

Cathepsin B 저해물질을 생산하는 *Streptomyces misakiensis*의 동정 및 저해물질의 분리

한길환 · 김상달*
영남대학교 응용미생물학과

Identification of *Streptomyces misakiensis* Producing Cathepsin B Inhibitor and the Purification of Inhibitor.
Han, Kil-Hwan and Sang-Dal Kim*. Department of Applied Microbiology, Yeungnam University, Kyongsan 712-749, Korea - A strain of Actinomycetes producing cathepsin B inhibitor was isolated from soil and identified as *Streptomyces misakiensis*. The product of *S. misakiensis* inhibited effectively cathepsin B proteinases as well as trypsin and papain. The cathepsin B inhibitor were largely produced with incubation for 4 days. The *S. misakiensis* was the most growth with incubation for 5 days. The cathepsin B inhibitor was isolated from the extraction of both with butanol, ethanol and chloroform, and following several column chromatography such as sephadex G-15, silica gel 60 and sephadex LH-20 chromatography. The molecular weight of purified inhibitor was 138 dalton.

Key words: Cathepsin B inhibitor, *S. misakiensis*

포유동물의 조직세포 내에 존재하는 lysosome은 외부로부터의 병원성세균의 침입, 세포내외에 불필요한 단백질의 소화 흡수 등을 하는 여러 가지 종류의 가수분해효소를 함유하는 세포내의 소 기관이다[4,5,12,15]. 이와 같은 lysosomal 가수분해효소들 중 대표적인 cysteine 계 단백질분해효소인 cathepsin B는 간, 비장, 포피선, 폐, 부갑상선, 뇌, 심장 등 여러 조직세포 내에 존재하며 여러 가지 생리적 조절작용 및 면역작용에 관여하고 있다[10,11,16,19]. Cathepsin B는 양도 아주 많이 함유하고 있을 뿐만아니라 활성에 의한 영향도 다른 단백질 분해효소보다 높은 것으로 알려져 있다. 이와 같은 cathepsin B의 이상발현은 포유동물 조직세포내의 기저막을 분해하여 암전이 및 염증반응의 원인이 되고, 면역작용에 관계하여 류머티즈 관절염등의 면역 관련 질병과 노인성 치매 등의 발병에 관여한다는 보고가 있다 [6,8,14,18].

이러한 cathepsin B 단백질 분해효소의 과다 발현을 억제하기 위한 저해물질 개발이 꾸준히 시도되고 있으며[7,9], 특히 leupeptin[1], antipain[21], E-64[20], β -MAPI[23], chymostatin[22] 등의 단백질저해물질들이 미생물로부터 개발되어 사용되고있으나, 이들 저해물질들은 cathepsin B에 대한 저해력이 낮을 뿐만아니라 인체 내에서 다른 효소에도 영향을 미쳐 부작용이 있는 것으로 밝혀졌다. 따라서 cathepsin B에 특이적으로 저해하는 새로운 저해물질의 개발이 절실히 필요하다.

본 연구는 토양내의 방선균으로부터 cathepsin B를 특이적으로 저해하는 새로운 저해제 개발을 시도하였으며 이를 위하여 전국 각지의 토양으로부터 방선균을 분리하여 lysosomal cathepsin B를 저해하는 균주를 분리하여 그 균주를 동정하였으며 저해물질 생산성에 미치는 각종배양 조건을 확인하였고 이 물질을 정제하였다.

재료 및 방법

균주, 효소 및 기질

전국 각 지역의 토양으로부터 cathepsin B 효소에 대한 저해력이 있는 균주를 선별하기 위하여 분리한 방선균 500여 균주를 Bennett's 배지 (glucose 10g, peptone 2g, yeast extract 1g, malt extract 1g, agar 20g을 11 ml에 녹인 후 pH 7.0로 조정)에 접종하여 방선균 보관용 배지로 사용하였다.

Cathepsin B는 bovine으로부터 추출한 Sigma사 제품을 사용하였으며 papain, α -chymotrypsin, plasmin, trypsin, pepsin, aminopeptidase M 등의 효소 또한 Sigma사 제품을 사용하였다. 효소에 적합한 기질로는 N α -CBZ-L-lysine *p*-nitrophenyl ester HCl (CLN), haemoglobin, casein, L-leucine-*p*-nitroanilide으로 Sigma사의 제품을 사용하였으며, pyroGlu-Phe-Lys-pNA.HCl은 DiaPharma 제품을 사용하였다.

