

포르피린 화합물을 이용한 콜레스테롤에스테르 가수분해효소 억제반응

李奉護* · 李銀烈 · 劉鐘完¹ · 俞炳洙¹

대전산업대학교 공업화학과

¹원광대학교 자연과학대학 화학과

(1998. 2. 11 접수)

Inhibition of Cholesterolesterase by Porphyrin Complexes

Bong Ho Lee*, Chang Yeol Lee, Jongwan Yu¹, and Byung Soo Yu¹

Department of Industrial Chemistry, Taejon National University of Technology, Taejon 300-717, Korea

¹Department of Chemistry, Wonkwang University, Iksan, Chonbuk 570-749, Korea

(Received February 11, 1998)

요 약. 혈중 고 콜레스테롤은 여러 가지 성인병의 원인이 되며 이에 대한 대책이 시급한 실정이다. 세계적으로 혈중 콜레스테롤 농도를 낮추기 위한 여러 가지 방법이 시도되고 있으나 획기적인 약제는 개발되지 않고 있다. 따라서 본 연구진은 콜레스테롤 생합성과 관계없는 콜레스테롤에스테라제(CEase) 억제제를 이용한 약제 개발을 목표로 합성 포르피린 화합물을 이용한 CEase 억제 활성을 검색하였다. 몇 가지 합성 페닐기치환포피린 화합물은 억제활성을 나타내었으며 이들의 억제상수는 μM 범위에 있었으며, 페닐고리의 치환기는 억제활성에 큰 변화를 나타내지는 않는 것으로 나타났다.

ABSTRACT. The high cholesterol level in the blood stream is the main cause for cardiovascular diseases. Despite considerable worldwide effort to reduce the blood cholesterol level, we still need a remarkable drug. For this reason, the inhibition of cholesterolesterase by synthetic porphyrin complexes was investigated. Some of the phenyl substituted porphyrins inhibited the enzyme and the inhibition constant was in the range of μM . The substituents on the phenyl group of tetraphenylporphyrin did not affect much on the inhibition constant.

서 론

혈관내 높은 콜레스테롤 농도에 의한 심장병은 우리나라를 비롯한 선진국에서 사망요인 가운데 큰 비중을 차지하여 건강에 큰 위협이 되고 있으며, 체내 콜레스테롤 농도를 낮추려는 여러 가지 연구가 진행되고 있다. 그 중에서 콜레스테롤 생합성중 속도조절 단계에 관여하는 HMGCoA 환원효소 억제제 연구가 가장 활발하고, 이를 이용한 lovastatin같은 약이 개발되어 있는데 이 방법은 콜레스테롤 생합성의 중간 단계를 억제하므로, 다른 스테로이드 생합성을 방해하게 되어 부작용을 나타내게 된다.¹⁻³ 이에따라 최근 콜레스테롤 생합성의 나중 단계에 관여하는 스칼렌 생성효소를 억제해 콜레스테롤 농도를 낮추려

는 연구가 활발하며,^{4,5} 콜레스테롤 전달 단백질의 활성을 억제해 혈중 콜레스테롤 농도를 줄이려는 방법도 연구중이다.^{6,7} 이 외에도 다른 방법등이 있으나 HMGCoA 환원효소 억제제외에 다른 방법으로 상용화된 것은 없는 실정이다.

체장 콜레스테롤에스테르 가수분해효소(cholesterolesterase, EC 3.1.1.13, 이하CEase)는 십이지장으로 분비되어 아실글리세롤, 콜레스테릴 에스테르, 그리고 인지질을 가수분해한다.⁸⁻¹⁰ 장에서 콜레스테롤에스테르 가수분해효소의 활성은 음식물중의 콜레스테롤을 혈액으로 흡수하는데 필요하다.^{11,12} 최근 연구에 의하면 이자액에서 이 효소를 제거하면 실험용 쥐에서 혈류로 흡수되는 콜레스테롤 양을 80%나 줄

