

Aminopeptidase M 저해제인 Valistatin과 des-Asp⁴-Amastatin을 생산하는 방선균 SL20209의 특성 및 동정

고학룡 · 전효곤 · 정명철 · 서현호¹ · 김홍중² · 박용하² · 고영희*
한국과학기술연구원, 생명공학연구소, 미생물화학연구그룹,
¹응용미생물연구그룹, ²유전자은행

Characterization and Identification of *Streptomyces* SL20209 Producing Valistatin and des-Asp⁴-Amastatin, Two Inhibitors of Aminopeptidase M. Hack-Ryong Ko, Hyo-Kon Chun, Myung-Chul Chung, Hyun-Hyo Suh¹ Hong-Joong Kim², Yong-Ha Park² and Yung-Hee Kho*. *Microbial Chemistry Research Group, ¹Applied Microbiology Research Group, ²Korean Collection for Type Cultures, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, KIST, P.O. Box 115, Yusong, Taejeon 305-600, Korea* – Characterization and numerical identification were carried out for an actinomycetes SL20209. Morphological, cultural and physiological properties of SL20209 which produced valistatin and des-asp⁴-amastatin as inhibitors of aminopeptidase M were evaluated. The isolate was identified to be the genus of *Streptomyces*. Forty-three taxonomic units were analysed by using a TAXON program. The isolate was classified into the major cluster 29 of *Streptomyces* and best-matched to *Streptomyces griseoplanus*.

단백질 분해효소는 생체내에서 소화효소의 작용 뿐만 아니라 종양, 혈액응고, 세포증식, virus 감염, 면역 및 암전이 등 수 많은 생명현상에 관여하며 이들의 생물학적 기능 및 작용기작, 그리고 질병 병발과정에서의 상호관계를 규명하고자 그 저해제의 탐색이 이루어지고 있다(1). Exopeptidase의 일종인 aminopeptidase M(AP-M 또는 AP-N; microsomal leucine aminopeptidase, EC 3.4.11.2)은 peptide의 N-말단으로 부터 단일 아미노산을 유리시키는 효소로서 주로 포유류의 신장 및 소장의 brush border에 존재하는 막-결합효소이다(2). 사람의 경우 정상 및 악성 골수세포와 fibroblast, hepatocytes, epithelial cell의 표면에 존재할 뿐만 아니라 cerebral membrane에도 존재하여 중추 신경계의 opioid peptide인 enkephalin을 불활화 하는 것으로 알려져 있다(3, 4). 모든 aminopeptidases(APs)와 같이 AP-M은 Zn을 함유한 metalloenzyme이며 넓은 기질 특이성을 가지지만 주로 N-말단의 소수성 아미노산 특히, Ala과 Leu에 가장 잘 작용하며 소장 점막에의 결합부위로 추정되는 N-말단에 23개의 소수성 아미노산 영역을 지닌 것으로 밝혀졌다(2). AP-M의 생리적 기능은 체내에서 단백질 소화 중에 소장에 도달한 짧은 peptides로 부터 아미노산을 유리시켜 소장 점막으로 흡수(peptide scavenging)되게 하며(2), 이 외에도 APs는 protein maturation, hormone level regulation 및 cell-cycle 조절 등에 관여한다(5). 최근에는

인체에서 기관지염을 일으키는 coronavirus TGEV 229E(6) 또는 돼지에서 치명적 설사를 유발하는 enteropathogenic coronavirus TGEV(7)의 receptor로 작용하는 것으로 보고되었다. 한편, Umezawa group은 포유 동물세포의 표면에서 APs의 존재를 확인하고(8) 이들 효소들의 저해제를 탐색한 결과, 비임과성 결핵 치료제로 사용되고 있는 최초의 미생물 기원 효소 저해제인 bestatin(9)을 비롯하여 amastatin(10), arphamenines A, B(11), actinonin(12), probestin(13) 및 leuhistin(14) 등을 발견하였으며 Kobaru 등(15)의 Bu-274E 및 Sano 등(16)의 OF4949도 APs 저해제로 알려져 있다. Bestatin은 delayed-type hypersensitivity(DTH)의 증진(17), T-cell의 DNA 대사의 촉진(18), 항종양 활성의 증진(19), 체장 세포 및 macrophage에서 효소활성 저해(20) 그리고 골수 progenitor cell의 분화 촉진(21) 등이 입증되었으며, amastatin, actinonin, arphamenine 및 probestin 등의 면역증강, 무통각 효과 및 autoimmune diseases의 억제 효과도 인정되었다(22).

