

새로운 반응기구에 의한 bradykinin 유사물의 합성

최 청

영남대학교 식품가공학과

초록 : 고상법으로 새로운 반응기구에 의한 bradykinin 및 (D-Phe⁷-Leu⁸) bradykinin을 합성하였다. Coupling은 N, N'-dicyclohexylcarbodiimide로 행하였으며 HBr 용액으로 cleavage한 후 조펩티드는 high pressure liquid chromatography로 정제하였다. 이들 펩티드의 순도는 paper chromatography, thin layer chromatography, paper electrophoresis, 용점측정기 및 아미노산기분석기에 의하여 분석하였다. Endopeptidase인 α -chymotrypsin과 trypsin, exopeptidase인 carboxypeptidase A와 leucine aminopeptidase를 사용하여 *in vitro* 상에서 이들 펩티드의 분해실험을 하였다. α -Chymotrypsin 및 carboxypeptidase A에 의하여 이들 펩티드는 빠르게 분해하였으나 leucine aminopeptidase는 N-말단의 2번 위치에 proline의 imino결합 때문에 분해하지 않았다(1991년 10월 2일 접수, 1991년 12월 4일 수리).

고혈압현상의 유발요인은 다양하며 복잡하고도 복잡한 경로에 의하여 야기되는 것이 보통이나 혈압상승 효과와 직접 관련된 체내부위는 신장조직이라고도 할 수 있다.¹⁻³⁾ 신장기능과 밀접한 관계를 갖고 있는 renin-angiotension계가 혈압상승 내지는 혈압조절 작용에 있어 중요 기능을 갖는 것으로 생각되어 왔으며⁴⁻⁶⁾ 최근에 밝혀진 바의 연구결과에 따르면 angiotensin-전환효소의 기질특이성은 angiotension I 이의 유사체에 대해서뿐 아니라 bradykinin계 펩티드 등과도 상당한 친화력을 보이고 있으며 특히 C-말단 아미노산으로 proline이나 valine 또는 isoleucine 등 내수성 아미노산을 함유한 펩티드 등에 대하여도 비교적 강한 친화력을 갖고있다 하였다.^{7,8)} Bradykinin은 혈청 globulin에서 생성되는 nonapeptide로써 평골을 자극하고 혈관을 확장시켜 혈압을 강하하는 펩티드성 호르몬이다. 혈청 globulin 분획중의 불활성 전구물질인 kininogen에 glandular kallirein이 작용하여 Lys-bradykinin이 되며 이것은 plasma kallikrein의 작용으로 lysine과 bradykinin이 된다.^{9,10)} Barbe 등¹¹⁾과 Escher^{12,13)}은 bradykinin에 대한 생물활성과 receptor B₁과의 관계를 규명하였고 새로운 receptor B₁은 천연의 nonapeptide보다 합성유도체인 octapeptide인 (des-Arg⁹) bradykinin이 천연 bradykinin보다 6배나 강하게 결합하므로써 더 높은 생물활성 즉 혈압강하를 나타낸다. 이에 관련하여 저자는 혈압 강하에 보다 높은

활성을 가진 bradykinin 유도체를 합성 할 목적으로 Merrifield의 고상법¹⁴⁾으로 본인이 새로운 반응용기를 제작하여 펩티드의 수율을 높일 목적으로 bradykinin 및 (D-Phe⁷-Leu⁸) bradykinin을 합성하고자 한다.

재료 및 방법

실험재료

Nitro-L-arginin, proline, glycine, phenylalanine, leucine, D-phenylalanine 및 Merrifield peptide resin은 Sigma Co.(St. Louis, Missouri, U.S.A.), α -chymotrypsin, carboxypeptidase A 및 leucine aminopeptidase는 Worthington Biochem, Corp.(Freehold, New Jersey, U.S.A.), 2-phenylacetonitrile, N, N-dicyclohexylcarbodiimide는 Pierce Chem. Co.(Rockford, Illinois, U.S.A.), 기타 일반 시약은 시판의 특급품을 사용하였다.

