminopeptidase M(EC 3.4.11.2)은 돼지의 신장으로부터 분리한 Sigma사 제품을 구입하여 더 이상 정제하지 않고 그대로 사용하였으며, 기질인 L-leucine-*p*-nitroanilide도 Sigma사로부터 구입하여 사

Key words: Aminopeptidase M, inhibitor, MR-387A and B, *Streptomyces* sp. SL-387, fermentation, taxonomy

*Corresponding author

용하였다.

방선균의 분리 및 보존

실험에 사용된 균주는 전국의 여러 지역에서 채취한 토양으로부터 방선균을 분리하여 사용하였다. 균주의 분리를 위한 배지로는 humic acid 1.0 g, Na₂HPO₄ 0.5 g, KCl 1.7 g, FeSO₄·7H₂O 0.01 g, CaCO₃ 0.01 g, B-vitamins trace, cyclohexamide 50 mg, agar 15 g을 1l의 물에 녹여 살균 후 사용하였고, 보존용 배지로는 soluble starch 5.0 g, glucose 5.0 g, bacto peptone 1.0 g, yeast extract 1.0 g, malt extract 1.0 g, agar 15.0 g을 물 1l에 녹여 pH 7.0으로 조절 후 살균하여 사용하였다.

균주의 동정

분리한 균주의 형태학적, 배양학적 특성은 Shirling과 Gottlieb 등(10)의 방법과 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology(11)의 방법에 따라 조사하였으며, 그외 다른 방법들은 Smibert 등(12)의 방법을 사용하였다.

저해제의 생산

저해제 생산에 대한 탄소원의 영향을 조사하기 위한 기본배지로 soybean meal 25.0 g, yeast extract 4.0 g, meat extract 1.0 g, NaCl 2.0 g, trace salt(CuSO₄·5H₂O 0.5 g, MgCl₂·4H₂O 5.0 g, ZnCl₂·7H₂O 0.5 g in 100 ml H₂O) 1 ml을 1l 물에 녹여 각각 10 ml을 60 ml 시험관에 분취하여 탄소원을 1% 수준으로 첨가 후 멸균하였고, 질소원을 위한 기본배지로는 glucose 20 g, K₂HPO₄ 0.25 g, NaCl 2.0 g, trace salt 1 ml을 1l의 물에 녹여 각각 10 ml을 60 ml 시험관에 분취하여 질소원을 1% 수준으로 첨가 후 멸균하여 균주의 포자를 백금으로 취하여 접종하여 4일간 27°C에서 진탕배양하였다.

저해제의 생산 균주는 soluble starch 10.0 g, glucose 20.0 g, soybean meal 25.0 g, meat extract 1.0 g, yeast extract 4.0 g, NaCl 2.0 g, trace salt 1 ml을 1l 물에 녹인 배지를 250 ml baffled flask에 50 ml 씩 넣어 살균 후 균을 접종하여 2일간 27°C의 rotary shaker에서 200 rpm으로 배양하여 발효용 접종원으로 사용하였다. 발효는 위와 동일한 배지를 5l-Jar Fermentor(한국발효기)에 3l 넣은 후 살균하고 접종원 50 ml을 접종하여 27°C에서 200 rpm 교반속도, 1 vvm 통기량으로 5일간 배양하였다. 배양 시간에 따른 저해제의 생산 정도는 배양액 20 µl가 AP-M에 대해 보이는 활성 저해율(%)로 확인하였다.

AP-M에 대한 저해 역가 측정

AP-M에 대한 저해 역가 측정은 먼저 배양액 또는 물에 녹인 시료 20 µl를 96 well microplate(Corning, USA)에 넣고, 기질인 L-leucine-*p*-nitroanilide는 stock solution(12.5 mg/ml in DMSO) 100 µl를 0.1 mM Tris·HCl buffer(pH 7.0) 10 ml에 사용 직전 희석하여 이 용액 160 µl를 microplate에 넣은 후 효소 용액 20 µl(약 1 mU)를 첨가하여 즉시 microplate reader (Bio-Rad 3550, USA)에서 405 nm 흡광도를 측정하였다. 이 microplate를 37°C incubator에서 30분간 반응시킨 후 다시 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

저해 역가(%)는 저해제를 넣은 것의 반응 전 흡광도(A)와 반응 후 흡광도(B), 저해제를 넣지 않은 것의 반응 전 흡광도(C)와 반응 후 흡광도(D)로부터 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{Percent Inhibition} = \frac{(D-C) - (B-A)}{(D-C)} \times 100$$