저자 등은 새로운 구조의 AP-M 저해제 개발을 목적으로 토양 미생물로 부터 AP-M 저해제를 탐색하는 과정에서 저해활성이 우수한 방선균 SL20209를 분리하였다. 이 균주는 신규 구조인 3-amino-2-hydroxy-4-phenylbutanoyl-valyl-valine의 구조를 가지는 valistatin(23)과 des-Asp⁴-amastatin(24)의 두 저해제를 동시에 생산하는 것으로 나타났다. 따라서, 본 논문에서는 이들 두 저해제 생산균주인 SL20209의 각종 형태적, 배양학적, 생리적 특성 및 기타 특성을 조사하고 기존의 방선균과 그 특성을 비교하였으며 TAXON program에 의한 수리 동정을 실시하였기에 이를 보고하고자 한다.

*Corresponding author.

Key words: Inhibitors of aminopeptidase M, actinomycetes, numerical identification, *Streptomyces griseoplanus* SL 20209

재료 및 방법

시약 및 효소

배지류는 Difco 사, 균 동정을 위한 당류, 아미노산, 항생물질, 그리고 arbutin, chitin, allantoin, elastin 및 pectin 등은 Sigma 사 제품을 사용하였다. AP-M 저해 활성 측정용 기질은 합성기질인 L-leucine- ρ -nitroanilide를, AP-M 효소는 hog kidney로부터 분리된 것을 Sigma 사로 부터 구입하였다.

균주 및 배양

본 실험에 사용된 AP-M 저해제 생산 균주로는 분리균 SL20209를 사용하였으며(23), 보존용으로는 Bennett 배지(glucose 10, peptone 2, yeast extract 1, beef extract 1, agar 20, g/l)를, 균주동정을 위하여 Bennett, modified Bennett, nutrient broth, Luria-Bertani(LB) broth, potato-dextrose(PD) 및 ISP 배지 등을 이용하였으며 필요에 따라 항온기 또는 rotary shaking incubator(170 rpm)에서 일정 시간 배양하였다. *Escherichia coli* AB11 513, *Salmonella typhimurium* TV119, *Staphylococcus aureus* R209, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans* 및 *Aspergillus niger*는 생명공학연구소 Screening Room으로 부터 분양받아 사용하였다.

균주의 특성 조사 및 수리동정

분리 균주의 형태학적, 배양학적 및 생리적 특성은 Shiring 등(25)과 Williams 등(26)의 방법과 Bergey's manual of systematic bacteriology(27) 및 Manual of method for general bacteriology(28)의 방법으로 조사하였다.

형태적 특성은 Bennett 배지에서 28°C, 14일간 배양 후 육안 또는 광학 현미경, 그리고 전자현미경(Hitachi, SEM S450)으로 관찰하였다. Diaminopimelic acid(DAP)의 분석은 6N HCl로 열처리된 균사체를 표준 DAP와 같이 methanol-물-5N HCl-pyridine(80 : 15 : 5 : 10)의 전개용매로 TLC(Cellulose 50F, Merck)한 후 ninhydrin 으로 발색시켜 R_f 치를 비교하여 분석하였다. Lecithinase와 lipase는 egg-yolk agar, urease는 Christensen urea agar 배지를 이용하여 판별하였다(27). 탄소원 이용성은 기본배지(NH₄)₂SO₄ 2.64, KH₂PO₄·anhydrous 2.38, K₂HPO₄·3H₂O 5.65, MgSO₄·7H₂O 1.00, g/l)에 Pridhan & Gottlieb trace salts(CuSO₄·5H₂O 0.64, FeSO₄·7H₂O 0.11, MnCl₂·4H₂O 0.79, ZnSO₄·7H₂O 0.15, g/l) l 당 1 ml 첨가한 배지에 각 탄소원(1%, w/v)을 첨가하여 배양하였다. 이 때 탄소원이 첨가되지 않은 배지를 negative, D-glucose가 첨가된 배지를 positive control로 하여 비교하였다(25). 질소원 이용성은 기본배지(D-glucose 10, MgSO₄·7H₂O 0.005, NaCl 0.05, FeSO₄·7H₂O 0.0001, K₂HPO₄ 0.01, g/l)에 각 질소원(0.1%, w/v)을 첨가하였