Boc-nitro-arginine polymer의 합성

Ethanol-ethyl acetate(1 : 1, v/v) 20 ml 용액에 boc-nitro-arginine, 1.8g(5 mM)을 가하고 여기에 chloromethyl polymer 10g을 녹인 triethylamine 0.64 ml(5 mM)을 첨가하여 24시간 교반하였다. Ester화된 polymer를 여과하여 소량의 ethanol-ethyl acetate(1 : 1, v/v), ethanol, H₂O, methanol을 차례로 사용하여 세척한 후 P₂O₅ 상

Key words : (D-Phe⁷-Leu⁸) bradykinin, peptide synthesis, solid phase method
Corresponding author : C. Choi

에서 진공감압 하에 건조하였다.

Boc-nitro-arginyl-prolyl-prolyl-glycyl-phenylalanyl-o-benzylseryl-D-phenylalanyl-leucyl-nitro-arginine polymer의 합성

본 펩티드합성에 사용한 아미노산 중 D-phenylalanine을 제외하고는 모두 L-형 아미노산 이었으며 boc-amino acid는 Schwyzer¹⁵⁾의 방법에 따라 합성하였다. 펩티드의 합성은 Merrifield의 고상법¹⁴⁾으로 본인이 제작한 새로운 용기(Fig. 1)에 의하여 bradykinin 및 (D-Phe⁷-Leu⁸) bradykinin을 합성하였으며 이들의 합성과정은 Fig. 2와 같이 하였다.

Polymer에 결합한 2.5g의 boc-nitro-arginine을 반응 용기에 주입하여 새로운 아미노산을 첨가하기 위하여 Table 1과 같은 일련의 반응을 시켰다. Boc-nitro-arginine의 coupling은 CH₂Cl₂ 대신에 dimethyl formamide (DMF)를 사용하였으며 peptide polymer는 P₂O₅ 상에서 진공감압상태 하에서 건조하였다.

Arginyl-prolyl-prolyl-glycyl-phenylalanyl-seryl-D-phenylalanyl-leucyl-arginine합성

보호된 polymer 4.40g을 trifluoroacetic acid(TFA) 40 ml로 2번 세척하여 100 ml의 TFA로 현탁시켜 용기에 옮겨 HBr 가스를 주입하여 실온에서 40분간 교반하였다. 이 polymer를 30 ml의 TFA로 3번 세척하여 여과한 여액을 실온에서 rotary evaporator로 감압 농축시켜 무수 에테르에 넣어 펩티드를 결정시켰다. 침전된 펩티드는 여과 후 다시 무수 에테르로 세척한 뒤 건조하였다. 부

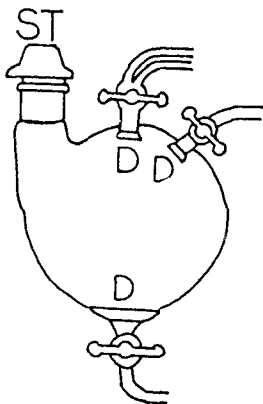


Fig. 1. The new reaction vessel for solid phase peptide synthesis.
D : Fritted disk(extra course porosity)
ST : Stopper

분적으로 보호된 nonapeptide의 잔기를 제거하기 위하여 80 ml의 methanol-acetic acid-H₂O(5 : 2 : 2, v/v)의 용매로 용해한 후 촉매를 가하여 수소가스를 실온에서 4일간 공급하였다. 촉매를 제거한 후 상기의 용매 15 ml로 3번 세척하여 회수된 여액을 20°C에서 진공 건조하고 acetone-ether(1 : 2, v/v) 용액에 녹인 후 50% acetic acid를 사용하여 2번 침전시켜 무수 에테르로 세척하였다. 이 crude peptide는 HPLC에 40 µg의 (D-Phe⁷-Leu⁸) bradykinin을 injection 하였다. 이때 사용한 column(4.6×250 mm)에 충전제 Vydac-218TP를 사용하여 0.05% TFA를

