

## *Streptomyces aburabiensis* SMF300이 생산하는 Cathepsin B 저해물질의 발효생산 및 특성분석

최영출 · 김인섭 · 박상진 · 윤성준\* · 이계준<sup>†</sup>

서울대학교 미생물학과, \*동화약품 중앙연구소

(Received April 28, 1995)

### Production and Physico-chemical Properties of Cathepsin B Inhibitor from *Streptomyces aburabiensis* SMF30

Young Chool Choe, In Seop Kim, Sang Jin Park, Sung Joon Yoon\*  
and Kye Joon Lee<sup>†</sup>

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 produce low molecular weight cathepsin B inhibitor. A strain of *Streptomyces aburabiensis* isolated from soil in Korea was selected and the optimum condition for the production of the inhibitor was evaluated. Glucose and soytone were selected as best carbon and nitrogen sources, respectively. From the kinetic analysis in batch fermentation, it was found that the specific cathepsin B inhibitor production rate ( $q_p$ ) was linearly related to specific growth rate ( $\mu$ ). The inhibitor in culture filtrate was purified by adsorption on activated charcoal, butanol extraction, silica gel chromatography, ion exchange chromatography using Dowex-1 (Cl form) and Amberlite IRC-50 (H<sup>+</sup> form), and preparative TLC. From the UV, IR, Mass spectroscopy and <sup>1</sup>H-NMR, the inhibitor was thought to be a new inhibitor of which molecular weight was 199.

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

미생물은 다양한 생리대사양상을 보이며 미생물 세포의 성장과 생명유지에 직접적인 연관을 갖는 대사에서 생산되는 1차 대사산물과 생명유치와는 무관하게 생산되는 2차 대사산물을 생산하는데, 유용한 생리활성을 갖는 2차 대사산물은 산업적으로 가치있는 신물질로서 이용되고 있다. 대표적인 경우로 항생물질, 항암물질, 생리조절 물질, 면역조절물질, Biopolymer, 식품첨가물, 식품자원등을 들 수 있으며 최근에는 reverse transcriptase inhibitor, aspartic protease inhibitor, protein kinase C inhibitor 등의 효소저해물질들이 항바이러스, 항AIDS 치료용 의약품으로서 연구개발되고 있으며 면역조절 물질로서 alkaline protease inhibitor, aminopeptidase inhibitor가, 당뇨병 등의

의약품으로 glycosidase inhibitor 등을 포함한 많은 효소저해물질들이 연구되고 있다. 방선균에서는 serine/cysteine protease inhibitor인 leupeptin,<sup>1)</sup> antipain,<sup>2)</sup> chymostatin,<sup>3)</sup> elastatin,<sup>4)</sup>  $\beta$ -MAPI<sup>5)</sup> 등과 pepstatin<sup>6)</sup> 등과 같은 aspartic protease inhibitor 저해물질, histargin<sup>7)</sup>과 같은 carboxypeptidase 저해물질들이 발견되었다.

Cathepsin(Cathepsin B1; EC 3.4.22.1)은 동물의 비장, 혼선, 간, 폐, 척수, 근육 등의 세포내 lysosome에 존재하는 호산성한 cysteine protease이다.<sup>8,9)</sup> 소의 비장으로부터 처음 발견된 이후 합성기질에 대한 기작과 존재 위치에 따라 여러 종류(cathepsin A, B, C, D, E, and H)가 발견되었다. Cathepsin B는 benzoly-L-arginineamide를 분해하며,<sup>10)</sup> cysteine,  $\beta$ -mercaptoethanol, glutathione 등의 활성제를 필

<sup>†</sup>본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

요로 한다. 일반적으로 비장에 가장 많이 존재하며, 혼선, kidney, 간, 폐 등에서도 발견되는 cathepsin B는 여러가지 병발작용에 관련되어 있다고 여겨지고 있어 근육실조, 암전이, 심근손상, 염증, 골다공증,<sup>13)</sup> 그리고 다른 여러 clinical disorders 등에 관련된 연구가 활발히 진행되고 있다. 또, 염증이 발생했을 경우 호중구(neutrophil) 이나 거식세포(macrophage), 비만세포(mastcell) 등이 활성화되게 되고 이때 lysosomal enzyme들이 과잉 분비되어 염증이 확산되게 되는데 저해물질이 이에 작용, 염증의 확산을 하는 것이 보고되었다.<sup>14)</sup>

본 연구에서는 병리조절물질로서의 이용가능성이 큰 cathepsin B의 저해물질 생산방선균의 성장과 저해물질의 생산에 가장 유리한 여러 조건과 환경요인을 규명하였고 이 균주에서 생산되는 저해물질을 분리정제하여, 그 이화학적 특성을 조사하였다.