으며, 기본배지를 negative, L-asparagine이 첨가된 배지를 positive control로 하여 그 생육 정도를 비교하였다(25). 항균활성 검정은 Williams 등(26)의 방법 그리고 항생제에 대한 내성은 Goodfellow & Orchard(29)의 paper-disc 방법으로 각 농도의 항생제에 대한 저해환의 생성을 관찰하였다. 고분자 화합물의 분해 특성은 glucose 대신 glycerol이 든 modified Bennett 배지에 각 화합물을 첨가하고 배양 후 colony 또는 그 아래의 clearing zone의 형성 여부를 관찰하였다(27). 위와 같은 방법으로 조사된 특성을 우선 Bergey's manual(26)에 나타난 방선균의 특성과 비교하고, 한편으로는 *Streptomyces* 속 균주의 특성을 data base화 하여 수리분류 하도록 한 TAXON program(30)을 이용하여 보다 정확한 동정을 시도하였다.

결과 및 고찰

AP-M 저해제 생산균주의 분리 및 특성

생명공학연구소 미생물탐색실로부터 분양 받은 각종 토양 방선균 배양상등액의 AP-M에 대한 저해활성을 조사하여 이 중 강한 저해활성을 나타내는 SL20209 균주를 선별하였다. 균주 SL20209는 Bennett agar plate에서 배양 초기에는 하얀색의 균사를 뿜히면서 자라다가 배양 4일 후부터 서서히 dark brownish grey 색깔의 spore mass를 형성하였으며, 배지내로 뿜은 substrate mycelium은 dark yellowish brown 색깔을 나타내었다(Table 1).

전자 현미경 관찰 결과(Fig. 1), 나선형의 포자사슬을 형성하고 있는 각 포자의 크기는 0.7~0.8×1.0~1.1 μ m 이었으며 표면이 smooth type이고 각 chain 당 20~30 개의 포자를 형성하였다. 균주 SL20209는 25~30°C 범위의 온도에서 생육이 가장 양호하였으며 10°C 및 45°C에서는 전혀 자라지 못 하였고 pH 4.3이나 pH 10.0에서도 양호한 생육을 보였다(Table 2). 이 균주의 전세포 가수분해물은 L, L-diaminopimelic acid(L, L-DAP)를 포함하는 것으로 나타나 방선균 중에서도 *Streptomyces* 속에 속할 것으로 추정되었다. 일반적으로 *Streptomyces* 속은 세포벽의 peptidoglycan 층이 많은 양의 L, L-DAP를 포함하는 것으로 알려져 있다(31). 가용성 색소는 생성

Table 1. Morphological characteristics of SL20209

Color of spore mass	Dark brownish grey
Color of substrate mycelium	Dark yellowish brown
Colony size	Discrete
Spore chain	Spirales
Spore surface ornamentation	Smooth
Spore size	0.7~0.8×1.0~1.1 μ m

*Cells were incubated at 28°C for 14 days in Bennett medium.

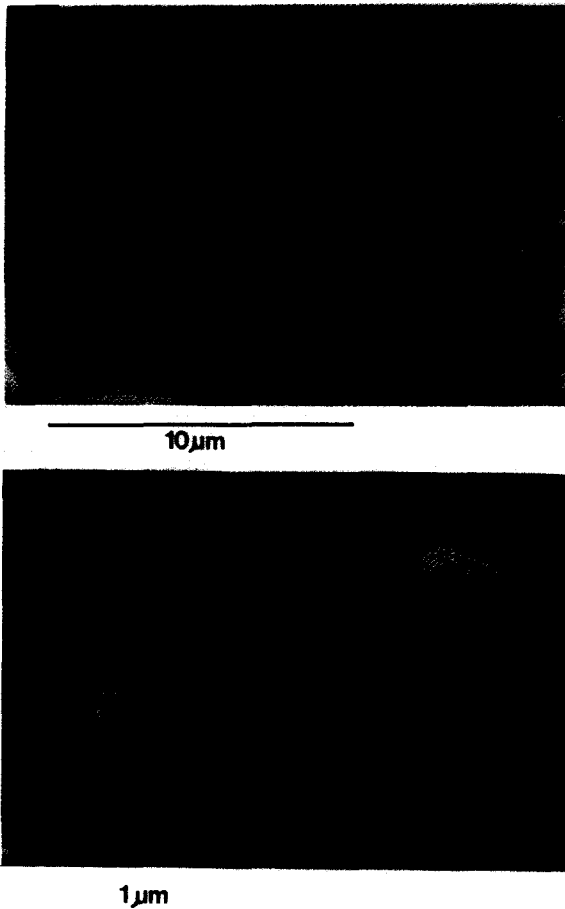


Fig. 1. Electronmicrographs (SEM) of spore chains (upper) and spores (lower) of SL20209.

