

Streptomyces 속 균주가 생성하는 α -D-Glucosidase 저해물질의 작용상

도재호^{1*} · 주현규²

¹한국인삼연구소, ²건국대학교 농화학과

Inhibition Mechanism of α -D-Glucosidase Inhibitor from *Streptomyces* sp.

Do, Jae-Ho* and Hyun-Kyu Joo¹

**Korea Ginseng & Tobacco Research Institute, Daejeon 302-345, Korea*

¹Department of Agricultural Chemistry, Konkuk University, Seoul 133-140, Korea

The inhibitor had the inhibitory activities against hydrolysis of PNPG, sucrose and ONPG by α -D-glucosidase, α - and β -galactosidase, but it did not inhibit amylases and other carbohydrases. Kinetic studies exhibited that the inhibitory substance non-competitively inhibited the enzyme reaction with a K_i value of 118 μ g/ml, and enzyme-inhibitor complex was formed slowly.

미생물성 효소저해물질에 관한 연구가 Umezawa group(1)에 의해 시작되어 현재 약 50여개의 저해물질이 분리 동정되었으며 이러한 저해물질은 효소성질의 해명, 효소활성 부위의 연구, 생리기능 및 병의 해석에 유용한 도구 또는 치료제로 알려져 있다(2). Murao group(3, 4)은 *Streptomyces diastaticus* var. *amylostaticus* No.2476로부터 분리한 S-AI는 동·식물성 및 미생물성 α -, β -amylase와 glucoamylase에 대해서는 저해능이 있으나 그의 탄수화물 분해효소에 대해서는 저해능이 없으며 β -amylase에 의해서 분해가 일어난다고 보고하였다.

*Streptomyces levandulae*로부터 얻은 S-GI는 glucoamylase, β -glucosidase, exo-laminarinase와 같은 exo-type glucoside hydrolase에 대해서 특징적인 저해능이 있으며(5), *Streptomyces griseosporus*로부터 얻은 Haim은 hogpancreatic amylase와 salivary amylase를 저해하며(6), *Streptomyces corchoushii*로부터 얻은 Paim I, II는 pig, log, cow, horse pancre-

atic α -amylase에 대해 저해능이 있다고 보고하였다(7). 한편 Inouye group(8, 9)은 *Streptomyces* 속 균주들로부터 여러 가지 carbohydrase에 대한 저해활성을 나타내며 항생물질인 nojirimycin을 분리하였는데 nojirimycin 및 그 유도체는 β -glucosidase, amylase 뿐만 아니라(10), intestinal glucosidase(11), α -D-glucosidase glucoamylase(12), lysosomal α -glucosidase(13) 등을 저해하는 비특이적 glucoamylase 저해물질로 보고되어 있다. 그리고 *Actinoplanes* 속 으로부터 얻은 acarbose(BAY₈ 5421)는 animal invertase와 α -D-glucosidase를 저해한다고 보고하였다(14,15). 이외에 α -glucosidase inhibitor에 관한 연구로서는 glycogen의 분포를 변경시키고 α -glucosidase 활성을 저해하는 castanospermine(16), *Aspergillus* sp. 및 *Bacillus subtilis*로부터 얻은 α -amylase 저해물질인 abscisic acid(17), honeybee haemolymph pNP- α -D-glucosidase를 저해하는 chloramphenicol(18)에 관한 연구 등이 있다. 저자 등은 *Streptomyces* 속의 한 균주가 생산하는 α -D-glucosidase inhibitor에 대해서 생산균주의 동정, 생산조건, 정제 및 저해물질의 물리화학적 성질에 대해서 보

Key words: α -D-Glucosidase inhibitor, inhibition mechanism

*Corresponding author

고한 바 있으며 (19-22), 본 보에서는 저해물질의 작용 상에 대해 검토한 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

저해물질

본 실험에 사용된 α -D-glucosidase inhibitor는 전보 (21)에 보고한 정제된 것을 사용하였다.

저해활성도 측정

α -D-Glucosidase에 대한 저해활성도 측정은 전보 (19)에 사용한 방법과 같다.

