

Cyclic L-Prolyl-L-Tyrosine의 동정, 합성, 및 생물학적 활성

이성홍 · 홍용표* · 서삼열† · 김용균† · 최종하

안동대학교 응용화학과

†안동대학교 생명자원과학부

(접수 2012. 7. 30; 게재확정 2012. 9. 7)

Identification, Synthesis, and Biological Activities of Cyclic L-Prolyl-L-Tyrosine

Sunghong Lee, Yong Pyo Hong*, Samyeol Seo†, Yonggyun Kim†, and Jong-Ha Choi

Department of Applied Chemistry, Andong National University, Andong 760-749, Korea

*E-mail: yphong@andong.ac.kr

†School of Bioresource Science, Andong National University, Andong 760-749, Korea

(Received July 30, 2012; Accepted September 7, 2012)

주제어: 동정, 합성, 생물학적 활성, Cyclic L-Pro-L-Tyr

Key words: Identification, Synthesis, Biological activities, Cyclic L-Pro-L-Tyr

서 론

유기 염소, 인, 카바메이트 등의 유기농약 개발은 식량 생산증가에 지대한 공헌을 해왔으나, 1950년대 후반부터 대두되기 시작한 곤충들의 살충제에 대한 저항성 증가, 음식물과 과일의 잔여농약 검출, 환경오염으로 인한 인축 피해 등의 결과로 환경 친화적인 생화학농약의 필요성이 증대되었다. 생화학농약은 유용 생명체 유래 추출물질로 미생물, 식물, 조류 및 갑각류 등의 유래물질을 포함한다.¹ 예를 들어 곤충병원세균인 *Xenorhabdus nematophila* 배양액에서 추출, 분리된 물질인 (E)-4-phenylbut-3-en-2-one, L-prolyl-L-tyrosine (L-Pro-L-Tyr), acetylated phenylalanyl-glycyl-valine 등은 Phospholipase A₂ (PLA₂)를 억제시켜 아이코사노이드 생합성을 방해함으로써 곤충의 면역억제를 유도하는 것으로 알려져 있다.² 곤충병원선충 *Photorhabdus temperata* ssp. *temperata* (Ptt) 또한 곤충의 면역반응을 억제시키는 것으로 알려져 있다.³⁻⁷ 본 연구에서는 Ptt의 대사물질에서 PLA₂를 억제시키는 화합물을 찾아 동정하고, 그 합성법을 개발하여 장차 생화학농약의 발전에 기여하고자 한다.

결과 및 고찰

Ptt 세균 배양액을 ethyl acetate로 추출하여 얻은 농축액을 컬럼크로마토그래피로 분리하여 네 개의 분획구를 얻었

다. 이 분획구들을 각각 PLA₂ 효소저해 및 배추좀나방에 대한 살충효과를 시험해 본 결과 생물학적 활성이 좋은 한 개의 분획구가 확인되었다. 이것을 재 정제하여 ¹³C NMR, ¹H NMR, 그리고 원소분석한 결과 전형적인 cyclic dipeptide⁸인 cyclic L-prolyl-L-tyrosine (1, cyclic L-Pro-L-Tyr)으로 확인되었다(Fig. 1).^{9,10} Cyclic L-Pro-L-Tyr는 maculosin으로 불리어지는 미국 서북지방의 잡초인 *Centauria maculosa* L.의 병원균 *Alternaria alternata*에서 분리된 diketopiperazine계의 제조성 항생물질로서,¹¹ 현재 제조제, 의약품 등의 개발에 이용되고 있는 알려진 물질이다.¹²

Cyclic L-Pro-L-Tyr에 대한 합성은 일반적으로 NH₂ 기가 보호된 L-proline과 CO₂H 기가 보호된 L-tyrosine의 아마이드 결합을 통한 L-Pro-L-Tyr유도체를 만드는 것으로부터 출발한다. 다음, 분자 내 아마이드 형성 반응인 cyclization은 일반적으로 palladium (Pd)계 촉매를 많이 사용하여 왔다.¹³ 하지만 Pd계 촉매는 값이 비싸고 반응 조건에 따라서 수율의 변화가 크다는 단점이 있다. Pd계 촉매를 사용하지 않고 아미노산을 cyclization하는 방법으로는 L-tyrosine의 NH₂ 기가 tert-butoxycarbonyl (Boc)로 보호된 N-

