

Neurokinin A와 그 유도체의 평활근 수축 활성

장태식 · 이봉헌[†] · 강신원

부산대학교 화학과

Smooth Muscle Contractile Activities of Neurokinin A and Its Derivatives

Tae-Sik Jang, Bong-Hun Lee[†], and Shin-Won Kang

Dept. of Chemistry, Pusan Nat'l Univ., Pusan 609-735, Korea

Abstract

Neurokinin A(NKA) and its derivatives ([Nle⁷]NKA, [Leu⁷]NKA) were synthesized by solid phase peptide synthesis method using Fmoc-TFA strategy and their smooth muscle contractile activities were measured to examine the structural effect of alkyl group at the 7th amino acid of NKA on the smooth muscle contractile activity. The smooth muscle contractile activities of [Nle⁷]NKA and [Leu⁷]NKA were only 5.64% and 1.55%, respectively when compared with NKA. This result suggested that the more exact three dimensional structure of the 7th amino acid as well as the whole message segment of NKA would be necessary to show the biological activity.

Key words : neurokinin A, smooth muscle contractile activity

서 론

1980년대 중반 포유류 유래의 tachykinin인 neurokinin A, B(NKA, NKB)가 발견되면서 이 부류의 신경 펩티드에 대해서 많은 연구가 이루어지게 되었다¹⁾. Neurokinin A는 돼지의 척수로부터 단리된 신경 펩티드로서 SP, NKB와 함께 tachykinin족에 속한다(Table 1). Tachykinin족 펩티드는 acetylcholine과는 달리 atropine에 의해 저해되지 않는 평활근 수축 작용²⁾과 심혈관 조절에 의한 혈압 조절³⁾, 타액 분비⁴⁾, 염증 발현 등의 생물 활성을 갖는다. 또한 신경의 탈분극, 통각의 전달 등에 관련성이 깊은 1차 지각 뉴런에 함유된 신경 전달 펩티드로 알려져 있다. 모르모트의 기관,

기관지 및 폐 등의 기도계에 있어서도 tachykinin이 존재하며, 기관지 천식의 중요한 원인 물질중의 하나라고 알려져 있다.

Tachykinin족 펩티드는 C-말단 쪽에 -Phe-Xaa-Gly-Leu-Met-NH₂라는 공통의 아미노산 배열을 가지고 있으며, -Xaa에 해당하는 아미노산이 NKA, NKB, KAS, ELE에서는 지방족 아미노산인 valine과 isoleucine인 반면, SP와 PHY에서는 방향족 아미노산인 phenylalanine, tyrosine이다. 또한 SP, NKA, NKB의 N-말단 쪽의 3-4개의 아미노산은 address segment라 하여 각 수용체를 인식하여 구별하는 역할을 담당하며, C-말단 쪽에 7개의 아미노산 잔기는 message segment라 하여 특유의 생물 활성을 나타낸다.

[†] Corresponding author

Table 1. Amino acid sequences of the natural mammalian and non-mammalian tachykinins

<i>Mammalian</i>	
SP	H-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln- <i>Phe</i> -Phe-Gly-Leu-Met-NH ₂
NKA	H-His-Lys-Thr-Asp-Ser-Phe-Val-Gly-Leu-Met-NH ₂
NKB	H-Asp-Met-His-Asp-Phe-Phe-Val-Gly-Leu-Met-NH ₂
Neuropeptide K	H-Asp-Ala-Asp-Ser-Ser-Ile-Glu-Lys-Gln-Val-Ala-Leu-Leu-Lys-Ala-Leu-Tur-Gly-His-Gly-Gln-Ile-Ser-His-Lys-Arg-His-Lys-Thr-Asp-Ser-Phe-Val-Gly-Leu-Met-NH ₂
Neuropeptide γ	H-Asp-Ala-Gly-His-Gly-Gln-Ile-Ser-His-Lys-Arg-His-Lys-Thr-Asp-Ser-Phe-Val-Gly-Leu-Met-NH ₂
<i>Non-mammalian</i>	
<i>Kassinin</i>	<i>H-Asp-Val-Pro-Lys-Ser-Ser-Asp-Gln-Phe-Val-Gly-Leu-Met-NH₂</i>
Eledoisin	H-Pyr-Pro-Ser-Lys-Asp-Ala-Phe-Ile-Gly-Leu-Met-NH ₂
Physalaemin	H-Pyr-Ala-Asp-Pro-Asn-Lys-Phe-Tyr-Gly-Leu-Met-NH ₂