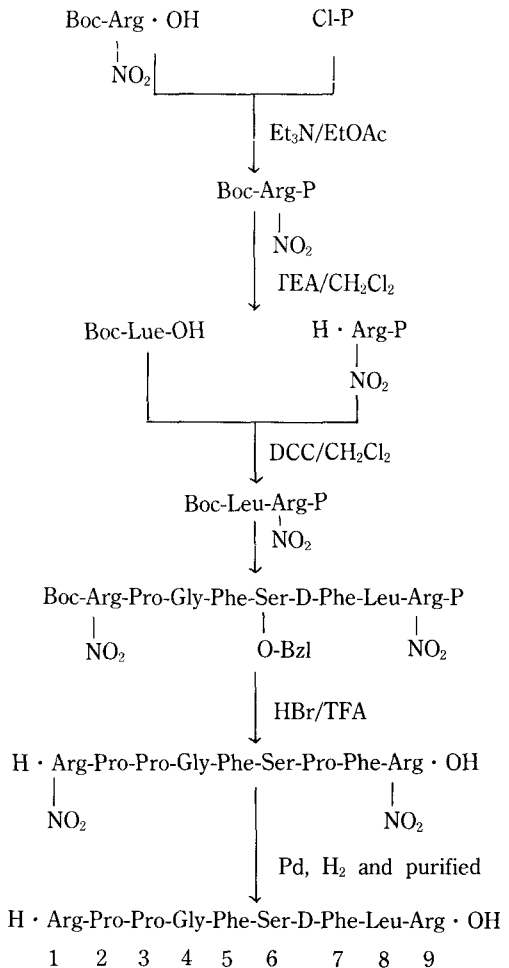


Fig. 2. Route of (D-Phe⁷-Leu⁸) bradykinin synthesis by solid phase method.
P : Polymer EtOH : Ethanol
Boc : t-Butoxycarbonyl EtOAc : Ethylacetate
TFA : Trifluoroacetic acid EtN : Triethylamine
DCC : N, N'-Dicyclohexylcarbodiimide

Table 1. Procedure for the solid phase synthesis of (D-Phe⁷-Leu⁸) bradykinin

Step	Reagents and operation	Mixing time(min)
1	Wash CH ₂ Cl ₂	8
2	Deprotection prewash 40% TFA/CH ₂ Cl ₂	8
3	Deprotection 40% TFA/CH ₂ Cl ₂	40
4	Wash CH ₂ Cl ₂ (3×)	8
5	Neutralization prewash 5% DFA/CH ₂ Cl ₂	8
6	Neutralization 5% DFA/CH ₂ Cl ₂	15
7	Wash CH ₂ Cl ₂ (2×)	8
8	Coupling, Boc-amino acid symmetrical anhydrides in DMF/CH ₂ Cl ₂	60
9	Wash CH ₂ Cl ₂ (2×)	8
10	Wash 2-propanol(2×)	8
11	Wash CH ₂ Cl ₂ (3×)	8
12	Next program, return to step 2 or 8 after ninhydrin test	

DEA : Diisopropylethylamine DMF : Dimethylformamide

함유한 5~65% acetonitrile로 구배용출 시켰으며 이때 flow rate는 2 ml/min 였다(Fig. 3).

HPLC에 의하여 분리된 펩티드를 thin layer chromatography하여 Ninhydrin 시험결과 시험관 37~40번을 모아 감압농축하여 증류수를 일정량 가하여 냉동건조시켜 순수한 (D-Phe⁷-Leu⁸) bradykinin 129 mg을 얻었다(Fig. 4).

효소실험

상기의 방법으로 합성한 bradykinin 및 (D-Phe⁷-Leu⁸) bradykinin의 효소학적 분해실험은 α-chmotrypsin, carboxypeptidase A 및 leucine-aminopeptidase를 사용하여 Carrara 등¹⁶⁾과 최 등¹⁷⁾의 방법으로 실험하였다.

