

분광광도법에 의한 Cathepsin B 저해물질의 효소동력학적 저해특성 조사

한길환 · 김상달*
영남대학교 응용미생물학과

Kinetic Analysis of Cathepsin B Inhibitor Using a Spectrophotometric Assay. Han, Kil-Hwan and Sang-Dal Kim*. Department of Applied Microbiology, Yeungnam University, Kyongsan 712-749, Korea – The KHS10, $C_4H_{11}O_4N_6$ formula produced from *Streptomyces luteogriseus* KT-10 effectively inhibited a lysosomal cysteine proteinase, cathepsin B. It inhibited the enzyme activity of cathepsin B competitively when the N α -CBZ-L-lysine *p*-nitrophenyl ester HCl (CLN) was used as a substrate. The inhibition constant (K_i) of KHS10 for cathepsin B determined by spectrophotometric assay was 430 nM. The effective inhibition of cathepsin B was observed at 25°C and pH 6.0. The cathepsin B inhibitor, KHS10 needed a preincubation of cathepsin B with the inhibitor for over 5 min. The KHS10 preserved over 80% inhibition activity even after heat-treatment at 100°C for 1 hr.

Key words: Cathepsin B inhibitor, kinetic characterization, spectrophotometric assay

사람의 조직세포는 외부로부터 병원성 세균의 침입을 막고, 세포내외에 불필요한 조직을 소화 흡수하며, 면역세포의 항원인식에 대한 단백질 생산과 세포막을 통한 단백질 분비의 조절에 관여하는 여러 종류의 단백질 분해효소를 함유한 기관인 lysosome을 지니고 있다[4,6,15,17]. 이 단백질분해효소들 중에서도 cysteine계 단백질 분해효소인 cathepsin B는 간, 비장, 지라, 표피선, 폐, 심장 등의 여러 조직세포에 존재하며 생리적 조절작용 및 면역작용에 관여하고 있다[13,14,18,20].

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 노인성치매 등의 발병에도 관여한다는 보고가 있다[7,9,16,19].

Cysteine 계 단백질 분해효소인 cathepsin B의 세포내외과다 발현은 여러 질병발생의 원인이 되므로 이러한 질병 발생 규명 및 치료를 위해 새로운 저해물질개발에 대한 연구가 꾸준히 이루어지고 있다[8,11]. Cathepsin B의 저해제로는 인체내의 urine으로부터 분리한 cystatin C[5]와 난백으로부터 분리한 cystatin[10] 등이 있으며 토양내의 미생물로부터는 leupeptin[1], antipain[22], E-64[21], β -MAPI[24] 등의 저해제가 개발되었다. 그러나 이와 같은 저해물질들은 cathepsin B에 대한 특이적 저해력이 떨어질 뿐만 아니라 인체내의 다른 효소에도 저해의 영향을 미치는 부작용이 나타났다.

본 연구는 토양내의 *Streptomyces luteogriseus* KT-10으로부터 cathepsin B를 특이적으로 저해하는 새로운 저해제 개발을 시도하여 $C_4H_{11}O_4N_6$ 로 추정하는 저해물질을 분리하였다[11,12].

이 저해물질을 KHS10이라고 명명하고 기질인 N α -CBZ-L-lysine *p*-nitrophenyl ester HCl (CLN)과 N α -benzoyl-DL-arginine β -naphthylamide (BANA)을 사용하여 저해제 KHS10가 cathepsin B 효소 활성을 저해하는데 미치는 영향을 분광광도 측정법을 이용하여 역학적으로 조사하였다. 또한 cathepsin B가 저해제 KHS10에 의해 저해되는 최적 반응조건을 조사하였다.

