

목단피로부터 Prolyl Endopeptidase 저해활성을 갖는 1,2,3,4,6-Pentagalloyl-β-D-Glucopyranose의 분리

김상인 · 송경식*

경북대학교 농화학과

(2000년 2월 25일 접수, 2000년 3월 20일 수리)

서 론

치매의 종류는 크게 혈관성치매(cerebrovascular dementia; CVT)와 노인성 치매(Alzheimer type dementia; AD)로 나눌 수 있다. AD는 주로 중년과 노년에 나타나는 진행성이고 퇴행성인 질병의 하나로 1906년 독일의 정신과 의사인 Alois Alzheimer가 처음으로 발견하였으며, 치명적인 정신능력의 손실을 가져오는 것으로 알려져 있다.¹⁾ 아직까지 AD의 원인과 경로는 완전히 밝혀져 있지 않으나 이 병의 특징적 병리학적 소견인 노인반(senile plaque)과 신경섬유 덩어리(neurofibrillary tangle), 그리고 acetylcholine성 기능장애를 통하여 병인(病因)을 추적하고 있다.^{2,3)} 한편, 노인반의 주요 구성물질 중 하나는 β-amyloid (Aβ)로 알려져 있으며 이 peptide가 AD에 대한 직접적인 원인이 될 수 있을 것으로 보고되고 있다.⁴⁾ 이러한 가설이 주목되고 있는 이유는 첫째, 유전학적으로 AD의 표현형을 일으키는 각각의 amyloid precursor protein(APP)의 돌연변이 또는 presenilin gene들 대부분의 경우가 Aβ_{1-42/43}의 과량생성과 관련되어 있으며,^{5,6)} 둘째, Aβ가 직접적인 신경독성을 가지고 신경 세포사를 유도할 수 있음이 알려졌다기 때문이다.^{7,9)} 아직 Aβ 침적과 AD가 어떻게 연관되어 있는지 완전히 규명되지는 않았으나 Aβ의 생성에 관여하는 효소 중 가장 가능성이 있는 효소의 하나로 prolyl endopeptidase(PEP)가 지목되고 있다.¹⁰⁾

PEP[EC3.4.21.26]는 peptide의 proline 잔기에 높은 기질 특이성을 나타내는 serine protease의 일종으로 Walter 등¹¹⁾에 의해 인간의 자궁에서 oxytocin을 파괴하는 효소로 처음 발견되었다. 이후의 연구결과, PEP는 proline의 carboxyl 말단을 절단할 뿐 아니라 amyloid precursor protein(APP)의 alanine의 carboxyl 말단도 절단할 수 있는 것으로 보고되었는데¹²⁾ 이는 PEP가 APP에서 AD성 Aβ를 형성하는데 결정적인 역할을 하는 γ-secretase로 작용할 수 있음을 시사하는 것이다. 또한 최근의 동물실험 결과 PEP 저해제가 뇌 내 노인반의 감소¹³⁾와 항건망효과¹⁴⁾를 나타낸다는 것이 보고되어 있다.

따라서 저자 등은 천연물로부터 항치매 선도물질의 탐색을 위하여 170여 종의 한약재에 대해 PEP 저해활성을 스크리닝 하였으며 그 결과, 목단피(Moutan Cortex)가 가장 강한 저해활

성을 나타내었으므로¹⁵⁾ 이로부터 활성본체를 추적, 동정하고 분리된 화합물의 저해활성을 측정하고자 하였다.

재료 및 방법

재료, 시약 및 기기

목단피(Moutan Cortex)는 대구 소재 한약재상에서 구입하여 사용하였다. PEP(*Flavobacterium meningosepticum* 유래)는 일본 生化学工業社로부터, chymotrypsin, trypsin, elastase(포유류 유래)는 Sigma Co.(St. Louis, USA)로부터 구입하여 사용하였다. 기질로는 Z-Gly-Pro-pNA(生化学工業社, Japan), Z-Arg-pNA, Z-L-Tyr-pNA 및 N-Suc-(Ala)₃-pNA(이상 Sigma Co. St. Louis, USA) 등이 사용되었다. Column chromatography용 resin은 Kieselgel 60(Merck, Art.7734, Germany)과 Sephadex LH-20(Sigma Co. St. Louis, USA)이 사용되었으며 TLC plate는 precoated Kieselgel 60 F₂₅₄(Merck, Art.1.05554, Germany) 및 precoated RP-18 F_{254s}(Merck, Art.1.15685, Germany)를 사용하였다.