### 실험방법

**사용균주 및 사용 배지** - 전보에서 보고한대로 토양에서 분리하고 동정한 *Streptomyces aburabiensis* SMF 30을 사용하였다. 본 사용균은 한천 배지에 접종하고 계대배양하여 4°C에 보관하였다. 종균 배양 및 본 배양 배지는 glucose 20.0 g, soytone 20.0 g, yeast extract 3.0 g, CaCO<sub>3</sub> 1.0 g을 증류수에 녹여 1 l가 되도록 만들어 사용하였다. 본배양은 glucose 20.0 g, Soytone 10.0 g, yeast extract 3.0 g, NaCl 0.3 g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.02 g, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.02 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5 g을 증류수에 녹여 1 l가 되도록 만들어 사용하였다.

**일반분석** - 건조 균체량 측정은 배양액 10 ml를 취하여 미리 무게를 측정한 여과지(Whatman GF/C)로 감압여과하고 증류수로 세척한 후 80°C 건조기에서 24시간 동안 건조하여 측정하였다. Glucose농도는 dinitrosalicylic acid(DNS)방법에 의하여 측정하였다.<sup>15)</sup> Ammonium ion의 농도는 specific ion analyzer(Model EA 940, Orion Research, U.S.A)를 이용하여 측정하였다.

**저해활성 측정** - Cathepsin B 저해활성은 Barret의 방법을 변형하여 사용하였다.<sup>16)</sup> 합성기질인 N- $\alpha$ -Benzoyl-DL-Arginine- $\beta$ -Naphthylamide(BANA) HCl(Sigma)이 cathepsin B1(from bovine spleen, Sigma)에 의해 절단되어 발생하는 p-naphthylamine

과 가해 준 Fast Garnet GBC salt의 coupling에 의해 발색이 일어나며, 540 nm에서의 흡광도를 측정함으로써 이를 감지하였다. 저해역가(inhibitory activity)는 다음과 같이 계산하였다.

$$\% \text{ Inhibitory activity} = \frac{A-B}{A} \times 100$$

A: Enzyme activity without inhibitor

B: Enzyme activity with inhibitor

저해물질의 역가는 1 $\mu$ M의 product( $\alpha$ -naphthyl amine)을 생산하는 cathepsin B1의 활성을 50% 저해하는 저해물질의 양을 1 unit로 하였다.

**회분배양에서의 저해물질 생산** - Flask배양의 경우, 500 ml baffled flask를 이용하여 200 rpm, 30°C에서 교반배양기를 이용하였다. Fermentor를 사용한 대량 배양은 3.0 l 발효조(Korea Fermentor Co. Ltd)를 사용하여 30°C에서 300 rpm으로 배양하였으며 회분발효에서의 비성장 속도(specific growth rate,  $\mu$ ), 성장 수율(growth yield, Y<sub>x/s</sub>), 생성 수율(product yield, Y<sub>p/s</sub>), 비기질 소모속도(specific substrate uptake rate, q<sub>s</sub>), 비대사산물 생산속도(specific product production rate, q<sub>s</sub>) 등을 분석하였다.

### Cathepsin B 저해물질의 정제

**활성탄 흡착** - 원심분리하여 얻어진 배양액을 100°C에서 10분간 열처리 하였다. 열처리하여 얻어진 배양액을 pH 10-11로 조절한 후, 그 상등액을 활성탄 (2.5% (w/v))과 잘 혼합하여준 다음 여과 깔대기를 이용, 감압하여 동일 부피의 증류수로 세척한 후, 0.01 N HCl이 첨가된 80% methanol을 사용하여 용출하였다. 활성이 높은 분획은 모아서 감압 농축하였다.

