

단백질 가수분해효소를 이용한 생리활성펩티드의 합성

(Synthesis of Bioactive Peptides by Proteases)

김 세 권

부산수산대학교 자연과학대학 화학과

1. 서 론

1886년 Dalewsky는 펩톤(peptone)의 농축액 및 오브 알부민(ovalbumin)의 가수분해액에 pepsin을 소량 가함으로써 불용성단백질과 같은 물질이 형성됨을 발견하였다. 이 불용성물질을 Sawjalow에 의해 plastein이라고 하였고, 그 합성과정을 plastein반응이라 하였다.¹⁾ Plastein반응은 1950년대 이전에는 단백질의 생합성과 관련하여 많은 연구가 이루어졌다. 그러나 1950년대 후반에 단백질생합성의 개시기구에 관련된 아미노산의 활성화기구가 해명되기 시작하여, 1960년대에 DNA-RNA계를 경유하여 단백질이 합성된다고 정설화됨에 따라 plastein반응의 연구는 거의 중단되었다. 그러나 1970년대부터 plastein반응은 단백질의 영양성개선,²⁻⁴⁾ 기능성개선⁵⁻⁷⁾ 및 펩티드화학⁸⁻¹⁰⁾에 관한 연구로 전환하게 되었다.

현재에도 생리활성이 있는 많은 종류의 펩티드들이 화학적합성법으로 만들어져 이용되고 있으나,¹¹⁾ 화학적합성법은 보호기의 도입과 선택적제거, 도입된 보호기에 의한 용해도감소, 라세미화 및 비효율적인 축합물질의 유발 등 많은 제약을 받고 있다. 특히 고온고압과 같은 강력한 반응환경에서 합성되므로 생산비증가를 초래할 뿐만 아니라 유독성물질을 사용함으로써 환경오염을 야기시키고 있다.¹²⁾ 이러한 단점을 해결하고자 최근에 와서 효소를 이용한 펩티드의 합성에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다. 효소를 이용한 펩티드합성의 경우 보호기의 도입이 간단하거나 불필요하며, 위치특이적인 펩티드결합에 의한 부반응의 감소 및 라세미체의 생성이 없는 등의 많은 잇점이 있다.¹³⁾

효소에 의한 펩티드합성법은 합성반응의 개발초기에는 용매로서 침전제를 이용하여 아미노산 혹은 펩티드기질에서 펩티드생성의 방향으로 평형화하는 방법을 많이 이용하였지만⁴⁾ 최근에는 물에 섞이는 유기용매(water-miscible organic solvent) 혹은 물에 섞이지 않는 유기용매(water-

immiscible organic solvent)들을 수용액과 함께 사용하여도 합성반응이 이루어진다는^{15, 16)} 사실이 밝혀져 그 응용연구의 범위가 점차로 확대되고 있다. 유기용매를 물 대신으로 사용할 경우 첫째, 열역학적인 평형을 가수분해반응에서 합성반응으로 이동시킬 수 있고, 둘째, 물이 존재할 때 일어나는 부반응을 억제시킬 수 있으며, 셋째, 효소의 열안정성이 향상되고, 넷째, 미생물의 오염이 없다는 등 많은 장점을 가지고 있다.¹⁷⁾

하지만 효소를 공업적으로 이용할 때 값이 너무 비싸고 합성물과의 분리, 정제에 어려움이 있다. 이러한 문제를 해결하기 위하여 효소의 고정화법(immobilized enzyme)이 널리 이용되고 있다.¹⁸⁻²²⁾ 이 방법은 효소의 활성을 증가시키고 유기용매상에서 안정성을 주는 장점을 가지고 있다. 그러나 침전계에서는 합성물과 고정화효소와의 분별이 어렵다는 점과 컬럼을 사용하면 막힘현상을 일으킨다는 이유때문에 고정화효소는 주로 가용계(organic monophasic system) 또는 이상계(organic biphasic system)에서 사용된다.

한편 protease에 의한 펩티드의 역합성은 단백질공학의 한 수법인 반합성(semisynthesis)으로서 주목을 끌고 있다. 단백질반합성은 천연단백질 및 펩티드를 protease/peptidase로 절단하여 그 단편의 일부를 다른 아미노산이나 합성펩티드로 치환시킨 후에 protease로 역합성하여 다시 펩티드사슬을 연결하는 단백질합성의 개량공정법이다. DNA의 조작기술이 오늘날과 같이 발전하기 이전에는 단백질합성의 공학적기법은 이 반합성과 화학적수식으로 한정되었다. 특히 반합성은 돼지의 인슐린을 사람의 인슐린형으로의 변환을 성공시킴으로써 단백질공학의 선구적인 연구의 시발점이 되었다.^{12, 23)}

본고에서는 유기용매중에서 protease를 이용한 생리활성펩티드의 합성에 필요한 protease의 종류, 이들의 펩티드 합성작용기구, 합성설계조건 및 유용 생리활성펩티드의

합성예를 소개하고자 한다.

2. 펩티드합성을 촉매하는 protease (단백질 가수분해효소)

Protease는 일반적으로 단백질의 가수분해를 촉매하는 단백질 가수분해효소(proteolytic enzyme)이다. Protease는 단백질의 말단아미노기 또는 카르복실기의 펩티드결합에 작용하여 아미노산을 한개씩 차례로 유리시키는 효소군(exopeptidase)과 단백질분자내부의 펩티드결합에 작용하

여 각 효소의 특이성에 따라 분해시키는 효소군(endopeptidase)으로 구별된다. 종래의 습관에 의해 전자를 peptidase라 하고 후자를 proteinase 또는 protease라고 한다.

현재 펩티드합성에 이용되는 효소는 trypsin²⁴⁾, chymotrypsin^{12, 25-28)} 그리고 papain²⁹⁻³²⁾ 등과 같은 endopeptidase가 대부분 이용되고 있으며, 최근에 비특이적인 serine peptidase인 carboxypeptidase Y^{18, 33-37)}로 단계적인 펩티드합성을 하는 endopeptidase도 이용되고 있다. 또한 이들 protease를 지지체(matrix)에 고정화시켜 사용되는 고정화합성법도 이용되고 있는데, 이것은 효소로부터 펩티드

Table 1. Specificity of various protease on protein cleavage

Enzyme	Cleavage site(↓)
Serine protease	
trypsin, trypsin-like enzymes	-Arg(Lys)-Y- ↓
<i>Achromobacter</i> protease	-Lys-Y- ↓
chymotrypsin, subtilisin	-Trp(Tyr, Phe, Leu)-Y- ↓
elastases, α-lytic protease	-Ala(Ser)-Y- ↓
proline specific protease	-Pro-Y- ↓
<i>Staphylococcus</i> protease	-Asp(Glu)-Y- ↓
carboxypeptidase Y	-X-Y-
Thiol protease	
papain, <i>Streptococcus</i> protease	-Phe(Val, Leu)-X-Y- ↓
cathepsin B, clostripain	-Arg-Y- ↓
cathepsin C	H-X-Phe(Tyr, Arg)-Y-
Metallo-protease	
thermolysin	↓ -X-Leu(Phe)- ↓
<i>Myxobacter protease</i> II	-X-Lys-
Aspartic protease	
Pepsin, mold-aspartic protease	↓ -Phe(Tyr, Leu)-Trp(Phe, Tyr)-

* X, Y : amino acid residues.