Table 2. Cultural and physiological properties of SL20209

Growth	
Optimal temp. range	25~30°C
At 10°C	No growth
At 20°C	Growth
At 37°C	Growth
At 45°C	No growth
Optimal pH range	6.5~7.0
At 4.3	Growth
At 10.0	Growth
Diaminopimelic acid	L, L type
Diffusible pigment	Negative
Melanin production on	
Tyrosine agar	Negative
Peptone-yeast iron agar	Negative
Nitrate reduction	Negative
Hydrogen sulfide production	Negative
Catalase	Positive
Lecithinase	Negative
Lipase	Negative
Urease	Positive

*Cells were incubated at 28°C for 14 days.

Table 3. Cultural characteristics of SL20209 in ISP media

Tryptone-yeast extract agar(ISP 1)	G; Poor AM; Poor, pale greenish yellow R; Pale greenish yellow SP; None
Yeast extract-malt extract agar(ISP 2)	G; Abundant AM; Moderate, Dark brownish grey R; Yellowish brown SP; None
Oatmeal agar(ISP 3)	G; Abundant AM; Abundant, Dark brownish grey R; Soft reddish yellow SP; None
Inorganic salts-starch agar(ISP 4)	G; Abundant AM; Abundant, Dark brownish grey R; Yellowish brown SP; None
Glycerol-asparagine agar(ISP 5)	G; Good AM; Abundant, Brownish grey R; Brownish yellow SP; None

*Cells were incubated at 28°C for 14 days.

G; Growth, AM; Aerial mycelium, R; Reverse, SP; Soluble pigment.

하지 않았으며 peptone-yeast extract-iron agar(ISP 6) 및 tyrosine agar(ISP 7) plate에서 melanin 색소도 생성하지 않았다. 질산환원 및 H₂S 생성능이 없었으며 catalase와 urease를 생산하는 반면 lipase나 lecithinase는 생산하지 못하였다.

한편, 각종 ISP 배지에서의 생육을 살펴본 결과(Table 3), 대부분의 배지에서 생육이 양호하였고 기균사의 색깔 및 reverse color가 약간씩 다르게 나타났다. 그러나 tryptone-yeast extract agar(ISP 1) plate에서 생육이 가장 불량하였고 기균사의 색깔도 다른 나머지 배지에서는 모두 brownish grey 계열이지만 pale greenish yellow 색깔을 나타내었다.

균주 SL20209는 D-fructose나 D-mannose 등의 육탄당, L-arabinose와 D-xylose와 같은 오탄당 그리고 D-cellobiose, maltose 및 D-melibiose 등의 이당류를 단일 탄소원으로 하는 배지에서 비교적 양호한 생육을 보였으나 adonitol, meso-inositol, L-rhamnose, D-melezitose,

Table 4. Carbohydrates utilization of SL20209

Adonitol	-	L-Arabinose	+
D(+)-Cellobiose	+	Dextran	-
D-Fructose	+	D-Galactose	+
Inositol(meso-)	-	Inulin	-
D-Lactose	±	Maltose	+
D-Mannitol	+	D-Mannose	+
D-Melezitose	-	D-Melibiose	+
D(+)-Raffinose	+	L-Rhamnose	-
Salicin	±	D-Sorbitol	-
L-Sorbose	-	Sucrose	+
Trehalose	±	Xylitol	+
D-Xylose	+	Sodium acetate	-
Sodium citrate	±	Sodium propionate	-

+, Positive, ±; Weakly positive, -, Negative.

Table 5. Nitrogens utilization of SL20209

D,L- α -Amino- <i>n</i> -butyric acid	-
L-Arginine	+
L-Cysteine	±
L-Histidine	+
L-Methionine	±
L-Phenylalanine	+
L-Serine	+
L-Threonine	+
L-Valine	+
Potassium nitrate	+
L-Asparagine ^a	+

+, Positive, ±; Weakly positive, -, Negative, ^aPositive control.

Table 6. Antimicrobial activities of SL20209

<i>Escherichia coli</i> AB11513	NI
<i>Salmonella typhimurium</i> TV119	NI
<i>Staphylococcus aureus</i> R209	NI
<i>Bacillus subtilis</i>	WI
<i>Candida albicans</i> IFO1594	WI
<i>Aspergillus niger</i>	I

NI; No inhibition, WI; Weakly inhibition, I; Inhibition.

inulin, dextran과 sodium acetate나 sodium propionate는 단일 탄소원으로 이용하지 못하였다(Table 4). 또한 질소원의 이용성에 있어서 D,L- α -amino-*n*-butyric acid를 제외한 대부분의 아미노산을 이용할 수 있었으며 특히 L-asparagine, L-phenylalanine, L-serine 및 L-threonine 등을 포함한 배지에서 다른 질소원에 비해 우수한 생육을 보여 주었다(Table 5).

