

## Aminopeptidase M 저해제를 생산하는 *Streptomyces* sp. SL-387 (KCTC 0102BP) 변이주의 특성

정명철 · 전효곤 · 이호재 · 이충환 · 고영희\*  
한국과학기술연구원 유전공학연구소 미생물화학연구그룹

### Characterization of the Mutant of *Streptomyces* sp. SL-387 (KCTC 0102BP) Producing Aminopeptidase M Inhibitors

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

Microbial Chemistry Research Group, Genetic Engineering Research Institute,  
KIST, P.O. Box 115 Yusong, Taejon, 305-600, Korea

**Abstract** — Since the original productivity of new aminopeptidase M inhibitors MR-387A and B by *Streptomyces* sp. SL-387 (KCTC 0102BP) was not enough for further chemical and biological evaluation, mutation of parent strain by the treatment of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine was performed in order to obtain a clone with greater inhibitory activity. Mutant N-3 was selected due to a 6-fold greater productivity (40  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) than that of the wild type (6.7  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). This mutant was resistant to 3,4-dehydro-DL-proline, an antimetabolite of proline, with 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of minimum inhibitory concentration. Furthermore, the characteristic morphological change from spiral spore chain in wild type to straight in mutant was observed. An aminopeptidase M inhibitor different from MR-387A and B was isolated from the culture broth of the mutant. This inhibitor was composed of 2 proline, 1 valine, and an unknown amino acid which is presumably 3-amino-4-phenylbutanoic acid.  $\text{IC}_{50}$  value (89.1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) of the purified inhibitor was lower than that of other inhibitors, which may be due to the absence of 2(S)-hydroxyl group within the structure of 3-amino-4-phenylbutanoic acid.

Enkephalin, kinin, tachykinin, substance P 등 저분자의 peptide는 생체내에서 hormone으로 뿐만 아니라 세포내 신경 전달 등 다양한 생리적 기능을 수행하는 것으로 알려져 있다(1). 이들 저분자 peptide는 세포내에 존재하는 endo- 또는 exopeptidase에 의해 분해되어 세포내에서의 기능이 조절된다(2, 3). 특히, 신장세포, 장상피세포 및 대뇌의 세포막 표면에 주로 존재하는 aminopeptidase M(EC 3.4.11.2, 이하 AP-M)은 대뇌에서는 무통각 작용을 나타내는 opioid의 일종인 enkephalin을 불활성화시키는 효소로 잘 알려져 있으며(4, 5) opioid peptide 대사 및 이와 관련된 질병 병발 메카니즘과 연관된 많은 연구가 진행되고 있다(6, 7). 이러한 연구의 일환으로 AP-M에 특이적인 저해제를 탐색하려는 노력에 의해 actinonin(8), amasta-

tin(9), probestin(10) 및 leuhistin(11) 등이 개발되어 보고되었다.

최근 본 연구자들은 AP-M의 저해제를 탐색하는 과정에서 *Streptomyces* sp. SL-387(KCTC 0102BP)로부터 두가지의 새로운 저해물질로서 MR-387A(3-amino-2-hydroxy-4-phenylbutanoyl-valyl-prolyl-hydroxyproline)과 MR-387B(3-amino-2-hydroxy-4-phenylbutanoyl-valyl-prolyl-proline)을 얻었다(12). 그러나 *Streptomyces* sp. SL-387이 생산하는 MR-387의 생산량은 극히 적을 뿐만 아니라(6.7  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 저분자의 선형 peptide 물질로 분리 정제하는 과정에서 회수율이 낮아, 생합성 경로의 규명, 임상실험에 필요한 물질의 확보, 나아가 산업적 생산을 위한 생산성의 제고가 필수적이다. 이를 위하여 야생형 균주를 배양학적 또는 유전적으로 변형시켜 대량 생산 균주를 개발하거나 발효 조건을 최적화하는 연구 등이 요구된다. 이러한 연구의 일환으로서 MR-387을 생산하는 야생형 균주를 N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine

**Key words:** Aminopeptidase M, inhibitor, strain development, MR-387A and B, *Streptomyces* sp. SL-387, NTG mutation

\*Corresponding author

(NTG)에 의하여 변이시켜 생산성이 높은 N-3 변이주를 선별하였다. 이 변이주 N-3는 포자사슬에 특이적인 형태적 변이가 일어났음을 관찰할 수 있었고, 이 변이주의 배양액으로부터 저해물질을 분리한 결과 MR-387A와 B 이외에 다른 저해제를 분리할 수 있었으며 그 구조내에는 특이적인 구조의 아미노산인 3-amino-4-phenylbutanoic acid moiety를 갖는 것으로 추정되었다.