합성물의 분리가 용이하고 효소의 활성이 증가되며 효소의 재사용이 가능하여 경제적인 문제를 해결해줄 수 있어 그 이용이 확대되고 있다.

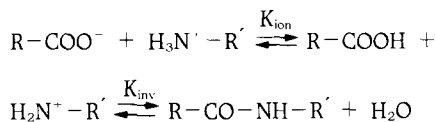
펩티드합성에 이용되는 효소는 결정체 혹은 고도로 정제된 표준품을 사용해야 하며, 특히 protease는 일차적인 특이성(Table 1)을 가지고 있으므로 각 효소의 특이성에 맞는 효소를 선택하여 펩티드를 합성해야 한다.

3. 펩티드합성을 촉매하는 효소의 작용기구

일반적으로 아미노산이나 펩티드가 효소의 존재하에서 결합하는 반응은 C-말단과 N-말단이 축합반응(condensation reaction)을 일으켜 펩티드축합물을 생성하게 된다. 이러한 축합반응을 촉매하는 효소에 대하여 근본적인 반응기구를 이해하여야 한다. 이러한 효소의 작용기구는 축합물의 수율에 영향을 미치는 인자들을 분석하는데 중요하며 또한 수율을 증가시키기 위한 생체촉매의 성질에 대한 정보를 제공해 준다. 펩티드합성은 평형조절에 의한 합성(equilibrium controlled synthesis)법과 반응속도론적인 조절에 의한 합성(kinetically controlled synthesis)법이 있다.

1) 평형조절에 의한 합성법³⁸⁾

펩티드결합의 평형조절에 의한 합성법은 단백질 가수분해효소에 의한 펩티드의 가수분해촉매반응의 역반응을 이용하는 것이다.^{13, 39-41)} 가수분해와는 달리 펩티드결합의 형성은 흡열반응이므로 엔트로피의 감소가 일어나면서 진행되기 때문에 열역학적으로 불리하다. 보호기가 도입되지 않은 아미노산끼리의 축합시 평형상수 K_{sys} 는 10^{-5} 이다. 기질이 이온화된 형태로는 반응성이 없으므로 평형조절의 접근방식에서는 아래와 같이 두개의 평형이 고려되어야 한다.



전하를 띠지 않는 기질과 생성물사이의 역평형(inversion

equilibrium, K_{inv})에 앞서 선행되어야 하는 것은 이온화평형(ionization equilibrium, K_{ion})이다. 이것을 전체 평형상수에 대입하면 다음과 같다.

$$K_{syn} = K_{ion} K_{inv} = \frac{[R-CO-NH-R']}{[R-COO^-][H_3N^+-R']^{-1}}$$

두가지의 기질과 반응액의 pH가 정해지면 K_{ion} 과 K_{inv} 는 일정하다. 따라서 역평형에 대한 펩티드농도는 선행된 이온화평형에서 형성되어진 전하를 띠지 않는 기질의 농도에 따라 달라진다. 이 농도는 다시 이들의 pK 값에 의해 결정된다. N-과 C- 보호기가 도입된 아미노산의 pK 값은 유리 아미노산의 그것과는 근본적으로 다르다. 따라서 이온화평형에서 전하를 띠지 않는 기질의 농도가 충분히 높게 되므로 역평형에서 펩티드가 많이 생성된다.

생성물의 수율을 향상시키기 위해 반응의 평형을 생성물의 방향으로 이동시킬 필요가 있다. 여기에는 생성물을 침전시키는 방법⁴²⁾, 수용액에 수용성 유기용매(water-miscible organic solvent)를 첨가하는 방법⁴³⁻⁴⁶⁾, 물에 잘 섞이지 않는 유기용매(water-immiscible organic solvent)를 첨가하여 수용액/유기용매 이상계(aqueous/organic solvent biphasic system)에서 반응을 시키는 방법⁴⁷⁻⁵⁰⁾ 등이 있고, 이들 방법에 의한 펩티드합성을 평형조절에 의한 합성이라 한다.

평형조절에 의한 합성에 사용되는 용매중에서 침전계(precipitation system)는 Bergmann가 보고한 이래 가장 많이 이용되어 온 방법이다. 이 방법은 가용성원료가 합성될 때 그 합성물은 용매에 의해 침전되므로 합성물의 농도는 원료에 비해 감소되어 평형반응을 합성방향으로 변화시키는 것이다. 그러나 이것은 원료 및 효소의 농도를 고려해야 하며 또 원료의 보호기종류에 따라 합성물의 용해도에 상당한 영향을 미친다. 최근에는 물과 섞이지 않은 수용액/유기용매의 이상계가 널리 이용되고 있다. 이 시스템에서는 초산에틸(ethyl acetate)이나 클로로포름(chloroform)과 같이 물에 난용성인 유기용매와 물(혹은 완충용액)과의 이상계에서 합성수율은 수용액계(water or buffer system) 및 가용계보다 높게 나타난다.⁵¹⁾ 예를 들어보면, des-Tyr-Leu-enkephalin 전구체(Z-GlyGlyPheLeu-OEt)의 합성을 이 상계에서 반응시킬 때에 수율을 상당히 향상시킬 수 있다.⁵²⁾

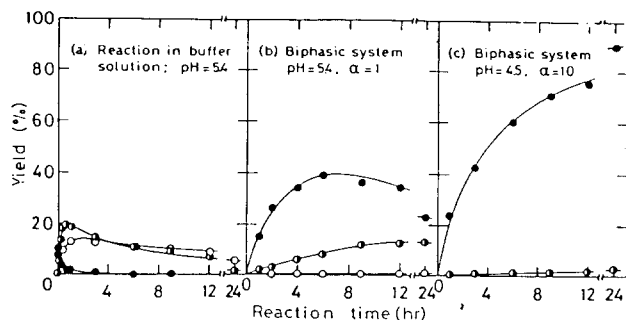


Fig. 1. Courses of synthesis of Z-GlyGlyPheLeu-OEt from Z-GlyGly and PheLeu-OEt in buffer solution and in biphasic systems at 40°C.