시약

실험에 사용된 α -amylase (human saliva, *Aspergillus oryzae*, porcine pancreas, *Bacillus licheniformis*), α -D-glucosidase (rice, brewer's yeast, yeast), β -amylase (barley), amyloglucosidase (*Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Rhizopus* sp.), cellulase (*Aspergillus niger*), invertase (*Candida utilis*, baker's yeast), dextranase (*Penicillium* sp.), pullulanase (*Enterobacter aerogenes*), β -glucosidase (almond), α -galactosidase (*Aspergillus niger*), β -galactosidase (bovine liver), PNPG, ONPG (*o*-nitrophenyl- α , β -D-galactosidase)는 Sigma 회사의 제품을 사용하였으며 α -amylase (*Bacillus subtilis*), β -amylase (sweet potato)는 Tokyo Kasei 회사의 제품을 사용하였다.

결 과

농도에 따른 저해율

α -D-Glucosidase에 대한 본 저해물질의 농도에 따른 저해율을 조사하기 위하여 α -D-glucosidase의 20 배량까지 저해물질을 가하여 저해율을 조사한 결과는 Fig.1과 같이 α -D-glucosidase와 동량에서 20% 정도, 2.5 배량에서 37%, 10 배량에서 80% 정도의 저해율을 나타내었다.

전처리 시간에 따른 영향

본 저해물질이 α -D-glucosidase에 작용할 때 EI complex를 형성하는 시간의 정도를 조사하기 위하여 30분까지 시간별로 전처리시킨 후 그 저해율을 조사한 결과는 Fig.2와 같이 전처리된 시간이 0일 때는 저해

