

새로운 합성 펩티드에 대한 펩신 작용

1. Benzyloxycarbonyl-glycyl-L-tyrosyl-L-phenylalanyl-glycine 과 그의 에틸에스테르에 대한 펩신 작용

동국대학교 산업대학 식품공학과
 윤 주 옥 · 신 홍 대*
 (1969. 3. 18 접수)

Pepsin Action on the New Synthetic Peptides

1. Pepsin action on benzyloxycarbonyl-glycyl-L-tyrosyl-L-phenylalanyl-glycine and its ethyl ester

by

Joo Ok Yoon and Hong Dae Shin*

Dept. of Food Tech., College of Industry, Dongguk Univ., Seoul

(Received March 18, 1969)

ABSTRACT

The synthesis is described of new pepsin substrates of benzyloxycarbonyl-glycyl-L-tyrosyl-L-phenylalanyl-glycine ethyl ester and benzyloxycarbonyl-glycyl-L-tyrosyl-L-phenylalanyl-glycine for studies on the specificity of pepsin, and thin layer chromatographic examination of the peptides prepared showed the new substrates are homogeneous and also, same examination of the incubation mixtures showed that two synthetic substrates are cleaved by pepsin at the L-tyrosyl-L-phenylalanyl bond and hydrolysis of these substrates by pepsin is achieved without transpeptidation.

It is found that synthetic peptides are moderately soluble with the amount of the substrate up to a concentration of 0.7 mM in aqueous sodium citrate buffers (0.04 M) in the pH range 1.8-4.0, thus obviating the necessity for the adding of an organic solvent in the assay mixture.

The kinetic parameters for synthetic substrates are tabulated in the following table. The data in the table

	opt. temp.	opt. pH	Km	k_{cat}
Z-Gly-Tyr-Phe-Gly-OH	35°C	2.2	$5.82 \times 10^{-4}M$	2.06 sec ⁻¹
Z-Gly-Tyr-PheGly-OEt	35°C	2.4	$4.14 \times 10^{-4}M$	1.69 sec ⁻¹

indicate that the susceptibility of synthetic peptides to peptic hydrolysis are relatively large and the change of the carboxyl-terminal group of synthetic substrate from glycine ethyl ester to glycine causes a small decrease in the susceptibility of the L-tyrosyl-L-phenylalanyl bond.

서 론

이때 까지 pepsin의 합성 기질로서 A-X-Y-OH 나 A-

His-X-Y-OEt 형의 peptide들이 연구되어 왔다. A는 acetyl 또는 benzyloxycarbonyl기; His는 histidyl 잔기 X는 L-phenylalanyl, L-tyrosyl 또는 L-glutamyl 잔기

*부산대학교 문리과대학 화학과

Y는 L-phenylalanyl, L-tyrosyl, L-3,5-dihydroxyphenyl, 또는 L-tryptophyl 잔기; 그리고 OEt는 ethoxy기를 나타낸다. 나 Katchalski⁽¹⁾들에 의하면 이들 합성 기질 가운데는 pepsin 분해를 받을 때 어떤 조건 아래서는 peptide 잔이 반응이 일어난다고 한다. 그러므로 kinetics 연구에 적합하지 못하다. 그래도 우리들은 수용성이며, pepsin에는 예민하고 가수분해 반응만을 받는 기질의 합성을 위해 보았다. 일반적으로 A-X-Y-OH형의 합성 기질은 물에 잘 녹지 않기 때문에 그 용액을 만들 때는 메탄올을 조금 첨가하는데, Tang⁽²⁾에 의하면 이 용액은 pepsin 작용에 경쟁적 억제 효과를 나타내므로 기질이 물에 잘 녹는다는 것은 중요한 일이다. 그래서 이번 실험에서는 benzyloxycarbonyl-glycyl-L-tyrosyl-L-phenylalanyl-glycine(Z-Gly-Tyr-Phe-Gly-OH)와 benzyloxycarbonyl-glycyl-L-tyrosyl-L-phenylalanyl-glycine ethyl ester(Z-Gly-Tyr-Phe-Gly-OEt)를 합성하고 물에 대한 용해도, 작용최적 pH와 온도, 그리고 그 가수분해 양식을 연구했다.

실 험

(1) 시 약

돼지 pepsin(2번 재결정한 것 Lot 710)은 Worthington Biochemical Corp., ninhydrin과 methyl cellosolve는 E. Merck 계를 썼고, 증류수는 이온교환수지 컬럼으로 재정제했다. 그밖에 다른 시약은 특별히 언급하는 경우를 제외하고는 특급품을 재정제하지 않고 사용했다.

pH는 sodium citrate buffer (0.04 M, pH 범위 1.8—4.0)로서 조절(Beckman research pH meter로 20°C에서 측정)했고, HCl-KCl 용액으로 이온 강도가 0.09가 유지되도록 하였다.

효소 용액은 효소를 매일 증류수와 buffer에 녹여 10,000 rpm, 5°C에서 30분동안 원심분리해서 얻은 상등액을 사용했고 그 농도는 pepsin의 활동수율을 51,500⁽³⁾으로 잡아 효소액 0.1 ml와 buffer 3.0 ml의 혼합액의 278 m μ 에서 흡수도로써 결정했다. (Beckman Du Spectrophotometer 사용).