본 연구에서는 이 변이주의 형태적 관찰, 생리적 특성 및 생산되는 저해제의 분리 정제 및 특성에 관하여 보고하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 실험재료

실험에 사용한 배지류는 주로 Difco 제품을 사용하였고, mutagen으로 사용한 NTG는 Fluka 제품을 사용하였다. 아미노산의 antimetabolite인 *m*- 또는 *p*-fluorophenylalanine, thienylalanine, 3,4-dehydro-DL-proline,  $\alpha$ -aminobutyrate 및 기타 아미노산은 Sigma 제품을 사용하였다. 물질 분리를 위한 resin류 중 Diaion HP-20은 Nippon Rensui 제품을, Sephadex G-10 및 Sephadex LH-20은 Pharmacia 제품을, silica gel은 Merck 제품을 각각 사용하였다. 저압 액체크로마토그래피(LPLC)를 위한 column으로는 Lobar RP-18(310×25 mm, 40~60  $\mu$ m, Merck Art. 10625)를 사용하였고, 고압 액체크로마토그래피(HPLC)를 위한 column으로는 YMC-ODS-AQ(250×4.6 mm, S-10  $\mu$ m)를 사용하였다.

### 사용기기

물질분리를 위한 LPLC는 Fluid Metering 사(New York, USA)의 FMI pump를 사용하였고, HPLC는 Tosoh사(Tokyo, Japan)의 TSK 6011 pump와 TSK 6041 detector를 사용하였다. 물질의 UV spectrum 분석을 위하여 Shimazu UV-260 spectrophotometer를, NMR spectrum은 Varian UNITY 300을 사용하였다.

### 사용균주

실험에 사용한 균주는 전남 월출산 도립공원 토양으로부터 유전공학연구소 미생물 탐색실에서 분리한 균주중 AP-M에 대하여 저해활성을 보이는 균주를 분양받아 *Streptomyces* sp. SL-387로 동정하고(KCTC 0102BP), 이 균주를 보존하면서 사용하였다(12). 보존용 배지로는 0.5% soluble starch, 0.5% glucose,

0.1% Bacto-peptone, 0.1% yeast extract, 0.1% malt extract, 1.5% agar를 첨가한 배지를 사용하였다.

### NTG에 의한 돌연변이

상기 보존용 배지상에 균주를 도말하여 2주간 배양하여 포자를 형성시키고, 그 표면에 0.1% Tween 80을 처리하여 포자를 긁어 모아 -20°C에 냉동 보관하고 필요에 따라 해동하여 사용하였다. 해동한 포자를 원심분리하여 상등액을 버리고 TM buffer(0.05 M Tris·HCl, 0.05 M maleic acid, pH 8.0)에 포자를 현탁한 후 NTG를 1 mg/ml 농도로 첨가하였다. 약 30분간 정치한 후 원심분리하여 포자를 모으고 TM buffer를 1 ml 가하여 원심분리하여 NTG를 제거하였다. 이 과정을 두 번 반복하고 최소배지(1% glucose, 0.05%  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 0.05%  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0.03% KOH, 0.001%  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , pH 7.0) 50 ml에 접종하여 1일간 27°C에서 배양하였다. 이를 cotton으로 막은 syringe를 통하여 여과하고 통과액을 보존용 평판배지에 도말하고 27°C에서 2~3일간 배양하였다. 형성된 colony를 무작위 선별하여 발효용 배지(1% soluble starch, 2% glucose, 2.5% soybean meal, 0.1% meat extract, 0.4% yeast extract, 0.2% NaCl, 0.0005%  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 0.005%  $\text{MgCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 0.005%  $\text{ZnCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , pH 7.2)에서 배양하여 그 활성정도를 비교하여 생산성이 높은 N-3 균주를 선별하였다.

### Antimetabolite의 최소생육저지농도(MIC)

Czapek's agar(3% sucrose, 0.3%  $\text{NaNO}_3$ , 0.1%  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0.05% KCl, 0.05%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.001%  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , pH 7.3)에 MR-387의 구성 아미노산의 antimetabolite를 농도별로 첨가한 후 균주를 백금아로 도말하여 7일간 배양한 후 그 생육 정도를 관찰하였다.

### AP-M 저해역가 측정

AP-M 저해역가 측정에 대한 역가의 측정은 전보(12)와 같이 행하였다. 생산된 저해제의 양은  $\text{IC}_{50}$  값(0.1  $\mu\text{g/ml}$ )과 저해역가(%)와의 상관관계로부터 역으로 산출하였다.

