Proteases를 이용한 기능성 펩티드의 합성

김 세 권 / 부산수산대학교 교수

1. 서 론

Protease가 단백질의 가수분해반응 뿐만 아니라 펩티드결합 형성반응을 촉매한다는 것은 20세기 초에 이미 알려졌지만 후자를 공업적 생산을 위한 응용이 전개된 것은 1970년대부터 시작되었다.[1]

근년 각종 생리활성이나 감미성을 나타내는 펩티드들의 구조가 밝혀짐에 따라 이들을 효율 좋게 합성하기 위한 효소법이 주목을 받고 있다.

현재에도 기능성이 있는 많은 종류의 펩티드들이 화학적 합성법으로 만들어져 이용되고 있으나[2], 화학적 합성법은 보호기의 도입과 선택적 제거, 도입된 보호기에 의한 용해도 감소, 라세미화 및 비효율적인 축합물질의 유발 등 많은 제약을 받고 있다. 특히 고온 고압과 같은 강력한 반응환경에서 합성되므로 생산비 증가를 초래할 뿐만 아니라 유독성 물질을 사용함으로써 환경오염을 야기시키고 있다.[3] 이러한 단점을 해결하고자 최근에 와서 효소를 이용한 펩티드 합성에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다. 효소를 이용한 펩티드 합성의 경우 보호기 도입이 간단하거나 불필요하며, 위치특이적인 펩티드 결합으로 인하여 부반응의 감소 및 라세미체 생성이 없는 등 많은 잇점이 있다.[4]

효소에 의한 펩티드 합성법의 개발초기에는 용매로서 침전계를 이용하여 아미노산 혹은 펩티드 기질에서 펩티드 생성 방향으로 평형화하는 방법을 많이 이용하였지만, 최근에는 물에 섞이는 유기용매(water-miscible organic solvent) 혹은 물에 섞이지 않는 유기용매(water-immiscible organic solvent)들을 수용액과 함께 사용하여도 합성반응이 이루어진다[5]는 사실이 밝혀져 그 응용연구범위가 점차로 확대되고 있다. 유기용매를 물 대신으로 사용할 경우 첫째, 열역학적 평형을 가수분해반응에서 합성반응으로 이동시킬 수 있고, 둘째, 물이 존재할 때 일어나는 부반응을 억제시킬 수 있으며, 셋째, 효소의 열안정성이 향상되고, 넷째, 미생물 오염이 없다는 등 많은 장점을 가지고 있다.[6]

하지만 효소를 공업적으로 이용할 때 값이 너무 비싸고 합성물과의 분리, 정제에 어려움이 있다. 이러한 문제를 해결하기 위하여 효소의 고정화법(immobilied enzyme)이 널리 이용되고 있다.[7] 이 방법은 효

소의 활성을 증가시키고 유기용매 상에서 안정성을 주는 장점을 가지고 있다. 그러나 참전계에서는 합성물과 고정화 효소와의 분별이 어렵다는 점과 컬럼을 사용하면 막힘 현상을 일으킨다는 이유 때문에 고정화 효소는 주로 가용계(organic monophasic system) 또는 이상계(organic biphasic system)에서 사용된다.

한편 protease에 의한 펩티드 역합성은 단백질 공학의 한 수법인 반합성(semisynthesis)으로서 주목을 끌고 있다. 단백질 반합성은 천연 단백질 및 펩티드를 protease/peptidase로 절단하여 그 단편의 일부를 다른 아미노산이나 합성 펩티드로 치환시킨 후 protease로 역합성하여 다시 펩티드 사슬을 연결하는 단백질 개량공정법이다. DNA 조작기술이 오늘날과 같이 발전하기 이전에는 단백질 공학적 기법은 이 반합성과 화학적 수식으로 한정되었다. 특히 반합성은 돼지의 인슐린을 사람의 인슐린형으로의 변환을 성공시킴으로써 단백질 공학의 선구적인 연구의 시발점이 되었다.[8]

Protease를 이용한 펩티드합성의 대부분은 특정 아미노산 배열을 얻기 위해 아미노산이나 펩티드 유도체의 아미노기를 보호하는 성분(카르복실 성분)과 카르복실기를 보호하는 성분(아민 성분) 간에 결합형성을 다루고 있지만 protease에는 유리 아미노기를 갖는 아민 성분을 유일한 기질로 하여 아미노산 소중합체(oligomer)를 생성하는 반응도 촉매하는 작용을 갖는 것도 있다. 식품분야에서의 유용 펩티드로는 엄밀한 아미노산 배열을 필요로 하는 것 외에 펩티드 전체의 아미노산 조성이나 친수성·소수성 아미노산의 비율 등에 의존하여 특성이 발휘되는 것도 많다. 이같은 기능성 식품 펩티드의 제조 목적을 위해 아미노산을 이용한 중합체 합성반응이 유효하다고 생각된다. 또 폴리 아미노산(polyamino acid)은 필름, 석유, 생체적합재료, 고정화, 인공효소, 반도체 등 여러분야에서 유용성이 기대되고 있다.[9]

본고에서는 유기용매 중에서 protease를 이용한 기능성 펩티드의 합성에 필요한 protease의 종류, 이들의 펩티드 합성작용기구, 합성설계조건 및 유용기능성 펩티드의 합성 예를 소개하고자 한다.

2. 펩티드 합성을 촉매하는 Protease

Protease는 일반적으로 단백질의 가수분해를 촉매하는 단백질가수분해 효소(proteolytic enzyme)이다. Protease는 단백질을 말단 아미노기 또는 카르복실기 펩티드 결합에 작용하여 아미노산을 한개씩 차례로 유리시키는 효소군(exopeptidase)과 단백질 분자 내부의 펩티드 결합에 작용하여 각 효소의 특이성에 따라 분해시키는 효소군(endopeptidase)으로 구별된다. 종래의 습관에 따라 전자를 peptidase라 하고, 후자를 proteinase 또는 protease라 한다.

현재 펩티드 합성에 이용되는 효소는 trypsin[10], chymotrypsin[11] 그리고 papain[12] 등과 같은 endopeptidase가 대부분 이용되고 있으며, 최근에 비특이적인 serine peptidase인 carboxypeptidase Y[13]로 단계적 펩티드 합성을 하는 endopeptidase도 이용되고 있다. 또한 이들 protease를 지지체(matrix)에 고정화시켜 사용되는 고정화 합성법도 이용되고 있는데, 이것은 효소로부터 펩티드 합성물의 분리가 용이하고 효소의 활성이 증가되며 효소의 재사용이 가능하여 경제적인 문제를 해결해 줄 수 있어 그 이용이 확대되고 있다.

펩티드 합성에 이용되는 효소는 결정체 혹

은 고도로 정제된 표준품을 사용해야 하며, 특히 protease는 일차적 특이성(표 1)을 가지고 있으므로 각 효소의 특이성에 맞는 효소를 선택하여 펩티드를 합성해야 한다.