NKA에 대하여 강한 감수성을 나타내는 GPT(guinea pig trachea) 평활근 수축 활성을 지표로 하여 여러 tachykinin 펩티드들에 대해 구조-활성간의 상관 관계를 연구한 것으로부터, ELE는 NKA보다 약 2배 정도의 활성을 나타냄이 보고되었으며⁵⁾, 이 NKA와 ELE에 있어서 message segment의 차이는 NKA의 제5위의 serine에 대하여, ELE는 aspartic acid, NKA의 제7위의 valine에 대해서는 ELE는 phenylalanine이다.

NKA에 있어서 제7위의 아미노산으로는 지방족 아미노산이 활성 발현에 필수적이며 또한 아미노산 잔기의 소수성보다는 아미노산 잔기의 지방성 결사슬의 크기와 구조 차이가 활성 발현에 더욱 더 중요한 것으로 판단되었다⁶⁾. 따라서 NKA의 제7위의 아미노산에 있어서 아미노산 결사슬의 소수성 -CH₂- 가지의 크기와 구조 변화가 활성에 미치는 영향에 대하여 계통적인 상세한 연구가 필요하였고, 아울러 특이적으로 활성이 높은 agonist의 개발을 기대하였다. 이를 위하여 본 연구에서는 우선 NKA의 제7위의 아미노산 잔기인 valine을 leucine로 치환한 [Leu⁷]NKA와 norleucine으로 치환한 [Nie⁷]NKA를 합성하고 GPT 평활근 수축 활성을 지표로 하여 아미노산 결사슬의 이러한 구조 변화가 활성에 미치는 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 재료 및 기기

본 실험에서 사용한 Fmoc(9-fluorenylmethoxycarbo-

nyl)-아미노산과 Fmoc-NH-SAL-Resin은 Watanabe사로 부터, N-hydroxy-benzotriazole(HOBT), diisopropylcarbodiimide(DIPCI), trifluoroacetic acid(TFA), 1,2-ethanedithiol(EDT), N-methyl-2-pyrrolidone(NMP)는 Junsei사로 부터 구입하여 사용하였다.

Waters 510 HPLC pump, Delta pak (5 μ , C18, 300A 3.9 \times 150mm) Column, Waters 990 photodiode array detector를 사용하여 합성 및 정제한 펩티드의 순도를 확인하였으며, Waters Delta Prep. 4000 Preparative Chromatography System, Delta pak (15 μ , C18, 300A 19 \times 300mm) Column, Waters 486 Detector, Waters 746 data module, Waters fraction collector를 이용하여 펩티드를 정제하였다. 아미노산 분석은 Pharmacia biochrom 20을 이용하였으며, 분자량은 FAB-MS(VG70-VSEQ Mass Spectrometer(VG, Analytical, UK))를 이용하여 확인하였다.

2. NKA 및 NKA의 유도체 합성

펩티드의 합성은 Fmoc-TFA strategy를 사용하는 고상법(solid phase peptide synthesis, SPPS)으로 합성하였다. 축합은 각 cycle당 resin에 대해 Fmoc-아미노산 3당량을 사용하였고, DIPCI와 HOBT로 carboxyl기를 활성화하고 축합하였다. 그리고 Kaiser test로 축합의 완결을 확인하여 반응이 완결되지 않았을 경우는 double coupling을 행하였다. Fmoc기의 제거는 20% piperidine/DMF로 행하였으며, resin으로부터 합성된 펩티드의 분리 및 결사슬 보호기의

제거에는 TFA/EDT/H₂O/TIS(92.5/2.5/2.5/2.5)를 사용하였다⁷⁾.