Ninhydrin 용액도 Zeffren⁽⁴⁾들의 방법에 따라 매일 새로이 만들었다.

peptide 합성에 사용한 시약은 그 합성법에서 언급한다.

(2) Kinetics 측정

합성 기질에 대한 pepsin 작용의 kinetics는 pepsin에 의한 가수분해를 가운데서 L-phenylalanyl-glycine (H-Phe-Gly-OH)이나 L-phenylalanyl-glycine ethyl ester

(H-Phe-Gly-OEt)만이 ninhydrin 양성물질이라는 사실을 이용, Zeffren⁽⁴⁾⁽⁵⁾들의 방법으로, 여러 가지 다른 기질 농도에 대한 pepsin 분해 반응의 초속도를 구하여 Hofstee 프로트에 의해 결정하였다. 즉, 두 시험관에 해당 pH (2.2 또는 2.4)의 sodium citrate buffer(0.04 M) 9 ml를 넣고 35.0 \pm 0.3°C가 되도록 한다. 이때 한 시험관에는 2.10 \times 10⁻⁴—6.50 \times 10⁻⁴M의 합성 기질 용액을 넣고, 다른 시험관에는 같은 양의 buffer만 넣는다. 두 시험관에 효소액 (E_0)=4.0 \times 10⁻⁶M을 넣음으로써 반응은 시작된다. 일정시간(가수분해율이 20%정도가 되도록) 뒤에 0.5 ml의 반응액을 1 ml의 ninhydrin 액이 든 5 ml 메스플라스크에 넣고 100 \pm 0.5°C에서 15분 동안 가열한 다음, 0°C의 얼음물에서 3분간 식힌다. 메스플라스크의 눈금까지 50%메탄올을 채우고 570m μ 에서 흡수도를 측정한다. 측정은 각 기질 농도에 대해서 2,3 번씩 실시했다.

합성 peptide의 가수분해율은 반응 초기에 반응액에 존재하고 있는 ninhydrin 양성 물질에 대한 보정용 하고 H-Phe-Gly-OH와 H-Phe-Gly-OEt를 앞서와 같은 조건으로 처리해서 얻은 표준 곡선으로부터 결정했다. 표준 곡선은 ninhydrin 반응액 속의 peptide나 peptide ester 양에 비례해서 직선으로 나타났다.

Michaelis 상수 K_m 과 속도상수 k_{cat} 는 Hofstee 식에 따라 $(S_0)/V$ vs. (S_0) 의 푸르트로부터 얻었다.

(3) Thin layer chromatography (TLC)

합성된 peptide와 pepsin 분해 산물의 균일성을 알기 위해서 silicagel G(E. Merck)를 사용하여 TLC를 실시했다. 전개 용액은 (A) methanol-ethylacetate (1:3, V/V); (B) *n*-butanol-acetic acid-water (4:1:1, V/V)를 사용하고 발색제는 (a) 0.2% ninhydrin *n*-butanol 용액; (b) 0.5N HCl와 2.5% NaNO₂ 혼합액에 0.5% sulfanilic acid를 가한 용액과, 10% Na₂CO₃ 용액(Pauly)을 사용했다.

(4) Peptide 합성

Z-Gly-Tyr-Phe-Gly-OEt의 합성은 figure 1과 같은 경로를 밟았다.

① Benzyloxycarbonyl-glycine (Z-Gly-OH)⁽⁶⁾

glycine (0.75 g, 0.01 M; E. Merck)를 2N NaOH (50 ml)에 녹인 용액에 에테르 (10~15 ml)을 가하고 얼음으로 식히면서 benzyloxycarbonyl chloride(20 g, 0.12 M; 大阪大學 蛋白質研究所)와 2N NaOH (75 ml)를 가한 다음, 2시간 동안 교반하고 에테르로서 추출했다. 물층에 6N HCl(42 ml)를 가해 생긴 기름 모양의 물질을 Na₂SO₄로 건조시켰다. 여과액을 감압 건조하고 에테르

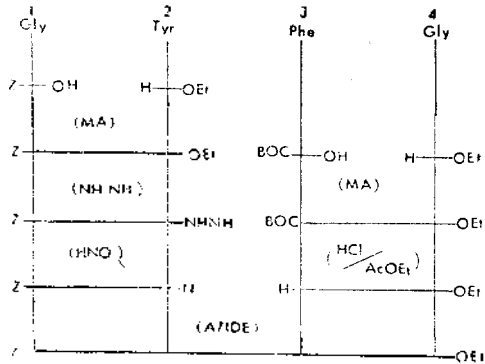


Fig. 1. Schematic diagram of synthesis of peptide. Z, benzyloxycarbonyl; OEt, ethyl ester; BOC, t-butylloxycarbonyl; NHNH₂, hydrazide; N₃, azide; AcOEt, ethyl acetate.

와 석유 에테르를 가해서 굳어지게 했다. 수득률 76%.

② L-tyrosine ethyl ester-p-tosylate (H-Tyr-OEt, ToSOH)⁽⁷⁾.

L-tyrosine (18.1g, 0.1M; E. Merck), p-toluene sulfonic acid monohydrate (20.9g, 0.11M; E. Merck), 에탄올(40 ml) 그리고 CCl₄(200 ml)의 혼합물을 약 24 시간동안 환류 가열한 뒤에 감압 농축하여 에테르(150 ml)-석유 에테르(50 ml)를 가해서 여과하고 이어서 열 에탄올-에테르로 재결정시켰다. 수득률 78%.

