

Streptomyces 배양액에서의 Interleukin-1 유사물질의 동정

남명수 · 배윤수¹ · 윤도영¹ · 남경수¹ · 최인성* · 정태화¹
KIST 유전공학연구소 세포생물학연구실, ¹면역화학연구실

Identification of Interleukin-1 Like Material in *Streptomyces* Culture Supernatant

Nam, Myoung-Soo, Yun-Soo Bae¹, Do-Young Yoon¹,
Kyung-Soo Nam¹, In-Seong Choe and Tai-Wha Chung¹

¹Laboratory of Cell Biology and Immunochemistry,
Genetic Engineering Research Institute,

Korea Institute of Science and Technology, Taejeon 305-606, Korea

Abstract — We have identified a T cell-activating material in the culture supernatant of *Streptomyces* species. The factor in microbial culture supernatant (MCS) induced thymocyte proliferation in a dose dependent fashion and it could be detected by immunoblot analysis using anti-interleukin-1(IL-1) antibody. The factor in MCS was slightly larger(about 21 kd) in its molecular weight than IL-1 on SDS-PAGE. When ¹²⁵I-MCS was covalently coupled with homo-bifunctional cross-linking agent, disuccinimidyl-propionate to IL-1 receptor(IL-1R) on mouse thymoma cell(EL-4) and immunoprecipitated with anti-IL-1R antibody the molecular weight of this complex of 110 kd was observed. Interaction between IL-1 receptor and the factor in MCS could be inhibited by addition of excess IL-1 β . These results suggest that *Streptomyces* species may produce a factor which is closely related to IL-1 β in its functional and biochemical characteristics.

미생물은 종류가 수없이 많고 구조가 간단해 조작이 쉬울뿐 아니라 증식이 빠르며 환경에 대한 적응력이 뛰어나므로 미생물에서 유용물질을 찾는 연구가 활발히 진행되고 있다.

*Actinomycetes*는 토양에 서식하며 다양한 이차 대사물질을 생성해 낸다. 이들의 이차 대사물질은 항균제, 항암성분, 항진균 성분, 살충제 등에 이용하기 위한 시도가 이루어지고 있다(1). 또한 이러한 시도 이외에 미생물의 대사물질에서 hormone이나 hormone-binding 단백질을 찾으려는 연구(2)와 장기이식시 필요한 면역억제제(3-7)를 찾으려는 연구도 활발히 진행되고 있다. *Neurospora crassa*와 *E. coli*에서 insulin과 유사한 물질이 분비됨을 관찰하였고 다양한 polypeptide성 hormone과 비슷한 물질이 각종 미생

물에서 분비가 되는 것을 볼 수가 있었다. 더욱이 장기이식시 필요한 면역억제제의 발견은 미생물의 대사물질의 연구에 많은 도움이 되었다. 그 중 Cyclosporin A(3)는 cyclic undecapeptide의 구조를 가지며 FK506은 macrocyclic lacton의 구조를 가지면서 T 임파구의 활성화를 억제한다.

IL-1은 체내에서 대식세포를 비롯한 여러 종류의 세포에서 분비되어 조혈 모세포, T 및 B 림파구에 작용하며 그 외에도 각종 조직 세포에 작용하는 면역조절물질중의 하나로 생체내 여러 면역기능에 관여하고 있으며(8, 9), 여러 형태의 염증반응(10) 등 매우 다양한 기능을 가지고 있는 것으로 보고되어 있다. 또한 IL-1은 17.5 KDa의 크기를 갖고 있으며 등전점에 기준하여 IL-1 β (pI 5.0)와 IL-1 β (pI 7.0)의 2개로 분류된다(11, 12). 이들은 서로 다른 아미노산 서열(유사성, 26%)을 가지고 있으나 같은 수용체와 결합해서 그 결과 거의 유사한 생리 활성을 나타낸

Key words: Interleukin-1, microbial culture supernatant (MCS), thymocyte proliferation

*Corresponding author

다고 알려져 있다.

본 연구는 토양미생물중 척추동물의 면역활성에 작용하는 IL-1의 유사물질을 탐색하여 그 물질의 성질을 규명하고 IL-1 신호전달 체계 연구를 위한 기초자료를 확립하는데 그 목적이 있다.

재료 및 방법

실험재료

Receptor binding의 분석에 사용한 세포주는 T cell 임파종 세포주인 EL4.6.1을 사용하였다. 토양미생물은 본 연구소의 미생물 탐색팀에서 제공받아서 실험에 이용하였다. IL-1 β 는 Genzyme사(U.S.A.)에서 구입하였으며 Iodo-Bead는 Pierce사(U.S.A.)에서 구입하였다. 또한 RPMI 1640과 Hank's balanced salt solution (HBSS)는 Sigma사(U.S.A.)에서 구입하였고 fetal bovine serum(FBS)는 Gibco Laboratories(Grand Island, U.S.A), phytohemagglutinin(PHA)는 Wellcome Diagnostics(Dartford, England)에서 구입하였다.

미생물 배양

*Streptomyces*는 soluble starch 1%, glucose 2%, bactosoytone 2.5%, beef-extract 0.1%, yeast extract 0.4%, NaCl 0.2%, K₂HPO₄ 0.025%, pH 7.0의 배지가 들어있는 삼각 flask를 37°C로 조정된 교반기에서 6~8일간 배양했다.