균주의 배양 및 저해물질 생산

Cathepsin B 저해물질을 가장 강하게 생산하는 방선균으로 선별된 균주 KH-11로부터 lysosomal cathepsin B 저해물질 생산을 위하여서는 저해물질 생산용 배지인 glucose 20g, peptone 3g, K₂HPO₄ 0.5g, MgSO₄·7H₂O 0.5g, NaNO₃

*Corresponding author

Tel. 82-53-810-2395, Fax. 82-53-811-4319
E-mail: sdkim@yeungnam.ac.kr

0.5 g, NaCl 0.5 g을 물 1에 녹여 pH 7.0으로 조절하여 사용하였다. 제조된 cathepsin B 저해물질 생산배지에 종 배양한 균주를 1% 되게 집중한 후 4 일 동안 28°C에서 배양하였다. 배양액은 Whatman No. 2로 균체를 여과한 후 배양액을 80°C에서 10분간 가열한 후 저해력을 조사하였다. 또한 균체의 건조중량은 Whatman No. 2 여과지로 균체를 여과 한 후 105°C에서 1 시간 건조한 후 측정된 무게를 3번 반복하여 측정된 평균값을 건조 중량으로 하였다.

Cathepsin B 저해물질의 활성도 측정

Cathepsin B 저해물질의 활성도 측정은 분광광도계의 1 ml cuvette 내에 25 mM sodium acetate buffer (pH 5.2) 에 1 mM EDTA를 녹인 incubation buffer 0.8 ml를 넣고, 기질로 N α -CBZ-L-lysine *p*-nitrophenyl ester HCl (CLN) 5.22 mM을 dimethylsulfoxide에 녹여 50 μ l 용액을 사용하여 반응시켰으며 저해물질용액은 100 μ l를 취하여 반응시켰다. CLN 기질은 326 nm에서 25°C 에서 반응시간에 따라 반응시킨 후 저해활성의 기율기 값(*V*₀)을 이용하여 저해 활성도를 측정하였다[2,3].

저해물질이 첨가되지 않은 기질과 효소의 반응을 A, 기질과 효소 그리고 저해물질을 첨가한 반응을 B, 효소가 첨가되지 않은 기질과 저해물질의 반응을 C라고 할 때 저해 활성도를 다음 식으로 계산하였다.

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

Cathepsin B 저해물질의 추출 및 정제

분리균주 KH-11 로 부터 생산되는 cathepsin B 저해물질을 추출, 정제하기 위하여 생산배지 2l 삼각 플라스크에 11 배지를 만든 후 전 배양시킨 균주를 1%되게 집중하여 170 rpm으로 28°C에서 4 일간 진탕 배양하였다. 그 배양 여액을 Whatman No. 2로 여과한 후 여액을 80°C에서 10분간 열을 가한 후 Fig. 1에서와 같은 방법으로 정제 과정을 수행하였다.

분석

분리, 정제된 cathepsin B 저해물질의 성질을 알기 위하여 자외선 분광기(Spectrophotometer), high performance liquid chromatography(HPLC), thin layer chromatography (TLC)등을 이용하여 조사하였으며, 물질의 구조를 구명하기 위하여 질량분석기 (Mass spectrometry, MS), 적외선 분광기 (Infrared, IR)를 이용하여 그 물질의 분자량 및 반응을 측정하였다.

결과 및 고찰

Cathepsin B 저해물질의 효소 저해력 확인

토양으로부터 분리한 500여 균주의 방선균으로부터 1차로 cathepsin B 저해력이 있는지를 확인 한 결과 7균주가 저해력이 있음을 확인하였다. 그 7균주 중 저해력이 가장 뛰어난 균주를 선별하기 위하여 cathepsin B에 대한 저해력을 조사하여 본 바 Fig. 2에서와 같이 KH-11 균주가 91%로 다른 균주에 비하여 cathepsin B에 대한 저해력이 가장 높게 나타났다.

