

환경 독성 Peptide의 인지질과의 상호 작용 특성 분석

이 봉 헌 · 박 흥 재*

부산대학교 화학과 · *인제대학교 환경시스템학부
(2002년 11월 15일 접수; 2003년 1월 9일 채택)

Analysis of the Interactive Characteristic of Environmental Toxic Peptide and Phospholipid

Bong-Hun Lee and Heung-Jai Park*

Department of Chemistry, Pusan National University, Busan 609-735, Korea

*School of Environmental Science and Engineering, Inje University, Gimhae 621-749, Korea

(Manuscript received 15 November, 2002; accepted 9 January, 2003)

The interaction of mastoparan B, a cationic tetradecapeptide amide isolated from the hornet *Vespa basalis*, with phospholipid bilayers was studied with synthetic mastoparan B and its analogue with Ala instead of hydrophobic 12th amino acid residue in mastoparan B. MP-B and its derivative, [12-Ala]MP-B were synthesized by the solid-phase peptide synthesis method. MP-B and its analogue, [12-Ala]MP-B adopted an unordered structure in buffer solution. In the presence of neutral and acidic liposomes, the peptides took an α -helical structure. The two peptides interacted with neutral and acidic lipid bilayers. These results indicated that the hydrophobic face in the amphipathic α -helix of MP-B critically affected the biological activity and helical content.

Key word : Interaction, Toxic peptide, Liposome

1. 서 론

Mastoparan B는 hornet venom의 주성분으로 14개의 아미노산 잔기로 구성되어 있는 양친매성인 독성 peptide이다.¹⁾ MP-B의 양친매성 구조는 친수성 부분에 더 많은 아미노산 잔기를 가지고 있다. 이 peptide는 vespid venom의 mastoparan 동족류에 속하며 mastoparan은 calmodulin sensitive phosphodiesterase, phospholipase A 및 GTP-binding 조절 단백질 등을 포함하는 여러 종류의 효소들을 조절하는 것으로 알려져 있다.²⁻⁴⁾ 또한 mastoparan은 phospholipid 막과 상호작용하며 black 지질막의 이온 투과성을 교란시키는 것으로 알려져 있다.⁵⁾ MP-B는 rat의 peritoneal mast cell로부터 histamine 생성을 유도할 뿐만 아니라 mastoparan 보다 강한 용혈 활성을 가지고 있다. 그리고 심장 혈관

수축을 유도하며 그람양성 및 음성균 모두의 성장을 저해한다. 천연물 기원의 합성 화합물을 이용한 구조-활성 관계 연구로 한쪽에 양이온성 아미노산 잔기를 다른 쪽에는 hydrophobic 잔기를 가진 양친매성 α -helix 구조가 MP-B의 활성 발현에 아주 중요하다는 것을 보여주었다.

본 논문에서는 환경 독성 peptide인 MP-B와 unilamellar vesicle과의 상호 작용에 대하여 연구하였다. 이와 같은 연구는 vesicle의 전하와 peptide에 의존하여 liposome의 액체 성분이나 vesicle fusion에 따른 유출을 유발한다. 독성 peptide의 인지질과의 상호 작용, 회합, 유출과 fusion 효과에 대한 관계를 알아보았다.

2. 재료 및 방법

2.1. 아미노산과 인지질

아미노산은 Watanabe Chemical Industries, Ltd., Hiroshima에서 구입하여 사용하였다. Phospholipid 농도는 Wako Pure Chemical Industries, Osaka에서

Corresponding Author : Bong-Hun Lee, Dept. of Chemistry, Pusan National University, Busan 609-735, Korea
Phone : +82-51-338-5130
E-mail : bh3266@hanmail.net

구입한 phospholipid-test reagent를 이용한 assay로 결정하였다. 다른 모든 시약들은 특급 이상의 것을 사용하였다.

