

Streptomyces chromofuscus SMF28을 이용한 Cathepsin B 저해물질의 발효생산 및 특성분석

이현숙 · 김인섭 · 윤성준¹ · 이계준*

서울 특별시 관악구 서울대학교 미생물학과, ¹경기도 안양시 동화약품 중앙연구소

Production and Characterization of Cathepsin B Inhibitor from *Streptomyces chromofuscus* SMF28

Hyoun Suk Lee, In Seop Kim, Sung Joon Yoon¹ and Kye Joon Lee*

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

¹Central Research Center, Dong Wha Pharmaceutical Co. Ltd

Abstract — The aim of the present research program was to construct an optimum fermentation system and to characterize the properties of cathepsin B inhibitor from *Streptomyces chromofuscus* SMF28. Glucose and casitone were proved to be good carbon source and nitrogen source, respectively. The production of inhibitor was high at lower concentration than 10 mM of inorganic phosphate. The optimum temperature and pH for the production of inhibitor were 30°C and pH 7, respectively. The production of inhibitor was related to mycelial growth and was affected by medium composition. The inhibitor in culture filtrate of *S. chromofuscus* SMF28 was purified by butanol extraction, silica gel chromatography, Amberlite IRC-50 (H⁺ form) chromatography, preparative TLC, and preparative HPLC. From amino acid analysis and UV, IR, ¹H-NMR spectroscopic analysis, the inhibitor was identified as a peptide containing valine and phenylalanine derivative.

Cysteine proteases 중에서 cathepsin은 다양한 동물 조직의 추출물에서 발견되는 acidic proteinase로서 세포내 lysosome에 주로 존재하는 것으로 알려져 있다(1, 2). Cathepsin들은 단백질이나 구조가 밝혀진 합성 peptide 기질에 대한 작용에 따라 분류된다. Beef spleen으로부터 cathepsin A, B, C가 발견된 이후, 현재까지 20여종의 cathepsin이 발견되었고 생체내 역할에 대하여 연구가 진행되었다.

Cathepsin B는 동물의 조직, 특히 spleen, thymus, lung, liver, kidney, adrenal의 lysosome내에서 높은 역가를 보이며, benzoyl-L-arginine-amide를 분해하는 역가와 transferase 역가를 갖고 있다(3). Cathepsin B는 β -mercaptoethylamine, cysteine, 2,3-dimercaptopropanol, β -mercaptoethanol, glutathione 등의 sulfhydryl compounds를 activators로 반드시 필요하다. Cathepsin B는 muscular dystrophy(4, 5), tumor metastasis, myocardial tissue damage, inflammation, bone resorption(6) 등의 병리적 현상과 연

관된 것으로 보고되었다. Cathepsin B의 병리적 기능이 밝혀지면서 이에 대한 저해물질을 탐색하려는 연구에 의해 peptidyl aldehyde leupeptin(7), chloromethyl ketones(8), diazomethyl ketones(9), peptidyl epoxides(10), peptidyl O-acyl hydroxamates(11) 등이 개발되어 보고되었다.

본 연구자들은 여러 가지 병리적 현상과 관련된 것으로 알려져 있는 동물 세포내 주요 lysosomal protease인 cathepsin B의 저해물질을 생산하는 균주인 *Streptomyces chromofuscus* SMF28을 분리 동정하였다(12). 본 연구에서는 *S. chromofuscus* SMF28을 이용하여 cathepsin B 저해물질의 생산을 위한 배지 조성 및 배양조건 등 발효 최적조건을 확립하였고, 최적화된 조건에서 cathepsin B의 저해물질을 대량 생산한 후 분리 정제하여 그 부분적 특성을 규명하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 사용배지

전보에서 보고한 대로 토양에서 분리 동정한 *Strep-*

Key words: Cathepsin B inhibitor, fermentation, *S. chromofuscus* SMF28

*Corresponding author

trichomyces chromofuscus SMF28을 사용하였다(12). 분리한 방선균의 보존용 배지는 Bennett's 배지를 사용하였다. 대량배양을 위한 종균의 배양은 3% glucose, 1.7% soytone, 0.3% peptone, 0.1% yeast extract, 0.1% CaCO₃로 구성된 배지를 사용하였다. 본 배양은 0.05% KH₂PO₄, 0.17% K₂HPO₄, 0.03% NaCl, 0.001% ZnCl₂, 0.0003% MnCl₂·4H₂O, 0.001% CaCl₂·2H₂O, 0.03% MgSO₄·7H₂O, 0.001% FeSO₄·7H₂O, 0.001% CuSO₄·7H₂O을 기본 배지로 하여 flask 배양을 통해서 탄소원, 질소원을 선택 최적농도를 결정하였다. 탄소원과 질소원, 무기인산염, 무기이온 등을 따로 멸균하여 첨가하였다.

분석방법

균체량은 건조 균체량(DCW)으로 측정하였다. GF/C Whatman filter paper로 배양액을 감압 여과한 후 증류수로 세척하여 mycelia를 회수한 후, 80°C drying oven에서 24시간 건조하고 무게를 측정하였다. 배양액의 포도당 농도는 Dinitrosalicylic acid(DNS) 방법으로 정량하였다(13). 암모늄 이온 농도는 specific ion analyzer(Model EA 940, Orion Research, USA)로 측정하였다. 배양 상등액 10 ml에 ISA(Ionic Strength Adjuster, Orion Research) 0.1 ml을 첨가한 후 교반하면서 이온 meter의 암모니아상 질소 농도를 측정하였다. 미리 표준액으로 이온 meter를 보정하였으며, 전극은 ammonia specific ion membrane 전극(Orion Research)을 사용하였다.