### 저해제의 생산 및 분리정제

선별된 N-3 균주는 상기 발효용 배지 50 ml에서 배양하여 발효용 접종원으로 사용하였으며, 이를 3 L 배지를 함유한 5 L-Jar fermenter(한국발효기, Model SY-500)에 접종하여 통기량 1 vvm, 교반속도 200 rpm으로 27°C에서 4일간 배양하였다. 이 배양액을

원심분리하여 상등액을 모아 Diaion HP-20에 흡착시켰다. 이를 물로 세척하고 70% MeOH로 용출한 다음 MeOH를 제거하고 1 N HCl로 pH 2.0으로 조절하였다. 이를 BuOH로 3번 추출하여 silica gel column에서 BuOAc-BuOH-AcOH-H<sub>2</sub>O(2 : 4 : 1 : 1)로 전개하여 활성 분획을 모았다. 이를 Sephadex LH-20에서 40% MeOH로 전개하여 활성분획을 모아 다시 Lobar RP-18 column 상에서 역상 크로마토그래피를 실시하였다. 이로부터 얻은 활성 분획을 다시 Sephadex G-10에서 물로 전개시킨 후 활성분획을 모아 HPLC를 행하였다. HPLC에 사용한 column은 YMC-ODS-AQ로 전개용매는 20% MeCN-0.1% TFA를 사용하였다. 이때 14분과 17분에서 각각 MR-387A와 MR-387B를 분리하였고 23분에서 새로운 저해활성을 갖는 물질을 분리하였다.

## 결과 및 고찰

### 변이주 N-3균주의 선별

*Streptomyces* sp. SL-387이 생산하는 MR-387의 생산량은 극히 적어(6.7 µg/ml), 생합성 경로의 규명, 임상실험에 필요한 물질의 확보, 나아가 산업적 생산을 위한 생산성의 제고가 필수적이다. 따라서 *Streptomyces* sp. SL-387의 야행성 균주를 배양학적 또는 유전적으로 변형시켜 대량 생산 균주를 개발하고자 하는 연구의 일환으로서 NTG에 의한 돌연변이를 유도하였다. 먼저 야행성의 포자 현탁액을 평판배지에

도말하여 단일 colony를 형성시키고 이중 약 100개의 colony를 각각 발효용 배지에서 배양하여 생산량이 높은 균주로서 A-10을 선별하였다. 이 균주의 포자를 NTG 처리하여 돌연변이를 유발시키고 영양요구주 집적배양법(auxotroph enrichment culture)에 의하여 배양한 다음 단일 colony를 무작위 선별하여 생산량이 높은 균주 N-3, N-13, N-15, N-25 및 N-66 균주를 선별하였다(Table 1). 이들 중에서 N-3 균주가 40 µg/ml로 가장 높은 생산량을 보였으며 이는 야행성에 비해 6배 가량 높은 생산량이었다. 한편 N-48, N-49, N-64 균주는 저해제의 생산이 야생형 균주보다 오히려 낮은 것으로 나타났다. N-3 균주는 전자현미경 하에서 포자사슬을 관찰한 결과, 나선형이던 야생형 균주와는 달리 직선형으로 형태적 변이가 일어났음을 관찰할 수 있었고(Fig. 1), 다른 균주들에서는 이러한 변이를 관찰할 수 없었다. 그러나 이러한 형태적 변이가 MR-387의 생산과 관련이 있는지에 대해서는 알

Table 1. Production of the compound MR-387 by *Streptomyces* sp. SL-387 mutants

Mutants	Productivity (µg/ml)	Relative productivity
Single colony isolation		
A-10	11.8	1.8
Positive mutants		
N-3	40.0	6.0
N-13	23.2	3.5
N-15	30.3	4.5
N-25	25.0	3.7
N-66	20.8	3.1
Negative mutants		
N-48	2.5	0.4
N-49	1.3	0.2
N-64	0.5	0.08
Wild type SL-387	6.7	1.0

The selected strains were cultured at 27°C for 2 days in test tube (2.2×20 cm) containing 10 ml of fermentation media described in Materials and Methods.



Fig. 1. Electron microscopic pictures of *Streptomyces* sp. SL-387 wild type (A) and mutant N-3 (B). \*Bars indicate 10 micrometers (×8800)

**Table 2. Minimum inhibitory concentration (MIC) of various antimetabolites of amino acid against *Streptomyces* sp. SL-387 wild type and N-3 mutant**

Antimetabolites	Natural metabolite	MIC ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	
		SL-387	N-3
<i>m</i> -Fluorophenylalanine	Phe, Tyr	200	200
<i>p</i> -Fluorophenylalanine	Phe, Tyr	200	100
Thienylalanine	Phe	>500	>500
3,4-Dehydro-DL-proline	Pro	<3	25
Isoleucine	Val	>500	>500
$\alpha$ -Aminobutyrate	Val	>500	>500

*Streptomyces* sp. SL-387 wild type and N-3 mutant were cultured at 27°C for 7 days in Czapek's media (sucrose 3%, NaNO<sub>3</sub> 0.3%, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.1%, KCl 0.05%, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.05%, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.001%, pH 7.3) supplemented with various antimetabolites.