3. 펩티드 합성을 촉매하는 효소의 작용기구

일반적으로 아미노산이나 펩티드가 효소

표 1. 각종 protease의 일차특이성

효 소	절 단 부 위 (↓)
Serine protease	
trypsin, trypsin-like enzymes	-Arg(Lys)↓-Y
Achromobacter protease	-Lys↓-Y
chymotrypsin, subtilisin	-Trp(Tyr, Phe, Leu)↓-Y
elastases, α-lytic protease	-Ala(Ser)↓-Y
proline specific protease	-Pro↓-Y
Staphylococcus protease	-Asp(Glu)↓-Y
Carboxypeptidase Y	-X↓-Y
Tiol protease	
papain, *Streptococcus* protease	-Phe(Val, Leu)-X↓-Y
cathepsin B, clostripain	-Arg↓-Y
cathepsin C	H-X-Phe(Tyr, Arg)↓-Y
Metallo-protease	
thermolysin	-X-Leu(Phe)↓-
Myxobacter protease II	-X-Lys↓-
Aspartic protease	
pepsin, mold-aspartic protease	-Phe(Tyr, Leu)↓-Trp(Phe, Tyr)-

※ X, Y : 아미노산 잔기

의 존재 하에서 결합하는 반응은 C-말단과 N-말단이 축합반응(condensation reaction)을 일으켜 펩티드 축합물을 생성하게 된다. 이러한 축합반응을 촉매하는 효소에 대하여 근본적인 반응기구를 이해하여야 한다. 이러한 효소 작용기구는 축합물의 수율에 영향을 미치는 인자들을 분석하는데 중요하며 또한 수율을 증가시키기 위한 생체촉매의 성질에 대한 정보를 제공해 준다. 펩티드 합성은 평형 조절에 의한 합성(equilibrium controlled synthesis)법과 반응속도론적 조절에 의한 합성(kinetically controlled synthesis)법이 있다.

1) 평형 조절에 의한 합성법[14]

펩티드 결합의 평형 조절에 의한 합성법은 단백질가수분해 효소에 의한 펩티드 가수분해 촉매반응의 역반응을 이용하는 것이다.[4] 가수분해와는 달리 펩티드 결합형성은 흡열반응이므로 엔트로피의 감소가 일어나면서 진행되기 때문에 열역학적으로 불리하다. 보호기가 도입되지 않은 아미노산끼리의 축합시 평형상수 Ksys는 10^{-5}이다. 기질이 이온화된 형태로는 반응성이 없으므로 평형 조절 접근방식에서는 아래와 같이 두 개의 평형이 고려되어야 한다.

전하를 띠지 않는 기질과 생성물 사이의

$$R-COO^- + H_3N^+-R' \overset{Kion}{\rightleftharpoons} R-COOH + H_2N^+ + -R' \overset{Kinv}{\rightleftharpoons} R-CO-NH-R' + H_2O$$

역평형(inversion equilibrium, Kinv)에 앞서 선행되어야 하는 것은 이온화 평형(ionization equilibrium, Kion)이다. 이것을 전체 평형상수에 대입하면 다음과 같다.

$$Ksyn = Kion \cdot Kinv = [R-CO-NH-R'] \; ([R-COO^-]\,[H_3N^+-R'])^{-1}$$

두가지의 기질과 반응액의 pH가 정해지면 Kion과 Kinv는 일정하다. 따라서 역평형에 대한 펩티드 농도는 선행된 이온화 평형에서 형성된 전하를 띠지 않는 기질의 농도에 따라 달라진다. 이 농도는 다시 이들의 pK 값에 의해 결정된다. N-과 C-보호기가 도입된 아미노산의 pK 값은 유리 아미노산의 그것과는 근본적으로 다르다. 따라서 이온화 평형에서 전하를 띠지 않는 기질 농도가 충분히 높게 되므로 역평형에서 펩티드가 많이 생성된다.

생성물의 수율을 향상시키기 위해 반응의 평형을 생성물 쪽으로 이동시킬 필요가 있다. 여기에는 생성물을 침전시키는 방법[15], 수용액에 수용성 유기용매(water-miscible organic solvent)를 첨가하는 방법[16], 물에 잘 섞이지 않는 유기용매(water-immiscible organic solvent)를 첨가하여 수용액/유기용매 이상계(aqueous/organic solvent biphasic system)에서 반응을 시키는 방법[17] 등이 있고, 이들 방법에 의한 펩티드 합성을 평형 조절에 의한 합성이라 한다.

평형 조절에 의한 합성에 사용되는 용매 중 침전계(precipitation system)는 Bergmann의 보고 이래 가장 많이 이용되어 온 방법이다. 이 방법은 가용성 원료가 합성될 때 그 합성물은 용매에 의해 침전되므로 합성물의 농도는 원료에 비해 감소되어 평형반응을 합성쪽으로 변화시키는 것이다. 그러나 이것은 원료 및 효소의 농도를 고려해야 하며 또 원료의 보호기 종류에 따라 합성물의 용해도에 상당한 영향을 미친다. 최

근에는 물과 섞이지 않는 수용액/유기용매 이상계가 널리 이용되고 있다. 이 시스템에서는 초산 에틸(ethyl acetate)이나 크로로포름(chloroform)과 같이 물에 난용성 유기용매와 물(혹은 완충용액)과의 이상계에서 합성수율은 수용액계(water of buffer system) 및 가용계보다 높게 나타난다.[18] 예를들면, Nakanishi 등[19]은 Z(benzyloxycarbony)-GlyGly와 PheLeu-OEt를 0.05 M MES-NaOH 완충용액(단일상계)과 초산에틸/0.05M MEs-NaOH 완충용액(이상계)의 각 반응계에서 thermolysin을 촉매로 하여 Z-GlyGlyPheLeu-OEt(des-Tyr-Leu-enkephalin 전구체)을 합성시켰을 때, 수율은 이상계에서 상당히 증가시킬 수 있었다(그림 1). 그림 1.의 (a)에서

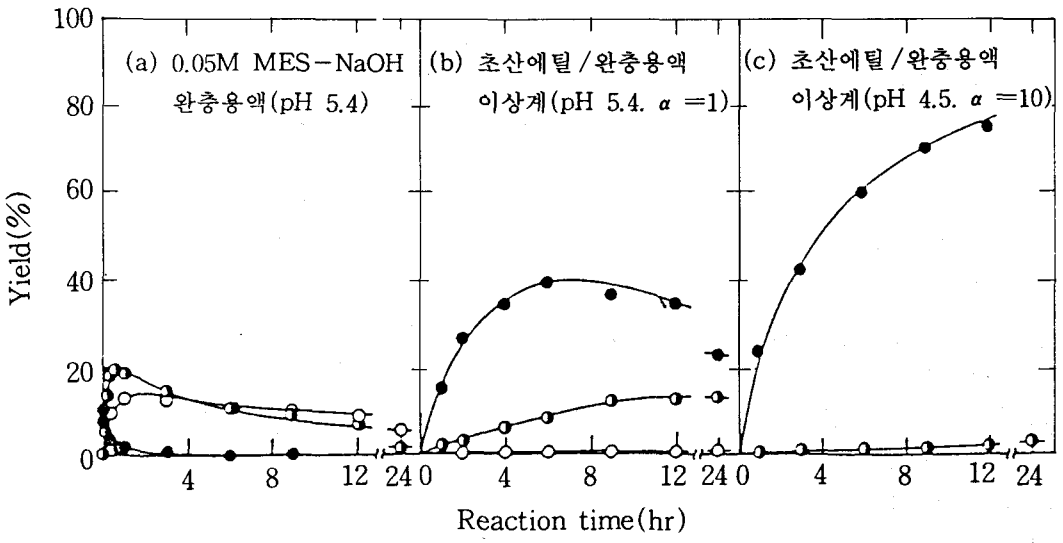


그림 1. Z-GlyGly와 PheLeu-OEt을 0.05M MES-NaOH 완충용액(단일상계)과 초산에틸/0.05M Mes-NaOH 완충용액(이상계)에서 Z-GlyGlyPheLeu-OEt(des-Tyr-Leu-enkephalin 전구체)의 합성(40℃)