일 수 있다고 알려지고있다.¹² 혈중 콜레스테롤 농도와 심장병 사이에 직접적인 연관관계가 있기 때문에 콜레스테롤 농도를 낮추는 물질은 심장병의 예방과 치료에 사용될 수 있다. CEase는 세린 가수분해효소의 일종으로서 활성자리에 세린 잔기를 가지고 있으며, 활성부위의 세린 히드록시기에 기질인 콜레스테롤에스테르의 카르보닐기를 공격해 아실 효소를 만들고, 이 아실 효소는 물분자에 의해 다시 가수분해되어 자유로운 효소를 만들게 된다.¹³ Quinn등은 세린 가수분해효소 억제제인 카르바산 에스테르 화합물을 이용해 비가역적인 CEase 억제반응을 연구하였다.¹⁴

CEase는 활성자리에 콜레스테롤 결합 부위를 가지고 있어 소수성 상호작용을 잘 하리라 생각된다. 실제로 Lin등¹⁵은 이나프틸부틸 카르바산 에스테르의 여러 가지 입체이성질체를 사용해 CEase를 비가역적으로 억제하는 반응을 연구하였다. 본 저자들은 이미 이러한 포르피린 화합물을 이용해 세린 가수분해효소의 일종인 아세틸콜린 가수분해효소(AChE) 억제반응과 쥐를 이용한 *in vivo* 연구를 통해 잠재적 약제로 개발할 수 있는 가능성을 발표한 바 있으며,¹⁶ 본 연구도 체내 콜레스테롤 농도를 낮추기 위한 기초 연구로서 소수성 포르피린 화합물을 이용해 CEase의 가역적 억제반응을 연구하였다.

실험

돼지이자 콜레스테롤에스테르 가수분해효소(EC 3.1.1.13)는 Sigma 시약회사에서 구입하여 사용하였으며, 효소반응의 기질로는 역시 Sigma사에서 구입한 *p*-니트로페닐 부티르산 에스테르(PNPB)를 사용하였다. 완충용액은 0.1 M, pH 7.3, 0.1 N 염화나트륨이 포함된 인산나트륨을 사용하였다. 그리고 포르피린 화합물들이 완충용액에 대한 용해도가 높지 않기 때문에 에탄올을 보조용매(2%, v/v)로 사용하였다. 반응은 기질을 포함한 다른 성분이 가해진 1 mL 짜리 석영 셀에 효소용액을 넣어서 시작하였다. 모든 반응은 적어도 두 번 이상 측정하였다. 반응의 경로는 Hewlett-Packard사의 HP 8452A 모델 자외선-가시광선 분광광도계를 사용하여 400 nm에서 *p*-니트로페놀이 생성되는 속도를 추적하였다. 반응온도는 수조를 사용하여 25.0±0.1°C로 조절하였다. 반응은 초기

속도(initial rate)를 측정하거나 적분형 Michaelis-Menten 반응속도론¹⁷으로 반응속도론적 파라미터인 K_m 과 V_{max} 값을 흡광도 단위로 구하였다. 효소억제제로 사용한 포르피린 화합물들은 문헌상의 방법^{18,19}에 따라 합성하였다.

결과 및 고찰

몇 가지 포르피린 화합물에 의한 CEase 억제반응에 있어서 측정된 속도론적 상수와 억제상수를 Table 1과 Table 2에 나타냈다. CEase 억제제로 사용한 화합물은 기본적으로 테트라페닐포르피린(TPP) 기본구조에서 페닐기의 여러위치에 플루오르가 치환되어 있는 구조이다(Fig. 1). 현재까지 TPP 중심에 금속(Fe, Zn)이 배워진 것과 배워지지 않은 것등 여러 가지 화합물을 합성하였으며, 합성한 몇 가지 화합물은 대부분 CEase를 억제하였고 이들중 특히 금속이 배워지지 않은 치환된 TPP가 활성이 비교적 높은 것으로 나타나고 있다. 금속이 배워진 화합물들은 용해도 범위내(약 100 μ M)에서 억제상수를 구할 수 있을 만큼 Michaelis상수와 최대속도에 영향을 주지 못하였다. TPP의 페닐 고리에 플루오르가 치환된 포르피린은 플루오르가 치환된 위치에 큰 상관없

Table 1. Kinetic Parameters for the Control and Inhibition Reactions by tetra-2,5-difluorophenylporphyrin