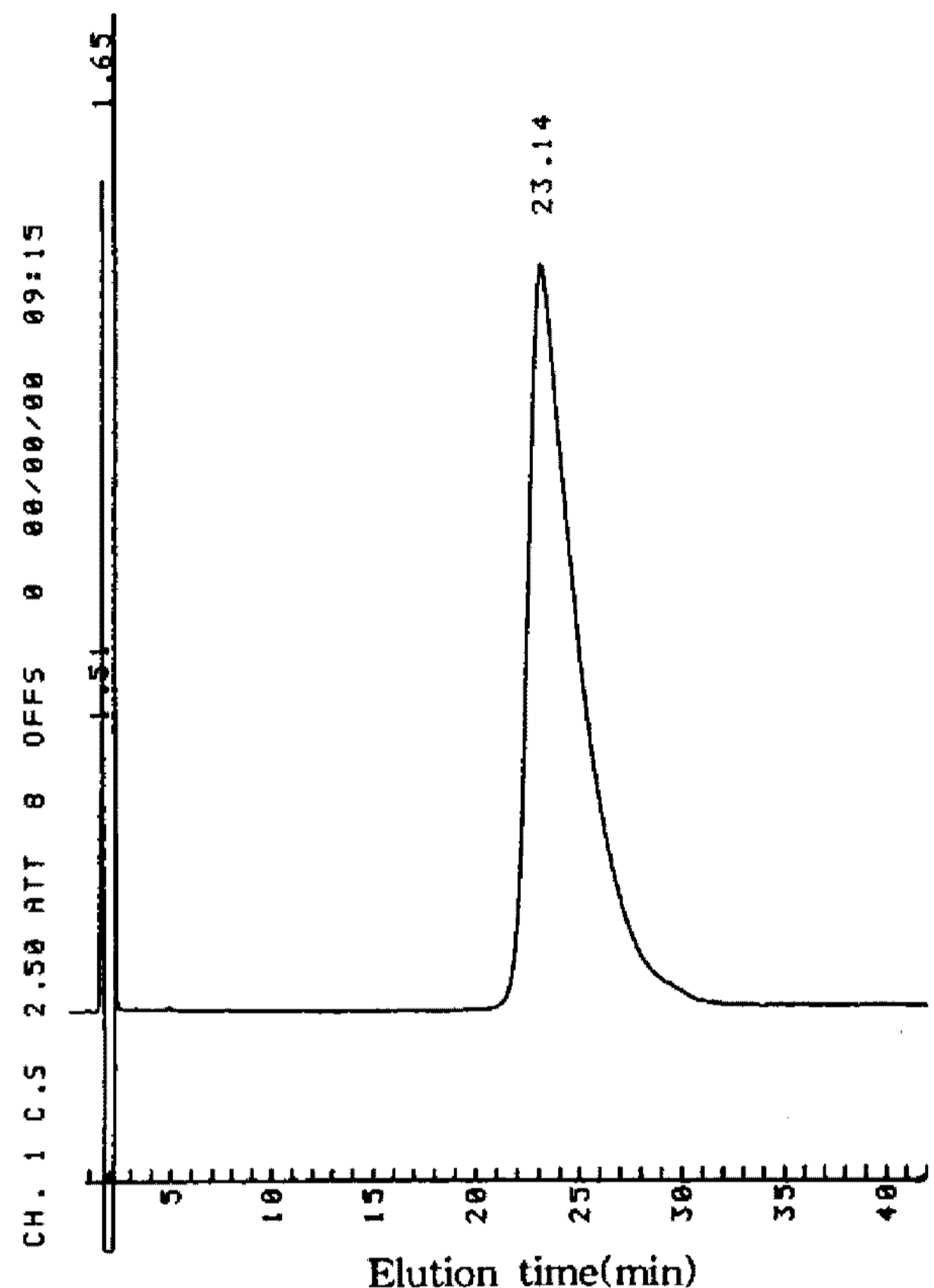
수 없으며 따라서 이에 대한 연구가 더 요구된다.

#### 변이주 N-3의 생리적 특성

N-3 균주는 영양요구주 집적배양법에 의하여 선별 되었으나 실제 영양요구주는 아니고 다만 최소배지에서 생육이 지연된 균주임을 알 수 있었다. 따라서 이 균주의 다른 생리적 특성을 조사하기 위하여 MR-387의 구성 아미노산들의 antimetabolite에 대한 저항성을 최소생육저지 농도(MIC)로 검토하였다. N-3 균주는 저해제 구성성분중 3-amino-2-hydroxy-4-phenylbutanoic acid(AHPA)와 유사한 아미노산인 phenylalanine과 tyrosine의 antimetabolite인 *m*- 또는 *p*-fluorophenylalanine과 thienylalanine, valine의 antimetabolite인 isoleucine과  $\alpha$ -aminobutyrate에서는 wild type과 별 차이가 없는 반면 proline의 antimetabolite인 3,4-dehydro-DL-proline에는 MIC가 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 이 물질 존재 하에서는 생육하지 못하는 wild type과는 달랐다(Table 2). 이는 AP-M 저해제인 probestin(AHPA-leucyl-prolyl-proline)(10) 및 MR-387 (12) 등의 구조내에 2개의 proline이 존재하는 것과 관련이 있을 것으로 생각된다.

