

Cathepsin B 저해물질을 생산하는 *Streptomyces aburabiensis*의 분리 및 동정

박상진 · 이현숙 · 김인섭 · 김형태 · 윤성준* · 이계준[†]

서울대학교 미생물학과, *동화약품 중앙연구소

(Received April 28, 1995)

Isolation and Identification of *Streptomyces aburabiensis* Producing Cathepsin B Inhibitor

Sang Jin Park, Hyun sook Lee, In Seop Kim, Hyoung Tae Kim,
Sung Joon Yoon* and Kye Joon Lee[†]

Department of Microbiology, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

*Central research Center, Dong Wha Pharmaceutical Co. Ltd,

Abstract -- The aim of the present study was to develop strains of actinomycetes producing low molecular weight cathepsin B inhibitor. Among 700 isolates from soil samples, a strain of *Streptomyces* sp. SMF30 producing cathepsin B inhibitor showing specificity and heat stability was selected by an economical and effective screening method. 50 units characteristics for major cluster analysis and 34 units characteristics for minor cluster were tested and the data were analyzed numerically using the TAXON program. The Isolate SMF30 was identified as a strain of *Streptomyces aburabiensis*

Keywords □ Cathepsin B inhibitor, Actinomycetes, *Streptomyces aburabiensis*.

방선균은 생리대사가 다양하여 매우 다양한 구조의 물질을 생산하며 단백질질을 외부로 생산, 분비하는 등 잇점이 많아 산업적으로 이용하고자 하는 노력이 계속되어 왔다. 특히 방선균이 생산하는 2차대사산물은 저분자량의 물질이 많아 항생물질, 항종양물질, 항바이러스 물질, 생리활성조절물질, 면역조절물질 등으로 이용되어 왔으며 최근에는 생체고분자물질생산에도 이용되고 있다.

단백질 분해효소는 생체내의 여러 조절기작에 관여하는데, 일반적으로는 소화, 체내단백질의 전환과 숙성, 체외단백질의 분해, 호르몬의 숙성, 수정등에 사용되며, 최근에 면역 반응의 조절, 부종, 혈액 응고, 혈압 조절, 암세포의 전이등에 관여한다는 것이 알려지면서 생체내 반응 조절과 그 저해물질을 이용한 질병의 치료에 대한 관심이 커지고 있다. 단백질 분해효소는 그 활성부위의

구조에 따라 serine protease(chymotrypsin, trypsin, elastase, subtilisin 등), metallo-protease(carboxypeptidase, thermolysin), cysteine protease(lysosomal cathepsins, papain, calpain, actinidin 등), 그리고, aspartic protease(pepsin, renin, chymosin 등)로 나누어진다.

Cathepsin은 동물의 비장, 흉선, 간, 허파, 척수, 근육 등에 존재하는 호산성 cysteine protease이다.¹⁻²⁾ 소의 비장에서부터 처음 발견된 이후 합성기질에 대한 반응기작과 존재 위치에 따라 여러 종류(cathepsin A, B, C, D, E, and H)가 발견되었다. Cathepsin B (Cathepsin B1 :EC 3.4.22.1)는 benzoyl-L-arginineamide를 분해하며, cysteine, β -mercaptoethanol, glutathione 등의 활성제를 필요로 한다. 일반적으로 비장에 가장 많이 존재하며, 흉선, 신장, 간, 허파 등에서도 발견된다. cathepsin B는 근육질조,³⁻⁴⁾ 암세포전이, 심근조직손상, 골다공증⁵⁾ 등에 관련이 있는

[†]본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

것으로 알려져 있어 이에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 또 염증이 발생하였을 때, 호중구(neutrophil)나 거식세포(macrophage), 비만세포(mast cell) 등이 활성화되어 lysosomal enzyme들을 과잉 분비함에 따라 염증이 확산되는데 저해물질이 이를 저해, 염증의 확산을 방지하는 것으로 보고되었다.⁶⁾

본 연구에서는 이러한 병리작용을 억제할 수 있는 생리활성물질로서 큰 의미를 지닐 수 있는 cathepsin B의 저해물질을 얻기 위해 전국 각지의 토양시료를 채취, 적절한 전처리와 방선균 분리용 배지를 이용하여 방선균만을 분리하였고, 생체내에서의 이용성과 안정성을 위하여 열과 pH에 안정하고 다른 계열의 단백질분해효소에는 비교적 작용하지 않는 저분자량의 저해물질을 생산하는 균주를 분리하고 이를 수리동정하였다.