흡광도는 ELISA autoreader(ELX808, Bio-TEK, USA)를 이용하여 측정하였으며 ¹H- 및 ¹³C-NMR은 Bruker Avance Digital 400으로 각각 400 및 100 MHz에서 TMS를 내부표준 물질로 하여 측정하였다.

PEP 저해활성 측정법

PEP 저해활성측정은 Toda등의 방법¹⁶⁾을 변형하여 사용하였다. 즉, 0.1 M Tris-HCl buffer(pH 7.0) 200 μl와 0.25 unit/ml enzyme 20 μl, 그리고 sample 10 μl의 혼합액을 96 well plate에 넣고 37°C에서 10분간 반응시킨 후 20 mM Z-Gly-Pro-pNA 20 μl를 가하여 37°C에서 30분 동안 반응하고 410 nm에서 흡광도(A)를 측정하였다. 따로 0.1 M Tris-HCl buffer(pH 7.0) 240 μl, sample 10 μl의 혼합액을 준비하여 역시 410 nm에서 흡광도(B)를 측정한 후 아래와 같은 식으로 저해율을 조사하여 활성의 지표로 삼았다. 이때 control은 sample 대신 sample을 녹인 용매를 사용하여 측정된 A₄₁₀값이다.

$$\text{Inhibition(\%)} = \frac{A_{410} \text{ of control} - (A-B)}{A_{410} \text{ of control}} \times 100$$

*연락처 : Tel : 82-53-950-5715; Fax : 82-53-950-5715
E-mail : Kssong@bh.knu.ac.kr

Chymotrypsin, trypsin 및 elastase 저해활성 측정법

Chymotrypsin, trypsin 및 elastase 활성은 기보고된 방법¹⁷⁻¹⁹⁾에 따라 측정하였으며, elastase의 경우 200 µU의 효소를 포함하는 0.2 M Tris-HCl buffer(pH 8.0)에서 25 mM N-Suc-(Ala)₃-pNA를 기질로 하여 측정하였다. 또한 trypsin활성은 0.02 M CaCl₂를 함유하는 0.05 M Tris-HCl buffer(pH 8.2)에서 효소 50 µU와 1.25 mM의 Z-Arg-pNA를 반응시켜 측정하였고, chymotrypsin의 경우는 trypsin과 같은 buffer하에서 50 µU의 효소를 1.25 mM Z-L-Tyr-pNA와 함께 반응시켜 측정하였다. 저해율의 계산은 PEP와 동일한 방법으로 행하였다.

추출, 분리 및 정제

목단피 1 kg을 methanol(MeOH)로 3시간씩 3회 추출하고 감압 농축하여 MeOH엑스 189.33 g을 얻었다. 이를 dichloromethane과 ethyl acetate(EtOAc)로 순차적으로 분배 추출한 후 유기용매 가용성 분획을 농축하였다. 높은 활성을 나타낸 EtOAc 분획(23.4 g)의 일부(10 g)를 silica gel column chromatography(4.5 × 68 cm, CH₂Cl₂-MeOH = 20 : 1~100% MeOH)하여 Fr. 1~Fr. 11을 얻었으며 이 중 활성 분획인 Fr. 9에 대하여 Sephadex LH-20 column chromatography(1 × 33 cm, 50% MeOH~100% MeOH)로 재정제 하여 Fr. 9-1~9-4의 네 개의 fraction으로 나누었다. 마지막으로 Fr. 9-3을 Sephadex LH-20 column chromatography(0.8 × 20 cm, 40%~100% MeOH)하여 compound **1** 124 mg을 얻었다.

