

GB I-II 와 관련된 Cyclic Peptide 들의 합성과 단백질 분해 효소에 대한 저해활성 연구

姜信源¹·許南源

釜山大學校 自然科學大學 化學科
(1989. 8. 24 접수)

Synthesis of Cyclic Petides Related to GBI-II and Study of Their Inhibitory Activity for Proteinases

Shin Won Kang¹ and Nam Won Huh

Department of Chemistry, Pusan National University, Pusan 609-391, Korea

(Received August 24, 1989)

요 약. GBI-II의 antielastic 고리와 LBI의 antitryptic 고리는 P_1 위치의 아미노산 잔기만 차이가 있으며 나머지 모든 아미노산 잔기는 동일하다. Inhibitor의 P_1 을 키모트립신에 효과적인 특이성이 있다고 알려진 Tyr 잔기로 치환시킨 cyclic nonapeptide와 저해작용에 필수적으로 생각되는 5개의 아미노산 잔기만으로 선정된 cyclic pentapeptide 유도체를 액상법으로 합성하였다. 이들 펩티드 유도체를 3종의 단백질 분해효소에 작용시켜 그 저해활성을 측정된 결과 cyclic nonapeptide는 키모트립신에는 저해작용이 없었고 의외로 에라스타제와 트립신에 저해활성이 있었다. 또한 cyclic pentapeptide는 키모트립신에만 저해활성이 있었다.

ABSTRACT. Antielastic fragment in GBI-II differ on P_1 site with that of antitryptic fragment in LBI. To obtain further understanding of the role of amino acid residue near the reactive site, specificity of P_1 site and loop size, Tyr substituted cyclic nonapeptide and cyclic pentapeptide were synthesized and the inhibition constants for some proteinases were calculated by Dixon method. Cyclic nonapeptide showed no inhibition for chymotrypsin but appeared low inhibitory activity for trypsin and elastase and that of cyclic pentapeptide possessed inhibitory activity for chymotrypsin.

서 론

생체내에 존재하는 각종 proteinase inhibitor들은 그 종류에 비해 생리적 기능이 밝혀진 것은 극소수에 불과하다^{1,2}. 이들 inhibitor들은 단백질 대사과정^{3,4}과 폐기종이나 류마티스성 관절염에 관여하는 leukocyte elastase와 같은 일부 단백질 분해효소가 생체내에서 유해한 작용을 한다는 사실이 알려지면서 이들을 약리학적으로 이용하려는 시도 등⁵ 여러 가지의 목적으로 연구의 대상이 되고 있다.

Inhibitor는 효소의 active site와 작용하는 reactive site가 존재하며⁶ 대부분의 콩과식물에서 reactive site는 disulfide 고리로 된 cyclic nonapeptide내에 있고 P_1 위치에 해당하는 아미노산 잔기가 reactive site이다². P_1 아미노산 잔기가 염기성 아미노산인 Lys 또는 Arg일 경우는 트립신 혹은 트립신형의 효소를 저해하고 소수성이 큰 Leu, Met, Tyr, Phe 및 Trp인 경우는 키모트립신, Ala 또는 Ser인 경우에는 에라스타제를 저해하는 등 각 효소에 대한 기질특이성이

P_1 위치의 아미노산 잔기와 관계¹가 있는 것으로 알려져 있으나 이와 같은 P_1 위치의 특이성은 모든 경우에 공통적인 것이 아니라 그 예외도 많이 밝혀져 있다⁷⁻⁹.

Bowman-Birk inhibitor(BBI)의 cyclic nonapeptide 고리를 대상으로 합성한 각종 nonapeptide 유도체를 트립신과 키모트립신에 작용시켜 그 저해활성을 연구한 결과¹⁰에 의하면 P_1 위치의 아미노산 잔기에 따라 현저한 특이성과 활성의 변화가 나타났었다. 특히 inhibitor의 기능을 가지기 위해서는 disulfide 결합이 필수적이고 또한 P_1 아미노산은 L-형 아미노산으로 구성되어야 하며 합성펩티드의 N 말단을 acetyl기로 C 말단을 NH_2 기로 치환시켰을 때 저해활성은 증가되었고 antichymotryptic 고리의 P_1 인 Leu를 Tyr으로 치환시킨 것이 의외의 높은 활성을 나타내고 있다. 한편, 많은 콩과식물의 씨속에 포함되어 있는 inhibitor에서 reactive site가 포함된 cyclic nonapeptide의 아미노산 서열은 유사성이 크다². 특히 Garden bean inhibitor(GBI-II)의 antielastase 고리¹¹와 Lime bean inhibitor(LBI)의 antitryptic 고리¹²는 P_1 를 제외하면 나머지 모든 잔기는 동일하다.