흉선세포 증식 분석법

생후 4~6주된 C3H/HeJ 쥐의 흉선(thymus)을 채취하고 이 흉선을 cell homogenizer를 이용하여 흉선세포가 단일 세포집합이 되도록 하였다. 단일흉선 세포들을 RPMI 1640 배지로 2번 씻은 후 세포수가 약 1.2×10^7 cells/ml이 되도록 하였다. 96 well에 흉선세포(1×10^6 cells/well)와 보조자극제로 PHA를 1.5 μ g/ml을 넣은 후 IL-1 대신 미생물 배양액을 넣어서 흉선세포의 증식을 관찰하였다. Well당 최종 배양부피는 200 μ l가 되도록 하며 FBS농도는 10%로 하였다. 96 well을 37°C의 CO₂ 배양기에서 48시간 배양한 다음 well당 0.5 μ Ci의 ³H-thymidine을 첨가하여 12시간 더 배양한 후 cell harvester(Skatron, U.S.A.)을 이용하여 cell를 glass fiber filter에 모으고 각 시료의 cpm값은 β -counter(United Technologies, Packard)를 이용하여 측정하였다(13). 또한 receptor binding 분석법(14)을 통하여 미생물 배양액의 인자가 IL-1 β re-

ceptor에 상호 작용하는지를 조사하였다.

미생물배양액에서 IL-1 유사물질의 정제

Ultrogel AcA44 column chromatography : Phosphate buffered saline(PBS, pH 7.0)로 pre-equilibration된 column(2.5 \times 96 cm)에 PBS로 dialysis한 10 mg의 MCS 농축액을 loading하고 0.15 ml/min의 속도로 2.4 ml/씩 tube에 받았다. 주어진 분획들을 0.2 μ m의 syringe filter로 여과하여 well당 50 μ l씩 넣어 thymocyte proliferation에 이용하였다.

Superose 12 column chromatography : PBS로 pre-equilibration시킨 FPLC용 Superose 12 column(1 \times 30 cm)에 Ultrogel AcA column을 통과한 분획들 중에서 thymocyte proliferation activity가 높은 분획(44-58번)을 4배까지 농축하여 한번에 200 μ l를 loading하고 flow rate는 0.25 ml/min, chart speed는 2.5 cm/min의 속도로 FPLC(Pharmacia LKB Biotechnology AB Uppsala, Sweden)를 수행하였다.

¹²⁵I-MCS의 조제

Iodo-Bead를 PBS에 미리 적신 후 ¹²⁵I을 1 mCi씩 반응 vial에 넣고 실온에서 5분간 방치한다. 방치시간이 지난후 MCS 1 ml를 넣어서 15분간 실온에서 배양한다. 배양시간 경과 후 Iodo Bead를 제거하고 단백질에 붙지않은 ¹²⁵Iodine은 투석을 이용하여 충분히 제거하였다.

MCS의 IL-1 유사물질과 EL 4.6.1 cell의 IL-1R와의 결합

EL 4.6.1 cell을 4°C에서 phenol red가 들어있지 않은 HBSS로 최소한 1번 이상 세척하여 결합 buffer (RPMI 1640 + FBS 10% + BSA 1 mg/ml)로 5×10^7 cells/ml이 되도록 재현탁한 후 ¹²⁵I-MCS 20 μ l을 넣고 4°C에서 약하게 흔들어 주면서 2시간 동안 배양시켰다. 배양이 끝난 세포들은 HBSS로 두번 세척한 다음 4×10^7 /ml로 다시 현탁시키고 14°C에서 5분간 미리 배양시킨 후 DMSO에 40 mM로 녹인 DSP(Disuccinimyl propionate)를 20°C에서 PBS로 천천히 섞어 희석한 2 mM의 DSP를 1 : 1(v/v)로 섞고 30분간 14°C에서 배양했다. 1 M ammonium acetate를 최종적으로 5 mM이 되도록 넣어서 반응을 멈추게 한 후 cell을 4°C에서 HBSS로 두번 세척하였다.

IL-1 유사물질/IL-1R(EL 4.6.1 cell) 복합체의 추출

Phenyl methyl sulfonyl fluoride(PMSF)와 1 M iodoacetamide를 추출 buffer(50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.02% NaN₃, pH 7.4)에 넣어 각각 2 mM 및 100 mM이 되도록 넣는다. 이러한 추출 buffer로 cell을 1×10⁸ cell/ml이 되도록 재현탁하였다. 그 후 1% NP(Nonidet P) 40이 들어있는 추출 buffer와 cell을 tube에 동량 넣어 강력히 흔들어주고 4°C에서 15분간 방치한 후 4°C에서 15분간 14,000×g로 원심 분리하여 세포막이 함유하는 상층액을 모았다. 추출 buffer에 의해서 추출된 IL-1 유사물질/IL-1R의 복합체는 normal rat serum(1 : 500)으로 preclearing을 한 후 rat anti-mouse IL-1R antibody(1 : 500)으로 immunoprecipitation시켰다. Antibody와 반응한 complex는 protein G Sepharose 4B로 침전시켰다. Anti-mouse IL-1R antibody와 결합한 IL-1R의 복합체는 각각 12% SDS-PAGE를 통하여 분리한 뒤 autoradiography를 수행하였다.