실험방법

방선균의 분리 - 다양한 토양 환경에서 얻어진 토양시료로부터 전처리 과정과 각종 방선균 분리배지를 이용하여 방선균을 선별, 분리하였다. 먼저 채취된 토양시료를 petri dish에 넣고 상온에서 충분히 건조시킨 후, 80°C dry oven에서 30분간 열처리하였다. 이렇게 전처리된 토양시료 1.0 g을 취하여 멸균 용기에 넣고 멸균된 식염수 10 ml와 10 µl의 tween 20을 가하여 30분간 잘 섞어주었다. 이를 적절히 희석한 후, cycloheximide(50 mg l⁻¹)과 nystatin(50 mg l⁻¹)이 첨가된 각종 방선균 분리용 배지에 접종하고 방선균의 colony가 생길 때까지 28°C에서 10~20일간 배양하였다. 형성된 colony를 멸균된 백금으로 따내어 Bennett's 한천배지에 접종하고 수차례 계대배양하였다.

배지 및 배양 - 방선균의 분리를 위해 starch-casein-nitrate 한천배지와 arginine-glycerol salts 한천배지를 사용하였고 계대 배양에는 Bennett's 한천배지를 이용하였다. 단백질분해효소 저해물질 생성균 주검색배지는 glucose 10.0 g, peptone 10.0 g, yeast extract 3.0 g, NaCl 3.0 g, FeSO₄ · 7H₂O 0.02 g, ZnSO₄ · 7H₂O 0.02 g, 한천 8.0 g을 증류수 1l에 녹여 사용하였다. 방선균 분리주의 동정용배지는 International Streptomyces Project(ISP)에서 제시한 배지를 사용하였다.⁷⁾

방선균 분리주 동정 - Bennett's 한천배지에서 7일간 배양한 후 배양액을 유리솜으로 걸러 균사체와 분리

한 포자를 생리식염수에 세척, glycerol에 현탁시킨 액을 접종원으로 사용하였다.⁸⁾ 고체배양은 한천배지를 사용하였으며, 액체배양은 baffled 플라스크에 배지를 넣어 회전 교반 배양기에서 시행하였다.

형태학적 특성분석 - 분리주 SMF30을 각종 ISP 배지들과 Bennett's 배지에 배양하면서 7일, 14일, 21일 간격으로 생육정도, colony 배면형태, 포자 형성등을 관찰하였다. ISP4 배지에서 3일 내지 7일간 배양한 후, 포자 생성이 활발히 일어난 부위의 배지에 홈을 파고 8% glutaldehyde 용액으로 채워 10~12시간 동안 고정시켰다. 고정이 끝나면 원하는 부위를 잘라낸 후 P₂O₅가 들어 있는 기밀용기에 넣고 -20°C에서 완전히 건조시켜 관찰하였다.

세포벽의 diaminopimelic acid(DAP) 이성체와 amino acid 분석 - Starch-casein-nitrate 배지에서 3일간 배양한 균체를 회수하여 세포를 완전히 파쇄(French pressure, American Instrument Company)한 후 동결건조하였다. 동결건조한 균사 20 mg을 6 N HCl 5 ml과 함께 넣고 밀봉한 후 100°C에서 18시간동안 가수분해하여 여과, 탈염산 농축하고 cellulose TLC plate(10×10 cm, Merck)에 점정하고 methanol-water-5N HCl-pyridine(80:15:5:10)으로 전개시킨 다음 acetonic ninhydrin으로 발색시켜 Sigma사의 표준제품과 비교하였다.⁹⁾

세포내 당분석 - 동결건조한 세포 50 mg을 시험관에 넣고 6 N HCl을 가하여 밀봉한 후 2시간 동안 가수분해하였고 이어 Ba(OH)₂를 이용하여 pH 5.0~5.2로 중화시킨 후 원심분리(10,000 rpm, 10 min.)하고 상등액을 농축하여 0.3 ml의 증류수에 녹였다. 이 시료를 cellulose TLC plate에 점정하고 n-butanol-water-pyridine-toluene(10:6:6:1, containing 1% acetic acid)으로 전개하고 diphenylamine 2g-aniline 2g-85% phosphoric acid 10 ml-methanol 90 ml의 용액으로 발색하여 Sigma사의 표준제품과 비교하였다.¹⁰⁾