단백질 분해효소에 대한 저해 활성 측정

Cathepsin B 저해 활성은 Barrett의 방법을 변형하여 행하였다(14). 96 well microplate의 각 well에 배양 상등액을 10 µl씩 분주하고 5 µg/ml 농도로 incubation buffer에 녹인 papain을 100 µl씩 넣은 후 37°C incubator(JEIO TECH Co.)에 10분간 정치하였다. 이어 10 mg/ml 농도의 BANA(N-α-Benzoyl-DL-Arginine-β-Naphthylamide·HCl) 용액을 40 µl씩 가하여 잘 흔들어 준 후 20분간 반응시키고, coupling reagent를 가하여 반응을 중단시키고 10분간 정치하여 발색시켰다. Control은 반응 시작 전에 coupling reagent를 가하였으며 sample blank에는 시료 대신에 동량의 증류수를 가하였다. Microplate reader(THERMOMax; Molecular Devices)를 이용하여 405 nm에서의 흡광도를 측정하여 흡광도의 증가를 대조구와 비교하여 상대적인 저해도를 다음 식으로 계산하였다. 1분 동안 1 µmole의 산물(2-naphthylamine)을 생성하는 cathepsin B 양을 50% 저해하는 저해물질의

양을 1 U(unit)로 정의하였다.

$$\% \text{ 저해 활성} = \frac{A-B}{A} \times 100$$

(A: 배양액 비첨가시 효소 활성, B: 배양액 첨가시 효소 활성)

Trypsin에 대한 저해 활성은 N-α-Benzoyl-DL-Arginine-p-Nitroanilide(BAPNA)를 기질로, papain에 대한 저해 활성은 p-Glu-Phe-Leu-p-nitroanilide(PFLNA)를 기질로, pepsin에 대한 저해 활성은 bovine serum albumin을 기질로, serratiopeptidase에 대한 저해 활성은 hammarsten casein을 기질로 각각 사용하여 측정하였다.

배양 조건

포자 생성배지에 생성된 포자를 0.85% saline solution에 현탁시킨 후 멸균된 glycerol을 가하여 20% (v/v) 농도가 되도록 한 것을 균주 보관용 tube에 5 ml씩 분주한 다음, -50°C deep freezer에 냉동보관하여 두었다. 종균 배양은 50 ml baffled flask에 종균 배지 100 ml을 넣고 포자 현탁액을 일정한 접종하여 rotary shaker에서 150 rpm으로 2일간 배양한 후 본 배양 접종원으로 사용하였다. 저해물질의 생산에 미치는 영양원의 영향을 조사하기 위하여, 탄소원과 질소원의 종류 및 농도, 무기인산염의 농도, 효모 추출물의 농도의 영향을 500 ml baffled flask를 사용하였다.

본 배양은 500 ml baffled flask에 본 배양배지를 50 ml씩 넣고 종균 배양액을 5%가 되도록 접종한 후 30°C의 rotary shaker에서 150 rpm으로 3일간 배양하였다. 발효조를 이용한 회분 배양은 2.5 l 발효조(Korea Fermentor Co.)를 사용하여 교반 속도를 300 rpm, 통기량을 0.5 vvm으로 실시하였다. pH의 조절은 용동성 펌프를 이용하여 2N NaOH와 HCl로 pH를 일정하게 유지시켜 주었다. 배양 온도의 영향은 교반 속도 300 rpm, 통기량 0.5 vvm, pH 7로 고정하고 배양 온도를 25, 30, 35°C로 달리하여 배양하면서 시료를 채취하여 저해물질의 활성을 비교하였다. 배양 pH의 영향은 교반 속도 300 rpm, 통기량 0.5 vvm, 온도 30°C로 고정하고 pH를 6, 7, 8, 9로 달리하여 배양하면서 시료를 채취하여 저해물질의 활성을 비교하였다.

Cathepsin B 저해물질의 분리

Butanol 추출 배양액을 GF/C filter paper(Whatman)로 여과하여 여과액을 100°C에서 10분간 열처리하였다. Rotary vacuum evaporator(EYELA, Tokyo

alkakikai Co., Ltd)로 배양액을 농축하여 부피를 줄인 후 농축액의 3배 부피의 n-butanol로 추출하고 추출액을 감압농축하였다. 농축시 형성된 불용성 물질은 원심분리로 제거하였다.

Silica gel chromatography Butanol 추출로부터 얻은 활성 농축액을 silica gel column(2.8×50 cm)에 흡착시킨 후 butanol-methanol-water(4 : 1 : 2)로 용출하였다. 활성 분획을 모아 evaporator로 감압농축한 후 증류수에 용해시켰다.

Amberlite IRC-50(H⁺) chromatography Silica gel chromatography로부터 얻은 활성 농축액을 Amberlite IRC-50 column(2.8×25 cm)에 흡착시킨 후 3차 증류수, 80% methanol, 80% methanol(0.04N HCl 첨가) 순으로 용출시켰다. 활성 분획을 모아 evaporator로 감압농축한 후 methanol에 녹였다.

Preparative TLC Amberlite IRC-50(H⁺) chromatography로부터 얻은 활성액을 silica gel이 피막된 thin layer chromatography(DC-plastikfolien Kieselgel 60 F254, 20×20 cm, 0.2 mm) plate에 streaking 하였다. Butanol-methanol-water(4 : 1 : 2) 전개용매로 전개시킨 후, UV light(254 nm) 하에서 band를 확인하고 spatular로 긁어 회수한 다음 n-butanol로 3회 추출하였다. 추출액을 evaporator로 감압농축한 후 물에 용해시켜 동결건조하였다.

Preparative HPLC Preparative thin layer chromatography로부터 얻은 활성분말을 HPLC용 용매에 용해시킨 후 불용성 물질을 원심분리하여 제거하고 상층액은 membrane filter paper(Whatman, 0.45 μm)로 여과하였다. 시료를 GS-310 column(JAIGEL Co.)에 충전한 후 70% methanol(0.01% TFA 함유)을 용매로 하여 preparative HPLC(Waters Delta Prep 4000)를 수행하였다. Flow rate은 5 ml/min으로 하고, UV detector(Waters 484)로 214 nm의 파장에서의 흡광도를 측정하였다. 활성분획을 evaporator로 감압농축한 후 동결건조시킨 다음 40% methanol(0.01% TFA 함유)을 용매로 하여 preparative HPLC를 수행하였다. 활성 분획을 evaporator로 감압농축한 후 동결건조시킨 다음 특성을 분석하였다.

저해물질의 물리화학적 특성 분석

UV 흡광도 측정 50 μg의 시료를 butanol에 녹인 후 UV-visible recording spectrophotometer(UV-265, Shimadzu)를 이용하여 200~400 nm에서 흡수 spectrum을 조사하였다.

Infrared spectroscopic analysis IR spectrophotometer(Model IFS 66, Bruker)를 이용하여 저해물

질의 적외선 흡수 spectrum을 측정하였다. 200 μg의 저해물질과 5 g의 KBr을 혼합하여 pellet maker를 통해 pellet을 형성시킨 후, 4,000~400 cm⁻¹의 적외선 범위에서 spectrum을 조사하였다.