Immunoblot assay (15)

부분 정제된 단백질을 12% SDS-PAGE를 수행한 다음 Western blotting 방법에 따라 흡수지 사이에 gel과 nitrocellulose paper(Hoefler Scientific Instruments, U.S.A.)를 밀착시킨 후 transfer buffer를 4°C로 냉각시키면서 2시간 동안 200 mA로 electrotransfer시켰다. Nitrocellulose paper를 3% BSA가 들어있는 PBS buffer로 2시간 이상 blocking시킨 후 세척 용액인 0.05% tween 20이 들어있는 PBS로 세척하고 anti-IL-1β antibody를 1% BSA가 포함된 PBS solution에 1 : 1000으로 희석한 후 2시간 동안 반응시켰다. 다시 세척 용액으로 씻어내고 HRP(horseradish peroxidase) conjugated anti-rabbit IgG를 1 : 1000으로 희석하여 가한 다음 1시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 nitrocellulose paper를 세척 용액과 PBS로 씻어낸 후 기질인 4-chloro-1-naphtol을 포함한 발색 용액(4-chloro-1-naphtol 10 mg, cold-MeOH 3 ml, PBS 17 ml, 30% H₂O₂)을 가하여 발색을 시키고 건조시켰다.

결과 및 고찰

홍선세포의 증식 분석법

*Streptomyces*의 배양액을 단백질의 크기가 10,000 정도인 투석막을 사용하여 PBS 존재하에서 완전 투석을 실시한 후 홍선세포에 대한 증식 정도를 관찰

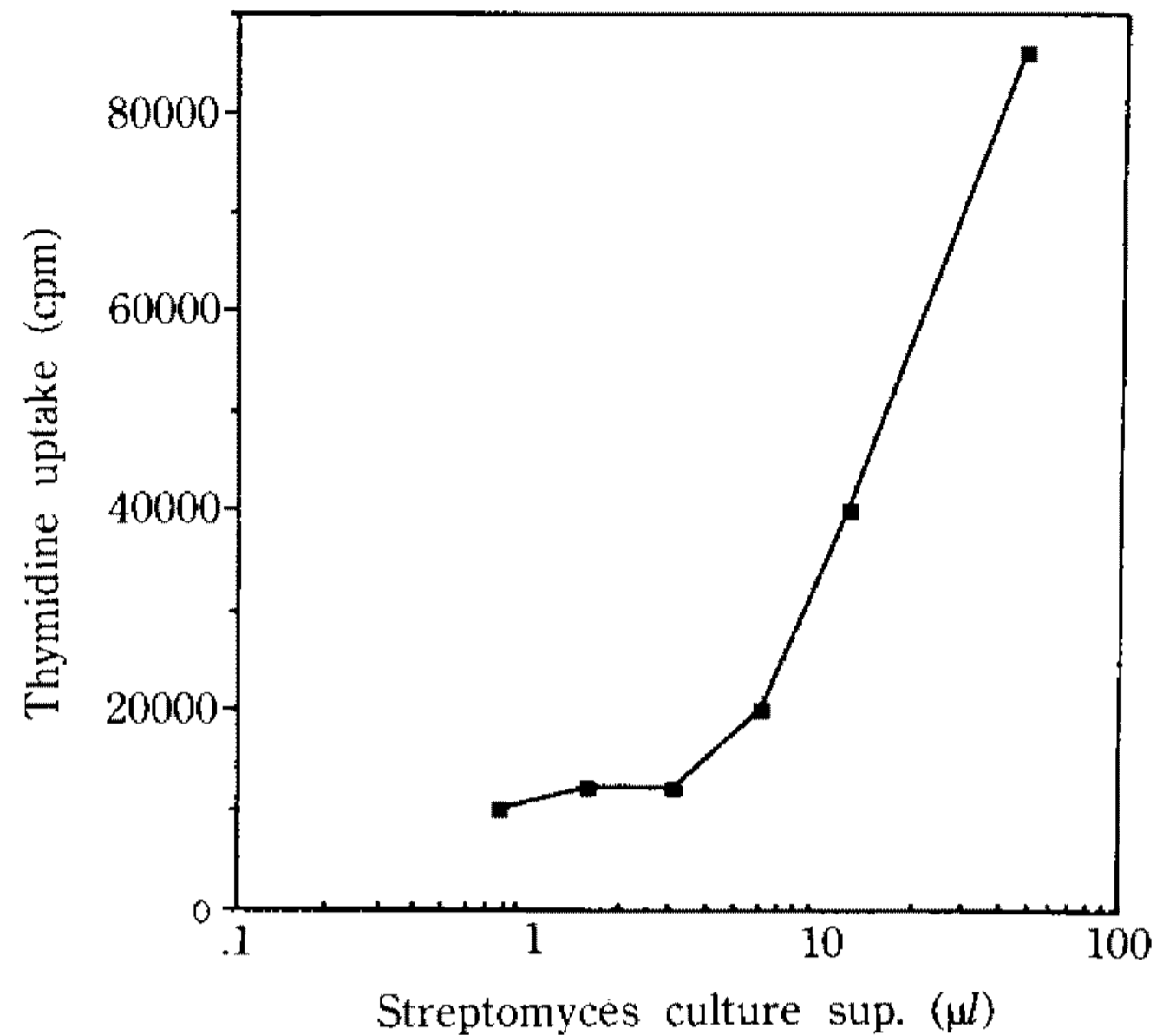


Fig. 1. T cell proliferation of microbial culture supernatant.