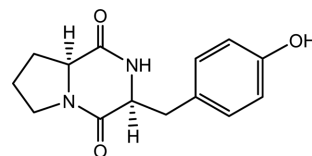
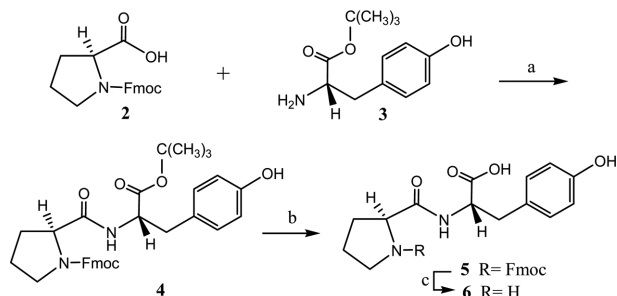


Fig. 1. Cyclic L-Pro-L-Tyr (1).

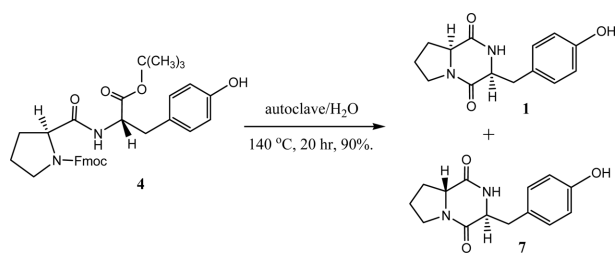
Boc-L-tyrosine과 L-proline을 아마이드 결합하고, trifluoroacetic acid (TFA)로 deprotection한 후 염기촉매 cyclization하는 방법이 있다.¹⁴ 이 방법은 수율이 낮으며 시약들의 단가가 높은 단점이 있다. 다른 방법으로는 *N*-Boc-L-tyrosine과 L-proline methyl ester hydrochloride를 이용하여 amide coupling한 후, 생성된 *N*-Boc-L-Tyr-L-Pro methyl ester를 수열합성장치(autoclave) 혹은 메탄올 환류장치로 직접 cyclization하는 방법이다.^{15,16} 이 방법 또한 반응 촉매가 고가이거나 수율이 낮아 실용적이지 못하다. 본 연구에서는 목적화합물 **1**의 합성을 위하여 먼저 L-Pro-L-Tyr의 경제적 합성을 시도하였다.

우리는 쉽게 구입할 수 있는 L-Proline의 아미노기를 (9H-fluoren-9-yl)methoxycarbonyl (Fmoc)로 보호한 Fmoc-L-proline (**2**)과 tyrosine의 COOH 기를 esterfication 시킨 L-tyrosine *tert*-butyl [L-Tyr(*t*-Bu)] ester (**3**)를 diphenylphosphoryl azide (DPPA) 촉매 amide coupling 반응시켜 90%의 수율로 Fmoc-L-Pro-L-Tyr(*t*-Bu) (**4**)를 합성하였다(Scheme 1). 다음 methylene chloride (MC) 용매에서 TFA로 tyrosine의 carbonyl 보호기 *t*-Bu를 제거하여 높은 수율로 Fmoc-L-Pro-L-Tyr (**5**)를 얻었으며, 계속하여 piperidine으로 Fmoc을 제거하였을 때 L-Pro-L-Tyr (**6**)를 얻을 수 있었다.¹⁷ 다음 수열합성장치로 **6**으로부터 목적화합물**1**의 합성을 시도하였으나, 30%의 낮은 수율로 두 개의 물질을 얻을 수 있었다. Ptt의 배양액으로부터 동정한 **1**과 위의 합성된 두 물질을 비교한 결과 TLC에서 위 spot ($R_f = 0.47$, 10% methanol in MC)이 동정한 **1**과 정확히 일치하였다. 그러나 TLC 상의 아래 spot ($R_f = 0.40$, 10% methanol in MC)의 농도가 더 강하였다.