균주의 동정

Cathepsin B에 대한 효소 저해력이 강한 KH-11 균주는 Bergey's[17]에 준하여 동정하였다. 분리한 균주의 형태학적

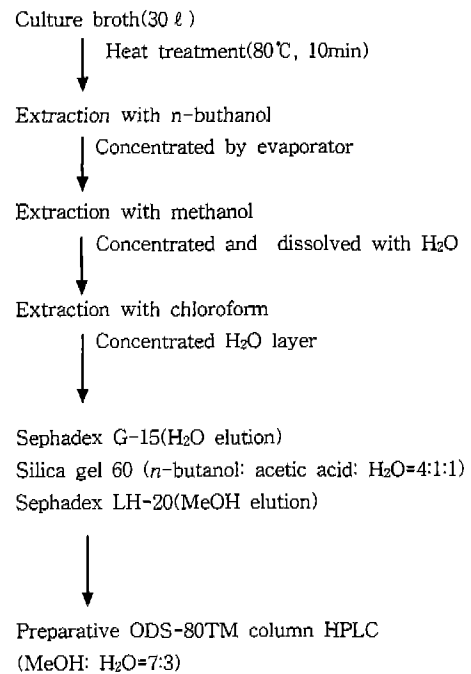


Fig. 1. Purification procedure for the cathepsin B inhibitor.

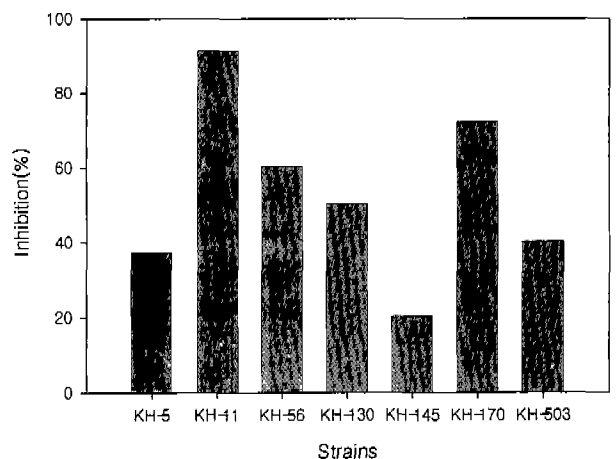


Fig. 2. Inhibition of cathepsin B by Actinomycetes strains isolated from soil samples.

특성을 조사하기 위해 방선균의 포자형성 및 형태 확인용 배지인 Inorganic salts starch agar (ISP 4) 배지를 이용하여 5일 동안 28°C에서 배양시킨 후 주사형 전자현미경 (SEM) 으로 관찰한 결과 Fig. 3와 같은 형태로 나타났다. 선발된 균주는 포자형태가 smooth하고 포자의 사슬이 rectiflexibles 하게 나타났다. 방선균내의 세포벽 성분인 diaminopimelic acid (DAP)의 구성성분은 LL-DAP로 구성되어 있음을 확인하였으며, 또한 Lechevalier에 의한 방법 [13]으로 세포내 당의 특징을 조사한 결과 *Streptomyces* 속의 특징인 당이 C의 형태로 특이한 당을 확인 할 수 없었다 (data를 나타내지 않았음). 이와 같은 결과로 본 균주는 *Streptomyces* 속임을 확인 할 수 있었다.

본 분리 균주의 동정을 위한 배양 및 생리적 특성은 Table 1에 나타난 것과 같이 10°C에서는 성장하였으나 45°C에서는 성장하지 않았으며 elastin과 xantine등의 고분자 물질도 분해 할 수 있었으며 *Bacillus subtilis*, *Streptomyces murinus* 에 대해 저해력도 확인할 수 있었다. Rifampicin, penicillin G 항생제에 대해 내성이 없었으며 NaCl, sodium azide, phenol, potassium tellurite에도 성장하지 않았다.

Lecitinase, lipolytic enzyme 등의 지방분해효소는 생산되지 않았으나 chitin, pectin, starch 등의 당 분해효소와 casein 및 gelatin 등의 단백질 분해효소를 생산하였다 (data를 나타내지 않았음).