재료 및 방법

균주, 효소 및 기질

토양으로부터 분리한 *Streptomyces luteogriseus* KT-10을 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 0.5 g을 물 1 liter에 녹여 pH 7.0으로 조절하여 만든 배지에 접종한 후 27°C에서 진탕 배양하여 cathepsin B 저해물질을 생산하였다. Cathepsin B 저해물질은 80°C에서 10분간 열을 가한 후 *n*-butanol로 추출한 물질을 DEAE-Sephadex A-25, Sephadex G-15, silica gel 60, Sephadex LH-20 그리고 최종적으로 분취용 ODS-80TM column을 이용하여 정제하였다[12].

Cathepsin B는 소로부터 분리한 Sigma사 제품을 사용하였다. 기질로는 N α -CBZ-L-lysine *p*-nitrophenyl ester HCl (CLN)과 N α -benzoyl-DL-arginine β -naphthylamide (BANA)을 Sigma사로부터 구입하여 사용하였다. 자외선 분광광도계 (UV-spectrophotometer)는 Hitachi 사의 U-2000을 사용하였다.

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

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 사용하거나, N α -benzoyl-DL-arginine β -naphthylamide (BANA)의 171 mM 농도를 N,N-dimethylformamide에 녹여 각 50 μ l를 반응시켰으며, 저해물질용액은 100 μ l를 취하여 반응시켰다. CLN 기질의 경우 326 nm의 분광광도계에서, BANA 기질의 경우는 340 nm의 분광광도계에서 25°C의 온도에서 반응시간에 따라 측정된 후 저해활성의 기울기 값(1/0)을 이용하여 저해활성도를 조사하였다[2,3].

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

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

결과 및 고찰

Cathepsin B 저해제 KHS10에 대한 동력학적 저해

Cysteine 계 단백질 분해효소인 cathepsin B가 저해제 KHS10에 대한 저해율을 조사하기 위하여 cathepsin B의 기질로 N α -CBZ-L-lysine *p*-nitrophenyl ester HCl (CLN) 과 N α -benzoyl-DL-arginine β -naphthylamide (BANA)을 사용하여 저해율을 조사하였다. 그 결과 Fig. 1, 2 에서와 같이 기질 CLN과 BANA의 저해력이 모두 높게 나타났다. 또한 cathepsin B에 대한 기질 CLN의 K_m 값은 0.5 mM, V_{max} 값은 29.4 μ M/min으로 나타났으며 BANA 기질의 경우는 K_m 값이 2 mM, V_{max} 값은 7.8 μ M/min로 조사되어 CLN과 BANA 합성기질에서 cathepsin B에 대한 활성은 BANA에 비해 CLN이 높은 활성을 보여주고 있다. 이와 같은 결과는 cathepsin B가 ester 결합을 한 BANA에 비해 amide 결합을 한 CLN에 대해 높은 분해 활성을 보인다는 Bajkowski 등(2)의 보고와 유사한 결과이다.

Cathepsin B에 대한 저해제 KHS10의 저해특성을 조사하기 위하여 반응액 중 CLN의 기질농도를 0.03, 0.06, 0.13, 0.25, 0.5 mM의 여러 농도별로 첨가하고 저해물질을 무첨가와 0.5, 1 μ M농도로 첨가하여 반응시킨 기울기를 초기속도(1/0) 값으로 구하여 그 초기속도와 각 기질농도를 역수로 취하여 Lineweaver-Burk plots에 의하여 확인하여 본 바 Fig. 3에서 나타난 바와 같이 본 저해제 KHS10은 cathepsin B에 대해 경쟁적인 저해를 나타냄을 확인하였다.

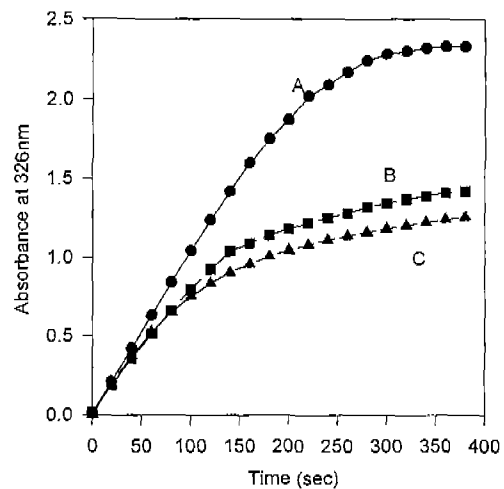


Fig. 1. Effect of KHS10 on the activity of cathepsin B using a substrate, CLN.

