

초청강연 논문 IV

축산물 유래 생체 조절기능
펩타이드의 설계와 응용

김 동 운 박사
(축산기술연구소)

축산물유래 생체조절기능 펩타이드의 설계와 응용

김동운
축산기술연구소

I 서론

생체내에는 여러 가지 생리활성을 나타내는 펩타이드가 다수 존재하고 있으며, 이들 대부분을 펩타이드 호르몬이라고 한다. 예로서 당 대사에 관여하는 insulin이나 glucagon, 위산과 펩신 분비를 조절하는 gastrin, 성장촉진 호르몬인 somatotrophin, 갑상선 자극 호르몬, 자궁 수축에 관여하는 oxytocin, 동맥이완에 관여하는 bradykinin 등이 있다. 기타의 펩타이드 생리활성 물질로서는 면역 반응에 관여하는 interleukins, 신경전달 물질로서 통증에 관여하는 enkephalin, 펩타이드 항생물질 등이 있다. 이와 같이 각종 펩타이드가 생체 내에서 다양한 생리활성을 나타내고 있다. 이들 펩타이드 호르몬이나 펩타이드 신경전달물질 등의 생리활성 펩타이드는 유전정보의 발현에 의해 일단 전구체 단백질로서 생합성된 후에 processing이라는 효소분해에 의해 파생하는 것으로 알려져 있다. 따라서 우리가 일상적으로 섭취하는 단백질을 효소 분해한 분해물중에도 펩타이드 호르몬과 같이 체내에서 체조절작용이 있는 생리활성 물질이 존재할 가능성이 있다

최근 식품 단백질이나 혈액 단백질 등 중래는 생리활성 펩타이드의 전구체로는 생각하지 않았던 단백질로부터도 효소소화에 의해 다양한 생리활성 펩타이드가 파생하는 예가 많이 발견되었고, 이들 중에는 경구 투여시에도 생리 작용을 나타내는 것이 있다. 이와 같은 펩타이드는 펩타이드호르몬과 같이 표적세포의 특정 receptor를 통하여 작용하는 것 또는 생체내 특정 효소의 활성을 저해함으로써 생리적 작용을 나타내는 것 등이 있다. 내인성 생리활성 펩타이드와 비교한 경우 일반적으로 이들 외인성 생리활성 펩타이드의 활성은 그다지 크지는 않지만, 한편으로는 유니크한 구조의 것이 많고, 또 다기능성을 나타내는 것도 있다.

카제인 유래 opioid peptide인 β -casomorphin(Brantl등, 1979)을 비롯하여, 당초 이와 같은 생리활성 펩타이드의 상당부분이 우유 단백질에서 얻어졌다. 따라서 우유, 고기 및 계란과 같은 단백질이 풍부한 축산물은 생리활성 펩타이드 생산에 적합한 소재가 될 수 있다. 여기에서는 이와 같은 생리활성 펩타이드의 제조에 관한 기본적인 접근방법 및 혈압강하작용 펩타이드의 생성에 관한 실례를 소개하고자 한다.

II. 식품단백질유래 생리기능성물질의 연구법

식품 단백질 유래의 생리활성 펩타이드의 탐색 및 해석법에 관해서 살펴보면, 식품 단백질 구조 중에 잠재적으로 존재하는 생리 기능성 물질의 구조를 연구하기 위해서는 적어도 4종의 기술이 필요하다. 첫

제는 목적으로 하는 생리 기능 활성의 탐색과 확인을 위한 *in vitro* 및 *in vivo* assay 방법의 확립이고, 둘째는 활성 펩타이드를 얻기 위한 효소처리법과 펩타이드의 정제법에 관한 기술, 셋째는 펩타이드의 1차구조의 결정법이 필요하고, 넷째는 펩타이드의 화학합성기술도 불가결하다. 따라서 이들 기술의 조합에 의해 두 가지의 기본적 연구전략에 기초하여 단백질중에 잠재적으로 존재하는 생리활성 펩타이드의 배열을 발견할 수 있다.

제 1의 전략은 단백질을 효소로 분해한 분해물로부터 목적으로 하는 펩타이드를 분리·정제하고 구조를 결정하는 것이다. 제 2의 전략은 목적으로 하는 peptide에 유사한 아미노산 배열을 재료 단백질의 1차구조중에서 찾아내어, 이것에 상당하는 fragment peptide를 화학합성하고, 이들의 활성을 평가하는 것이다. 제 2의 방법은 대부분의 식품 단백질의 1차구조가 판명되어 있는 현재 목적으로 하는 생리 기능성 물질의 활성발현에 필요한 구조에 관한 정보가 집적되어 있는 경우에는 유효한 방법이다. 제 1의 방법은 통상 이용되고 있는 방법이지만 예상을 넘어서 구조나 활성을 가진 물질이 얻어질 수 있는 가능성이 있다. 따라서 목적으로 하는 생리활성펩타이드를 효과적으로 얻기 위해서는 상기 2가지의 전략을 선택적으로 구사할 필요가 있다.