③ Benzyloxycarbonyl-glycyl-L-tyrosine ethyl ester (Z-Gly-Tyr-OEt)⁽⁸⁾⁽⁹⁾.

Z-Gly-OH(2.09 g, 0.01 M)와 triethylamine (NEt₃) (1.4 ml, 0.01M; E. Merck)을 tetrahydrofuran (THF) (40 ml; E. Merck)에 녹여서 0~-5°C로 식히고 isobutyl-chlorocarbonate(BCC) (1.4 ml, 0.01 M; E. Merck)를 가했다. 15분 뒤에 H-Tyr-OEt, ToSOH (3.8 g, 0.01 M)와 NEt₃ (1.4 ml)의 chloroform(40 ml)용액을 가하고 잘 혼합했다. 이 용액을 얼음 속에 1시간, 상온에 하루밤 두었다가, 감압 농축하고 물과 석유 에테르를 가해서 결정화시켰다. 충분히 영킨뒤에 여과해서 4% NaHCO₃, 2% HCl 그리고 물로 씻고 잘 건조시켜 초산에틸-에테르-석유 에테르로 재결정했다. 수득률 70% m.p 102°C



④ Benzyloxycarbonyl-glycyl-L-tyrosine (Z-Gly-Tyr-OH)Z-Gly-Tyr-OEt는 알칼리로 비누화 되므로⁽¹⁰⁾ Z-Gly-Tyr-OEt(4.0 g, 0.01 M)를 메탄올(30 ml)에 녹여 1N를 가했다. 비누화된 정도는 비누화가 일어나고 있는 반응액을 에테르 silica gel G (E. Merck)와 용매(B),

그리고 발색제는 48% HBr와 (b)를 사용하여 TLC로 조사했다. 비누화의 초기에는 Rf=0.82인 Z-Gly-Tyr-OEt의 스폿가 대부분이었으나 약 4시간 뒤에는 Rf=0.65인 Z-Gly-Tyr-OH 단으로 되었다. 비누화가 끝나면 감압해서 메탄올을 없애고 에테르로 추출하여 물층에 1N NCl(13 ml)를 가하고 초산에틸로 다시 추출, Na₂SO₄로 건조시켜 감압 농축한것에 에테르와 석유 에테르를 가해 결정시켰다. 이를 여과하여 초산에틸-에테르-석유 에테르로 재결정시켰다. 수득률 75%. m.p 132~135°C.



⑤ Benzyloxycarbonyl-glycyl-L-tyrosyl hydrazine (Z-Gly-Tyr-NHNH₂)⁽¹¹⁾

Z-Gly-Tyr-OEt (4.0 g, 0.01 M)을 dimethylformamide (DMF) (60 ml; E. Merck)에 녹이고 NH₂NH₂·H₂O (9.7 ml, 0.2 M; E. Merck)를 가해서 상온에 2일간 두었다가, 감압으로 NH₂NH₂를 제거한 다음, 물을 가해 여과하고 물로 씻었다. 수득률 75% m.p 115~118°C.

⑥ Benzyloxycarbonyl-glycyl-L-tyrosine azide(Z-Gly-Tyr-N₃)

Z-Gly-Tyr-NHNH₂ (1.3 g, 3.3 mM)를 빙초산(80 ml)에 녹이고 2N HCl (8 ml)를 가해 0~-5°C로 냉각하고 1N NaNO₂ (3.4 ml)를 가했다. 10분뒤에 물(400 ml)을 가하고 10분뒤에 켈리모양의 물질을 흡인 여과 하여 물, 0.5 N NaHCO₃, 물의 차례로 씻고 건조시켰다. 모든 용매는 0°C의 것을 사용하고 조작도 냉동실 안에서 했다. 수득률 80%. 이것을 곧 실험 ⑩에 사용했다.

⑦ Glycine ethyl ester-p-tosylate (H-Gly-OEt, ToSOH)⁽⁷⁾

Glycine (7.5 g, 0.1 M), p-toluene sulfonic acid monohydrate (20.9 g, 0.11 M), 에탄올 (40 ml), 그리고 CCl₄ (200 ml)의 혼합물을 24 시간 환류가열하여 감압 농축하고 에테르(150 ml)-석유 에테르(50 ml)로 가해서 여과한 것을 열에탄올-에테르로써 재결정했다. 수득률78%

⑧ Tertiarybutyloxycarbonyl-L-phenylalanyl-glycine ethyl ester (BOC-Phe-Gly-OEt)⁽⁶⁾

Tertiarybutyloxycarbonyl-L-phenylalanine(BOC-Phe) (8.0 g, 0.03 M; Cyclo Chemical Corp.)와 NEt₃(4.2 ml, 0.03 M)를 THF(60 ml)에 녹여서 0~-5°C로 냉각하고 다시 BCC(3.94 ml, 0.03 M)를 가했다. 15분 뒤에 H-Gly-OEt, ToSOH(8.3 g, 0.03 M)와 NEt₃ (4.2 ml)의 chloroform(60 ml)용액을 가하고 얼음 속에 1시간, 상온에 하루밤 두었다가 감압 농축하고 초산에틸(90 ml)을 가한 다음, 4% NaHCO₃, 2% 염산, 물의 차례로 씻고