생산용 배지에서 4일간 진탕배양된 균주 SL20209의 배양여액 40 μ l을 paper disc 법으로 항균활성을 조사해 본 결과(Table 6), *Escherichia coli*나 *Staphylococcus au-*

Table 7. Degradative activities of SL20209

Adenine	+	Allantoin	-
Arbutin	-	Casein	+
Chitin	-	Elastin	-
Gelatin	+	Guanine	+
Hypoxanthine	-	Pectin	-
Starch	+	Tyrosine	+
Xylan	-	Xanthine	-

+, Degradation, -, No degradation.

Table 8. Growth of SL20209 in the presence of chemical inhibitors

Sodium chloride		Crystal violet	
7%	+	0.0001%	+
10%	-	0.001%	-
Phenol		Sodium azide	
0.05%	+	0.01%	±
0.1%	±	0.02%	-

*Cells were incubated at 28°C for 14 days in the modified Bennett medium.

+, Growth, ±; Poor growth, -, No growth.

Table 9. Resistance to antibiotics of SL20209

Antibiotics	MCI ^a (μ g/ml)
Cephalosporin C	>200
Chloramphenicol	>200
Cycloserine(D-)	>200
Erythromycin	<10
Lincomycin	>200
Neomycin	10
Oleandomycin	<10
Penicillin G	>1,590 Units
Rifampicin	50
Tetracycline	>200
Tobramycin	<10

^aMinimal concentration of inhibition.

*reus*와 같은 Gram 음성 세균을 제외한 *Bacillus subtilis*, *Candida albicans* 및 *Aspergillus niger*의 생육을 저해하였다. 각종 단일 또는 고분자 복합체들의 분해능을 조사해 본 결과(Table 7), adenine, gelatin, casein 및 guanine 등의 분해활성은 확인되었으나 arbutin, allantoin 및 elastin 등은 분해하지 못하는 것으로 나타났다. 또한, 균주 SL20209는 7% 농도의 NaCl에서 자랄 수 있었으며 0.1% phenol이나 0.01% sodium azide에서도 미약하지만 생육이 가능하였다(Table 8).

한편, 각종 항생제에 대한 내성을 조사한 결과(Table 9), 세포벽 합성을 저해하는 cephalosporin C 및 penicillin G와 같은 β -lactam 계열의 항생물질에는 강한 저항

Table 10. Identification of the isolate SL20209 to the major clusters of *Streptomyces* by TAXON program

Major Taxon	Taxon distance	95% Taxon radius	% Prob. of strain further away	Willcox probability
29 (<i>Streptomyces lydicus</i>)	0.4225	0.3805	0.2222	0.999551
31 (<i>Streptomyces antibioticus</i>)	0.4928	0.4108	0.0069	0.000336
19 (<i>Streptomyces diasticus</i>)	0.5035	0.4644	0.5231	0.000112

Table 11. Identification of HMO, centrotpe, best-matched strain, outer-most member and the isolate SL20209 to the major cluster 29 by TAXON program

Members of cluster 29	Taxon distance	95% Taxon radius	% Prob. of strain further away	Willcox probability
SL20209	0.4225	0.3805	0.2222	0.999551
HMO	0.1986	0.3805	99.9807	>0.999999
Centrotpe (<i>Streptomyces sioyaensis</i>)	0.2374	0.3805	99.2684	>0.999999
Best-matched strain (<i>Streptomyces griseoplanus</i>)	0.3399	0.3805	31.3235	>0.999999
Outer-most member (<i>Streptomyces platensis</i>)	0.4078	0.3805	0.7665	>0.999999

Table 12. Comparison of taxonomic unit characters between member organisms in cluster 29 of *Streptomyces* and SL20209 by TAXON program