A(●), in the absence of inhibitor KHS10; B(■), in the presence of inhibitor KHS10 (1 μ M); C(▲), in the absence of cathepsin B.

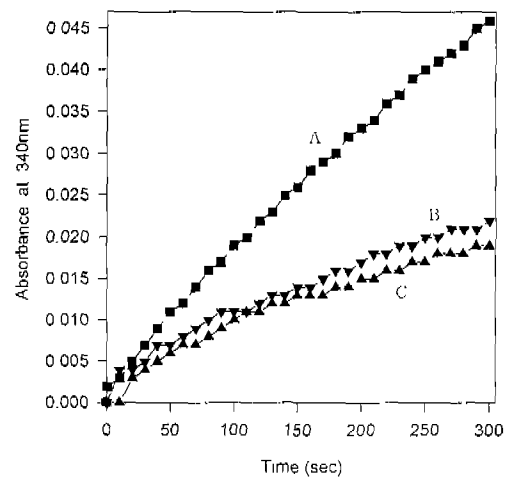


Fig. 2. Effect of KHS10 on the activity of cathepsin B using a substrate, BANA.

A(■), in the absence of inhibitor KHS10; B(▼), in the presence of inhibitor KHS10 (1 μ M); C(▲), in the absence of cathepsin B.

KHS10의 저해제 속도상수

Cathepsin B 저해제 KHS10가 효율적으로 cathepsin B에 대해 경쟁적인 저해를 하는지 확인하기 위하여 저해제 속도 상수(K_i) 값을 구하였다. 이 K_i 값은 cathepsin B와 저해제 KHS10 사이의 해리상수로 나타내었다. 기질 CLN에 대한 농도별로 Lineweaver-Burk plot를 이용 K_m 값을 구한 후 이 K_m 값을 이용한 2 차 plot으로 y 축의 K_m 값을 K_m 로 하고 x 축을 저해제 KHS10 농도별 기울기 1/0 값으로 하여 이차 Lineweaver-Burk plot를 작성하여 x 축과 만나는 지점을 $-K_i$ 값으로 하여 나타내었다. Cathepsin B에 대한 K_i 값은 Fig. 4에서 나타난 것과 같이 0.43 μ M로 나타났다. Cathepsin B 저해제 KHS10의 K_i 값은

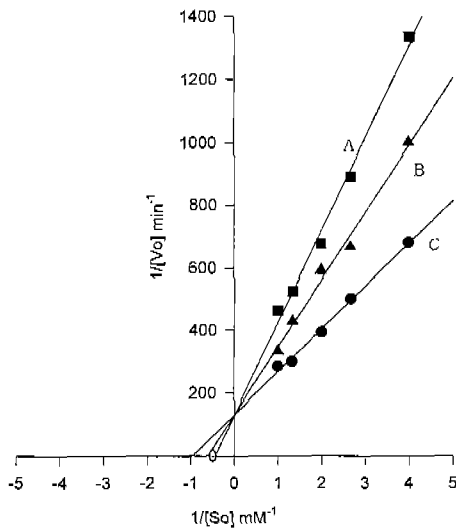


Fig. 3. Inhibition mode of cathepsin B inhibitor KHS10. N α -CBZ-L-lysine *p*-nitrophenyl ester (CLN) was used as a substrate to assay the cathepsin B activity. A(■), in the absence of KHS10; B(▲), in the presence of KHS10 (1 μ M); C(●), in the presence of KHS10 (2 μ M).