는 MES-NaOH buffer 수용액계에서 반응 수율 약 10%정도 목적 생성물을 얻을 수 있었지만 곧 감소하여 거의 0%였다. (b)에서는 유기용매/수용액의 부피비(α)가 1인 이상계에서 합성을 하여 반응시간 6시간에서 약 40%의 목적 생성물을 얻었으며 (c)에서는 α를 10으로 증가시키고 또한 pH를 감소시킴으로서 24시간 후 거의 90%까지 높은 수율을 얻을 수 있었다.

지금까지 이 분야의 연구에 사용된 유기용매는 물과의 상호 용해성이라는 관점에서 표 2.와 같이 분류할 수 있다.[20]

2) 속도론적 조절에 의한 합성[21]

아미노산 혹은 펩티드의 C-말단에 활성기질 즉, ester 기질을 가지고서 반응하는 것으로서 serine 및 thiol protease가 이 반응을 촉매하는 효소이다. 이들 중 serine protease를 예로 그 기구를 설명하고자 한다.

그림 2.의 모식적으로 나타낸 바와 같이

표 2. 펩티드 합성에 유용한 주요 유기용매

1) Water-miscible organic solvents

methanol, ethanol, ethylene glycol, glycerol, *N, N'* -dimethylformamide. dimethyl sulforxide, acetone, formaldehyde, dioxane, etc.

2) Water-immiscible organic solvents

※ alcohols

(*n*-, *iso*-)propyl alcohol, (*n*-, *s*-, *t*-)butyl alcohol, (*n*-, *s*-, *t*-)amyl alcohol, *n*-octanol, etc.

※ esters

methyl acetate, ehtyl acetate(37.8, 40℃), *n*-butyl acetate, hexyl acetate, etc.

※ alkyl halides

methylene chloride(2, 30℃), chloroform, carbon tetrachloride, trichloroethane(0.4, 40℃), etc.

※ ethers

diethyl ether(12, 20℃), dipropyl ether, diisopropyl ether, dibutyl ether, dipentyl ether, etc.

3) Water-insoluble organic solvents

※ aliphatic hydrocarbons

n-hexane(320, 40℃), *n*-heptane(310, 30℃), isooctane(180, 30℃), etc.

※ aromatic hydrocarbons

benzene(1200, 40℃), toluene(880, 30℃), etc.

※ allicyclic hydrocarbons

cyclohexane(160, 30℃), etc.

※ 괄호 속에 있는 숫자는 용해도(ppm)와 온도

펩티드의 가수분해반응은 아미드(펩티드)로부터 중간체인 아실화(acylation) 효소의 생성을 지나 카르복실산(carboxylic acid)으로 진행하며 펩티드 결합의 생성은 이 역의 경로를 취한다. Serine protease는 에스테라제(esterase) 활성도 갖고 있지만 에스테르의 생성은 같은 중간체의 아실화 효소를 만들어 펩티드 생성과 공통인 경로로 진행된다. 반응경로에서 항상 아실화 효소의 생성이 최초 단계이며, 이것이 무엇으로 취해질 것인가에 따라 전체의 진행방향이 결정된다.

이와 같이 기질과 효소에 의한 아실화는 물과 친핵체에 의해서 경쟁적으로 탈아실화가 이루어지며 이에 대한 식은 다음과 같다.

중간체인 아실화 효소(Ac-Phe-E)는 물분자와 친핵체(Nu:)의 공격에 따라서 탈아실화가 이루어지는 데 이 반응계에서 친핵체가 물분자보다 더 강력하게 핵을 공격하여 탈아실화하면 가수분해보다 먼저

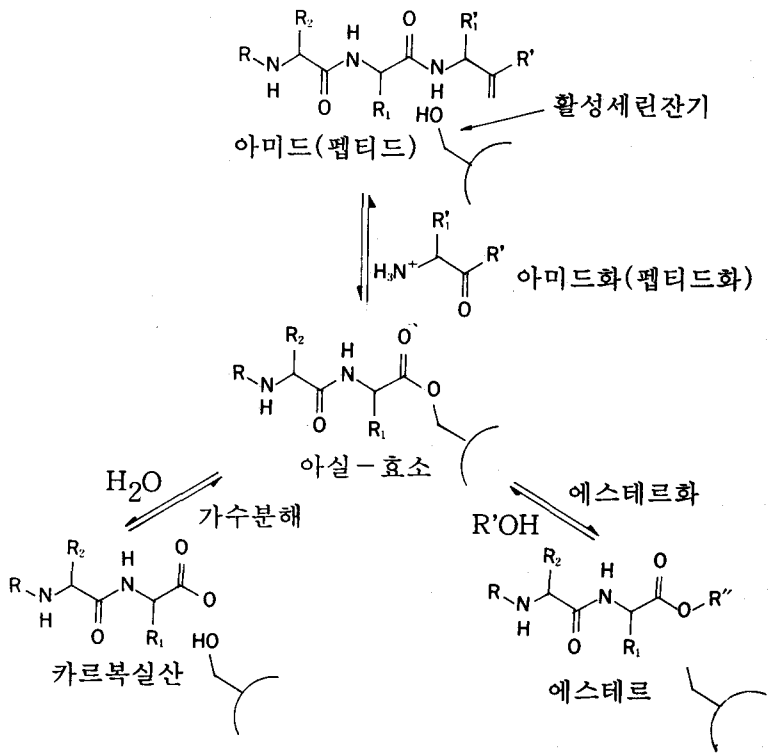
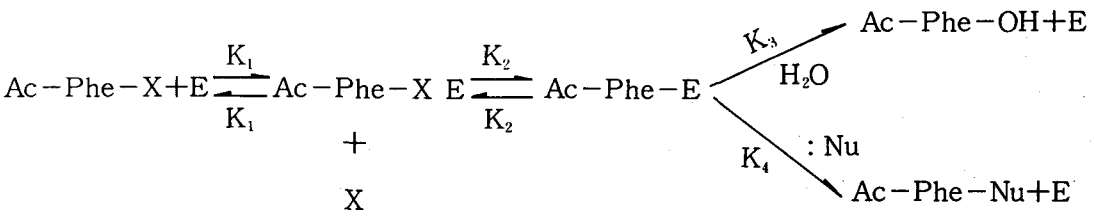


그림 2. 세린 protease의 촉매 기구



Ac-Phe-Nu가 생성된다. 여기서 친핵체가 아미노산 혹은 펩티드일 경우에는 새로운 펩티드 결합이 형성되며, 알코올일 경우에는 에스테르화로 반응이 진행된다. 이들 반응 경로는 생리적 조건을 에너지-도표(energy-diagram)상에 나타내면 그림 3.과 같다.[22]