이와 같은 사실은 곧 해당효소에 대한 특이성의 차이에 따른 P_1 위치의 아미노산 잔기만 달라졌을 뿐 inhibitor를 이루는 주변 아미노산 잔기는 공통성이 있음을 암시한다. 이러한 관점에서 P_1 위치의 특이성을 확실히 규명하고 inhibitor의 저해 활성이 reactive site 주변 아미노산과 어떠한 연관성이 있는가를 규명해 보기 위하여 우선 아미노산 서열 중 P_1 위치를 Tyr으로 치환시켜 키모트립신에 대한 저해활성의 변화 정도를 측정해 보기로 하였다. 또한 고리를 형성하는 9개의 아미노산 잔기 중 Pro-Pro 잔기는 입체구조 유지에 보조적이며¹³ P_2 '와 P_3 '는 활성에 직접 관여하지 않는다는 보고로¹⁴ 미루어 보아 저해작용은 nonapeptide에서 뿐만 아니라 아미노산 잔기의 수를 축소한 경우에서도 활성을 나타낼 것으로 추측된다. 즉 disulfide 결합 형성에 필요한 두 개의 Cys와 P_1 위치의 Tyr, P_1 '의 Ser과 또한 고리의 안정화에

필요한 P_2 의 Thr으로 구성된 cyclic pentapeptide를 최소크기의 모델 저해제로 선정하였으며 이들을 액상법으로 합성하여 트립신, 키모트립신 및 에라스타제 등의 proteinase에 대한 저해활성을 Dixon method¹⁵로 측정하고자 한다.

실 험

본 실험에 이용된 기기로는 DU-8B spectrophotometer로 효소의 반응속도를 측정했으며 HPLC는 microbonda pack- C_{18} 역상 column을 사용하여 water associates model 441를 이용하였다. 아미노산 분석은 Hitachi 835-50 amino acid analyzer, 비선광도는 zeiss-128289, 원소분석은 carlo erba model 1106, mp.는 electrothermal capillary melting point apparatus를 사용했고 보정하지 않았다. 또한 CD spectra는 JASCO model J-600으로 측정했다.

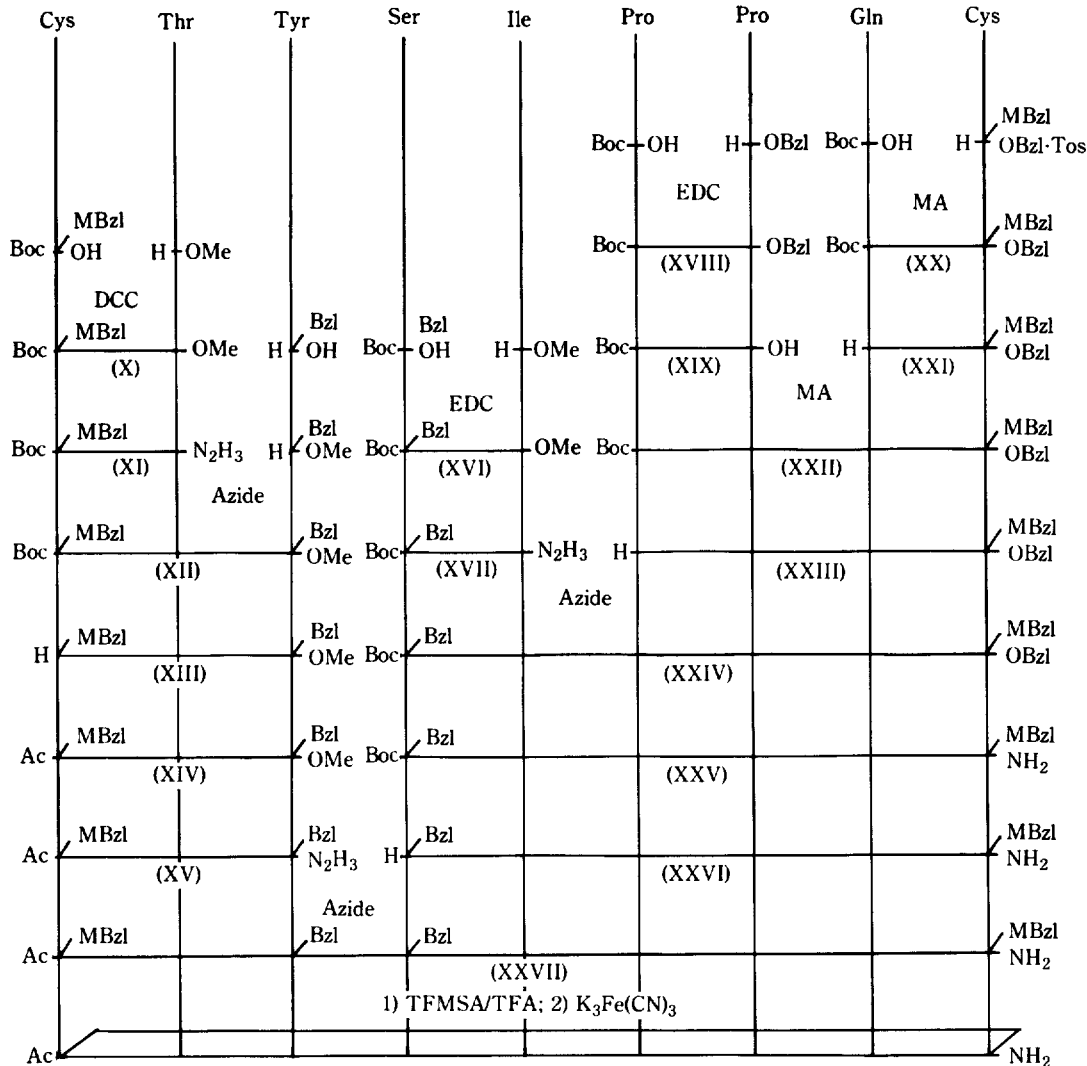
Cyclic peptide 유도체들의 합성

Cyclic nona 및 pentapeptide는 Scheme 1과 2와 같이 DCC, MA 및 azide법을 이용하여 액상법으로 합성하였다.