#### 변이주 N-3가 생산하는 저해제의 특성

MR-387A와 B 이외에 변이주 N-3가 생산하는 AP-M 저해물질은 Diaion HP-20, BuOH 추출, silica gel, Sephadex LH-20, 역상 silica gel, Sephadex G-10 등을 거쳐 최종적으로 HPLC에 의하여 단일 peak로 분리하였다(Fig. 2). 이 물질은 UV spectrum 상에서  $\lambda_{\text{max}}(\epsilon)$  값이 219(end, 1048), 253(204), 258(210), 263(195), 268(184), 280(sh. 143) nm을 나타내



**Fig. 2. HPLC chromatogram of the inhibitor purified from culture broth of mutant N-3.**

Column: YMC-ODS-AQ (250×4.6 mm)  
Flow rate: 2.0 ml/min  
Solvent: 20% MeCN-0.1% TFA  
Detection: 210 nm

었으며, 이는 phenyl 기가 구조내에 존재함을 시사한다. <sup>1</sup>H-과 <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY NMR spectrum으로부터 이 물질의 구조내에는 2 proline[Pro<sup>1</sup>:  $\alpha$ -CH, 4.45 dd(J=3.9, 6.9);  $\beta$ -CH<sub>2</sub>, ca. 2.00 m, 2.24 m;  $\gamma$ -CH<sub>2</sub>, ca. 2.00 m, 2.07 m;  $\delta$ -CH<sub>2</sub>, 3.62 m, 3.79 m; Pro<sup>2</sup>:  $\alpha$ -CH, 4.66 dd(J=5.4, 8.4);  $\beta$ -CH<sub>2</sub>, ca. 1.96 m, 2.30 m;  $\gamma$ -CH<sub>2</sub>, ca. 2.00 m, 2.05 m;  $\delta$ -CH<sub>2</sub>, 3.67 m, 3.93 m]과 1 valine[ $\alpha$ -CH, 4.41 m;  $\beta$ -CH, 2.01 m; 2x  $\gamma$ -CH<sub>3</sub>, 1.01 d, 0.96 d(J=6.9)]이 존재함을 알 수 있다(Fig. 3). 한편 이 물질내에는 3-amino-4-phenylbutanoic acid moiety가 존재함을 추론할 수 있다. <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY NMR spectrum과 total shift correlation spectroscopy(TOCSY) 등의 2차원 NMR spectrum에서 이 미지의 아미노산을 assign 할 수 있었다. 즉 TOCSY spectrum에서 4.39 ppm의 peak( $\beta$ -CH)는 2.83 dd와 2.74 dd(J=6.3, 13.8, 4-CH<sub>2</sub>) 및 2.40 d(J=6.0, 2-CH<sub>2</sub>)과 연결되고, 이는 <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY NMR spectrum에서  $\beta$ -CH는 각각 양방향으로 2-CH<sub>2</sub>와 4-CH<sub>2</sub>로 연결됨을 추론할 수 있다(Fig. 4). 따라서 변이주



N-3가 생산하는 또 하나의 저해 물질은 MR-387A나 B의 구조와는 다르며, 특히 저해제 내에서 중요한 기능을 수행하는 것으로 보고된 (2S,3R)-3-amino-2-hydroxy-4-phenylbutanoic acid(AHPA)의 2(S)-hydroxyl group이 제거됨으로써 그 활성에 있어서도 큰 차이가 있을 것으로 기대되었다(13). 이 저해물질의 저해역가를 측정된 결과 IC<sub>50</sub> 값이 89.1 µg/ml로(Table 3), 이는 2-hydroxyl group이 구조내에서 중요한 역할을 함을 뒷받침해 준다. 또한 이 저해물질 구조내에 존재하는 dehydroxylated AHPA의 구조는 AHPA의 생합성 과정을 규명하는데 도움이 될 것으로 기대된다. 현재 백혈병 등의 항암 치료제로 사용하고 있는 bestatin(14) 내에도 이 (2S,3R)-AHPA의 구조가 있으며, 이의 화학합성은 D-phenylalanine으로부터 (2S,3R)-APHA와 (2R,3R)-AHPA의 diastereoisomer 혼합물 상태로 이루어지며, 이들의 전체 수율은 약 55%에 달하지만 이 혼합물로부터(2S,3R)-AHPA의 선택적 분리는 N-benzyloxycarbonyl 유도체의 fractional crystallization에 의해 이루어지는 등 상당한 어려움을 안고 있다(15). 따라서 미생물에 의한 chiral compound의 선택적 합성에 관심이 집중되고 있으며, 이를 위해서는 우선 미생물내에서 AHPA의 생합성 경로가 규명되어야 할 것이다. 만약 3-amino-4-phenylbutanoic acid가 먼저 합성되고 그 다음에 hydroxyla-

tion 과정이 일어나는지, 아니면 처음부터 AHPA와 3-amino-4-phenylbutanoic acid가 다른 과정을 통해 합성되는지를 규명한다면 미생물 내에서 AHPA의 생합성 경로를 규명하는데 큰 도움이 될 것이다. 따라서 변이주 N-3 균주로부터 얻은 저해물질이 MR-

