Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.
Vol. 29, No. 2, 84–89 (2001)

Streptomyces luteogriseus KT-10 이 생산하는 Cathepsin B 저해물질의 분리 및 특성

한길환 · 김상달 *
영남대학교 응용미생물학과

Isolation and Characterization of Cathepsin B inhibitor Produced by *Streptomyces luteogriseus* KT-10. Han, Kil-Hwan and Sang-Dal Kim*. *Department of Applied Microbiology, Yeungnam University, Kyongsan 712-749, Korea* – The cathepsin B inhibitor produced by *Streptomyces luteogriseus* KT-10 was very stable in heat, acidic and alkaline conditions. The cathepsin B inhibitor was isolated from the extracted fraction of culture broth with butanol, methanol and chloroform subsequently, the inhibitor was purified with following several column chromatography such as DEAE-Sephadex A-25, Sephadex G-15, silica gel 60, Sephadex LH-20, and preparative HPLC. The cathepsin B inhibitor showed positively to detective reaction of ninhydrine, 5% H_2SO_4, iodine, but negatively to the reaction of Ehrlich's reagent, DNS, aniline. The molecular formular of cathepsin B inhibitor was elucidated by IR, ^1H and ^{13}C-NMR, FAB mass and elemental analyzer. Consequently, it was identified as $C_4H_{11}O_4N_6$. The cathepsin B inhibitor had the mode of competitive inhibition with the reaction of cathepsin B.

Key words: Cathepsin B inhibitor, *Streptomyces luteogriseus* KT-10

포유동물의 조직세포에 존재하는 lysosome은 외부로부터의 병원성세균의 침입을 막고, 세포내외에 불필요한 조직을 소화 흡수하며, 면역세포의 항원인식에 대한 단백질 생산과 세포막을 통한 단백질 분비의 조절에 관여하는 여러 종류의 단백질 분해효소를 함유하는 소기관이다[4,6,14,16]. Lysosome 내의 단백질 분해효소는 pH 5에서 활성이 강한 약 산성효소이며 세포내의 생리적 조절 작용에 중요한 역할을 한다. 그 중에서도 cysteine 계 단백질 분해효소인 cathepsin B는 간, 비장, 지라, 표피선, 폐, 심장 등의 여러 조직세포에 존재하며 생리적 조절작용 및 면역작용에 관여하고 있다[12,13,17,19]. 이러한 cathepsin B는 세포외막에 존재하며 세포외부로 분비함으로 세포의 기저막을 분해하여 만성적 염증성 질환을 일으키며 특히 암 발병 및 전이의 원인이 되고 면역작용에 과민반응을 일으켜 류머티스 관절염 등의 질병과 노인성 치매 등의 발병에도 관여한다는 보고도 있다[7,9,15,18].

한편 cysteine 계 cathepsin B 효소의 과다 발현으로 인하여 세포내의 질병발생의 원인 규명 및 치료를 위한 연구가 꾸준히 이루어지고 있다[8,11]. Cathepsin B의 저해물질 개발 연구로 인체내의 urine으로부터 cystatin C[5], 난백으로부터 cystatin[10] 등이 분리되었으며 토양 미생물로부터 leupeptin[1], antipain[21], E-64[20], 그리고 β-MAPI[22] 등의 저해물질이 개발되었다. 그러나 이와 같은 저해물질들은 cathepsin B에 대한 특이적 저해력이 떨어 질 뿐만아니라 인체 내에서 다른 효소에도 저해의 영향을 미치는 부작용이 나타났다.