●, Z-GlyGlyPheLeu-OEt; ○, Z-GlyGlyPhePhePheLeu-OEt. α is the volume ratio of organic phase/aqueous phase.

Fig. 1의 (a)에서는 MES-NaOH buffer 수용액계에서 반응수율 약 10% 정도의 부적생성물을 얻을 수 있었지만 곧 감소하여 거의 0%였다. (b)에서는 이상계에서 반응을

실시하여 목적 생성물을 증가시켰고 (c)에서는 유기용매/수용액의 부피비(α)를 증가시키고 또한 pH를 감소시킴으로서 거의 90%까지 높은 수율을 얻을 수 있었다.

지금까지 이 분야의 연구에 사용된 유기용매는 물과의 상호용해성이라는 관점에서 Table 2와 같이 분류할 수 있다.

53-55)

2) 속도론적 조절에 의한 합성^{56, 57)}

아미노산 혹은 펩티드의 C-말단에 활성기질 즉, 에스테르기질을 가지고서 반응하는 것으로서 serine 및 thiol protease가 이 반응을 촉매하는 효소이다. 이들 중 serine protease를 예로 그 기구를 설명하고자 한다.

Fig. 2에 모식적으로 나타낸 바와 같이 펩티드의 가수분해반응은 아미드(펩티드)로부터 중간체인 아실화(acylation)효소의 생성을 지나 카르복실산(carboxylic acid)으로 진행하며 펩티드결합의 생성은 이 역의 경로를 취한다. Serine protease는 에스테라제(esterase)활성도 갖고 있지만 에스테르의 생성은 같은 중간체의 아실화효소를 만들어 펩티드생성과 공통의 경로로 진행된다. 반응경로에서 항상

Table 2. The important organic solvents used peptide synthesis

1) Water-miscible organic solvents

methanol, ethanol, ethylene glycol, glycerol, *N, N'*-dimethylformamide, dimethyl sulfoxide, acetone, formaldehyde, dioxane, etc.

2) Water-immiscible organic solvents

* alcohols

(*n*-, *iso*-)propyl alcohol, (*n*-, *s*-, *t*-)butyl alcohol, (*n*-, *s*-, *t*-)amyl alcohol, *n*-octanol, etc.

* esters

methyl acetate, ethyl acetate(37.8, 40°C), *n*-butyl acetate, hexyl acetate, etc.

* alkyl halides

methylene chloride(2, 30°C), chloroform, carbon tetrachloride, trichloroethane(0.4, 40°C), etc.

* ethers

diethyl ether(12, 20°C), dipropyl ether, diisopropyl ether, dibutyl ether, dipentyl ether, etc.

3) Water-insoluble organic solvents

* aliphatic hydrocarbons

n-hexane(320, 40°C), *n*-heptane(310, 30°C), isooctane(180, 30°C), etc.

* aromatic hydrocarbons

benzene(1200, 40°C), toluene(880, 30°C), etc.

* allicyclic hydrocarbons

cyclohexane(160, 30°C), etc.

* The numbers in parenthesis are their solubilities(ppm) and temperature.

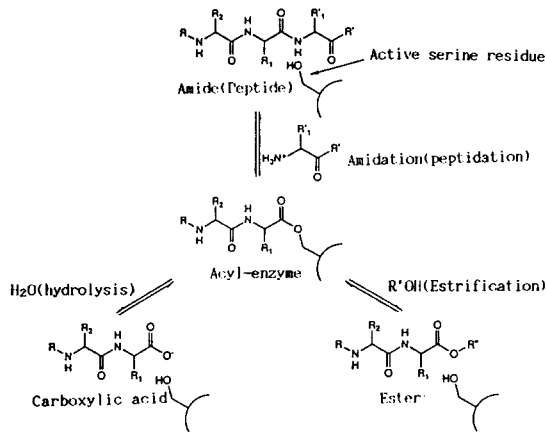
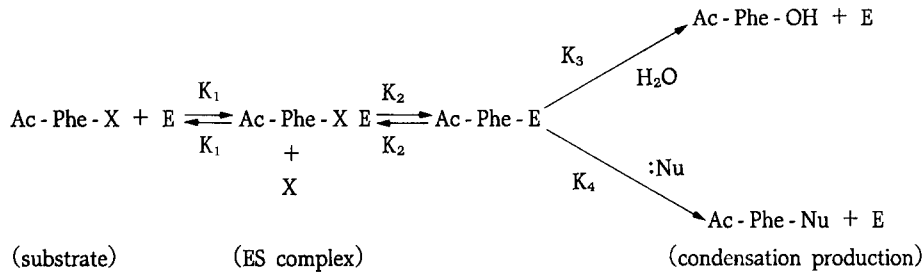


Fig. 2. Catalytic mechanism of serine-protease.

아실화효소의 생성이 최초단계이며, 이것이 무엇으로 취해질 것인가에 따라 전체의 진행방향이 결정된다.

이와 같이 기질과 효소에 의한 아실화는 물과 친핵체에 의해서 경쟁적으로 탈아실화가 이루어지며 이에 대한 식은 다음과 같다.



중간체인 아실화효소(Ac-Phe-E)는 물분자와 친핵체(Nu:)의 공격에 따라서 탈아실화가 이루어지는데 이 반응계에서 친핵체가 물분자보다 더 강력하게 핵을 공격하여 탈아실화하면 가수분해보다 먼저 Ac-Phe-Nu가 생성된다. 여기서 친핵체가 아미노산 혹은 펩티드일 경우에는 새로운 펩티드결합이 형성되며, 알코올일 경우에는 에스테르화 반응이 진행된다. 이들 반응경로의 생리조건을 에너지-도표(energy-diagram)상에 나타내면 Fig. 3과 같다.⁵⁸⁾

아미드(펩티드)와 카르복실산을 비교하면 카르복실산 쪽이 보다 안정하기 때문에 아실화효소는 아미드(펩티드)로부터 보다 빨리 생성된다. 불안정한 아실화효소는 반응계중에 높은 농도(55M)로 존재하고 있는 물과 빠르게

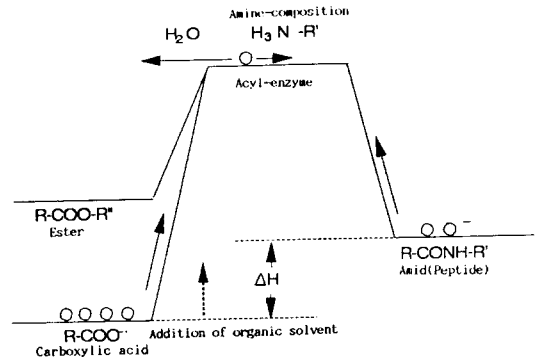


Fig. 3. Energy-diagram on hydrolysis of amide(peptide) and amidation of carboxylic acid by catalytic protease.