MR-387A 및 B의 분리정제

배양액으로부터 저해제의 분리는 다음과 같이 행하였다. 우선 배양액 10l를 Amberlite XAD-2에 흡착시킨 후 물로 수세하고 50% MeOH로 탈착하여 감압 농축하였다. 농축된 물질을 Dowex 50W×4(H⁺ form)에 흡착시켜 0에서 1N NH₄OH로 선형 농도구배를 실시하여 용출시킨 후 활성 부위를 모아 농축하였다. 농축된 분획을 DEAE-cellulose(free acid)에 통과시켜 농축 후 sephadex LH-20에서 50% MeOH로 전개시켜 노란색의 활성 분말을 얻었다. 이 분말을 물에 녹여 MCI gel CHP-20P(Nippon Rensui Co., Japan) column에 흡착시킨 후 0~50% aq. methanol까지 농도구배에 의해 전개하여 활성분획만 모아 Lobar RP-18(Merck Art No. 10625, Germany)에서 동일 용매 조건으로 전개한 후 농축하여 백색의 분말을 얻었으며 최종적으로 HPLC를 통하여 단일 물질로 분리하였다. HPLC의 용매조건으로 1차 MeCN : 0.1% TFA(17 : 83)을 사용하여 분리한 후 2차 MeOH : 20 mM phosphate buffer(pH 7.2)(50 : 50)을 사용하여 분리하였으며 column은 LiChrosorb RP-18(Merck)를 사용하였다. 용매로 사용한 완충액의 염을 제거하기 위하여 Diaion HP-20에 흡착시킨 후 물로 수세하고 methanol 80%로 용출한 후 농축하여 백색분말을 얻었다.

결과 및 고찰

균주의 형태학적 특성

저해제 생산 균주 SL-387은 가지가 난 기저균사에서 나선상의 기균사를 형성하며, 포자낭은 보이지 않고, 포자의 표면은 평활(smooth)한 형태로 기균사의 색은 갈색 또는 적회색 계열로 나타났다. 포자의 크

기는 0.7~0.8×1.1~1.2 μm로 원통형이었으며, 1사슬 당 포자의 수는 10~60개 정도로 다양하였다(Fig. 1).

균주의 배양학적 특성

영양생장(vegetative growth)기 때의 색깔은 회갈색 내지 적회색을 나타내었고, 용해성 색소는 ISP-4배지 (Starch-inorganic salt agar)에서 비확산성의 핑크색 색소와 확산성의 황색 색소를 배지에 분비하였다. 멜라닌 색소는 ISP-1(Tryptone-yeast extract agar), ISP-6(Peptone-yeast extract-iron agar) 및 ISP-7(Tyrosine agar) 모두에서 관찰되었다. 기균사는 ISP-7 배지에서는 형성하지 않았으며, ISP-2(Yeast extract-malt extract agar), ISP-3(Oat meal agar), 및 ISP-4 배지에서는 분말상의 왕성한 발육을 나타내었다 (Table 1).

균주의 생리적 특성

생육 온도는 Bennett 배지(glucose 1%, yeast extract 0.1%, bacto-peptone 0.2%, beef extract 0.1%, agar 1.5%)를 사용하였을 때 20~40°C 에서 생육하였