Dipeptide **6**로부터 **1**의 합성 수율을 높이기 위한 여러 방법을 시도한 후에, 결국 dipeptide **4**의 보호기를 제거하지 않고 직접 cyclization을 시도하였다(Scheme 2). 이 방법 역시 TLC에서 두 개의 spot이 생겼지만, 수율이 90%로 월등히 높았으며, 생성 비율은 1:1이었다. 구조를 확인하기 위하여 위 두 물질을 분리 정제하여 원소 분석한 결과 둘



Scheme 1. Synthesis of L-Pro-L-Tyr (**6**). Reagent and conditions: (a) DPPA (1.0 eq), Et₃N (1.0 eq), DMF, 20h, rt, 90%; (b) TFA: MC (9:1 v/v), 1h, rt, 95%; (c) piperidine: MC (1:4 v/v), 3h, rt, 78%.



Scheme 2. Direct Synthesis of Cyclic Dipeptides **1** and **7** from Fmoc-L-Pro-L-Tyr (*t*-Bu) (**4**).

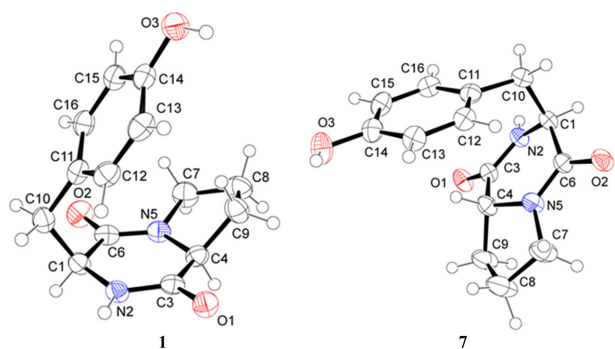


Fig. 2. X-Ray crystallography of Cyclic L-Pro-L-Tyr (**1**) and Cyclic D-Pro-L-Tyr (**7**).

다 분자식(C₁₄H₁₆N₂O₃)이 **1**과 동일하였으며, NMR을 통하여 두 물질이 이성질체의 관계임을 알 수 있었다.

이러한 결과들을 기초로 이성질체의 확실한 구조를 알기 위해 각각의 화합물을 결정화하여 얻은 X-Ray crystallography를 분석한 결과 diastereomers cyclic L-prolyl-L-tyrosine (**1**) 및 cyclic D-prolyl-L-tyrosine (**7**, cyclic D-Pro-L-Tyr)의 구조를 가지는 것으로 확인 되었다(Fig. 2).¹⁸

각각의 물질들을 PLA₂저해 및 diamondback moth 살충 효과로 본 생물활성 시험에서 Ptt 유래 성분인 cyclic L-Pro-L-Tyr (**1**)이 그 이성체인 cyclic D-Pro-L-Tyr (**7**) 보다 활성이 뛰어난 것을 확인하였다(Fig. 3).

결론

Cyclic L-Pro-L-Tyr이 *Photorhabdus temperata* subsp. *temperata* (Ptt)의 배양액으로부터 동정되었으며, 분광학적 방법에 의해 그 구조가 확인되었다. 한편, cyclic L-Pro-L-Tyr이 Fmoc-L-Pro-L-Tyr(*t*-Bu) (**4**)로부터 합성되었는데, **4**는 값싼 DPPA의 촉매로 Fmoc-L-proline과 L-tyrosine(*t*-Bu) ester로부터 쉽게 합성되었다. PLA₂의 저해와 diamondback moth의 살충효과로 본 생물학적 활성시험에서 Ptt 유래 성분인 cyclic L-Pro-L-Tyr (**1**)은 그 이성질체인 cyclic D-Pro-L-Tyr (**7**) 보다 활성이 월등히 높음을 확인하였다.

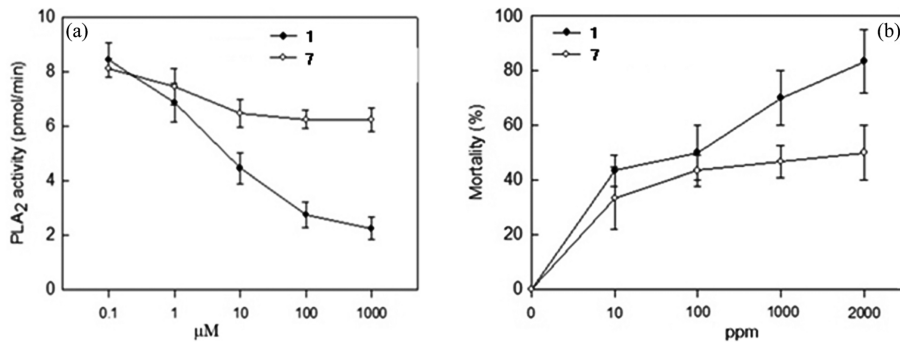


Fig. 3. (a) Enzyme Inhibiting Test for PLA₂; (b) Insecticidal Test for Diamondback Moth.