결과 및 고찰

Compound **1**은 회백색의 무정형 분말로 분리되었으며 FeCl₃에 흑색으로 발색하였다. ¹H-NMR에서 당의 anomeric proton으로 추정되는 signal이 6.35 ppm(1H, *d*, *J* = 8.4 Hz)에서 관측되었으며 δ4.50(2H, *m*), 4.60(1H, *m*), 5.62(1H, *t*, *J* = 8.8), 5.66(1H, *t*, *J* = 8.8) 및 6.03(1H, *t*, *J* = 8.8) ppm의 proton peak들의 chemical shift 및 coupling pattern으로 미루어 구조 중 glucopyranose 환을 함유하고 있음을 추정할 수 있었다²⁰⁾. 또한 6.97~7.18 ppm에서 나타난 다섯 개의 singlet(각각 2H)들은 1,3,4,5-tetrasubstituted benzene 형태의 부분구조에서 대칭성 2번과 6번 proton이 중첩되어 나타날 수 있는 signal들로, 서로 비슷한 환경의 치환기가 다섯 개 존재함을 알 수 있었다. 한편 ¹³C-NMR에서는 119.8~121.3 ppm 및 139.0~139.8 ppm에서 각각 거의 중첩된 5개씩의 4급 탄소 10개가, 또한 110.2~110.3 ppm에서 거의 중첩된 5개의 aromatic methine carbon이 관측되었으며 139.0~139.8 사이에서도 거의 중첩된 5개의 aromatic quaternary carbon이 관측되었다. 이러한 pattern은 당 core를 갖는 gallotannin 계열 화합물에서 흔히 볼 수 있는 것으로 이 화합물 역시 비슷한 골격을 갖는 화합물의 일종으로 생각되었다. 한편 ¹H-NMR에서 6.35 ppm에서 나타난 anomeric proton의 coupling constant가 8.4 Hz인 것과 ¹³C-NMR에서 anomeric carbon이 93.3 ppm에서 검출된 것으로 미루어 glucose가 β-configuration을 취하고 있음을 확인할 수 있었다.²¹⁾ 이와 같은 사실을 종합해 볼 때 compound **1**은 β-D-

Table 1. ¹H- and ¹³C-NMR Data for Compound **1** (δ in ppm)^{a,b}

NO.	¹ H	¹³ C
1	6.35 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> =8.4)	93.3 (<i>d</i>)
2	5.66 (1H, <i>t</i> , <i>J</i> =8.8)	71.7 (<i>d</i>)
3	6.03 (1H, <i>t</i> , <i>J</i> =8.8)	73.2 (<i>d</i>)
4	5.62 (1H, <i>t</i> , <i>J</i> =8.8)	69.2 (<i>d</i>)
5	4.60 (1H, <i>m</i>)	73.9 (<i>d</i>)
6	4.50 (2H, <i>m</i>)	62.8 (<i>t</i>)
1'		119.8~121.3 (each <i>s</i>)
2', 6'	6.97, 7.00, 7.05, 7.10, 7.18 (each 2H, <i>s</i>)	110.2~110.3 (each <i>d</i>)
3', 5'		145.8~146.1 (each <i>s</i>)
4'		139.0~139.8 (each <i>s</i>)
-COO		165.0~166.4 (each <i>s</i>)
-OH	8.1 (15H, <i>brs</i>)	

^aSpectra were measured in acetone-d₆ at 400 and 100 MHz.

^b*J* value are expressed in Hz.

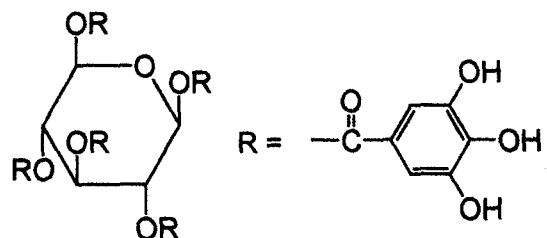


Fig. 1. Structure of compound **1** (1,2,3,4,6-pentagalloyl-β-D-glucopyranose).

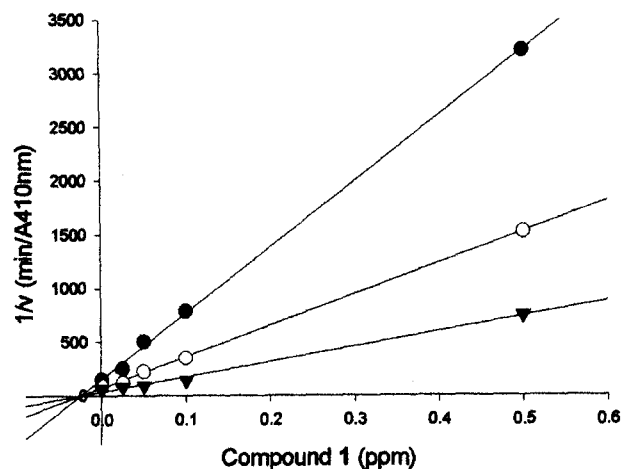


Fig. 2. Dixon plot of the inhibition of PEP by compound **1**. The concentration of the substrate was 0.5 mM (●-), 0.75 mM (○-), and 1 mM (▼-), respectively.