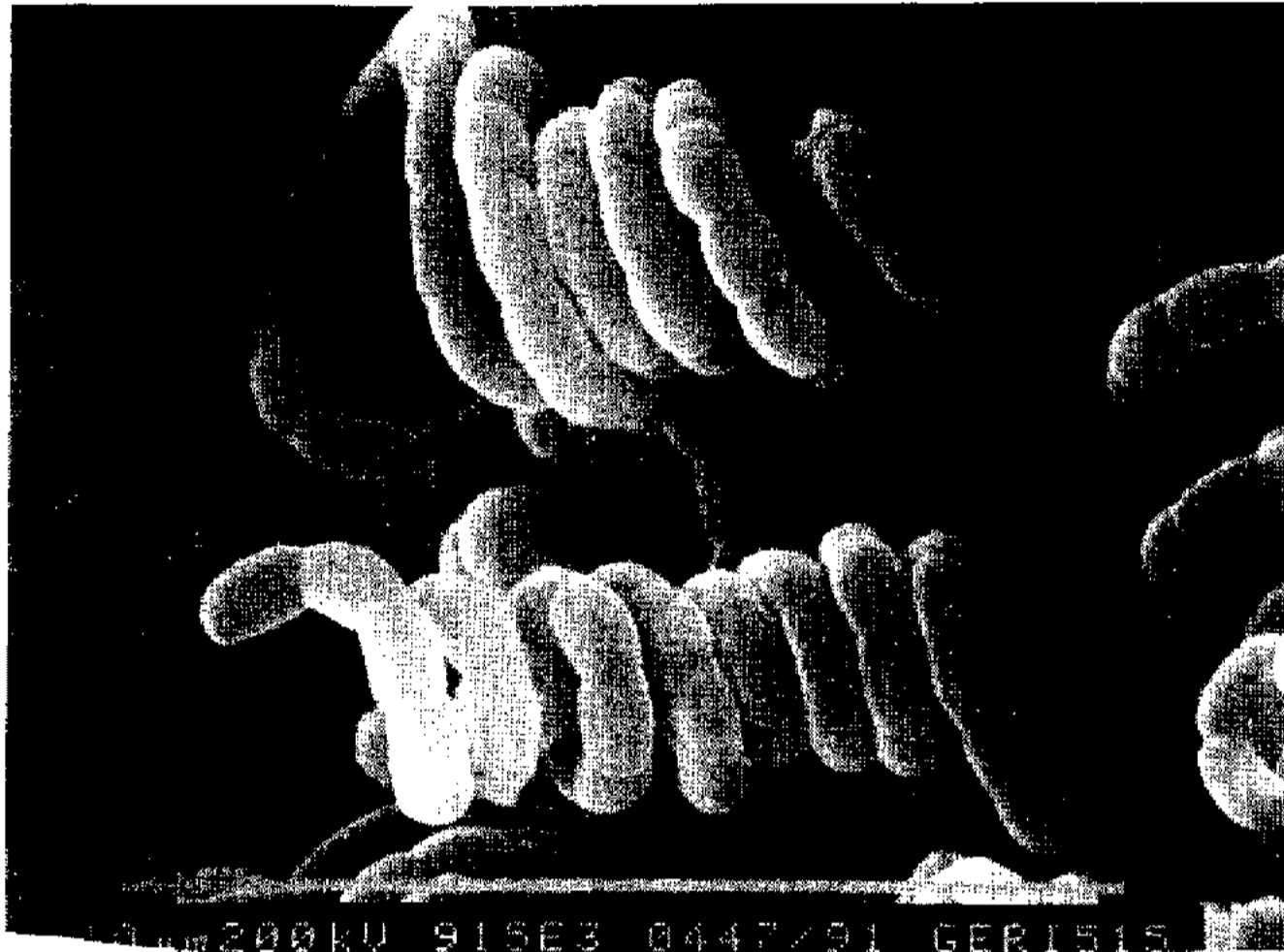


Fig. 1. Spore chain of *Streptomyces* sp. SL-387 on ISP-4 medium by scanning electron microscopy (×9,150, bar indicates 10 μm).

Table 1. Cultural characteristics of *Streptomyces* sp. SL-387

Media	Characteristics
Peptone-yeast extract agar(ISP-1)	A : moderate, whitish G : moderate, light brownish S : pale yellowish brown
Yeast extract-malt extract agar(ISP-2)	A : abundant, velvety, gray(light brownish gray~brownish gray) G : good, yellowish brown~dark yellowish brown(almost black) S : dull orange~yellowish brown
Oatmeal agar (ISP-3)	A : moderate, powdery or velvety, red(reddish gray) G : moderate, light brownish gray~brownish gray S : trace of pale yellowish brown
Inorganic salt-starch agar(ISP-4)	A : abundant, velvety, red(light pinkish gray), gray(brownish gray) G : moderate, brownish gray~reddish gray S : pinkish pigment under colony, less diffusive; dull yellow, good diffusive
Glycerol-asparagine agar(ISP-5)	A : poor, powdery, grayish G : moderate, light brownish gray~brownish gray S : trace of dull orange, less diffusive
Tyrosine agar (ISP-7)	A : none G : moderate, light reddish gray~reddish gray S : light reddish gray, less diffusive

A: aerial mycelium, G: growth, S: substrate mycelium

Table 2. Comparison of taxonomic characteristics of strain SL-387 with *Streptomyces naganishii*