아미드(펩티드)와 카르복실산을 비교하면 카르복실산 쪽이 보다 안정하기 때문에 아실화 효소는 아미드(펩티드)로부터 보다 빨리 생성된다. 불안정한 아실화 효소는 반응계 중에 높은 농도(55M)로 존재하고 있는 물과 빠르게 반응하며 카르복실산을 생성한다. 전체반응은 발역적(△H)이므로 아미드

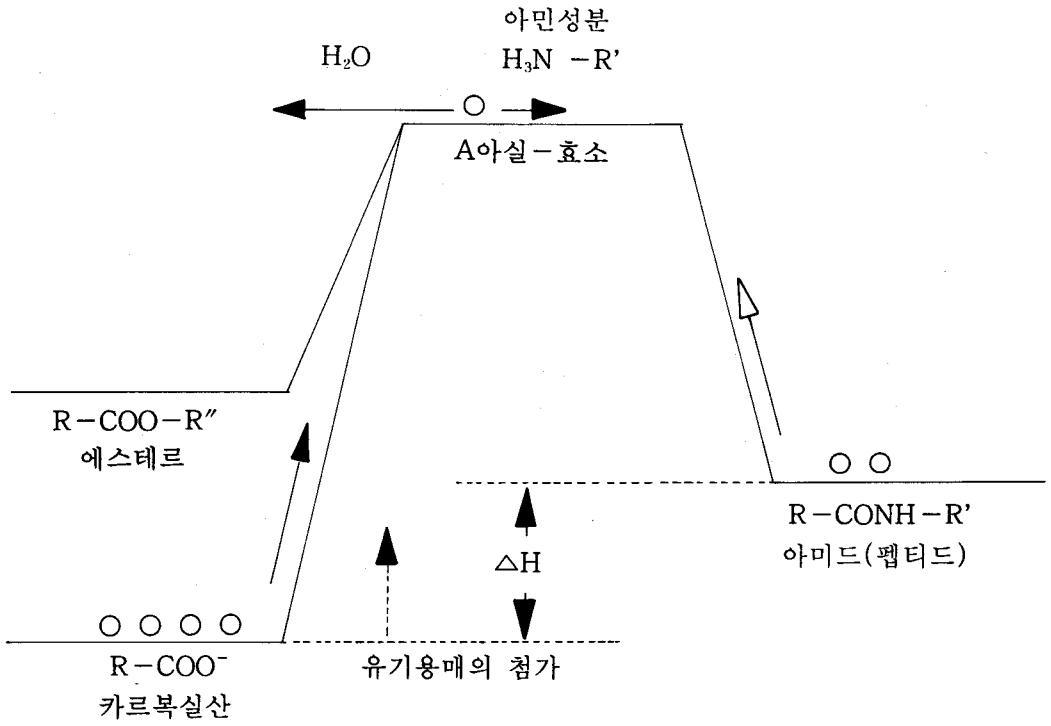


그림 3. Protease가 촉매하는 펩티드의 가수분해 및 카르복실산의 아미드화 반응의 에너지 다이아그램

의 가수분해 쪽으로 진행될 것이다. 그럼 어떻게 하면 이 serine protease에 의한 펩티드의 가수분해를 역반응인 합성쪽으로 변화시킬 수 있을까?

첫째로 생각되는 것은 아실화 효소를 아민(아미노산)에 포착시킬 수 있으며 펩티드 합성으로 유도될 것이므로 아민성분을 과잉으로 첨가하여 아민의 농도를 높여야 한다. 표 3.에 나타낸 것은 아래 식의 반응에 있어서 아민성분(로이신 아미드)의 농도를 변화시킬 때에 dipeptide의 합성율이 어떻게 변화되는가에 대한 Tauzuki 등[23]에 의해 조사된 결과이다. 아민성분의 농도를 0.05 M에서 2M까지 증대시키면 합성율을 0에서 약 50%까지 상승시킬 수 있다. 이것은 열역학적으로는 위의 식의 평형을 질량작용법칙에 의해 합성방향으로 변했다고 해석할 수 있다.

둘째로는 아실화 효소와 물과의 반응속도가 떨어지는 반응계에 물과 혼합할 수 있는 유기용매를 고농도로 첨가하는 방법이다. 물의 농도가 감소하여 아민성분과의 반응,

$$Z-Arg-OH+H-Leu-NH_2 \xrightarrow[pH\ 6.5]{trypsin} Z-Arg-Leu-NH_2$$

표 3. 트립신에 의한 펩티드 합성반응[a]에 미치는 아민 성분의 농도 영향과 유기용매 효과

H−Leu−NH_2 농도(M)	합성율 (%)	디메틸포름아미드 (%)	합성율 (%)
0.05	0	0	11
0.2	5	10	17
0.5	11	20	34
1.0	40	30	39
2.0	49	50	46

a) 반응에는 0.05M의 기질, Z−Arg−OH를 사용, 0.02mM의 트립신에 의해 37℃에서 20시간

즉 아미드화(펩티드 합성)가 증가하게 된다. 표 3에서 조금 전의 예와 같은 trypsin에 의한 dipeptide 합성에 있어서 디메틸포름아미드(dimethylformamide)의 효과를 나타내었다. 50%의 디메틸포름아미드를 사용하면 0.5M의 로이신 아미드를 아민성분으로서 합성율을 11%에서 50%정도까지 개선시킬 수 있다. 여러 종류의 유기용매를 비교하면 같은 농도에서도 용매의 종류에 따라 다른 효과를 얻을 수 있고, 유기용매 첨가가 물농도를 떨어뜨릴 만큼 작용하지 않는 것은 확실하다. Homandberg 등[16]이 유기용매를 첨가하여 카르복실산의 pKa가 상승됨을 밝혔다. 이것은 카르복실기가 해리되기 어렵게 된다는 것을 의미하고, 유기용매 첨가의 효과는 에너지 단위를 밀어 올려 아미드화(펩티드 합성)와의 에너지차 △H를 적게 한다고 생각된다(그림 3). 그림 3의 도표(diagram)에서 보다 높은 에너지 준위에 있는 에스테르에서 출발하면 카르복실산에서 보다도 상당히 빠른 반응속도로 아미드화(펩티드 합성) 효소가 생성되어 아미드화(펩티드 합성) 또는 가수분해로 진행하는 것을 이해할 수 있다. 이 경우 아미드화 가수분해와의 비율을 결정하는 것은 아실화 효소와 아민 성분과의 반응속도(Va) 및 아실화 효소와 물과의 반응속도)(Vh)의 비(Va/Vh)만으로 되고 이것을 반응속도론적 조절에 의한 합성이라 한다. 속도(Vh)의 비(Va/Vh)만으로 되고 이것을 반응속도론적 조절에 의한 합성이라 한다. 펩티드 합성에서 반응을 진행시키기 위한 구체적인 방법은 카르복실산에서 출발한 경우와 같이 고농도의 아민성분 및 유기용매의 첨가를 생각할 수 있다. 이러한 반응속도론적 조절에 의한 합성은 반응시간이 수분정도로 아주 짧고 생성물이 다시 가수분해하는 가역반응이 이루어지지 않는다는 장점이 있으나 thermolysin이나 carboxypeptidase와 같은 금속−protease는 촉매하지 않는다는 제약이 따른다.