하였다. 홍선세포의 증식 정도는 미생물의 배양액에 따라서 증가되었으며 양이 증가되면서 plateau에 도달하였다. 이 배양액으로 배양 후 쥐의 홍선세포의 현미경적 외관은 별다른 영향을 받지 않았음을 알 수 있었다. 이것의 결과로 보아서 미생물 배양액의 인자가 쥐의 홍선세포를 활성화시키며 그것은 농도에 의존적임을 알 수 있었다(Fig. 1).

또한 receptor binding 분석법을 통하여 미생물 배양액의 인자가 IL-1R에 상호 작용하는지를 조사하였다. 그 결과 미생물 배양액은 C₃H/HeJ의 홍선세포에 있는 IL-1R에 IL-1β-FITC의 결합을 경쟁적으로 방해하였으며, 이들의 저해 양상은 FITC가 표식안된 IL-1β과 urine내의 IL-1 저해인자와 비슷한 양상을 보였다(Fig. 2). 따라서 이 미생물 배양액의 인자는 IL-1 수용체를 통하여 홍선세포의 증식 또는 활성화작용이 일어난다고 생각되어진다.

Column chromatography를 이용한 IL-1 유사물질의 정제

미생물 배양액 인자의 분리와 이들 성분의 물리적 성질을 알기 위하여 먼저 gel filtration chromatography인 Ultrogel AcA 44(2.5×95 cm)를 이용하여 정제하였다. 그 결과 분획번호가 48번 근처의 단백질 군에서 홍선세포의 증식이 가장 증가함을 알 수 있었다(Fig. 3). 홍선세포의 증식이 제일 큰 부근의 분획을 모아서 FPLC용 column인 superose 12를 이용하여 다시 정제를 수행하였다(Fig. 4). 그 결과 21번

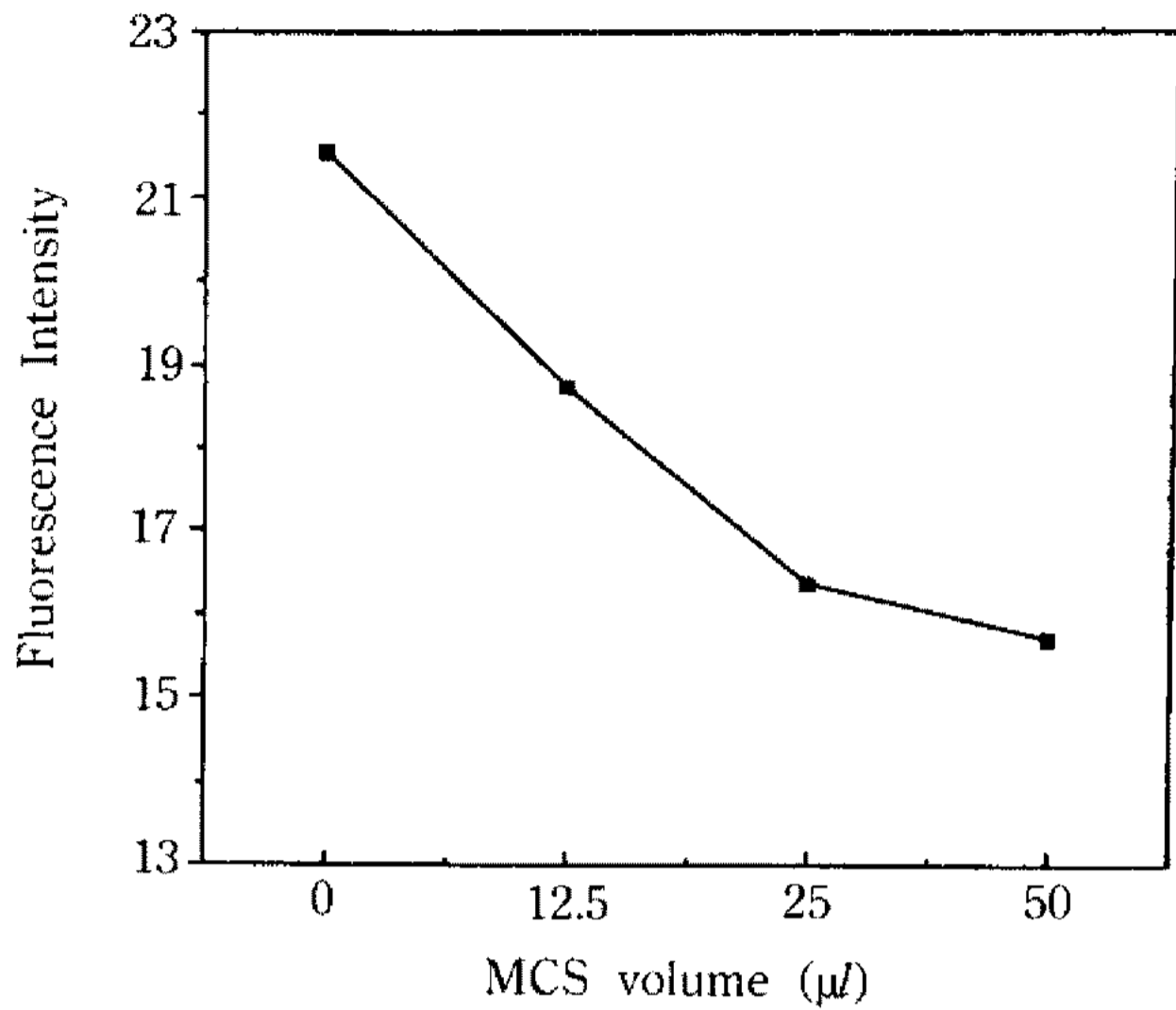


Fig. 2. Inhibition of IL-1β-FITC binding to thymi by MCS.