반응하며 카르복실산을 생성한다. 전체반응은 발열적(ΔH)으로서 아미드의 가수분해 쪽으로 진행되어질 것이다. 그러면 어떻게 하면 이 serine protease에 의한 peptide의 가수분해를 역반응인 합성으로 변화시키는 것이 가능한 것인가?

첫째로 생각되는 것은 아실화효소를 아민(아미노산)에 포착시킬 수 있으면 펩티드합성으로 유도될 것이므로 아민성분을 과잉으로 첨가하여 아민의 농도를 높여야 한다. Table 3에 나타낸 것은 아래 식의 반응에 있어서 아민성분(로이신아미드)의 농도를 변화시킬 때에 dipeptide의 합성율이 어떻게 변화되는가에 대한 Tazuki 등⁵⁹⁾에 의해 조사된 결과이다. 아민성분의 농도를 0.5M에서 2M까지 증대시키면 합성율을 0에서 약 50%까지 상승시킬 수 있다. 이것은 열역학적으로는 위의 식의 평형이 질량작용법칙에 의해 합성방향으로 변했다고 해석할 수 있다.

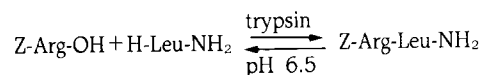
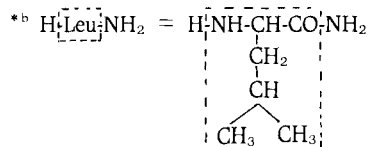
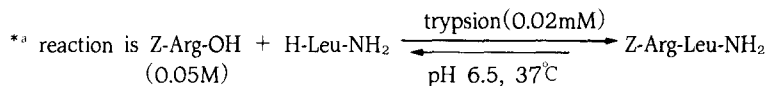


Table 3. Peptide synthesis^{*a} yields on influence of amine con. and organic solvent con. with trypsin

H-Leu-NH ₂ ^{*b} con. (M)	Yield (%)	Methyl formamide (%)	Yield (%)
0.05	0	0	11
0.2	5	10	17
0.5	11	20	34
1.0	40	30	39
2.0	49	50	46

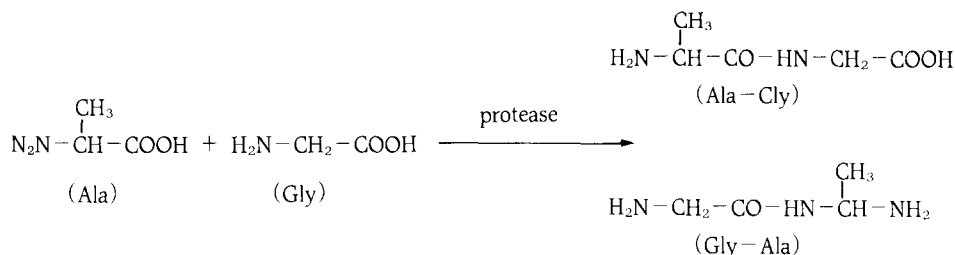


둘째로는 아실화효소와 물과의 반응속도가 떨어지는 반응계에 물과 혼합할 수 있는 유기용매를 고농도로 첨가하는 방법이다. 물의 농도가 감소하여 아민성분과의 반응, 즉 아미드화(펩티드합성)가 증가하게 된다. Table 3에서 조금 전의 예와 같은 trypsin에 의한 dipeptide 합성에 있어서 디메틸포름아미드(dimethylformamide)의 효과를 나타내었다. 50%의 디메틸포름아미드를 사용하면 0.5M의 로이신아미드를 아민성분으로서 합성율을 11%에서 50% 정도 까지 개선할 수 있다. 여러 종류의 유기용매를 비교하면 같은 농도에서도 용매의 종류에 따라 다른 효과를 얻을 수 있고 유기용매의 첨가가 물의 농도를 떨어뜨릴만큼 작용하지 않는 것은 확실하다. Homandberg 등⁴⁴⁾이 유기용매를 첨가하여 카복실산의 pKa가 상승됨을 밝혔다. 이것은 카복실기가 해리되기 어렵게 된다는 것을 의미하고, 유기용매 첨가의 효과는 에너지단위를 떨어뜨려 아미드화(펩티드 합성)와의 에너지차 ΔH 를 적게 한다고 생각된다(Fig. 3). Fig. 3의 도표(diagram)에서 보다 높은 에너지준위에 있는 에스테르에서 출발하면 카복실산에서 보다도 상당히 빠른 반응속도로 아미드화(펩티드 합성)효소가 생성하여 아미드화(펩티드 합성) 또는 가수분해로 진행되는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이 경우 아미드화와 가수분해의

비율을 결정하는 것은 아실화효소와 아민성분과의 반응속도(V_a) 및 아실화효소와 물과의 반응속도(V_h)의 비(V_a/V_h)만으로 되고 이것을 반응속도론적인 조절에 의한 합성이야 한다. 펩티드합성에서 반응을 진행시키기 위한 구체적인 방법은 카복실산에서 출발할 경우와 같이 고농도의 아민성분 및 유기용매의 첨가를 생각할 수 있다. 이러한 반응속도론적 조절에 의한 합성은 반응시간이 수분 정도로 아주 짧고 생성물이 다시 가수분해하는 가역반응이 이루어지지 않는다는 장점이 있으나 thermolysin이나 carboxypeptidase와 같은 metallo-protease는 촉매하지 않는다는 제약이 따른다.

4. 펩티드의 합성설계

펩티드합성을 실시하기 위해서는 먼저 아미노산 혹은 펩티드의 유도체를 합성하여야 한다. 아미노산은 분자내에서 아미노기와 카복실기가 공존하고 있으므로 펩티드를 합성할 때는 이들 기(group)에 보호기의 도입이 필요하다. 예를 들어서, alanine과 glycine으로 dipeptide를 합성시킬 때에 보호기의 도입이 없을 경우에는 다음과 같이 축합물이 생성된다.