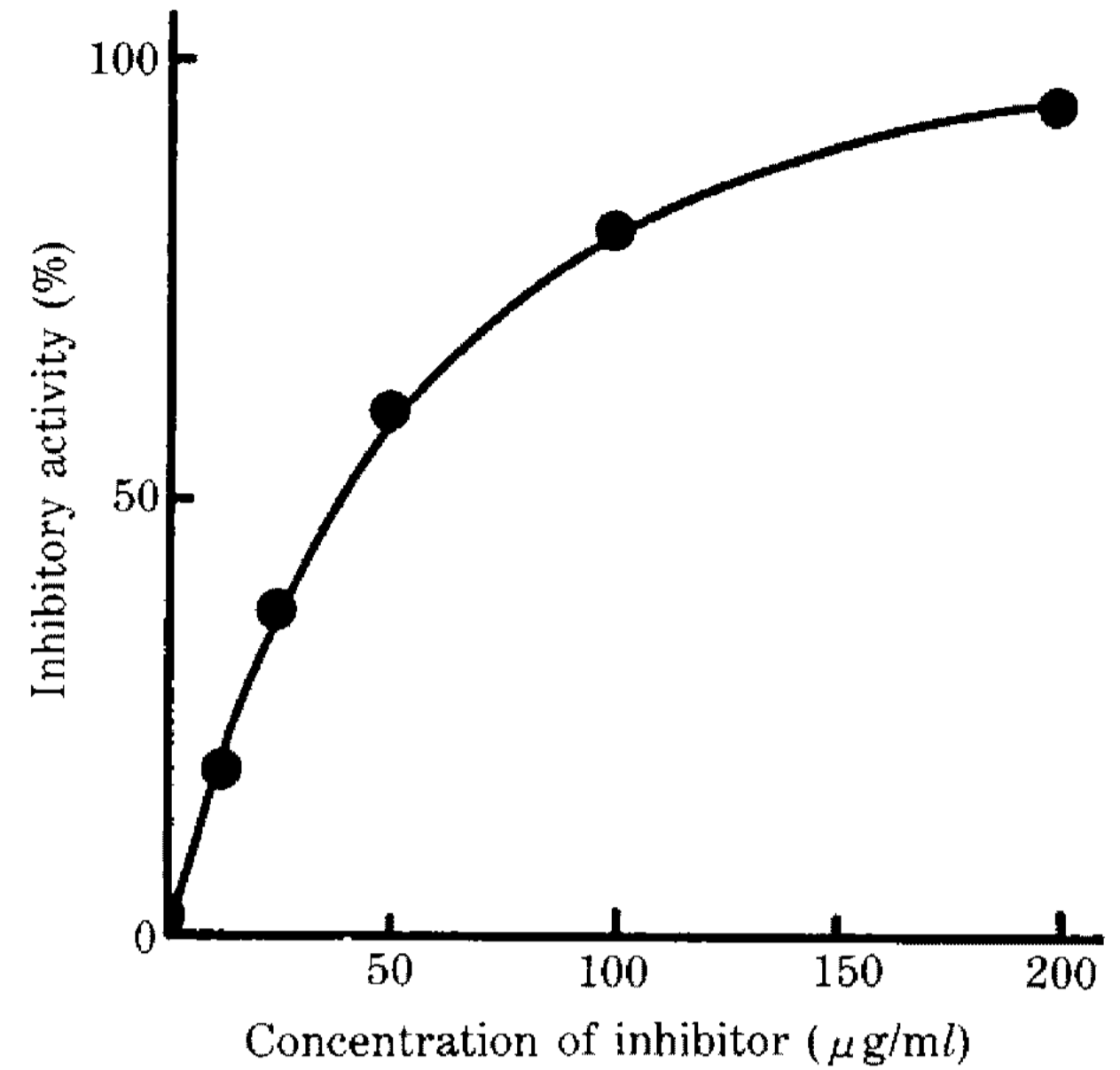


Fig. 1. Inhibitory effect of the inhibitor concentration toward α -D-glucosidase.

Each reaction mixture was composed of 0.1 ml of glucosidase solution (10 µg), 0.4 ml of 1/15 M-phosphate buffer solution (pH 6.8), and 0.1 ml of inhibitor solution. The reaction mixture was preincubated at 37°C for 15 min, and then 0.4 ml of 0.0035 M-PNPG solution was added, and incubated at 37°C for 20 min.