실험 방법

시약 및 기기

핵자기 공명(¹H, ¹³C NMR) 스펙트럼은 Avance Digital 400 MHz spectrometer를 이용하였고 화학적 이동은 ppm 단위로 나타내었다. 원소분석(EA)은 이탈리아/Thermo Fisher Flash 2000을 사용하였으며, 측정조건은 1,700 °C, 100 ppm이며, 시료의 양은 5 mg, 검출기는 TCD를 사용하였다. 관크로마토그래피는 머크사의 실리카겔(70~230 mesh ASTM)을 사용하였으며, 시약은 Aldrich 사와 T.C.I 사의 제품을 정제 없이 사용하였고, 용매는 제품을 정제하지 않고 사용하거나 문헌에 알려진 방법에 의거하여 증류, 정제하여 사용하였다.

Ptt로부터 cyclic L-Pro-L-Tyr (1)의 동정

Ptt 배양액 50 L를 EtOAc 50 L로 추출한 후 감압 농축하여 얻은 10.33 g을 컬럼(SiO₂, 10% MeOH in EtOAc)으로 분리하여 4개의 분획구 A (6.45 g), B (0.38 g), C (0.17 g), 그리고 D (0.83 g)를 얻었다. 각각의 분획구들을 생물학적 활성 시험한 결과 제일 활성이 높은 분획구 D를 여러 번 PTLC 정제하여, 50 mg의 순수한 물질을 얻었다. $R_f=0.47$ (10% MeOH in EtOAc); ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) $\delta = 9.45$ (br, 1H), 7.90 (s, 1H), 7.04 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 6.63 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 4.24 (t, $J = 8.2$ Hz, 1H), 4.06-4.02 (m, 1H), 3.48-3.20 (m, 3H), 2.96-2.87 (m, 1H), 2.05-1.98 (m, 1H), 1.80-1.71 (m, 2H), 1.43-1.31 (m, 1H); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) $\delta = 168.92, 165.11, 155.95, 130.84, 127.01, 114.78, 58.41, 56.02, 44.57, 34.69, 27.86, 21.88$.

Fmoc-L-Pro-L-Tyr(*t*-Bu) (4)의 합성

Fmoc-L-proline (2) (5.00 g, 14.82 mmol)과 L-tyrosine-*t*-butyl ester (3) (4.22 g, 17.78 mmol)를 각각의 round bottom flask에 넣고, 질소치환 시킨다. 각각의 flask에 dry DMF를

25 mL씩 부가하여 녹이고, 0 °C에서 proline을 포함하는 flask에 DPPA와 Et₃N을 빠르게 부가한다. TLC에서 proline spot이 사라지면, L-tyrosine-*t*-butyl ester 용액을 proline flask에 부가한다. 계속하여 0 °C에서 2시간 반응 후 실온에서 20시간 반응 시킨다. 반응이 끝난 후 EtOAc, H₂O, 포화 NaCl 수용액을 이용하여 추출하였다. 유기층을 농축한 후 컬럼(SiO₂, 50% EtOAc in hexane)으로 분리 정제하여 화합물 4 (7.50 g, 90%)를 얻었다. $R_f=0.30$ (50% EtOAc in hexane); ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) $\delta = 7.88$ (d, $J = 7.2$ Hz, 2H), 7.84 (d, $J = 7.2$ Hz, 2H), 7.41 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H), 7.34 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H), 7.01-6.93 (m, 2H), 6.66 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 6.27 (s, 1H), 4.42-4.31 (m, 1H), 4.28-4.20 (m, 2H), 4.18-4.14 (m, 1H), 3.38-3.24 (m, 2H), 2.88-2.79 (m, 2H), 2.07-1.95 (m, 1H), 1.82-1.68 (m, 3H), 1.37 (s, 9H); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) $\delta = 172.19, 170.54, 155.94, 142.59, 139.43, 137.44, 130.16, 128.94, 127.30, 121.40, 120.04, 114.91, 109.76, 80.97, 80.47, 59.88, 54.38, 46.65, 46.57, 35.93, 30.33, 27.60, 23.39$.