¹H-NMR spectrum 분석 ¹H-NMR spectrum은 Bruker AMX-500 NMR spectrometer로 측정하였다. 정제된 저해물질 5 mg을 0.6 ml의 CD₃OD에 녹인 후 5.0 mm probe에 넣어 500 MHz로 측정하였다.

결과 및 고찰

저해물질의 발효 배지 조성

탄소원의 종류에 따른 저해물질의 생산 양상을 조사한 결과, glucose(3% w/v)를 기질로 사용하였을 때 균체의 증식, cathepsin B 저해물질 생산 및 생산수율(Y_{p/x})이 가장 우수하였다(Table 1). 질소원의 종류에 따른 저해물질의 생산 양상을 조사한 결과, 다른 질소원에 비하여 casitone을 첨가하였을 때 균체의 증식 및 저해물질 생산성이 월등히 높았다(Table 2). Casitone의 농도가 증가할 수록 균체량은 점차 증가하였으나 저해물질 생산량은 casitone 농도가 3%가 될 때까지 증가하다가 그 이후로 감소하였다. 생산수율(Y_{p/x})을 고려하여 2%를 casitone 최적 농도로 결정하였다. 첨가하는 무기인산염의 농도를 변화시켜 저해물질의 생산 양상을 조사한 결과, 0~10 mM 농도까지는 균체의 증식 및 cathepsin 저해물질의 생산에 큰 차이가 없었으나, 10 mM 이상에서는 cathepsin 저해물질의 생산생산량이 현격히 감소하였다(Table 3). 무기인산염을 따로 첨가하지 않은 배지의 경우에도 배양액내 총인산염의 농도가 4.03 mM 정도로 검출되었다. 이는 평균 배양액과 casitone으로부터 기

Table 1. Effect of glucose concentration on the inhibitor production

Glucose (g/l)	Final pH	DCW (g/l)	Inhibitor (×10 ⁵ U/l)	Yield(Y _{p/x}) (×10 ⁵ U/g)
0	8.53	4.18	1.10	0.26
5	7.33	8.56	4.47	0.52
10	6.60	8.58	4.03	0.47
20	6.35	7.01	4.73	0.67
30	6.33	4.39	8.59	1.96
50	6.05	3.53	4.33	1.23
75	5.66	2.96	4.28	1.45
100	6.03	4.42	2.94	0.67

Glucose was added to the culture medium containing 1% peptone as the nitrogen source.

Table 2. Effect of nitrogen sources on the inhibitor production

Nitrogen source	Final pH	DCW (g/l)	Inhibitor ($\times 10^5$ U/l)	Yield($Y_{p/x}$) ($\times 10^5$ U/g)
No addition	7.24	1.01	0.28	0.28
Skim milk	6.62	—	0.73	—
Na-caseinate	6.09	4.36	2.99	0.69
Casitone	6.45	9.26	11.52	1.24
Casamino acid	8.25	1.38	1.50	1.09
Peptone	5.91	6.84	2.41	0.35
Soytone	7.20	3.32	2.86	0.86
Yeast extract	7.08	4.18	4.93	1.18

The nitrogen sources (1%, w/v) were added to the culture medium containing 3% glucose as the carbon source.

Table 3. Effect of inorganic phosphate concentration on the inhibitor production

Phosphate (mM)	Final pH	DCW (g/l)	Inhibitor ($\times 10^5$ U/l)	Yield($Y_{p/x}$) ($\times 10^5$ U/g)
0	6.19	8.03	16.09	2.00
5	6.19	7.05	16.65	2.36
10	6.21	8.11	16.68	2.06
25	6.00	6.19	7.84	1.27
35	6.29	4.13	6.01	1.46

Inorganic phosphate was added to the culture medium containing 3% glucose and 2% casitone.

인하는 것으로 판단되었다.

저해물질의 발효 및 발효 동력학적 특성

배양 온도에 따른 저해물질의 생산 양상을 조사한 결과, 30°C일 때 최대 생산성을 보였다. 35°C의 경우에는 초기에는 30°C에서 배양할 때와 유사한 정도로 균체량과 저해물질 생산이 증가하다가 일찍 정체기에 들어가면서 저해물질 생산성이 급격하게 감소하였다 (Fig. 1). 배양 pH에 따른 저해물질의 생산 양상을 조사한 결과, pH 7에서 저해물질 최대 비생산속도와 (q_p) 생산수율($Y_{p/x}$) 및 최대 생산성을 보였다 (Table 4).

최적화된 조건에서 발효조를 이용하여 시간의 경과에 따른 균체량, 저해물질의 활성, 포도당 농도, 암모늄 이온의 농도 변화를 측정된 결과는 Fig. 2와 같다. 암모늄 이온의 농도는 초기에 약간씩 증가하다가 24시간 이후 감소하였으며 37시간 이후부터는 급격하게 증가하는 양상을 보였다. 저해물질의 활성은 대수성장기 동안 급격하게 증가하였다가 정체기에