***t*-Boc-Ser(Bzl)-Ile-OMe(XVI).** *t*-Boc-Ser(Bzl)-OH 14.77 g(50 mmol)과 H-Ile-OMe·HCl 9.08 g(50 mmol)을 DMF 60 ml에 용해시킨 후 0°C에서 Et_3N 7 ml(50 mmol), EDC 11.6 g(60 mmol) 및 HOBt 8.1 g(60 mmol)을 첨가하여 실온에서 24시간 교반시켰다. 감압농축한 후 잔류물을 EtOAc에 녹이고 10% citric acid, 4% $NaHCO_3$ 및 물로 세척하고 무수 Na_2SO_4 로 건조시킨 후 Ether를 가하여 결정화시켰다.

수율: 15.21 g(72%), mp.: 152~154°C, $[\alpha]_D^{25} = -7.7$ (C2.6, H_2O), Anal for $C_{22}H_{34}O_6N_2$: C, 62.54%; H, 8.11%; N, 6.63% Found C, 62.72%; H, 8.08%; N, 6.61%.

Boc-Cys(MBzl)-Thr-Tyr(Bzl)-OMe(XII). 22.83 g(50 mmol)의 화합물 XI을 DMF 200 ml에 용해시키고 -60°C에서 4.2 M HCl을 용해시킨 dioxane 36 ml와 isopentyl nitrite 8.5 g(60



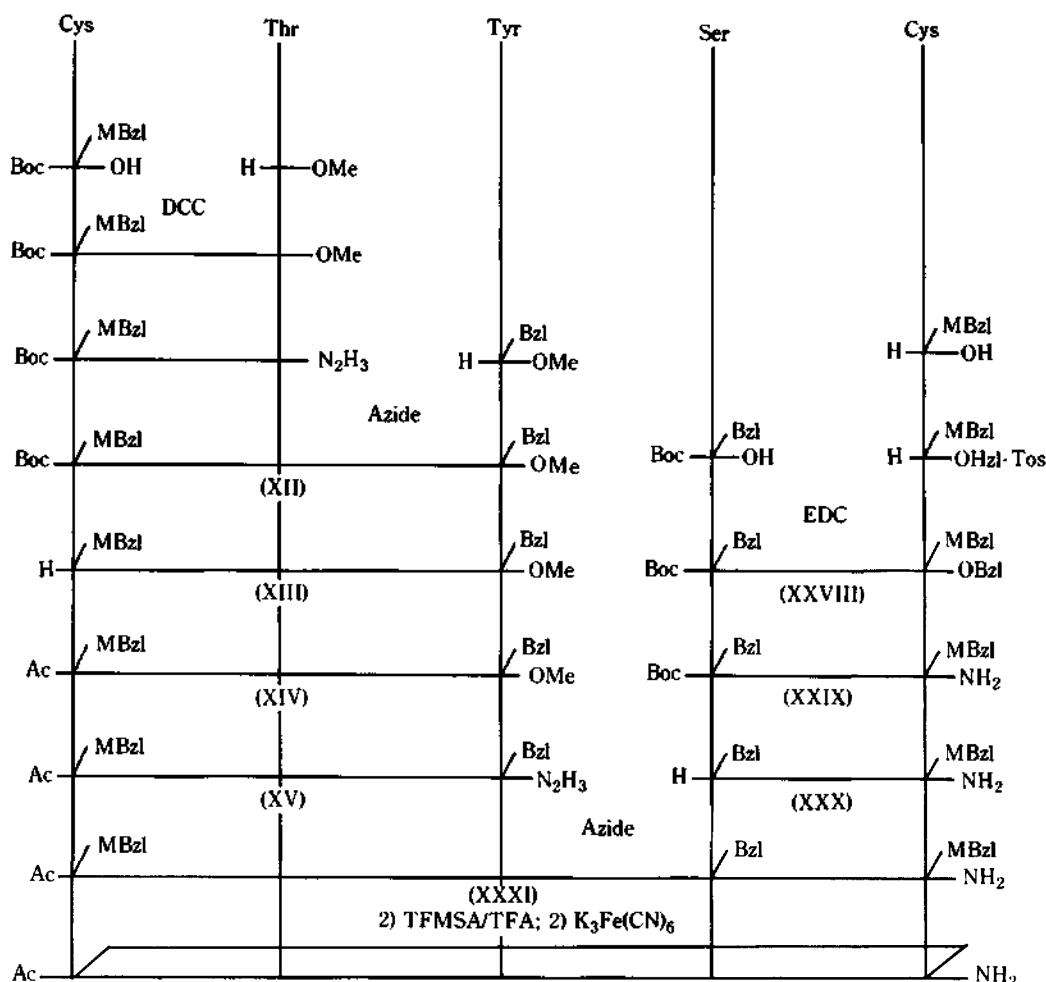
Scheme 1. Synthesis of the cyclic nonapeptide.