종동정을 위한 특성분석 및 TAXON 프로그램에 의한 수리분석 - Williams 등 (1983)의 방법에 따라¹¹⁻¹²⁾ 주군집(major cluster) 동정을 위한 50 단위형질(unit characters)을 하였으며, 부군집(minor cluster) 동정을 위하여서는 34가지의 단위형질을 조사하였다. TAXON 프로그램은 영국의 Newcastle upon Tyne 대학 미생물학과의 S. A. Ward 박사에게 개발된 프로그램으로써 단위형질의 특성을 + 혹은 -로

간단하게 입력하고, 입력된 자료를 CLUSTAN으로 분석하여 수리분류할 수 있으며 수리분류 데이터를 기본으로 하여 작성된 동정확률행렬(identification probability matrix)의 특성과 미지균의 특성을 비교 분석하여 수리동정할 수 있다.

저해활성 측정 - Cathepsin B 저해활성은 Barret의 방법을 변형하여 사용하였다.¹³⁾ 합성기질인 N- α -benzoyl-DL-arginine- β -naphthylamide · HCl(BANA; Sigma)이 cathepsin B(from bovine spleen, Sigma)와의 반응으로 발생하는 p-naphthylamine과 따로 가해 준 Fast Garnet GBC salt가 결합함에 따라 증가하는 540 nm에서의 흡광도를 측정하였다.

저해역가는 다음과 같이 계산하였고 저해물질의 정량은 1 μ M의 product(α -naphthylamine)을 생산하는 효소를 50% 저해하는 저해물질의 양을 1 unit로 하였다.

$$\text{저해역가 (\%)} = \frac{A-B}{A} \times 100$$

A : Enzyme activity without inhibitor

B : Enzyme activity with inhibitor

Trypsin(Sigma)에 대한 저해역가 측정은 nitro-anilide 계열의 발색단을 가진 합성기질인 N- α -benzoyl-DL-arginine-p-nitroanilide(BAPNA; Sigma)를 이용하였고, buffer로는 10 mM Tris-HCl(Sigma)을 사용하였다.

결과 및 고찰

방선균의 분리 및 cathepsin B 저해물질 생산 균주의 선별 - 전국 각지의 산사, 골짜기등에서 주로 부식토를 채취하였고 건열 처리와 다양한 방선균 분리 배지를 이용하여 방선균 특유의 특징을 보이는 콜로니를 약 713개를 선별, 수 차례의 계대 배양을 통하여 순수 분리하였다. 분리된 방선균들을 단백질분해효소 저해물질 생성액배지에서 3일간 배양한 후 원심분리(5000 rpm, 10 min.)하고 저분자량 저해물질을 생성하는 균주를 선별하기 위하여 그 상등액을 취하여 100°C에서 10분간 열처리한 다음 cathepsin B에 대한 저해활성을 조사하였다.

검색한 713개의 열처리된 배양액중 저해역가 90%

이상을 보인 49개의 배양을 1차로 선별하였고 다시 이들중에서 10배 희석하였을 때에도 80% 이상의 저해역가를 보이는 18균주를 선택하였다. 이들중, cysteine계열 단백질분해효소에 대한 특이성이 큰 저해물질생산균을 선별하기 위하여 trypsin(serine protease 계열), serratiopeptidase(metalloprotease 계열), pepsin(aspartic protease 계열) 등과, cathepsin B와 같은 cysteine 계열 단백질분해효소인 papain에 대한 저해역가를 조사하였다.

그 결과 SMF30 균주는 cathepsin B에 높은 저해역가(98.7%)를 보인 반면 다른 계열의 단백질분해효소인 trypsin에 대해서는 낮은 저해역가(5.6%)를 보였고 serratiopeptidase, pepsin등에는 전혀 저해역가를 보이지 않아 비교적 대상효소에 대한 특이성이 컸으며 저해물질이 열처리와 유기용매추출에 안정하므로 저분자량의 저해물질을 생산하는 것으로 판단되어 최종선별하였다.

선택균주 SMF30의 형태적 특성 - 분리주 SMF30을 각종 ISP 배지와 Bennett's 한천배지 등에서 배양하여 성장정도, 포자(aerial spore mass) 색깔, 배면 색깔, 수용성 색소, melanin 생성등의 특성을 관찰하였다. 모든 배지에서 성장이 활발히 일어났으며 포자를 생산하였고 inorganic salts-starch 한천배지(ISP4 배지)에서의 포자 색은 회색이었으며 glycerol-asparagine 한천배지(ISP5 배지) 수용성 색소는 생성되지 않았다. Melanin 색소는 ISP6 배지(peptone yeast iron agar)과 7(tyrosine agar)에서 나타났다. 배양시 colony의 상태는 질기고 가죽질이었으며, 가장자리는 불규칙적인 모양으로 관찰되었다. 또한 분리주 SMF30를 Bennett's 액체 배지에서 3일간 배양한 후 위상차 현미경(Nikon, Labophot, X1500)으로 근사체의 성장과 포자 생성을 조사하였다. 액체배지에서의 성장은 전형적인 방선균의 mycelium과 포자 형성을 보였으며 성장이 어느정도 활발히 진행되면 분절이 일어나는 것으로 관찰되었다.