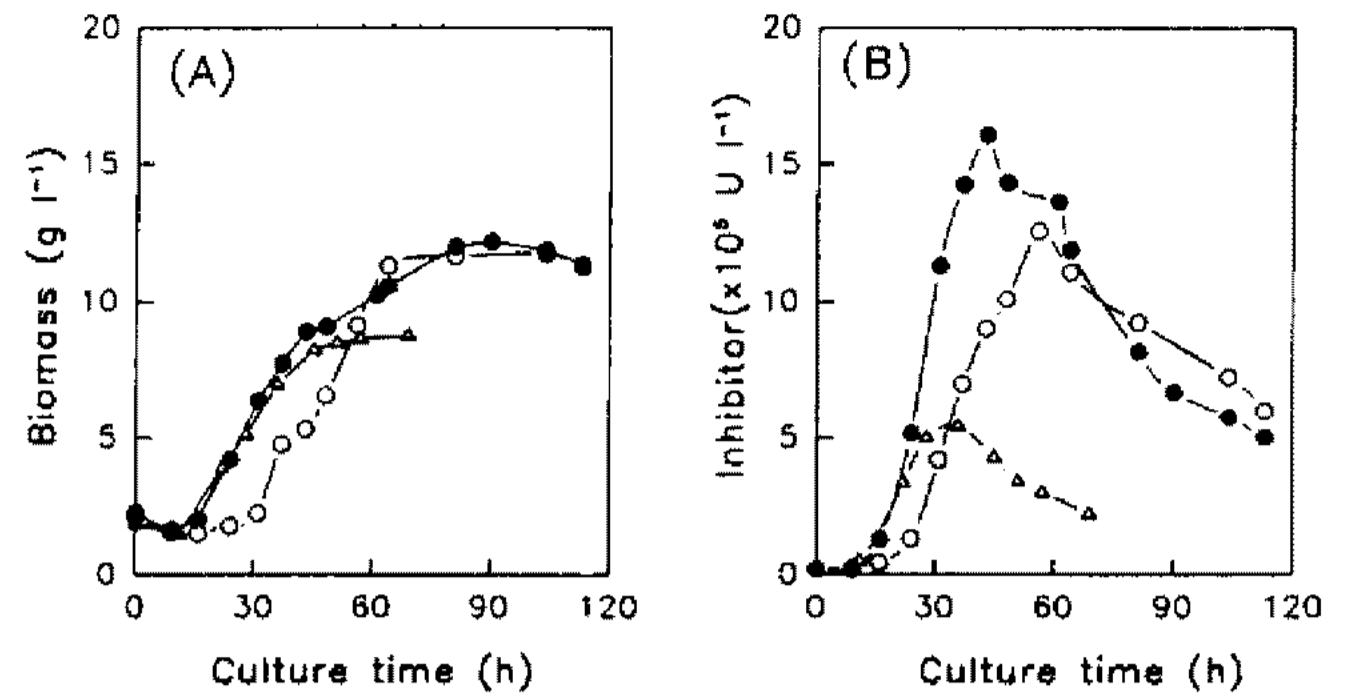


Fig. 1. Effect of temperature on the growth (A) and production of inhibitor (B).

The culture was carried out using the optimized inhibitor production medium containing 3% glucose and 2% casitone at pH 7.0, 25°C(○), 30°C(●) and 35°C(△).

Table 4. Comparison of kinetic parameters in batch cultures at various pH

Kinetic parameters	pH			
	6	7	8	9
Specific growth rate, μ (h^{-1})	0.04	0.07	0.08	0.09
Maximum inhibitor production ($\times 10^5$ U/l)	4.57	8.28	5.32	2.43
Specific inhibitor production rate, q_p ($\times 10^4$ U/g/h)	0.52	0.85	0.23	0.19
Inhibitor yield, $Y_{p/x}$ ($\times 10^5$ U/g)	1.14	1.22	0.42	0.32

The culture was carried out using the optimized protease inhibitor production medium containing 3% glucose and 2% casitone at 30°C. The pH was controlled using a two-way pH controller by the addition of 1N HCl and 1N NaOH.

접어들면서 급격하게 감소하였다. 이 결과로 볼 때 본 사용 균주가 생산하는 cathepsin B 저해물질은 균체증식과 연관된 대사산물을 알 수 있었다. 암모늄 이온 농도가 급격하게 증가하기 시작할 때 최대 생산된 저해물질이 급격히 저하되므로 저해물질의 분리 정제를 위한 배양액 회수 시기를 암모늄 이온 농도를 측정함으로써 해서 결정할 수 있었다.

저해물질의 분리

배양액을 열처리한 후 농축하여 부피를 줄인 다음 butanol로 추출하였다. Butanol층 활성액을 농축한 후 silica gel chromatography를 수행하였다. 그 결과 두 개의 활성 부분이 존재하는 것을 알 수 있었다. 첫번째