mmol)을 가한 후 $-20^{\circ}C$ 에서 40분간 방치한 후 hydrazine test에서 azide 생성이 완결되었을 때 다시 $-60^{\circ}C$ 로 냉각하고 Et_3N 23.8 ml를 가하여 pH 7.5로 조정하였다. DMF 200 ml에 Tyr (Bzl)-OMe·HCl 16.1 g (50 mmol)과 Et_3N 7 ml (50 mmol)을 혼합한 용액을 $-15^{\circ}C$ 로 냉각하여 위의 azide 용액에 혼합시켰다. 이를 $0^{\circ}C$ 에서 5일간 교반시킨 다음 충분한 양의 물을 부어 결정을 석출시켰고 10% citric acid, 4% $NaHCO_3$ 및 물로 세척하고 KOH pellet 상에서 건조시켰

다. 생성물을 메탄올에 용해시켜 silicagel을 채운 column (2.8×156 cm)에서 메탄올과 크로로포름 혼합용매로 용출시켜 순수한 생성물을 분리한 후 감압농축하고 ether로 결정시켰다.

수율: 23.11 g (65%), mp.: $151-153^{\circ}C$, $[\alpha]_D^{25} = -6.7$ (C2, methanol), Anal for $C_{24}H_{37}O_8N_3S$: C, 62.60%; H, 6.67%; N, 5.92% Found C, 62.75%; H, 6.52%; N, 5.85%.

Ac-Cys(MBzl)-Thr-Tyr(Bzl)-OMe(XIV). 9.15 g (15 mmol)의 화합물 XIII을 DMF 60 ml



Scheme 2. Synthesis of the cyclic pentapeptide.

EDC : 1 Ethyl-3-(3 dimethyl aminopropyl) carbodiimide
 MBzl: *p*-methyloxycarbonyl
 Boc : *t*-Butyloxycarbonyl
 Ac : Acetyl
 OMe : Methyl ester

DCC : N,N- dicyclohexylcarbodiimide
 Z : Benzyloxycarbonyl
 Bzl : Benzyl
 TFMSA: Trifluoromethanesulfonic acid
 Obzl : Benzyl ester
 MA : mixed anhydride method

에 용해시키고 Et₃N 2.1 ml (15 mmol)와 *p*-nitrophenylacetate 3.26 g (18 mmol)을 가하여 실온에서 24시간 교반시킨 후 감압농축하였다. 잔류물을 EtOAc에 녹여 10% citric acid와 물로 세척한 후 무수 Na₂SO₄로 건조시키고 농축하여 생성된 결정은 MeOH-Ether로 재결정하였다. 수율: 7.04 g (72%), mp.: 147~149 °C,

$[\alpha]_D^{25} = -14.7^\circ$ (C1.5, methanol), Anal for C₃₄H₄₁O₈N₃S · $\frac{1}{2}$ H₂O: C, 61.80%; H, 6.41%; N, 6.36%; Found C, 61.69%; H, 6.50%; N, 6.32%.

Boc-Gln-Cyz(MBzl)-OBzl(XX). 정제 한 THF 160 ml에 *t*-Boc-Gln-OH 19.68 g (80 mmol)을 녹여 -15 °C로 냉각시키고 심하게 교반

하면서 Et_3N 11.2 ml (80 mmol)와 -15°C 로 냉각시킨 *iso*-Butylchloroformate 10.48 ml (80 mmol)를 첨가하고 10분 후 DMF 160 ml에 Cys(MBzl)-OBzl·Tos 40.32 g (80 mmol)을 녹인 -15°C 의 용액을 혼합하고 다시 Et_3N 11.2 ml (80 mmol)을 첨가했다. 이 혼합용액을 0°C 에서 1시간 교반한 후 실온에서 24시간 교반시켰다. 반응 완결을 확인하고 THF를 감압제거한 다음 충분한 양의 물을 가하여 결정을 석출시키고 이를 여과한 다음 10% citric acid, 물, NaHCO_3 및 물의 순으로 세척하고 KOH pellet 상에서 건조시켜 MeOH-ether에서 재결정하였다.

수율: 39.04 g (87%), mp.: $131\sim 134^\circ\text{C}$ (Lit.¹⁰ $134\sim 135^\circ\text{C}$), $[\alpha]_D^{25} = -20.5^\circ$ (C2, DMF).

Ac-Cys(MBzl)-Thr-Tyr(Bzl)-Ser(Bzl)-Ile-Pro-Pro-Gln-Cys(MBzl)-NH₂ (XXVII). 1.34 g (2 mmol)의 화합물 XV와 1.78 (2 mmol)의 화합물 XXVI을 사용하여 화합물 XII의 합성법과 동일하게 합성하였다. 반응이 끝난 후 생성시킨 결정을 DMF에 용해시키고 Sephadex LH-20을 채운 column (2.8×156 cm)에서 DMF로 용출시켜 순수한 생성물을 얻었다.

수율: 1.89 g (64%), mp.: $136\sim 139^\circ\text{C}$, $[\alpha]_D^{25} = -58.5^\circ$ (C2, DMF), Anal. for $\text{C}_{75}\text{H}_{97}\text{O}_{16}\text{N}_{11}\text{S}_2$: C, 61.16%; H, 6.64%; N, 10.46% Found C, 61.75%; H, 6.52%; N, 10.57%

Ac-Cys-Thr-Tyr-Ser-Ile-Pro-Pro-Gln-Cys-NH₂ (cyclic nonapeptide). 736 mg (0.5 mmol)의 화합물 XXVII을 TFA 15 ml에 ethanedithiol 0.65 ml를 넣은 혼합용매에 녹이고 thioanisole 1.8 ml와 TFMSA 1.35 ml를 넣은 후 실온에서 한 시간 교반시켰다. 반응액에 ether를 가하여 침전된 잔류물을 10% AcOH 800 ml에 용해시킨 후 Ether로 세척하고 1 M NH_4OH 를 가하여 pH 7.8로 조정하였다. 여기에 0.1 M $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 수용액 12 ml를 첨가하여 30분간 실온에서 교반하고 Amberlite IR-45(Cl⁻ form)를 처리한 후 resin을 여과하여 버리고 동결건조시켰다.