**부탄올 추출** - 활성탄 흡착과정을 통해 농축된 활성 분획을 동일 부피의 n-butanol을 이용하여 3차례 추출하였다.

**Silica gel Chromatography** - 농축된 butanol추출액을 butanol-methanol-D.W. (4:1:1)으로 미리 평형시킨 Silica gel 컬럼(2.8×30 cm)에 흡착시킨 후 동일 용매로 용출하였으며, 60 ml/hr의 용출 속도로 6 ml씩 분획하였다. 활성이 높은 분획을 모아 감압농축하였다.

**Dowex-1(Cl) Chromatography** - Silica gel 컬럼에서 얻어진 활성농축액을 삼차 증류수로 평형시킨 Dowex-1 컬럼(2.7×25 cm)에 흡착시킨 후 증류수로

충분히 세척하고 0-1 N NaCl gradient를 형성시켜 용출하였다. 용출속도는 30 ml/hr로 하였으며 6 ml씩 분획하였다. 활성이 높은 분획은 모아 감압농축하였다.

**Amberlite IRC-50(H<sup>+</sup>) Chromatography** - 농축된 활성용액은 우선 butanol추출을 수행하여 남아있는 염을 제거하고, 다시 농축하여 증류수로 평형시킨 Amberlite IRC-50(H<sup>+</sup> form)에 흡착시켰다. 먼저 증류수와 80% methanol을 이용하여 용출하였다. 용출속도는 25 ml/hr 하여 5 ml씩 분획하였다.

**Preparative TLC** - Amberlikte IRC-50(H<sup>+</sup>)를 거쳐 농축된 활성용액을 silica gel이 피막된 plate (Kieselgel 60 F254)에 점점한 다음 Butanol-methanol-D.W. (4:1:2)로 전개하여 잘 말리고 활성이 확인된 Rf 0.45부근의 silica plate를 일정 간격으로 spatular로 잘 끊어내어 butanol로 추출하였다. 활성 구간은 모아서 동결건조 하였다.

### Cathepsin B 저해 물질의 특성 분석

**정색 반응(color reaction)** - 순수분리된 저해물질의 작용기(functional group)를 조사하기 위하여 다양한 발색반응을 실시하였다. amine group, carbonyl group, hydroxyl group, sugar, 그리고 ketone등의 작용기를 조사하기 위하여 각각 ninhydrin 반응, di-nitrophenylhydrazine 반응, Vaniline 반응, Anthrone 반응 등을 실시하였다.

**Ultraviolet spectroscopic analysis** - 50 µg의 분리된 저해물질을 증류수에 녹인 후, UV-visible spectro-photometer(Pu3700 series UV/VIS scanning system, Philips)를 이용하여 자외선 흡수 스펙트럼을 얻어내었다.

**Infrared spectroscopic analysis** - IR spectro-photometer(Model IFS66, Bruker)를 이용하여 저해물질의 적외선 흡수 스펙트럼을 측정하였다. 200 µg의 저해물질과 5g의 KBr을 혼합하여 pel/et marker를 통해 pellet을 형성시킨 후, 4,000~400 cm<sup>-1</sup>의 적외선 범위에서 스펙트럼을 조사하였다.

**Mass spectroscopic analysis** - 분리된 저해물질의 분자량을 조사하고 구조분석의 기본 자료로 사용하기 위하여 negative thermospray LC-Mass(VG LAB-BASE, the Quattro GC-MS Data system)를 실시하였다. 사용한 column은 ODS-C18(Novapak. 0.5×30 cm)이었으며, 100 mM ammonium acetate가 첨

가된 30% methanol을 이동상으로 하여 저해물질을 전개하였다.

## 결과 및 고찰

**저해물질의 발효배지 조성** - 질소원의 종류에 따른 저해물질의 생산양상을 조사한 결과, 첨가된 질소원 중 soytone이 균체 성장과 저해물질 생산에서 가장 좋았으며 casitone, peptone과 casamino acid 등도 비교적 높게 나타났다. 생산수율(Y<sub>p,x</sub> (U g<sup>-1</sup>))에서 가장 높은 값을 나타낸 soytone을 저해물질 생산에 가장 좋은 질소원으로 결정하였다(Table I).