Na_2SO_4 로 건조시켰다. 이의 여과액을 농축하고 석유에테르로 결정화 시키고, 초산에틸-에테르-석유 에테르로서 재결정했다. 수득률 60%, m. p 108~111°C
 $\text{C}_{18}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_5$ (350) Calcd. N 8.0
 Found N 7.3

⑨ L-phenylalanyl-glycine ethyl ester (H-Phe-Gly-OEt)⁽¹²⁾

BOC-Phe-Gly-OEt (1.48 g, 4.25 mM)에 2N HCl/AcOEt (40 ml)를 가하고 상온에 2시간 두었다가 감압 농축했다. 이를 물에 녹여 Dowex 50×8 (H⁺형)의 컬럼 (1.2×10 cm)의 냉고 물로 씻은 다음, 1N NH_4OH 로서 용출했다. 이 용출액을 감압 농축하고, 아세톤에 녹여서 여과한 것을 뜨거운 물-아세톤으로 재결정시켰다. 수득률 80%, m. p 174~175°C.

$\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_3$ (250) Calcd. N 9.8
 Found N 10.7

⑩ L-phenylalanyl-glycine (H-Phe-Gly-OH)

BOC-Phe-Gly-OEt (3.5 g, 0.01 M)를 dioxane (20 ml; E. Merck)에 녹이고 1N NaOH (12 ml)를 가하여 비누화시켰다. 실험 ④와 같은 조작으로(염산 대신 citric acid를 사용) BOC-Phe-Gly-OH (m. p 126~127°C)를 얻었다. 수득률 81%. 이로부터 실험 ⑨와 같은 방법으로 H-Phe-Gly-OH를 얻었다. 수득률 79%, m. p 182~183°C

$\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_3$ (222) Calcd. N 12.6
 Found N 11.5

⑪ Benzyloxycarbonyl-glycyl-L-tyrosyl-L-phenylalanyl-glycine ethyl ester (Z-Gly-Tyr-Phe-Gly-OEt)⁽¹¹⁾

Z-Gly-Tyr-N₃ (1.27 g, 3.2 mM)를 H-Phe-Gly-OEt (0.91 g, 3.2 mM)와 NEt_3 (3.2 mM)의 DMF (20 ml) 용액에 가하여 0°C에서 하루, 상온에서 하루동안 교반하고 물(120 ml)을 가해서 석출되는 결정을 여과했다. 이것을 따뜻한 DMF에 녹여 미량의 불용물질을 걸러서 없애고, 감압하면서 끓는 물 속에서 농축시킨 다음, 초산에틸을 가하여 결정을 얻었다.

수득률 46%, m. p 142~144°C, $[\alpha]_D^{25} -2.4^\circ$ (C_2 에탄올) 에탄올), TLC(용매(A))로 단일 스포트가 확인됐다. (Rf. 0.46; Pauly).

$\text{C}_{33}\text{H}_{36}\text{N}_4\text{O}_8$ (604) Calcd. C 63.8, H 6.0, N 9.3
 Found C 63.0, H 5.8, N 8.6

Z-Gly-Tyr-Phe-Gly-OEt (4.5×10^{-4} M), pepsin (4.0×10^{-8} M), 그리고 pH 2.4 sodium citrate buffer (0.04 M)로 된 incubation 혼합물(10 ml)을 20시간 동안 35°C에 두었다가 그 분해산물을 TLC(용매(B))로 분석하여 ninhydrin 양성 성분은 Rf 0.52 (H-Phe-Gly-OEt의 Rf)이고 Pauly 양성 성분은 Rf 0.64 (Z-Gly-Tyr-OH의 Rf)임을 확인했고 그밖에 다른 스포트는 없었다.

⑫ Benzyloxycarbonyl-glycyl-L-tyrosyl-L-phenylalanyl-glycine (Z-Gly-Tyr-Phe-Gly-OH)

Z-Gly-Tyr-N₃와 H-Phe-Gly-OH를 실험 ⑩과 같이 아깃드법에 의해 fragment condensation했다. 수득률 42%, m. p. 184~186°C.

TLC(용매(A))로 단일 스포트(Rf 0.54; Pauly)를 얻었다.

$\text{C}_{30}\text{H}_{32}\text{N}_4\text{O}_8$ (576) Calcd. C 62.5, H 5.6, N 9.5
 Found C 62.0, H 4.7, N 10.3

Z-Gly-Tyr-Phe-Gly-OH를 실험 ⑩에서와 같은 조건으로(단 pH 2.2) pepsin 분해시켜 그 분해물을 TLC(용매(B))로 조사한 결과, ninhydrin 양성 성분은 Rf 0.48 (H-Phe-Gly-OH), Pauly 양성 성분은 Rf 0.64 (Z-Gly-Tyr-OH)인 스포트만 얻어졌으며 다른 스포트는 없었다.