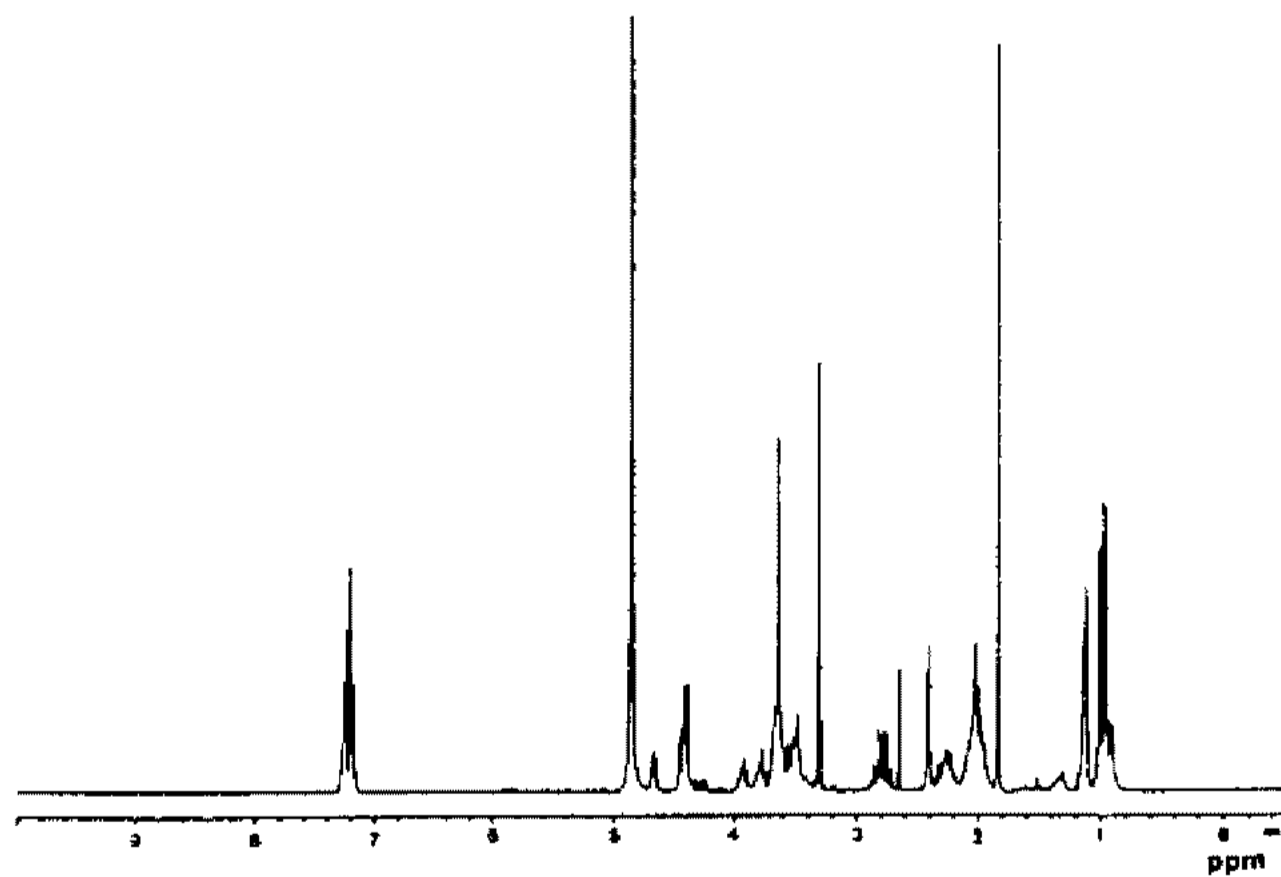
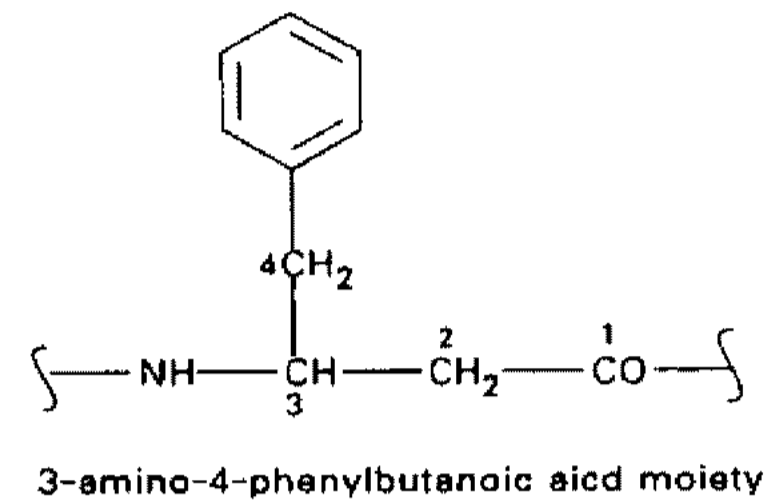


Fig. 3. <sup>1</sup>H-NMR spectrum of the inhibitor from culture broth of mutant N-3 at 300 MHz in CD<sub>3</sub>OD.

