

Cathepsin B 저해물질을 생산하는 *Streptomyces chromofuscus*의 분리 및 동정

이현숙 · 김인섭 · 김형태 · 윤성준¹ · 이계준*

서울 특별시 관악구 서울대학교 미생물학과, ¹경기도 안양시 동화약품 중앙연구소

Isolation and Identification of *Streptomyces chromofuscus* Producing Cathepsin B Inhibitor

Hyoun Suk Lee, In Seop Kim, Hyoung Tae Kim,
Sung Joon Yoon¹ and Kye Joon Lee*

Department of Microbiology, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

¹Central Research Center, Dong Wha Pharmaceutical Co. Ltd

Abstract — The aim of the present research program was to develop a strain of actinomycetes producing extracellular cathepsin B inhibitor. Soil samples were collected from various sites in Korea and a number of actinomycetes were isolated from the soil samples by applying various physical and chemical pretreatments. An economical and effective method was developed for the screening of strains producing low molecular weight cathepsin B inhibitor, and consequently a strain (SMF28) among over 700 isolates was selected. Chemotaxonomic and numerical identification were carried out for the isolate. Fifty taxonomic unit characters were tested and the data were analyzed numerically using TAXON program. The isolate was identified as a strain of *Streptomyces chromofuscus*.

미생물이 매우 극한적인 환경에서도 생존할 수 있는 것은, 다양한 대사과정을 통해 다양한 구조의 물질들을 생산 이에 대응하기 때문이다. 미생물 세포의 균형 성장과 생명 유지와 직접 연관된 생화학 반응들로부터 생산되는 일차 대사산물과 성장, 생명 유지와는 무관하게 생산되는 이차 대사산물은 생리적으로 다양한 활성을 갖고 있어서 산업적으로 유용한 신물질로 이용되고 있다. 대표적인 것으로 식품자원, 식품첨가물, 향생물질, 향암물질, 생리조절물질, 면역조절물질, biopolymer 등이 있으며, 최근에는 항암, 항바이러스 치료제로서의 가능성이 있는 protein kinase C inhibitor, reverse transcriptase inhibitor, AIDS 치료물질로서 aspartic protease inhibitor, reverse transcriptase inhibitor, 면역조절물질로서 alkaline protease inhibitor, aminopeptidase inhibitor, 당뇨병 등의 의약품으로서 glycosidase inhibitor, 염증, 관절염, 폐기종 등에 효과를 보이는 protease inhibitor 등이 연구되고 있다.

특히 방선균의 배양액으로부터 분리된 저분자량의

단백질 분해효소 저해물질에는 leupeptin(1), antipain(2), chymostatin(3), elastatinal(4), β -MAPI(5) 등의 serine과 cysteine protease 저해물질과 pepstatin(6)과 같은 aspartic proteases 저해물질, phosphoramidon(7)과 같은 metallo-proteases 저해물질 등이 있다. 또한 carboxypeptidase B를 저해하는 histargin(8) 등이 방선균 배양액으로부터 분리되었다.

Cysteine protease중에서 cathepsin은 다양한 동물 조직의 추출물에서 발견되는 acidic proteinase로서 세포내 lysosome에 존재하는 proteinase를 말한다(9, 10). Cathepsin들은 단백질이나 구조가 밝혀진 합성 peptide 기질에 대한 작용에 따라 분류된다. Beef spleen으로부터 처음으로 cathepsin A, B, C가 발견된 이후, 다양한 단백질 분해 역가를 가진 cathepsin들이 발견되고 부분적으로 분리되었다. 현재까지 20여종의 cathepsin이 발견되었고 생체내 역할에 대하여 연구가 진행되었다.

Cathepsin B는 동물의 조직 특히 spleen, thymus, lung, liver, kidney, adrenal의 lysosome 내에서 높은 역가를 보이며, benzoyl-L-arginine-amide를 분해하는 역가와 transferase 역가를 갖고 있다(11). Cathepsin B는 β -mercaptoethylamine, cysteine, 2,3-dimercap-

Key words: Cathepsin B inhibitor, numerical identification, *S. chromofuscus*

*Corresponding author

topropanol, β -mercaptoethanol, glutathione 등의 sulfhydryl compounds를 activators로 반드시 필요로 한다. Cathepsin B는 muscular dystrophy(12, 13), tumor metastasis, myocardial tissue damage, inflammation, bone resorption(14) 등의 병리적 현상과 연관된 것으로 보고되었다.

본 연구에서는 여러 가지 병리적 현상과 관련된 것으로 알려져 있는 동물 세포내 주요 lysosomal protease인 cathepsin B의 저해물질을 방선균에서 screening하고자 하였다. 이를 위해서 다양한 종류의 방선균을 다양한 조건하에 있는 토양 시료로부터 순수 분리하였고, 그 중 분자량이 작으며 열에 대한 내성이 큰 cathepsin B 저해물질 생산 균주를 선별하였다. 이러한 탐색과정을 통하여 취득된 신규성 cathepsin B 저해물질 생산력이 우수한 균주인 SMF28을 수리 동정하였다.