Taxonomic unit characters	% Value in cluster 29	Isolate	HMO in cluster 29	Centrotpe in cluster 29 ^a	Best-matched strain ^b	Outer-most member ^c
RFS	1	-	-	-	-	-
SPI	99	+	+	+	+	+
RED	9	-	-	+	-	+
GRY	91	+	+	+	+	-
ROS	1	-	-	-	-	-
PIG	1	-	-	-	-	-
YBP	1	-	-	-	-	-
MPI	1	-	-	-	-	-
MTY	1	-	-	-	-	-
BUT	9	-	-	-	-	+
CYS	45	-	-	-	-	-
VAL	27	+	-	-	+	-
PHE	99	+	+	+	+	+
HIS	36	+	-	-	+	-
LEC	64	-	+	+	-	+
LIP	18	-	-	-	-	-
PEC	1	-	-	-	-	-
NO3	9	-	-	-	-	+
H2S	1	-	-	-	-	-
SUB	73	+	+	+	+	+
ALB	27	+	-	-	-	-
NIG	99	+	+	+	+	+
ELA	36	-	-	-	-	-
XAN	82	-	+	+	-	-
ARB	99	-	+	+	+	+
NEO	18	-	-	-	-	-
RIF	9	-	-	-	-	-
OLE	9	-	-	-	-	-
PEN	91	+	+	+	+	-
45C	1	-	-	-	-	-

Table 12. Continued

Taxonomic unit characters	% Value in cluster 29	Isolate	HMO in cluster 29	Centrotype in cluster 29 ^a	Best-matched strain ^b	Outer-most member ^c
7NA	55	+	+	+	+	-
01Z	18	-	-	+	-	-
PHN	9	-	-	-	-	-
SUC	73	+	+	+	+	+
INO	91	-	+	+	-	+
MAN	91	+	+	+	-	+
RHA	18	-	-	-	-	-
RAF	82	+	+	+	+	+
MEZ	82	+	+	+	+	+
ADO	82	-	+	+	+	-
MEB	82	+	+	+	+	+
DEX	1	-	-	-	-	-
XYT	55	+	+	-	+	+
Matched		43	35	32	39	31
Mismatched		0	8	11	4	12
SSM value (%)		100	81	74	91	72
Willcox probability		0.999551	>0.999999	>0.999999	>0.999999	>0.999999

^a*S. sioyaensis*, ^b*S. griseoplanus*, ^c*S. platensis*.

성을 보인 반면, erythromycin이나 oleandomycin과 같은 macrolide 항생물질에는 매우 낮은 저항성을 보였다.

균주 SL20209의 특성 비교 및 수리동정

이상의 형태학적, 배양학적, 생리학적 및 기타특성을 토대로 균주 SL20209는 방선균 중 *Streptomyces* 속에 속하는 균주임을 알 수 있었다. 한편, *Streptomyces* 속으로 동정된 균주 SL20209의 특성을 *Streptomyces* 균주의 특성을 data base화 하여 수리분류하도록 한 TAXON program(30)을 이용하여 본 균주의 수리동정을 실시하였다. Table 10에서 보는 바와 같이 SL20209는 TAXON program의 주군집(major cluster)들 중 군집 29(*Streptomyces lydicus*)에서 Willcox probability가 0.999551 이상이며 다른 주군집들 보다도 월등히 높으므로 우선 본 균주가 주군집 29에 속할 가능성이 높을 것으로 추정되었다(26, 32). 또한, 분리주 SL20209의 Taxon distance (0.4225)가 주군집 29의 95% Taxon radius(0.3805)보다 크고 또한, 주군집 29의 최외곽 member(out-most member)의 Taxon radius(0.4078)보다 큰 것으로 나타났다(Table 11). 또한, % probability of strain further away (0.2222)가 매우 낮은 것으로 보아 군집 29에는 속하나 29 군집의 기존 member보다는 중심으로부터는 더 멀리 떨어져 있을 것으로 판단되었다.

주군집 29에는 11주의 *Streptomyces* 균주가 포함되어 있으며(26) 이 중 *Streptomyces griseoplanus*가 본 분리 균주 SL20209와 가장 근접된 균주(best-matched strain)로 나타났다. 분리주 SL20209를 가장 근접된 균주인 *St-*

reptomycetes griseoplanus, centrotype인 *S. sioyaensis* 등과의 Taxon characters 및 SSM 치를 비교한 결과를 Table 12에 나타내었다. 이들 중 분리주 SL20209와 가장 근접된 균주인 *S. griseoplanus* 두 균주 사이의 SSM(simple matching coefficient) 값이 다른 균주들보다 가장 높은 91로 나타났다. 이들 특성을 Bergey's manual of systematic bacteriology Vol. 4(27)의 여러 *Streptomyces* 속 균주들과 비교해 본 결과 *Streptomyces lydicus*와 매우 유사함을 알 수 있었다(data not shown). 그러나, SL20209는 *S. lydicus*와 형태적 및 생리적 특성에서는 거의 일치하였으나 xanthine 분해능과 L-cysteine, L-valine 및 meso-inositol의 이용성에서 서로 상반된 결과를 보여 *S. lydicus*와 유사하나 동일 균주가 아닌 것으로 판단되었다.