1. 단백질가수분해효소의 선택

일반적으로 식품단백질 분해에 사용되는 효소는 유래에 따라 동물의 소화관유래, 식물유래, 미생물유래이고, 작용기작에 따라 endoprotease와 exoprotease으로 분류된다. 단백질 분해물의 제조에 사용되는 효소는 기본적으로 endo형의 활성이 높은 프로테아제가 선택되는 경우가 많다. 실제로는 특이성이 비교적 높은 동물유래의 효소인 pepsin, trypsin, chymotrypsin, 식물성유래 효소인 파파인, 브로멜라인을 사용하고, 단백질을 비특이적으로 저분자 시킬 수 있는 미생물 유래의 효소도 자주 사용되고 있다. 이들 기본으로 되는 효소를 단독 또는 복수 조합하며, 목적에 따라 exo형 프로테아제가 병용되는 경우도 많다. 따라서 protease류는 대단히 다양히 존재하기 때문에 각종 분해 양식에 따라 여러 종류의 펩타이드가 생성될 수 있다. 또한 상업용 효소는 주로 고온에서도 작용하며, 가격이 싸기 때문에 널리 사용되고 있다. 한가지 주의하여야 할 점은 소화관유래의 것이 아닌 효소로 펩타이드를 만들었을 경우는 소화관 효소로 분해시켜 분해가 되지 않고 활성이 유지되는지 관찰해 보아야 경구투여시의 효과에 대하여 알 수 있다.

Table 1에 대표적인 단백질 가수분해효소의 종류와 특징에 관해서 열거하였는데 실제로는 이것외에도 다수의 효소가 이용되고 있으므로 미리 조사하여야 한다. 단백질분해효소의 선택은 생리활성펩타이드의 제조에 있어서 가장 중요한 포인트라고 말할 수 있으며 뒤에서 실제로 여러 종류의 단백질분해효소가 어떻게 쓰여졌는지 살펴보기로 한다.

Table 1. Specificity of proteases for producing bio-active peptides

Enzyme	B Site-C site specificity ^a	Other requirements
Trypsin	B = Lys or Arg	No hydrolysis if C = Pro; hydrolysis slowed if A or C are acidic
Chymotrypsin	Pre ferentially, B = Trp, Tyr, Phe; some hydrolysis if B = Met, Leu, or His	As with trypsin
Pancreatic elastase	B = Ala,Val,Gly, or Ser	
Thermolysin	Preferentially, C = Phe, Leu, Val, Tyr, Ile, Met, or Trp; some hydrolysis if C = Ala, Asn, Thr or His	No hydrolysis with C = Gly or with D = Pro
Pepsin	B or C = Phe, Tyr, Trp, Leu (cleaves others slowly)	No cleavage if B = pro
Subtilisin	B or C = hydrophobic	
Papain	Broad specificity	
Streptococcal peoteinase	A, B =bulky(e.g., Phe, Tyr, Leu, His)	No cleavage if B = Gly

Specificities given in terms of a tetra-peptide A-B-C-D with site of cleavage between B and C.

2. HPLC에 의한 펩타이드의 정제

단백질의 효소소화물중에는 길이가 다른 여러 종류의 펩타이드가 혼합되어 있기 때문에 이들로부터 활성 펩타이드의 구성아미노산배열이나 작용메카니즘을 연구하기 위해서는 펩타이드의 정제과정이 필요하다. 단백질의 효소가수분해물의 경우는 바로 ODS등의 역상계 column(silica 표면의 OH기에 비극성의 성질을 지닌 탄소 18개의 포화탄화수소그룹인 octadecylsilyl group이 결합되어 있는 것)을 장착시킨 HPLC에 의해 극성의 정도에 따라 peptide 정제가 가능하다. Acetonitrile 등 유기용매의 gradient(농도경사)에 의한 용출을 실시하여 215nm 부근에서 흡수를 나타내는 펩티드를 우선적으로 측정하면 능률적이다. 용매를 농축원심분리하여 제거한 후, 소량의 물에 peptide를 용해시켜 bioassay를 실시한다. 가장 용이한 경우에는 1단계의 HPLC만으로 단일 peptide가 얻어지는 일도 있으나 보통은 여러 단계의 정제가 필요하다. 그와 같은 경우에는 최초의 단계로 20X250mm 정도의 조제용 column을 사용하는 것이 좋다. Peak의 수가 많은 경우에는 먼저 group으로 나누어 활성을 측정하고 활성이 확인된 group에 대해 각 peak의 활성을 개별적으로 측정할 수 있다. 또한 정제시에는 동일조건에서 rechromatography를 실시하는 것보다 column의 종류 또는 전개조건을 바꾸는 것이 훨씬 효과적이다. octadecyl silica(ODS)외에도 phenyl silica column, cyanopropyl silica column, size-exclusion column 및 ion exchange column도 자주 이용되고 있다.