Soytone을 질소원으로 하여 다양한 탄소원의 균체 성장 및 저해물질 생산에 대한 영향을 분석한 결과, glucose를 첨가한 경우가 다른 탄소원에 비하여 성장과 저해물질 생산에서 모두 우수하였다. Glucose농도에 따른 균체 성장 및 저해물질 생산의 영향을 분석한 결과 균체량은 glucose 3%까지 계속 증가하다가 그 이후로는 감소하였고, 저해물질의 생산은 2-3%정도까지는 증가하였으나 높은 glucose농도에서는 급격히 감소하였다. 배양 최종 pH는 glucose농도가 증가함에 따라 생성된 유기산 등의 산성 대사산물이 축적되므로 낮게 나타났다. 따라서, Growth와 yield에서 가장 좋은 glucose 2.5%를 최적한 조건으로 선택하였다(자료미제출).

Soytone과 glucose(1%, w/v)를 각각 질소원과 탄소원으로 하고 초기 phosphate의 농도를 달리하여 배양한 후 균체 성장과 저해물질 생산의 영향을 알아 보았다. 균체의 성장은 phosphate농도가 25 mM이 될 때까지 증가하다가 그 이후로는 어느 정도 일정하게 유지되었고, 저해물질의 생산은 phosphate의 농도가 12.5

**Table I** - Effects of nitrogen sources on the inhibitor production

N sources	Final pH	D.C.W (g/l)	Inhibitor (×10 <sup>3</sup> U/l)	Yield (Y <sub>p,x</sub> )
None	6.77	1.23	165	134
Skim milk	6.37	ND	159	ND
Na-caseinate	6.08	3.56	572	160
Casitone	6.86	4.05	882	217
Casamino acid	6.26	2.68	673	251
Soytone	6.54	3.63	1055	290
Peptone	7.06	3.05	690	226

\*ND: Not Determined.

**Table II** — Comparison of kinetic parameters in batch cultures at various pH

Kinetic parameter	pH				
	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0
Maximum specific growth rate, $\mu$ ( $\text{h}^{-1}$ )	0.130	1.145	0.235	0.120	0.125
Specific glucose uptake rate, $q_{glc}$ ( $\text{g g}^{-1}\text{h}^{-1}$ )	0.135	0.170	0.243	0.217	0.224
Specific inhibitor production, $q_{inh}$ ( $\times 10^4 \text{U g}^{-1}\text{h}^{-1}$ )	32	51	49	49	31

The culture was carried out using protease inhibitor production medium containing 1% soytone, 1% glucose (w/v) and 12.5 mM phosphate. The pH was controlled using a two-way pH controller by addition of 1 N HCl and NaOH.

**Table III** — Comparison of kinetic parameters in batch cultures at various temperatures

Kinetic parameter	Temperature ( $^{\circ}\text{C}$ )		
	25	30	35
Maximum specific growth rate, $\mu$ ( $\text{h}^{-1}$ )	0.175	0.234	0.207
Specific inhibitor production, $q_{inh}$	27	51	39

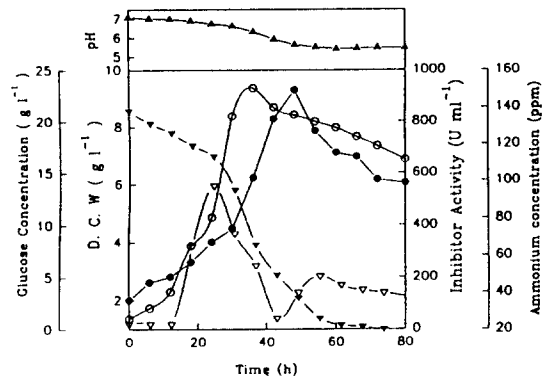
The culture was carried out using protease inhibitor production medium containing 1% soytone, 1% glucose (w/v) and 12.5 mM phosphate at 30 $^{\circ}\text{C}$ .

mM이었을 때 최대를 나타내었으며 그 이후로는 감소하였다(자료미제출).

**저해물질발효에 대한 pH와 온도의 영향** - 3.0 l fermentor(Korea Fermentor Co.)를 이용하여 pH(6.0~8.0) 및 온도가 균체성장 및 저해물질생산에 미치는 영향을 조사하였다. pH변화에 따른 최대비성장속도는 pH 7에서 최대였으며(0.235  $\text{h}^{-1}$ ), glucose의 소모속도는 pH 7.5에서는 최대였고 저해물질의 생산은 pH 6.5-7.0에서 가장 높았다(Table II).