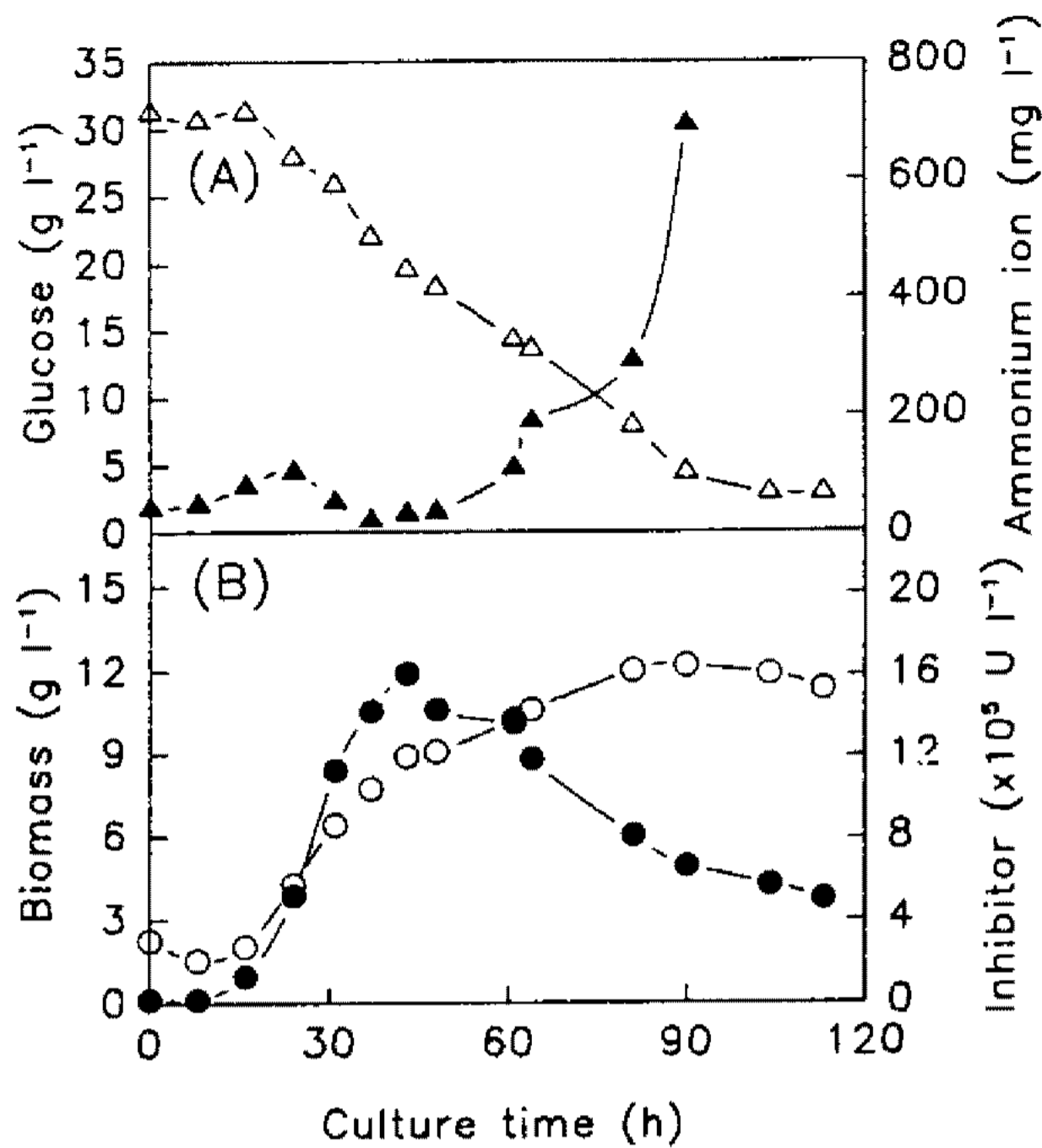


Fig. 2. Changes in the concentration of glucose (Δ), ammonium ion (\blacktriangle), biomass (\circ), and inhibitor (\bullet) in the optimized batch culture of *Streptomyces chromofuscus* SMF28.

The culture was carried out using the optimized inhibitor production condition containing 3% glucose and 2% casitone at 30°C and pH 7.0.

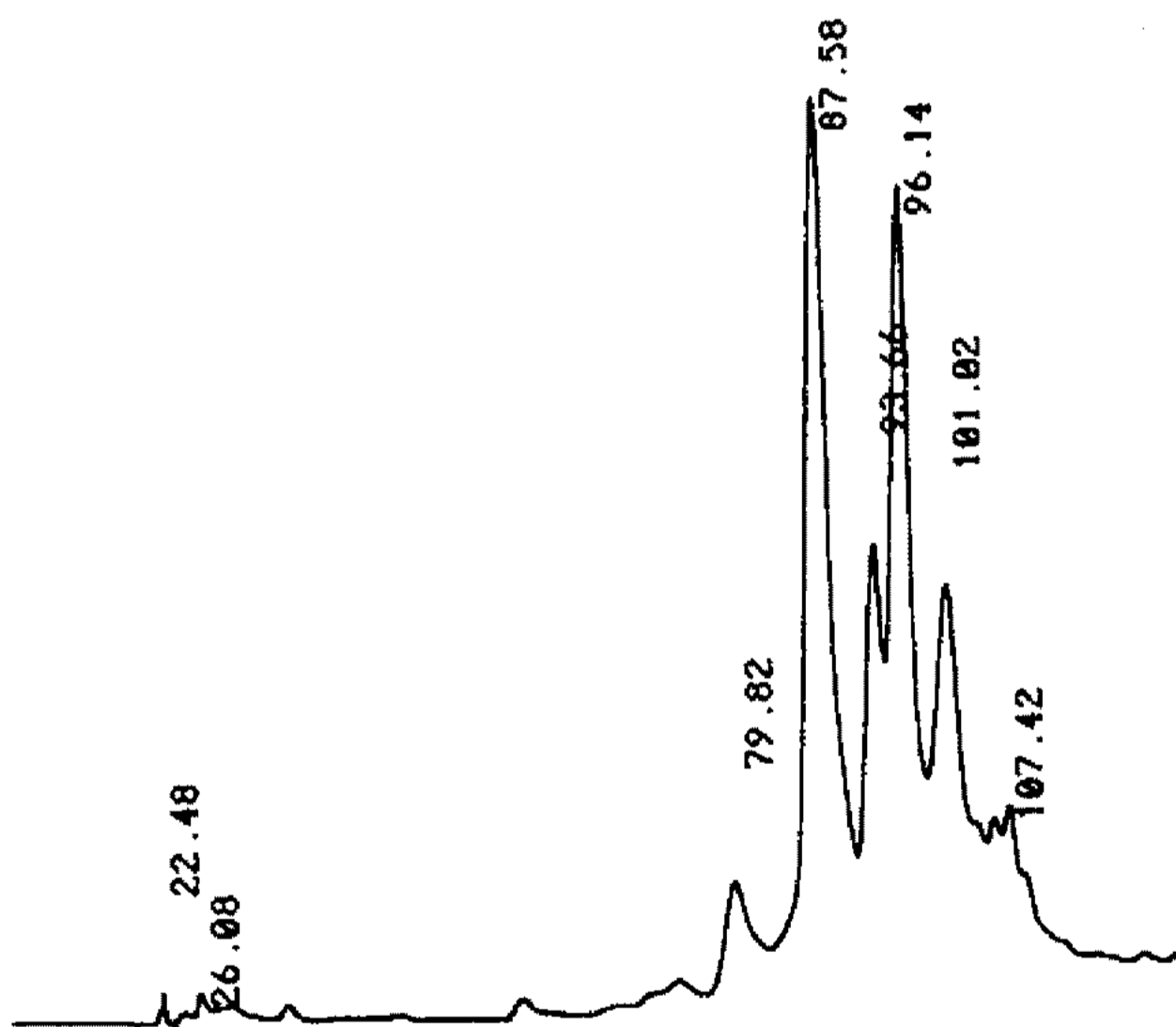


Fig. 3. Preparative HPLC.

The sample solution was applied to the GS-310 column and then eluted with 40% methanol containing 0.01% trifluoroacetate. The flow rate was 5 ml min⁻¹ and fractions of 5 ml were collected.

활성분획을 농축한 후 Amberlite IRC-50 chromatography를 수행하였다. 80% methanol(0.04N HCl 함유)을 가하였을 때 활성 peak이 나왔으며 색소가 상당량 제거되었다. 활성분획을 농축한 후 분취용 TLC를

Table 5. Protease inhibitory spectrum of protease inhibitor produced by *S. chromofuscus* SMF28 on various protease

Protease	Substrate	Inhibition
Thiol protease		
Papain	PFLNA	+
Cathepsin B	BANA	+
Serine protease		
Trypsin	BAPNA	±
Metallo-protease		
Serratiopeptidase	Casein	-
Aspartic protease		
Pepsin	Albumin	-

+: More than 90%, ±: Less than 10%, -: No inhibition, PFLNA: p-Glu-Phe-Leu-p-Nitroanilide, BANA: N- α -Benzoyl-Arg- β -Naphthylamide, BAPNA: N- α -Benzoyl-Arg-p-Nitroanilide

수행하였다. 254 nm의 파장에서 검은 band로 보이는 부분(Rf=0.4-0.6)을 긁어내어 butanol로 추출하였다. 추출액을 농축한 후 동결건조하고 70% methanol(0.01% TFA 함유)을 용매로 하여 분취용 HPLC를 수행하였다. 주활성분획을 모아 농축한 후 동결건조한 후, 40% methanol(0.01% TFA 함유)을 용매로 하여 다시 분취용 HPLC를 수행하였다(Fig. 3). 여러 개의 peak으로 분리되었는데 그 중 87.58분 peak에서 활성을 보였다. 활성분획을 농축한 후 동결건조하여 흰색의 분말을 얻었다.