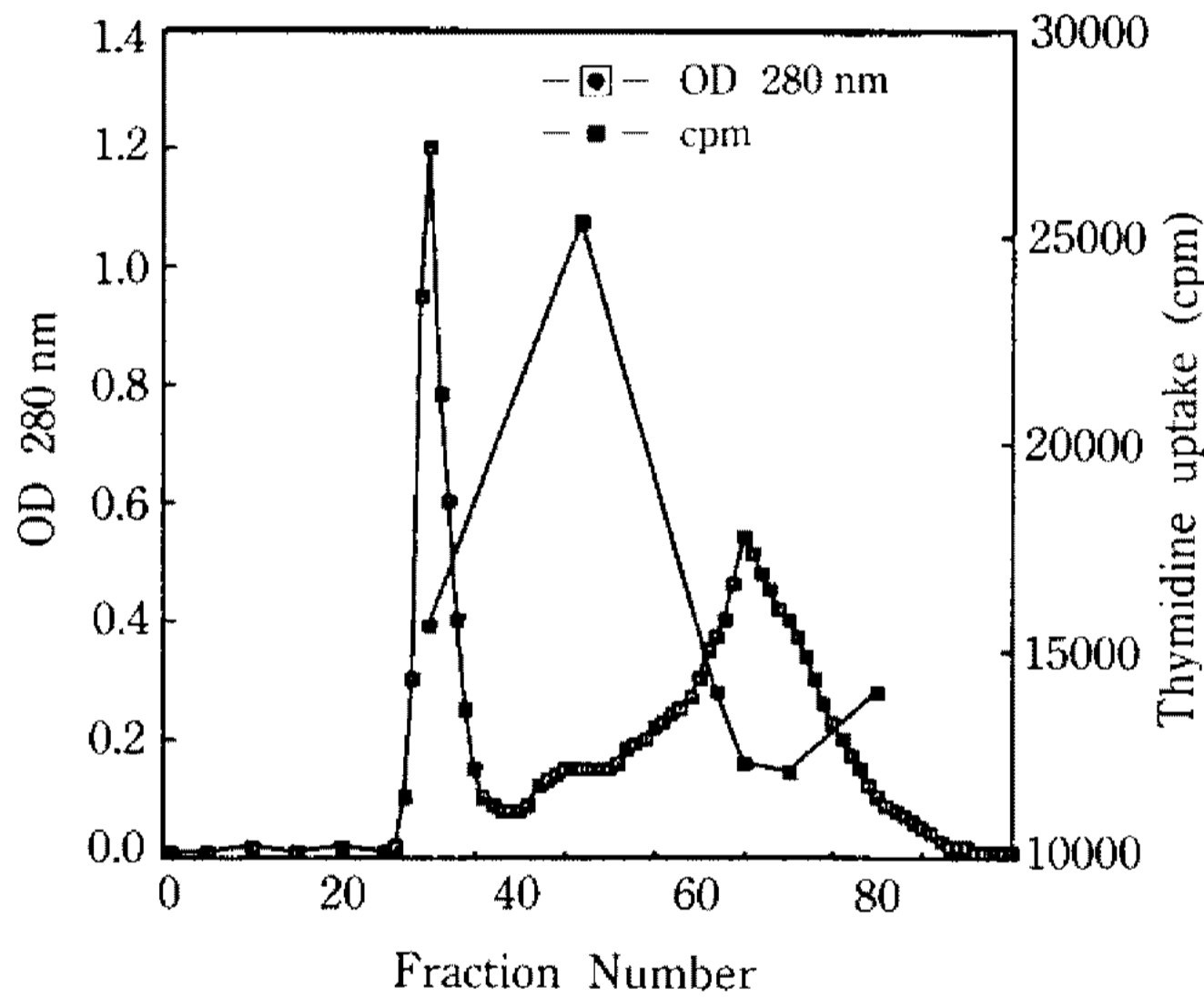


Fig. 3. Ultrogel AcA 44 (2.5×95 cm) column chromatography.

The fractions were assayed in the thymocyte proliferation as described materials and methods. The biological activity was expressed as cpm value.

분획에서 제일 높은 흉선세포의 증식을 보였다.

면역침강 시험법

¹²⁵I-MCS를 homo-bifunctional cross-link 시약인 disuccinimidylpropionate를 이용하여 쥐 thymoma cell인 EL 4.6.1의 IL-1R에 covalent coupling시킨 후 anti-rIL-1βR antibody로 immunoprecipitation시킨 결과 110 kd 정도의 complex가 보였으며, IL-1R 와 MCS에 있는 인자와의 결합은 과량의 IL-1β를 넣어 줌으로써 억제되었다.