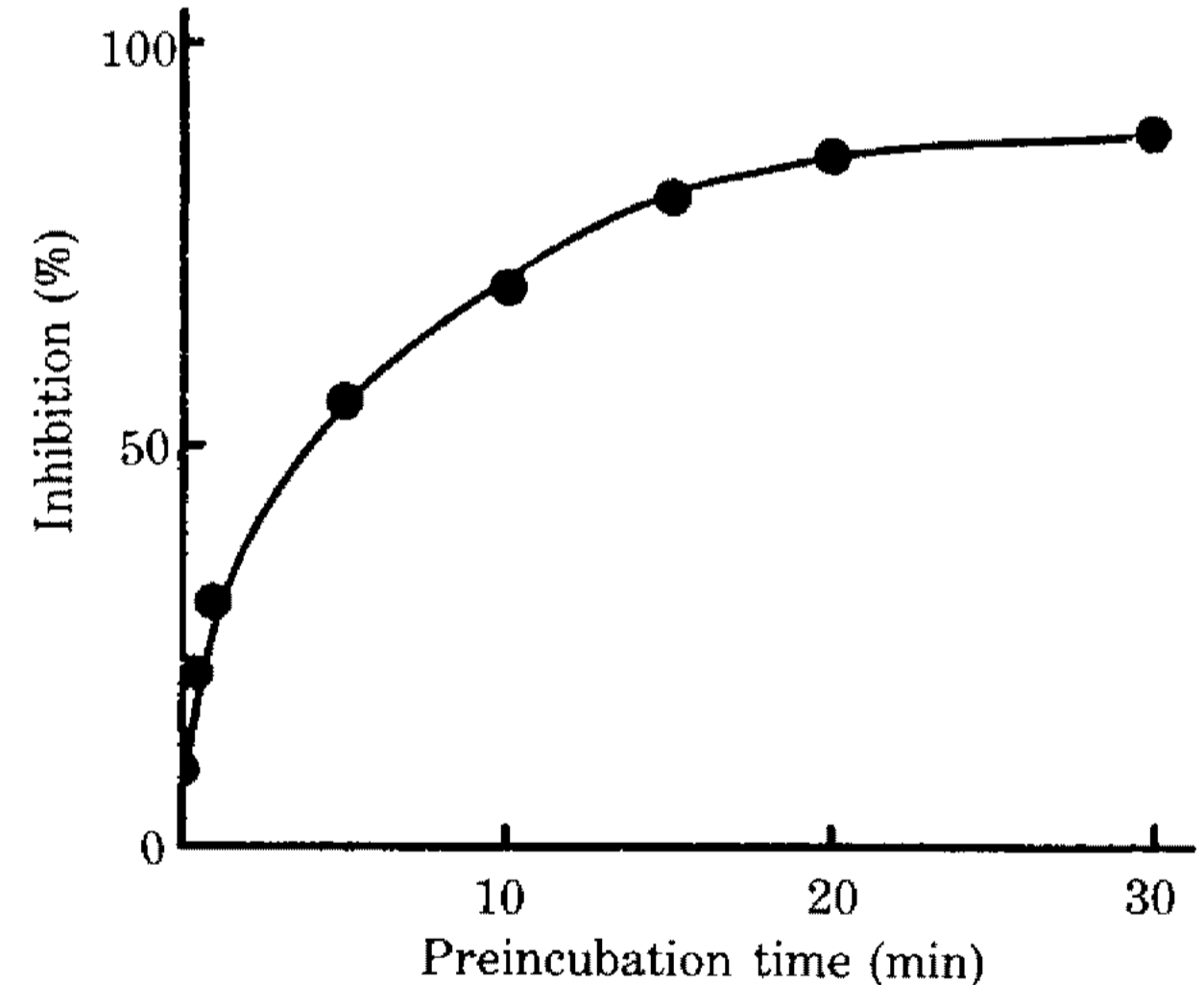


Fig. 2. Effect of preincubation time on inhibitory activity of inhibitor.

Reaction mixture was composed of 0.1 ml of glucosidase (10 µg), 0.4 ml of buffer (pH 6.8) and 0.1 ml of inhibitor solution (100 µg), and incubated at 37°C for each time. And then 0.4 ml PNPG solution was added, incubated at 37°C for 20 min and 3 ml of 0.1 N-Na₂CO₃ was added, and absorbance at 400 nm was measured.

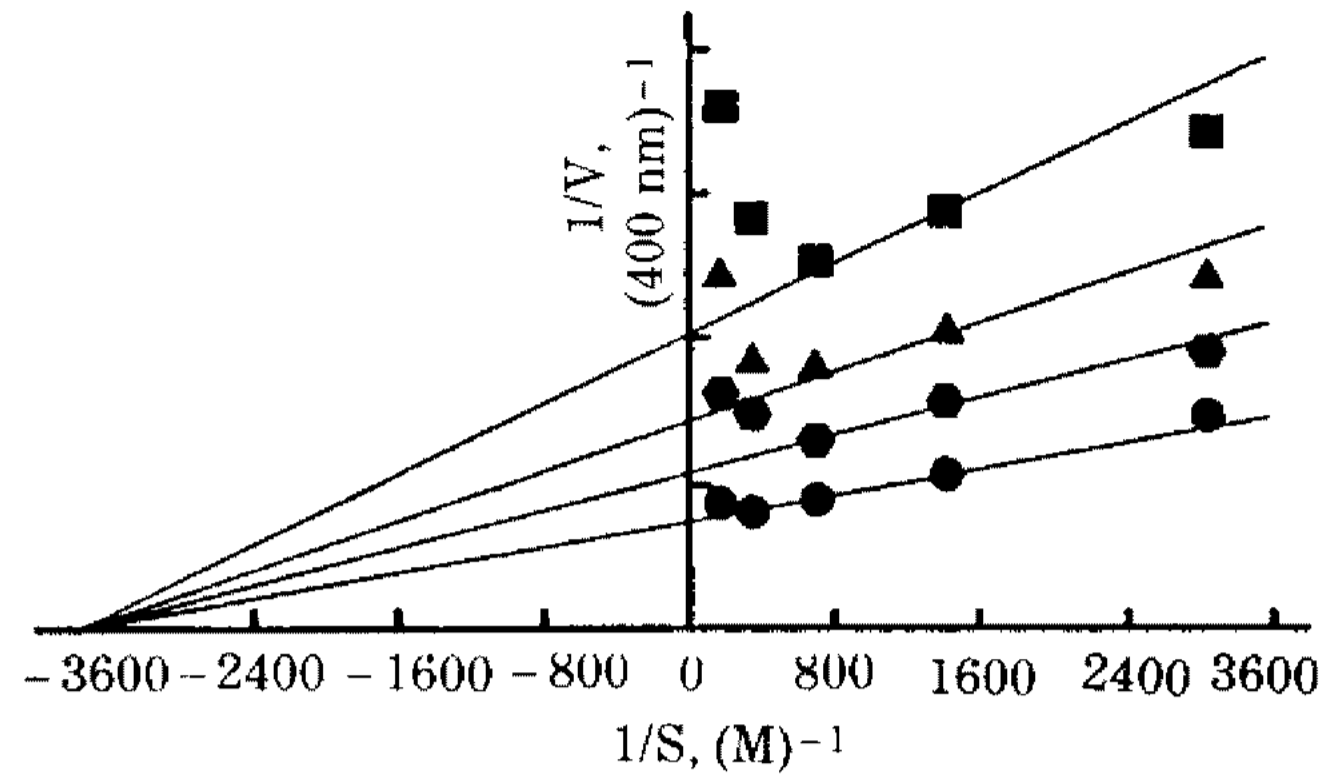
율이 약 10% 였으나 전처리 시간이 길어질수록 저해율은 급격히 증가하여 5분간 전처리시켰을 때는 약 55%, 20분간 처리시켰을 때는 약 85%의 저해율을