분리주 SMF30을 inorganic salts-starch 한천배지(ISP4 배지)에서 7일간 배양한 후 진처리 과정을 거쳐 주사 전자현미경 (Stereoscan 260 SEM, Cambridge ltd, U.K., X5,000-10,000)으로 조사하였다 (Fig. 1). 포자 사슬의 모양은 분지가 잘된 망사 모양으로 분절되어 끝이 굽은 모양이었고 (hook), 포자 모양은 타원형에 가까운 원형이었고 표면은 거친 모양 (spike)으로

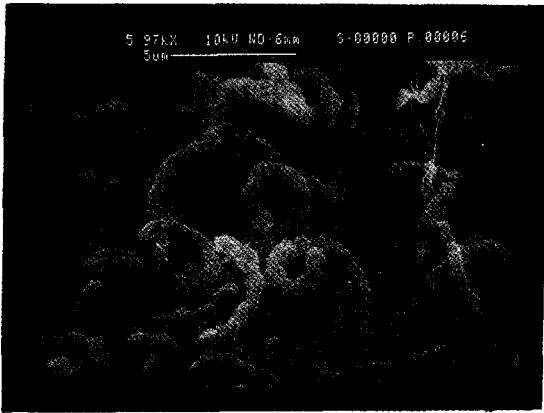


Fig. 1 — Scanning electron micrograph of isolate SMF30.

관찰되었다.

분리주 SMF30의 속 동정 - 분리주 SMF30을 starch-casein-nitrate 한천에서 배양한 후 균체를 회수하여 가수분해한 시료를 이용한 세포벽의 분석은 DAP (diaminopimelic acid) isomer가 LL-DAP(LL-2,6-diaminopimelic acid) 형태이며, amino acid는 glycine, glutamic acid, alanine등이 검출되었고, 당은 검출되지 않았다. 형태적인 특징에서 포자가 형성되었고 *Streptoverticillium*의 특징이 관찰되지 않았으며, 포자표면이 매끈하지 않고 거친(spike) 모양으로 나타났다. 또한, 세포벽 DAP isomer와 amino acid를 조사한 결과 세포벽의 peptide는 glycine으로 연결된

Table I — Comparison of diagnostic characteristics among *Sreptomycetes*, *streptoverticillium*, and isolate SMF 30

Characteristics	<i>Streptomycetes</i>	<i>Streptoverticillium</i>	SMF30
Colont size	Discrete	Discrete	Discrete
Substrate mycelium	+	+	+
Spore	+	-	+
Sproangia	-	-	-
Motile spore	-	-	-
Aerial mycelium	+	+	+
Chains of arthrospores	+	+	+
Arthrospore in verticils	-	+	-
Sproe surface smooth	+	+	-
Sproe surface hairly, spiny, or warty	+	-	+
Motile spores	-	-	-
Sugar in hydrolysates Ara, gal, xyl	-	-	-
DAP isomer in cell wall			
LL-DAP	+	+	+
meso-DAP	-	-	-

⁺Symbol : +, 90% or more of strains are positive;- , 10% or less of strains are positive

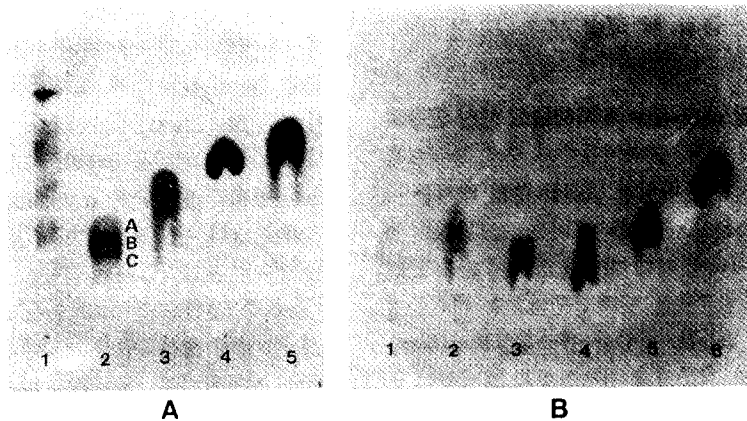


Fig. 2 — Cellulose thin layer chromatography of cell wall diaminopimelic acid (DAP) isomers and amino acids (A) and whole cell sugar extract (B) of isolate SMF30.