생성된 잔류물에 50% AcOH 수용액 20 ml를

가하여 Sephadex G-15를 채운 column (2.8×10 cm)에 걸어 동일 용매로 용출시켜 ammonium acetate의 salt를 제거시켰다. 이를 다시 동결건조한 후 10% AcOH 5 ml에 용해시켜 Sephadex G-25를 채운 column (2.8×100 cm)에서 10% AcOH 용액으로 용출시켜, 생성물이 포함된 fraction (465~525 ml)을 수집하여 동결건조시킴으로써 최종생성물인 cyclic nonapeptide를 얻었다.

수율: 307.27 mg (53%)

효소의 저해활성 측정

각 효소반응은 Terada 등의 방법¹⁰에 따라 최적 조건에서 기질용액 0.1 ml와 합성 펩티드 용액 (inhibitor) 0.1 ml를 해당 buffer에 넣어 2.9 ml가 되게 하고 preincubation시킨 후 효소용액 0.1 ml를 가하여 반응을 개시하였으며 spectrophotometer에서 흡광도의 변화로 반응진행 정도를 측정했다.

Elastase에 대한 저해활성

Porcine pancreas에서 추출하여 재결정된 엘라스타제를 사용하여 표준기질로 succinyl-(Ala)₃-p-nitroanilide를 사용했고 buffer는 0.05% Triton X-100과 $1\times 10^{-3}M$ AcOH가 함유된 0.1 M Tris buffer (pH 8)를 사용했다.

기질은 소량의 DMSO에 용해시킨 후 최종농도가 0.5, 1 및 2 mM이 되게 하였고 효소는 $1\times 10^{-8}M$ AcOH에 용해시킨 후 분자량 25,900으로 간주하여 최종농도가 $1\times 10^{-7}M$ 이 되게 하였으며 합성 펩티드는 100~300 μM 사이의 농도가 되게 하여 410 nm에서 p-nitroanilide의 유리를 측정하여 초기속도로 K_i 를 구했다.

Trysin에 대한 저해활성

재결정된 트립신을 사용하여 표준기질로 Tos-Arg-OMe (TAME)를 사용하고 buffer는 0.01 M CaCl_2 를 함유한 0.05 M Tris buffer (pH 8.0)를 사용했다. 최종기질농도는 0.5, 1 및 2 mM이 되게 하였고 효소의 분자량은 23,800으로 하여 최종농도는 $1\times 10^{-8}M$ 이 되게 하였으며 합성 펩티드는 최종농도 50~300 μM 의 범위에서 각종 농도로 만들어 245 nm에서 흡광도 변화에

의한 초기속도를 이용하여 K_i 값을 구했다.

Chymotrypsin 에 대한 저해활성

Bovine pancreas 에서 추출하여 재결정된 키모 트립신을 사용하여 표기준질로 Ac-Tyr-OEt (ATEE)를 사용했고 buffer 는 0.05 M phosphate buffer (pH 7.0)를 사용했다.

기질은 소량의 MeOH 에 용해시킨 후 최종농도가 0.5와 1mM 이 되게 하였고 효소의 분자량은 25,000으로 하여 최종농도는 $4 \times 10^{-8} M$ 이 되게 하였으며 합성 펩티드는 최종농도가 50~300 μM 의 범위에서 각종 농도로 만들어 237nm 에서 흡광도 감소를 측정했다.

결 과

아미노산 유도체들의 합성. *t*-Boc 아미노산 유도체들은 *t*-Boc-N₃에 NaOH 를 염기로 사용한 Pettit 법¹⁶과 Et₃N 을 염기로 사용한 Nagasawa 법¹⁷을 이용했는데 대부분 후자의 경우 수율이 높았다.

반응용액의 온도는 실온에서보다 35°C 정도로 유지할 때 반응시간이 단축되었고 수율도 높았다.

아미노산 ester 유도체들은 hydrazine 으로 처리하여 hydrazide 로 전환되는 즉 azide 법의 합성 중간체로 손쉽게 전환될 수 있는 methyl ester 로 합성하였으며 염기에 의한 가수분해시 수반되는 라세미화를 피하기 위해 Pro 잔기는 hydrolysis 에 의해 쉽게 제거되는 Bzl 을 사용하였다. 결사슬의 보호는 Cys 의 경우 Bzl 보다는 MBzl 로 치환시켜 deblocking 과정에서 유발되는 미반응 및 부반응을 억제하게 했으며 Tyr, Lys 및 Ser 은 마지막 제거단계에서 MBzl 기와 동시에 제거될 수 있는 Z 와 Bzl 로 보호했다.