저해물질의 활성 스펙트럼

분리 정제된 저해물질의 여러가지 단백질 분해효소들에 대한 저해 활성은 Table 5와 같다. 분리 정제된 저해물질은 cathepsin B 뿐만 아니라 cysteine protease인 papain에 대해서도 저해활성을 나타내었지만, 다른 serine protease, metallo-protease, aspartic protease 등에는 저해 활성을 나타내지 않아 cysteine protease 특이적인 저해물질임을 알 수 있었다.

저해물질의 물리화학적 특성 분석

분취용 HPLC로부터 얻은 저해물질은 흰색의 분말로서, butanol에 녹여 UV 흡광도를 조사한 결과 273.4와 258.0 nm에서 흡광도를 나타내었다(Fig. 4). IR 스펙트럼에서는 1635 및 1540 cm⁻¹ 부근에서 전형적인 peptide bond의 C=O 흡수파장대가 있고, 3300 cm⁻¹에 amide 흡수파장대를 보여주었다(Fig. 5). 또한 2959 cm⁻¹에 날카로운 C-H stretching band가 관찰되었다. 이와같은 결과로부터 분리된 저해물질은

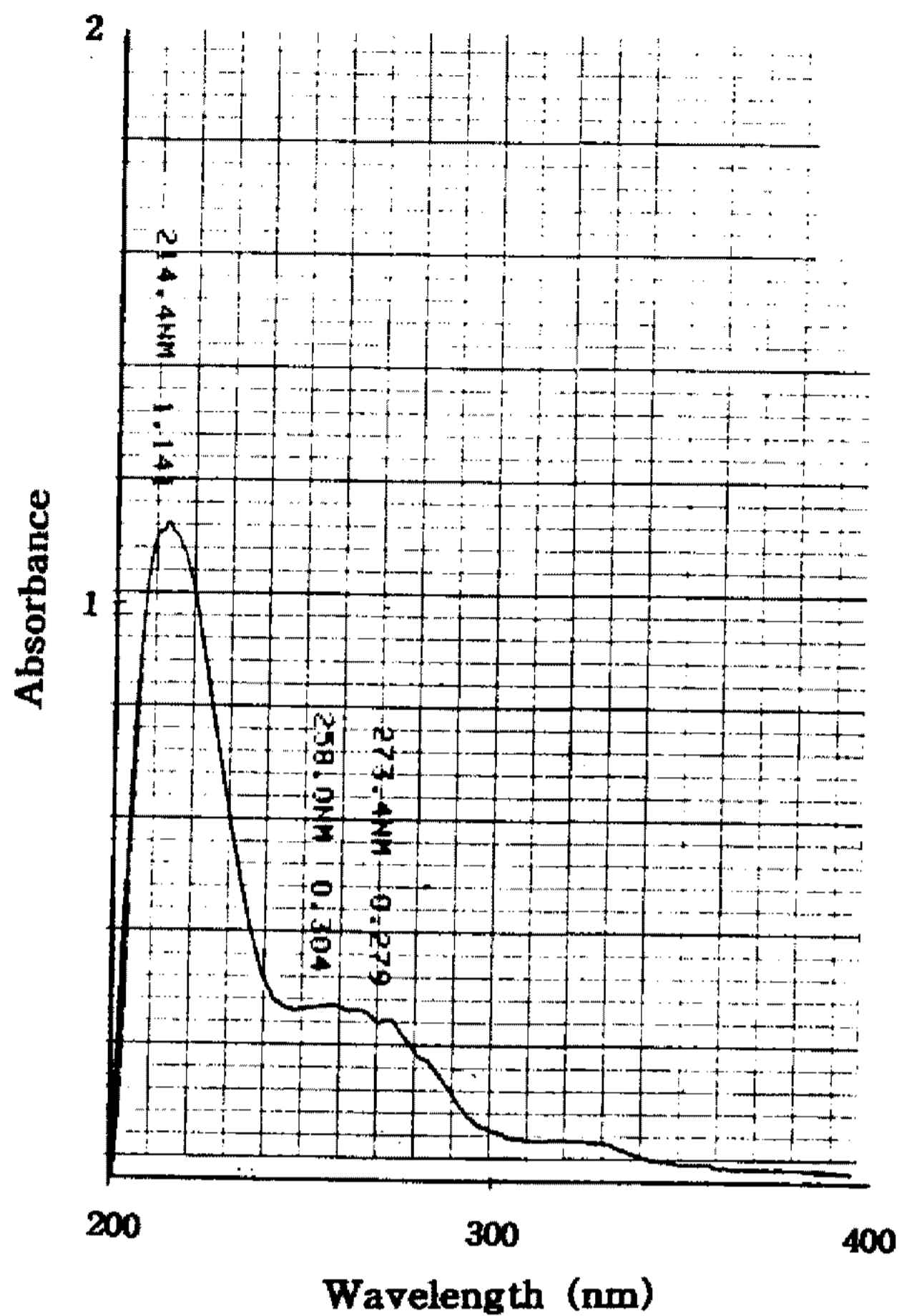


Fig. 4. Ultraviolet absorbance spectrum of the purified inhibitor in butanol. 50 μg of inhibitor was dissolved in butanol and ultraviolet absorbance spectrum was analyzed by using an UV-visible spectrophotometer.

aromatic ring을 가진 peptide 물질임을 알 수 있었다. 하지만 저해물질을 conc-HCl로 포화시킨 후 115°C에서 24시간 반응시킨 다음, 아미노산 조성을 분석한 결과 valine만 관찰되었다(자료 미제출). $^1\text{H-NMR}$ 분석 결과 7.3 ppm에서 전형적인 aromatic C_6H_5 peak가 관찰되었으며, 0.8~0.9 ppm 사이에서 valine의 CH $(\text{CH}_3)_2$ proton peak들이 관찰되었다(Fig. 6). 이와같은 결과로부터 분리된 저해물질은 valine과 phenylalanine 유도체와 같은 aromatic 아미노산을 함유하는 peptide성 물질로 추정되었다. 이러한 구조의 물질은