이와 같이 아미노산의 배열이 달라지므로 dipeptide가 갖는 활성도 달라지게 된다. Amino기의 보호를 위해서는 주로 benzylchloroformate($\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{OCOCl}$), di-tert-butyl carbonate ($(\text{CH}_3)_3\text{CCOOCOC}(\text{CH}_3)_3$), acetic acid(CH_3COOH) 등이 이용되고 있으며 카복실기에는 ammonia (NH_3), ethyl alcohol($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) 그리고 tert-butyl alcohol 등이 사용되고 있다. 보호기와 용해도와의 관계는 Table 4에서와 같이 acetic acid와 ammonia를 도입시킨 유도체의 용해도가 매우 높다.³⁸⁾

이와 같이 아미노산유도체를 합성시킨 후 protease에 의한 펩티드결합을 합성하게 되는데 이것은 Kimura 등⁶⁰⁾에 의해 합성된 Leu-enkephalin을 예를 들어 보면, Fig. 4와 같이 Z-Gly과 Gly-OBu'를 papain으로 합성하여 Z-Gly-Gly-OBu'를 생성시킨 후 H_2/Pd 를 촉매제로 첨가하여 Gly-Gly-OBu'를 만든다. 여기에 다시 Z-Tyr과 Gly-Gly-OBu'를 α -chymotrypsin으로 반응시켜 Z-Tyr-Gly-Gly-OBu'를 생성시킨 다음 OBu'를 제거하기 위하여 개비산(HCOOH)을 첨가시킴으로써 Z-Tyr-Gly-Gly를 제조할 수 있다. 한편 Z-Phe과 Leu-OEt는 thermolysin의 존재하에서 Z-Phe-Leu-OEt를 생성시키고 여기에 $\text{HBr}/\text{CH}_3\text{COOH}$ 를 첨가하여 Phe-Leu-OEt로 제조한다. 끝으로 Z-Tyr-Gly-Gly과 Phe-Leu-OEt를 thermolysin으로 합성하면 Leu-enkephalin유도체인 Z-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-OEt이 생성하게 된다. 이때 반응물과 촉합물에 대한 분석은 고속액체크로마토그래피(HPLC)로 분

석이 가능하며, 이동상용매로서는 인산으로 pH를 2.5로 조절한 acetonitrile/water(60/40, V/V)를 사용하여 UV검출기로 254nm에서 측정하면 벤젠환을 가진 N-benzylryl carbonyl, tyrosine과 phenylalanine 잔기 등의 함량을 측정

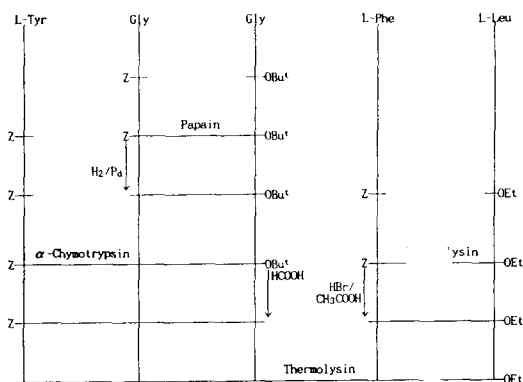


Fig. 4. Outline of the synthesis of the precursor of Leu-enkephalin. Z is protecting group for the amino terminal. OBu' and OEt are protecting groups for carboxyl terminal. The peptide bonds between L-Tyr and Gly, and Gly and Gly were synthesized with α -chymotrypsin and papain, respectively. The bonds between L-Phe and L-LeuOEt, and Gly and L-Phe were formed by thermolysin. Arrows show the removal of protecting groups.

Table 4. Solubility of protected condensation products

Condensation products	Solubility(μM) ^{*a)}
Ac-Phe-Leu-NH ₂	10 ⁴
Z-Phe-Leu-NH ₂	27
Z-Phe-Leu-OEt	17
Z-Phe-Leu-OBu'	1.7
Z-Phe-Leu-NHC ₆ H ₅	0.8
Z-Phe-Leu-ODPM	0.03

*a) : water system containing 10% dimethylformamide(pH 7.0).

할 수 있다.

한편, 펩티드합성에 대한 수율을 향상시킬 목적으로 수용액/유기용매 이상계를 이용하여 장기간 연속반응이 가능할 수도 있다.⁶¹⁾ Nakanishi 등^{62, 63)}은 초산에틸을 사용한 고정화 thermolysin에서 aspartame 전구체 (Z-Asp-Phe-OMe)의 연속합성을 시도하였다. 여러가지 분계점을 해결하여 95%수율로 적어도 500시간 연속운전은 가능하였다. 반응후의 고정화 thermolysin의 잔존활성은 75~100%였다. Kimura 등²⁹⁾도 초산에틸을 사용하여 축합반응과 에스테르치환반응을 조합시켜 연속적으로 tripeptide 전구체를 합성한 반응기의 이용을 검토하였다. 220시간에 걸쳐서 80% 이상의 수율로 Z-Gly Phe Leu-NH₂의 합성이 가능하게 되었고 잔존활성도 고정화 thermolysin이 94%, 고정화 chymotrypsin이 100%였다.

효소법은 화학법에 비해 기질이 한정되어 있는 단점을 갖고 있다. 잘 조합시키면 적은 효소로 다종의 펩티드합성이 가능하게 된다. 여기서 Kimura 등⁶⁰⁾은 3종의 범용되고 있는 protease만을 사용하여 영양학적인 견지에서 필수아미노산으로 구성된 펩티드를 합성하였다. Table 5는 유리효소에 의한 이상계반응과 고정화효소에 의한 불포화 초산에틸 중 반응에서의 각 펩티드의 수율을 나타내고 있다. 어떠한 펩티드도 비교적 높은 수율로 얻을 수가 있어 이들 계가 소량다품종의 생산 system으로 될 가능성을 보였다. 이와 같이 수용액/유기용매의 이상계를 이용하여 효율이 좋은 반응기의 설계도 가능할 수 있다.

5. 유용 생리활성펩티드의 합성

화학법의 경우와 마찬가지로 단계적신장 또는 단편축합(fragment condensation)이 이용되고 있다. 전자의 경우 이미 기술한 carboxypeptidase Y를 사용한다. 그러나 이 효소의 이용도 대개 5~6 아미노산잔기의 펩티드사슬까지 합성할 수 있으며 그 이상의 크기로 되면 단편축합을 하는 연구가 대부분이다.