Thr-OMe·HCl 은 HCl 을 제거해야 결정화가 잘되었는데 Et₃N 으로 HCl 을 제거하는 Pettit 법¹⁶으로는 쉽게 변색되었고 MeOH 에 NH₃ 기체를 포함시켜 HCl 을 제거하는 Chang 의 방법¹⁸으로는 비교적 안정했다. 이것은 여분의 Et₃N 이 결정속에 존재하여 변색의 요인이 되는 반면 NH₃ 는 감압농축과정에서 제거되기 때문으로 생각된다. 본 실험에서는 Thr-OMe·HCl 을 완전히 농축하여 모든 용매를 제거한 무색의 진한 유상물

-20°C에서 장기간 방치하여 결정화시켜 사용했다.

Ser 의 경우는 본 실험에서 이용된 반응조건에서 측쇄의 -OH 기 보호없이도 azide 나 DCC 법 모두 부반응이 없었음을 IR 과 NMR 로 확인할 수 있었고 azide 법에서는 보호하지 않은 경우 20% 정도의 높은 수율을 얻을 수 있었으나 본 실험에서는 Ser 의 결사슬을 Bzl 로 보호하여 합성과정과 *t*-Boc 의 제거과정에서 생길지 모를 가능한 부반응을 배제하기로 하였다.

Coupling 반응. 본 실험에서는 DCC, EDC, azide 및 MA 법으로 coupling 했다. Azide 법은 Rudinger 법¹⁹에 따랐는데 hydrazide 가 형성되는 활성단계에서는 산에 의해 *t*-Boc 기가 유리되는 것을 막기 위해 -20°C 이하에서 실시되어야 하므로 활성단계의 반응시간이 다소 많이 요구되었고 이 때 isopentyl nitrite 는 1.2당량 이상을 넣어야 반응이 완결되었다. 반응시간은 대개 0°C에서 3일 정도 교반시키는 것으로 알려져 있지만 시간을 연장하고 매일의 pH 를 측정하여 반응의 진행정도에 따라 pH 를 조정해 줌으로써 수율이 증가되었다.

합성 중간단계에서의 *t*-Boc 제거는 0.1N HCl 을 용해시킨 99% formic acid 용액으로 제거하였으며 최종단계의 보호기 제거는 EDT 와 thioanisol 존재하에서 TFA 에 1M-TFMSA 를 용해시킨 용액으로 제거했다.

Thioanisol 은 보호기의 제거를 촉진시키고²⁰ 0°C에서 90분 정도 교반시켜 완결된다고 보고하였으나²¹ 실온 정도의 온도가 아니면 반응시간이 많이 요구되거나 완결되지 않았다.

Disulfide 결합 형성은 K₃Fe(CN)₆를 이용하였으며 이 때 dimer 등의 polymer 생성이 억제되도록 가능한 묽은 농도인 0.2mM 정도에서 처리하였다.

최종 생성물은 Amberlite IR-45 resin 으로 처리하여 cyanide salt 를 제거하였고 용액속에 존재하는 ammonium acetate 는 Sephadex G-15 column 에 통과시켜 제거하였으며 이를 Sephadex G-25 column 에 통과시키고 동결건조하여 목적하는 순수한 생성물을 얻었다. 생성물의 HPLC 결과를 Fig. 1에, 아미노산 분석결과는

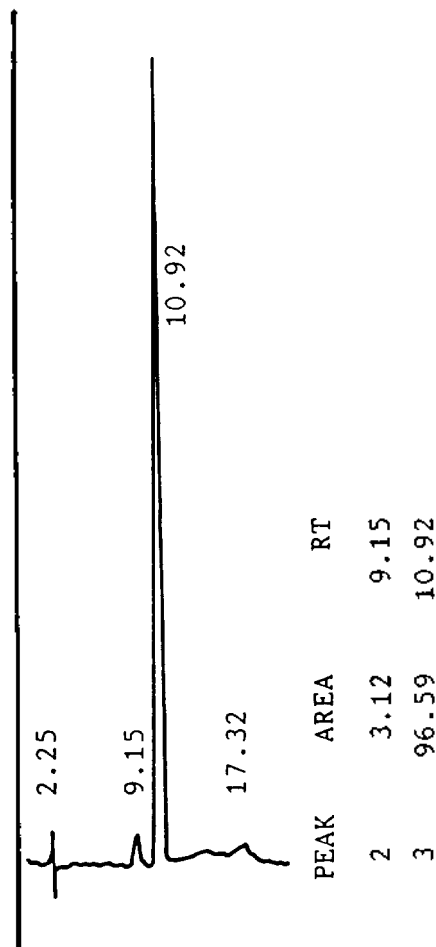


Fig. 1. HPLC analysis of pure cyclic nonapeptide: Bondapak C₁₈ column (300 × 4 mm) detection at 254 nm, solvent of MeOH/0.01M sodium acetate (1:1) pressure 860 psi, sample injection 10 μl, flow rate 1.0 ml/min.

Table 1에 수록했으며 수율과 paper electrophoresis 및 TLC에 대한 물리상수는 Table 2에 나타내었다.