배양 온도가 균체의 성장, 저해물질 생산에 미치는 영향을 조사한 결과 균체의 비성장속도와 glucose소모속도는 온도가 증가함에 따라 증가하였다. 저해물질의 생산은 균체 성장과 유사한 형태를 보이며, 낮은 온도에서는 느리게 만들어지고 높은 온도에서는 빨리 최대치에 도달한 곧 바로 분해되었다. 따라서 저해물질 생산의 최적 온도는 30 $^{\circ}\text{C}$ 로 판단되었다(Table III).

**Cathepsin B 저해물질 생산의 발효 동력학적 분석** - 최적화된 조건에서 5 l jar fermentor를 이용하여 시간에 따른 균체 성장, glucose농도변화, 저해물질의 생산,



**Fig. 1** — Batch culture data for the production of cathepsin B inhibitor by *Streptomyces aburabiensis* SMF30. The Culture was carried out using the medium containing glucose 2%, and soytone 1%. Changes in the biomass (●), cath-epsin B inhibitor (○), glucose (▼) and ammonium ion (▽) and pH (▲) were measured.

pH등을 분석한 결과는 Fig. 1과 같다. 대수증식기 동안 glucose농도는 급속히 감소하였으며 저해물질의 농도는 균체성장을 따라 급격히 증가하였다. 정체기에 이르면 저해물질의 역가는 다시 감소하였으므로 저해물질의 생산은 균체의 성장과 매우 연관된 것임을 알 수 있었다.

**저해물질의 분리 정제** - 배양액을 원심분리(6,000 rpm, 15 min)하여 상등액을 얻은 다음 100 $^{\circ}\text{C}$ 에서 10분간 열처리 하였다. 열처리한 배양액을 2N NaOH를 이용하여 pH를 10으로 보정하였다. 활성탄(2.5%, w/v)을 첨가하여 잘 저어주고 정치한 후 여과 깔대기(filtering funnel)를 통해 수거하였다. 활성탄을 증

류수로 수차례 수세한 후 80% methanol로 cathepsin B 저해물질을 용출하였다. 활성탄 흡착 과정을

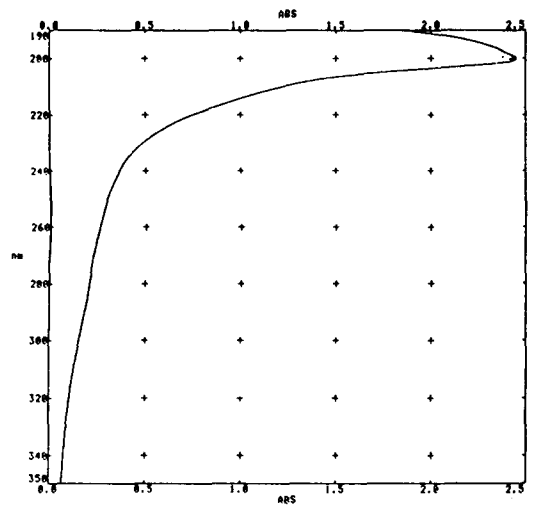
**Table IV**— Purification procedures of cathepsin B inhibitor produced by *S. aburabiensis* SMF30

Procedure	Volume (ml)	Activity ( $\times 10^3$ U)	Yield (%)
Culture Broth	7000	13,500	100.0
Activated charcoal	900	1,296	9.6
Silica gel	200	972	7.2
Butanol extraction	200	970	7.2
Dowex-1 (Cl <sup>-</sup> )	150	715	5.3
Butanol extraction	100	688	5.1
Amberlite IRC-50 (H <sup>+</sup> )	50	328	2.4

