연 구 속 보

대두가수분해물로부터 새로운 항혈전성 펩타이드, SSGE와 DEE의 분리

이 경 애, 김 승 호
식품기능연구본부

A soy protein hydrolysate was found to inhibit rat platelet aggregation induced by ADP, an aggregating agent. To find out its principal antiplatelet peptide(s), the soy protein hydrolysate was separated successively by gel filtration chromatography, revere-phase HPLC, and cation exchange HPLC. During the course of separation, we observed that most fractions had antiplatelet effects, which suggests that most peptides have some degree of antiplatelet effect. Following the inhibitory fractions, we purified and identified two new peptides, SSGE and DEE, by LC-electrospray ionization MS and peptide sequencing. Both peptides were highly hydrophilic. The concentrations to obtain 50% inhibition (IC_{50}) of the aggregation intensity were approximately 458μM and 485 μM, respectively, for SSGE and DEE.

Ⅰ. 서론

혈소판의 비정상적인 활성화에 의해 형성되는 미세혈전들은 혈전종(thrombosis)과 각종 혈전성 질환 뿐만 아니라 동맥경화증과 고혈압 등의 심장 질환의 성인병의 발현에도 관여하고 있는 것으로 밝혀지고 있다(Gorden, 1981; Knapp, Reilly, Alessandrini, & Fitzgerald, 1986).

펩타이드가 혈소판 응집 및 혈전을 억제하는 사실은 Rutherfurd 등(2000)과 Fiat(1993) 등에 의해 연구되었다. 지금까지 밝혀진 혈소판 응집저해활성을 갖는 펩타이드는 우유단백질 κ-casein유래의 MAIPPKKNQDK과 PHLSF(Jollès et al., 1986), 인유 단백질 lactoferrin유래의 KRDS(Mazoyer et al., 1990a) 그리고 쌀단백질의 trypsin 분해물로부터 분리한 RGDLER(Andriex et al., 1989) 등이 있으며 이들은 혈소판의 응집을 억제하고 ADP에 의해 활성화된 혈소판에 fibrinogen이 binding되는 것을 억제하는 것으로 밝혀졌다.

Shon(Shon et al., 1996) 등은 된장으로부터 ADP에 의해 활성화된 혈소판의 응집을 억제하는 펩타이드를 분리한 바 있으며, whole-casein은 thrombin에 의한 혈소판응집을 억제한다는 보고한 바 있다(Mazoyer et al., 1990b). 또한 RGDS 와 KRDS (Mazoyer et al., 1990a), 그리고 GMP (Mazoyer et al., 1990b)에 의한 *in vivo* 실험에서는 혈전증이 유발된 실험동물의 thrombogenesis를 억제하는

것으로 확인되었다.

본 연구에서는 중요한 단백질 급원이고 여러 가지 생리활성을 갖는 것으로 알려진 대두의 가수분해물에 대하여 ADP에 의해 유도된 혈소판 응집을 억제하는 효과를 검색한 결과, 우수한 항혈소판 활성이 확인되었다. Gel filtration chromatography, reverse-phase HPLC, 그리고 cation exchange HPLC 등을 이용하여 항혈전 활성 펩타이드를 분리·정제하여 최대활성을 갖는 펩타이드의 아미노산서열을 확인하여 항혈전 및 심혈관질환 등의 성인병을 예방하며 나아가 치료제로서 실용화할 수 있는 기초를 마련하고자 하였다.

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 재료

대두단백 가수분해물은 (주)농심으로부터 제공받았다. 실험동물은 Sprague Dawley (SD) male rat을 삼육 실험동물 연구소에서 구입하여, 한달 이상 사육하여 무게가 200 g± 30 이상되는 것을 실험에 사용하였으며, ADP (adenosine-5′-diphosphate)는 Chrono-log사 제품을 구입하였다. 혈소판 응집실험은 Chrono-log사의 Aggregometer (Model No. 490)를 이용하여 turbidometric 방법으로 측정하였다. Sequencing용 시약들은 sequenal grade였으며, acetonitrile은 HPLC grade, 기타 시약들은 analytical grade를 사용하였다.

분자량의 측정은 LC-electospray ionization mass spectrometer (*MassLynx 2.1*, *Micromass platform* Ⅱ, manchester U.K)를 이용하였다. 펩타이드의 sequencing은 Procise™ (perkin Elmer, protein sequencing system, USA)에 의하여 자동분석하였고 펩타이드의 합성은 433A 펩타이드 synthesizer (Perkin Elmer, Applied Biosystems, USA)를 이용하였으며, 시약 및 아미노산은 Perkin Elmer로부터 구입하여 사용하였다. 펩타이드의 분리와 정제는 HPLC (Jasco UV-975, Japan)를 이용하였다.