3. 스크리닝방법

스크리닝방법은 한마디로 설명할 수 없다. 왜냐하면 생체내에서 여러 종류의 펩타이드 호르몬이 각기 다른 생리활성능을 발휘하듯이 목적으로 하는 생리활성펩타이드에 따라 assay방법도 각각 다를 수밖에 없다. 따라서 상세한 것은 논문이나 실험서를 참고하여야 하고, 경험과 기술적인 노하우를 필요로 한다. 탐색의 과정에서는 보통 *in vitro* assay를 실시하며, 이때는 주로 표적세포receptor와의 반응 또는 생체내 특정효소의 저해반응을 조사하는 것이 일반적이다. 펩타이드의 생체조절 기능에 관한 연구에 있어서는 고감도의 *in vitro* assay법이 대단히 중요한 위치를 차지하고 있다. 이것은 개체(whole body)를 이용하는 *in vivo* 에세이와 비교하여 ① 고감도이고 ② 필요한 샘플량이 적고 ③ 재현성이 높고 ④ 흡수 및 체내대사라고 하는 장벽을 거치지 않고 목적으로 하는 표적에 대한 작용을 직접 평가할 수 있으며, ⑤ 동물에 부여하는 고통이 적다는 등의 이유에 의한 것이다. 또 세포를 이용하는 실험의 경우에는 ⑥ 사람유래의 세포를 이용하는 것이 가능하고, ⑦ 왜래유전자를 도입한 세포를 사용하는 것이 가능하다는 등 개체를 이용하는 경우에는 곤란한 실험이 가능하다. Primary screening에서 얻어진 물질의 작용을 생체구성요소간의 상호작용을 포함함 보다 고차의 계에서 평가하고 최종적으로 *in vivo* 효과를 판정하는 것이 일반적인 흐름이다. 한편, 작용기구의 해석 경우에는 이것과는 반대의 방향으로 고차의 계에서 관찰된 작용을 세포레벨 즉 분자의 레벨에서 해명을 추구한다.

4. 1차구조결정

펩타이드란 일정한 입체구조를 만들어서 생물학적 기능을 발휘하며, 기본이 되는 구조는 20종의 아미노산이 특정의 순서를 가지고 펩타이드 결합에 의해 연결되어 만들어진 것이다. 따라서 펩타이드의 1차

구조 해석이란 펩타이드를 구성하고 있는 아미노산의 배열순서를 결정하는 것이며, 아미노산의 구성과 배열을 해석함으로써 생리활성기능의 작용메카니즘을 추정할 수 있다. 아미노산의 1차구조 결정시에는 펩타이드가 충분히 분리·정제되어져 있어야 하며, 아미노산 배열의 결정방법은 Edman degradation이 일반적인 방법이고, 통상 automated amino acid sequencer를 이용하여 배열을 결정한다. Edman degradation의 원리는 알칼리조건에서 펩타이드의 N-말단 아미노산에 phenyl isothiocyanate(PITC)를 반응시켜 phenylthiocarbamoyl 유도체로 만든다. Trifluoroacetate로 처리하여 N말단을 탈리시키는 조작을 순차적으로 반복하는 방법이다. 탈리한 N말단 아미노산의 동정은 산성에서 가열하여 안정한 phenyl thiohydantoin 유도체로 전환시켜 TLC상에서 Rf치 또는 역상HPLC상에서의 용출시간을 표준물과 비교하여 알 수 있다.

5. Peptide합성법

스크리닝 방법 중에는 목적으로 하는 peptide에 유사한 아미노산 배열을 이미 배열이 알려져 있는 재료 단백질의 1차구조 중에서 찾아내어, 이것에 상당하는 fragment peptide를 화학합성하고, 이들의 활성을 평가하는 방법이 있다. 사실 peptide hormone의 경우 구조와 기능과의 관계를 해명하기 위하여 화학합성에 의한 펩타이드연구가 많이 되어 왔다.