[I] (μ M)	K_m (A)	V_{max} ($A^{-1}s^{-1}$)	K/V
0	0.761	2.14×10^{-2}	35.52
5	0.780	2.03×10^{-2}	38.56
10	0.944	1.95×10^{-2}	48.51
20	2.154	2.69×10^{-2}	80.12

Table 2. Kinetic and Inhibition Constants for CEase Reactions

Compound	K_i (μ M) ^a	K_m ^b	K_m/K_i
PNPB		0.14±0.01	
tetra-2,6-difluoroTPP	8.00±1.03		17.5
tetra-2,5-difluoroTPP	14.6±1.50		10.4
tetra-3,4-difluoroTPP	NA		13.4
tetra-3-fluoroTPP	18.8±2.87		1.56
TMpyP (F16TPP)	90.1±9.20		

^a K_i values were determined from K/V vs. [I] replot.

^b K_m value was obtained from reference 17. NA: not available

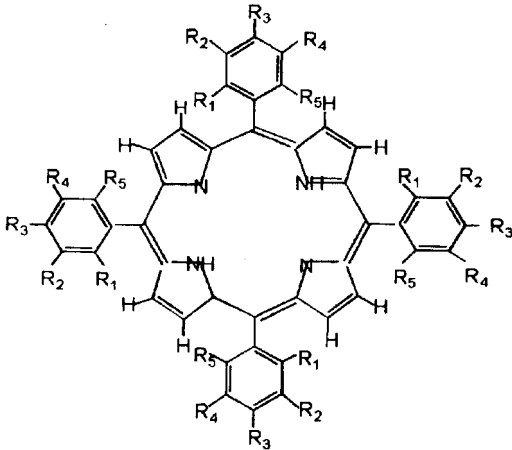


Fig. 1. Structures of Porphyrin Inhibitors. R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , $R^5=H$:tetraphenylporphyrin (TPP).

이 효소억제 활성을 나타냈다.

테트라-3-플루오르페닐포르피린의 경우 K_m 과 V_{max} 를 변화시키는 것으로 보아 순수한 경쟁적 억제나 비경쟁적 억제는 아닌 것 같고 일종의 혼합형 억제제인 것으로 판단된다. 효소억제제가 K_m 을 변화시키는 정도가 V_{max} 를 변화시키는 정도보다 큰 것으로 미루어 경쟁적 억제제에 더 가까운 것으로 생각된다. 테트라-2,5-디플루오르페닐포르피린의 경우 $10 \mu M$ 까지 규칙적으로 K_m 값을 변화시키고 $20 \mu M$ 에서는 V_{max} 에 조금의 영향을 주기는 하여도 여전히 K_m 을 크게 변화시키는 것으로 보아 순수한 경쟁적 억제제인 것으로 판단된다. 이들의외에도 2,4-디플루오르페닐포르피린, 3,4-디플루오르페닐포르피린, F4STPPH등으로 억제 연구를 하였지만 용해도 문제와 억제정도가 너무 낮아 억제상수를 구하지는 못하였다. Table 2에 억제제로 사용한 화합물과 억제상수를 나타내었다.

Table 2에서 보듯이 가역적 억제상수 값이 모두 μM 범위에 있어 억제상수 값에 큰 차이를 나타내지 못하고 있다. 가장 낮은 억제상수 값과 가장 높은 억제 상수 값 사이에 약 10배 정도 밖에 차이가 나지 않는다. 화합물의 구조상 이들 억제제들의 차이점은 포르피린 고리에 붙어있는 페닐기의 치환기가 다르다는 것인데 이 결과는 페닐기의 플루오르 치환기의 위치와 숫자가 효소억제 상수에 큰 영향을 미치지 못한다는 것을 보여준다. 이러한 결과는 아세틸콜린 에스테르 가수분해효소 억제효과에 미치는 플루오