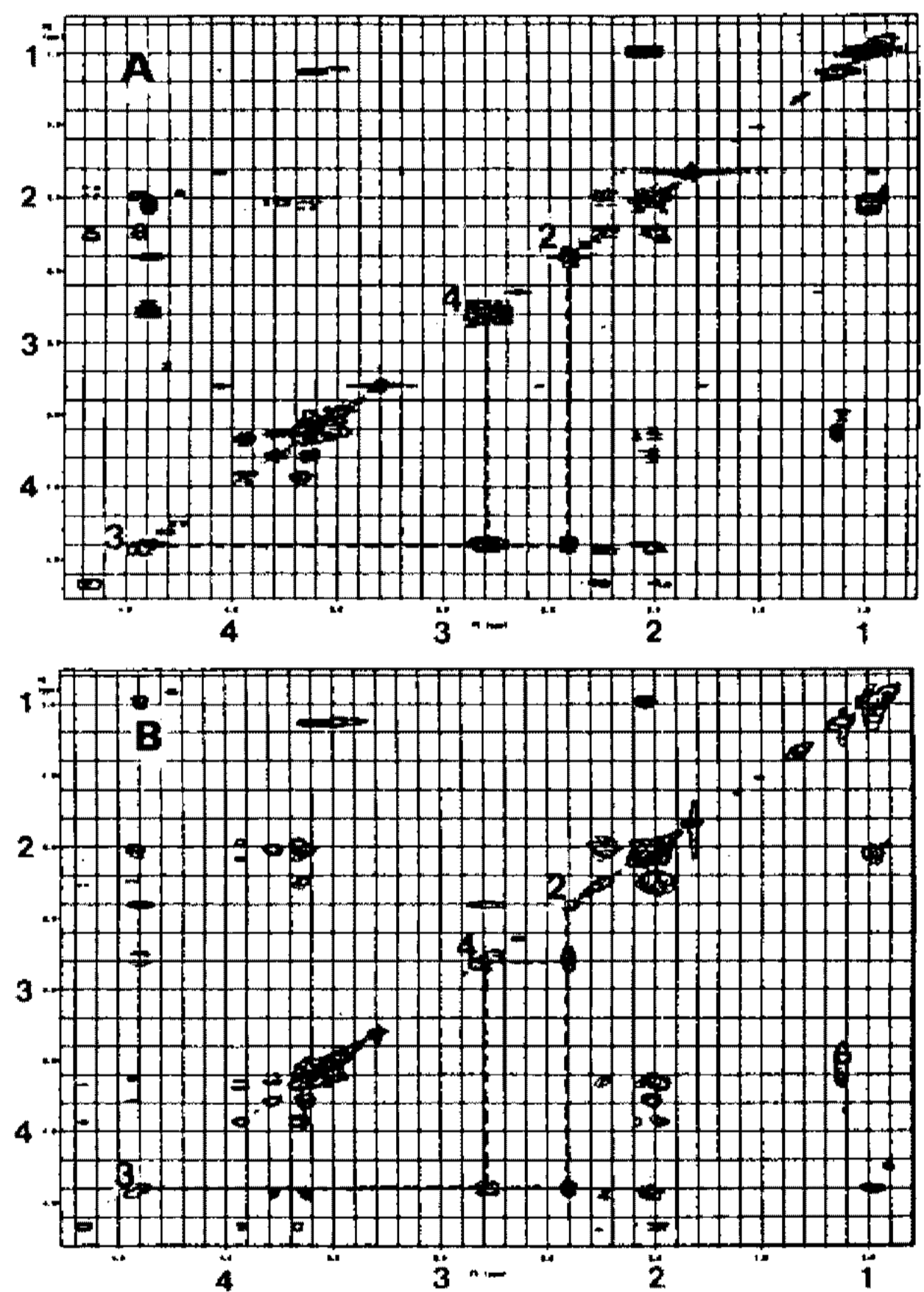


Fig. 4. Partial structure of 3-amino-4-phenylbutanoic acid deduced by <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY (A) and TOCSY (B) spectrum of the inhibitor from culture broth of mutant N-3 at 300 MHz in CD<sub>3</sub>OD.

Table 3. IC<sub>50</sub> values of various AP-M inhibitors containing (2S,3R)-3-amino-2-hydroxy-4-phenylbutanoic acid (AHPA) moiety and purified inhibitor from the culture broth of mutant N-3

Inhibitor	Structure	IC <sub>50</sub> (µg/ml)	Reference
Bestatin	(2S,3R)-AHPA-Leu	6.20	14
Probestin	(2S,3R)-AHPA-Leu-Pro-Pro	0.03	8
MR-387C	(2S,3R)-AHPA-Val-Pro-Leu	0.04	16
Purified inhibitor	—	89.1	this study

387의 생합성 단계의 중간물질인 지의 여부에 대한 연구가 계속되어야 할 것으로 사료된다.