Table 1. Action of inhibitor on various glucoside hydrolases.

Enzyme (Origin)	Enzyme amount (μg)	Substrate	pH	Extent of inhibition*
α-Amylase				
Human saliva	50	Starch	6.8	0
<i>Bacillus subtilis</i>	100	Starch	6.8	0
<i>Aspergillus oryzae</i>	200	Starch	6.8	0
Porcine pancreas	500	Starch	6.8	0
<i>Bacillus licheniformis</i>	50	Starch	6.8	0
β-Amylase				
Sweet potato	50	Starch	5.0	0
Barley	200	Starch	5.0	0
Soybean	500	Starch	5.0	0
Amyloglucosidase				
<i>Aspergillus niger</i>	100	Starch	5.0	0
<i>Aspergillus oryzae</i>	100	Starch	5.0	0
<i>Rhizopus</i> sp.	200	Starch	5.0	0
Cellulase				
<i>Aspergillus niger</i>	200	CMC	5.0	0
Invertase				
<i>Candida utilis</i>	100	Sucrose	5.0	0
Baker's yeast	100	Sucrose	5.0	0
Dextranase				
<i>Penicillium</i> sp.	70	Dextran	6.0	0
Pullulanase				
<i>Enterobacter aerogenes</i>	50	Pullulan	5.0	0
β-Glucosidase				
Almonds	100	Salicin	5.0	0
α-D-Glucosidase				
Rice	50	PNPG**	5.0	41
Brewer's yeast	40	PNPG**	6.8	67
Yeast	10	PNPG**	6.8	78
Yeast	50	Sucrose	6.8	48
α-Galactosidase				
<i>Aspergillus niger</i>	50	ONPG***	5.0	71
β-Galactosidase				
Bovine liver	100	ONPG****	6.8	20

Each reaction mixture was composed of 0.1 ml of each enzyme, 0.1 ml of inhibitor (100 μg), 0.4 ml of appropriate buffer, and 0.4 ml of substrate solution, and incubated for 20 min at 37°C. Initially, each enzyme solution was preincubated with inhibitor and buffer solution for 15 min at various pH, and then residual activity was assayed by adding substrate.

*Values were calculated from the percentage of activity in control without inhibitor. ***p*-Nitrophenyl- α -D-glucoside, ****o*-Nitrophenyl- α -D-galactoside, *****o*-Nitrophenyl- β -D-galactoside

**Fig. 3. Lineweaver-Burk plots for hydrolysis of p-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside by α -D-glucosidase in the presence and absence of inhibitor.**

● : in the absence of inhibitor, ◻ : in the presence of 50 μg of inhibitor, ▲ : in the presence of 100 μg of inhibitor, ■ : in the presence of 200 μg of inhibitor.

Table 2. Kinetics data for the inhibition of α -D-glucosidase by inhibitor.