재료 및 방법

토양 시료로부터 방선균의 분리 및 Cathepsin B 저해물질 생산균의 검색

토양 시료들을 상온에서 5일간 건조시킨 후 80°C에서 30분간 열처리한 다음, 증류수에 현탁시켜 방선균 분리용 평판배지에 도말하였다. 30°C에서 7일간 배양한 후 형성된 콜로니들 중에서 방선균의 형태적 특성이 인정되는 균주들을 분리 보존하였다. 단백질 저해물질 생성배지가 20 ml 씩 담긴 baffled flask에 분리, 보존 중인 각 균주를 접종한 후 30°C 회전 shaker에서 3일간 배양하였다. 배양액을 5,000 rpm에서 원심분리하여 상등액만을 취하고 이것을 100°C에서 10분간 가열한 후 다시 10,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액을 얻었다. 배양 상등액의 cathepsin B 저해활성이 90% 이상인 균주를 저해물질 생산 균주로 1차 선별하였다. 1차 선별된 균주중에서 trypsin, papain, pepsin, serratiopeptidase 들에 대한 저해 여부를 조사하여 trypsin에 대한 저해 활성이 낮은 균주를 2차로 선별하였다.

사용배지

방선균 선택적 분리배지는 starch-casein-nitrate agar 배지(pH 7~7.2), arginine-glycerol salts agar 배지(pH 6.9~7.1)에 0.005% cycloheximide 및 0.005% nystatin을 첨가하여 사용하였다. 분리한 방선균의 보존용 배지는 Bennett's 배지를 사용하였다. 균주동정을 위한 배지는 ISP에서 제시한 배지를 사용하였다(15). 단백질 분해효소 저해물질 생산균의 검색배

지는 1% glucose, 1% soluble starch, 2% peptone, 0.3% yeast extract, 0.3% NaCl, 0.001% $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.001% $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.1% CaCO_3 를 함유하는 배지를 사용하였다.

균주의 동정

분리 균주의 수리 동정을 위해 사용된 형태학적, 생리 생화학적 50개의 단위 형질 분석은 Williams등의 방법을 따랐다(16, 17). 탄소원 이용 이외의 모든 시험에서는 Bennett's 배지에서 7일간 배양한 후 배양액을 유리솜으로 균사체와 분리한 포자를 생리 식염수에 세척, glycerol에 현탁시킨 액을 접종원으로 사용하였다(18).

형태학적 특성 분석 ISP 배지(15), Bennett's 배지, Czapeck solution 한천배지에 배양하면서 기균사의 색깔, 배면 색깔 등 콜로니 형태를 관찰하였다. 기균사 포자 사슬의 주사전자현미경 관찰을 위하여 ISP 4 배지 위에 멸균된 nucleopore membrane filter(8 μm)를 올려놓고 포자를 접종한 다음 1주일간 배양하여 filter 전면상에 완전히 균사체와 호기성 포자가 형성되면 핀셋으로 조심스럽게 떼어내어 membrane상의 균사체와 포자를 알곤가스 chamber(Polaron SC 502 Sputter coater, Fisons Co.)속에서 gold coating을 하여 주사전자현미경(Stereoscan 260 SEM, Cambridge Ltd, UK)으로 5,000~10,000배로 관찰 및 촬영하였다.

세포벽의 diaminopimelic acid 이성체와 아미노산 분석 Starch-casein-nitrate 배지에서 3일간 배양한 균체를 회수하여 초음파로(Sonic Dismembrator Model 300, Fisher Co., USA. 100W) 파쇄한 뒤 원심분리(11,000 g, 15분)하여 동결건조였다. DAP와 아미노산 분석을 위하여 동결건조된 균사 20 mg을 6N HCl 5 ml과 같이 시험관에 넣고 밀봉한 후 100°C에서 18시간 가수분해하여 여과, 탈염산, 농축하고 이 농축액을 cellulose TLC(10×10 cm, HFTLC Cellulose, Merck Co.)의 시료로 하여 methanol-water-5N HCl-pyridine(80 : 15 : 5 : 10)으로 전개시킨 다음 acetic ninhydrin으로 발색시켜 Sigma사 표준제품과 비교하였다(19).

세포내의 당 분석 동결건조한 세포 50 mg을 시험관에 넣고 밀봉한 후 6N HCl로 2시간 가수분해시키고 $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 로 pH 5.0~5.2로 중화시킨 다음 원심분리(11,000 g, 15분)하여 침전물을 제거하고 상등액을 감압농축한 후 이를 0.3 ml의 증류수에 녹여 TLC 시료로 사용하였다. n-butanol-water-pyridine-toluene(10 : 6 : 6 : 1, 1% acetic acid 함유) 용매로

전개시킨 다음, aniline phthalate로 발색시켜 세포내의 당을 확인하였다(20).