2.2. MP-B와 그 유도체 peptide 합성

MP-B와 [12-Ala]MP-B(12번째 아미노산인 Lys 잔기를 Ala로 치환한 유도체)를 Fmoc 과정에 따라 Fmoc-NHSAL resin부터 시작하여 solid phase peptide synthesis method로 합성하고 막 결합 특성에 대하여 조사하였다. Trifluoroacetic acid(TFA)/thioanisole/ethanedithiol/m-cresol(20:5:3:1)을 2시간 동안 처리하여 모든 보호기와 resin을 제거하였다. Resin에서 분리한 crude peptide는 10% acetic acid로 용해시키고 Sephadex G-25와 HPLC(Waters 600 System, C₁₈-ODS column(4.6x250mm) 사용)로 0.1% TFA를 포함하는 H₂O-acetonitrile의 gradient system으로 정제하였다. Sealing tube를 사용하여 100°C에서 24시간 동안 5.0M HCl로 peptide를 가수분해한 후 FP-210 spectrofluorometer detector가 장착된 Jasco HPLC amino acid analysis system으로 아미노산을 분석하였다. 분자량은 Jeol SX-102A를 사용한 fast atom bombardment mass spectra(FAB-Mass)로 결정하였고 MP-B와 그 유도체의 peptide 농도는 8M urea에서 Trp의 UV-absorbance로부터 계산하였다.

2.3. 인지질 제조

Egg yolk phosphatidylcholine(EYPC)는 silica gel column chromatography로 분리하였다. Egg yolk phosphatidylglycerol(EYPG)은 EYPC를 phospholipase D로 가수분해해서 얻어 silicagel column으로 통과시켜 정제하였다. 작은 unilamellar vesicle은 EYPC와 EYPC/EYPG(3:1)로 구성된 두 lipid로 각각 중성 및 산성 vesicle로 만들었다.⁶⁾ Phospholipid 20mg(25mmol)을 chloroform 1mL에 녹이고 원추형 유리관에 질소를 통과시켜 건조시켰다. 건조된 lipid를 50°C에서 30분 동안 반복 혼합, 5mL Tris buffer(pH 7.4) 2mL로 수화하고 같은 buffer를 사용하여 25mL로 희석하였다(lipid 농도는 약 1.0 mM).

3. 결과 및 토론

Peptide와 막과의 상호작용은 Jasco J-715 spectropolarimeter로 얻은 CD spectra를 사용하여 상에서 관찰하였다. Buffer solution과 EYPC liposome 존재에서 MP-B와 [12-Ala]MP-B는 주로 random 구조를 보였다. 산성 liposome(EYPC/EYPG=3:1)에서 두 peptides는 205와 222 nm에서 double minimum peaks를 가져 α-helical 구조를 나타내었다.

따라서 막과의 결합에 대한 MP-B의 conformation 변화는 아마도 hydrophobic 상호작용이라기 보다는 MP-B의 양전하기와 phospholipid 막의 음전하를 띤 인산기 사이의 상호작용에 기인하는 것 같다. EYPC와 EYPC/EYPG(3:1) liposome의 회합은 450 nm와 25°C에서 파장을 측정함으로써 알 수 있다(Fig. 1). 1x10⁻⁴M MP-B의 존재는 EYPC liposome의 산란 준위와 비교해보았을 때 EYPC/EYPG liposome 시료의 광 산란을 증가시켰다. [12-Ala]MP-B는 EYPC와 EYPC/EYPG liposome 둘 다에서 MP-B와 비슷한 산란 준위를 나타내었다. 이 결과는 MP-B에 의해 유도된 liposome의 회합은 MP-B의 양전하 효과보다는 liposome의 음전하에 강하게 의존한다는 것을 암시해주었다.

지질 이중층에의 peptide의 회합은 빈번히 막 자체와 투과성을 변화시키므로 MP-B 회합에 의해 유도된 liposome에서 carboxyfluoresin의 유출을 조사하였다. Fig. 2에 pH 7.6, 25°C에서 MP-B에 의해 유도된 EYPC와 EYPC/EYPG(3:1) 소포로부터의 액체 성분 유출을 나타내었다. Liposome 함량 유출은 형광 염료-유출 실험에 따라 결정하였다. 이 결과는 [12-Ala]MP-B의 막 섭동 효과가 EYPC와 EYPC/EYPG liposome 둘 다에서 MP-B보다 크다는 것을 나타내준다. 양성이 적은 [12-Ala]MP-B가 그와 같은 차이를 가져왔을 것이다. 염료 유출을 유도한 peptide의 능력이 산성 liposome보다는 중성 liposome에서 더 작다. 또한 1x10⁻⁴M MP-B에 의해 유도된 EYPC와 EYPC/EYPG 소포 결합 과정을 측정하였다(Fig. 3). 액체 유출과 결합 속도를 비교해보면 소포 결합이 완결되기 전에 유출이 일어난다는 것을 명확히 나타내준다. 그래서 MP-B의 유출과 결합 작용은 항상 연결되어 있는 것 같지는 않다.