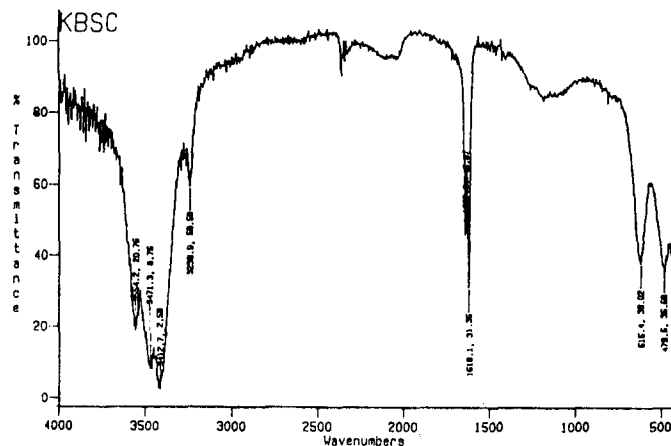
**Table V**— Physico-chemical properties of purified cathepsin B inhibitor

Appearance	White powder
Solubility	
Soluble	water, DMSO, acetic acid, methanol, ethanol, butanol
Insoluble	ethylacetate, chloroform, hexane
UV absorption	End Absorption
Molecular mass	199
Rf Value	
(Butanol-Methanol-D.W. = 4:1:2)	0.45
Color reaction	
Ninhydrin	positive
Dinitrophenylhydrazine	negative
Vanilline	negative
Anthrone	negative

을 통해 감압 농축된 저해물질은 butanol을 이용하여 추출한 다음 butanol-methanol-D.W.(4:1:1)로 평형을 이룬 silica gel 60 column에 흡착시키고 동일한 용매로 활성물질을 용출하였다. Silica gel chromatography를 통해 얻어진 저해물질을 Dowex-1(Cl<sup>-</sup> form) column에 흡착시키고 증류수로 수세한 후 NaCl 농도구배(0-1M)로 저해물질을 용출하여 농축하



**Fig. 2**— Ultraviolet absorbance spectrum of the purified inhibitor in H<sub>2</sub>O. The purified inhibitor was dissolved in H<sub>2</sub>O and ultraviolet spectrum was analyzed by using an UV-visible spectrophotometer.



**Fig. 3**— Infrared absorbance spectrum of the purified inhibitor. The IR spectrum of the purified inhibitor was measured by using an IR spectrophotometer.

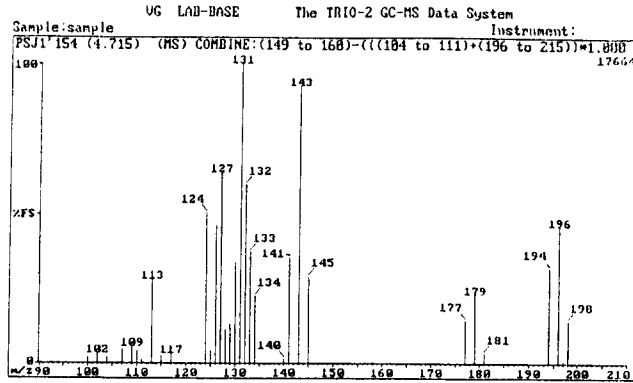


Fig. 4 — LC - Mass fragmentation pattern of the purified inhibitor.

LC - Mass analysis was carried out using reverse phase C18 column (Nova-pak, 0.5×25 cm), and eluted with 30% methanol containing 100 mM ammonium acetate. Flow rate was 0.5 ml/min.

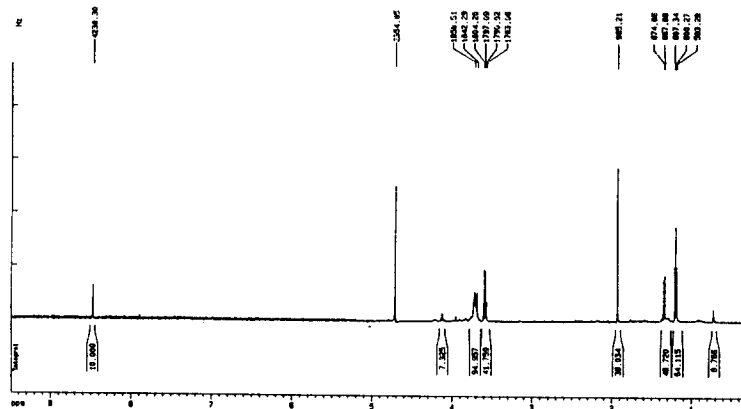


Fig. 5 — <sup>1</sup>H-NMR spectrum of the purified inhibitor.