4. 펩티드 합성 설계

펩티드 합성을 실시하기 위해서는 먼저 아미노산 혹은 펩티드의 유도체를 합성하여야 한다. 아미노산은 분자내에서 아미노기와 카르복실기가 공존하고 있으므로 펩티드를 합성할 때는 이들 기(group)에 보호기의 도입이 필요하다. 예를 들어서, alanine과

glycine으로 dipeptide를 합성시킬 때 보호기의 도입이 없을 경우 다음과 같은 축합물이 생성된다.

이와 같이 아미노산 배열이 달라지므로 dipeptide가 갖는 활성도 달라지게 된다. Amino기의 보호를 위해서는 주로 benzylchloroformate($C_6H_5CH_2OCOCl$), di-tert-butyl carbonate($(CH_3)_3CCOOCOC(CH_3)_3$), 초산(CH_3COOH) 등이 이용되고 있으며 카르복실기에는 암모니아(NH_3), 에탄올(CH_3CH_2OH) 그리고 tert-부탄올 등이 사용되고 있다. 보호기와 용해도와의 관계는 표 4에서와 같이 초산과 암모니아를 도입시킨 유도체의 용해도가 매우 높다.[14]

이와 같이 아미노산 유도체를 합성시킨 후 protease에 의한 펩티드 결합을 합성하게 되는데 이것은 Kimura 등[24]에 의해 합성된 Leu-enkephalin을 예를들어 보면, 그림 4.와 같이 Z-Gly과 Gly-OBu^t를 papain으로 합성하여 Z-Gly-Gly-OBu^t를 생성시킨 후 H_2/Pd를 촉매제로 첨가하여 Gly-Gly-OBu^t를 만든다. 여기에 다시 Z-Try과 Gly-Gly-OBu^t를 α-chymotrypsin으로 반응시켜 Z-Tyr-Gly-Gly-OBu^t를 생성시킨 다음 OBu^t를 제거하기 위하여 개미산(HCOOH)을 첨가시킴으로써 Z-Try-Gly-Gly을 제조할 수 있다. 한편 Z-Phe과 Leu-OEt는 thermolysin 존재 하에서 Z-Phe-Leu-OEt를 생성시키고 여기에 HBr/CH_3COOH를 첨가하여 Phe-Leu-OEt로

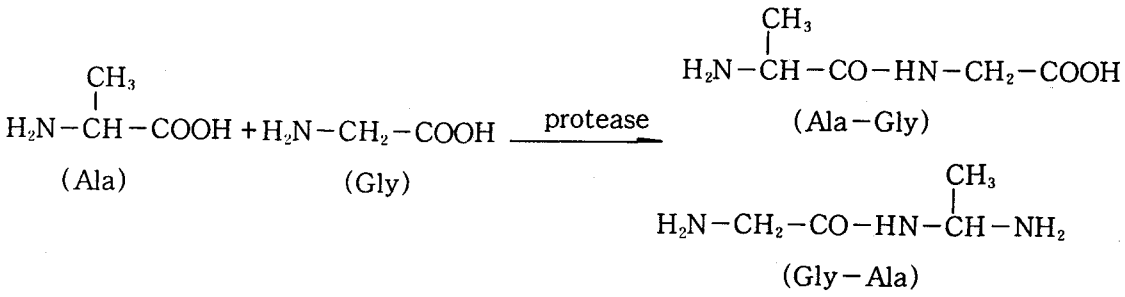


표 4. 화합물의 용해도와 보호기의 종류

화 합 물 *a	용 해 도 (μM) *b
Ac-Phe-Leu-NH_2	10^4(물)
Z-Phe-Leu-NH_2	27
Z-Phe-Leu-OEt	17
Z-Phe-Leu-OBu^t	1.7
Z-Phe-Leu-NHC_6H_5	0.8
Z-Phe-Leu-ODPM	0.03

*a : 약호 Ac, acetyl ; Z, benzyloxycarbonyl ; OEt, ethylester ; OBu^t, t-butylester ; ODPM, diphenylmethlester.

*b : 10% dimethylformamide를 함유, pH 7.0

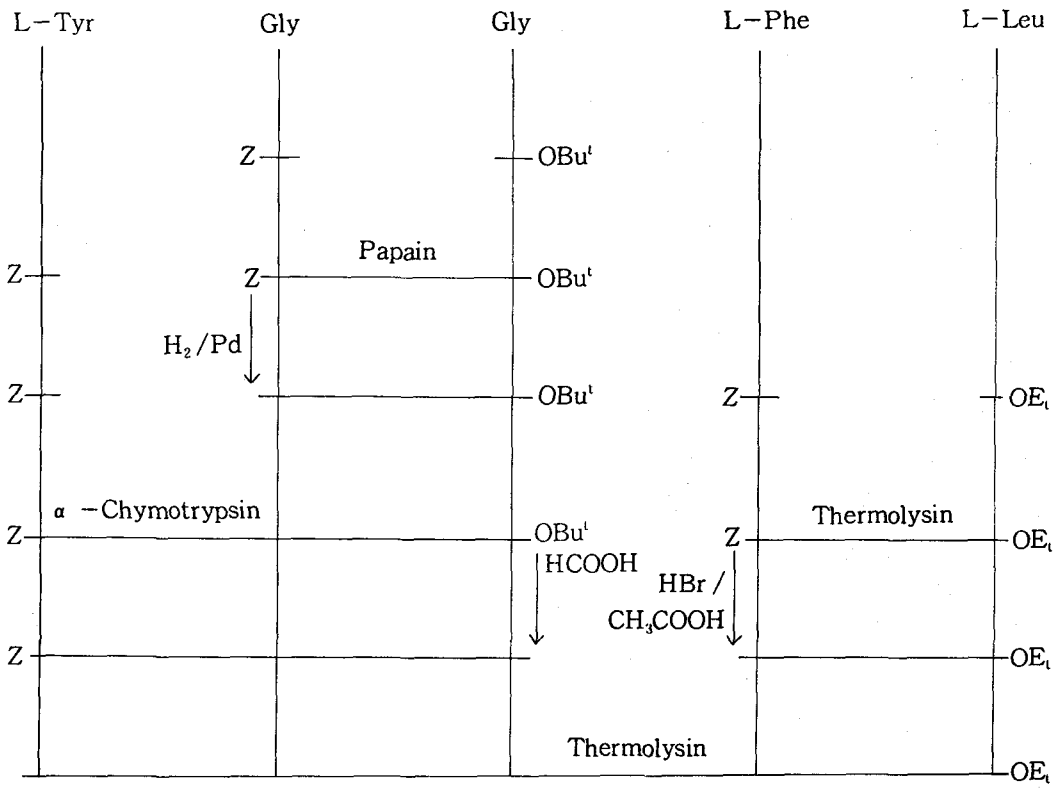


그림 4. Leu-enkephalin 전구체의 효소적 합성 설계
Z는 아미노 말단의 보호기, OB^{t}와 OEt는 카르복실 말단의 보호기. L-Tyr과 Gly 그리고 Gly과 Gly의 펩티드 결합은 α -chymotrypsin과 papain에 의하여 각각 합성하였다. 또한, L-Phe과 L-Leu-OEt 그리고 Gly과 L-Phe은 thermolysin에 의하여 결합이 형성되었다. 화살표는 보호기의 제거를 의미한다.