그 외에 생화학적인 조사로서 hydrogen sulfide production, catalase에 대해 양성으로 나타났으며 nitrate reduction, indole production에 대해 음성으로 나타났다. 선발 균주의 당 이용은 meso-inositol, mannitol, L-rhamnose 그리고 D-melibiose 등에 이용이 약한 반면 sucrose, raffinose에 대한 이용성은 양성으로 나타났다. 질소 이용성은 phenylalanine에 대해 이용성이 좋은 반면 histidine에는 생육력이 약했다. 이와 같이 나타난 결과를 이용 Bergey's 의 방법 [17]에 따라 방선균 균주와의 연관성 및 일치도를 확인하여 본 결과 Table 1에서와 같이 *Streptomyces misakiensis*에 속하는 것으로 동정되었다.

Lysosomal cathepsin B 저해물질을 생산하는 *S. misakiensis* 는 기존에 leupeptin, antipain, E-64 등의 단백질 분해효소 저해제를 생산하는 것으로 알려지지 않은 새로운 분리균이었다.

Table 1. Taxonomical characteristic of isolated strain KH-11

Characteristic	Isolated strain	<i>S. misakiensis</i>
Whole-cell sugar pattern	Not detected (ND)	ND
Wall chemotype	LL-diaminopimelic acid	LL-diaminopimelic acid
Spore chain morphology	Rectiflexible	Rectiflexible
Spore surface ornamentation	Smooth	Smooth
Color of spore mass	Gray-Brown	Gray
Diffusible pigment produced	+	+
Growth at 10°C	+	ND
Growth at 45°C	-	-
Antibiosis against		
<i>Bacillus subtilis</i>	+	+
<i>Streptomyces murinus</i>	+	+
Elastin degradation	+	+
Xanthine degradation	+	+
Resistance to rifampicin (50 µg/ml)	-	-
Resistance to penicillin G (10 i.u.)	-	-
Growth with (% w/v)		
NaCl(7.0)	-	-
Sodium azide(0.01)	-	-
Phenol(0.1)	-	-
Potassium tellurite (0.001)	-	+
Utilization of		
L-Phenylalanine	+	+
L-Histidine	+	+
Sucrose	+	+
meso-Inositol	-	-
Mannitol	-	-
L-Rhamnose	-	-
Raffinose	+	+
D-Melibiose	-	-

기타 protease들에 대한 저해활성

S. misakiensis KH-11가 생산하는 lysosomal cathepsin B 단백질 분해효소저해물질이 다른 여러 효소에 대한 저해력이 어떠한지 그 저해 spectrum을 조사한 결과 Table 2에서 나타난 것과 같이 cysteine계 단백질 분해 효소인 cathepsin B, papain 과 serine계 단백질 분해 효소인 trypsin에 저해력을 확인 할 수 있었으나 pepsin, α -chymotrypsin, aminopeptidase M, plasmin등의 효소에서는 억제력이 없었다. 이와 같은 결과는 leupeptin이 plasmin, papain, trypsin 그리고 cathepsin B를 저해하는 것으로 나타난 것과 antipain이 cathepsin A 와 B, trypsin, papain을 저해하는 것과 조금 상이하게 나타났다.

배양시간에 따른 저해물질 생산

S. misakiensis KH-11 균주가 생산하는 cathepsin B 저해물질의 배양시간에 따른 최적조건을 조사하기 위해 종 배양한 균주의 1%를 접종하여 배양시간에 따라 저해물질의

Table 2. Effect of cathepsin B inhibitor isolated in this study on various proteases

Proteolytic enzyme	Substrate	Inhibition ^a
Plasmin	pyroGlu-Phe-Lys-pNAHCl	-
Pepsin	haemoglobin	-
Cathepsin B	CLN ^b	+
Papain	casein	+
Trypsin	casein	+
α -chymotrypsin	casein	-
Aminopeptidase M	L-leucine- <i>p</i> -nitroanilide	-

a: +: Inhibited more than 50%, -: Inhibited less than 50%

b: N α -CBZ-L-lysine *p*-nitrophenyl ester HCl

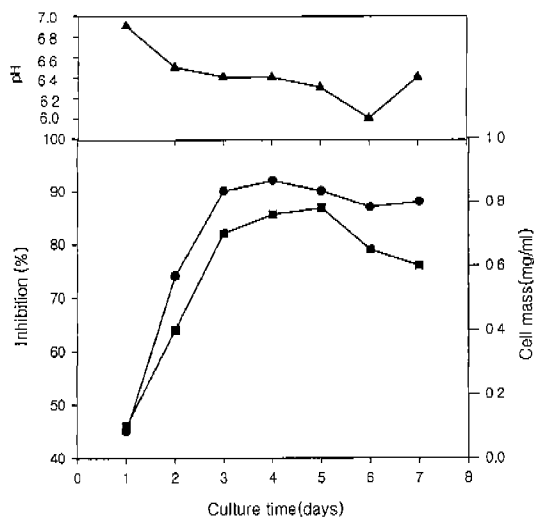


Fig. 4. Effect of cultural time of *S. misakiensis* KH-11 on the production of cathepsin B inhibitor.