따라서 일련의 본 연구에서 토양내의 방선균으로부터 cathepsin B를 특이적으로 저해하는 새로운 저해제 개발을 시도하였으며 이를 위하여 전국 각지의 토양으로부터 분리한 방선균으로부터 lysosomal cathepsin B에 저해력이 강한 균주를 선발하였으며 그 중 저해력이 가장 뛰어난 방선균을 선발하여 동정한 결과 *Streptomyces luteogriseus* KT-10으로 확인하였다[11]. 이 연구에서는 *S. luteogriseus* KT-10이 생산하는 cathepsin B 저해물질을 동정하기 위한 정제과정을 수행하였으며, 그 물질의 분자식을 확인하였고 또한 저해물질의 저해기작도 조사하였다.

재료 및 방법

균주, 효소 및 기질

토양으로부터 분리한 *Streptomyces luteogriseus* KT-10 [11]을 glucose 20 g, peptone 3 g, K_2HPO_4 0.5 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g, $NaNO_3$ 0.5 g, NaCl 0.5g을 물 1 liter에 녹여 pH 7.0으로 조절하여 만든 배지에 접종하여 27°C에서 진탕배양하여 cathepsin B 저해물질을 생산하였다.

Cathepsin B는 bovine으로부터 추출한 Sigma사 제품을 사용하였으며 papain 또한 Sigma사 제품을 사용하였다. 기질로는 Nα-CBZ-L-lysine *p*-nitrophenyl ester HCl (CLN)과 L-

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

leucine-*p*-nitroanilide을 Sigma사 제품을 구입하여 사용하였다.

균주의 배양 및 저해물질 생산

Cathepsin B 저해물질을 생산하는 *S. luteogriseus* KT-10을 cathepsin B 저해물질 생산배지에 종 배양한 균주를 1% 되게 접종한 후 4 일 동안 27°C에서 배양하였다. 배양액은 Whatman No. 2 로 균체를 여과한 후 배양 여액을 80°C에서 10 분간 가열한 후 저해력을 조사하였다.

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 Nα-CBZ-L-lysine *p*-nitrophenyl ester HCl (CLN) 5.22 mM을 dimethylsulfoxide에 녹여 사용하거나, Nα-benzoyl-DL-arginine β-naphthylamide (BANA)의 171 mM 농도를 N,N-dimethylformamide에 녹여 각 50 μl를 반응시켰으며 저해물질 용액은 100 μl를 취하여 반응시켰다. CLN 기질의 경우는 326 nm에서, BANA 기질의 경우는 340 nm에서 25 °C 에 각 반응시간에 따라 반응시킨 후 저해활성의 기울기 값(V_0)을 이용하여 저해활성도를 측정하였다[2]. Cathepsin B 저해물질의 생산성 조사 실험에서는 cathepsin B 대신에 같은 활성을 지닌 papain으로 대체하여 저해활성도를 측정하였다[2,3].

저해물질이 첨가되지 않은 기질과 효소의 반응을 A, 기질과 효소 그리고 저해물질을 첨가한 반응을 B, 효소가 첨가 되지 않은 기질과 저해물질의 반응을 C 라고 할 때 저해활성도를 다음 식으로 계산하였다.

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

Cathepsin B 저해물질의 추출 및 정제

S. luteogriseus KT-10 으로부터 생산되는 cathepsin B 저해물질을 추출, 정제하기 위하여 생산배지 50 liter에 전 배양시킨 균주를 1%되게 접종하여 4 일간 배양하였다. 그 배양여액을 Whatman No. 2 로 여과한 후 여액을 80°C에서 10 분간 열을 가한 후 Fig. 1에서와 같은 방법으로 정제 과정을 수행하였다. 정제에 사용되는 column chromatography는 DEAE Sephadex A-25, Sephadex G-15 그리고 Sephadex LH-20으로 Pharmacia 제품을 사용하였으며, silica gel column chromatography(70-230 mesh)는 Merck사 제품을 사용하였다.