결과 및 고찰

Bradykinin 및 (D-Phe⁷-Leu⁸) bradykinin의 순도는

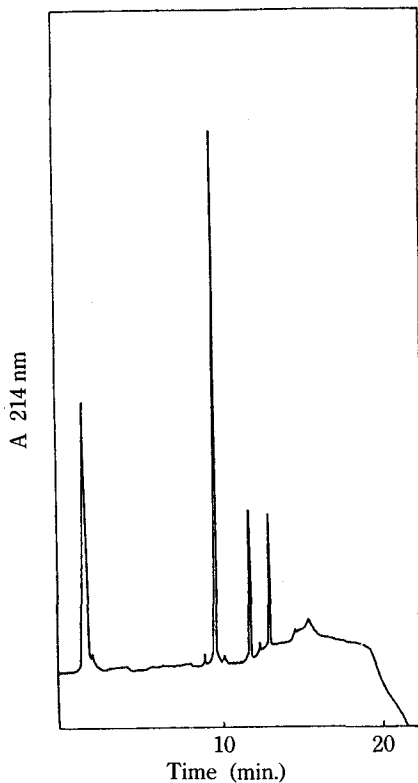


Fig. 3. HPLC of a 40 µg crude (D-Phe⁷-Leu⁸) bradykinin on a Vydac-218 TP column; 4.6×250 mm. Elution was by a linear gradient of 5.65% acetonitrile in 0.05% TFA over a period of 20 min. Flow rate was 2 ml/min.

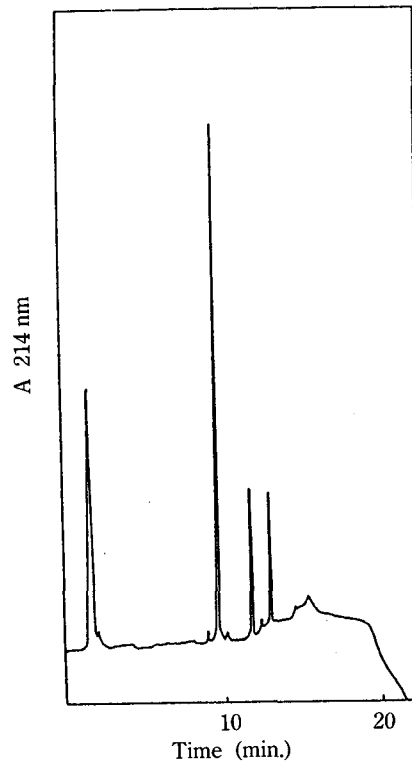


Fig. 4. HPLC of a 40 µg sample of pure (D-Phe⁷-Leu⁸) bradykinin on a Vydac-218 TP column; 4.6×250 mm. Elution was by a linear gradient of 5.65% acetonitrile in 0.05% TFA over a period of 20 min. Flow rate was 2 ml/min.

paper chromatography(PC), thin layer chromatography (TLC) 및 paper electrophoresis에 의하여 결정하였다. 이들의 1차구조 및 물리적 성질은 Table 2에 표시한 바와 같이 그 수득율은 각각 66.63%로써 비교적 양호한 결과를 얻었으며 새로운 반응용기를 사용하여 bradykinin을 형성하였을 때 그 수득률이 높았고 Drapeau 등¹⁸⁾이 고상법으로 합성한 수득율 54%보다 높았다. Table 3에서는 이들 펩티드를 6N-HCl로 24시간 110°C에서 가수분해하여 아미노산 몰비율로 표시한 것으로 각 아미노산들이 이상적으로 결합되었음을 알 수 있었다.