종 수리동정을 위한 특성 분석 주군집(major cluster) 동정을 위한 50 단위형질(unit character)은 Williams 등(16, 17)의 방법에 따라 시험하였다. 형태 및 색소 형성, 항균력 시험, 분해능 및 항생물질 내성 시험, 효소 시험, 생장 및 영양요구성 시험 등은 평판배지를 사용하였으며 질산염 환원, 황화수소(H_2S) 생성, hippurate 가수분해와 arbutin 분해능 시험은 시험관을 사용하였다. 접종된 배지는 $28^\circ C$ 에서 일정 기간 배양하여 결과를 관찰하였다.

TAXON program TAXON program은 영국 Newcastle upon Tyne 대학 미생물학과의 A.C. Ward 박사에 의하여 개발된 프로그램으로서 단위형질의 특성을 + 혹은 -로 간단하게 입력하고, 입력된 자료를 CLUSTAN으로 분석하여 수리분류를 할 수 있으며, 수리분류 데이터를 기본으로 하여 작성된 identification probability matrix의 특성과 미지균의 특성을 비교, 분석함으로써 수리동정하였다(21, 22).

단백질 분해효소 저해 활성 측정

Cathepsin B 저해 활성은 Barrett의 방법을 변형하여 행하였다(23). 96 well microplate의 각 well에 배양 상등액을 $10 \mu l$ 씩 분주하고 $5 \mu g/ml$ 농도로 incubation buffer에 녹인 papain을 $100 \mu l$ 씩 넣은 후 $37^\circ C$ incubator(JEIO TECH Co.)에 10분간 정치하였다. 이어 $10 mg/ml$ 농도의 BANA($N-\alpha$ -Benzoyl-DL-Arginine- β -Naphthylamide·HCl) 용액을 $40 \mu l$ 씩 가하여 잘 흔들어 준 후 20분간 반응시키고, coupling reagent를 가하여 반응을 중단시키고 10분간 정치하여 발색시켰다. Control은 반응 시작 전에 coupling reagent를 가하였으며 sample blank에는 시료 대신에 동량의 증류수를 가하였다. Microplate reader(THERMO_{max}; Molecular Devices)를 이용하여 405 nm에서의 흡광도를 측정하여 흡광도의 증가를 대조구와 비교하여 상대적인 저해도를 다음 식으로 계산하였다.

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

(A: 배양액 비첨가시 효소 활성, B: 배양액 첨가시 효소 활성)

1분 동안 $1 \mu mole$ 의 산물(2-naphthylamine)을 생성하는 cathepsin B 양을 50% 저해하는 저해물질의 양을 1 U(unit)로 정의하였다.

Trypsin에 대한 저해 활성은 $N-\alpha$ -Benzoyl-DL-Argi-

nine-p-Nitroanilide(BAPNA)를 기질로, papain에 대한 저해 활성은 p-Glu-Phe-Leu-p-nitroanilide(PFLNA)를 기질로, pepsin에 대한 저해 활성은 bovine serum albumin을 기질로, serratiopeptidase에 대한 저해 활성은 hammarsten casein을 기질로 각각 사용하여 측정하였다.

결과 및 고찰

저해물질 생산균의 선별 및 저해물질 생산균의 검색

덕유산, 설악산, 한라산, 소백산, 관악산, 광릉 등 전국 여러 장소에서 총 54개의 토양 시료를 채취하였다. 토양 시료를 전처리한 후 방선균 선택 배지에서 다양한 종류의 방선균을 713주 순수 분리하였다. Arginine glycerol salts 배지보다 starch casein nitrate agar 배지에서 다양한 방선균이 분리되었다.

분리균주들을 단백질 분해효소 저해물질 생성 배지에서 배양하여 배양 상등액을 얻었다. 단백질이 아닌 저분자량의 저해물질을 선별하기 위하여 $100^\circ C$ 에서 10분간 가열처리를 한 후 cathepsin B에 대한 저해활성을 조사하였다. 일차 검색 결과, 저해 활성이 90% 이상인 49 균주를 일차 선별하였다. Cathepsin B에 대한 특이성을 가지고 다른 단백질 분해효소에는 가급적 작용하지 않는 저해물질을 선별하기 위하여 단백질 분해효소의 4가지 group에 속하는 대표적인 효소인 trypsin, papain, pepsin, serratiopeptidase에 대한 저해 여부를 조사하였다(자료 미제출). 49 균주들로부터 생산되는 저해물질들은 cathepsin B와 마찬가지로 thiol protease인 papain에 대하여는 저해 활성이 높았다. Aspartic protease인 pepsin과 meta-