A : 1. Cell wall hydrolysate, 2. DAP isomers (A: LL-DAP, B: Meso-DAP, C: 3-OH DAP), 3. Glycine, 4. Glutamic acid, 5. Alanine
 B : 1. Whole cell extract, 2. Arabinose, 3. Galactose, 4. Glucose, 5. mannose

Table II— Major unit characters for the identification of *Streptomyces* sp. SMF30

1. Morphology and pigmentation.			
Spore chain morphology	: rectiflexible (RFS)	+	spiral (SPI) -
Color of spore mass	: red (RED)	-	grey (GRY) +
Mycelial pigment	: red/orange (ROS)	-	
Diffusible pigment	: production (PIG)	-	yellow/brown (YBP) -
Melanin production on	: PYI 배지 (MPI)	+	tyrosine 배지 (MTY) +
2. Antimicrobial activity.			
<i>Bacillus subtilis</i> (SUB)		-	<i>Micrococcus luteus</i> (LUT) -
<i>Candida albicans</i> (ALB)		-	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (CER) -
<i>Streptomyces murinus</i> (MUR)		-	<i>Aspergillus niger</i> (NIG) -
3. Biochemical tests.			
Lecithinase (LEC)		-	Lipolysis (LIP) +
Pectin hydrolysis (PEC)		+	Nitrate reduction (N03) +
H ₂ S production		+	Hippurate reduction (HIP) -
4. Degradation tests.			
Elastin (ELA)		+	Xantine (XAN) +
Arbutin (ARB)		+	
5. Antibiotic resistance.			
Neomycin (NEO)		+	Ripamficin (RIF) -
Oleandomycin (OLE)		+	Penicillin G (PEN) -
6. Growth test.			
45 °C (45C)		+	NaCl (7NA) +
Sodium azide (0IZ)		+	Phenol (PHN) -
Potassium tellurite (0IT)		+	Thallus acetate (T01) -
7. Compound as sole source of nitrogen (0.1%, W/V).			
DL- α -amino-n-butyric acid (BUT)		+	L-Cysteine (CYS) +
L-Valine (VAL)		-	L-Phenylalanine (PHE) -
L-Histidine (HIS)		+	L-Hydroxyproline (HYD) -
8. Organic compounds as sole source of carbon (1%, W/V)			
Sucrose (SUC)		+	meso-Inositol (INO) +
Mannitol (MAN)		+	L-Rhamnose (RHA) +
Raffinose (RAF)		-	D-Melizitose (MEZ) -
Adonitol (ADO)		-	Dextran (DEX) +
D-Melibiose (MEB)		-	Xylitol (XYT) -

*Characters in parenthesis is the code name for computer

Table III— Identification score of the *Streptomyces* sp. SMF30 to the major cluster of *Streptomyces* by TAXON program

Cluster	Taxon distance	95% Taxon radius	Probability of strain further away (%)	Identification score
1B	0.5041	0.4404	0.0345	0.899400
15	0.5022	0.4271	0.0126	0.098647
3	0.5131	0.3631	0.0000	0.000015
18	0.5350	0.4497	0.0061	0.001059
12	0.5303	0.4173	0.0001	0.000309

peptidoglycan type A3 γ 으로, 세포벽이 I형인 것으로 나타났으며, 세포내의 특징적인 당이 나타나지 않았으므로 당성분 C형에 해당하는 것으로 판명되었다(Fig. 2).¹⁴⁾ 따라서, 분리주는 전형적인 *Streptomyces* 속에 해당하는 것임을 알 수 있었다(Table I).