CD spectra. 합성 peptide들의 CD spectra는 Fig. 2에 수록하였다. 두 peptide 모두 200 nm 부근에서 극소점을 가지는 것으로 보아 random 구조가 우세한 것으로 생각되며^{22,23} cyclic nonapeptide의 경우 Pro에 의한 부분적 정렬구조가 210 nm 부근의 weak negative band에서 나타나고 있다²⁴. 이러한 구조는 수 종의

Table 1. Amino acid composition of the synthetic peptides

	Ile	Thr	Tyr	Ser	Pro	Glu	(Cys) ₂
nona	1.00	0.93	0.82	0.86	2.34	1.12	0.81
penta		0.97	0.85	0.87			0.82

Condition; after hydrolysis with 6N HCl/phenol (2:1) for 24 hr at 110 °C. Standard column (2.6 × 150 nm) and ammonia filter column (4 × 50 nm), flow rate 0.225 ml/min for buffer solution and 0.3 ml/min for ninhydrin, sample injection 16 μl. Detection at 570 nm and 550 nm.

Table 2. Yields and physical constants of the synthetic peptides

	Yield	TLC ^a (R _f)	Paper electrophoresis ^b (R ^{Lys})
nona	53	0.68	0.12
penta	45	0.42	0.21

^aSolvent system, nBuOH-AcOH-Pyridine-H₂O (4:1:1:2). ^bSolvent system, HCOOH-AcOH-MeOH-H₂O (1:3:6:10), pH 1.8, performed on Toyo Roshi No52 paper at 600V the mobilities of samples being given relative to Lysin (R^{Lys}).

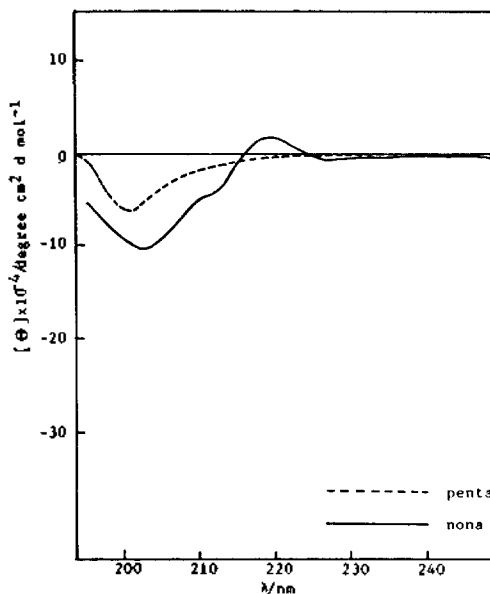


Fig. 2. CD spectra of synthetic cyclic peptides in MeOH at 25 °C, scan speed 50 nm/min, sensitivity 5m deg/FS.

cyclic peptide에 대하여 이미 보고된 바 있는 cyclic peptide들의 형태^{25,26}와 별다른 큰 차이가 없음을 보여주고 있다. 각종 cyclic nonapeptide

Table 3. Competitive inhibition constant (K_i , μM) of trypsin, chymotrypsin and elastase by synthetic cyclic peptide

	Trypsin ^a	Chymotrypsin ^b	Elastase ^c
nona	25	—	80
penta	—	278	—

^a0.05M Tris buffer (pH 8.0) containing 0.01M $CaCl_2$ at 25°C. Substrate, Tos-Arg-OMe. ^b0.05M phosphate buffer (pH 7.0) containing 3% MeOH at 25°C. Substrate, Ac-Try-OEt. ^c0.1M Tris buffer (pH 8.0) containing 1×10^{-3} M AcOH substrate, succinyl (Ala)₃-p-nitroanilide.

의 활성과 관련된 CD spectra의 data와 정확하게 비교할 수는 없지만 일반적인 cyclic peptide와는 구조상 큰 차이점이 나타나지 않는다고 생각된다.

효소에 대한 저해활성. 합성한 cyclic peptide 유도체들을 트립신, 키모트립신, 에라스타제와 각각 반응시켜 그 활성을 Dixon 법¹⁵으로 측정하였고 그 결과를 Table 3에 수록하였다.

고 찰

Terada 등¹⁰은 BBI의 antichymotryptic fragment 합성시 P₁을 Tyr으로 치환시켜 활성이 크게 증가됨을 보고하였고 azuki bean과 vicia angustifolia inhibitor²⁷도 antichymotryptic fragment의 P₁이 Tyr으로 구성되어 있다.

본 실험에서는 GBI-II antielastic fragment의 P₁에 Tyr을 치환시켜 일반적인 chymotryptic fragment와는 조성아미노산에서 다소 차이가 있는 cyclic nonapeptide와 cyclic pentapeptide를 합성하였다. Cyclic nonapeptide의 경우 P₁의 특이성에 해당하는 키모트립신에 대하여 저해활성이 나타나지 않았고 의외로 에라스타제와 트립신에 대하여 저해활성이 나타났다. 그러나 cyclic pentapeptide는 키모트립신에 저해활성이 있었다. Cyclic nonapeptide가 특이성에 따르지 않는 이유로서 우선 reactive site가 유동될 수 있는 reactive site의 전이가능성이 가장 클 것으로 예상하여 에라스타제와 트립신으로 가수분해시