제조한다. 끝으로 Z-Try-Gly-Gly과 Phe-Leu-OEt를 thermolysin으로 합성하면 Leu-enkephelin 유도체인 Z-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-OEt이 생성된다.

이때 반응물과 축합물에 대한 분석은 고속액체크로마토그래피(HPLC)로 분석 가능하며 이동상 용매로서 인산으로 pH를 2.5로 조절한 acetnitrile/water(60/40, V/V)를 사용하여 UV검출기로 254nm에서 측정하면 벤젠 환을 가진 N-benzylry carbonyl, tyrosine과 phenylalanine 잔기 등의 함량을 측정할 수 있다.

한편, 펩티드 합성에 대한 수율을 향시킬 목적으로 수용액/유기용매 이상계를 이용하여 장기간의 연속반응이 가능할 수도 있다.[25] Nakanishi 등[26]은 초산 에틸을 사용한 고정화 thermolysin에서 aspartame 전구체(A-AspPhe-OMe)의 연속합성을 시도하였다. 여러가지 문제점을 해결하여(고정화 효소) 95%수율로 적어도 500시간 연속운전은 가능하였다. 반응 후의 고정화 thermolysin의 잔존활성은 75~100%였다.

표 5. 효소와 고정화 효소가 펩티드 합성수율에 미치는 영향

합 성 물	수 율 (%)		효 소
	효 소	고정화 효소	
(1) Z−Lys−(Z)−Ile−OMe	100	100	thermolysin
(2) Z−Thr−Trp−OEt	73	43	papain
(3) Z−Thr−Trp−Val−NH_2	100	100	α−chymotrypsin
(4) Z−Leu−Phe−OMe	100	100	thermolysin
(5) Z−Met−Leu−Phe−OMe	100	100	thermolysin

Kimura 등[12]도 초산에틸을 사용하여 축합반응과 에스테르 치환반응을 조합시켜 연속적으로 tripeptide 전구체를 합성한 반응기의 이용을 검토하였다. 220시간에 걸쳐서 80%이상의 수율로 Z−Gly Phe Leu−NH_2의 합성이 가능하게 되었고 잔존활성도 고정화 thermolysin이 94%, 고정화 chymotrypsin이 100%였다.

효소법은 화학법에 비해 기질이 한정되어 있는 단점을 갖고 있다. 잘 조합시키면 적은 효소로 다종의 펩티드 합성이 가능하게 된다. 여기서 Kimura 등[24]은 3종의 범용되고 있는 protease만을 사용하여 영양학적 견지에서 필수 아미노산으로 구성된 펩티드를 합성하였다. 표 5는 유리 효소에 의한 이상계 반응과 고정화 효소에 의한 물포화 초산에틸 중 반응에서의 각 펩티드의 수율을 나타내고 있다. 어떠한 펩티드도 비교적 높은 수율로 얻을 수가 있어 이들 계가 소량 다품종의 생산시스템으로 될 가능성을 보였다. 이와 같이 수용액/유기용매 이상계를 이용하여 효율 좋은 반응기의 설계도 가능할 수 있다.

5. 유용한 기능성 펩티드의 합성

화학법의 경우와 마찬가지로 단계적 신장 또는 단편축합(fragment condensation)이 이용되고 있다. 전자의 경우 이미 기술한 carboxypeptidase Y를 사용한다. 그러나 이 효소의 이용도 대개 5~6 아미노산 잔기의 펩티드 사슬까지 합성할 수 있으며 그 이상의 크기로 되면 단편축합을 하는 연구가 대부분이다.

짧은 사슬의 펩티드 합성은 주로 침전계에서 행하여도 문제는 별로 없다. 합성능이 강력하여 평형론적 및 속도론적 조절반응을 적용할 수 있고 특이성이 넓은 papain을 많이 이용한다.

한편 단편축합은 2차분해의 염려가 있기 때문에 최종 합성단계에서 그런 점을 충분히 고려해야 한다. 그런 점에서 특이성이 좁은 효소(예를들면 trypsin)가 추천된다. 또 속도론적 조절반응은 합성속도가 2차분해의 그것보다도 훨씬 빠르기 때문에 유리하다. 지금까지 효소적으로 합성된 유용한 기능성 펩티드 중 식품과 의약분야에 관심이 있는 몇가지 예에 대하여 소개한다.

Aspartame(Asp−Phe)은 식품분야의 기능성 펩티드 중 대표적인 것으로 특유의 단맛을 가지고 있다. Nakanishi 등[27]은 Z−Asp와 Phe−OMe을 0.05M MES−NaOH 완충용액/초산 에틸의 이상계에서 thermolysin의 촉매반응에 의해 합성하였다. 이 상계에서의 합성은 수용계보다 반응속도에

서는 훨씬 낮았지만, 최대 수율은 높게 나타났다.

그외 Aso 등[28]은 papain을 이용하여 L-glutamic acid diethylester로부터 감칠맛이 강한 글루탐산 소중합체를 합성한 결과, 글루탐산 잔기가 5~9개인 펩티드의 수율은 80%이상이었다고 보고하였다. 한편, Aso[29]는 Ac-PhyLys이 슈크로오스 보다도 20배 강한 단맛을 가지고 있음을 확인하고, 이를 합성하기 위하여 Ac-Phe-OEt와 Lys-OR (R=에탄올, 부탄올 및 벤젠)을 α-chymotrypsin 촉매반응에 의하여 합성하였다. 그 결과는 리신잔기에 부틸 에스테르가 붙어 있는 것이 가장 높은 수율을 얻었으며, 또한 Lys-OBu은 Ac-Phe-OEt보다 2배이상 과량의 농도(molar)로 첨가한 것이 최대의 수율(약 75%)을 얻었다고 보고하였다.

Kyotorphin(Tyr-Arg)은 일본의 Takagi 등[30]에 의해 bovine brain에서 추출한 진통제 펩티드라는 사실이 밝혀져 이것을 필자의 연구실에서는 Ac-Tyr과 Arg-NH_2을 수용액/유기용매의 이상계에서 α-chymotrypsin 촉매작용에 의하여 합성을 시도한 결과, 유기용매로서 초산에틸을 사용하고, 이상계의 부피비가 15(수용액 : 유기용매=1 : 15)일 때 약 70%의 최대수율을 얻었다.[31] 현재 이들 펩티드의 연속적 생산을 위한 기술개발을 진행 중에 있다.

Leu-enkephalin(Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu)의 동력학적 조절 합성은 serine-exoprotease인 carboxypeptidase Y를 사용하여 펩티드의 C-말단으로부터 단계적인 부가방식에 의해 이루어진다.[13] 친핵체로서 보호기가 도입되지 않은 유리 아미노산을 사용하면 수율이 낮고 아미노산 에스테르를 사용하면 제어하기 곤란한 부가반응이 일어나므로 아미노산 아미드가 많이 사용되고 있다.