	Strain SL-387	<i>S. naganishii</i>
Spore chain morphology	spirals	spirals
Spore surface	smooth	smooth
Aerial mass color	brownish or reddish gray	gray or red color
Reverse side color	yellowish brown to dark yellowish brown	pale grayish yellow to yellow brown
Soluble pigment	pink	transient red
pH sensitivity of soluble pigment	sensitive	not sensitive
Melanoid pigment		
ISP-1	+	+
ISP-6	+	+
ISP-7	+	+/-
Carbon utilization		
D-glucose	+	+
L-arabinose	+	+
D-xylose	+	+
D-fructose	+	+
D-mannitol	+	+
Inositol	+	+
L-rhamnose	+	+
Sucrose	-	-
Raffinose	+	+/-

+: utilized, +/-: doubtful

으며, 최적 생육온도는 24~30°C 범위였다. 젤라틴 액화는 양성이었으며, 가용성 전분, 탈지우유 펩톤화 등의 시험도 양성이었다. 질산염은 환원시키지 못하였으며, 황화수소를 생성하였다. 탄소원으로는 D-glucose, L-arabinose, D-xylose, D-fructose, D-mannitol, inositol, L-rhamnose, 및 raffinose 등은 이용하였으며, sucrose는 이용하지 못했다.

균주의 동정

균주의 전세포 가수분해 산물로부터 세포벽 성분을 조사한 결과 LL-diaminopimelic acid를 함유한 것으로 나타났다. 이러한 특징으로부터 이 균주는 *Streptomyces*속에 속하는 것으로 생각되었다. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology에 의하여 기존 균주와 비교한 결과 *S. griseoruber* 및 *S. naganishii*와 각각 유사도 계수(S_{SM}) 82.4% 및 69.2%로 유사하였다. 그러나 SL-387균주는 pectin 분해능이 없고, D-mannitol과 raffinose를 이용하는 점 등이 *S. griseoruber*와 달랐고, *S. naganishii*와는 용해성 색소의 pH sensitivity와 배지 배면색이 약간 차이가 났다(Table 2). 따라서 본 균주는 *Streptomyces* sp. SL-387로 명명하고

한국과학기술연구원 유전공학연구소 유전자원센터에 기탁하였다(수탁번호 KCTC0102BP).

저해제 생산에 대한 탄소원 및 질소원의 영향

탄소원이 저해제 생산에 미치는 영향을 조사한 결과 탄소원은 저해제 생산에 별 영향을 미치지 못하였으나, glucose, galactose, mannose 및 xylose 등이 상대적으로 높은 것으로 나타났다(Table 3). 질소원 중에서 $(NH_4)_2SO_4$, NH_4Cl , $NaNO_3$ 및 urea 등의 무기 염류에서는 생육이 부진하였으며 저해제 또한 생산하지 않았다. 유기질소원 중에서는 casamino acid, yeast extract 및 corn steep liquor 등에서는 저해제의 생산이 낮았으며, soytone, soybean meal, fish meal 및 gluten meal 등에서 높은 것으로 나타났다(Table 4). 또한 배지에 0.025%의 인산염을 첨가하였을 경우 균체 성장은 빨랐으나 저해제의 생산은 줄어 들었다.

배양 시간별 저해제 생산

각각의 질소원에 대하여 배양 시간별로 저해제 생산을 250 ml flask 배양으로 비교한 결과 soybean meal은 2일, soytone, fish meal 및 gluten meal은

Table 3. Effect of carbon sources on the production of inhibitor

Carbon sources	Final pH	Inhibition activity ¹⁾
L(+)-arabinose	9.5	77(120)
D(+)-cellobiose	9.6	76(120)
Cellulose	9.4	54(87)
D-galactose	9.3	76(123)
D-glucose	9.5	75(121)
Lactose	9.1	58(94)
D-fructose	9.6	65(104)
D-mannitol	9.8	74(119)
D(+)-mannose	9.6	78(126)
D(+)-raffinose	9.4	56(90)
L-rhamnose	9.8	74(119)
Saccharose	9.4	61(98)
D-sorbitol	9.4	58(94)
L-sorbose	9.2	58(94)
Xylitol	9.2	52(83)
D(+)-xylose	9.5	81(130)
Soluble starch	9.4	65(104)
Maltose	9.3	60(97)
Control	9.2	62(100)

Streptomyces sp SL-387 was cultured for 4 days in the fermentation medium substituted by several carbon sources described in Materials and Methods.

¹⁾Inhibition percent of 2.5 μ l of culture broth, (): relative activity to control (no added carbon source)

Table 4. Effect of nitrogen sources on the production of inhibitor

Nitrogen sources	Final pH	Inhibition activity ¹⁾
(NH ₄) ₂ SO ₄	4.3	6
NH ₄ Cl	4.1	5
NaNO ₃	6.6	0
Urea	8.7	0
Peptone	8.5	55
Soytone	5.8	76
Casamino acid	5.6	19
Yeast extract	6.9	46
Corn steep liquor	5.7	39
Soybean meal	5.7	65
Fish meal	5.8	78
Gluten meal	6.1	65
Control	5.7	6

Streptomyces sp. SL-387 was cultured for 4 days in fermentation medium substituted by several nitrogen sources.