Cathepsin B 저해물질의 이화학적 성질을 조사하기 위해 TLC는 Silica gel 60F 254 plate (Merck)를 사용하여 여러 가지 전개용매로서 단일 spot 및 R_f 값을 조사하였다. 발색방법은 ninhydrine 방법으로 발색시켜 확인하였다. 분취용(pre-parative) HPLC(Tosoh)를 이용한 정제 분석은 TSK gel ODS-80 T_m column을 사용하여 UV 210 nm에서 검출하였으며 이때 eluent는 methanol:water (70:30, v/v)를 유속 50 ml/min로 분리하였다. 분석용(analyti-cal) HPLC를 이용한 분석은 SUPELCOSIL T_m LC-NH_2 (SUPELCO)을 사용하여 UV 210 nm에서 검출하였으며 이때 eluent는 methanol: water (70:30, v/v)를 유속을 1.0 ml/min 로 사용하였다.

기기분석

분리, 정제된 cathepsin B 저해물질의 성질을 알기 위하여 자외선 분광기(UV-spectrophotometer)는 Hitachi 사의 U-2000을 사용하였고, 동결건조기는 FD5510(일신, 한국)을 사용하였으며 fraction collector는 FC-80K(Gilson, France)을 사용하였다. 물질의 구조를 구명하기 위하여 적외선 흡수분광광도계(Infra-red spectroscopy, IR)는 IFS120HR/FRA106(Bruker, Germany)를 이용하였으며, 핵자기공명분광법(nuclear magnetic resonance, NMR)인 H^1-NMR과 ^{13}C-NMR은 Bruker ARX300(Germany)를 사용하였다. 질량분석기 (FAB Mass spectrometry)는 JMS-700(Jeol, Japan)을 이용하여 분자량을 측정하였다. 또한 원소분석기(Elemental analyzer)는 EA1108(VG Fisons, Italy)를 사용하였다.

결과 및 고찰

Cathepsin B 저해물질의 저해력 측정

S. luteogriseus KT-10이 생산하는 cathepsin B 저해물질은 기존의 cathepsin B 기질로 알려진 Nα-CBZ-L-lysine *p*-nitrophenyl ester HCl (CLN)과 Nα-benzoyl-DL-arginine β-naphthylamide (BANA)의 합성기질을 이용한 활성과 저해력을 확인하여 본 결과 Fig. 2에서와 같이 저해율이 80%이상의 억제력을 확인 할 수 있었다. 기질인 CLN에 대한 cathepsin B의 저해력은 90%이상으로 나타났다. 또한 BANA 기질을 이용한 억제력은 84% 이상의 억제율을 확인 할 수 있었으나 cathepsin B 효소와의 반응에서 활성율이 크게 떨어짐을 알 수 있었다. 그러므로 bovine계 cathepsin B는 BANA가 기질로써 적당하지 않음을 확인하였다. 식물성 cysteine계 단백질 분해효소인 papain에 대한 저해력은 cathepsin B보다 약간 낮은 억제력을 나타냈으나 80% 이상의 저해력을 확인 할 수 있었다.

Cathepsin B 저해물질의 성질 조사

S. luteogriseus KT-10이 생산하는 cathepsin B 저해물질의 물리화학적 안정성을 조사하기 위해 1 N HCl 과 1 N NaOH의 강산 및 강알카리에서 안정성을 조사하여 본 결과 Table 1에서와 같이 4시간 이상의 강산 및 강알카리에서도 저해물질의 저해력이 안정한 것으로 나타났다. 또한 100°C에서 1시간 반응 시켜도 저해력이 90%로 나타났다. 이러한 환경요인에 대한 안정성은 저해물질의 배양 및 정제과정에 있어서 생산성을 향상시킬 수 있을 뿐만아니라 실제 생산

Table 1. Residual activity of cathepsin B inhibitor after various treatments

Treatment		Residual Inhibition(%)
1 N HCl, 30°C	1hr	94.3
	2hr	90.2
	4hr	83.0
1N NaOH, 30°C,	1hr	90.2
	2hr	86.0
	4hr	84.0
100°C	30min	94.6
	1hr	94.0