기존에 저해물질인 leupeptin의 0.31 μ M 보다는 조금 높지만 antipain의 0.359 mM 과 E-64의 30 μ M에 비해 저해능이 우수함을 확인할 수 있었다.

온도에 의한 KHS10의 cathepsin B 효소 활성 저해율 분광광도계를 사용하여 KHS10의 최적 저해율을 보이는 반응 온도를 조사하였다. KHS10 1 μ M, CLN 0.375 mM

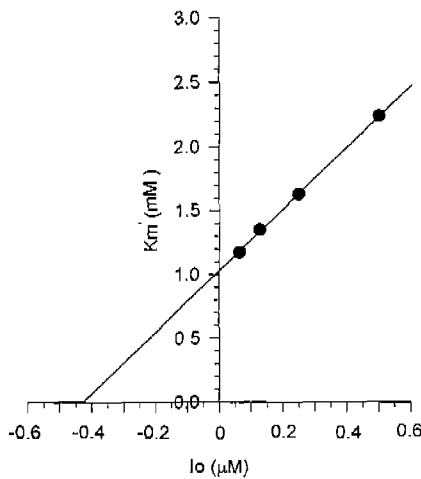


Fig. 4. Determination of inhibitor constant (K_i) for the KHS10.

The K_m values were measured at various concentrations of inhibitor KHS10. In a plot of K_m' against (l_o), the X axis gives $-K_i$. The K_i value was calculated by using the equation $K_m' = K_m / K_i \times (l_o) + K_m$, where K_m value for N α -CBZ-L-lysine *p*-nitrophenyl ester was 1.03 mM.

과 cathepsin B를 혼합한 반응액을 20, 25, 30, 37°C의 온도에서 반응시킨 결과 Fig. 5 에서와 같이 25°C에서 저해율이 가장 높게 나타났다. 온도에 의한 저해율은 cathepsin B 효소와 CLN과의 반응 기울기 값이 KHS10이 첨가된 cathepsin B 효소와 CLN과의 반응 기울기 값을 나눈 백분율로 나타낸 값이다. Cathepsin B 효소의 경우 37°C에서 활성이 좋으나 저해제 KHS10를 처리한 후 저해율은 25°C에서 가장 좋게 나타났다. 이러한 이유는 합성기질에 의한 영향으로써 CLN이 온도가 상승할수록 효소와의 반응에 의한 발색능력이 떨어지는 것으로 사료된다.

pH에 의한 KHS10 저해율 영향

Cathepsin B 효소는 기질과의 반응에 있어서 pH에 의한 영향을 가장 많이 받는다[2]. 이와 같은 결과를 확인하기 위하여 cathepsin B, CLN 0.375 mM 그리고 KHS10의 반응에서 최적의 pH를 알기 위하여 반응별의 pH를 3.0-9.0로 조절한 다음 KHS10에 대한 효소활성 저해정도를 조사하였다. 그 결과 pH 6.0에서 저해율이 가장 높게 나타났다 (Fig. 6). Cathepsin B는 lysosomal 단백질 분해효소로서 pH 5.0 부근인 약 산성을 유지하는 것으로 알려져 있으며 저해제 KHS10과의 저해율은 pH 6.0에서 가장 좋은 활성을 갖는 저해제임을 확인하였다. 이와 같은 결과는 Turk 등 [23]에 의해 bovine stefin B 저해제를 이용하여 cathepsin S에 대한 저해율이 pH 6.0에서 가장 높게 나타났다는 보고와 비슷한 결과를 보여주고 있다.