고 염을 제거하기 위해 butanol추출을 실시하였다. 추출된 활성액을 농축하여 Amberlite IRC-50 resin이 충전된 column에 흡착시키고 증류수와 80% methanol로 수세한 다음 0.04 N HCl이 첨가된 80% methanol로 용출시켰다. 여기에서 얻어진 활성분획을 농축하여 분취용 TLC를 실시하였다. 저해물질을 plate에 점정한 후 butanol-methanol-D.W.(4:1:2) 용매로 전개시킨 다음 UV하에서 위치(Rf=0.45)를 확인하여 spatula로 긁어 회수하고 butanol로 용출하였다. 위의 과정에서 얻어진 활성액을 농축하고 물에 용해시킨 후 동결건조하였다. 배양액으로부터 얻어진 저해물질의 분리 정제 과정이 Table IV에 나타나 있다. 분리정제 결과 yield는 2.43%였다.

**저해물질의 이화학적 특성 분석** - 분리된 저해물질의 이화학적인 특성을 Table V에 나타내었다. 분리된 저해물질은 동결건조 후 흰 색의 분말로 얻어졌고, 물, acetic acid, methanol, butanol, DMSO등에는 잘 녹았으며 acetonitrile, acetone, chloroform, hexane등에는 잘 녹지 않았다. UV 흡광도는 약 200 nm 부근에서 보였으며, 분자이온 peak(M-H<sup>+</sup>)은 198에 나타났다. 발색 반응에서는 ninhydrin반응에서만 양성으로 나타났고, dinitrophenylhydrazine반응, vanilline반응, anthrone반응등에서는 반응이 나타나지 않았다.

UV 흡광도가 200 nm 부근에서 나타났으므로 특징적인 aromatic ring이나 alcohol등의 작용기는 없는

것으로 판단되었다(Fig. 2). IR spectrum에서는 peptide bond의 특징적인 1660과 1550  $\text{cm}^{-1}$  부근의 peak가 나타나지 않았으며 3,400~3,550  $\text{cm}^{-1}$  부근의 C-H stretching peak이 관찰되었다. 1,518  $\text{cm}^{-1}$ 의 peak은 C=C 혹은 C-N으로 생각되어지며 C=O의 강한 peak(1,550~1,600  $\text{cm}^{-1}$ )은 나타나지 않았다(Fig. 3).

Mass spectrum을 통해 저해물질의 분자량이 199임을 알 수 있었다(Fig. 4). 저해물질을  $\text{D}_2\text{O}$ 에 녹인  $^1\text{H}$ -NMR spectrum에서는 아주 간단한 peak모양이 나타났다(Fig. 5).  $\text{CH}_3$ 와  $\text{CH}_2$ 의 aliphatic proton들이 0.7~1.4 ppm 부근에서 보였으며, 다른 특징적인 peak은 나타나지 않았다.

이와 같은 결과로부터 분리정제된 저해물질은 분자량이 199인 저분자의 물질로 아미노산이 포함되어 있지 않은 것으로 판단되며 이와 같은 구조는 기존의 알려진 여러 단백질 분해효소 저해물질과는 상이한 구조로 생각되어진다.

## 결 론

전국각지에서 수집된 토양시료에서 선별된 *Streptomyces aburabiensis*가 생산하는 cathepsin B저해물질의 최적 발효조건을 조사하여 본 결과 glucose와 soytone을 가장 좋은 탄소원과 질소원으로 결정하였고 저해물질의 생산이 균체의 생산과 함께 일어나므로 균체성장과 산물생성에의 영향을 고려하여 최적 phosphate, glucose농도를 각각 12.5 mM, 2.5%로 결정하였으며 온도와 pH의 최적조건은 30°C, 6.5~7이었다. 이렇게 결정된 최적조건에서 생산된 저해물질을 열처리, 활성탄 흡착, butanol추출, silica gel chromatography, Dowex-1, Amberlite IRC-50 ion exchange chromatography, 분취용 TLC를 통하여 분리정제하고 자외선 흡광법, 적외선 흡광법, 질량분석, 핵자기공명법등을 이용하여 그 구조를 알아보려고 하였다. 그 결과 아미노산이 포함되어 있지않고 분자량이 199이며 기존의 저해물질들과는 다른 구조를 가진 물질임을 추정할 수 있었다.