glucopyranose에 5개의 gallic acid가 ester 결합을 한 화합물로 추정되었으며 **1**의 NMR data를 기보고된 문헌^{20,22)}과 비교해 본 결과 1,2,3,4,6-pentagalloyl-β-D-glucopyranose와 정확히 일치하였다. Compound **1**의 ¹H-, ¹³C-NMR data를 Table 1에 나타내었으며 구조는 Fig. 1에 나타내었다.

PEP에 대한 저해 활성

Compound **1**(1,2,3,4,6-pentagalloyl-β-D-glucopyranose)의 PEP

Table 2. Inhibitory activity of compound 1 against other serine protease

enzyme	conc. (ppm)	inhibition %
Elastase	1	55.1
	5	45.3
	40	53.0
Trypsin	1	9.9
	5	7.6
	40	12.4
Chymotrypsin	1	13.6
	5	1.3
	40	6.9

에 대한 IC_{50} 값은 0.072 ppm(76.51 nM)으로 나타났다. Dixon plot 결과 화합물 1의 저해양상은 기질과 비경쟁적이었으며 K_i 값은 0.025 ppm(27.2 nM)이었다(Fig. 2). 이 활성은 지금까지 천연물 유래로 가장 높은 활성을 나타내는 것으로 보고된 staurosporine($IC_{50}=0.77 \mu M$, $K_i=0.7 \mu M$, 비경쟁적 저해)²³⁾보다 약 10배 강한 PEP 저해 활성이다. 그러나 tannin 계통의 화합물들은 단백질과 비특이적으로 결합하여 불용성의 침전을 형성할 수 있으므로 본 연구 결과 얻어진 compound 1도 이러한 비특이적 효소의 침전에 의한 false-positive reaction일 가능성이 있을 것으로 생각되었다. 이를 확인하기 위하여 수종의 다른 serine protease에 대한 저해활성을 측정해 본 결과, compound 1은 비교적 높은 농도에서도 trypsin과 chymotrypsin에 대해서 거의 저해활성을 나타내지 못하였으며 elastase의 경우에도 PEP에 비하여 현저히 낮은 저해활성을 나타내었다(Table 2).

따라서 본 연구에서 분리된 compound 1은 PEP에 비교적 특이적으로 작용하는 저해제임을 확인할 수 있었으며 앞으로 이 화합물이 항치매제의 개발 및 치매의 발병 기작 규명에 유용하게 사용될 수 있을 것으로 기대된다.

참고문헌

- Alzheimer, A. (1907) ber eine eigenarte Erkrankung der Hirnrinde. *Zentralbl Nervenheik.* **30**, 177-179.
- Suh, Y.-H. (1992) Molecular biology of Alzheimer's disease. *Saengwhahak Nyusu* **12**, 283-241.
- Auld, D. S., Kar, S. and Quirion, R. (1998) β -Amyloid peptides as direct cholinergic neuromodulators: missing link? *Trends Neurosci.* **21**, 43-49.
- Masters, C. L., Simms, G., Weinman, N. A., Multhaup, G., McDonald, B. L. and Beyreuther, K. (1985) Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **82**, 4245-4249.
- Mullan, M. and Crawford, F. (1993) Genetic and molecular advances in Alzheimer's disease. *Trends Neurosci.* **16**, 398-402.
- Hardy, J. (1997) Amyloid, the presenilins and Alzheimer's disease. *Trends Neurosci.* **20**, 154-159.
- Yankner, B. A., Duffy, L. K. and Kirschner, D. A. (1990) Neurotrophic and neurotoxic effects of amyloid beta protein: reversal by tachykinin neuropeptides. *Science* **250**, 279-282.