TAXON 프로그램을 이용한 분리주의 종 동정

주군집(major cluster)에 의한 동정 - 분리균주 SMF30의 종 동정을 위한 주군집 형질실험 결과는 Table II와 같다. TAXON 프로그램을 이용하여 수리 동정한 결과 군집 1B(cluster)에 속할 확률이 가장 높다는 것을 알 수 있었다(Table III). 군집 1B(*S. albidoflabus*)의 Willcox 확률¹⁵⁾이 군집 15(*S. chromofuscus*)보다 높았다. 그러나, 분리주 SMF30은 군집 1B에서의 Willcox 확률이 너무 낮고, taxon거리(taxon distance)가 0.5041로 95% taxon 반경(taxon radius)보다 상당히 크며, 시험 균주가 군집 1B에 속하는 다른 균주보다 군집중심(cluster centroid)에 더 가까이 있다고 하는 % of probability of strain further away가 아주 낮은 것으로 미루어 이 군집의 최외각에 속하기 보다는 다른 군집에 속할 가능성이 높은 것으로 판단되었다. 따라서, 이 균주를 부군집으로서 재동정하였다.

Table IV — Minor unit characters for the identification of *Streptomyces* sp. SMF30.

1. Morphology and pigmentation.					
Spore chain morphology.	:	rectiflexible (RFS)	+	spiral (SPI)	
Color of spore mass	:	grey (GRY)	+		
Diffusible pigment	:	production (PIG)	-		
2. Antimicrobial activity.					
Bacillus subtilis (SUB)			-		
Mirococcus leuteus (LUT)			-		
Streptomyces murinus (MUR)			-		
3. Biochemical tests.					
Pectin hydrolysis (PEC)			+		
4. Degradation tests.					
Guadine (GUA)	+	Xylan (XYN)	+	Elastin(ELA)	+
Urea (URE)	+	Xanthine (XAN)	+	Allantoine (ALL)	-
5. Antibiotic resistance.					
Rifampicin (RIF)	-	Penicillin G (PEN)	-		
6. Growth tests.					
45°C (45C)	+	Phenol (PHN)	-	NaCl (7NA)	+
Potassium tellurite (01T)	-	Sodium azide (01Z)	-		
7. Compound as a sole source of nitrogen (0.1%, W/V)					
Potassium nitrate (POT)	+	L-Phenylalanine (PHE)	-		
L-Histidine (HIS)	+				
8. Organic compounds as sole source of carbon (1%, W/V).					
L-Arabinose (ARA)	-	Raffinose (RAF)	+	Sucrose (SUC)	+
D-Lactose (LAC)	+	D-Xylose (XYL)	+	Salicilin (SAL)	+
myo-Inositol (INO)	+	D-Melibiose (MEB)	+	Mannitol (MAN)	+
Sodium acetate(ACE)	+	D-Fructose (FRU)	+	L-Rhamnose (RHA)	+
Sodium citrate(CIT)	+	Sodium propionate(RPO)	+	Sodiumpyruvate(PYR)	+

*Characters in parenthesis is the code name for computer

Table V — Identification score of the *Streptomyces* sp. SMF30 to the minor cluster of *Streptomyces* by TAXON program.

Cluster	Taxon distance	95% Taxon radius	probability of strain further away (%)	identification score
2	0.3828	0.3972	15.0009	0.999472
64	0.5150	0.3154	0.0000	0.000522
34	0.5484	0.4066	0.0000	0.000006
14	0.5501	0.2869	0.0000	0.000000
22	0.5501	0.2869	0.0000	0.000000

부군집(minor cluster)에 의한 동정 - 분리주 SMF 30의 부군집 형질 실험 결과는 Table IV와 같다.

TAXON 프로그램에 의한 수리동정 결과 Willcox 확률이 부군집 2(*S. aburabiensis*)에서 0.999472로 다음 부군집 64의 0.000522에 비해 월등히 높았으며, taxon 거리가 0:3818로 95% taxon 반경보다 작고 % of probability of strain further away가 상대적으로 크므로 부군집 2에 속할 확률이 아주 높다는 것을 알 수 있었다(Table V).

부군집 2에는 중심균주인 *Streptomyces aburabiensis* ISP 5033과 *Streptomyces herbaricolor* ISP 5123과, *Streptoverticillum olivericillatum* ISP 5250등의 3종들이 속해 있다. 부군집 2의 가상중심균주(hypothetical median organism)와 가상중심에 가장 가까운 중심균주인 *Streptomyces aburabiensis* ISP 5033, 최

Table VI — Comparison of taxonomic scores between hypothetical median organism (HMO), centrotype, outermost member strain (OMS), best match strain, and *Streptomyces* sp. SMF30 in cluster 2.

member strain in cluster 2	Tax. distance	95% Tax. radius	% Prob of members further away	Willcox probability
H M O	0.2328	0.3972	99.6192	0.999999
Centrotype (<i>S. aburabiensis</i>)	0.3113	0.3972	72.8418	0.999999
O M S (<i>S. olivericillatum</i>)	0.3621	0.3972	23.4578	0.999999
Best match strain (<i>S. herbaricolor</i>)	0.3113	0.3972	72.8418	0.999999
St. sp. SMF30	0.3828	0.3972	15.0129	0.999472