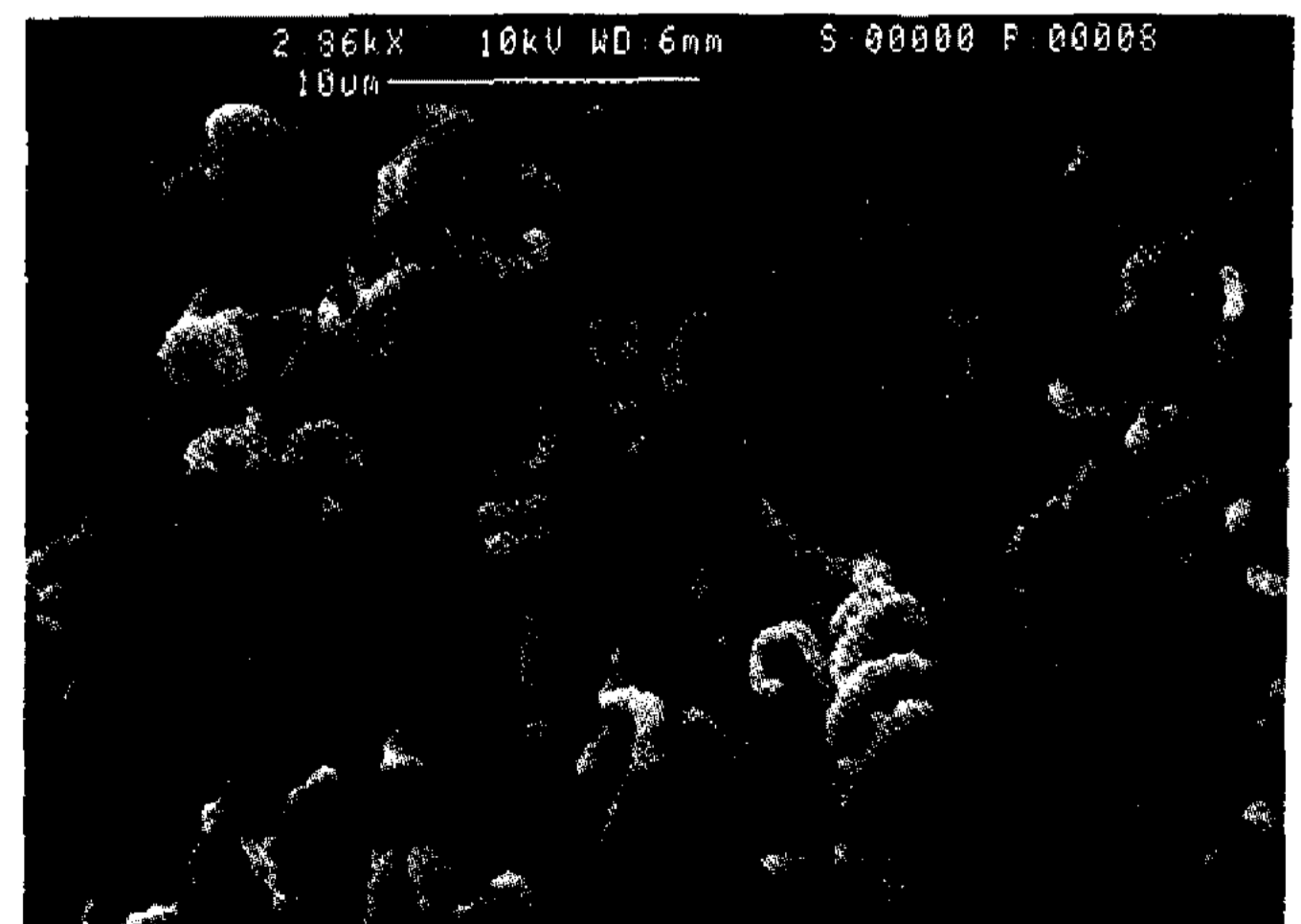


Fig. 1. Scanning electron micrograph of isolate SMF28 cultured on ISP4 media for 7 days.

llo-protease인 serratiopeptidase에 대한 저해활성 측정 결과, 주어진 조건에서는 저해하지 않았다. 이차 검색 결과로부터 trypsin에 대한 저해활성이 10% 미만이고 cathepsin B에 특이적으로 강한 저해활성을 보이는 균주(SMF28)를 최종 선별하였다.

분리균주 SMF28의 속(genus) 동정

SMF28 균주를 ISP 4 평판배지에서 1주일 배양한 후 주사전자현미경으로 관찰한 결과, 포자는 타원형이며 hairy한 표면을 가지고 있었다(Fig. 1). 포자 사슬 형태는 spiral이었다. *Streptoverticillium*의 특징인 verticil은 관찰되지 않았다. 세포벽 DAP isomer와 아미