짧은 사슬의 펩티드합성은 주로 침전계에서 행하여도 문제는 별로 없다. 합성능이 강력하여 평형론적 및 속도론적인 조절반응을 적용할 수 있고 특이성이 넓은 papain을 많이 이용한다.

한편 단편축합은 2차분해의 염려가 있기 때문에 최종 합성단계에서 그런 점을 충분히 고려하지 않으면 안된다. 그런 점에서 특이성이 좁은 효소(예를 들면 trypsin)가 추천된다. 또 속도론적 조절반응은 합성속도가 2차분해의 그것보다도 훨씬 빠르기 때문에 유리하다. 지금까지 효소적으로 합성된 유용 생리활성펩티드에 대하여 소개한다.

Leu-enkephalin(Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu)의 동력학적 조절 합성은 serine-exoprotease인 carboxypeptidase Y를 사용하여 펩티드의 C-말단으로부터 단계적인 부가방식에 의해 이루어진다.³³⁾ 친핵체로서 보호기가 도입되지 않은 유리 아미노산을 사용하면 수율이 낮고 아미노산에스테르를 사용하면 제어하기 곤란한 부가반응이 일어나므로 아미노산 아미드가 많이 사용되고 있다.

Table 5. Peptide synthesis yields on free and immobilized enzymes

Products	Yield (%)		Enzyme
	Free enzyme	Immobilized enzyme	
(1) Z-Lys-(Z)-Ile-OMe	100	100	thermolysin
(2) Z-The-Trp-OEt	73	43	papain
(3) Z-Thr-Trp-Val-NH ₂	100	100	α -chymotrypsin
(4) Z-Leu-Phe-OMe	100	100	thermolysin
(5) Z-Met-Leu-Phe-OMe	100	100	thermolysin

Abbreviation

Ac : acetyl
 Z : benzyloxycarbonyl
 OEt : ethylester
 OBU' : t-butylester
 OMe : methylester
 ODPM : diphenylmethylester

Dynorphin(Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg-Ile)은 Leu-enkephalin의 C-말단이 연장된 것으로 papain, chymotrypsin과 trypsin을 촉매로하여 평형 및 동력학적 조절합성법을 조합하여 합성한다.⁶⁴⁾ 이 목적을 위해 4개 잔기의 펩티드를 각각 효소법으로 합성하고 두개의 tetrapeptide 조각을 조합시켜 제조한다. Boc-Tyr(Bzy)-Gly-Gly-Phe-OEt와 Leu-Arg-Arg-Ile-NH-NH-C₆H₅의 두 펩티드를 chymotrypsin으로 합성시키면 부분적으로 blocking된 octapeptide가 생성되며 후에 보호기를 제거하면 생리활성이 있는 dynorphin을 얻을 수 있다. 카복실기에 대한 보호기는 일반적으로 phenylhydrazide인데 이것은 papain 촉매하에 Boc-아미노산으로 도입될 수 있으며, 산화시켜 제거할 수도 있고 에스테르로의 전환도 가능하다.⁶⁵⁾

Eledoisin(hexapeptide)은 사염화탄소/완충용액으로 이루어진 이상계에서 papain과 chymotrypsin을 사용하여 합성할 수 있다.⁶⁶⁾ 이상계는 평형에 영향을 미치기 위해서가 아니라 완충용액에 용해된 효소가 높은 활성을 나타내도록 또한 유기용매에 기질의 분해도가 높도록 하기 위해서 사용된다. 전체반응물의 부피는 수용성의 보조용매를 사용할 때보다 적으므로 수율을 높일 수 있다. C-말단 dipeptide는

thermolysin 촉매에 의해 얻을 수 있는데 동력학적 조절 촉합법의 평형을 생성물인 Z-Leu-Met-NH₂가 유기용매 상으로 추출되므로 생성물합성 쪽으로 이동된다.⁶⁷⁾

8-수면 유도펩티드의 합성⁶⁸⁾은 대부분의 펩티드결합의 결합반응에 papain을 사용하는 것이 특징이다. Papain의 넓은 특이성과 평형론적 또는 속도론적 조절반응을 교묘하게 이용한 반응의 예이다. 단, Trp-Ala의 결합은 α-chymotrypsin을 사용한다.

사람의 인슐린은 돼지의 인슐린의 B-chain 30위치의 alanine을 threonine으로 치환시킴으로써 조제할 수 있다. 이 같은 변환은 최초에는 화학법에 의해 시도되었지만 Inouye 등²³⁾은 효소적합성에 성공하였다. 이 방법은 돼지의 인슐린에 trypsin을 작용시켜 des-octapeptide(B23-B30)-insulin(DOI)를 조제하고 이것과 사람형 octapeptide와 고농도의 가용계에서 trypsin을 사용하여 평형론적 조절반응으로 합성한 후 탈보호처리하여 사람의 것과 같은 인슐린을 얻었다. 이와 같은 반합성은 이미 화학적으로 시도된 바 있지만 그것에 비해 수율을 현저하게 상승시켰을 뿐만 아니라(10~50%), 부산물의 생성이 적어 정제가 매우 용이하다(Fig. 5).

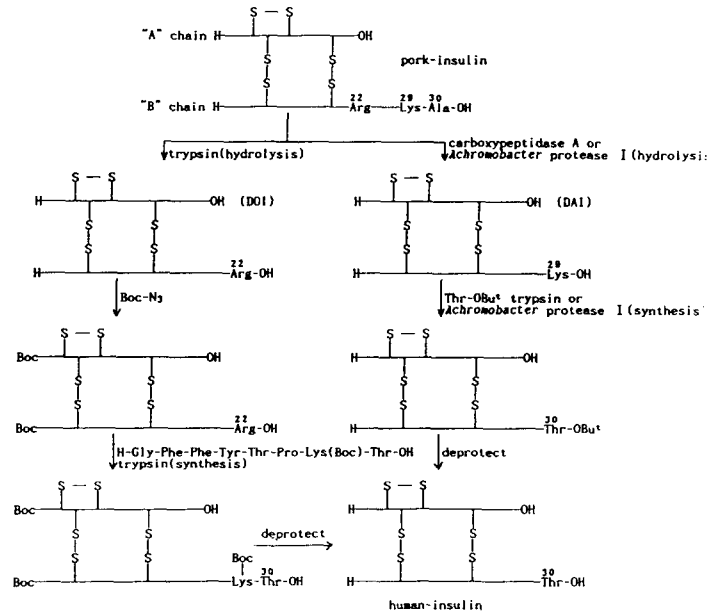


Fig. 5. Processing on converting pork-insulin to human insulin.