KHS10 전처리 시간이 cathepsin B 저해에 미치는 영향 분광광도계를 이용하여 효소와 기질 및 저해제 KHS10간의 반응을 일으키기 전에 기질을 넣지 않은 상태에서 효소와

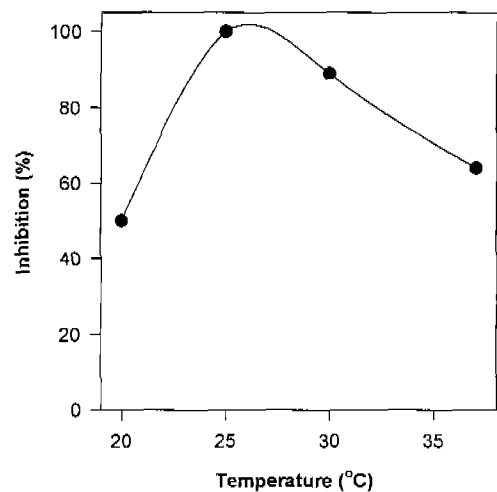


Fig. 5. Effect of temperature on the inhibitory activity of KHS10 on the cathepsin B.

The reaction used 0.375 mM of N α -CBZ-L-lysine *p*-nitrophenyl ester and 1 μ M of KHS10.

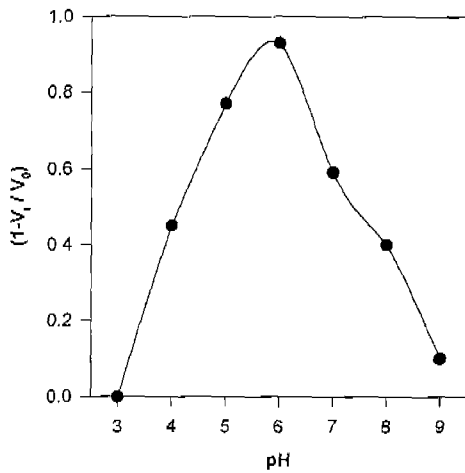


Fig. 6. Effect of pH on the activity of the cathepsin B in the presence of inhibitor, KHS10.

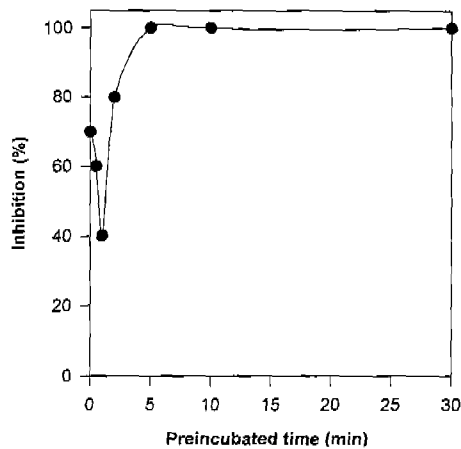


Fig. 7. Effect of preincubation of inhibitor KHS10 and cathepsin B on the enzyme activity.

Inhibitor KHS10 (1 μM) was incubated with cathepsin B in the absence of N α-CBZ-L-lysine *p*-nitrophenyl ester (CLN) (0.375 mM) for various time at 25°C and pH 6.0 prior to the determination of inhibitory activity.

저해제 간의 전처리 시간을 달리하며 최적의 저해율을 나타내는 전처리 시간을 확인하기 위하여 cathepsin B, CLN 0.375 mM 과 저해제 KHS10 1 μM 를 이용하여 전처리 시간을 조사한 결과 Fig. 7에서와 같이 0 시간에서 70%의 저해율이 나타났으나 그 후 1분 후까지는 40%로 저해율이 떨어졌다가 저해율이 점점 증가하여 5분 반응시 가장 높은 저해율로 나타났다. 이와 같은 결과는 cathepsin B 와 저해제 간의 상호반응에 있어서 유도기적인 시간범위라고 사료된다.