¹⁾Percent inhibition of 2.5 μ l of the culture broth

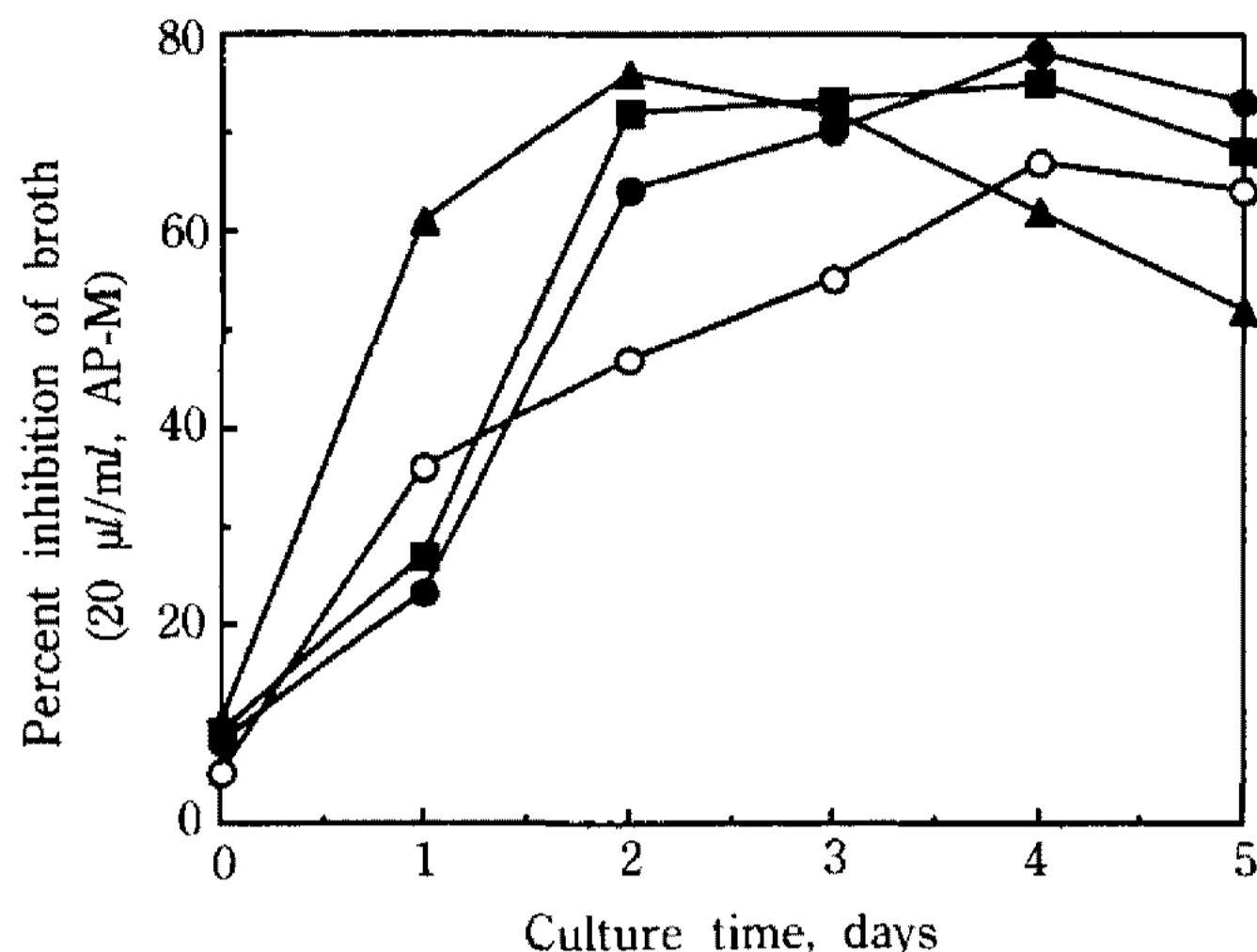


Fig. 2. Effects of organic nitrogen sources on inhibitor production in 250 ml-baffled flask culture.