합성법으로서는 수동에 의한 액체합성, 자동 peptide synthesizer에 의한 고체합성 (solid-phase peptide synthesis)이 있다. 고체합성법은 유기용매에 불용인 지지체 (support)에 아미노산을 결합하고 그것으로부터 펩타이드길이를 연장시키는 방법이고, 액상법에 비하여 쉽고 단시간에 펩타이드 합성이 가능하다. 자동 peptide synthesizer에서는 아미노산으로서 t-Boc amino acid(t-butyloxycarbonyl group)이 아미노산의 N말단에 결합되어 있는 것, 보호기의 역할을 한다) 또는 Fmoc amino acid, 그리고 관련 시약을 장치에 장진하는 것만으로 자동적으로 peptide의 결합이 형성되나 amino 산 측사의 보호기나 수지의 제거는 수동으로 할 필요가 있다. 합성한 peptide는 역상 HPLC로 정제한 후, amino 산 분석의 질량분석으로 구조를 확인 할 필요가 있다. 현재 고상합성에 자주 사용되고 있는 Boc-아미노산과 chloromethyl수지를 이용할 경우의 예를 살펴보면 먼저 chloromethyl수지(chloromethyl기=CICH₂를 가진 1~2% 디비닐 벤젠 가교 Polystyrene)에 Boc-아미노산의 카르복실기를 결합시킨 후 Boc기 (t-butyloxycarbonyl group)만을 선택적으로 절단하고 다시 목적으로 하는 Boc-amino acid를 연결시켜 나간다. Boc기의 선택적인 제거와 Boc-아미노산의 연결을 목적으로 하는 펩타이드 길이가 될 때까지 반복한다. 일어난 보호 펩타이드 수지를 HF등으로 처리하여 C말단 아미노산 잔가와 수지간의 벤질 ester결합을 절단하고, 보호기도 제거하면 원하는 펩타이드가 얻어진다(泉屋信夫 등, 1985).

III. 혈압저하작용 펩타이드

혈압상승을 억제하려면 2가지 관점에서 접근할 수 있다. 첫째는 bradykinin이나 angiotensin II의 receptor와 반응하는 peptide를 만드는 것이다. 왜냐하면 일반적으로 peptide hormone은 표적세포표면의 receptor에 결합하여 세포내로 신호를 전달하여 작용케하기 때문이다. bradykinin은 9개의 아미노산으로

되어있는 peptide hormone이며, 이것은 B1 receptor와 결합하여 prostacyclin의 방출을 촉진하여 동맥을 이완시킨다. 따라서 bradykinin과 같은 작용을 가진 펩타이드는 동맥을 이완시켜 혈압상승을 막을 수 있을 것이다. 또한 혈압상승작용을 가진 angiotensin II가 결합하는 receptor가 두 개(AT1과 AT2) 존재하는데, AT1은 혈압상승, AT2는 혈압강하에 관한 것으로 알려져 있다. 따라서 AT1 receptor에 대하여 antagonist로 작용하는 펩타이드이나, AT2 receptor에 친화성이 있는 펩타이드(agonist)는 혈압상승을 막을 수 있을 것이다.

둘째는 angiotensin 변환효소(ACE :angiotensin converting enzyme)의 작용을 저해하는 것이다. 생체 내의 혈압조절에 작용하는 대표적인 계로는 renin-angiotensin계(승압계)와 kallikrein-kinin계(강압계)가 있고, 이들 양계에 관여하는 효소에 angiotensin 변환효소가 있다(Fig. 1). 승압계에서는 간장에서 합성된 angiotensinogen이 신장의 사구체 세포에서 분비된 renin의 작용에 의해 혈액중에서 decapeptide인 angiotensin I(Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu)으로 분해된다. 이 angiotensin I은 폐순환중에 ACE의 작용에 의해 C말단측의 His-Leu가 절단되어서 angiotensin II로 변환된다. angiotensin II는 말초혈관의 평활근을 직접 수축시키는 등 강한 승압 활동을 가진다. 한편 강압계에서는 혈액중의 고분자 및 저분자 kininogen이 kallikrein등에 의해 분해되어 bradykinin과 같은 kinin을 생성한다. 이 kinin은 혈관확장에 의한 강압작용, 혈관 투과성 항진작용 등을 가지고 있지만 kininase(I 및 II)에 의해 신속히 분해된다. kininase의 하나인 kininase II가 ACE이다. 따라서 ACE를 저해하면 승압작용을 가진 angiotensin II의 생성이 저해되는 동시에 강압작용을 가진 kinin의 분해가 저지되어 결과적으로 혈압은 강하하게 된다. 이와 같이 생체내에서는 여러 가지 혈압조절기구가 존재하므로 고혈압을 예방하는 기능성 펩타이드를 만들기 위해서는 목적으로 하는 상압인자를 분명히 설정하여 접근하여야 한다. 여기에 2가지의 경우, receptor를 통한 혈압저하작용 펩타이드와 angiotensin전환효소 저해를 통한 혈압저하작용펩타이드의 예와 이때 사용되는 단백질가수분해효소에 대하여 알아본다.