2. 방법

2.1. Gel filtration chromatography (Sephadex G-25)에 의한 분리

0.1N acetic acid에 녹인 대두단백가수분해물을 Sephadex G-25를 충진한 XK (Pharmacia Biotech) column (5.0×90cm)에 넣어 gel filtration chromatography를 행하고, 그 분획들은 254nm에서 흡광도를 측정하고, 항혈전 활성을 검색한 후 동결건조하여 -20℃에 보관하였다.

2.2. Semi-preparative reverse phase HPLC (C_{18}, 10×25cm)에 의한 분리

동결건조된 획분의 펩타이드를 증류수에 녹인 후 Acrodisc 0.45 m PTFE filter (Gelman Lab., Ann Arbor, MI)로 여과하고, semi-preparative reverse phase HPLC (C_{18}, 10×25cm; C_{18} Vydac 218TP510; The Separations Group, Hesperia, CA)를 행하였다. 0.1% trifluoroacetic acid (TFA)를 포함하는 5% acetonitrile을 eluant로 하여 analytical column을 사용하여 isocratic 조건으로 분리하였으며, 항혈전 활성이 우수한 획분은 동결건조하여 -20℃에서 보관하였다.

2.3. Cation exchange HPLC에 의한 분리 및 reverse phase HPLC에 의한 desalting

이들 중 가장 활성이 높은 획분을 분리하여 5 mM potassium phosphate buffer (pH 3.0)에 녹여 strong cation exchange sulfonic acid column (Vydac 400VHP575, 5, 7.5×50mm, The Separations Group, Hesperia, CA)을 이용한 chromatography를 행한 후 항혈전 활성이 높은 획분을 reverse

phase HPLC로 desalting한 후 동결건조하여 보관하였다.

2.4. LC-MS에 의한 동정 및 peptide sequencing

LC-electospray ionization mass spectrometer (*MassLynx 2.1, Micromass platform* II, manchester U.K)를 이용하여 분리된 획분의 분자량을 확인하고, 그 sequencing은 Procise™(perkin Elmer, protein sequencing system, USA)를 이용하여 biobrene으로 처리한 여지에 펩타이드를 담은 상태로 Edman degradation method를 이용하여 자동분석하였다. Sequencing 결과는 protein database인 NREF(Web page: www-nbrf.georgetown.edu/pir)을 이용하여 비교하였다.

2.5. 동정한 펩타이드의 합성 및 분리

펩타이드의 합성은 433A peptide synthesizer (Perkin Elmer, Applied Biosystems, USA)를 이용하여 FastMoc chemistry (HMP resin, benzoic anhydride)에 의해 자동합성 하였으며 합성된 펩타이드는 TFA cleavage procedure와 ether extraction 방법을 사용하여 펩타이드를 회수한 후 동결건조하고 reverse phase HPLC로 분리·정제하였다.

2.6. 혈소판 응집

Rat을 diethylether로 마취하여 개복한 후, 항응고제인 ACD용액 (12.5 g Trisodium citrate dihydrate, 7.5 g Citric acid monohydrate, 10 g Glucose)을 1 : 6 (v/v)으로 미리 넣어놓은 syringe로 채혈하여, 상온에서 150 g로 15분간 원심분리하고 상층의 PRP (Platelet rich plasma)를 취한 후에 다시 500 g에서 10분간 원심분리하였다. 침전된 platelet에 washing buffer (11.9 mM $NaHCO_3$, 0.33 mM NaH_2PO_4, 163.3 mM NaCl, 2.8 mM KCl, 1.1 mM $MgCl_2$, 11.2 mM α-D-Glucose, 2.0 mM EDTA, 0.35% Bovine Serum Albumin, pH 7.4)를 넣고 1,800 rpm으로 10분간 원심분리하여 분리된 washed platelet을 suspension buffer (11.9 mM $NaHCO_3$, 0.33 mM NaH_2PO_4, 16.3 mM NaCl, 2.8 mM KCl, 1.1 mM $MgCl_2$, 11.1 mM α-D-Glucose, pH 7.4)에 현탁시켜 hemacytometer (Superior, Germany)로 platelet 의 수를 5×10^8/㎖로 조정하였다. 혈소판 응집실험은 Aggregometer (Chrono-log, No. 490)를 사용하여 다음과 같이 측정하였다. 세척한 platelet suspension 450 μl를 37℃로 맞춘 aggregometer의 hole에 꽂아 1,000 rpm으로 5분간 preincubation 시킨 후에 $CaCl_2$용액 (final concentration 1.0 mM)을 첨가하여 2분간 반응시키고, 시험물질 (inhibitor)을 농도별로 10 μl씩 첨가하여 2분 동안 반응을 시킨 다음 혈소판 응집 유도물질인 ADP(final concentration 10 μM) 용액을 넣어 5분간 반응시키고 transmittance를 측정하였다. 시험물질의 억제율(inhibition rate)은 다음과 같이 산출하여 혈소판 응집을 50% 억제하는 농도인 IC_{50} 값을 구하였다.