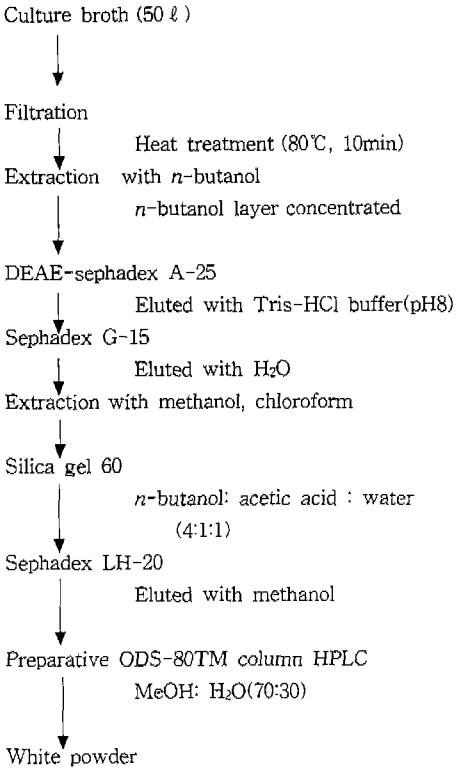

Fig. 1. Purification procedure of the cathepsin B inhibitor.

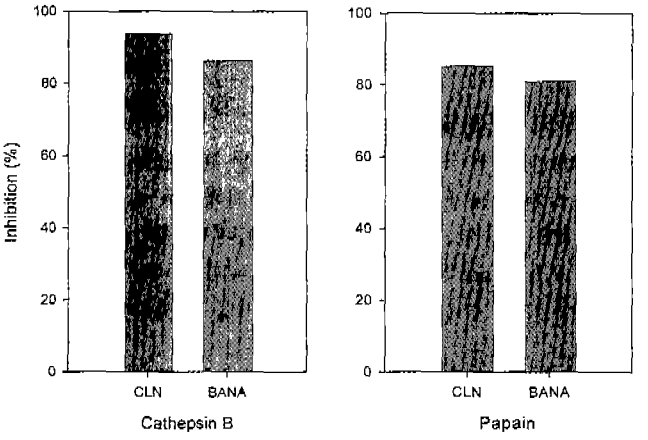

Fig. 2 Inhibition for hydrolysis between cathepsin B, papain and N α-CBZ-L-lysine *p*-nitrophenyl ester HCl (CLN), N α-benzoyl-DL-arginine β-naphthylamide (BANA) substrates.

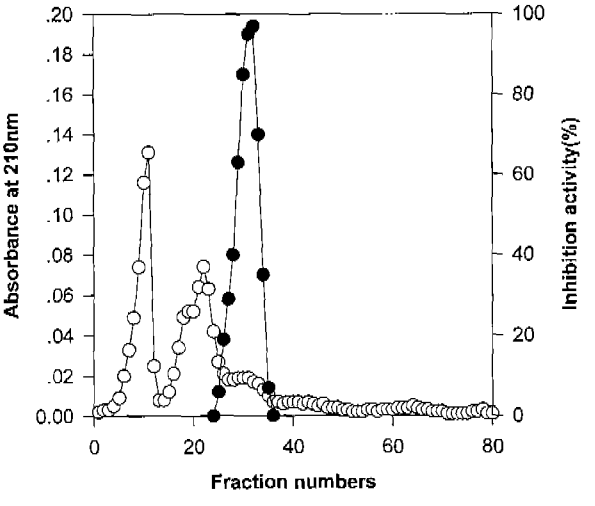

Fig. 3. DEAE-Sephadex A-25 column chromatography of cathepsin B inhibitor.

○: absorbance at 210 nm, ●: cathepsin B inhibitor activity (%) The sample solution was applied to the column (Φ2.5 × 50 cm) equilibrated with water and then eluted with the same solution. Fraction of 4 ml were collected at a flow rate of 19 ml/hr.