키고 dansylation 한 결과 가수분해는 P₁-P₁' bond에서 일어났음이 확인되어 reactive site의 전이는 없었음을 알 수 있었다. 또한 conformation의 급격한 차이에 의해 저해 특이성이 달라질 가능성이 생각되지만 CD spectra만으로 단정지을 수는 없으나 형태상의 큰 차이점은 지적되지 않았다. 이러한 사실들로 미루어 볼 때 reactive site의 인접잔기 차이에 의해 특이성도 변할 수 있다고 생각된다. Cyclic nonapeptide는 콩과식물에 존재하는 각종 antichymotryptic fragment와 비교하면 P₂, P₁, P₁' 혹은 P₅'에서 차이가 나는 것도 있다. Cyclic nonapeptide의 경우 P₁인 Tyr 잔기가 키모트립신의 active site와 interaction할 때 부적당한 인접아미노산 잔기들이 직접적인 방해요인으로 작용될 수 있으나 트립신과 에라스타제의 active site와 interaction할 때는 이러한 아미노산 잔기들이 오히려 유리하게 작용되어 저해활성을 가능하게 해준다고 생각된다. 또한 P₁을 중심으로하여 이론적으로 설정한 pentapeptide는 낮은 저해활성이지만 값이 존재한다는 사실로 미루어보아 중요한 의미가 있다고 생각된다. 이것은 P₁의 중요성을 강조하는 자료가 됨은 물론 연구대상으로 이용되는 단백질의 필요한 부분만을 이론적으로 설정할 수 있는 가능성을 보여줌과 동시에 저해활성 발현에는 P₂, P₁ 및 P₁'와 Cys에 의한 disulfide bond 형성이 중요하며 inhibitor로서의 최소단위가 될 수 있는 가능성을 시사하고 있다. 따라서 inhibitor의 저해작용은 P₁의 아미노산 잔기에만 의존하는 것이 아니라 reactive site 주변의 아미노산 잔기의 기하학적 구조와 결사슬의 영향도 크게 관여됨을 생각할 수 있다.

이 연구는 문교부의 1988년도 특성학과 교수 해외과건 계획으로 이루어졌으며 이에 감사를 드립니다.

인 용 문 헌

1. M. Jr. Laskowski, I. Kato and W. J. Kohr, "Proc. Int. Symp. Proteins, Versatility of Proteins N. Y., Acad., p.466, 1978.

2. M. Jr. Laskowski and I. Kato, *Ann. Rev. Biochem.*, **49**, 593 (1980).
3. H. Holzer and H. Tschesche, "Biological Functions of Proteinases, Springer-Verlag, Berlin", 1979.
4. H. Tschesche, *Angew. Chem. Int. Edn. Engl.*, **13**, 10 (1974).
5. A. J. Barrett, *Agents Actions*, **8**, 11 (1978).
6. K. Ozawa and M. Jr. Laskowski, *J. Biol. Chem.*, **241**, 3975 (1966).
7. I. Kato, W. J. Kohr and M. Jr. Laskowski, "Proc 11th FEBS Meet, Regulatory Proteolytic Enzymes and their Inhibitors, Oxford, Pergamon", p.197, 1978.
8. S. Norioka and T. Ikenaka, *J. Biochem.*, **93**, 479 (1983).
9. T. Kurokawa, S. Hara, H. Takahara, K. Sugawara and T. Ikenaka, *J. Biochem.*, **101**, 1361 (1987).
10. S. Terada, K. Sato, T. Kato and N. Izumiya, *Int. J. Peptide Protein Res.*, **15**, 441 (1980).
11. C. G. L. Tan and F. C. Stevens, *Eur. J. Biochem.*, **18**, 515 (1971).
12. K. A. Willson and M. Sr. Laskowski, *J. Biol. Chem.*, **248**, 756 (1973).
13. Y. Birk and A. Gertler, "Proteins Inhibitors Proc. Ist. Int. Res. Conf., Munich, 412, 1970.
14. M. Dixon, *Biochem. J.*, **55**, 170 (1953).
15. G. R. Pettit, S. K. Kuroiwa, K. Narita and Y. Isowas, *Bull. Chem. Soc. Jap.*, **46**, 1269 (1973).
16. T. Nagasawa, K. Kuroiwa, K. Narita and Y. Isowas, *Bull. Chem. Soc. Jap.*, **46**, 1269 (1973).
17. J. K. Chang, M., Shimizu and S. S. Wang, *J. Org. Chem.*, **41**, 3255 (1976).
18. J. Honzyl and J. Rudinger, *Coll. Czech. Chem. Commun.*, **26**, 2333 (1961).
19. Y. Kiso, M. Satomi, K. Ukawa and T. Akita, *J. C. S. Chem. Commun.*, 1063 (1980).
20. K. Akaji, N. Fujii, H. Yajima and D. Pearson, *Chem. Pharm. Bull.*, **30**(1), 349 (1982).
21. S. Beychok, "in poly- α -Amino Acids (Fasman, G. D. ed.), Vol.1, (Marcel Dekker, New York, p.293, 1967.
22. N. Greenfield and G. D. Fasman, *Biochemistry*, **8**, 4108 (1969).
23. M. Narita, H. Ohkawa, S. Nagasawa and S. Isokawa, *Int. J. Peptide Protein Res.*, **24**, 129 (1984).
24. L. M. Gierasch, C. M. Deberg, V. Madison, C. H. Niu and E. R. Blout, *Biochemistry*, **20**, 4730 (1981).
25. K. Sato, R. Kato and U. Nagai, *Bull. Chem. Soc. Jap.*, **59**, 535 (1986).
26. O. Abe, J. Ohata, Y. Utsumi and K. Kuromizu, *J. Biochem.*, **83**, 173 (1978).