$$\text{Inhibition rate (\%)} = \frac{A-B}{A} \times 100$$

A: Control aggregation %
B: Sample aggregation %

Ⅲ. 결과 및 고찰

쥐의 혈소판을 분리하여 ADP로 자극하였을때 일어나는 응집을 저해하는 정도를 aggregometer로 측정하였다. PRP(platelet rich plasma)에 존재하는 albumin 등의 혈장단백질이 활성물질의 작용을 방해할 수 있으므로 (Lee, 등 1982) PRP 대신 세척한 혈소판(washed platelet: WP)을 사용하여 저해활성을 검색하였다. ADP에 의해 유도되는 혈소판 응집을 저해하는 활성을 측정하였을 때, 대두단백 가수분해물은 IC_{50}이 2 mg/ml로 상당한

항혈전 활성이 있음을 확인하였다. 냉동 건조한 대두단백 가수분해물에 gel filtration chromatography (Sephadex G-25)를 행하고 얻은 각 획분의 항혈전 검정을 한 결과, 항혈전 활성이 매우 넓게 분포한 경향을 보였다(Fig.1). 그중 가장 높은 활성을 보인 획분을 모아(fractions 127-130) 다음 단계의 분리를 위해 동결건조하였다.

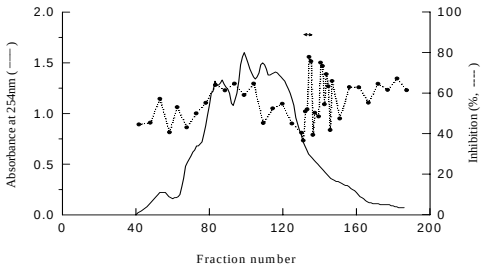

Fig. 1. Sephadex G-25 gel filtration chromatogram of a soy protein hydrolysate with inhibition of platelet aggregation.

Gel filtration chromatography에서 활성이 높게 나타난 획분에 대하여 semi-preparative reverse phase HPLC(C_{18}, 10×25cm)를 행하여 주요 peak들을 분취하고 항혈전 검정을 하였다. 그 결과, 둘째 획분에서는 높은 활성을 보이는 peak가 없었으며, 첫째 획분에서는 거의 대부분을 차지하는 제일 큰 peak에서는 활성이 낮게 나타났지만, 다른 4개의 peak들에서 비교적 높은 항혈전 활성이 나타났다(자료 제시하지 않음). 따라서 gel filtration chromatography에서 활성이 높은 획분에 대하여 semi-preparative reverse phase HPLC(C_{18}, 10×25cm)를 행하여 그 중에서 항혈전 활성이 높게 나타난 획분을 분리하여 분취하였다. Linear gradient elution(0-60 min, 0.1% trifluroacetic acid in water-60% acetonitrile in water containing 0.1% trifluroacetic acid)으로 reverse phase HPLC를 행하였을 때, 전반부에서 용출되는 펩타이드들에서 항혈전 활성이 비교적 높게 나왔으므로 이들의 분리를 더욱 효율적으로 하기 위해 isocratic조건에서 analytical column(1×25cm)으로 실험하였다. 0.1% trifluoroacetic acid(TFA)를 포함하는 5% acetonitrile 용액을 eluant로 하여 지름 1 cm의 semi-preparative column으로 HPLC를 행하여 얻어진 획분들에 대한 항혈전 검정을 실시한 결과는 Fig. 2와 같다.