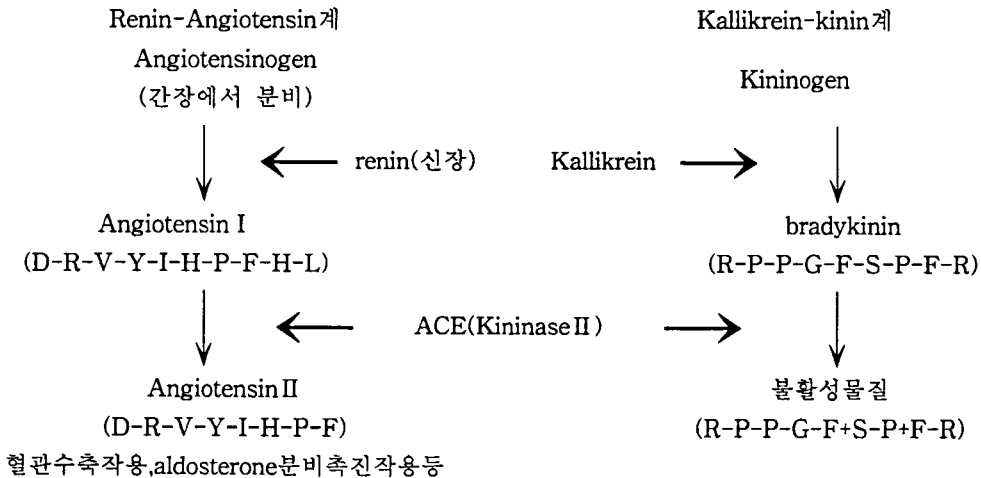


Fig. 1 Renin-Angiotensin and Kallikrein-Kinin system.

1. receptor를 통한 혈압저하작용 펩타이드의 제조와 단백질가수분해효소

Bradykinin이라고 하는 peptide hormone은 동맥을 이완시켜 혈압강하작용을 나타낸다. 개의 장관담동맥에 대한 이완활성을 지표로 각종 단백질의 효소 소화물중에서 스크리닝 하여 난백 알부민의 pepsin 소화물로부터 3단계의 HPLC에 의해서 활성 펩타이드인 ovokinin이 단리 되었다(Fujita 등, 1996).

○ 난백 알부민 + pepsin → ovokinin(Phe-Arg-Ala-Asp-His-Pro-Phe-Leu)

이 펩타이드는 egg albumin의 358~365잔기에 해당하는 Phe-Arg-Ala-Asp-His-Pro-Phe-Leu라고 하는 구조를 가진 octapeptide이고, 동맥이완활성은 bradykinin B1 receptor를 통한 것이기 때문에 ovokinin이라고 명명되었다. 또 ovokinin과 B1 receptor의 내인성 ligand인 des-Arg⁹-bradykinin (Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe)의 사이에 3개의 상동잔기밖에 존재하지 않더라도 동일 receptor에 결합하는 것은 흥미 깊다(Fig. 2). 한편 ovokinin과 Angiotensin II (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe)와의 사이에도 4개 잔기의 homology가 확인되었고, ovokinin은 angiotensin AT1 및 AT2 receptor에 대한 친화성을 나타내며, AT1 receptor에 대해서는 antagonist로서 작용하였다(Yoshikawa 등, 1996).

한편 난백 알부민의 chymotrypsin 소화물로부터는 Arg-Ala-Asp-His-Pro-Phe이라고 하는 펩타이드가 분리되었다. 이것은 ovokinin으로부터 N말단과 C말단을 1개 잔기씩 제거한 것에 해당되며 본 peptide를 ovokininIII로 명명했다(吉川正明 등, 1996)(Fig. 3).