Dynorphin(Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg-Ile)은 Leu-enkephalin의 C-말단이 연장된 것으로 papain, chymotrypsin과 trypsin을 촉매로 하여 평형 및 동력학적 조절 합성법을 조합하여 합성한다.[32] 이 목적을 위해 4개 잔기의 펩티드를 각각 효소법으로 합성하고 두개의 tetrapeptide 조각을 축합시켜 제조한다. Boc-Tyr(Bzy)-Gly-Gly-Phe-OEt와 Leu-Arg-Arg-Ile-NH-NH-C_6H_5의 두 펩티드를 chymotrypsin으로 합성시키면 부분적으로 봉쇄된 octapeptide가 생성되며 후에 보호기를 제거하면 생리활성이 있는 dynorphin을 얻을 수 있다. 카르복실기에 대한 보호기는 일반적으로 phenylhydrazide인데 이는 papain 촉매하에 Boc-아미노산으로 도입될 수 있다. 이는 산화시켜 제거할 수도 있고 에스테르로의 전환도 가능하다.

Eledoisin(hexapeptide)은 사염화탄소/완충용액으로 이루어진 이상계에서 papain과 chymotrypsin을 사용하여 합성할 수 있다. 이상계는 평형에 영향을 미치기 위해서가 아니라 완충용액에 용해된 효소가 높은 활성을 나타내도록 또한 유기용매에 기질의 분해도가 높도록 하기 위해서 사용된다. 전체 반응물 부피는 수용성 보조용매를 사용할 때보다 적으므로 수율을 높일 수 있다. C-말단 dipeptide는 thermolysin 촉매에 의해 얻을 수 있는데 동력학적 조절 축합법의 평형을 생성물인 Z-Leu-Met-NH_2가 유기용매상으로 추출되므로 생성물 합성쪽으로 이동된다.[33]

δ-수면 유도 펩티드의 합성은 대부분의 펩티드 결합의 결합반응에 papain을 사용하는 것이 특징이다. Papain의 넓은 특이성과 평형론적 또는 속도론적 조절반응을 교모하게 이용한 반응 예이다. 단, Trp-Ala의 결합은 α-chymotrypsin을 사용한다.

사람의 인슐린은 돼지의 인슐린의 B-

chain 30위치의 alanin을 threonine으로 치환시킴으로써 조제할 수 있다. 이같은 변환은 최초 화학법에 의해 시도되었지만 Inouye 등[8]은 효소적 합성에 성공하였다. 이 방법은 돼지의 인슐린에 trypsin을 작용시켜 des-octapeptide(B23-B30)-insulin(DOI)를 조제하고 이것과 사람형 octapeptide와 고농도의 가용계에서 trypsin을 사용하여 평형론적

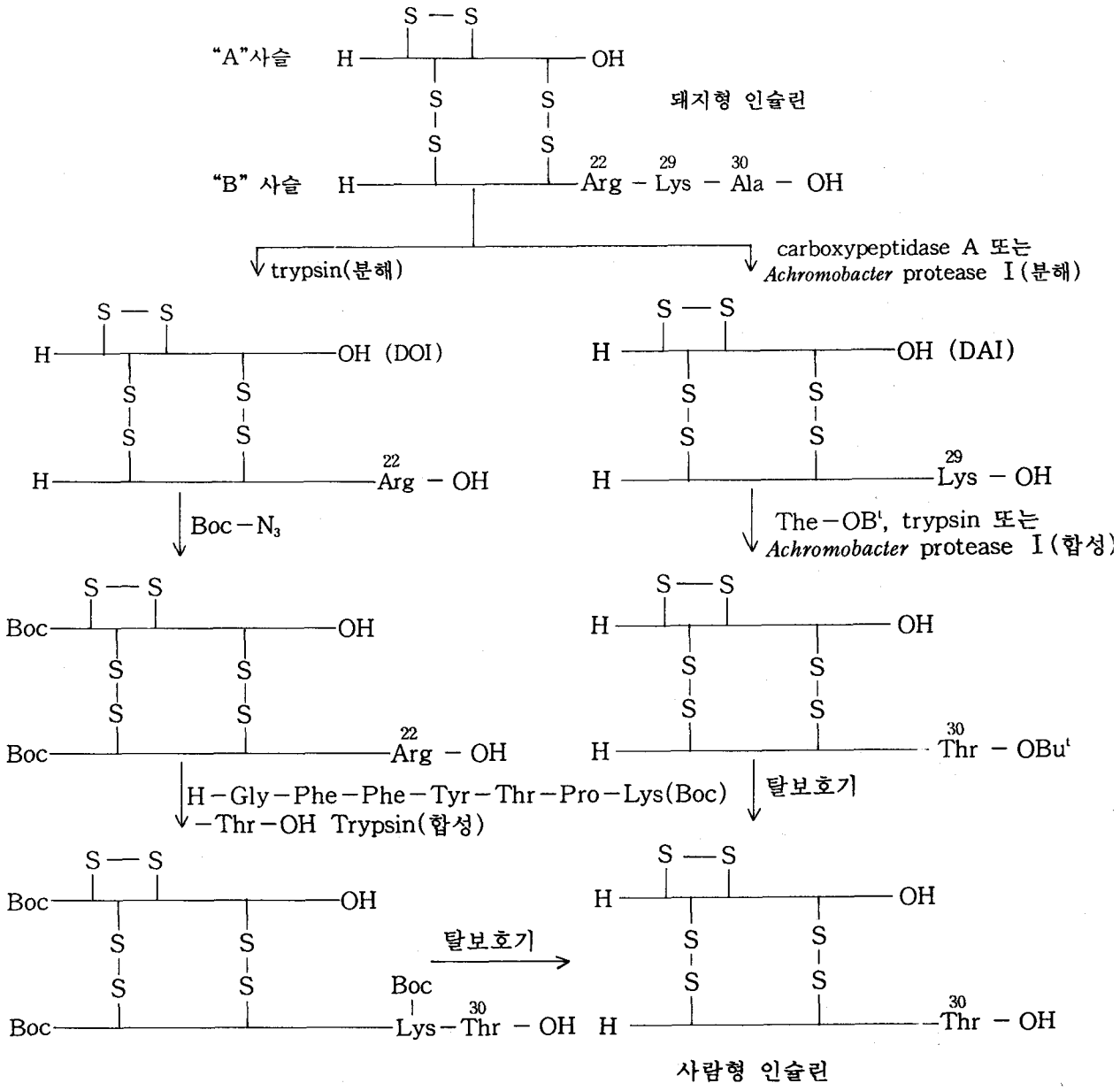


그림 5. 돼지형 인룰린을 사람형 인슐린으로 변환하는 효소적 합성 과정

조절반응으로 합성한 후 탈보호 처리하여 사람의 것고 같은 인슐린을 얻었다. 이와 같은 방식의 반합성은 이미 화학적으로 시도된 바 있지만 그것에 비해 수율을 현저하게 상승시켰을 뿐만 아니라(10~50%), 부산물의 생성이 적어 정제가 매우 용이하다(그림 5).