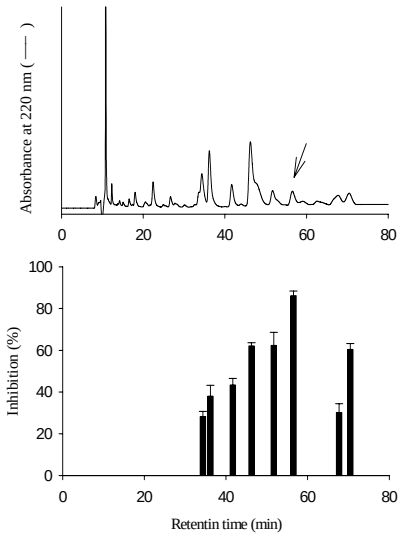

Fig. 2. Reverse-phase HPLC chromatogram (top) and inhibition of platelet aggregation (bottom). Results are expressed as mean±SEM of two measurements in the bottom figure.

Retention time 30분에서 70분사이에서 관심 peak의 대부분이 잘 분리되었으며 이 중에서 가장 활성이 높은 획분(60분)을 분취하여 동결건조시켰다. 동결건조물에 5 mM KH_2PO_4 (pH 3.0) buffer를 넣어 녹인 후 cation exchange HPLC를 행하여 Fig. 3과 같은 결과를 얻었다.

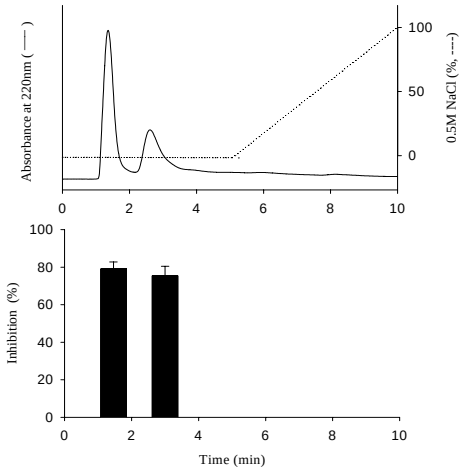

Fig. 3. Cation exchange HPLC chromatogram (top) and inhibition of platelet aggregation (bottom). Results are expressed as mean±SEM of two measurements in the bottom figure.

Column에 retain되지 않은 두 개의 peak가 분리되었으며 이들을 분취하여 동결건조시킨 획분들을 각각 reverse phase HPLC로 desalting하여 단일 peak들을 얻어 동결건조시킨 후 100 μl의 물에 녹여 10 μl를 항혈전 검정을 실시한 결과, 두 획분 모두에서 약 80% 정도의 높은 항혈전 활성을 보였다. 분리된 두 peak (Fig. 3)들을 LC-electospray ionization mass spectrometer (*MassLynx 2.1*, *Micromass platform* II, manchester U.K)로 LC-MS 한 결과, 분자량이 각각 381.30 Da과 391.3 Da의 거의 순수한 물질들임이 확인되었으며, Procise^{TM} (perkin Elmer,protein sequencing system, USA)를 이용하여 자동분석한 결과, 각각 SSGE(*Ser-Ser-Gly-Glu*)와 DEE(*Asp-Glu-Glu*)로 동정되었다. SSGE와 DEE는 친수성이 매우 높은 펩타이드로 평균 hydropathy scores가 Kyte(1982) 등에 의한 계산으로 볼 때, 각각 1.38 and 3.5였다. 이는 Mazoyer (1990)이 발견한 항혈전 펩타이드인 KRDS와 RGDS도 매우 친수성이 높았던 것과 일치하였다.

이들 펩타이드들은 433A peptide synthesizer (Perkin Elmer, Applied Biosystems, USA)를 이용하여 자동합성하였으며, 동결건조시킨 두 개의 합성 펩타이드를 농도별로 증류수로 희석한 후, 항혈전 검정(*in vitro*)을 실시한 결과, 이들은 농도의 존적으로 활성을 나타냈으며, 50%의 항혈전 활성을 갖는 농도인 IC_{50}은 458 μM and 485 μM(Fig. 4)이었다. 이 농도는 대조구로 사용된 RGDS의 IC_{50} (475 μM)과 거의 비슷한 활성을 갖는 것으로 확인되었으며, RGDS의 IC_{50}을 500 μM로 보고한 Drouet (1990) 등의 결과와 비슷한 결과였다.

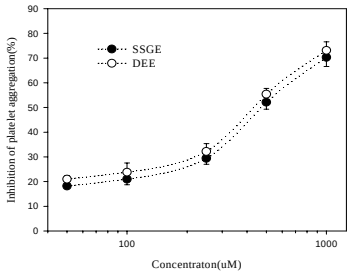

Fig. 4. Concentration-dependent inhibition of ADP-induced platelet aggregation. Results are expressed as mean±SEM of two measurements.