## 요 약

*Streptomyces* sp. SL-387 균주가 생산하는 신규의 aminopeptidase M 저해물질 MR-387A와 B의 생산성은 극히 적어, 이들 물질의 생산성 제고를 위하여 N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine로 돌연변이를 유발시켜 N-3 균주를 선별하고 특성을 조사하였다. 변이주 N-3는 MR-387의 생산량이 wild type보다 6배 가량 높았으며, proline의 antimetabolite인 3,4-dihydro-DL-proline에 저항성을 나타냈다(MIC 25 µg/ml). 특히 이 균주는 포자사슬이 나선형인 wild type과는 달리 직선형으로 형태적 변이가 일어났음을 관찰할 수 있었다. 한편 N-3 균주의 배양액으로부터 aminopeptidase M 저해물질을 분리하고 구조분석을 실시하였다. 이 물질의 aminopeptidase M에 대한 저해활성은 IC<sub>50</sub> 값이 89.1 µg/ml로 다른 저해제들보다 낮았다. 이는 물질의 구조내에 3-amino-4-phenylbutanoic acid moiety가 있어 저해활성을 나타내는 2(S)-hydroxyl group이 구조 내에 없기 때문일 것으로 추론할 수 있었다.

## 참고문헌

- Kenny, A.J. and N.M. Hooper. 1991. Peptidases involved in the metabolism of bioactive peptides. In: *Degradation of bioactive substances; Physiology and pathology* (ed. J. H. Henrickson) Pp. 47-79. CRC Press, Boca Raton.
- Benter, I.F., E.M. Hirsh, A.J. Tuchman, and P.E. Ward. 1990. N-terminal degradation of low molecular weight opioid peptide in human cerebrospinal fluid. *Biochim. Biophys. Acta* **40**: 465-472.
- Aoyagi, T., H. Suda, M. Nagai, K. Ogawa, J. Suzuki, T. Takeuchi, and H. Umezawa. 1976. Aminopeptidase activities on the surface of mammalian cells. *Biochim. Biophys. Acta* **452**: 131-143.
- Kenny, A.J., S.L. Stephenson, and A.J. Turner. 1987. *Mammalian Ectoenzymes*, Pp. 169-210. Elsevier Scientific Publishing, Amsterdam.
- 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.
- Giros, B., C. Gros, B. Solhonne, and J.C. Schwartz. 1985. Characterization of aminopeptidases responsible for inactivating endogenous (Met<sup>5</sup>) enkephalin in brain slices using peptidase inhibitors and aminopeptidase M antibodies. *Mol. Pharmacol.* **29**: 281-287.
- Noble, F., J.M. Soleilhac, E. Soroca-Lucas, S. Turcaud, M.C. Fournie-Zaluski, and B.P. Roques. 1992. Inhibition of the enkephalin-metabolizing enzymes by the first systemically active mixed inhibitor prodrug RB101 induces potent analgesic responses in mice and rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **261**: 181-190.
- 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. Antibiotics* **38**: 1629-1630.
- Aoyagi, T., H. Tobe, F. Kojima, M. Hamada, T. Takeuchi, and H. Umezawa. 1978. Amastatin, an inhibitor of aminopeptidase A, produced by actinomycetes. *J. Antibiotics* **31**: 636-638.
- 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. Antibiotics* **43**: 143-153.
- 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. Antibiotics* **44**: 573-581.
- Chung, M.C., H.K. Chun, H.J. Lee, and Y.H. Kho. 1994. Taxonomic characteristics of strain producing MR-387A and B, new inhibitors of aminopeptidase M, and their production. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **22**: 447-452.
- Tobe, H., H. Morishima, T. Aoyagi, H. Umezawa, K. Ishiki, K. Nakamura, T. Yoshioka, Y. Shimauchi, and T. Inui. 1982. Synthesis and structure-activity relationships of amastatin analogues, inhibitors of aminopeptidase A. *Agric. Biol. Chem.* **46**: 1865-1872.
- Umezawa, H., T. Aoyagi, H. Suda, M. Hamada, and T. Takeuchi. 1976. Bestatin, an inhibitor of aminopeptidase B, produced by actinomycetes. *J. Antibiotics* **29**: 97-99.
- Nishizawa, R. and T. Saino. 1977. Synthesis and structure-activity relationships of bestatin analogues, inhibitors of aminopeptidase B. *J. Med. Chem.* **20**: 510-515.
- Chung, M.C., H.K. Chun, H.J. Lee, and Y.H. Kho. 1995. The novel synthetic substance MR-387 C[(2S,3R)-3-amino-2-hydroxy-4-phenylbutanoyl-L-valyl-L-prolyl-L-leucine] as an aminopeptidase M inhibitor. *J. Biochem. Mol. Biol.* **28**: 83-86.

(Received 17 November 1994)