따라서, 방선균 분리주 SL20209는 TAXON program에 의한 수리동정 결과 주군집 29에 속하는 *S. griseoplanus*로 동정할 수 있으나 Taxon distance 등에서 큰 차이를 보이므로 *S. griseoplanus*의 한 종일 것으로 판단되었다.

요 약

Aminopeptidase M 저해제인 valistatin과 des-asp⁴-amastatin을 생산하는 방선균 분리주 SL20209의 특성을 조사하고 수리동정을 실시하였다. 형태적, 배양학적 및 생리적 특성으로부터 SL20209는 방선균 중에서도 *Streptomyces* 속에 속하는 것으로 나타났으며, 43개의 분류 단위 특성으로 TAXON program을 이용하여 수리동정한

결과, 주균집 29의 *Streptomyces* 중 *Streptomyces griseoplanus*와 가장 근접한 것으로 나타났다. 따라서, 분리주 SL20209를 *S. griseoplanus* SL20209로 동정하였다.

참고문헌

- Aoyagi, T. 1990. Small molecular protease inhibitors and their biological effects. Pp. 312-363. In H. Klein-kauf & H. Dohren (eds.), *Biochemistry of Peptide Antibiotics*, Walter de Gruyter, Berlin.
- 鶴大典, 船津勝. 1993. 蛋白質 分解酵素 II. 生物化學實驗法 31. Pp. 18-29. 學會出版센터 (日本).
- Giros, B., C. Gros, B. Solhome, and J.-C. Schwartz. 1986. Characterization of aminopeptidase responsible for inactivating endogenous Met⁵ enkephalin in brain slices using peptidase inhibitors and anti-aminopeptidase N antibodies. *Mol. Pharmacol.* **29**: 281-187.
- Gros, C., B. Giros, and J.-C. Schwartz. 1985. Identification of aminopeptidase M as an enkephalin-inactivating enzyme in rat cerebral membrane. *Biochem.* **24**: 2179-2185.
- Taylor, A. 1993. Aminopeptidases: towards a mechanism of action. *TIBS* **18**: 167-172.
- Yeager, C.L., R.A. Ashmum, R.K. Williams, C.B. Cardellicchio, L.H. Shapiro, A.T. Look, and K.V. Holmes. 1992. Human aminopeptidase N is a receptor for human coronavirus 229E. *Nature* **357**: 420-422.
- Delmans, B., J. Gelfi, R. L'Haridon, L.K. Vogel, H. Sjöström, O. Norén, and H. Laude. 1992. Aminopeptidase N is a major receptor for the enteropathogenic coronavirus TGEV. *Nature* **357**: 417-420.
- Aoyagi, T., H. Suda, M. Nagai, K. Ogawa, J. Sizuki, T. Takeuchi, and H. Umezawa. 1976. Aminopeptidase activities on the surface of mammalian cells. *Biochem. Biophys. Acta.* **452**: 131-143.
- 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.
- 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.
- Umezawa, H., T. Aoyagi, S. Ohuchi, A. Okuyama, H. Suda, T. Takita, M. Hamada, and T. Takeuchi. 1983. Arphamenines A and B, new inhibitors of aminopeptidase B, produced by bacteria. *J. Antibiotics* **36**: 1572-1575.
- 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.
- Yoshida, S., Y. Nakamura, H. Naganawa, T. Aoyagi, and T. Takeuchi. 1990. Probestin, a new inhibitor of aminopeptidase M, produced by *Streptomyces azureus* MH663-2F6. II. Structure determination of probestin. *J. Antibiotics* **43**: 149-153.
- Yoshida, S., H. Naganawa, T. Aoyagi, T. Takeuchi, and Y. Kodama. 1991. Leuhistin, a new inhibitor of aminopeptidase M, produced by *Bacillus laterosporus* BMI156-14F1. II. Structure determination of leuhistin. *J. Antibiotics* **44**: 579-581.
- Kobaru, S., M. Tsunakawa, M. Hamada, M. Konishi, K. Tomita, and H. Kawaguchi. 1983. Bu-2743E, a leucine aminopeptidase inhibitor, produced by *Bacillus circulans*. *J. Antibiotics* **36**: 1396-1399.
- Sano, S., K. Ikai, H. Kuroda, T. Nakamura, A. Obayashi, Y. Ezure, and H. Enomoto. 1986. OF4949, new inhibitors of aminopeptidase B. I. Taxonomy, fermentation, isolation and characterization. *J. Antibiotics* **39**: 1674-1684.
- Umezawa, H., M. Ishizuki, T. Aoyagi, and T. Takeuchi. 1976. Enhancement of delayed-type hypersensitivity by bestatin, an inhibitor of aminopeptidase B and leucine aminopeptidase. *J. Antibiotics* **29**: 857-859.
- Müller, W.E.G., R.K. Zahn, J. Arendes, N. Munsch, and H. Umezawa. 1979. Activation of DNA metabolism in T-cells by bestatin. *Biochem. Pharmacol.* **28**: 3131-3137.
- Abe, F., K. Shibuya, J. Ashizawa, K. Takahashi, H. Horinishi, A. Matsuda, M. Ishizaka, T. Takeuchi, and H. Umezawa. 1985. Enhancement of antitumor effect of cytotoxic agents by bestatin. *J. Antibiotics* **38**: 411-414.
- Kuramochi, H., A. Motegi, M. Iwabuchi, A. Takahashi, H. Horinishi, and H. Umezawa. 1987. Action of ubenimex on aminopeptidase activities in spleen cells and peritoneal macrophages from mice. *J. Antibiotics* **40**: 1605-1611.
- Ishizuki, M., T. Aoyagi, T. Takeuchi, and H. Umezawa. 1981. Activity of bestatin: Enhancement of immune responses and antitumor effect. Pp. 17-38. In H. Umezawa (ed.), *Small molecular immunomodifiers of microbial origin: fundamental and clinical studies of bestatin*, Japan Scientific Societies Press, Tokyo.
- Aoyagi, T. and T. Takeuchi. 1989. Low molecular weight enzyme inhibitors produced by microorganisms. Chap. 12. Pp. 101-107. In A.L. Demain et al. (eds.), *Novel microbial products for medicine and agriculture*, Society for Industrial Microbiology, Tokyo.
- Ko, H.R., H.K. Chun, M.C. Jung, and Y.H. Kho. 1995. Valistatin (3-amino-2-hydroxy-4-phenylbutanoyl-valyl-valine), a new aminopeptidase M inhibitor, produced by *Streptomyces* sp. SL20209. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **5**: 36-40.
- Ko, H.R., H.K. Chun, S.H. Kim, N.K. Sung, and Y.H. Kho. 1995. des-Asp⁴-amastatin, MRK-22 as an inhibitor of aminopeptidase M produced by *Streptomyces* sp. SL 20209. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **5**: 154-157.
- Shirling, E.B. and D. Gottlieb. 1966. Method for characterization of *Streptomyces* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **16**: 313-340.
- Williams, S.T., M. Goodfellow, G. Alderson, E.M.H. Wellington, P.H.A. Sneath, and M.J. Sackin. 1983. Nu-