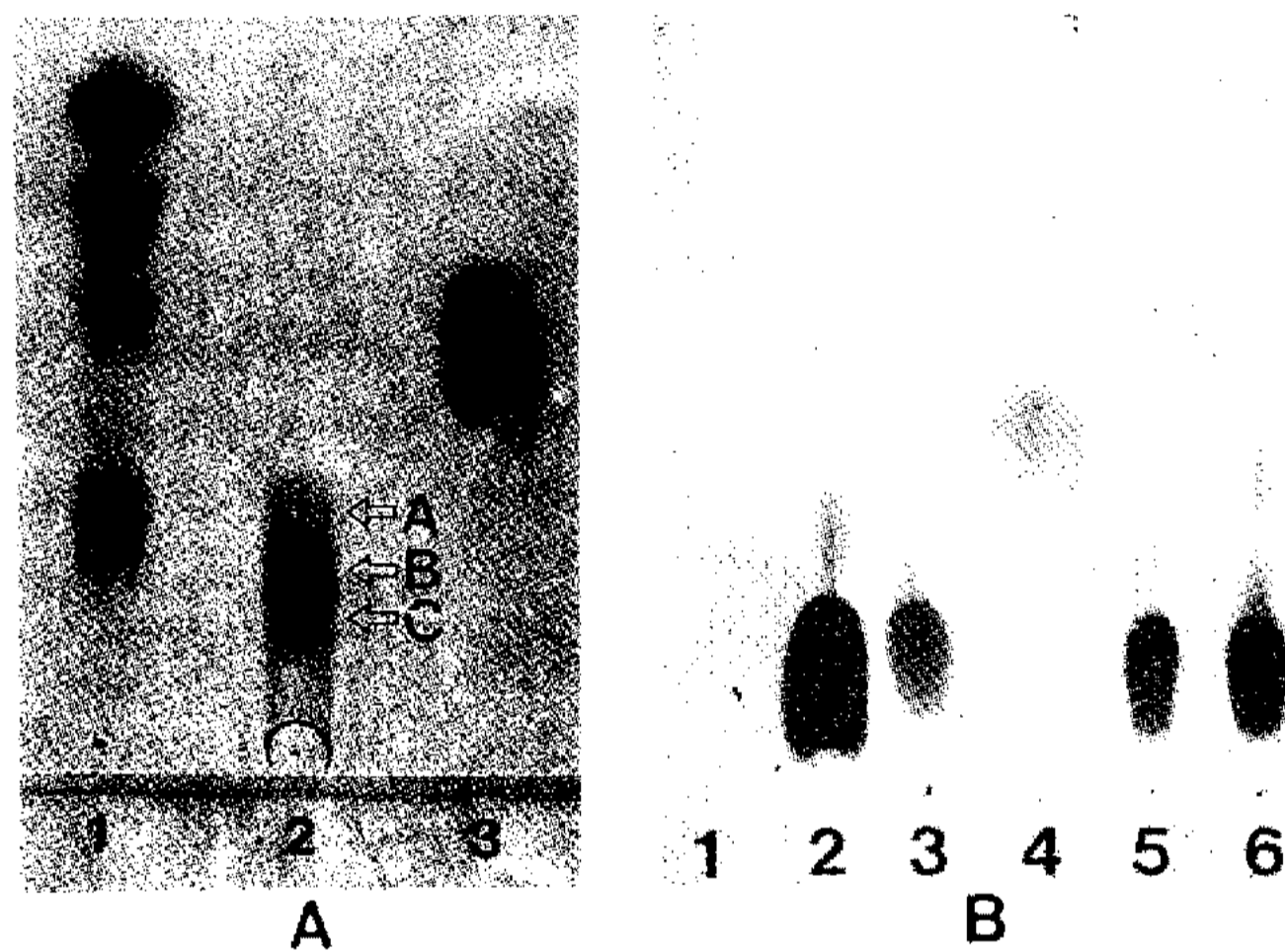


Fig. 2. Cellulose thin layer chromatogram of cell wall diaminopimelic acid (DAP) isomers and amino acids (A) and whole cell sugar extract (B) of isolate SMF28. (A) Lanes: 1, cell wall hydrolysate; 2, DAP isomers (A: LL-DAP, B: meso-DAP, C: 3-OH-DAP); 3, glycine (B) Lanes: 1, whole cell extract; 2, glucose; 3, arabinose; 4, rhamnose; 5, galactose; 6, mannose

노산 조성을 조사한 결과 세포벽의 peptide는 glycine으로 연결된 peptidoglycan type A3γ이며, wall type I으로 밝혀졌다(Fig. 2A). 세포내의 당은 특징적인 당이 나타나지 않는 sugar pattern C(24)에 해당하는 것으로 판명되었다(Fig. 2B). 따라서, 분리균주는 전형

Table 1. Comparison of diagnostic characteristics among *Streptomyces*, *Streptoverticillium*, and isolate SMF28

Characteristics	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptoverticillium</i>	SMF28
Colony size	Discrete	Discrete	Discrete
Substrate mycelium	+	+	+
Spore	+	-	+
Sporangia	-	-	-
Motile spore	-	-	-
Aerial mycelium	+	+	+
Chains of arthrospores	+	+	+
Arthrospore in verticils	-	+	-
Spore surface smooth	+	+	-
Spore surface hairy, spiny, or warty	+	-	+
Motile spores	-	-	-
Sugar in hydrolysates			
Arabinose, galactose, xylose	-	-	-
DAP isomer in cell wall			
LL-DAP	+	+	+
meso-DAP	-	-	-

Symbol: +, 90% or more of strains are positive; -, 10% or less of strains are positive