○ 난백 알부민 + chymotrypsin → ovokinin III(Arg-Ala-Asp-His-Pro-Phe)

ovokinin III의 bradykinin B1 receptor 및 angiotensin AT1 receptor에 대한 친화성은 ovokinin과 비교하여 저하하지만, AT2 receptor에 대한 친화성에는 차이가 없다. ovokinin 및 ovokinin III는 자연발증 고혈압 랫드(SHR)에 정맥내 투여시 거의 같은 혈압저하 작용을 나타내고, 그 작용은 angiotensin AT2 antagonist인 PD 123319에 의해 block되었다. angiotensin receptor subtype 중 AT1 receptor는 혈압상승에 관여하지만 AT2 receptor의 기능은 분명하지 않았는데, 최근 AT2 receptor 유전자 결핍 마우스가 정상 마우스보다도 높은 혈압을 나타내는 것이 보고되어 AT2 receptor는 혈압강하에 관여하고 있는 것을 알게 되었다(Hein 등, 1995, Ichiki 등, 1995). 내인성의 AT2 ligand로서는 angiotensin III가 있지만 AT1 receptor에 대한 친화성을 가지고 있기 때문에 오히려 혈압상승작용을 나타낸다. ovokinin 및 ovokinin III는 AT2 receptor를 통하여 혈압강하작용을 나타내는 최초의 펩타이드라고 말할 수 있다.

AT2 receptor에 대한 ovokinin 및 ovokinin III의 친화성에는 이들의 Arg 잔기가 필수이다. ovokinin 및 ovokinin III에 대한 trypsin의 작용을 검토한 결과 ovokinin은 Arg-Ala결합에서 절단되어 실패하지만 ovokinin III는 분해되지 않았다. 이것은 trypsin이 exopeptidase 활성을 가지고 있지 않은 것에 의해 설명할 수 있다. 또 pepsin의 작용에 의해 일단 생성된 ovokinin은 chymotrypsin의 작용에 의해 ovokinin III로는 거의 변환되지 않는데, 이것은 chymotrypsin의 exopeptidase활성이 대단히 작기 때문이다. SHR에의 경구 투여 때에 ovokinin 및 ovokinin III는 혈압 강하 작용을 나타낸다(Fujita 등, 1995).

화물은 정도의 차이는 있으나 미관상의 ACE저해를 나타내지만 경구투여 했을 때 혈압강화 작용과 연관하는 진짜 저해펩타이드는 특정의 단백질을 특정효소에 의해서 소화한 경우에만 생성될 수 있다.

종래 보고되고 있는 식품단백질 유래의 많은 ACE저해펩타이드는 이런 관점에서 재평가될 필요가 있다. 사실 *in vitro*의 screening방법에서 검출된 활성은 *in vivo*에서 유효성을 가질 수 있다고 하는 가능성을 나타내는 것에 지나지 않고 얻어진 생리활성의 *in vivo*에서의 유효성을 가능한 연구의 초기단계에서 검토하는 것이 바람직하다.

Table 2. Angiotensin converting enzyme inhibitor peptides from digested food protein with proteases.

펩타이드(기원)	IC ₅₀ (μM)		항 An-I ² (정맥주사)	혈압강화 ³ (경구투여) (최대치, 시간)	
	통상법	전처리법 ¹⁾			
진짜 저해물질					
IY (가다랭이포)	2.1	1.9	+	19mmHg, 2시간후	
LW (난백알부민)	6.8	6.6	+	22	2
IKW (닭고기)	0.21	0.18	+	17	4
IKP (가다랭이포)	1.6	1.8	+	19	4
ACE 기질					
FFGRCVSP (계란알부민)	3.2	28	+	0	
FKGRYYP (닭고기)	1.3	34	+	0	
Prodrug 형 (체내에서 ACE 기질로부터 진짜 저해물질로 변환되는 것)					
LKPNM ⁴ (가다랭이포)	2.4	0.76	+	23	6
IWHHT ⁴ (가다랭이포)	5.1	3.5	+	26	6

¹⁾ peptide를 ACE와 preincubation (37°C, 3시간) 한 후 저해활성을 측정.

²⁾ peptide를 10mg/kg 용량으로 정상 rat에 정맥주사하여 angiotensin I (100ng/kg)에 의한 승압을 억제하는 작용

³⁾ peptide를 60mg/kg용량으로 고혈압 자연발증 rat에 경구투여 후 2시간 간격으로 혈압측정

⁴⁾ ACE작용에 의해 진짜 저해물질로 변환된다.