	V (O.D. 400 nm)	K_m (mM)	V/K_m
Control (I) = 0 μg	0.27	0.26	1.04
Inhibition			
(I) = 50 μg	0.18		0.69
(I) = 100 μg	0.13		0.50
(I) = 200 μg	0.10		0.38
K_i			118 $\mu\text{g/ml}$

나타내어 비교적 EI complex 를 서서히 형성하는 물질로 나타났다.

여러 가지 carbohydrases 에 대한 영향

본 저해물질이 α -D-glucosidase 에 대해 저해활성을 나타내었으므로 기타 탄수화물 분해효소에 대해서도 저해활성이 있는지의 여부를 조사한 결과 Table 1 과 같이 α -D-glucosidase, α - 및 β -galactosidase 에 대해서는 저해활성이 있었으나 그외의 효소에 대해서는 저해능이 거의 없었다.

저해의 형태

α -D-Glucosidase 에 대한 본 저해물질의 작용양상을 조사하기 위하여 반응액 중에 PNPG 와 저해물질을 농도별로 첨가하여 반응시킨 후 그 결과를 Lineweaver-Burk plot(23)로 나타내면 Fig.3 과 같으며 kinetic data 는 Table 2 와 같다. Fig.3 에 나타난 바와 같이

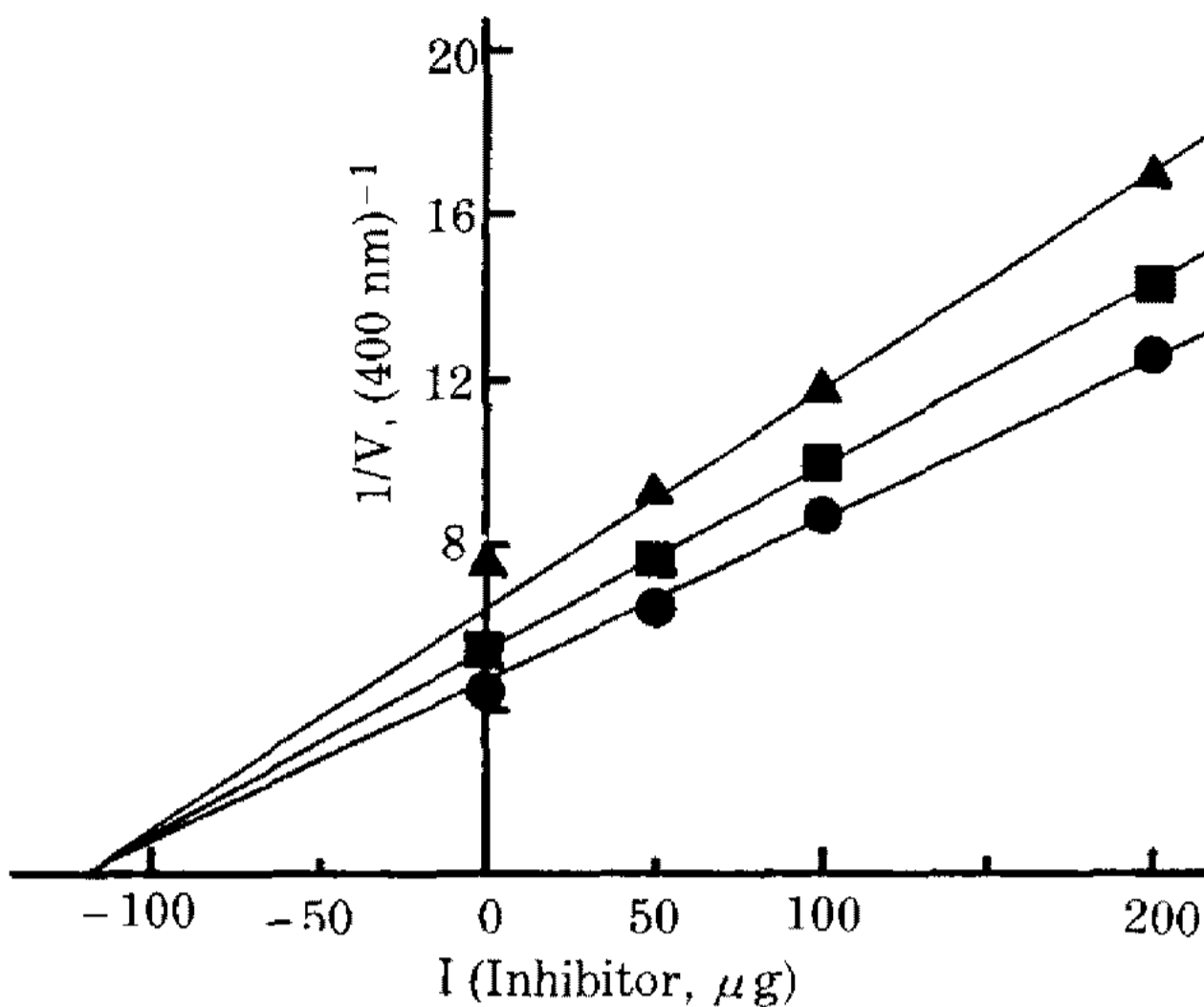


Fig. 4. Dixon plots for determination of inhibitor constant.

▲: 3.5×10^{-4} M of PNPG, ■: 7.0×10^{-4} M of PNPG, ●: 14×10^{-4} M of PNPG.

본 저해물질은 α -D-glucosidase에 대해 비경쟁적인 저해를 하였으며 Dixon plots(24)에 의해 비경쟁적인 저해양상을 나타낸다는 것이 확실하게 나타났다(Fig.4). α -D-Glucosidase에 대한 저해상수를 구하기 위하여 Dixon plot에 대한 방정식 즉 $\frac{1}{v} = \frac{1}{V} (1 + \frac{k_m}{S} (1 + \frac{i}{K_i}))$ 의 식과 Table 2의 kinetic data로부터 본 저해물질의 K_i 값을 구한 결과 $118 \mu\text{g/ml}$ (약 10^{-4} M)로 나타났다.

고 찰