Table 2. Major unit characters for the identification of *Streptomyces* sp. SMF28

1. Morphology and pigmentation.			
Spore chain morphology	: rectiflexible (RFS)	-	spiral (SPI) +
Color of spore mass	: red (RED)	-	grey (GRY) +
Mycelial pigment	: red/orange (ROS)	-	
Diffusible pigment	: production(PIG)	-	yellow/brown(YBP) -
Melanin production on	: PYI 배지 (MPI)	+	tyrosine 배지 (MTY) -
2. Antimicrobial activity.			
<i>Bacillus subtilis</i> (SUB)	+	<i>Micrococcus luteus</i> (LUT)	-
<i>Candida albicans</i> (ALB)	-	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (CER)	-
<i>Streptomyces murinus</i> (MUR)	-	<i>Aspergillus niger</i> (NIG)	-
3. Biochemical tests.			
Lecithinase (LEC)	+	Lipolysis (LIP)	+
Pectin hydrolysis (PEC)	+	Nitrate reduction (N03)	+
H ₂ S production	+	Hippurate reduction (HIP)	-

Table 2. Continued

4. Degradation tests.				
Elastin (ELA)	—	Xantine (XAN)		+
Arbutin (ARB)	+			
5. Antibiotic resistance.				
Neomycin (NEO)	—	Ripamficin (RIF)		—
Oleandomycin (OLE)	+	Penicillin G (PEN)		—
6. Growth test.				
45°C (45C)	+	NaCl (7NA)		+
Sodium azide (01Z)	+	Phenol (PHN)		—
Potassium tellurite (01T)	+	Thallus acetate (T01)		—
7. Compound as sole source of nitrogen (0.1%, W/V).				
DL- α -amino-n-butyric acid (BUT)	—	L-Cysteine (CYS)		—
L-Valine (VAL)	—	L-Phenylalanine (PHE)		—
L-Histidine (HIS)	+	L-Hydroxyproline (HYD)		—
8. Organic compounds as sole source of carbon (1%, W/V)				
Sucrose (SUC)	+	meso-Inositol (INO)		+
Mannitol (MAN)	+	L-Rhamnose (RHA)		+
Raffinose (RAF)	—	D-Melizitose (MEZ)		—
Adonitol (ADO)	—	Dextran (DEX)		+
D-Melibiose (MEB)	—	Xylitol (XYT)		—

*Characters in parenthesis is the TAXON code name for computer analysis

Table 3. Identification score of the *Streptomyces* sp. SMF28 to the cluster of *Streptomyces* by TAXON program

Cluster	Taxon distance	95% Taxon radius	Probability of SMF28 further away(%)	Willcox probability
15	0.4264	0.4271	5.1989	0.992211
12	0.4525	0.4173	0.4352	0.007545
37	0.4960	0.3658	0.0000	0.000000
1C	0.5016	0.3883	0.0000	0.000218
19	0.5042	0.4508	0.1263	0.000012

적인 *Streptomyces* 속으로 동정되었다(Table 1).

TAXON program을 이용한 SMF28의 종(species) 동정

분리균주 SMF28의 종동정을 위한 50가지 단위형 질실험 결과는 Table 2와 같다. *Streptomyces* 주군집 (major cluster)을 대상으로 TAXON program을 사용하여 수리동정을 수행한 결과, Table 3과 같이 주군집 15, 즉 *Streptomyces chromofuscus* group에 대해 높은 Willcox probability(0.997516)를 나타내었다. Hypothetical median organism(HMO), centrotype,

Table 4. Comparison of taxonomic scores between hypothetical median organism (HMO), centrotype, outer-most member strain (OMS), best matched organism (BMO), and isolate SMF28 in cluster 15

Member strain in cluster 15	TAXON distance	95% TAXON radius	Probability of further away (%)	Willcox probability
HMO	0.2358	0.4271	99.9808	>0.999999
Centrotype (<i>S. chromofuscus</i>)	0.3092	0.4271	94.0342	>0.999999
OMS (<i>S. galbus</i>)	0.4595	0.4271	0.5813	0.994235
BMO (<i>S. argenteolus</i>)	0.3334	0.4271	81.6057	0.999946
Isolate SMF28	0.4264	0.4271	5.1989	0.992211

Table 5. Comparison of taxonomic unit characters among member of organisms in cluster 15 of *Streptomyces* and isolate SMF28 and the SSM value calculated by TAXON program