결과 및 고찰

(1) 합성 peptide에 대한 pepsin 작용

합성 peptide Z-Gly-Tyr-Phe-Gly-OH와 Z-Gly-Tyr-Phe-Gly-OEt를 기질로 하여 pH 2.2와 2.4 (0.04 M sodium citrate buffer), 35°C에서 pepsin을 작용시킨 결과 그 가수분해율은 표 1과 같았다. 두 합성 기질의 pepsin에 대한 susceptibility는 Z-Gly-Tyr-Phe-Gly-OEt가 조금 크고, 90분이 지나면 둘다 70% 이상이 가수분해 되었다. 또 이들 peptide는 0.04 M sodium citrate buffer (pH 1.8~4.0)에 0.7 mM까지 잘 녹았으므로 기질 용액(농도 0.65 mM 이하)을 만들 때 유기용매를 첨가하지 않았다. Tang⁽¹³⁾은 지방족 알코올이 합성 기질 benzyloxycarbonyl-L-glutamyl-L-tyrosine에 대한 pepsin 작용을 억제한다고 했으므로, 우리들이 합성한 peptide 기질이 수용성이라는 것은 pepsin kinetics 연구에 큰 도움이 될 것이다.

한편 합성된 peptide와 그 pepsin 분해산물에 대해 실시한 TLC로 peptide들은 그 균일성이 확인되었으며 pepsin 분해산물은 Z-Gly-Tyr-OH와 H-Phe-Gly-OEt(또는 H-Phe-Gly-OH)만이 검출되었으므로 Tyr-Phe 사이의 결합이 분해됨을 알 수 있다. 이는 pepsin이 sensitive peptide bond 양쪽에 L-방향족 아미노산이 있는 곳을 선택적으로 작용한다는 Baker⁽¹⁴⁾와 Fruton⁽¹⁵⁾들의 보고와 일치된다. katchalski⁽¹⁶⁾들에 의하면 Z-Glu-Tyr-OH와 Ac-Tyr-Tyr-OH는 pepsin에 의해 peptide 전이 반응을 일으켜 몇 가지 생성물이 얻어진다고 보고 하였다. 따라서 이들 합성 기질은 pepsin kinetics 연구에 적합하지 못하다. 그런데 우리들이 합성한 peptide는 가수분해 반응만을 받으므로 kinetics 연구에 알맞은 합성 기질로 생각된다.

TABLE 1. Data for the hydrolysis of Z-Gly-Tyr-Phe-Gly OH and Z-Gly-Tyr-Phe-Gly-OEt by pepsin at 35°C.

Substrates	[S ₀](M)	[E ₀](M)	Time(min)	Hydrolysis(%)
Z-Gly-Tyr-Phe-Gly-OH ^(a)	4.0 × 10 ⁻⁴	3.9 × 10 ⁻⁸	30	26.9
			60	54.7
			90	76.3
			120	81.7
			150	87.3
Z-Gly-Tyr-Phe-Gly-OEt ^(b)	4.0 × 10 ⁻⁴	4.0 × 10 ⁻⁸	30	28.6
			60	57.3
			90	75.9
			120	82.8
			150	88.3
Ac-Phe-Tyr-OH ^(c)	2.19 × 10 ⁻⁴	1.41 × 10 ⁻⁵	90	58.0
			180	91.4

^(a)pH 2.2 (0.04 M sodium citrate buffer)

^(b)pH 2.4 (0.04 M sodium citrate buffer)

^(c)Silver *et al.*⁽³⁾, tested at pH 2.1, 35°C and 3.4% methanol.

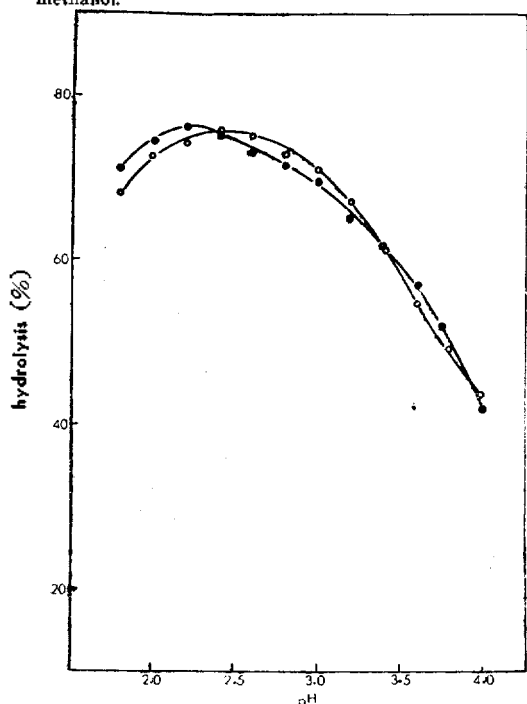


Fig. 2. pH optima for the hydrolysis of synthetic peptides by pepsin at 35°C. (0.04 M sodium citrate buffer, ([S₀]=4.0 × 10⁻⁴M, [E₀]=4.0 × 10⁻⁸M, and 90 min)

(2) 합성 peptide에 대한 pepsin 작용의 최적 pH와 최적온도

pH 변화에 따른 pepsin의 합성 peptide가 수분해율은 figure 2와 같고 온도에 의한 것은 figure 3과 같다.