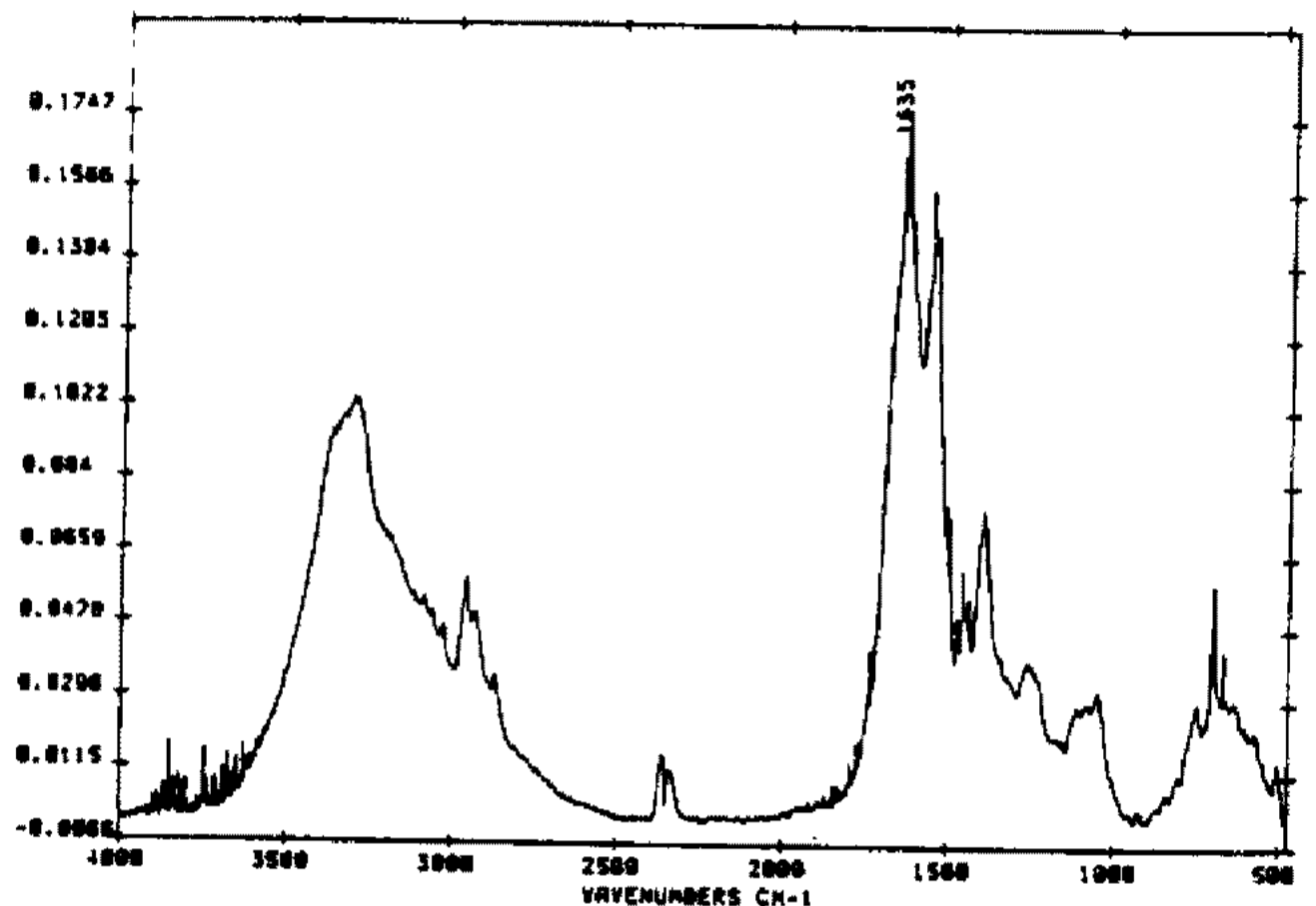


Fig. 5. FT-IR spectrum of the purified inhibitor. 200 μg of inhibitor was mixed with 5 g of KBr and KBr pellet of inhibitor was made by pellet maker. The infrared radiation range was 4,000~400 cm^{-1} .