(●): Inhibition, (■): Cell mass. (▲): pH

생산에 따른 변화를 조사하여본 결과 Fig. 4에서 나타난 것과 같이 3일 이상 배양할 경우 cathepsin B 저해물질 생산율이 90%이상 증가하였으며 4일 배양했을 경우 91% 저해율을 나타냈다. 균체의 성장률은 5일 배양했을 때 균체의 건조중량이 가장 높게 나타났다.

균체의 성장률과 저해물질 생산과의 차이점은 균체의 생장은 5일 배양했을 때 가장 높은 증기를 보인 반면 저해물질 생산은 4일 배양했을 때 가장 높게 나타났다. 이러한 결과로 이 저해물질은 균체의 성장 후 2차 대사에 의해 생성된 물질이기보다 중간대사산물인 것으로 사료된다. 또한 균체 배양에 의한 배양물질의 pH 변화를 조사하여 본 결과 균체가 성장할수록 약산성에 가까웠으며 6일 이후 pH가 증가하는 현상을 확인 할 수 있었다. 이러한 결과로 pH가 저해력에 어떠한 영향을 주는 것은 아닌 것으로 생각된다.

Cathepsin B 저해물질의 정제 및 기기분석

S. misakiensis 균주가 생산하는 cathepsin B 저해물질을 Fig. 1에 따라 정제 과정을 수행하여 HPLC를 이용하여 측정 한 결과 Fig. 5에서 와 같이 단일 peak의 순수한 물질을 확인 할 수 있었다. 또한 EI mass를 이용하여 저해물질의 분자량을 측정 한 결과 Fig. 6에서 나타난 것과 같이 분자량이 138 dalton을 가진 것으로 추정하며, 적외선 분광기 (Infrared, IR)를 이용한 저해물질의 반응기는 3,399 cm^{-1} 부근에서 OH기 peak가 나타났으며 2,940 cm^{-1} 부근에서 CH기 peak를 확인할 수 있었다(Fig. 7). 기존에 cathepsin B 단백질 분해 효소 저해물질로써 보고된 leupeptin의 426, antipain의 604, E-64의 357, β -MAPI의 627 그리고 cystatin C의 13,000으로 구성된 분자량을 가진 물질과 다른 작은 크기의 물질로 보고된 바 없는 신규의 저해물질로 추정한다.

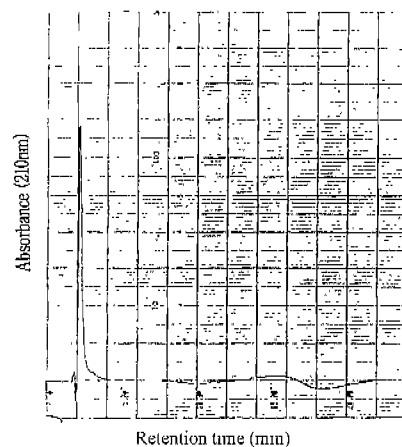


Fig. 5. HPLC elution pattern of the cathepsin B inhibitor.

The elution was done on analytical SUPELCOSILTM LC-NH₂ (SUPELCO) column with methanol: H₂O (7:3) as solvent at flow rate of 1.0 ml/min and detected at 200 nm.