Bradykinin 및 (D-Phe⁷ -Leu⁸) bradykinin에 단백질 분해효소 endopeptidase인 α-chymotrypsin과 trypsin, exopeptidase인 carboxypeptidase A와 leucine aminopeptidase를 사용한 분해실험 결과는 Table 4에 표시한 바와 같다. α-Chymotrypsin을 bradykinin에 반응시간에 따라 incubation 하였을 때 pentapeptide, Arg¹ -Pro² -Pro³

-Gly⁴ -Phe⁵과 tripeptide Ser⁶ -Pro⁷ -Phe⁸과 arginin으로 분해하였다. (D-Phe⁷ -Leu⁸) bradykinin에도 마찬가지로 phenyl alanine의 carboxyl기에 작용하여 각각 pentapeptide, tripeptide 및 arginine으로 분해하였다. Trypsine의 작용에 있어서는 bradykinin과 (D-Phe⁷ -Leu⁸) bradykinin에서 arginine의 carboxyl기에 작용하여 반응시간 5분 후에는 arginine과 octapeptide, Pro¹ -Pro² -Gly³ -Phe⁴ -Ser⁵ -Pro⁶ -Phe⁷ -Arg⁸으로 분해하였다. Carboxypeptidase A가 이들 펩티드에 작용하는 경우 C 말단의 아미노산을 절단하였다. 이는 Carrara 등¹⁹⁾이 angiotensin II을 기질로한 실험에서도 proline의 imminog에 연결된 펩티드 결합은 분해되지 않았는데 본 실험의 결과도 이와 일치하였다. Leucine aminopeptidase을 이들 펩티드에 처리하였을 때 N-말단의 1번 위치의 arginine¹과 octapeptide, Leu² -Pro³ -Gly⁴ -Phe⁵ -Ser⁶ -Pro⁷ -Phe⁸ -Arg⁹으로 분해되었으나 시간이 경과하여도 그 이상 분해되지 않

Table 2. The physical properties and R_f values of bradykinin and (D-Phe⁷ -Leu⁸) bradykinin

Compound	Primary structure	R _f value				Earg	MP(°C)	Yield(%)
		PC		TLC				
		BAW	BAPW	BAP	BAPW			
Bradykinin (BK)	H · Arg ¹ -Pro ² -Pro ³ -Gly ⁴ -Phe ⁵ -Ser ⁶ -Pro ⁷ -Phe ⁸ -Arg ⁹ · OH	0.33	0.25	0.23	0.50	0.83	209~212	66
(D-Phe ⁷ -Leu ⁸) BK	H · Leu ¹ -Pro ² -Pro ³ -Gly ⁴ -Phe ⁵ -Ser ⁶ -D-Phe ⁷ -Leu ⁸ -Arg ⁹ · OH	0.67	0.59	0.31	0.51	0.71	229~231	63

Earg : Migration values of bradykinin analogues in comparison with that of arginine as a standard.

BAW : 1-BuOH : acetic acid : H₂O(4 : 1 : 5, v/v)

BAPW: 1-BuOH : acetic acid : pyridine : H₂O(30 : 60 : 20 : 24, v/v)

Table 3. Ratio of amino acid and chemical fomula of bradykinin and (D-Phe⁷ -Leu⁸) bradykinin

Compound	Ratio of amino acid						Molecular weight
	Leu	Arg	Pro	Gly	Phe	Ser	
Bradykinin(BK)	—	2.04	2.92	1.00	1.97	1.02	1060.3
(D-Phe ⁷ -Leu ⁸) BK	1.02	2.03	1.94	1.00	1.98	1.02	1076.4

Table 4. Degradation products of bradykinin and (D-Phe⁷ -Leu⁸) bradykinin after incubation with proteolytic enzyme at 30°C for different periods

Compound	α-Chymotrypsin (min)						Trypsin (min)						Carboxypeptidase A (min)						Leucine aminopeptidase (min)																	
	0		5		10		20		30		60		0		5		10		20		30		60		0		5		10		20		30		60	
	Bradykinin(BK)	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-						
(D-Phe ⁷ -Leu ⁸) BK	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-							

(-) : Degradation, (+) : No degradation

았다. 이는 Carrara 등¹⁶⁾이 실험한 결과와 같이 N-말단 아미노산이 proline의 immino기와 결합하기 때문에 전혀 분해되지 않았다. 상기의 확인반응은 표준물질과 비교하여 전개한 후 처음에 ninhydrin으로 증색 반응시킨 다음 arginine의 양성을 나타내는 Sakaguchi 시약으로 2차 발색시켰다.