Z-Gly-Tyr-Phe-Gly-OEt의 최적 pH는 2.4 근방, 최적온도는 35°C 근방이며,

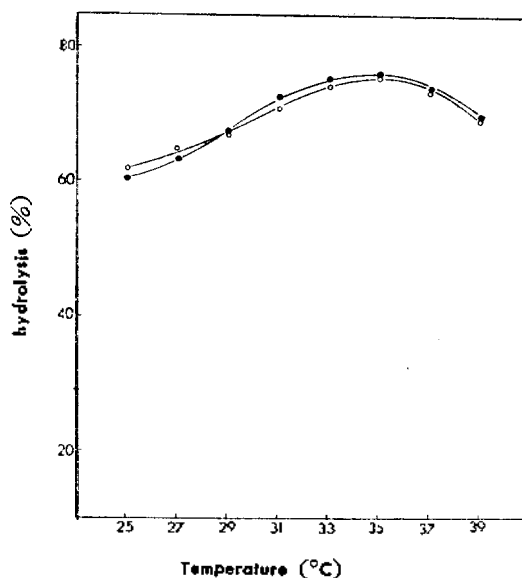


Fig. 3. Temperature optima for the hydrolysis of synthetic peptides by pepsin (0.04 M sodium citrate buffer, ([S₀]=4.0 × 10⁻⁴M, [E₀]=4.0 × 10⁻⁸M, and 90 min)

Z-Gly-Tyr-Phe-Gly-OH의 최적 pH는 2.2 근방, 최적온도는 35°C 근방이다. Fruton 들⁽¹⁴⁾은 sensitive peptide bond 바로 이웃에 있는 유리 α-COOH기가 pepsin 작용을 억제한다고 했는데 유리 α-COOH기가 sensitive peptide bond 바로 이웃에 있지 않은 Z-Gly-Tyr-Phe-Gly-OH에 대한 pepsin의 가수분해율이 Z-Gly-Tyr-Phe-Gly-OEt보다 조금 떨어지고 있으나 그것이 유리 α-COOH기의 억제 작용에 의한 것인지는 분명치 않다.

(3) pepsin 작용의 Kinetics

합성 peptide에 대한 pepsin 분해 반응의 kinetic parameter는 다음 식에 의해서 얻었다.

$$E + S \xrightleftharpoons[k_{-2}]{k_1} ES \xrightarrow{k_{cat}} E + P_1 + P_2 \quad (1)$$

$$k_m = (k_2 + k_{cat}) / k_1$$

$$k_2 \gg k_{cat} \text{ 이면}$$

$$k_m \approx \frac{k_2}{k_1} \quad (2)$$

$$v = k_{cat}(ES) = k_{cat}(E_0)(S_0)/k_m + (S_0) \quad (3)$$

E는 효소, S는 기질, ES는 효소 기질 복합체, P₁과 P₂는 pepsin에 의한 분해 생성물, k₁, k₂, 그리고 k_{cat}는 각각 속도 상수며 k_m은 Michaelis 상수, v는 효소 반응 초속도, [E₀]와 [S₀]는 효소와 기질의 초기 농도들 [S]는 t시간 뒤의 기질 농도를 나타낸다. 물론 (3)은 반응 경과 중에도 성립한다⁽¹⁵⁾. V가 최대속도 즉, V = V_{max}일 때는 전효소는 ES복합체로서 존재하게 되므로 반응은 기질에 대해 영차반응이 되어

$$V_{max} = k_{cat}(E_0) \quad (4)$$

이 성립된다. 따라서 (3)에서 (5) Lineweaver-Burk⁽¹⁶⁾식이 얻어지고 (5)로부터 (6) Hofstee 식이 얻어진다.

$$\frac{1}{v} = \frac{k_m}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S_0]} + \frac{1}{V_{max}} \quad (5)$$

$$[S_0]/v = [S_0]/V_{max} + k_m/V_{max} \quad (6)$$

(6)을 이용해서 얻은 직선으로부터 k_m을 구하고 k_{cat}의 값은 (4)에서 얻는다.

Z-Gly-Tyr-Phe-Gly-OEt의 경우, [S₀] = 4.0 × 10⁻⁴M,

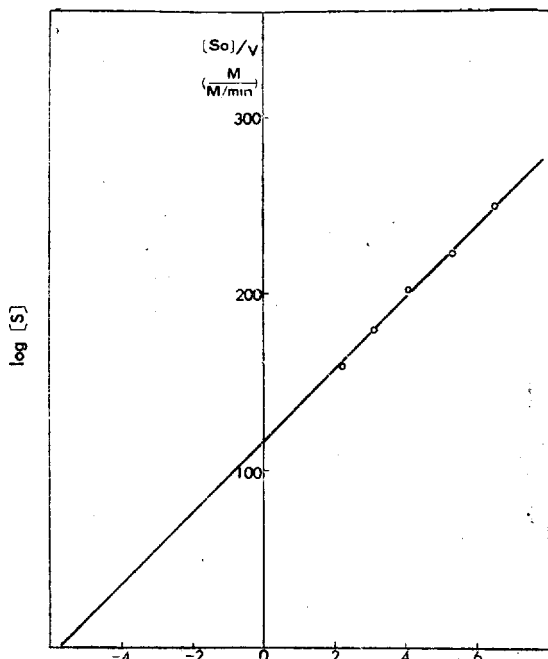


Fig. 4. The plots of log [S] vs. time at pH 2.4 and 35°C. (substrate, Z-Gly-Tyr-Phe-Gly-OEt; [S₀] = 4.0 × 10⁻⁴M; [E₀] = 4.0 × 10⁻⁸M)