반응 시간별 KHS10의 저해율

효소와 기질 그리고 저해제 사이의 최적의 반응 시간을 분광광도계를 이용하여 측정하기 위하여 cathepsin B 저해제 KHS10 1 μM, CLN 0.375 mM 그리고 cathepsin B의

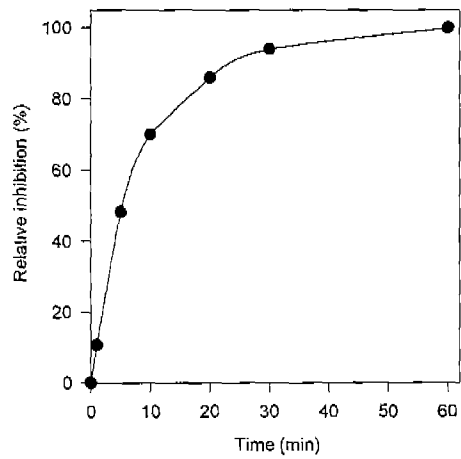


Fig. 8. Effect of reaction time for inhibitory activity of KHS10. The reaction was performed with 0.375 mM of N α-CBZ-L-lysine *p*-nitrophenyl ester and 1 μM of inhibitor KHS10 after being preincubated for 5 min.

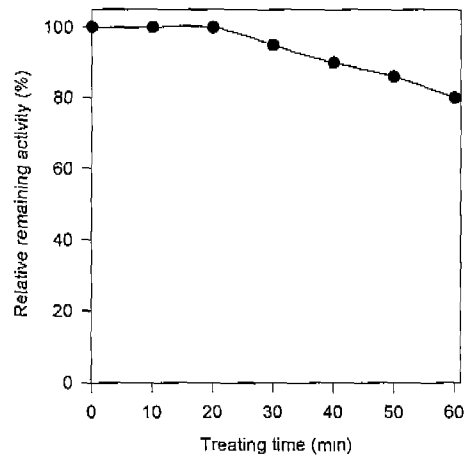


Fig. 9. Thermal stability of the cathepsin B inhibitor KHS10.

농도로 하여 조사하였다. 효소, 기질 그리고 저해제 사이의 반응 시간에 따른 기울기를 상수로 나타내었으며 이러한 저해력을 계산하여 반응 시간별로 확인한 결과 Fig. 8 에서와 같이 30 분 반응시 90% 이상의 저해율을 나타내었으며 1 시간 반응시 100%에 가까운 저해율을 나타내었다.

이와 같은 결과는 cathepsin B 와 저해제 KHS10가 기질과 반응에 있어서 시간이 지남에 따라서 저해력이 높아짐을 확인할 수 있었다. 이 저해제 KHS10은 활성능에 있어서 지속적인 활성을 나타냄으로써 *in vivo*에서의 가능성을 기대한다.

KHS10의 열에 대한 안정성

정제된 저해제 KHS10을 100°C에서 시간별로 처리시킨 후 그 잔존 저해율을 측정하여 열 안정성을 측정하였다. 그 결과 Fig. 9에서 나타난 것과 같이 100°C에서 20 분간 열

처리시 100%의 저해율이 유지되었고, 60분간 열을 가하였을 경우에도 80% 이상의 저해율을 나타내는 매우 열에 안정한 물질임을 알 수 있었다.

요 약

Cysteine 계 cathepsin B 단백질 분해 효소는 고등동물의 세포조직 내에 lysosome에 존재하며 병원성세균의 침입을 막고 불필요한 단백질을 분해시키며 또한 면역세포의 항원인식에 대한 단백질 생산 등에 관여하는 효소이다. 이 cathepsin B의 과량 발현은 암전이, 만성적 염증성 질환, 류머티스 관절염, 노인성치매 등의 원인이 된다. 이 cathepsin B를 저해하는 것으로 밝혀진 *S. luteogriseus* KT-10으로부터 분리한 저해제 KHS10을 이용하여 분광광도계를 사용, 그 저해력을 조사하였다. Cathepsin B 저해제 KHS10은 경쟁적 저해를 나타내며 cathepsin B는 기질 CLN에 대해 K_m 값은 0.5 mM을 V_{max} 값은 29.4 μM 로 나타내었으며, 합성기질인 BANA에 대해서는 K_m 값이 2 mM을 V_{max} 값은 7.8 $\mu\text{M}/\text{min}$ 로 나타났다. 저해제 KHS10의 K_i 값은 0.43 μM 로 측정되었다. Cathepsin B에 대한 저해제 KHS10의 반응시간에 대한 저해력은 1시간 반응시 저해력이 100%에 가깝게 높게 나타났으며 온도에 의한 저해율은 25°C에서 활성이 가장 높게 나타났다.