에도 좋은 효과를 거둘수 있을 것이라 사료된다.

Cathepsin B 저해물질의 정제

Cathepsin B 저해물질은 종 배양시킨 *S. luteogriseus* KT-10을 50 liter 저해물질 생산배지에 1% 되게 접종하여 27°C에서 4일간 배양시킨 후 Whatman No. 2로 여과한 여액을 80°C 에서 10 분간 가열 한 후 Fig. 1와 같은 방법으로 정제 과정을 수행하였다. 저해물질은 *n*-butyl alcohol로 추출한 후 DEAE-Sephadex A-25를 이용하여 column chromatography를 수행하였다. 그 결과 Fig. 3에서 나타난 것과 같이 저해력이 25에서 35 번 fraction tube 사이에서 나타났으며 이 부분을 모아 Sephadex G-15를 이용하여 gel filtration을 수행하였다. 그 결과 Fig. 4에서와 같이 23번에서 28번 fraction tube에서 그 저해력을 확인 할 수 있었다.

이 후 Silica gel column chromatography를 *n*-butanol:acetic acid:water(4:1:1)을 eluent로 사용하여 분리하였으며 또한 Sephadex LH-20에 methanol 로 elution과정을 거친 후 분취용 HPLC를 이용하여 저해물질 부분을 분리하여 Fig. 5 와 같이 단일 peak를 확인 할 수 있었다. 또한 정제한 저해물질을 동결 건조한 결과 백색의 분말로 나타났다.

저해물질의 이화적특성 조사

분리 정제한 cathepsin B 저해물질은 UV 상의 전 범위에서 특이한 검출 부위를 확인 할 수 없었으며(Fig. 6), H_2O, methanol, ethanol, n-butanol에 녹지만 비극성인 chloro-

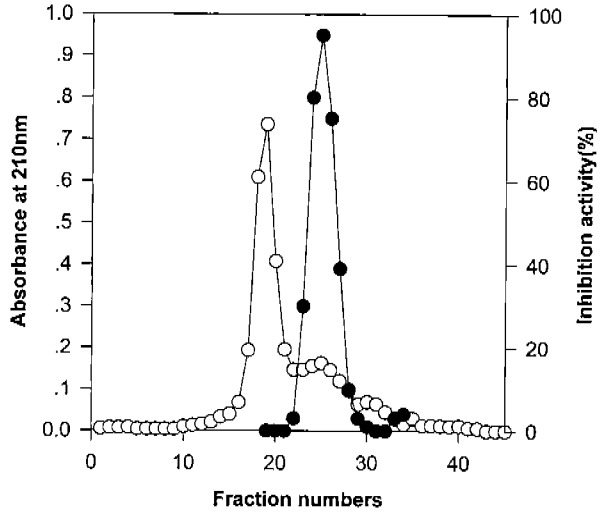

Fig. 4. Sephadex G-15 column chromatography of cathepsin B inhibitor.

○: absorbance at 210 nm, ●: cathepsin B inhibitor activity (%) The sample solution was applied to the column (Φ1.5 × 30 cm) equilibrated with distilled water and then eluted with the same solution. Fraction of 3 ml were collected at a flow rate of 14.3 ml/hr.

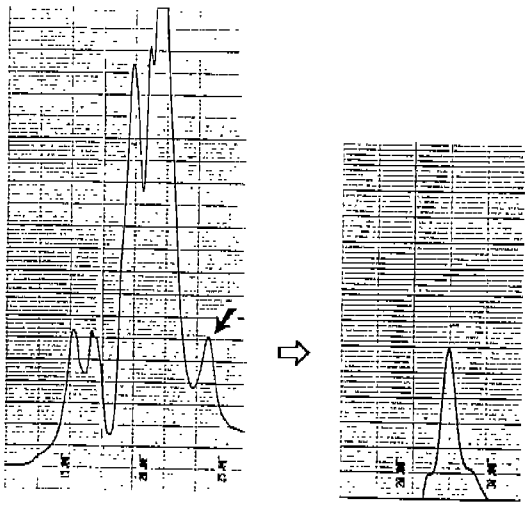

Fig. 5. Chromatograms of cathepsin B inhibitor by HPLC.