Table VII— Comparison of taxonomic unit characters among member of organisms in cluster 2 of *Streptomyces* and isolate SMF30 and the S_{SM} value calculated by TAXON program

Taxonomic unit characters (TAXON code)	Positive characters state (%)	HMO in cluster 5	<i>S. aburabiensis</i> ISP 5033	<i>S. herbaricolor</i> ISP 5123	SMF30
RHA	67	+	+	-	+
RFS	67	+	+	+	+
SPI	1	-	-	-	-
GRY	33	-	+	-	+
PIG	1	-	-	-	-
POT	67	+	+	+	+
PHE	67	+	+	-	-
HIS	99	+	+	+	+
PEC	33	-	-	+	+
SUB	33	-	-	-	-
LUT	33	-	-	-	-
MUR	1	-	-	-	-
GUA	99	+	+	+	+
ELA	67	+	+	+	+
XAN	99	+	+	+	+
XYN	67	+	+	+	+
URE	67	+	-	+	+
ALL	33	-	-	-	+
RIF	99	+	+	+	+
PEN	99	+	+	+	-
45C	33	-	-	-	+
7NA	99	+	+	+	+
01Z	99	+	+	+	-
PHN	67	+	+	-	-
01T	99	+	+	+	-
ARA	99	+	+	+	+
SUC	67	+	+	+	+
XYL	99	+	+	+	+
INO	67	+	+	+	+
MAN	99	+	+	+	+
FRU	99	+	+	+	+
RAF	33	-	+	-	+
LAC	99	+	+	+	+
SAL	99	+	+	+	+
MEB	67	+	+	-	-
ACE	67	+	-	+	+
CIT	99	+	+	+	+
PRO	99	+	+	+	+
PYR	99	+	+	+	+
matching to SMF30 :		29	29	32	39
mismatching to SMF30 :		10	10	7	0
S_{SM} value (%) :		74.35	74.35	82.05	100

외각 균주인 *Streptomyces herbaricolor* ISP 5123은 모두 taxon 거리가 낮아 95% taxon 반경에 포함되고 Willcox 확률이 0.999999이상이었다. 부군집 2와 분리주와의 taxonomic scores는 Table VI에 나타나 있다.

TAXON 프로그램에서의 부군집 2의 구성 균종 중 가장중심균주(HMO)와 중심균주인 *Streptomyces*

aburabiensis ISP 5033, 그리고, 본균주와 가장 근접한 (best matched member) 균주인 *Streptomyces herbaricolor* ISP 5123과 분리주 SMF30가 가진 특성을 비교, 단순비교계수(simple matching coefficient)를 분석한 결과 Table VII과 같았다. SSM 분석결과 HMO와는 74.35%로 *S. aburabiensis*와는 74.35%로,

*S. herbaricolor*와는 82.05%로 나타났다.

분리주는 부군집 2의 3 member 중 123HB(*Streptomyces herbaricolor* ISP 5123)와 가장 가까운 것으로 나타났다. 부군집을 동정하는데 필요한 39 단위형질 중 32개 형질이 동일한 결과를 보였으며 raffinose와 rhamnose 이용성, penicilin G에 대한 저항성, 45°C에서의 성장, 포자의 색깔(회색)등에서 다르게 나타났다. 여기에서 대부분 낮은 양성값(positive value)를 보이는 형질에서 차이를 나타냈다는 것을 알 수 있다.

이상의 수리동정에서 SMF30 균주가 가장 유사한 것으로 여겨지는 것은 *Streptomyces herbaricolor*이었으나, 부군집 2에 속하는 최외각 균주(OMS) 보다도 taxon 거리가 크고 부군집에 속할 확률(% of probability of strain further away)이 최외각 균주보다도 매우 낮아서 이 분리 동정균은 부군집 2에 속하는 신종으로 판단되었다. 그러나, 최근 *streptomyces*의 분류는 신종으로 명명하기보다는 통합하는 추세이고 부군집 2의 모든 균주는 중심균주인 *Streptomyces aburabiensis*와 같은 것으로 보고되고 있으므로 분리주 SMF30은 *Streptomyces aburabiensis*의 한 strain(SMF-30)인 것으로 동정, 명명되었다.