일반적으로 생체내 소화관유래의 protease보다도 미생물 protease에 의한 소화물이 혈압강화작용이 큰 경향이 보여주고 있다(Table 3). 그 원인으로서의 소화관 protease 소화물의 경우 ACE의 기질이 되는 부분이 크고, 또 얻어지는 ACE 저해 펩타이드의 분자량이 꽤 큰 것 등을 생각할 수 있다. 각종 미생물 protease에 관해서 검토한 결과 thermolysin효소가 양호한 ACE 저해 펩타이드를 만든다는 것을 알 수 있다. Table 4에 닭고기, 가다랭이포 및 계란 알부민의 효소 소화물에서 단리한 ACE 저해 펩타

이드를 나타냈다(Yokoyama 등, 1992; Yokoyama 등, 1993). 이들중에서 가다랭이포를 thermolysin효소로 처리한 소화물에서 얻어진 Leu-Lys-Pro-Asn-Met(IC₅₀=2.4 μM)은 전형적인 prodrug형의 ACE 저해 펩타이드이고, ACE 그 자체에 의해 Leu-Lys-Pro (IC₅₀=0.32 μM)과 저해활성이 없는 Met-Asn으로 분해되는데 이 과정에서 효소 저해활성은 약 8배 활성화된다. 여기서 만들어진 Leu-Lys-Pro의 ACE 저해 활성은 식품 단백질 유래의 것으로서는 강력한 것이다.

○ 가다랭이포 + thermolysin → Leu-Lys-Pro-Asn-Met + ACE → Leu-Lys-Pro + Met-Asn

이 ACE 저해 활성을 의약인 captopril과 비교하면 역가는 약 1/10이다. 그런데 SHR에 대한 경구 투여시 몰당 혈압 강하 작용에서는 Leu-Lys-Pro는 거의 captopril에 필적하는 효과를 나타낸다(藤田裕之 등, 1996).

일반적으로 peptide는 체내에서 분해되기 때문에 경구 투여에서는 효과를 발휘하기 어렵다고 생각해 왔지만 *in vitro*의 효소 저해 활성으로부터 예상되는 보다 큰 *in vivo*효과를 나타내는 펩타이드가 얻어진 것은 흥미로운 일이다. 또 Leu-Lys-Pro-Asn-Met을 SHR에 경구투여한 경우에는 활성형인 Leu-Lys-Pro를 투여한 경우와 비교하여 지속적인 혈압저하 작용을 나타낸다. 이것은 두 펩타이드의 흡수 속도의 차이 또는 효소적 변환에 요하는 시간을 반영하고 있기 때문일 것이다. 이와 같이 체내에서 활성화되는 type의 생리활성 펩타이드는 효과의 지속성이라고 하는 관점에서 기대된다. 또 가다랭이포의 thermolysin 소화물은 고혈압 환자에 대해서도 유효성을 나타냈다.

Table 3. Inhibition of ACE by Enzymatic Digests of Food Proteins

Substrate	Protease	IC ₅₀ (μg/ml)
Dried Bonito	Pepsin	47
	Trypsin	161
	Chymotrypsin	117
	Thermolysin	29
	Pronase	51
Chicken Muscle	Thermolysin	45
Casein	Trypsin	105
	Thermolysin	34
Ovalbumin	Pepsin	45
	Trypsin	>1000
	Chymotrypsin	>1000
	Thermolysin	83

Table 4. ACE-Inhibitory Peptides Derived from Food Proteins

Peptides	IC ₅₀ (μM)	Blood pressure decrease in SHR (mmHg)	Type
Thermolysin Digest of Dried Bonito			
IY	2.3	19	inhibitor
IKPLNY	43	18	inhibitor
ALPHA	10	16	inhibitor
LKPNM	2.4	23	prodrug
IWHHT	5.1	26	prodrug
IVGRPRHQG	2.4	14	prodrug
Thermolysin Digest of Chicken			
LKP	0.32	20	inhibitor
LAP	3.5	20	inhibitor
IKW	0.21	17	inhibitor
FKGRYYP	0.55	0	substrate
IVGRPRHQG	2.4	14	prodrug
Peptic Digest of Ovalbumin			
LW	6.8	22	inhibitor
FGRCVSP	6.2	0	substrate
FFGRCVSP	5.8	0	substrate
ERKIKVYL	1.2	0	substrate

IV 결론

식품 단백질 유래의 생리활성 펩타이드에 관한 최대의 관심사는 말할 것도 없이 펩타이드 또는 이들을 포함한 전구체 단백질을 섭취한 경우에 어떠한 생리작용을 나타내는가 하는 점이다. 적어도 실험동물에서 여러 종류의 펩타이드가 소화관에서의 분해와 장관흡수라고 하는 벽을 넘어서 효과를 발휘하였으며, 효소처리조건, 투여 방법 등의 개량에 의해서 경구투여시의 유효성이 증가된다. 이와 같은 효과가 인정되면 기능성 식품의 개발로 연결될 수 있다.