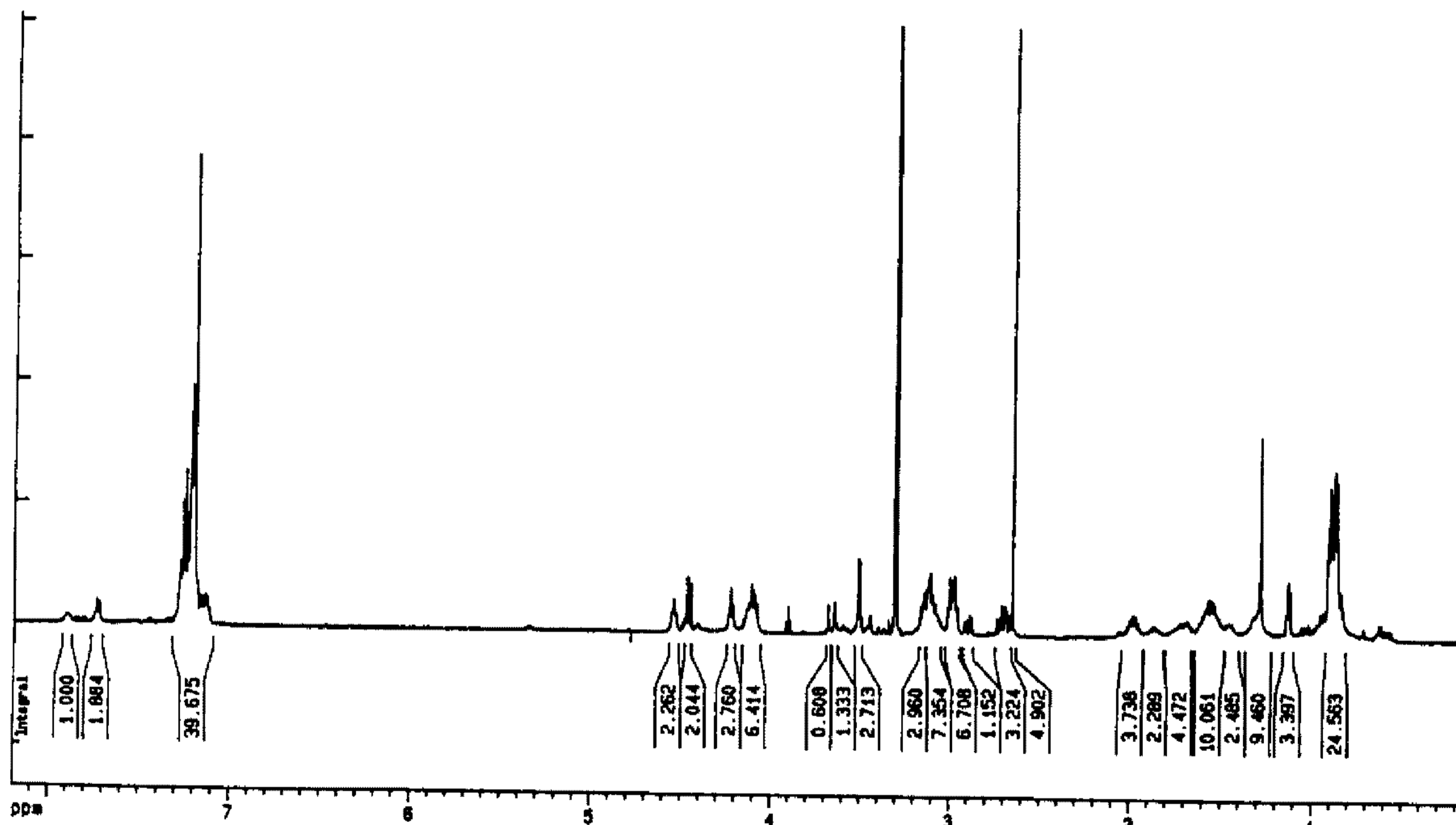


Fig. 6. $^1\text{H-NMR}$ spectrum of the purified inhibitor in CD_3OD .

현재까지 보고된 cathepsin B 저해물질과는 다른 것으로 추정된다.

요 약

Streptomyces chromofuscus SMF28이 생산하는 저분자량 cathepsin B 저해물질의 발효 특성과 생합성 최적 조건을 탐구하기 위하여 회분 배양을 통한 발효 동력학적 연구를 수행하였다. 저해물질의 생성은 균체의 성장과 밀접한 연관성을 갖고 있는 growth associated type이었으며, 탄소원과 질소원의 종류와 농도에 크게 영향을 받았다. 탄소원으로는 glucose가 가장 적합하였으며, 최적 농도는 3%인 것으로 밝혀졌다. 질소원으로 casitone을 사용하였을 때 저해물질 생산성이 크게 증가하였다. 무기인산염의 농도가 10 mM 이하일 때 생산성이 높은 것으로 나타났으며, 저해물질 생산에 최적한 온도와 pH는 각각 30°C와 pH 7인 것으로 밝혀졌다. *Streptomyces chromofuscus* SMF28 배양액으로부터 cathepsin B 저해물질을 butanol 추출, silica gel 크로마토그래피, Amberlite IRC-50(H⁺ form) 크로마토그래피, 분취용 TLC, 분취용 HPLC를 사용하여 분리하였다. 정제된 저해물질을 UV, IR, ¹H-NMR spectrum 분석과 아미노산 조성 분석 결과 valine과 phenylalanine 유도체와 같은 aromatic 아미노산을 함유하는 peptide성 물질로 추정되었다.

감사의 글

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

참고문헌

- Barrett, A.J. 1977. Cathepsin B and other thiol proteinases, Pp. 181-208. In A.J. Barrett (ed.), *Proteinases in Mammalian Cells and Tissues*. North-Holland Biomedical Press.
- Barrett, A.J. and H. Kirschke. 1981. Cathepsin B, cathepsin H, and cathepsin L, Pp. 535-561. In *Methods in Enzymology*, Vol. 80, Academic Press Inc.
- Barrett, A.J. 1977. Introduction to the history and classification of tissue proteinases, Pp.1-18. In A.J. Barrett (ed.), *Proteinases in mammalian cells and tissues*. North-Holland Biomedical Press.
- Stracher, A., E.B. McGowan, and S.A. Shafiq. 1978. Muscular dystrophy: Inhibition of degeneration *in vivo* with protease inhibitors. *Science*. **200**: 50-51.
- Tappel, A.L., H. Zalkin, K.A. Caldwell, I.D. Desai, and S. Shibko. 1962. Increased lysosomal enzymes in genetic muscular dystrophy. *Arch. Biochem. Biophys.* **96**: 340-346.
- Kominami, E., T. Tsukahara, Y. Bando, and N. Katunuma. 1985. Distribution of cathepsin B and H in rat tissues and peripheral blood cells. *J. Biochem.* **98**: 87-93.
- Baici, A. and M. Gyger-Marazzi. 1982. The slow, tight-binding inhibition of cathepsin B by leupeptin: A hysteretic effect. *Eur. J. Biochem.* **129**: 33-41.
- Smith, R.A., L.J. Copp, S.L. Donnelly, R.W. Spencer, and A. Krantz. 1988. Inhibition of cathepsin B by peptidyl aldehydes and ketones: Slow-binding behavior of a trifluoromethyl ketone. *Biochemistry*. **27**: 6568-6573.
- Green, G.D.J. and E. Shaw. 1981. Peptidyl diazomethyl ketones are specific inactivators of thiol proteinases. *J. Biol. Chem.* **256**: 1923-1928.
- Towatari, T., T. Nikawa, M. Murata, C. Yokoo, M. Tamai, K. Hanada and N. Katunuma. 1991. Novel epoxysuccinyl peptides-A selective inhibitor of cathepsin B, *in vivo*. *FEBS*. **280**: 311-315.
- Smith, R.A., P.J. Coles, R.W. Spencer, L.J. Copp, C.S. Hones, and A. Krantz. 1988. Peptidyl O-acyl hydroxamates: Potent new inactivators of cathepsin B. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **155**: 1201-1206.
- Lee, H.S., I.S. Kim, H.T. Kim, S.J. Yoon, and K.J. Lee. 1995. Isolation and identification of *Streptomyces chromofuscus* producing cathepsin B inhibitor. *Kor. J. Appl. Microbiol.*
- Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**: 426-428.
- Barrett, A.J. 1972. A new assay for cathepsin B1 and other thiol proteinases. *Anal. Biochem.* **47**: 280-293.

(Received 8 May 1995)