α -D-Glucosidase $10 \mu\text{g}$ 에 대해서 저해물질을 $50 \mu\text{g}$ 과 $100 \mu\text{g}$ 을 첨가하였을 때 저해율은 각각 60%와 80%였으며 저해물질이 α -D-glucosidase와 반응할 때 enzyme-inhibitor complex의 형성에 필요한 시간을 조사한 결과 α -D-glucosidase와 5분간 전처리시켰을 때 효소활성을 55% 정도 저해하였으며 비교적 서서히 EI complex를 형성하였다. 본 저해물질은 α -D-glucosidase 이외에 α -galactosidase에 대해서도 저해능이 강하였으나 β -galactosidase에 대해서는 저해능이 약했으며 그외의 amylases, cellulase, invertase, dextranase, pullulanase, β -glucosidase에 대해서는 전혀 저해능이 없었다. 그리고 본 저해물질은 α -D-glucosidase에 대해서 비경쟁적인 저해양상을 나타내었으며 K_i 값은 $118 \mu\text{g/ml}$ (약 10^{-4} M)로 이것은 acarbose의 경우, 소장 점막미용모막의 disacchaidase(sucrose), sucrase isomaltase complex(sucrose, mal-

tose)에 대한 K_i 값과 비슷했으나 기질을 isomaltose를 사용했을 때의 $4.3 \sim 5.1 \times 10^{-2}$ M 보다는 낮았다(25). 그러나 human sucrase, pancreatic α -amylase, salivary α -amylase에 대한 α -glucoside hydrolase inhibitor(26,27), maltase에 대한 acarbose(28), lysosomal α -glucosidase(human liver)에 대한 nojirimycin(13), α -amylase에 대한 Haim(29) 및 *Cladosporium herbarum* F-828이 생산하는 α -amylase inhibitor(30)의 K_i 값보다는 컸다.

요 약

본 저해물질은 $10 \mu\text{g}$ 의 α -D-glucosidase에 대해서 $50 \mu\text{g}$ 및 $100 \mu\text{g}$ 을 첨가했을 때 저해율은 각각 60%, 80% 정도였으며 enzyme-inhibitor complex를 비교적 서서히 형성하여 5분간 전처리했을 때 약 55%의 저해율을 나타내었다. 그리고 α -D-glucosidase, α -galactosidase 및 β -galactosidase를 제외한 탄수화물 분해효소에 대해서는 저해능이 없었으며, α -D-glucosidase에 대한 저해양상은 non-competitive type이었으며 K_i 값은 $118 \mu\text{g/ml}$ 였다.