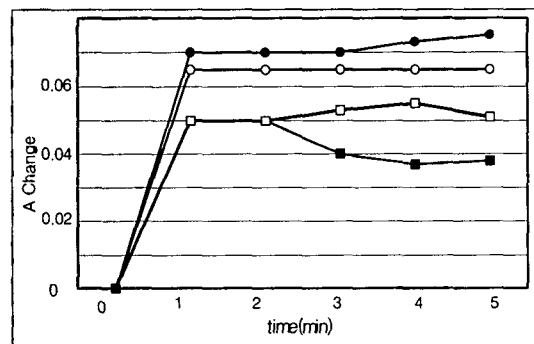


Fig. 1. The light scattering of MP-B induced aggregation of EYPC liposome with MP-B(□), [12-Ala]MP-B(■) and EYPC/EYPG(3:1) liposome with MP-B(○), [12-Ala]MP-B(●).

이 결과로부터 중성 및 산성 liposome에서 MP-B의 다른 분자적 상호작용 모델을 설명할 수 있다. 음전하(EYPC/EYPG=3:1)를 띠고 있는 phospholipid unilamellar vesicle은 안정하여 정전기적 반발력으로 인해 자발적으로 회합하거나 융합되지 않는다. 그러나 MP-B가 음전하를 띤 소포와 상호작용할 때 MP-B가 기본 peptide로 인지질의 head group과 peptide의 양전하가 소포 교차 연결을 진행시켜 결국 회합과 결합을 가져온다.

인지질 소포의 결합은 두 가지의 과정 즉, 소포 회합체의 형성과 결합 반응 자체로 이루어져 있으므로 소포의 적은 회합이 생겨 중성 소포와 MP-B의 회합은 적은 결합을 유도하게 될 것이다. 음전하를 띤 소포와의 회합은 지질 이중층에 담긴 peptide 때문에 결합을 유발한다. 소포 회합 때문에 결합은 서로 반대가 된다. 이러한 배치는 에너지적으로 불안정한 구조를 유도한다. 양이온성 단백질의 막 결합 활성은 음전하를 띤 막을 사용하는 여러 계에서 조사하였다. Cytochrome C, myelin 염기성 단백질, 합성 polylysine 및 polyhistidine 등은 막 투과성을 동반한 결합 활성을 가진다.⁷⁻¹⁰⁾ 본 연구 결과는 myelin 염기성 단백질로부터 얻은 연구 결과와 유사하다. 그 이유는 MP-B와 myelin이 liposome과 상호작용하여 다른 mechanism으로 누출과 회합을 유도한다. 여기에서 제시한 결과는 MP-B에 의하여 유도된 결합에 대한 분자적 메커니즘을 수립하기에는 불충분하다.

양친매성 구조는 생물학적으로 활성인 peptide 분자에서 발견되어 왔다. 특히 기본적인 α -helix 구조는 천연 peptide에서 발견되는 것과 같은 항미생물 활성 발현에 있어서 가장 중요한 구조적 단위 중의 하나라고 생각된다. MP-B와 그 유도체는 강한

항미생물 활성을 나타낸다. 양친매성 α -helix의 공수성 쪽에 위치한 아미노산 잔기를 Ala로 치환하면 그람 양성균에서의 활성 감소와 함께 그람 음성균에서 비슷한 활성을 보였다. Blondelle과 Houghten은 8개에서 22개 사이의 잔기로 구성된 염기성 양친매성 peptide중에서 14개 또는 15개 서열을 가진 peptide가 높은 항미생물 활성을 가진다고 보고한 바 있다. 그래서 MP-B와 그 유도체가 항미생물 활성을 가지는 것으로 판명되었을 것 같다. MP-B와 그 유도체 사이의 상당한 차이가 산성 및 중성 liposome 존재에서의 α -helical 함량에서 관찰된다. 중성 지질 이중층에서 MP-B와 그 유도체의 α -helical 함량은 산성 liposome에서보다 현저하게 감소한다. MP-B와 그 유도체 사이에 친수성 영역은 거의 같은 아미노산 잔기로 이루어져 있으므로 그와 같은 차이는 공수성 영역에 기인하는 것 같다. 그래서 MP-B의 model peptide와 산성 지질 head group 사이의 charge interaction은 α -helical 구조를 안정화시키는데 중요한 역할을 하는 것 같지는 않다. 인지질 이중층의 공수성 내부와 공수성 아미노산 잔기 사이의 hydrophobic 상호작용은 α -helical 구조를 유도하는데 중요한 요인이다. 이러한 결과들은 MP-B에서 hydrophilicity 및 hydrophobicity의 적절한 배향을 포함한 hydrophobic α -helical 구조를 나타내고 다양한 생물학적 활성을 나타내는데 필요하다는 암시이다. 이것 외에도 본 결과는 mastoparan 독소의 구조-활성 관계와 선택적으로 다양한 생물 과정을 활성화시키는 peptide를 디자인하는데 유용할 것이다.