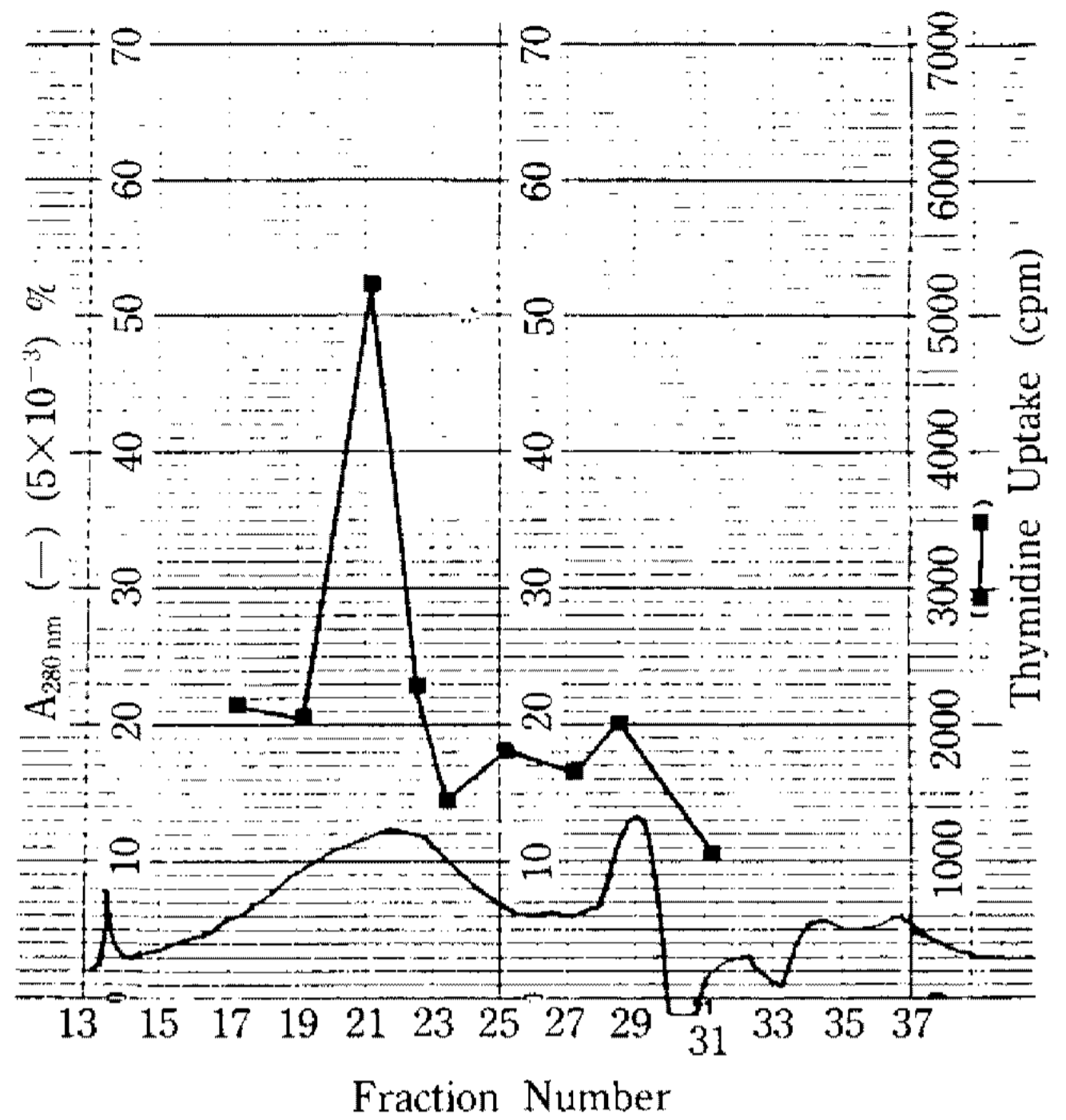


Fig. 4. FPLC pattern (Superose 12 column).

The fractions were assayed in the thymocyte proliferation as described materials and methods. The biological activity was detected as described in Fig. 3.

또한 환원제인 2-mercaptoethanol을 넣으면 homo-bifunctional cross-linking agent에 의해 형성된 covalent coupling이 없어져서 receptor와 결합했던 factor가 떨어져 나옴을 확인할 수 있었다(Fig. 5). 이 실험은 Fig. 2에서 수행한 receptor binding 분석결과를 뒷받침하는 결과이다. 이들이 IL-1R의 type I과 결합하여 약 110 kd 정도의 분자량을 보이는 것으로 보아, 이들 인자의 분자량을 짐작할 수 있다. 즉 type I IL-1R의 분자량은 약 80 kd 정도이며 여기에 인자가 결합하여 약 110 kd 정도로 retardation된 것으로 보아, 미생물 배양액내의 인자는 약 20~30 kd 정도의 분자량을 갖는 물질로 추정되었다. Affinity chemical cross-linking 실험으로부터 미생물 배양액의 활성인자는 IL-1의 receptor를 통하여 흉선세포의 활성을 유발하는 것으로 보여진다.