- merical classification of *Streptomyces* and related genera. *J. Gen. Microbiol.* **129**: 1743-1813.
27. Locci, R. 1989. *Streptomyces* and related genera, Pp. 2451-2492. In S.T. Williams, M.E. Sharpe, and J.G. Holt (eds.), *Bergey's manual of systematic bacteriology* Vol. 4. Williams & Wilkins, Baltimore.
28. Smibert, R.M. and N.R. Krieg. 1981. General characterization. Chap. 20. In P. Gerhart *et al.* Pp. 409-443. *Manual of method for general bacteriology*. American Society for Microbiology, Washington.
29. Goodfellow, M. and V.A. Orchard. 1974. Antibiotic sensitivity of some nocardioform bacteria and its value as a criterion for taxonomy. *J. Gen. Microbiol.* **83**: 375-387.
30. Willcox, W.B., S.P. Lapage, S. Bascomb, and M.A. Curtis. 1973. Identification of bacteria by computer: theory and programming. *J. Gen. Microbiol.* **77**: 317-330.
31. Lecheralier, H.A. and M.P. Lecheralier. 1970. Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **20**: 435-443.
32. Williams, S.T., M. Goodfellow, E.M.H. Wellington, J.C. Vickers, G. Alderson, P.H.A. Sneath, M.J. Sackin, and A.M. Mortimer. 1983. A probability matrix for identification of some *Streptomyces*. *J. Gen. Microbiol.* **129**: 1815-1830.

(Received 15 September 1995)