한편, des-alanine-(B3O)-insulin(DAI)을 돼지의 인슐린에 carboxypeptidase A 또는 *Achromobacter protease*를 작용시켜 거의 정량적으로 생성시킬 수 있다. 즉 DAI와 Thr-OBu'를 trypsin⁶⁹⁾ 또는 *Achromobacter protease*¹⁴⁾를 사용하여 평형론적 조절반응을 실시하면 거의 정량적으로 합성반응이 진행된다(Fig. 5).

Markussen은 돼지의 인슐린에 trypsin을 작용시켜 한번에 B3O 위치의 alanine을 threonine으로 교환하는 transpeptidation법⁷⁰⁾의 개발에 성공하여 덴마크의 Novo사는 현재 이 방법을 이용하여 공업적으로 인슐린을 제조하고 있다.

6. 결 론

Protease를 사용한 펩티드합성연구의 재연분이 일어난 것은 겨우 10년정도에 불과하다. 우연한 발견으로 시작된 연구였지만 지금까지 축적된 protease의 구조연구, 작용기작 또는 열역학적연구가 그 이론적인 뒷받침이 되어 합성반응을 평형론적 또는 속도론적인 제어반응으로서 이해되기에 이르렀다. 또 종래의 합성반응은 침전계 뿐이었지만 그것이 이론적인 뒷받침이 되어 이상계 또는 가용계에서의 합성반응도 가능하게 되었다. 때문에 효소법의 적용으로 펩티드결합의 종류도 대폭으로 확대되었고, 새로운 특이성을 나타내는 효소의 발견과 서로 잘 어울려서 극히 특수한 예외를 제외하고 대개의 펩티드결합은 효소법에 의해 촉매 가능하게 되었다.

그렇지만 30~50 아미노산잔기 크기의 펩티드는 화학법으로, 그것보다 큰 단백질의 합성은 유전자공학의 이용이 주류로 되어 있다. 여기서 효소법은 어느 방면으로 이용되는 것이 유리한 책략일까? 먼저 전자의 펩티드합성의 경우, 우선 화학법으로 대신한다고 생각하면 그것을 달성하기 위해서는 화학법의 우수한 장점을 화학자에게 충분히 이해시키고 또한 그 사용을 간편하게 할 필요가 있다. 이 때문에 앞으로 protease를 사용하기 쉬운 형(예를 들면 고정화효소의 조제)으로 하여 반응의 종류와 효소를 잘 선정하여 이를 조합한 새로운 공업적 system을 고안해야 할 것이다. 효소법에 의한 단백질의 반합성은 유전자공학의 발전을 보기까지는 거의 독무대였다고 해도 과언이 아니다. 예를 들면 유전자조작법에서 선전되고 있는 부위특이성 변이단백질을 본장에서 기술한 바와 같이 그것보다 이미

이전에 효소법으로 고안되고 있었다. 물론 효소법의 경우에는 단백질의 종류 또는 아미노산의 부위로 한정되어 있고, 유전자조작법을 능가하지는 못하지만 특수한 경우, 예를 들면 본장에서 기술한 인슐린의 변환에는 유용하다.

상업적 펩티드합성은 그 목표를 40~100아미노산잔기의 작은 단백질합성으로까지 진행되고 있다. 이 크기의 펩티드/작은 단백질은 DNA조작기술에 의해 효율 좋게 발현시키기에는 너무 짧고 반대로 펩티드합성기에서 순도 좋게 만들기에는 너무 길다. 효소적인 펩티드합성이 이들 방법을 보충하여 작은 단백질합성의 수단으로서 확립되는 것이 바람직하다.

수식 protease를 효소적 펩티드합성에 이용하려는 움직임은 앞으로 더욱 가속될 것이다. 특히 내유기용매성이 높은 protease는 고농도의 유기용매 중에서는 가수분해효소로 작용하지 않고 아미드(펩티드)결합 합성효소로서 작용할 것으로 기대되는데 이것이 실용화되면 반합성과 효소적 펩티드합성을 크게 발전시킬 수 있을 것이다.

어떤 방법이든 완벽을 기대할 수는 없다. 어느 것이나 장점과 단점이 있기 때문이다. 펩티드합성은 화학법 또는 유전자조작법과 더불어 효소법의 특징을 살리면 더욱 더 위력을 발휘하여 보다 간편한 방법으로 우수한 생리활성 펩티드를 합성할 수 있을 것으로 기대된다.

참고문헌

1. Horowitz, J. and Haurowitz, F., *Biochimica. Et. Biophysica. Acta.*, **33**, 231(1959).
2. Fujimaki, M., Arai, S., and Yamashita, M., *Protein, Nucleic Acid and Enzyme*, **20**, 927(1975).
3. Aso, K., Yamashita, M., Arai, S., and Fujimaki, M., *Arg. Biol. Chem.*, **38**, 679(1974).
4. Noar, S. R. and Shipe, W. F., *J. Food. Sci.*, **49**, 1316 (1984).
5. 김세권, 이응호, 한국수산학회지, **20**, 282(1978).
6. 김세권, 광동채, 조덕재, 이응호, 한국영양식량학회지, **17**, 233(1988).
7. 김세권, 이응호, 한국농화학회지, **30**, 234(1987).
8. Bondanszky, M., In *Peptide Chemistry*, p. 68, Springer-Verlag Berlin Heidelberg(1988).