## 감사의 말씀

본 연구는 과학기술처에서 선정한 '94 선도기술개발

사업과제 연구비에 의해서 수행되었다. 본 연구에 많은 도움을 준 서울대학교 분자미생물학 연구센터에 감사드린다.

## 문 헌

- 1) Aoyagi, T., S. Miyata, M. Nanbo, F. Kojima, M. Matsuzaki, M. Ishizuka, T. takeuchi, and Umezawa, H.: Biological cativities of leupeptins. *J. Antibiot.* **22**, 558-568 (1969).
- 2) Suda, H., T. Aoyagi, M. Hamada, T. Tekeuchi, and Umezawa, H.: Antipain, a new protease inhibitor isolated from actinomycetes. *J. anti-biot.* **25**, 263-266 (1972).
- 3) Umezawa, H., T. Aoyagi, H. Morishima, S. Kunitomo, M. Matsuzaki, M. Hamada, and Tekeuchi, T.: Chymostatin, a new chymotrypsin inhibitor produced by actinomycetes. *J. Antibiot.* **23**, 425-427 (1970).
- 4) Umezawa, H., T. Aoyagi, A. Okura, H. Morishima, T. Takeuchi, and Okami, Y.: Elastatinal, a new elastase inhibitor produced by actinomycetes. *J. Antibiot.* **26**, 787-789 (1973).
- 5) Shin-watanabe, T., K. Fukuhara, and Murao, S.: The structure of  $\beta$ -MAPI, an novel proteinase inhibitor. *Tetrahedron.* **38**, 1775-1780 (1982).
- 6) Umezawa, H., T. Aoyagi, H. Morishima, M. Matsuzaki, M. Hamada, and tekeuchi, t.: aoyagi, H. Morishima, M. Matsuzaki, M. Hamada, and Tekeuchi, t.: Pepstatin, a new pepsin inhibitor produced by actinomycetes. *J. Antibiot.* **23**, 259-262 (1970).
- 7) Umezawa, .. T. Aoyagi, K. Ogawa, H. Inuma, H. Naganaa, M. Hamada, and Takeuchi, H.: Histargin, a new carboxypeptidase B, produced by actinomycetes. *J. Antibiot.* **37**, 1088-1090 (1984).
- 8) Barrett, A. J.: Cathepsin Band other thiol proteinases, p.181-208. In A. J. Barrett (ed.), *Proteinases in Mammalian Cells and Tissues*. North-Holland Biomedical press (1977).
- 9) Barrett, A. J. and Kirschke, H.: Cathepsin B,

- cathepsin H, and cathepsin L, p.535-561. In *Methods in Enzymology* **80**, Academic Press Inc. (1981).
- 10) Barrett, A. J.: Introduction to the history and classification of tissue proteinases, pp. 1-19. In A. J. Barrett (ed.), *Proteinases in mammalian cells and tissues*. North-Holland Biomedical Press (1977).
- 11) Stracher, A., E. B. McGowan, and Shafiq, S. A.: Muscular dystrophy, Inhibition of degeneration in vivo with protease inhibitors. *Science* **200**, 50-51 (1978).
- 12) Tappel, A. L., H. Zalikin, K. A. Caldwell, I. D. Desai, and Shibko, S.: Increased lysosomal enzymes in genetic muscular dystrophy. *Arch. Biochem. Biophys.* **96**, 340-346 (1962).
- 13) Kominami, 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).
- 14) Jochum, M., K. H. Dunsward, S. Neumann, J. Witte, H. Fritz and seemuller, E.LO Proteinase and their inhibitors in inflammation. In Katunuma, N., Umezawa, H., and H. Holzer (ed.), *proteinase inhibitors, Medical and biological aspect*. Jap. Sci. Soc. Press, Tokyo, pp. 85-95 (1983).
- 15) Miller, G. L.: Use of dinitrodalicyclic acid reagent for determination of reducing suger. *Anal. chem.* **31**, 426-428 (1959).
- 16) Barrett, A. J.: a new assay for cathepsin B1 and other thiol proteinases: *Anal. Biochem.* **47**, 280-293 (1972).