- Pike, C. J., Walencewicz, A. J., Glabe, C. G. and Cotman, C. W. (1991) *In vitro* aging of beta-amyloid protein causes peptide aggregation and neurotoxicity. *Brain Res.* **563**, 311-314.
- Cotman, C. W. and Pike, C. J. (1994) In 'Alzheimer Disease,' Terry, R. D., pp 305-326, Raven Press.
- Ishiura, S., Nishikawa, T., Tsukahara, T., Momoi, T., Ito, H., Suzuki, K. and Sugita, H. (1990) Distribution of Alzheimer's disease amyloid A4-generating enzyme in rat brain tissues. *Neurosci. Lett.* **115**, 329-334.
- Walter, R., Shlank, H., Glass, J. D., Schwartz, I. L. and Kerényi, T. D. (1971) Leucyl-glycinamide released from oxytocin by human uterine enzyme. *Science* **173**, 827-829.
- Shinoda, M., Toide, K., Ohsawa, I. and Kohsada, S. (1997) Specific inhibitor for prolyl endopeptidase suppresses the generation of amyloid β protein in NG108-15 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **235**, 641-645.
- Kato, A., Fukunari, A., Tabira, T., Shimizu, T., Arahata, K. and Sugita, H. D. (1997) Prevention of amyloid-like deposition by a selective prolyl endopeptidase inhibitor, Y-29794, in senescence-accelerated mouse. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* **283**, 328-335.
- Yoshimoto, T., Kado, K., Matsubara, F., Koriyama, N., Kaneto, H. and Tsuru, D. (1987) Specific inhibitors for prolyl endopeptidase and their anti-amnesic effect. *J. Pharmacobio-Dyn.* **10**, 730-735.
- Lee, K. H., Kwak, J. H., Lee, K. B. and Song, K. S. (1998) Prolyl endopeptidase inhibitors from Caryophylli Flos. *Arch. Pharm. Res.* **21**, 207-211.
- Toda, S., Obi, Y., Numata, K., Hamagishi, Y., Tomita, K., Komiyama, N., Kotake, C., Furumai, T. and Oki, T. (1992) Eurystatins A and B, new prolyl endopeptidase inhibitors. I. Taxonomy, production, isolation and biological activities. *J. Antibiotics* **45**, 1573-1579.
- Chung, C. H., Ives, H. E., Almeda, S. and Goldberg, A. L. (1983) Purification of Escherichia coli of a periplasmic protein that is a potent inhibitor of pancreatic proteases. *J. Biol. Chem.* **258**, 11032-11038.
- Gaertner, H. F. and Puigserver, A. J. (1992) Increased activity and stability of polyethylene glycol-modified trypsin. *Enzyme Microbiol. Technol.* **14**, 150-155.
- Spieß, B. J. and Wermuth, C. G. (1974) The synthesis and analytical use of a highly sensitive and convenient substrate of elastase. *Biochemical Medicine* **11**, 350-357.
- Nonaka, G., Ishimatsu, M., Tanaka, T., Nishioka, I., Nishizawa, M. and Yamagishi, T. (1987) Tannins and related compounds. LVIII. Novel gallotannins possessing an α -glucose core from *Nuphar japonicum* DC. *Chem. Pharm. Bull.* **35**, 3127-3131.
- Stoddart, J. F. (1971) In 'Stereochemistry of Carbohydrates,' pp129-145, John Wiley & Sons, Inc., NY, USA.
- Burapadaja, S. and Bunchoo, A. (1995) Antimicrobial activity of tannins from *Terminalia citrina*. *Planta Medica* **61**, 365-366.
- Kimura, K., Kawaguchi, N., Yoshihoma, M. and Kawanishi, G. (1990) Staurosporin, a prolyl endopeptidase inhibitor. *Agric. Biol. Chem.* **54**, 3021-3022.

1,2,3,4,6-Pentagalloyl- β -D-Glucopyranose, A Prolyl Endopeptidase Inhibitor from Moutan Cortex

Sang-In Kim and Kyung-Sik Song*(*Department of Agricultural Chemistry, Kyungpook National University, Teagu 702-701, Korea*)

Key words : *Paeonia moutan*, Moutan Cortex, prolyl endopeptidase inhibitor, 1,2,3,4,6-pentagalloyl- β -D-glucopyranose

*Corresponding author