Taxonomic unit characters (TAXON code)	Positive characters state (%)	HMO	Centrotrope ¹	BMO ²	Isolate SMF28
RFS	22	-	-	-	-
SPI	78	+	+	+	+
RED	1	-	-	-	-
GRY	33	-	-	-	+
ROS	1	-	-	-	-
PIG	11	-	-	-	-
YBP	11	-	-	-	-
MPI	33	-	-	-	+
MTY	22	-	-	-	-
BUT	67	+	+	-	-
CYS	67	+	-	+	-
VAL	33	-	+	-	-
PHE	11	-	-	+	-
HIS	78	+	+	+	+
HYD	1	-	-	-	-
LEC	11	-	-	-	+
LIP	89	+	+	+	+
PEC	22	-	-	+	+
NO3	22	-	-	+	+
H2S	89	+	+	+	+
SUB	11	-	-	-	+
LUT	11	-	-	-	-
ALB	1	-	-	-	-
CER	1	-	-	-	-
MUR	22	-	-	-	-
NIG	1	-	-	-	-
HIP	11	-	-	-	-
ELA	67	+	+	+	-
XAN	22	-	-	-	+
ARB	99	+	+	+	+
NEO	1	-	-	-	-
RIF	33	-	-	-	-
OLE	1	-	-	-	+
PEN	44	-	-	+	-
45C	67	+	+	-	+
7NA	44	-	-	-	+
01Z	56	+	+	-	+
PHN	22	-	-	-	-
01T	67	+	+	+	+
T01	1	-	-	-	-
SUC	33	-	-	-	+
INO	89	+	-	+	+

Table 5. Continued

Taxonomic unit characters (TAXON code)	Positive characters state (%)	HMO	Centrotrope ¹	BMO ²	Isolate SMF28
MAN	99	+	+	+	+
RHA	67	+	+	+	+
RAF	22	-	+	-	-
MEZ	22	-	-	-	-
ADO	22	-	-	-	-
MEB	44	-	-	-	-
DEX	78	+	+	+	+
XYT	1	-	-	-	-
Matching to SMF28		37	35	36	50
Mismatching to SMF28		13	15	14	0
S _{SM} value (%)		74	70	72	100

¹Centrotrope: *S. chromofuscus*, ²Best matched organism: *S. argenteolus*

outer-most member strain(OMS), best matched organism(BMO)와 분리주 SMF28의 TAXON distance, 95% TAXON radius와 Willcox probability 등을 비교한 결과 Table 4와 같았다. 분리주 SMF28의 TAXON distance(0.4264)가 95% TAXON radius(0.4271) 내에 있으며, probability of further away(%)가 5.1989로서 비교적 낮은 조건이나 주군집 15의 최외각 균주(OMS)보다는 높은 조건이어서 분리주는 주군집 15에 귀속되었다. 분리주 SMF28의 단위형질 특성을 비교한 결과 *S. argenteolus*와의 단순비교계수(simple matching coefficient)는 72%로 centrotrope인 *S. chromofuscus*와의 단순비교계수 70%보다 높아 *S. argenteolus*와 가장 유사한 것으로 판단되었다(Table 5). 그러나, *S. argenteolus*는 cluster 15의 centrotrope인 *S. chromofuscus*에 귀속되므로 본 분리주는 *S. chromofuscus*의 한 균주(SMF28)로 최종 동정하였다(25). *S. chromofuscus*는 지금까지 보고되지 않은 cathepsin B 저해물질 생산균주로서, *S. chromofuscus* SMF28이 생산하는 cathepsin B 저해물질은 valine과 phenylalanine과 같은 방향족 아미노산을 함유하는 peptide성 신규물질로 추정되었다(26).

요 약

다양한 환경으로부터 채취한 토양 시료에 여러가지

물리 화학적 전처리를 한 후, 방선균 선택 배지를 이용하여 700여 방선균을 선택적으로 분리하였다. 분리한 균주 중에서 저분자량의 cathepsin B 저해물질을 생산하는 균주를 검색하였다. 균주 배양액의 여러 단백질 분해효소에 대한 저해 여부와 cathepsin B 저해활성도를 비교하여, cathepsin B에 특이적인 저해물질을 생산하는 균주 SMF28을 선별하여 화학 동정 및 수리 동정을 실시하였다. 50개의 분류단위 형질을 분석하였고 이 실험결과를 TAXON program에 적용하여 종의 수리 동정을 실시하였다. 그 결과 분리균 SMF28은 *Streptomyces chromofuscus*로 동정되었다.

감사의 글

본 연구는 과학기술처에서 선정된 '94 선도기술개발사업과제 연구비에 의해서 수행되었다. 본 연구에 많은 도움을 준 서울대학교 분자미생물학 연구센터에 감사드린다.