Immunoblot assay

미생물 배양액에서 분리 정제된 단백질이 rIL-1β와 유사물질인가를 확인하기 위해서 anti-rIL-1β 항체를 이용하여 Immunoblot를 수행한 결과 Fig. 6에서 나타난 바와 같이 미생물 배양액에서 분리정제된 단백질은 anti-rIL-1β 항체와 반응하며 21 kd 부근에서 band(2개)가 확인되었다. 2 band중 어느 부분이 활

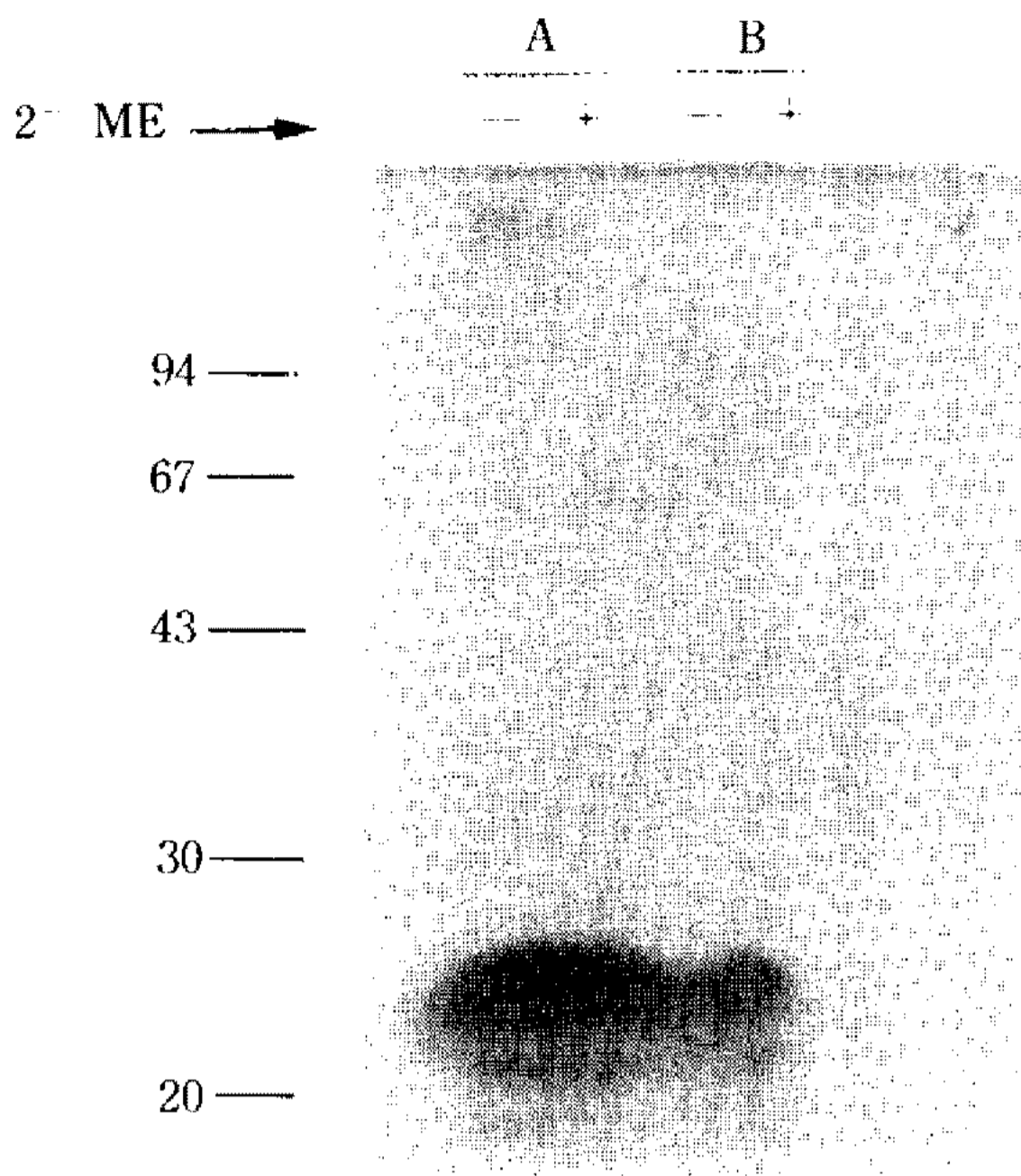


Fig. 5. Immunoprecipitation of IL-1 receptors radiolabeled with MCS and affinity cross-linked with dithiobis-succinimidyl propionate.

A: Lane(-); EL 4 cells+¹²⁵I-MCS; receptor-ligand complex was not reduced with 2-ME before application to the gel.

Lane(+); EL 4 cells+¹²⁵I-MCS; receptor-ligand complex was reduced with 2-ME.

B: EL 4 cells had been incubated with unlabeled IL-1β before the binding reaction with ¹²⁵I-MCS.

The detailed method was described in the materials and methods.