Fmoc-L-Pro-L-Tyr (5)의 합성

Ester 4 (6.00 g, 10.78 mmol)를 포함하는 dry MC 용액 (25 mL)에 0 °C에서 TFA (40.55 g, 32.99 mmol)를 천천히 부가한 후 실온에서 overnight 반응 시킨다. 반응이 끝난 후 감압증류 하여 MC와 TFA를 제거하고, EtOAc와 H₂O로 추출하였다. 유기층을 농축한 후 컬럼으로 분리 정제하여 화합물 5 (5.37 g, 95%)를 합성하였다. $R_f=0.45$ (20% MeOH in MC); ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) $\delta = 7.88$ (d, $J = 7.6$ Hz, 2H), 7.84 (d, $J = 7.6$ Hz, 2H), 7.41 (td, $J = 7.6, 1.2$ Hz, 2H), 7.34 (td, $J = 7.6, 1.2$ Hz, 2H), 6.93-6.85 (m, 2H), 6.60-6.56 (m, 2H), 6.28 (s, 1H), 5.76 (s, 1H), 4.32-4.20 (m, 1H), 4.16-3.97 (m, 2H), 3.55-3.45 (m, 1H), 3.35-3.20 (m, 2H), 3.00-2.78 (m, 2H), 1.95-1.85 (m, 2H), 1.80-1.69 (m, 1H), 1.68-1.55 (m, 1H), 1.53-1.43 (m, 1H); ¹³C NMR

(DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ = 172.76, 170.50, 155.66, 154.42, 142.63, 139.48, 137.48, 128.98, 127.55, 121.43, 120.08, 114.67, 109.79, 67.16, 60.42, 54.97, 46.66, 46.47, 36.23, 30.03, 21.17.

L-Pro-L-Tyr (6)의 합성

Fmoc dipeptide **5** (5.37 g, 10.73 mmol)를 dry MC (30 mL)에 녹인 후, 0 °C에서 piperidine (6.85 mL, 17.49 mmol)을 천천히 부가하였다. 약 1시간 후 반응이 종료되면 용매를 제거하고 EtOAc로 3번 씻어낸다. 잔유물을 컬럼(SiO₂, 25% H₂O in ethanol)으로 분리 정제하여 화합물 **6** (2.35 g, 78%)을 합성하였다. *R*_f=0.51 (25% H₂O in ethanol); ¹H NMR (D₂O, 400 MHz) δ = 7.13 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 6.82 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 4.79 (s, 4H), 4.40-4.35 (m, 1H), 4.25-4.20 (m, 1H), 3.41-3.28 (m, 2H), 3.11 (dd, *J* = 14.0, 4.8 Hz, 1H), 2.86 (dd, *J* = 14.0, 9.2 Hz, 1H), 2.41-2.34 (m, 1H), 2.06-1.89 (m, 3H); ¹³C NMR (D₂O, 100 MHz) δ = 178.00, 168.99, 154.52, 130.82, 129.93, 115.68, 59.99, 57.55, 46.79, 36.85, 29.90, 24.09.

Cyclic L-Pro-L-Tyr (1)와 Cyclic D-Pro-L-Tyr (7)의 합성

보호된 dipeptide **4** (4.59 g, 8.25 mmol)를 수열합성장치에 넣고, H₂O 165 mL를 부가한다. 140 °C의 오븐에서 20시간 동안 반응시킨 후, 감압 증류하여 H₂O를 제거한다. 잔유물을 컬럼(SiO₂, 10% MeOH in MC)으로 분리 정제하여 목적 화합물 **1** (0.96 g, 45%)을 얻었다. 이때, 이성질체로 확인된 cyclic D-Pro-L-Tyr(7)도 비슷한 수율(0.95 g, 45%)로 합성되었다.

화합물 **1**, *R*_f=0.47 (10% MeOH in MC); ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ = 9.19 (s, 1H), 7.87 (s, 1H), 7.06 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 6.65 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 4.26-4.24 (m, 1H), 4.05 (t, *J* = 6.8 Hz, 1H), 3.44-3.36 (m, 2H), 3.29-3.23 (m, 1H), 2.98-2.89 (m, 1H), 2.05-1.98 (m, 1H), 1.80-1.71 (m, 2H), 1.46-1.35 (m, 1H); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ = 168.89, 165.09, 155.88, 130.80, 127.05, 114.76, 58.38, 56.00, 44.54, 34.69, 27.83, 21.85.; Elemental Analysis: calcd C 64.60%, H 6.20%, N 10.76%, O 18.44%; found 64.30%, H 6.04%, N 10.74%, O 18.65%.