Streptomyces sp. SL-387 was cultured in 250 ml-baffled flask containing 50 ml of fermentation media (soluble starch 1%, glucose 2%, NaCl 0.2%, trace salts 1 ml/l) supplemented with 2% of organic nitrogen sources at 27°C on a rotary shaker at 200 rpm.

●: soytone, ▲: soybean meal, ■: fish meal, ○: gluten meal

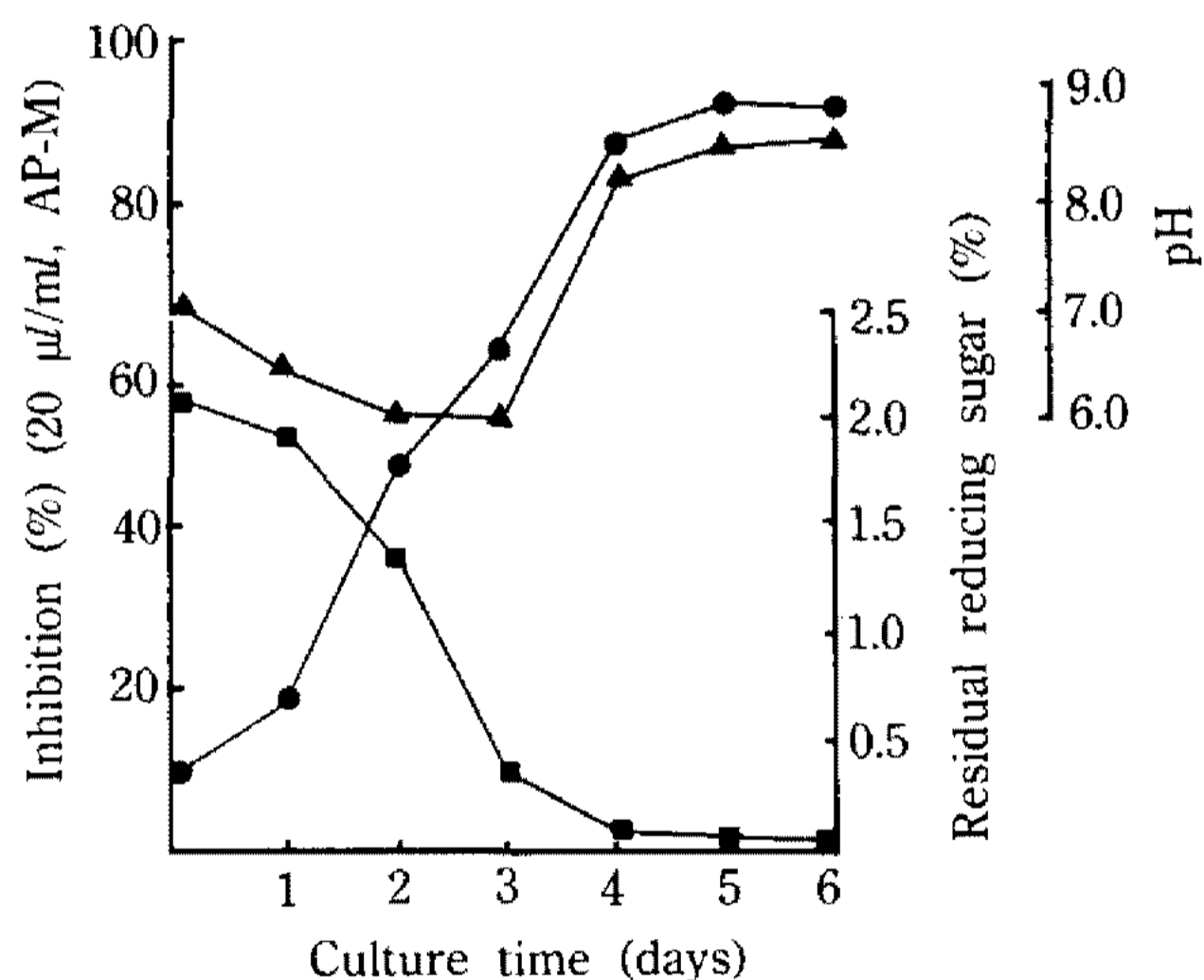


Fig. 3. Time course of inhibitor production by *Streptomyces* sp. SL-387.

Fermentation was carried out on 5L-Jar fermentor containing 3l media under aeration (1 vvm) and with agitation (200 rpm).