[E₀] = 4.0 × 10⁻⁸M일 때, 예를 들면 pH 2.4 35°C에서 반응시간 t에 대해 log(S)를 푸르트한 것은 figure 4와 같이 1차 반응으로 나타났다. k_m 값보다 적거나 큰 여러 가지 농도의 합성기질에 대한 v를 구하고 이 v를 이용해서 [S₀]/v vs. [V₀]를 푸르트한 것을 figure 5

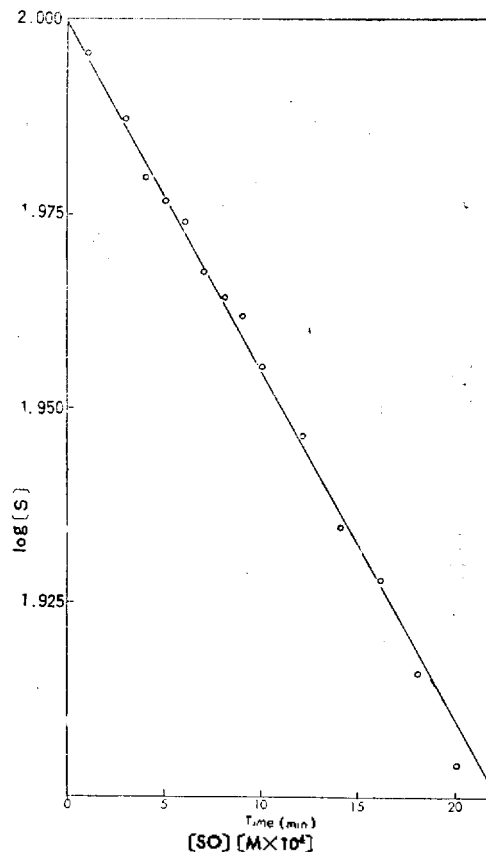


Fig. 5. Determination of Michaelis constant, K_m, and rate constant, K_{cat}, for the hydrolysis of Z-Gly-Tyr-Phe-Gly-OEt by pepsin at pH 2.4 and 35°C. ([S₀] = 4.0 × 10⁻⁴M, [E₀] = 4.0 × 10⁻⁸M)

와 6에, 이 푸르트로부터 얻은 k_m과 k_{cat} 값을 표 2에 각각 표시하였다.

단백질 분해 효소의 relative specificity를 Knowles⁽¹⁷⁾ 그리고 Bender와 Kézdy⁽¹⁸⁾의 방법에 따라 k_{cat}/k_m 값으로 표 2에 표시하였다. 또 Ac-Phe-Tyr-OH의 relative reactivity를 1로 두고 Z-Gly-Tyr-Phe-Gly-OH 및 Z-Gly-Tyr-Phe-Gly-OEt와 비교해 보니 Ac-Phe-Tyr-OH보다 약 200배나 크므로 합성된 peptide는 pepsin에 대한 susceptibility가 큰 기질로 생각된다. Z-Gly-Tyr-Phe-Gly-OH와 Z-Gly-Tyr-Phe-Gly-OEt 사이의 susceptibility는 전자가 조금 적으나 이번 실험으로는 그 이유를 밝혀내기 힘들다.

몇 가지 한정된 합성 peptide에 대한 pepsin 작용으로부터 얻은 data로서 많은 단백질과 polypeptide에 대한 pepsin의 작용 특이성을 만족스럽게 추리할 수는 없겠지만 두 합성 peptide의 pepsin에 의한 분해가 Tyr-Phe 결합 사이에서 일어난다는 사실은 pepsin 작용이 com-

TABLE 2. Kinetic constants for pepsin with synthetic peptides at 35°C.

Substrates	pH	[S ₀] (M)	[E ₀] (M)	k _m (M)	k _{cat} (sec ⁻¹)	k _{cat} /k _m (mM ⁻¹ ·sec ⁻¹)	Rel Reactivity
Z-Gly-Tyr-Phe-Gly-OH	2.2	2.2-6.5×10 ⁻⁴	4.0×10 ⁻⁸	5.82×10 ⁻⁴	2.06	3.54	177
Z-Gly-Tyr-Phe-Gly-OEt	2.4	2.1-6.0×10 ⁻⁴	4.0×10 ⁻⁸	4.14×10 ⁻⁴	1.19	4.08	204
Ac-Phe-Tyr-OH ⁽²⁾	2.0	1.16-13.6×10 ⁻⁴	1.31-1.58×10 ⁻⁵	16.8×10 ⁻⁴	0.0408	0.02	1
				19.5×10 ⁻⁴	0.0466	0.02	1