현재의 시점에서 각종 식품 단백질에 대하여 protease를 사용함으로써 다양한 활성을 나타내는 생리활성 펩타이드가 얻어지고는 있으나, 목적에 맞는 최적의 효소를 예측한다는 것은 불가능하다. 그렇지만 목적에 맞게 시험해야 할 효소를 어느 정도까지 예상하는 것은 가능한 단계이며, 이와 같은 연구가 계속 되어 재료단백질과 목적으로 하는 생리활성이 결정되면 사용해야 할 효소를 지정할 수 있게 되는 것도 가능하리라 본다.

생리활성 펩타이드의 새로운 탐색법의 하나는 수학적으로 가능한 모든 1차 구조를 조합한 oligo peptide를 포함하는 랜덤 라이브러리를 화학합성 또는 파지 벡타상에서의 발현에 의해 제작하고, 그것

으로부터 스크리닝에 의해 생리활성 펩타이드를 탐색하는 방법이 있다(吉川正明, 1992). 한편 각종 단백질을 동물뿐만 아니라 미생물이나 식물 기원의 여러 종류의 protease에 의해서 소화하여 얻어진 소화물은 펩타이드 랜덤 라이브러리의 일종이라고 간주할 수 있을 것이다. 이 라이브러리는 수학적으로 가능한 모든 조합을 포함한 것은 아니지만, 자연계에 존재하는 아미노산 배열을 반영한 라이브러리라고 말할 수 있다. 이와 같은 라이브러리로부터 1차 스크리닝에 의해서 얻어진 생리활성 펩타이드 중에서 경구 투여시 유효한 효과를 발현 할 수 있는 것을 선별할 수 있다.

펩타이드의 생리활성은 구성아미노산이 한개 잔기만 달라도 변화하기 때문에 소화에 이용하는 protease를 바꾸면 하나의 단백질로부터 파생하는 생리활성 펩타이드도 당연히 변화한다. 단백질을 생체유래의 소화효소가 아닌 다른 유래의 protease에 의해 처리함으로써 의외의 활성을 가진 펩타이드가 얻어지는 경우도 있고, 또 이들 펩타이드는 종래의 내인성 생리활성 펩타이드와는 현저히 다른 구조를 가지고 있으므로 새로운 ligand를 설계 할 때에 리드물질로써 사용될 가능성이 있다. 이들을 리드물질로 하여 drug design을 함으로서 유니크한 agonist 또는 antagonist의 창조 또한 기대된다.

<참고문헌>

- Brantl, V., Teschmacher, H., henschel, A. and Lottspeich, F. : Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem., 360, 1211(1979)
- Fujita, H. Sasaki, R. and Yoshikawa, M.: Biosci. Biotech. Biochem., 59, 2344 (1995)
- Fujita, H. Usui, H., Kurahashi, K. and Yoshikawa, M.: Peptides, 16, 785 (1996)
- Hein, L., Barsh, G. S., Pratt, R. E., Dzau, V. J. and Kobilka, B. K.: Nature, 377, 744 (1995)
- Ichiki, T., Labosky, P. A., Shiota, C., Okuyama, S., Imagawa, Y., Fogo, A., Niimura, F., Ichikawa, I., Hogan, B. L. M. and Inagami, T.: Nature, 377, 748 (1995)
- Maruyama, S. Nakagomi, K., Tomizuka, N. & Suzuki, H. : Agric. Biol. Chem., 49, 1405 (1985)
- Oshima, G., Shimabukuro, H. & Nagasawa, K. : Biochim. Biophys. Acta, 566, 128 (1978)
- Suetuna K. : Clin. Rep., 25, 2245 (1991)
- Yokoyama, K., Chiba, H. & Yoshikawa, M. : Biosci. Biotech. Biochem., 56, 1541 (1992)
- Yokoyama, K., Chiba, H. and Yoshikawa, M.: Biosci. Biotech. Biochem., 56, 1541 (1992)
- Yokoyama, K., Fujita, H. Yasumoto, R. and Yoshikawa, M.: Peptide Chemistry 1992, ed by N. Yanaihara, p.390, ESCOM Science Publishers, Leiden (1993)
- Yoshikawa, M. and Fujita, H.: Developments in Food Engineering, ed. by T. Yano, R. Matsuno and K. Nakamura, p.1053, Blackie Academic and Professional, Glasgow (1994)
- Yoshikawa, M. Peptide Chemistry , p141, Protein research foundation (1996).

吉川正明, 中桐菴介, 的場神行, 藤田裕之, 佐々木隆造 : 農化誌, 70, 13 (1996)

吉川正明: 化學, 47, 72-73 (1992)

藤田裕之, 安本良一, 吉川正明 : 農化誌, 70, 13 (1996)

泉屋信夫, 加藤哲夫, 青柳東彦, 脇道典. ペプチド合成の基礎と實驗 (1985)