감사의 말

본 연구는 '91년도 영남대학교 학술진흥연구비 지원에 의하여 이루어졌으며, 이에 감사의 말씀을 드립니다.

참 고 문 헌

1. Skeggs, L.T., Kahn, J.R. and Shumway, N.P. : J. Exp. Med., 103 : 295(1956)
2. Piquilloud, Y., Reinharz, A. and Roth, M. : Biochim. Biophys. Acta., 206 : 136(1970)
3. Samuels, A.I., Miller, E.D., Fray, J.C.S., Haber, E. and Barger, A.C. : Fed. Proc., 35 : 2512(1976)
4. Ondetti, M.A., Rubin, B. and Cushman, D.W. : Science, 196 : 441(1977)
5. Crocker, A.D. and Willavors, S.P. : J. Pharm. Pharmacol., 28 : 78(1976)
6. Collier, H.D. and Shoriey, P.G. : Brit. J. Pharmacol., 15 : 610(1960)
7. Drapeau, G., Rhaleb, N., Dion, S., Jukic, D. and Regoli, D. : Europ. J. Pharmacol., 155 : 193(1988)
8. Rhaleb, N., Dion, S., Drapeu, G. and Regoli, D. : Europ. J. Pharmacol., 151 : 275(1988)
9. Feldberg, W. and Lewis, G.P. : J. Physiol., 171 : 98 (1964)
10. Mazur, R.H., Ellis, B.W. and Cammarata, P.S. : J. Biol. Chem., 237 : 1619(1962)
11. Barb, J., Drouin, J.N., Regili, D. and Park, W.K. : Can. J. Physiol. Pharmacol., 55 : 1270(1977)
12. Escher, E. : Biochem. J., 121 : 309(1989)
13. Escher, E. : Parmac. Ther., 37 : 32(1988)
14. Merrifield, R.M. : Science, 50 : 178(1965)
15. Schwyzor, R., Sieber, P. and Keppeoer, H. : Helv. Chem. Acta., 42 : 2622(1959)
16. Carrara, M.C., Regoli, D. and Park, W.K. : Can. J. Physiol. Pharmacol., 50 : 113(1972)
17. Choi, C., Lee, J.C., Bae, M.J. and Yoon, S.H. : Korean Biochem. J., 15 : 344(1982)
18. Drapeau, D. and Regoli, D. : Methods in enzymology, 163 : 263(198)

Synthesis of bradykinin analogues by new reaction vessel

Cheong Choi(Department of Food Science and Technolgoey, College of Agriculture and Animal Science, Yeungnam University, Gyongsan 712-749, Korea)

Abstract : Synthesis of (D-Phe⁷ -Leu⁸) bradykinin and bradykinin by solid phase method using a new reaction vessel was carried out. Coupling was performed by dicyclohexylcarbodiimide. After cleavage with dried HBr the peptides were purified by high pressure liquied chromatography. Their purify was assayed by paper and thin layer chromatography, melting point and amino acid analysis. (D-Phe⁷ -Leu⁸) bradykinin and bradykinin were incubater *in vitro* endopeptidase (α -chymotrysis) and exopeptidase(carboxypeptidase A, leucine aminopeptidase) in order to study the degradation pattern of peptides. (D-Phe⁷ -Leu⁸) bradykinin and bradykinin were rapidly degraded by α -chymotrypsin and carboxypeptidase A (D-Phe⁷ -Leu⁸) bradykinin and bradykinin coution(D-Phe⁷ -Leu⁸) bradykinin and bradykinin contain imino peptide bound from proline at N-terminal and therefore they were not attacked by leucine aminopeptidase.