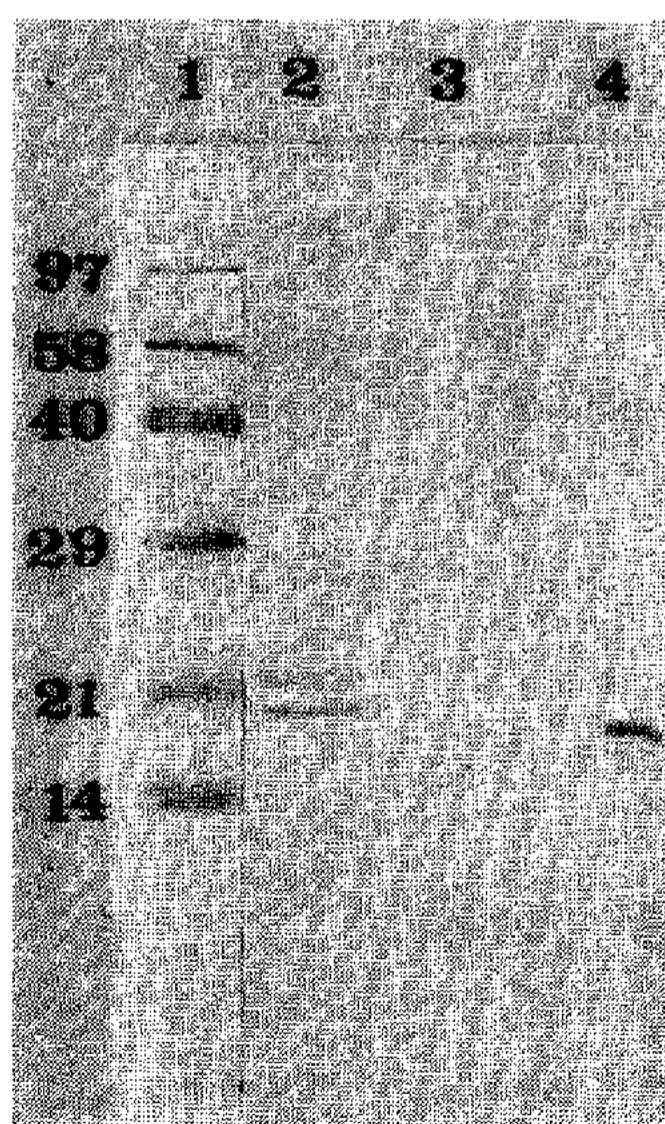


Fig. 6. Immunoblot analysis of IL-1 like material and rIL-1β, using antisera to rIL-1β.

Lane 1, Molecular weight marker; lane 2, culture sup.; lane 3, lysate; lane 4, recombinant human IL-1β.

성을 가지느냐에 관해서는 아직 연구가 진행중이나 이들 물질중에 IL-1와 어느 공동의 한 부분이 anti-rIL-1β 항체에 의해 확인됨을 알 수 있었다.

요 약

*Streptomyces*의 배양액이 쥐의 흉선세포(thymocyte)를 활성화시켰는데 그것은 농도에 의존적이었고 receptor binding 분석법에서는 C₃H/HeJ의 흉선세포에 있는 IL-1 receptor에 IL-1β-FITC의 결합을 경쟁적으로 억제하였다. *Streptomyces*의 배양액에 있는 단백질을 분리하기 위해서 ultrogel AcA44 column chromatography를 하여 흉선세포의 증식이 제일 많은 분획을 모아서 FPLC용 column인 superose 12에 loading한 결과 흉선세포의 증식이 제일 높은 분획은 21번 분획이었다. Affinity chemical cross-linking 실험에서 미생물 배양액의 활성인자는 IL-1 receptor를 통하여 흉선세포의 활성을 유발하는 것으로 생각된다. 미생물 배양액에서 분리정제된 단백질은 anti-rIL-1β 항체와 반응하며, western blotting 결과 그 분자량은 약 21 kd으로 추정되었다.

참고문헌

1. Goodfellow, M., S.T. Williams and M. Mordarski. 1988. *Actinomycetes in Biotechnology*, Chap. 1. Academic Press, 1-32.
2. Lenard, J. 1992. Mammalian hormones in microbial cells. *TIBS* 17: 147-150.
3. Bishop, D.K. and W. Li. 1992. Cyclosporin A and FK506 mediate differential effects on T cell activation *in vitro*. *J. of Immunol.* 148: 1049-1054.
4. Schreiber, S.L. 1991. Chemistry and biology of the immunophilins and their immunosuppressive ligands. *Science* 251: 283-287.
5. Totterman, T.H., A. Danersund, K. Niisson and A. Killander. 1982. Cyclosporin A is selectively cytotoxic to human leukemic T cells *in vitro*. *Blood* 59: 1103-1107.
6. Nakamura, A., K. Nagai, S. Suzuki, K. Ando and G. Tamura. 1986. Anovel method of screening for immunomodulating substances, establishment of an assay system and its application to culture broths of microorganisms. *J. of Antibiot.* 39: 1148-1154.
7. DeFranco, A.L. 1991. Immunosuppressants at work. *Nature* 352: 754-755.

8. Gery, I., R.K. Gershon and B.H. Waksman. 1972. Potentiation of the lymphocyte response to mitogens. I. The responding cell. *J. Exp. Med.* **136**: 128-142.
9. Oppenheim, J.J., E.J. Kovacs, K. Matsushima and S.K. Durum. 1986. There is more than one interleukin 1. *Immunol. Today* **7**: 45-56.
10. Dinarello, C.A. 1989. Interleukin-1 and its biologically related cytokines. *Adv. Immunol.* **44**: 153.
11. Auron, P.E., A.C. Webb and L.J. Rosenwasser. 1984. Nucleotide sequence of human monocyte interleukin 1 precursor cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**: 7907-7911.
12. March, C.J., B. Mosley and A. Larsen. 1985. Cloning, sequence and expression of two distinct human interleukin 1 complementary DNAs. *Nature* **315**: 641-647.
13. Clemens, M.J., A.G. Morris, and A.J.H. Gearing. 1987. Lymphokines and Interferons. Chapter 15. 269-289.
14. Bae, Y.S., E.H. Lee, D.Y. Yoon, M.S. Nam, K.H. Kim, I.S. Choe and T.W. Chung. 1992. Identification and characterization of interleukin 1 inhibitor from human febrile urine. *Kor. J. BRM.* **2**: 79-84.
15. Burnette, W.H. 1981. Western blotting. *Anal. Biochem.* **112**: 195-203.

(Received February 16, 1993)