●: Inhibition, ▲: pH, ■: Residual reducing sugar

4일에 각각 높은 것으로 나타났다(Fig. 2). 한편 5l-Jar fermentor에 soybean meal을 질소원으로 glucose 및 soluble starch를 탄소원으로 하여 3l 배지로 배양하였을 때 균체의 성장과 관련하여 저해 활성이 증가하여 배양 5일에 최대에 도달함을 알 수 있었다(Fig. 3).

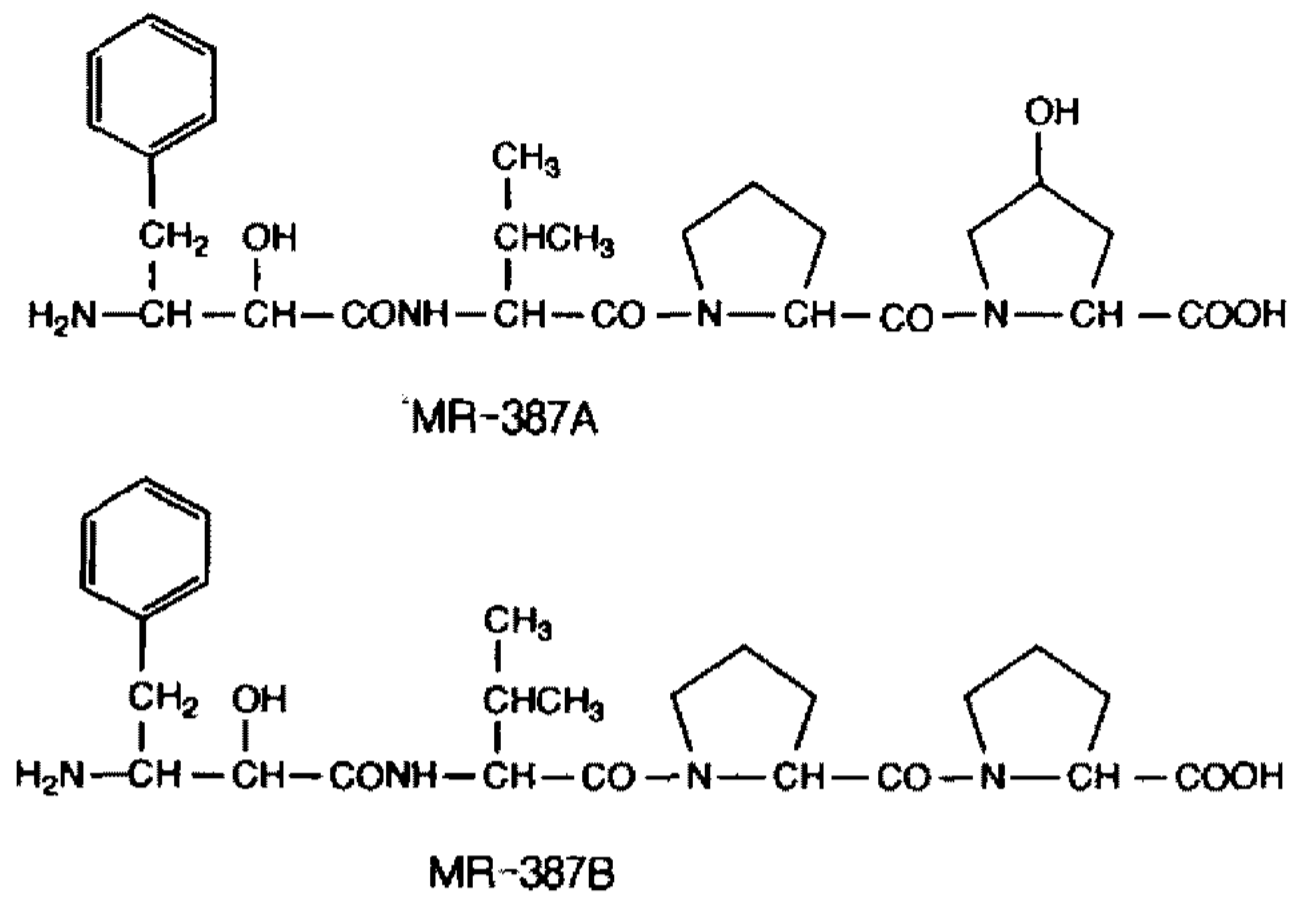


Fig. 4. Structures of MR-387A and B.