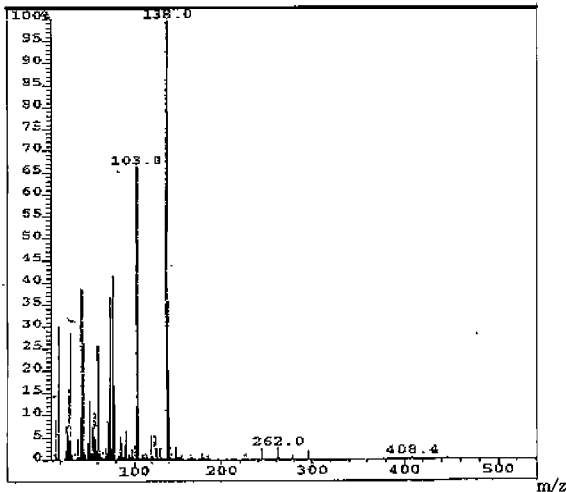


Fig. 6. EI-mass spectrum of the cathepsin B inhibitor produced from *S. misakiensis* KH-11(MeOH).

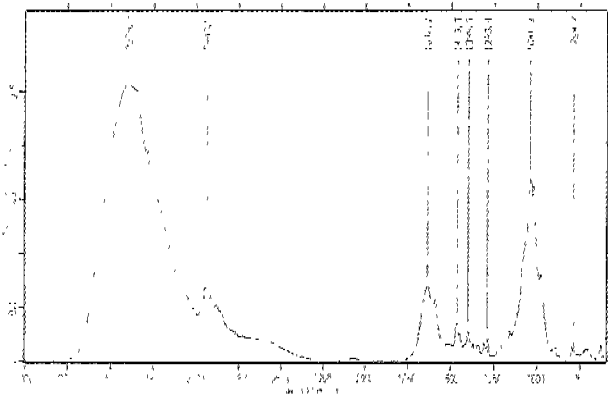


Fig. 7. IR spectrum of the cathepsin B inhibitor KH-11 in KBr.

요 약

세포내의 lysosomal cysteine계 단백질분해 효소 cathepsin B는 기저막을 분해하여 암전이 및 염증반응의 원인이 되고 면역작용에 관계하여 류머티즈 관절염 등의 질병과 노인성 치매 등의 발병에 관여하고 있는 단백질 분해효소이다. 본 연구는 토양으로부터 cathepsin B에 저해력을 가진 균주들을 선별하여 저해력이 가장 강한 한 균주를 선별하여 동정을 시도하였으며 그 결과 *Streptomyces misakiensis*로 동정하였다. *S. misakiensis*의 배양상 특성을 조사한 결과 28°C에서 4일 배양했을 경우 균주의 저해물질 생산성이 가장 좋았으며 균체의 생육은 5일 배양했을 경우 가장 좋았다. 또한 균체의 배양시 배지내의 pH의 변화는 약산성으로 계속 pH가 감소하다가 6일 후 pH가 증가하였다. 저해물질의 정제과정은 *n*-butanol, methanol, chloroform의 추출과정과 Sephadex G-15, silica gel chromatography, Sephadex LH-

20의 chromatography를 수행하여 최종적으로 preparative ODS-80TM column HPLC로써 정제를 하였다. Trypsin, papain, cathepsin B에 대해 저해력을 확인 할 수 있었으며 저해물질은 분자량이 138 정도의 매우 작은 물질로 이루어져 있음을 확인하였다.