Cathepsin B와 저해제 KHS10이 반응 전 배양은 5분간의 전 배양으로 높은 저해율을 나타내었으며 또한 pH에 의한 저해활성은 pH 6.0에서 가장 높게 저해하는 것으로 조사되었다. 저해제 KHS10은 100°C에서 1시간 열을 가해도 그 잔류 저해력은 80% 이상 유지되었다.

REFERENCES

- Aoyagi, T., T. Takeuchi, A. Matsuzaki, Kawamura, K. S. Kondo, Hamada, M. K. Maeda, and H. Umezawa. 1969. Leupeptins, new protease inhibitor isolated from *Actinomyces*. *J. Antibiot.* **22**: 283-286.
- Bajkowski, A. S. and A. Frankfater. 1975. Specific spectrophotometric assays for cathepsin B. *Anal. Biochem.* **68**: 119-127.
- Barrett, A. J. 1972. A new assay for cathepsin B and other thiol proteinases. *Anal. Biochem.* **47**: 280-293.
- 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.
- Barrett, A. J., M. E. Davies, and A. Grubb. 1984. The place of human gamma-trace (cystatin C) amongst the cysteine proteinase inhibitors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **120**: 631-636.
- Chapman H. A., R. J. Ricse, and G. P. Shi. 1997. Emerging roles for cysteine proteases in human Biology. *Annu. Rev. Physiol.* **59**: 63-88.
- de Duve, C. 1969. In J. T. Dingle and H. B. Fell, (ed.), *Lysosomes in Biology and Pathology* North-Holland Publ., Amsterdam. **1**: 3-42.
- Duffy, M. J. 1996. Protease as prognostic markers in cancer. *Clin. Cancer Res.* **2**: 613-618.
- 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.
- Engh, R. A., T. Dieckmann, W. Bode, E. A. Auerswald, V. Turk, R. 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.
- 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.
- Han, K. H. and S. D. Kim. 2001. Isolation and characterization of cathepsin B inhibitor produced by *Streptomyces luteogriseus* KT-10. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **29**: printed
- 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.
- Katunuma, N. and E. Kominami. 1983. Structures and functions of lysosomal thiol proteinases and their endogenous inhibitor. *Curr. Top. Cell. Regul.* **22**: 71-101.
- 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.
- Lenney, J. F. 1980. Inhibitors associated with the proteinases of mammalian cells and tissues. *Curr. Top. Cell. Regul.* **17**: 25-57.
- Neurath, H. and K. A. Walsh. 1976. Role of proteolytic enzymes in biological regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **73**: 3825-3832.
- 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.
- 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.
- Sloane, B. F., K. Moin, and T. T. Lah. 1994. Regulation of lysosomal endopeptidases in malignant neoplasia, pp. 411-466. In G. Pretlow and H. Pretlow (ed.), *Biochemical and Molecular Aspects of Selected Cancers*, vol 2, Academic Press, New York.
- Sreedharan, S. K., C. Verma, L. S. 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.
22. Suda, H., T. Aoyagi, M. Hamada, T. Takeuchi, and H. Umezawa. 1972. Antipain, a new protease inhibitor isolated from *Actinomycetes*. *J. Antibiot.* **25**: 263–266.
23. Turk, B., A. Colic, V. Stoka, and V. Turk. 1994. Kinetic of inhibition of bovine cathepsin S by bovine stefin B. *FEBS Lett.* **339**: 155–159.
24. 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 Apr. 19, 2001/Accepted Jun. 1, 2001)