결 론

전국각지에서 수집된 토양시료를 여러가지 방법으로 전처리하고 방선균 분리용 배지를 사용하여 얻어진 약 700여종의 방선균으로부터 여러가지 병리작용에 관여한다고 알려진 Cathepsin B에 대한 저분자량의 저해물질을 생산하는 균주를 검색한 결과, 생산하는 저해물질의 Cathepsin B에 대한 특이성, 역가, 열에 대한 안정성등이 우수한 균주 SMF30을 선별하여 화학적 수리동정을 행하였다. 총 50개의 주군집, 34가지의 부군집형질을 조사한 결과를 TAXON 프로그램을 이용하여 분석한 결과 분리균 SMF30은 *Streptomyces aburabiensis*로 동정되었다.

감사의 말씀

본 연구는 과학기술처에서 선정한 '94 선도기술개발사업과제 연구비에 의해서 수행되었다. 본 연구에 많은 도움을 준 서울대학교 분자미생물학 연구센터에 감사드린다.

문 헌

- 1) Barrett, A. J.: Cathepsin B and other thiol proteinases, p.181-208. In A. J. Barrett (ed.), Proteinases in Mammalian Cells and Tissues. North-Holland Biomedical Press. (1977).
- 2) Barrett, A. J. and Kirschke, H.: Cathepsin B, cathepsin H, and cathepsin L, In Methods in Enzymology **80**, Academic Press Inc. 535-561 (1981).
- 3) Stracher, A., E. B. McGowan, and Shafiq, S. A.: Muscular dystrophy, Inhibition of degeneration in vivo with protease inhibitors. *Science* **200**, 50-51 (1978).
- 4) Tappel, A.L., H. Zalkin, K.A. Caldwell, I.D. Desai, and Shibko, S.: Increased lysosomal enzymes in genetic muscular dystrophy. *Arch. Biochem. Biophys.* **96**, 340-346 (1962).
- 5) ominami, E., T. Tsukahara, Y. Bando, and Katunuma, N.: Distribution of cathepsin B and H in rat tissues and peripheral blood cells. *J. Biochem.* **98**, 87-93 (1985).
- 6) Jochum, M., K. H. Dunsward, S. Neumann, J. Witte, H. Fritz and Seemuller, U.: Proteinase and their inhibitors in inflammation. p. 85-95. In proteinase inhibitors, Medical and biological aspect. Katunuma, N., Umezawa, H., and H. Holzer (ed), Jap.Sci.Soc. Press, Tokyo. (1983).
- 7) Shirling, E. B. and Gottlieb, D.: Methods for the characterization of *Streptomyces* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **16** (3), 313-340 (1966).
- 8) Hopwood, D. A., M. J. Bibb, K. F. Chater, T. Kiesser, C. J. Bruton, H. M. Kiesser, D. J. Lydiate, C. P. Smith, J. M. Ward and Schrempf, H.: *Genetic manipulation of Streptomyces, A laboratory Manual*. The John Innes Foundation, Norwich, UK. (1985).
- 9) Yadama, K. and Kamagatam, K.: Taxonomical studies on Coryneform Bacteria. II. Principal amino acids in the cell wall and their taxonomic significance. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **16**, 103-113 (1970).
- 10) Chaplin, M. F. and Kennedy, J. F.: TLC analysis of Carbohydrates. In *Carbohydrate*

- Analysis*. p12. Oirl Press. Oxford (1986).
- 11) Williams, S. T., M. Goodfellow, E. M. H. Wellington, J. C. Vickers, G. Alderson, P. H. A. Sneath, M. Sackin and Mortimer, A. M.: A probability matrix for the identification of some streptomycetes. *J. Gen. Microbiol.* **129**, 1815-1830 (1983).
 - 12) Williams, S. T., M. Goodfellow, E. M. H. Wellington, J. C. Vickers, G. Alderson, P. H. A. Sneath, M. Sackin and Mortimer, A. M.: Numerical classification of streptomycetes and related genera. *J. Gen. Microbiol.* **129**, 1743-1813 (1983)
 - 13) Barrett, A. J.: A new assay for cathepsin B1 and other thiol proteinases. *Anal. Biochem.* **47**, 280-293 (1972).
 - 14) Lechevalier, M. P. and Lechevalier, H. A.: Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **20**, 435-443 (1970).
 - 15) Willcox, W. B., S. P. Lapage, S. Bascomb, and Curtis, M. A.: Identification of Bacteria by computer. Theory and programming. *J. Gen. Microbiol.* **77**, 317-330 (1973).