한편, des-alanine-(B30)-insulin(DAI)을 돼지의 인슐린에 carboxypeptidase A 또는 *Achromobacter* protease를 작용시켜 거의 정량적으로 생성시킬 수 있다. 즉 DAI와 Thr-OBu^{t}를 trypsin[34] 또는 *Achromobacter* protease를 사용하여 평형론적 조절반응을 실시하면 거의 정량적으로 합성반응이 진행된다(그림 5).

Markussen[35]은 돼지의 인슐린에 trypsin을 작용시켜 한번에 B30 위치의 alanine을 threonine으로 교환하는 transpeptidation법의 개발에 성공하여 덴마크의 Novo社는 현재 이 방법을 이용하여 공업적으로 인슐린을 제조하고 있다.

5. 결 론

Protease를 사용한 펩티드 합성 연구의 재연붐이 일어난 것은 겨우 10년 정도밖에 안된다. 우연한 발견으로 시작된 연구였지만 지금까지 축적된 protease의 구조연구, 작용기작 또는 열역학적 연구가 그 이론적 뒷받침이 되어 합성반응을 평형론적 또는 속도론적 제어반응으로서 이해되기에 이르렀다. 또 종래의 합성반응은 침전계 뿐이었지만 그것이 이론적 뒷받침이 되어 이상계 또는 가용계에서의 합성반응도 가능하게 되었다. 때문에 효소법의 적용으로 펩티드 결합의 종류도 대폭으로 확대되었고, 새로운 특이성을 나타내는 효소의 발견과 서로 잘 어울려서 극히 특수한 예외를 제외하고 대개의 펩티드 결합은 효소법에 의해 촉매 가능하게 되었다.

그렇지만 30~50 아미노산 잔기 크기의 펩티드는 화학적 합성법으로, 그것보다 큰 단백질의 합성은 유전자공학의 이용이 주류로 되어 있다. 여기서 효소적 합성법은 어느 방면으로 이용되는 것이 유리한 책략일까? 먼저 전자의 펩티드 합성의 경우, 우선 화학적 합성법으로 대신한다고 생각하면 그것을 달성하기 위해서는 화학적 합성법의 우수한 장점을 화학자에게 충분히 이해시키고 또한 그 사용을 간편하게 할 필요가 있다. 이 때문에 앞으로 protease를 사용하기 쉬운 형(예를들면 고정화 효소의 조제)으로 하여 반응종류와 효소를 잘 선정하여 이를 조합한 새로운 공업적 시스템을 고안해야 할 것이다.

상업적 펩티드 합성은 그 목표를 40~100 아미노산잔기의 작은 단백질 합성으로까지 진행되고 있다. 이 크기의 펩티드/작은 단백질은 DNA조작 기술에 의해 효율 좋게 발현시키기에는 너무 짧고 반대로 펩티드 합성기에서 순도 좋게 만들기에는 너무 길다. 효소적 펩티드 합성이 이들 방법을 보충하여 작은 단백질 합성의 수단으로서 확립되는 것이 바람직하다.

수식 protease를 효소적 펩티드 합성에 이용하려는 움직임은 앞으로 더욱 가속화될 것이다. 특히 내유기용매성(耐有機溶媒性)이 높은 protease는 고농도의 유기용매 중에서는 가수분해효소로 작용하지 않고 아미드(펩티드) 결합 합성효소로서 작용할 것으로 기대되는데 이것이 실용화되면 반합성과 효소적 펩티드 합성을 크게 발전시킬 수 있을 것이다.

참 고 문 헌

1) Horowitz, J. Haurowitz, Biochemica. Et. Biophysica. acta., 33, 231(1959).
2) Barany, G. and Merrifield, R.B., In the Peptides, Vol.2, Gross, E. and Meienhofer, J., eds., Academic Press, New York, 1(1980).
3) Kasche, V., Michaelis, G. and Galunsky, B., Biotech. Lett., 13, 2, 75(1991).
4) Fruton, J.S., Adv. Enzymol. Relat. Areas. Mol. Biolo., 53, 239(1982).
5) Klibanov, A.M., Sanokhin, G.P., Martinek, K. and Berezin, I.V., Biotechnol. Bioeng., 19, 1351(1977).
6) Dordick, J.S., Enzyme Microb. Technol., 11, 194(1989).
7) Cramer, S.M. and Horvath, C., Biotech. Bioeng. 33, 344(1989).
8) Inouye, K., Watanate, K., Morihara, K., Tochino, Y., Emura, T. and Sakakibara, S., J. Am. Chem., Soc., 101, 751(1979).
9) 麻生慶一, 化學と生物, 28, 271(1990).
10) Kise, H. and Hayakawa, Enzyme Microb. Technol., 13, 584(1991).
11) Blanco, R.M., Alvaro, G. and Guisan, J.M., Enzyme Microb., Technol., 13, 573(1991).
12) Kimura, Y., Muraya, K., Araki, Y., Matsuoka, H., Nakanishi, K. and Matsuno, R., Argic. Biol. Chem., 54, 3331(1990).
13) Widmer, F., Breddam, K. and Johansen, J.T., Carlsberg Res. Commun., 46, 97(1981).
14) Morihara, K., Trends in Biotech., 5, 164(1987).
15) Oka, T. and Morihara, K., J. Biochem., 84, 1277(1973).
16) Fastrez, J. and Fersht, A.R., Biochemistry, 12, 2025(1973).
17) Martinek, K. and Semenov, A.N., J. Appl. Biochem., 3, 93(1981).
18) Zaks, A. and Klibanov, A.M., J. Biol. chem., 263, 8017(1987).
19) Nakanishi, K., Kinara, Y. and Matsuno, R., BIO/TECHNOLOGY, 4, 452 (1986).
20) Lilly, M.D., J. Chem. Technol. Biotechn, 32, 162(1982)
21) Nakanishi, K. and Matsuno, R., Eur. J. Biochem., 161, 533(1986).
22) 小久保利雄, 蛋白質 核酸 酵素 37(3), 419(1992).
23) Tsuzuki, M., Morihara, K., J. Biochem., 88, 669(1980).
24) Kimura, Y., Nakanishi, K. and Matsano, R., Enzyme Microb. Technol., 12, 272(1990).
25) Zaks, A. and Klibanov, A.M., Science, 224, 1249(1984).
26) Nakanishi, K., Kamikabo, T. and Matsuno, R., BIO/TECHNOLOGY, 3, 459 (1985).
27) Nakanishi, K., Kimura, Y. and Matsuno, R., Eur. J. Biochem. 161, 541 (1986).
28) Aso, K., Uemura, T. and Shiokawa, Y., Agric, Biol, Chem., 52, 2443(1988).
29) Aso, K., Agric, Biol, Chem., 53, 729 (1989).
30) Takagi, H., Shiomi, H., Ueda, H. and Amano, H., Nature, 282, 410 (1979).
31) 전유진, 부산수산대학교 석사학위청구

논문, (1993).
32) Kullmann, W., J. Org. Chem., 4 (1982).
33) Jonczyk, A. and Gattner, H.G., Hoppe-Seyler's z. Physiol. Chem., 362, 1591(1981),
34) Schmitt, E. and Gattner, H.G. Physiol, chem., 359, 799(1978).
35) Markussen, J., UK Patent Application GB 2069502 A(1981).

새질서 새생활로
명랑사회 이룩하자