4. 결론

1) 환경 독성 peptide인 mastoparan B와 그 유도체

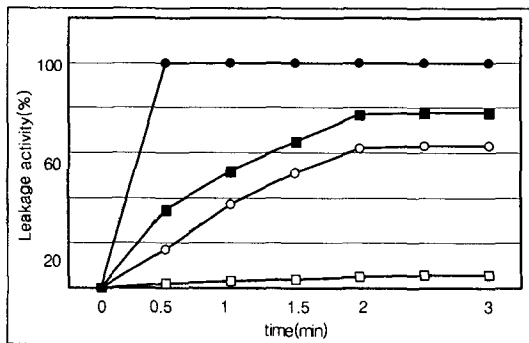


Fig. 2. Time dependence of aqueous content leakage from EYPC[MP-B(□), [12-Ala]MP-B(■)] and EYPC/EYPG(3:1)[MP-B(○), [12-Ala]MP-B(●)] induced by MP-B.

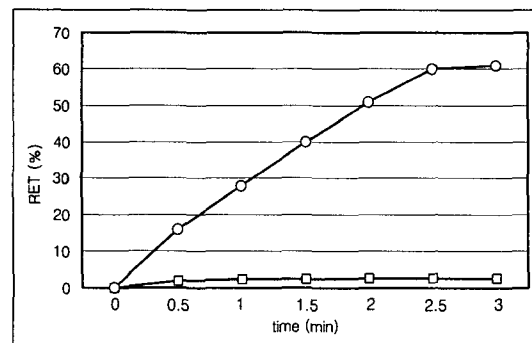


Fig. 3. Time dependence of lipid intermixing from EYPC(□) and EYPG(○) induced by 1×10^{-4} M MP-B at 25°C.

[12-Ala]MP-B와 인지질 liposome과의 상호작용을 알아보기 위하여 두 peptide를 합성하였다.

- 2) 중성 및 산성 liposome에서 두 peptide는 α -helical 구조를 나타내었으며 중성 및 산성 liposome과 상호 작용하였다.
- 3) 이상의 결과는 MP-B α -helix의 hydrophobic 부분이 생물 활성과 α -helical 함량에 영향을 미친다는 것을 암시하였다.

참 고 문 헌

- 1) Ho, C. L. and L. L. Hwang, 1991, *Biochem. J.*, 274, 453-457.
- 2) Barnette, M. S., R. Daly, and B. Weiss, 1983, *Biochem. Pharmacol.*, 32, 2929-2934.
- 3) Argiolas, A. and J. J. Pisano, 1983, *Biol. Chem.*, 258, 13697-13702.
- 4) Higashijima, S., S. Uzu, T. Nakajima, and E. M. Ross, 1988, *Biol. Commun.*, 263, 6491-6497.
- 5) Okmura, K., K. Inui, Y. Hirai, and T. Nakajima, 1981, *Biomed. Res.*, 2, 450-457.
- 6) Park, N. G., Y. Yamato, S. Lee, G. Sugihara, J. S. Park, and S. W. Kang, 1996, *Bull. Korean Chem. Soc.*, 17, 239-246.
- 7) Gad, A. E., B. L. Silver, and G. D. Eytan, 1982, *Biochim. Biophys. Acta*, 690, 124-128.
- 8) Surewics, R. M., R. M. Epand, W. J. Vail, and M. A. Moscarelo, 1985, *Biochim. Biophys. Acta*, 820, 310-306.
- 9) Uster, P. S. and D. W. Dreamer, 1985, *Biochemistry*, 24, 1-8.
- 10) Wang, C. Y. and L. Huang, 1984, *Biochemistry*, 23, 4409-4411.