form, n-hexane, benzene 등에서는 불용성으로 나타났다. 또한 생화학적인 반응시험에서 amine기 반응으로 ninhydrine과 탄소원 구성 반응인 5% H_2SO_4, iodine에 양성 반응으로 나타났으나 Ehrlich's, Pauly 그리고 Sakaguchi 등의 단백질 반응과 phthalic acid, DNS, aniline 등의 당 반응은 음성으로 나타났다(Table 2).

저해물질의 구조적 특성

정제된 cathepsin B 저해물질의 활성기를 조사하기 위해 IR로 측정한 결과 Fig. 7과 같이 3350 cm^{-1}에서 OH 기의 peak를, 2940 cm^{-1}에서 aliphatic CH 기의 peak를 확인하

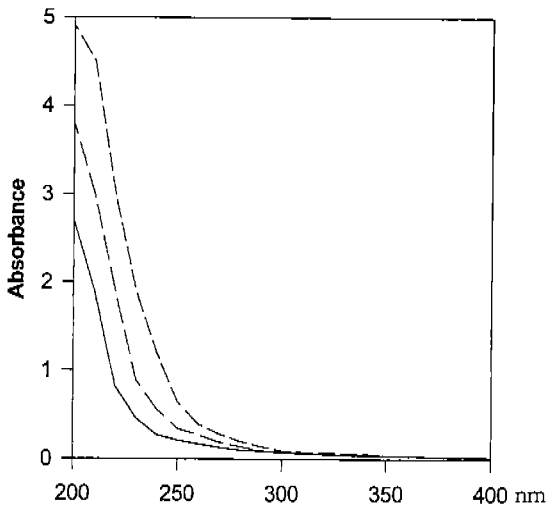

Fig. 6. Spectrogram of cathepsin B inhibitor on UV.

Table 2. Physico-chemical characteristics of cathepsin B inhibitor

Appearance		White powder
FAB-mass		m/z 207
IR ν max cm^{-1}		1288.4, 1398.9, 1463.3, 1638.2, 2940.5, 3399.9
Molecular formula		$C_4H_{11}O_4N_6$
Solubility	Soluble	MeOH, EtOH, H_2O, n-butanol,
	Insoluble	chloroform, hexane, ethyl ether, toluene
Color reaction	Positive	Ninhydrine, H_2SO_4, phosphomolybdic acid
	Negative	Ehrlich's reagent, Pauly reagent, Sakaguchi, phthalic acid, DNS, aniline, molisch, fehling
R_f value		0.9, MeOH:H_2O=7:30.64, *n*-butanol: acetic acid:H_2O=4:1:1

였다. ^1H NMR기기로 proton을 확인 한 결과 Fig. 8에 나타난 것과 같이 나타났다. 4.8931, 4.9075 ppm에서 수분의 OH peak가 높게 나타났으며, 2.2449 ppm에서 NH peak를 3.6141과 3.3066 peak에서 CH의 proton peak를 확인할 수 있었다. ^{13}C NMR spectrum은 21.415, 23.666, 64.109 그리고 129.855 ppm에서 탄소 peak를 확인하였다(Fig. 9). 질량분석기인 FAB mass를 이용하여 분자량을 측정한 결과 Fig. 10에서와 같이 분자량이 207 dalton인 것으로 확인하였으며 또한 원소 분석기에 의한 저해물질을 분석한 결과 분자식이 $C_4H_{11}O_4N_6$으로 나타났다. 따라서 본 연구에서 분리한 cathepsin B 저해물질은 그 분자식이나 구조적 특성이 발표된 바 없는 새로운 물질로 확인되었다. 향후 본 저해물질을 이용한 세포내에서의 cathepsin B 효소 활성에 의한 영향 등을 연구하며 아울러 의약품 개발로써의 가능성을 타진하여 산업화할 수 있을 것으로 사료된다.