9. Isowa, Y., Ohmori, M., Ichikawa, J., Mori, K., Nonaka, Y., Kihara, K., Oyama, K. Satoh, H., and Nishimura, S., *Tetrahedron Lett.*, **20**, 2611(1979).
10. Oyama, K., Kihara, K., and Nonaka, Y., *J. Chem. Soc., Perkin Trans.*, **2**, 356(1981).
11. Barany, G. and Merrifield, R. B., In *The Peptides*, Vol. 2, Gross, E. and Meienhofer, J.(Eds.), p. 1, Academic Press, New York(1980).
12. Kasche, V., Michaelis, G., and Galunsky, B., *Biotech. Lett.*, **13**, 75(1991).
13. Fruton, J. S., *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.*, **53**, 239(1982).
14. Morihara, K., Oka, T., Tsuzukt, H., Tochino, Y., and Kanaya, T., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **92**, 396 (1980).
15. Klibanov, A. M., Sanokhin, G. P., Martinek, K., and Berezin, I. V., *Biotechnol. Bioeng.*, **19**, 1351(1977).
16. Ferjancic, A., Puigserver, A., and Gaertner, H., *Biotechnology Letters*, **10**, 101(1988).
17. Dordick, J. S., *Enzyme Microb. Technol.*, **11**, 194(1989).
18. Cramer, S. M. and Horvath, C., *Biotech. Bioeng.* **33**, 344(1989).
19. Horvath, C., *Biochim. Biophys. Acta.*, **358**, 164(1974).
20. Tanizawa, K. and Bender, M. L., *J. Biol. Chem.*, **249**, 2130(1974).
21. Weetall, H. H. and Vann, W. P., *Biotech. Bioeng.* **18**, 105(1976).
22. Vann, W. P. and Weetall, H. H., *J. Solid-Phase Biochem.*, **1**, 297(1976).
23. Inouye, K., Watanabe, K., Morihara, K., Tochino, Y., Emura, T., and Sakakibara, S., *J. Am. Chem. Soc.*, **101**, 751(1979).
24. Kise, H. and Hayakawa, A., *Enzyme Microb. Technol.*, **13**, 584(1991).
25. Blanco, R. M., Alvaro, G., and Guisan, J. M., *Enzyme Microb. Technol.*, **13**, 573(1991).
26. Clapes, P., Aglercreutz, P., and Mattiasson, B., *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **12**, 376(1990).
27. Schellenberger, V., Jakabke, H. D., Zapevalova, N. P. and Mitin, Y. Y., *Biotech. Bioeng.* **38**, 319(1991).
28. Gaertner, H. and Puigserver, A., *Eur. J. Biochem.*, **181**, 207(1989).
29. Kimura, Y., Muraya, K., Araki, Y., Matsuoka, H., Nakanishi, K. and Matsuno, R., *Argic. Biol. Chem.*, **54**, 3331(1990).
30. Chen, S. T., Li, K. F., Wang, K. J., *J. Chim. Chem. Soc.*, **35**, 207(1988).
31. Barbas, C. F. III and Wong, C. H., *J. Chim. Soc. Chem. Commun.*, 553(1987).
32. Tai, D. F., Fu, S. L., Chuang, S. F., and Tsai, H., *Biotech. Lett.*, **11**, 173(1989).
33. Widmer, F., Breddam, K., and Johansen, J. T., *Carlsberg Res. Commun.*, **46**, 97(1981).
34. Widmer, F., Breddam, K., and Johansen, J. T., *Carlsberg Res. Commun.*, **45**, 453(1983).
35. Oyama, K., Nishihara, S., Nonaka, Y., Kihara, K., and Mashimoto, T., *J. Org. Chem.*, **46**, 5241(1981).
36. Yamane, T., Ichiryu, T., Nagata, M., Ueno, A., and Shimizu, S., *Biotech., Bioeng.* **36**, 1063(1990).
37. Kuhl, P., Konnecke, A., Doring, G., Daumer, H., and Jakubke, H. D., *Tetrahedron Lett.*, **21**, 893(1980).
38. Morihara, K., *Trends in Biotech.*, **5**, 164(1987).
39. Chaiken, I. M., Komoriya, A., Ohno, M., and Widmer, F., *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **7**, 385(1982).
40. Petkov, P. D., *Theor. J. Biol.*, **98**, 419(1982).
41. Petkov, D. D. and Stoineva, IV., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **118**(1), 317(1984).
42. Oka, T. and Morihara, K., *J. Biochem.*, **84**, 1277 (1973).
43. Fastrez, J. and Fersht, A. R., *Biochemistry*, **12**, 2025 (1973).
44. Homandberg, G. A., Matlis, J. A., and Laskowski, M., *Biochemistry*, **17**, 5220(1978).
45. Mitin, Yu. V., Zapevalova, N. P., and Gorbunova, E. Yu., *Int. J. Peptide Protein Res.*, **23**, 528(1984).
46. West, J. B. and Wong, G. H., *J. Org. Chem.*, **51**, 2728 (1986).

47. Martinek, K. and Semenov, A. N., *J. Appl. Biochem.*, **3**, 93(1981).
48. Klivanov, A. M., Samokhin, G. P., Martinek, K., and Berezim, I. V., *Biotechnol. Bioeng.*, **19**, 1351(1977).
49. Antonini, E., Carrea, B., and Cremonesi, P., *Enzyme Microb. Technol.*, **3**, 291(1981).
50. Köhler, K., Ljungquist, C., Kondo, A., and Veide & Nilsson, B., *BIO/TECHNOLOGY*, **9**, 642(1991).
51. Zaks, A. and Klivanov, A. M., *J. Biol. Chem.*, **263**, 8017(1987).
52. Nakanishi, K., Kihara, Y., and Matsuno, R., *BIO/TECHNOLOGY*, **4**, 452(1986).
53. Lilly, M. D., *J. Chem. Technol. Biotech.*, **32**, 162(1982).
54. Laane, C., Boeren, S., Vos, K., and Veeger, C., *Biotech. Bioeng.*, **30**, 81(1987).
55. 高橋積二, *バイオインダストリー*, **7**, 470(1990).
56. Nakanishi, K. and Matsuno, R., *Eur. J. Biochem.*, **161**, 533(1986).
57. Nakanishi, K., Kimura, Y., and Matsuno, R., *Eur. J. Biochem.*, **161**, 541(1986).
58. 小久保利雄, *蛋白質 核酸 酵素*, **37(3)**, 419(1992).
59. Tsuzuki, M. and Morihara, K., *J. Biochem.*, **88**, 669 (1980).
60. Kimura, Y., Nakanishi, K., and Matsuno, R., *Enzyme Microb. Technol.*, **12**, 272(1990).
61. Zaks, A. and Klivanov, A. M., *Science*, **224**, 1249 (1984).
62. Nakanishi, K., Kamikabo, T., and Matsuno, R., *BIO/TECHNOLOGY*, **3**, 459(1985).
63. Nakanishi, K., Takeachi, T., and Matsuno, R., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **32**, 633(1990).
64. Kullmann, W., *J. Org. Chem.*, **47**, 4(1982).
65. Milne, H. B. and Kilday, W., *J. Org. Chem.*, **30**, 64 (1965).
66. Kuhl, P., Döring, G., Neubert, K., and Jakubke, H. D., *Monatsh. Chem.*, **115**, 423(1981).
67. Jonczyk, A. and Gattner, H. G., *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **362**, 1591(1981).
68. Sakina, K., Veno, Y., Morihara, K., In *Peptide Chemistry*, Miyazawa, J.(Eds.), p. 305, Protein Research Foundation, Osaka(1987).
69. Schmitt, E. and Gattner, H. G., *Physiol. Chem.*, **359**, 799(1978).
70. Markussen, J., UK Patent Application GB 2069502A.