Ⅳ. 요약

단백 가수분해물로부터 항혈전 활성을 갖는 펩타이드를 찾고자, SD 흰쥐의 세척혈소판(washed platelet)을 이용하여 ADP 자극으로 유도되는 혈소판응집의 저해정도를 aggregometer에서의 탁도로 측정하였다. 증류수로 추출한 대두단백 가수분해물을 gel filtration chromatography를 행하여 활성이 높은 한 획분을 분취한 후 reverse phase HPLC와 cation exchange chromatography를 행하

였다. 분리된 펩타이드는 LC-MS를 행하여 순수한 물질임을 확인하였으며 protein sequencer로 그 아미노산서열은 SSGE 와 DEE로 밝혀졌다. 이들은 매우 친수성이 높은 펩타이드로 IC_{50}이 각각 485 μM 과 458 μM로서 항혈전 활성이 매우 우수한 것으로 확인되었다.

Ⅴ. 참고문헌

1. Andriex, A., Hudry-Clergeon, G., Ryckcwaert, J. J., Chapel, A., Ginsberg, M. H., Plow, E. F., & Marquerie, G. (1989).Amino acid sequences in fibrinogen mediating its interaction with its platelet receptor, GPIIbIIIa. *Journal of Biological Chemistry, 264,* 9258-9265.
2. Drouet, L., Bat dit Sollier, C., Cisse, M., Pignaud, G., Mazoyer, E., Fiat, A., Jolles, P., & Caen, J. P. (1990a). The antithrombotic effect of KRDS, a lactoferrin peptide, compared with RGDS. *Journal of Experimental and Clinical Hematology, 32,* 59-62.
3. Drouet, L., Bat dit Sollier, C., Cisse, M., Pignaud, G., Mazoyer, E., Fiat, A., Jolles, P., & Caen, J. P. (1990b). Use of caseinoglycopeptide K as an antithrombotic agent derived from cows etc. and administered by injection or orally as enteric coated capsules. *USA patent,* 5063203.
4. Fiat, A., Migliore-Samour, D., Jollès, P., Drouet, L., Bat dit Sollier, C., & Caen, J. (1993). Biologically active peptides from milk proteins with emphasis on two examples concerning antithrombotic and immunomodulating activities. *Journal of Dairy Science, 76,* 301-310.
5. Gorden, J. L. (1981). Platelets in perspective. In J. L. Gorden, *Platelets in Biology and Pathology*(pp. 1-17). Amsterdam: Elsevier, North-Holland Press.
6. Jollès, P., & Caen, J. P. (1991). Parallells between milk clotting and blood clotting: opportunities for milk-derived products. *Trends in Food Science and Technology, 2,* 42-43.
7. Jollès, P., Lévy-Toledano, S., Fiat, A., Soria, C., Gillessen, D., Thomaidis, A., Dunn, F. W., & Caen, J. P. (1986). Analogy between fibrinogen and casein: effect of an undecapeptide isolated from -casein on platelet function. *European Journal of Biochemistry, 158,* 379-382.
8. Knapp, H. R., Reilly, I. A. G., Alessandrini, P., & Fitzgerald, G. A. (1986). *In vivo*indexes of platelet and vascular during fish oil administration in patients with atheriosclerosis. *New England Journal of Medicine, 314,* 937-942.
9. Kyte, J., & Doolittle, R. F. (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *Journal of Molecular Biology, 157,* 105-132.
10. Lee, H., Nurden, A. T., Thomaidis, A., & Caen, J. P. (1982). Relationship between fibrinogen binding and the platelet glycoprotein deficiencies in Glanzmann's Thrombasthenia type I and type II. *British Journal of Haematology, 48,* 47-57.
11. Mazoyer, E., Levy-Toledano, S., Rendu, F., Hermant, L., Lu, H., Fiat, A., Jollés, P., & Caen, J. (1990). KRDS, a new peptide derived from human lactotransferrin, inhibits platelet aggregation and release action. *European Journal of Biochemistry, 194,* 43-49.
12. Rutherfurd, K. J., & Gill, H. S. (2000). Peptides affecting coagulation. *British Journal of Nutrition, 84, Suppliment 1,* S99-S102.
13. Shon, D., Lee, K., Kim, S., Ahn, C., Nam, H., Lee, H., & Shin, J. (1996). Screening of antithrombotic peptides from soybean paste by the microplate method. *Korean Journal of Food Science and Technology, 28,* 684-688.