luteogriseus KT-10에 의해 생산되어 분리되었다. *S. luteogriseus* KT-10이 생산하는 cathepsin B 저해물질은 열에 안정하며 산, 알칼리에도 안정한 물질로 구성되어 있다. Cathepsin B 저해물질은 DEAE-Sephadex A-25, Sephadex G-15, silica gel, Sephadex LH-20의 column chromatography 과정을 거친 후 분취용 HPLC를 이용 분취한 후 백색분말의 cathepsin B 저해물질을 정제하였다. 이 정제한 저해물질은 UV 상의 전 범위에서 특이한 검출부위를 확인 할 수 없었으며, H_2O, methanol, ethanol, *n*-butanol에는 녹지만 비극성인 chloroform, n-hexane, benzene 등에는 불용성이었다. 또한 ninhydrine, H_2SO_4, iodine에 양성 반응이지만 Ehrlich's, Pauly, Sakaguchi, phthalic acid, DNS, aniline 등의 단백반응과 당 반응에는 음성 반응으로 나타났다. IR 기기에서는 OH 기와 CH 기의 peak를 확인하였으며 ^1H NMR 기기로 OH peak와 NH peak 또한 확인 할 수 있었다. ^{13}C NMR spectrum은 4개의 탄소 peak를 가진 물질로 확인된 분자량이 207 dalton인 저해물질이다. 원소 분석기를 이용한 저해물질 분석 결과 분자식이 $C_4H_{11}O_4N_6$로 나타났다. 이 cathepsin B 저해물질의 저해양식은 competitive 저해로 작용함을 확인 할 수 있었다.

REFERENCES

1. Aoyagi, T., T. Takeuchi, A. Matsuzaki, K. Kawamura, S. Kondo, M. Hamada, K. Maeda, and H. Umezawa, 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. Barrett, A. J., M. E. Davies, and A. Grubb. 1984. The place of human gamma-trace(cystatin C) amongst the cysteine proteinase inhibitors. *Biochem. Biophysical Res. commun.* **120**: 631–636.
6. 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.
7. 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.
8. Duffy, M. J. 1996. Protease as prognostic markers in cancer. *Clin. Cancer Res.* **2**: 613–618.
9. 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.
10. Engh, R. A., W. T. Dieckmann, E. A. Bode, V. Auerswald, R. Turk, Huber, and H. Oschkinat. 1993. Conformational variability of chicken cystatin. Comparison of structures determined by X-ray diffraction and NMR spectroscopy. *J. Mol. Biol.* **234**: 1060–1069
11. 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.
12. 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.
13. Katunuma, N. and E. Kominami. 1983. Structures and Functions of Lysosomal Thiol Proteinases and Their Endogenous Inhibitor. *Curr. Top. Cell. Regul.* Academic Press Inc. **22**: 71–101.
14. Ledakis, P., T. T. William, 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.
15. Lenney, J. F. 1980. Inhibitors Associated with the Proteinases of Mammalian Cells and Tissues. *Curr. Top. Cell. Regul.* **17**: 25–57.
16. Neurath H and K. A. Walsh. 1976. Role of Proteolytic enzymes in biological regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **73**: 3825–3832.
17. 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.
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-β-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 *Actin-omycetes*. *J. Antibiot.* **25**: 263–266.
22. Watanabe, T. and S. Murao. 1979. Purification and characterization of crystalline microbial alkaline proteinase inhibitors (MAPI) produced by *Streptomyces nigrescens* WT-27. *Agric. Biol. Chem.* **43**: 243–250.

(Received Jan. 21, 2001/Accepted Mar. 12, 2001)