화합물 **7**, *R*_f=0.40 (10% MeOH in MC); ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ = 9.32 (s, 1H), 8.12 (s, 1H), 6.91 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 6.68 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 3.94-3.91 (m, 1H), 3.45-3.39 (m, 1H), 3.23-3.17 (m, 1H), 2.95-2.85 (m, 2H), 2.77 (dd, *J* = 13.6, 4.8 Hz, 1H), 2.00-1.91 (m, 1H), 1.81-1.76 (m, 1H), 1.62-1.50 (m, 2H); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ = 168.32, 164.86, 156.34, 130.77, 125.88, 115.07, 58.14, 57.17, 44.55, 38.61,

28.55, 21.30; Elemental Analysis: calcd C 64.60%, H 6.20%, N 10.76%, O 18.44%; found C 64.33%, H 6.04%, N 10.74%, O 18.87%.

Acknowledgments. This work was supported by 2012 AGENDA research grant of a Rural Development Administration, Korea.

REFERENCES

- Copping, L.G.; Menn, J. J.; Manage, P. *Science* **2000**, *56*, 651.
- Ji, D.; Yi, Y.; Kang, G. H.; Choi, Y. H.; Kim, P.; Baek, N. I.; Kim, Y. *FEMS Microbiol Lett.* **2004**, *239*, 241.
- Park, Y.; Yi, Y.; Kim, Y. *J. Asia-Pacific Entomol.* **1999**, *2*, 105.
- Kang, S.; Han, S.; Kim, Y. *J. Asia-Pacific Entomol.* **2005**, *8*, 411.
- Kim, Y.; Ji, D.; Cho, S.; Park, Y. *J. Insect Physiol.* **2005**, *89*, 258.
- Seo, S.; Kim, Y. *Korean J. Appl. Entomol.* **2009**, *48*, 385.
- Seo, S.; Jang, H.; Kim, K.; Kim, Y. *Korean J. Appl. Entomol.* **2010**, *49*, 409.
- Prasad, C. *Peptides* **1995**, *16*, 151.
- Degrassi, G.; Aguilar, C.; Bosco, M.; Zahariev, S.; Pongor, S.; Venturi, V. *Curr. Microbiol.* **2002**, *45*, 250.
- Rosa, S. D.; Mitova, M.; Tommonaro, G. *Biomolecular Engineering* **2003**, *20*, 311.
- Strobel, G.; Stierle, A.; Park, S.H.; Cardellina, J. *Microbes and Microbial Products as Herbicides*; Hoagland, R., Ed.; ACS Symposium Series 439, Chap. 2; ACS: Washington, DC, 1990.
- (a) Bobylev, M. M.; Bobyleva, L. I.; Strobel, G. A. *J. Agric. Food Chem.* **1996**, *44*, 3960. (b) Houston, D. R.; Synstad, B.; Eijssink, V. G. H.; Michael, E.; Stark, M. J. R.; Eggleston, I. M.; van Aalten, D. M. F. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 5713.
- (a) Wolf, L. B.; Kim, C.; Tjen, M. F.; Floris, P.; J. T. Rutjes, J. T.; Henk Hiemstra, H.; Schoemaker, H. E. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 5081. (b) Deppermann, N.; Prenzel, A. H.; Beitat, A.; Maison, W. *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 4267.
- Milne, P. J.; Oliver, D. W.; Roos, H. M. *J. Chem. Crystal.* **1992**, *22*, 643.
- (a) Thajudeen, H.; Park, K.; Moon, S. S.; Hong, I. S. *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, 1303. (b) Wang, G.; Li, C. L.; Jia, X. *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 1438.
- Martins, M. B.; Carvalho, I. *Tetrahedron.* **2007**, *63*, 9923.
- Albert, I.-L.; Mercedes, A.; Fernando, A. *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 2455.
- Hong, Y. P.; Lee, S.; Choi, J.-H.; Nakamura, G.; Suzuki, T. *J. Mol. Struct.* **2012**, submitted.