참고문헌

1. Demain, A.L.: *Science*, **219**, 709 (1983)
2. Murao, S.: *Nippon Nôgeikagaku Kaishi*, **55**, 503 (1981).
3. Murao, S. and K. Ohyama: *Agric. Biol. Chem.*, **39**, 2271 (1975).
4. Ohyama, K. and S. Murao: *Agric. Biol. Chem.*, **41**, 2271 (1977).
5. Murao, S., K. Ohyama, H. Murai, A. Goto, Y. Matsui, K. Fukuhara, S. Miyata, M. Sumida and M. Arai: *J. Jap. Soc. Starch Sci.*, **26**, 157 (1979).
6. Murao, S., A. Goto, Y. Matsui and K. Ohyama: *Agric. Biol. Chem.*, **44**, 1679 (1980).
7. Murao, S., N. Oouchi, A. Goto and M. Arai: *Agric. Biol. Chem.*, **47**, 453 (1983).
8. Inouye, S., T. Tsuruoka and T. Niida: *J. Antibiot. Ser. A.*, **19**, 288 (1966).
9. Inouye, S., T. Tsuruoka, T. Ito and T. Niida: *Tetrahedron.*, **24**, 2125 (1968).
10. Niwa, T., S. Inouye, T. Tsuruoka, Y. Koaze and T. Niida: *Agric. Biol. Chem.*, **34**, 966 (1970).
11. Schmidt, D.D., W. Frommer, L. Müller and E. Truscheit: *Naturwissenschaften*, **66**, 584 (1979).
12. Reese, E.T. and F.W. Parrish: *Carbohydr. Res.*, **18**, 381 (1971).
13. Chambers, J.P., A.D. Elbein and J.C. Williams:

- Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **107**, 1490 (1982).
14. Schmidt, D.D., W. Frommer, B. Junge, L. Müller, W. Wingender, E. Truscheit and D. Schäfer: *Naturwissenschaften*, **64**, 535 (1977).
 15. Hidaka, H., T. Takaya and J.J. Marshall: *J. Jap. Soc. Starch Sci.*, **27**, 114 (1980).
 16. Saul, R., J.J. Ghidoni, R.J. Molyneux and A. Elbein: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **82**, 93 (1985).
 17. Hemberg, T.: *Physiol. Plant.*, **35**, 11 (1975).
 18. Bounias, M. and M.R.J. Morgan: *Arch. Intern. Physiol. Biochim.*, **89**, 405 (1981).
 19. Do, J.H. and H.K. Joo: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **17**, 202 (1989).
 20. Do, J.H. and H.K. Joo: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **17**, 207 (1989).
 21. Do, J.H. and H.K. Joo: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **17**, 529 (1989).
 22. Do, J.H. and H.K. Joo: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, In print.
 23. Lineweaver, H. and O. Burk: *J. Amer. Chem. Soc.*, **56**, 658 (1934).
 24. Dixon, M.: *Biochem. J.*, **55**, 170 (1953).
 25. Goda, T., K. Yamada, N. Hosoya and S. Moriuchi: *J. Jap. Soc. Nutr. Food Sci.*, **34**, 139 (1981).
 26. Caspary, W.F.: *Lancet*, **1**, 1231 (1978).
 27. Suehiro, I., M. Otsuki, T. Yamasaki, A. Ohki, C. Sakamoto, H. Yuu, M. Maeda and S. Baba: *Clin. Chim. Acta*, **117**, 145 (1981).
 28. Moriuchi, S., Y. Bunya, S. Endo, K. Kamai, S. Yoshizawa, T. Goda and N. Hosoya: *J. Jap. Soc. Nutr. Food Sci.*, **35**, 351 (1982).
 29. Goto, A., Y. Matsui, K. Ohyama, M. Arai and S. Murao: *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 435 (1985).
 30. Saito, N.: *J. Biol. Chem.*, **257**, 3120 (1982).

(Received January 24, 1990)