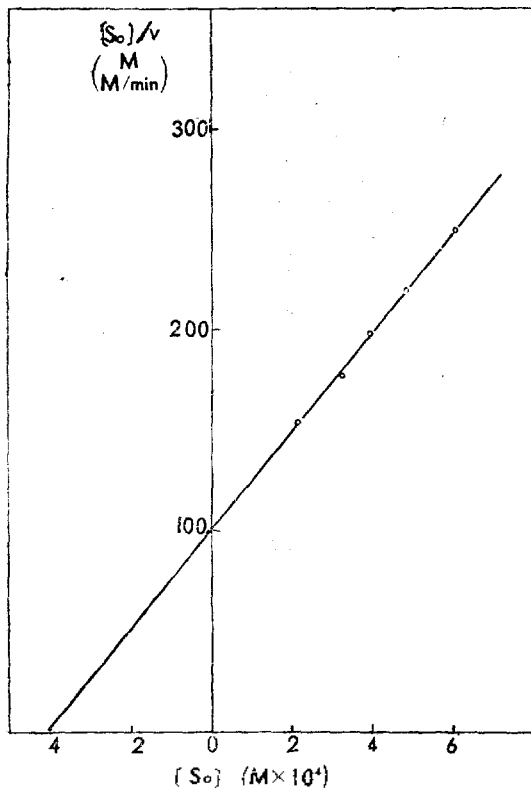


Fig. 6. Determination of Michaelis constant, Km, and rate constant, k_{cat}, for the hydrolysis of Z-Gly-Tyr-Phe-Gly-OH by pepsin at pH 2.2 and 35°C. ([E₀]=4.0×10⁻⁴M), [S₀]=4.0×10⁻⁸)

plex substrates의 preferential site에서 일어난다고 보는 Tang⁽¹⁹⁾의 생각과 일치되고 있다.

결론

pepsin specificity 연구의 일환으로 Z-Gly-Tyr-Phe-Gly-OH와 Z-Gly-Tyr-Phe-Gly-OEt를 합성하고 TLC에 의해 그 균일성을 확인했다. 이들 합성 peptide는 pepsin으로 Tyr-Phe결합이 분해되고 peptide전이 반응

은 일으키지 않음이 TLC로 확인되었다. 0.04 M sodium citrate buffer(pH 1.8~4.0)에는 0.7 mM까지 녹았으므로 기질 용액을 만들 때 유기 용매를 첨가할 필요는 없었다. 두 합성 peptide의 kinetic parameter는 다음과 같았다.

	opt. temp.	opt. pH	Km	k _{cat}
Z-Gly-Tyr-Phe-Gly-OH	35°C	2.2	5.82×10 ⁻⁴ M	2.06sec ⁻¹
Z-Gly-Tyr-Phe-Gly-OEt	35°C	2.4	4.14×10 ⁻⁴ M	1.69sec ⁻¹

두 합성 peptide에 대한 pepsin 작용의 susceptibility는 비교적 큰 편이었고 합성 peptide의 C-말단기를 Gly-OEt로부터 Gly-OH로 바꾸므로써 그 susceptibility는 약간 줄었다.

인용문헌

- 1). H. Neumann, Y. Levin, A. Berger, and E. Katchalski, *Biochem. J.*, 73, 33 (1959)
- 2). J. Tang, *J. Biol. Chem.*, 240, 3810 (1965)
- 3). M. S. Silver, J. L. Denburg, and J. J. Steffens, *J. Am. Chem. Soc.*, 87, 886 (1965)
- 4). E. Zeffren and E. T. Kaiser *J. Am. Chem. Soc.* 88, 3129 (1966)
- 5). E. Zeffren and E. T. Kaiser, *J. Am. Chem. Soc.*, 89, 4204(1967)
- 6). J. P. Greenstein, M. Winitz, *Chem. of the Amino Acids*, Vol. II, p. 763, J. Wiley and Sons, New York (1961)
- 7). T. Kato, S. Makisumi, M. Ohno, and N. Izumiya, *J. Chem. Soc., Japan*, 83, 1151 (1962)
- 8). J. R. Vaughan, Jr., R. L. Osato, *J. Am. Chem. Soc.*, 74, 676(1952)
- 9). N. Izumiya, H. Uchio, *J. Biochem.*, Japan, 46, 235(1959)
- 10) K. Hofmann, T. A. Thompson, M. E. Woolner,

- G. Spühler, H. Yajima, J. D. Ciper, and E. T. Schwartz, *J. Am. Chem. Soc.*, **82**, 3721 (1960)
- 11) R. A. Boissonnas, St. Guttman, P. A. Jaquenoud and J. P. Waller, *Helv. Chim. Acta.*, **38**, 1491 (1955)
- 12) R. Schwyzer, P. Sieber, *Helv. Chim. Acta.*, **43**, 1910 (1960)
- 13) L. E. Baker, *J. Biol. Chem.*, **193**, 809 (1951)
- 14) K. Inouye, I. M. Voynick, G. R. Delpierre, and J. S. Fruton, *Biochemistry*, **5**, 2473 (1966)
- 15) K. Nisizawa, K. Shimura, *Introduction to Enz. Chem.*, p. 25, Nankodo, Tokyo, Japan (1968)
- 16) H. Lineweaver, D. Burk, *J. Biol. Chem.*, **56**, 658 (1934)
- 17) J. R. Knowlas, *J. Theoret. Biol.*, **9**, 213 (1965)
- 18) M. L. Bender, and F. J. Kézdy, *Ann. Rev. Biochem.*, **34**, 49 (1965)
- 19) J. Tang, *Nature*, **199**, 1094 (1963)

▶ 訂 正 ◀

X-선 형광 분석에 의한 천연수 중의 미량 금속 정량 (II)
 영남대학교 공과대학 화공과
 박 영 규

위의 논문중 Abb 2의 오른 쪽의 ▲ Pb 와 ○ Zn 의 표시가 바뀌어 있으므로 이를 訂正함.