참고문헌

1. Aoyagi, T., S. Miyata, M. Nanbo, F. Kojima, M. Matsuzaki, M. Ishizuka, T. Takeuchi, and H. Umezawa. 1969. Biological activities of leupeptins. *J. Antibiot.* **22**: 558-568.
2. Suda, H., T. Aoyagi, M. Hamada, T. Tekeuchi, and H. Umezawa. 1972. Antipain, a new protease inhibitor isolated from actinomycetes. *J. Antibiot.* **25**: 263-266.
3. Umezawa, H., T. Aoyagi, H. Morishima, S. Kunitomo, M. Matsuzaki, M. Hamada, and T. Tekeuchi. 1970. Chymostatin, a new chymotrypsin inhibitor produced by actinomycetes. *J. Antibiot.* **23**: 425-427.
4. Umezawa, H., T. Aoyagi, A. Okura, H. Morishima, T. Takeuchi, and Y. Okami. 1973. Elastatinal, a new elastase inhibitor produced by actinomycetes. *J. Antibiot.* **26**: 787-789.
5. Shin-Watanabe, T., K. Fukuhara, and S. Muraio. 1982. The structure of β -MAPI, a novel proteinase inhibitor. *Tetrahedron.* **38**: 1775-1780.
6. Umezawa, H., T. Aoyagi, H. Morishima, M. Matsuzaki, M. Hamada, and T. Tekeuchi. 1970. Pepstatin, a new pepsin inhibitor produced by actinomycetes. *J. Antibiot.* **23**: 259-262.
7. Suda, H., T. Aoyagi, M. Hamada, and H. Umezawa. 1973. A thermolysin inhibitor produced by actinomycetes, Phosphoramidon. *J. Antibiot.* **26**: 621-623.
8. Umezawa, H., T. Aoyagi, K. Ogawa, H. Iinuma, H. Naganaa, M. Hamada, and T. Takeuchi. 1984. Histargin, a new carboxypeptidase B, produced by actinomycetes. *J. Antibiot.* **37**: 1088-1090.
9. Barrett, A.J. 1977. Cathepsin B and other thiol proteinases, Pp. 181-208. In A.J. Barrett (ed.), *Proteinases in Mammalian Cells and Tissues*. North-Holland Biomedical Press.
10. Barrett, A.J. and H. Kirschke. 1981. Cathepsin B, cathepsin H, and cathepsin L, Pp. 535-561. In *Methods in Enzymology*, Vol. 80. Academic Press Inc.
11. Barrett, A.J. 1977. Introduction to the history and classification of tissue proteinases, Pp.1-18. In A.J. Barrett (ed.), *Proteinases in mammalian cells and tissues*. North-Holland Biomedical Press.
12. Stracher, A., E.B. McGowan, and S.A. Shafiq. 1978. Muscular dystrophy: Inhibition of degeneration *in vivo* with protease inhibitors. *Science.* **200**: 50-51.
13. Tappel, A.L., H. Zalkin, K.A. Caldwell, I.D. Desai, and S. Shibko. 1962. Increased lysosomal enzymes in genetic muscular dystrophy. *Arch. Biochem. Biophys.* **96**: 340-346.
14. Kominami, E., T. Tsukahara, Y. Bando, and N. Katunuma. 1985. Distribution of cathepsin B and H in rat tissues and peripheral blood cells. *J. Biochem.* **98**: 87-93.
15. Shirling, E.B. and D. Gottlieb. 1966. Methods for the characterization of *Streptomyces* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **16**: 313-340.
16. Williams, S.T., M. Goodfellow, E.M.H. Wellington, J.C. Vickers, G. Alderson, P.H.A. Sneath, M. Sackin, and A.M. Mortimer. 1983. A probability matrix for the identification of some streptomycetes. *J. Gen. Microbiol.* **129**: 1815-1830.
17. Williams, S.T., M. Goodfellow, G. Alderson, E.M.H. Wellington, P.H.A. Sneath, and M. Sackin. 1983. Numerical classification of *Streptomyces* and related genera. *J. Gen. Microbiol.* **129**: 1743-1813.
18. Wellington, E.M.H. and S.T. Williams. 1978. Preservation of actinomycete inoculum in frozen glycerol. *Microbios Letters.* **6**: 151-157.
19. Yamada, K. and K. Kamagata. 1970. Taxonomic studies on *Coryneform* bacteria. II. Principle amino acids in the cell wall and their taxonomic significance. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **16**: 103-113.
20. Stanek, J.L. and G.D. Robert. 1974. Simplified approach to identification of aerobic actinomycetes by thin-layer chromatograph. *Appl. Microbiol.* **28**: 226-231.
21. Kim, I.S., H.T. Kim, A.C. Ward, M. Goodfellow, Y.C. Hah, and K.J. Lee. 1992. Numerical identification of a *Streptomyces* strain producing thiol protease inhibitor. *J. Microbiol. Biotechnol.* **2**: 220-

- 225.
22. Rho, Y.T., H.T. Kim, K.H. Oh, H.I. Kang, A.C. Ward, M. Goodfellow, Y.C. Hah, and K.J. Lee. 1992. Numerical identification of a *Streptomyces* strain producing spores in submerged culture. *Kor. J. Microbiol.* **30**: 278-286.
23. Barrett, A.J. 1972. A new assay for cathepsin B1 and other thiol proteinases. *Anal. Biochem.* **47**: 280-293.
24. 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*. Society for Industrial microbiology, Arlington.
25. Romaano, L. 1989. Streptomyces 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.
26. Lee, H.S., I.S. Kim, H.T. Kim, S.J. Yoon, and K.J. Lee. 1995. Production and characterization of cathepsin B inhibitor from *Streptomyces chromofuscus* SMF28. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*

(Received 8 May 1995)