REFERENCES

1. Aoyagi, T., T. Takeuchi, A. Matsuzaki, K. Kawamura, Kondo, S., Hamada, M., Maeda, K. and Umezawa, H. 1969. Leupeptins, new protease inhibitor isolated from *actinomycetes*. *J. Antibiot.* **22**: 283-286.
2. Bajkowski, A. S. and A. Frankfater 1975 Specific spectrophotometric assays for cathepsin B. *Anal. Biochem.* **68**: 119-127.
3. Barrett, A. J. 1972. A New Assay for Cathepsin B and Other Thiol Proteinases. *Anal. Biochem.* **47**: 280-293.
4. Barrett, A. J. 1977. Introduction to the history and classification of tissue proteinase, Pp. 1-18, In A. J. Barrett (ed.), *Proteinase in mammalian cells and tissue*. North-Holland Biomedical Press.
5. Chapman H. A., R. J. Riese, and G. P. Shi. 1997. Emerging Roles for Cysteine Proteases in Human Biology, *Annu. Rev. Physiol.* **59**: 63-88.
6. de Duve, C. 1969. In *Lysosomes in Biology and Pathology* (J. T. Dingle and H. B. Fell, eds.), North-Holland Publ., Amsterdam. **1**: 3-42.
7. Duffy, M. J. 1996. Protease as prognostic markers in cancer. *Clin. Cancer Res.* **2**: 613-618.
8. Ebert, W., H. Knoch, B. Werle, G. Trefz, T. Muley, and E. Spiess, 1994. Prognostic value of increased lung tumor tissue cathepsin B. *Anticancer Res.* **14**: 895-900.
9. Han, K. H. and S. D. Kim, 1997. Selection and Identification of a Strain KT-10 Producing the Cathepsin B Inhibitor, *J. Microbiol. Biotechnol.* **7**: 333-340.
10. Hara, K., E. Kominami, and N. Katunuma. 1988. Effect of proteinase inhibitors on intracellular processing of cathepsin B, H, and L in rat macrophages. *FEBS Lett.* **231**: 229-231.
11. Katunuma, N. and E. Kominam, 1983. Structures and Functions of Lysosomal Thiol Proteinases and Their Endogenous Inhibitor. *Curr. Top. Cell. Regul.* Academic Press Inc. **22**: 71-101.
12. Ledakis, P., William T. T., N. Rosenberg, D. Romero-Fischmann, I. Daskal, and T. T. Lah. 1996. Cathepsin D, B, and L in Malignant Human Lung Tissue. *Clin. Cancer Res.* **2**: 561-568.
13. Lechevalier, H. A. and M. P. Lechevalier. 1980. The chemotaxonomy of actinomycetes, Pp. 227-291. In A. Dietz and D. W. Thayer. (ed.), *Actinomycete taxonomy, special publication 6. Socety for Industrial microbiology, Arlington*
14. Lenney, J. F. 1980. Inhibitors Associated with the Proteinases of Mammalian Cells and Tissues. *Curr. Top. Cell. Regul.* **17**: 25-57.

15. Neurath H, and K. A. Walsh. 1976. Role of Proteolytic enzymes in biological regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **73**: 3825–3832.
16. Reddy U. Y., Q-Y. Zhang, and S. J. Weiss. 1995. Percellular mobilization of the tissue destructive cysteine proteases, cathepsin B, L, and S, by human macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**: 3849–3853.
17. Romano, L. 1989. Streptomycetes and related genera, Pp. 2451-2508. In S. T. Williams, M. E. Sharpe, and J. G. Holt (ed.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol 4., Williams and Wilkins Press.
18. Sloane, B. F., K. Moin, E. Krepela, and J. Rozhin. 1990. Cathepsin B and its endogenous inhibitors: role in tumor malignancy. *Cancer Metastasis Rev.* **9**: 333–352.
19. Sloane, B. F., K. Moin, and T. T. Lah. 1994. Regulation of lysosomal endopeptidases in malignant neoplasia. In: G. Pretlow and H. Pretlow(eds.), *Biochemical and Molecular Aspects of Selected Cancers*, 2, pp. 411-466. New York: Academic Press.
20. Sreedharan, S. K., C. Verma, L. S. D. Caves, S. M. Brocklehurst, S. E. Gharbia, H. N. Shah, and K. Brocklehurst. 1996. Demonstration that 1-trans-epoxysuccinyl-L-leucylamido-(4-guanidino) butane (E-64) is one of the most effective low Mr inhibitors of trypsin-catalysed hydrolysis. Characterization by kinetic analysis and by energy minimization and molecular dynamics simulation of the E-64–trypsin complex. *Biochem. J.* **316**: 777–786.
21. Suda, H., T. Aoyagi, M. Hamada, T. Takeuchi, and H. Umezawa. 1972. Antipain, a new protease inhibitor isolated from *Actinomyces*. *J. Antibiot.* **25**: 263–266.
22. Umezawa, H., T. Aoyagi, H. Morishima, S. Kunimoto, M. Matsuzaki, M. Hamada, and T. Takeuchi. 1970a. Chymostatin, a new chymotrypsin inhibitor produced by *actinomyces*. *J. Antibiot.* **23**: 425–427.
23. Watanabe, T. and S. Mura. 1979. Purification and characterization of crystalline microbial alkaline proteinase inhibitors (MAPI) produced by *Streptomyces nigrescens* WT-27. *Agric. Biol. Chem.* **43**: 243–250.

(Received Oct. 27, 2000/Accepted Dec. 28, 2000)