생산된 저해제는 Diaion HP-20, silica gel, sephadex LH-20, reverse phase silica gel 등의 column chromatography 방법을 조합 또는 반복하여 최종적으로 HPLC에 의하여 두 종류의 물질로 분리하였다. 그 구조는 AHPA[(2S,3R)-3-amino-2-hydroxy-phenylbutanoic acid)와 valine, proline 및 hydroxyproline 등을 포함하는 구조로, 기존의 저해제와는 아미노산 조성 및 배열이 다른 신규 물질임을 알 수 있었으며, 이를 각각 MR-387A 및 B로 명명하였다(Fig. 4). 이들에 대한 물리 화학적 특성, 구조 해석 및 생물학적 활성 등은 다른 논문으로 보고할 예정이다.

요 약

Aminopeptidase M에 대하여 강한 저해활성을 보이는 물질 MR-387A 및 MR-387B를 생산하는 균주 SL-387을 분리하고 동정하였다. 이 균주는 포자낭이 보이지 않고 기균사는 나선형이며 포자의 표면은 평활(smooth)형이었다. 멜라닌 색소 및 용해성 색소를 분비하였고, 단백질 및 전분 분해력이 강한 편이었다. 세포벽 성분중 diaminopimelic acid는 LL-형이었으며 펙틴 분해능은 없었다. 이 균주는 *Streptomyces griseoruber* 및 *S. naganishi*와 유사하였으나 몇몇 배양학적 특성 혹은 생리적 특성이 달라 *Streptomyces* sp. SL-387로 명명하고, 한국과학기술연구원 유전공학연구소 유전자원센터에 기탁하였다(KCTC0102BP). 저해제 생산은 탄소원으로 glucose, galactose, mannose, xylose 등이, 질소원으로 soybean meal, soytone, fish meal, gluten meal 등에서 높게 생산되었으며, Jar fermentor에서 배양시 5일만에 가장 높은 저해 활성을 보였다.

참고문헌

1. Kenny, A.J., S.L. Stephenson, and A.J. Turner. 1987. *Mammalian Ectoenzymes*, Pp. 169-210. Elsevier Scientific Publishing, Amsterdam.
2. Gros, C., B. Giros, and J.C. Schwartz. 1985. Identification of aminopeptidase M as an enkephalin-inactivating enzyme in rat cerebral membranes. *Biochemistry* **24**: 2179-2185.
3. Menrad, A., D. Speicher, J. Wacker, and M. Herlyn. 1993. Biochemical and functional characterization of aminopeptidase N expressed by human melanoma cells. *Cancer Res.* **53**: 1450-1455.
4. Yoneda, J., I. Saiki, H. Fujii, F. Abe, Y. Kojima, and I. Azuma. 1992. Inhibition of tumor invasion and extracellular matrix degradation by ubenimex(bestatin). *Clin. Exp. Metastasis* **10**: 49-59.
5. Aoyagi, T., H. Tobe, F. Kojima, M. Hamada, T. Takeuchi, and H. Umezawa. 1978. Amastatin, an inhibitor of aminopeptidase A, produced by actinomycetes. *J. Antibiot.* **31**: 636-638.
6. Umezawa, H., T. Aoyagi, H. Suda, M. Hamada, and T. Takeuchi. 1976. Bestatin, an inhibitor of aminopeptidase B, produced by actinomycetes. *J. Antibiot.* **29**: 97-99.
7. Umezawa, H., T. Aoyagi, T. Tanaka, H. Suda, A. Okuyama, H. Naganawa, M. Hamada, and T. Takeuchi. 1985. Production of actinonin, an inhibitor of aminopeptidase M, by actinomycetes. *J. Antibiot.* **38**: 1629-1630.
8. Aoyagi, T., S. Yoshida, Y. Nakamura, Y. Shigihara, M. Hamada, and T. Takeuchi. 1990. Probestin, a new inhibitor of aminopeptidase M, produced by *Streptomyces azureus* MH663-2F6. *J. Antibiot.* **43**: 143-153.
9. Aoyagi, T., S. Yoshida, N. Matsuda, T. Ikeda, M. Hamada, and T. Takeuchi. 1991. Leuhistin, a new inhibitor of aminopeptidase M, produced by *Bacillus laterosporus* BMI156-14F1. *J. Antibiot.* **44**: 573-581.
10. Shirling, E.B. and D. Gottlieb. 1966. Methods of characterization of *Streptomyces* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **16**: 313-340.
11. Williams, S.T., M.E. Sharpe, and J.G. Holt. 1989. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol.4, Pp. 2333-2585. 9th ed. Williams & Willkins, Baltimore.
12. Smibert, R.M. and N.R. Krieg. 1981. General characterization, Pp. 411-449. *In Manual of Methods for General Bacteriology*, American Society for Microbiology, Washington.

(Received June 1, 1994)