르 치환기의 숫자와 치환 위치의 중요성과는 상반되는 결과로서, CEase의 경우 부분전하는 억제효과에 큰 영향을 미치지 못하는 것을 보여준다. 따라서 효소억제에 가장 중요한 요소는 소수성 포르피린 고리일 것으로 추정된다. Lin 등은 이나프틸부틸 카르바산 에스테르의 여러 가지 입체 이성질체를 이용해 CEase 억제반응을 연구했는데, 이들에 의하면 가역적 억제상수(K_i)는 모두 μM 범위에 있어 본 연구에서 구한 억제상수 값과 유사한 값을 가지는 것을 보여준다.¹⁵ 이들은 CEase 기질인 콜레스테릴 에스테르의 콜레스테릴 부분이 효소 활성자리의 소수성 지역을 차지하며, 이들은 억제제중 이나프틸 부분이 기질과 마찬가지로 소수성 지역에 결합함으로써 가역적 억제를 하는 것으로 설명하고 있다. 본 연구에서 사용한 포르피린 고리 또한 소수성 부분이 큰 부피를 차지하고 있어 비슷한 방식으로 결합 할 수 있으리라 생각되며, 가역적 억제상수 값도 μM 범위에 있어 이러한 사실을 뒷받침 해준다. 이러한 고찰을 뒷받침하기 위한 모델링 연구가 진행중이다. Michaelis상수 값과 억제상수 사이의 비는 대략 기질과 억제제의 결합 친화력에 대한 정보를 제공하는데 이 값들이 TMpyP의 경우 1에 가깝고 가장 큰 경우에도 20을 넘지 않는다. 이러한 결과 역시 CEase와 억제제의 상호작용에서 소수성 상호작용의 중요성을 시사하고 있다.

이미 아세틸콜린에스테르 가수분해효소 억제반응과 *in vivo* 연구를 통해 이 화합물의 안정성등 몇 가지 조사가 되었으므로¹⁶ 비교적 쉽게 콜레스테롤 농도 측정을 할 수 있으리라 기대된다.

본 연구는 한국과학재단 후원 의약자원연구센터 지원에 의한 것으로 이에 감사를 표합니다.

인 용 문 헌

1. Chang, T. Y. and Limanek, J. S. *J. Biol. Chem.* **1980**, 255, 7787-7795.
2. Metherall, J. E.; Goldstein, J. L.; Luskey, K. L. and Brown, M. S. *J. Biol. Chem.* **1989**, 264, 15634-15641.
3. Leonard, S. and Sinensky, M. *Biochim. Biophys. Acta* **1988**, 947, 101-112.
4. Gotteland, I.-P.; Brunel, I.; Gendre, F. et al. *J. Med. Chem.* **1995**, 38, 3207-3216.

5. Magnin, D. R.; Biller, S. A.; Chen, Y.; Dickson, J. K. *et al. J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 657-660.
6. Kumazawa, T.; Harakawa, H.; Fukui, H.; Shirakura, S.; Ohishi, E. and Yamada, K. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1995**, *5(16)*, 1829-1832.
7. Chackalamannil, S.; Xia, Y.; Wang, Y.; Tsai, H.; Czarniecki, M.; Wang, S.; Clemmons, A.; Ahn, H.-S. and Boykow, G. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1995**, *5(17)*, 2005-2010.
8. Brockerhoff, H. and Jensen, R. G. *Lipolytic Enzymes*, pp. 176-193 (1974), Academic Press, New York.
9. Kritchevsky, D. and Kothari, H. V. *Adv. Lipid Res.* **1978**, *16*, 221-26610.
10. Rudd, E. A. and Brockman, H. L. in *Lipases* (1984), pp. 185-204, Elsevier, Amsterdam.
11. Bhat, S. G. and Brockman, H. L. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1982**, *109*, 486-492.
12. Gallo, L. L., Clark, S. B., Myers, S. and Vahouny, G. V. *J. Lipid Res.* **1984**, *25*, 604-612.
13. Stout, J. S.; Sutton, L. D. and Quinn, D. M. *Biochim. Biophys. Acta* **1985**, *837*, 6-12.
14. Hosie, L.; Sutton, L. D. and Quinn, D. M. *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 260-264.
15. Lin, G.; Liu, H.-C. and Tsai, Y.-C. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, *6*, 43-46.
16. Lee, B. H.; Park, M. B.; Yu, B. S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* (submitted).
17. Sohl, J.; Sutton, L. D.; Burton, D. J. and Quinn, D. M. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1988**, *151*, 554-560.
18. Eaton, S. S. and Eaton, G. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, *97*, 3660-3668.
19. Woon, T. C. and Shirazi, T. C. *Inorg. Chem.* **1986**, *25*, 3845-3852.