3. GPT 평활근의 조제

합성 펩티드들의 수용체에 대한 근육 수축 활성은 NKA에 대하여 강한 감수성을 나타내는 GPT의 평활근을 이용하였다. GPT는 400g 정도의 guinea pig의 뒷 머리를 타격하여 실신 시킨 후 빠른 시간 내에 20-25mm 길이의 기관을 떼어내었다. 기관에 부착되어 있는 지방과 조직 등을 제거한 후 평활근 반대쪽의 연결 부분을 세로로 절개하였다. 절개한 기관의 연결과 연결 사이를 약 1.5-2.0mm의 폭으로 가로로 잘라 평활근이 손상되지 않도록 주의하여 단편을 2개씩 직렬로 실로 연결하여 근육 표본으로 하였다.

4. GPT 평활근의 수축 활성 측정

GPT 평활근 수축 활성은 System 1000 power supply model-DI 205 card-cage, model PM-1000 transducer amplifier, force transducer F30 type 372(range : ±0.3N (±30g), input max. : 5V-1kohm) WindaQ demonstration system을 이용하여 다음 과정으로 측정하였다(Fig. 1).

조제한 GPT 평활근을 Krebs 용액(NaCl 120mM, KCl 4.7mM, NaHCO₃ 250mM, MgCl₂ 1.2mM, CaCl₂ 2.5 mM, glucose 5.55mM)이 담긴 organ bath에 매달아 95% O₂-5% CO₂의 혼합 가스를 주입하면서 온도를 37°C로 유지하였다. 20분 간격으로 Krebs 용액을 교환하고 1.0g의 장력을 걸면서 1-2 시간 동안 평형화하였다. 평형화된 평활근에 대하여 10⁻³M의 carbachol의 투여를 3회 반복하여 평활근의 수축 활성을 확인하면서 근육을 training시켰다. 합성된 펩티드들을 소량의 DMSO에 녹인 후 생리 식염수로 정량적으로 희석하여 농도별로 누적 투여하였다. 근육의 수축을 isometric muscle transducer로 검출, 증폭하여 기록하였으며 NKA의 활성을 기준으로 하여 각 펩티드의 평활근 수축 활성을 측정하였다.

결과 및 고찰

1. NKA 및 NKA의 유도체 합성

NKA 및 NKA의 유도체들을 고상법으로 합성하였고 수

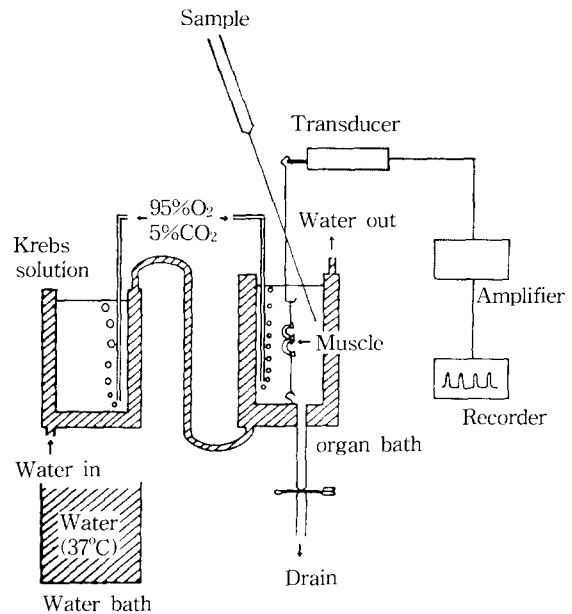


Fig. 1. Test system for the smooth muscle contractile activity.

지는 Fmoc-NH-SAL-Resin을 사용하였다. 합성된 정제되지 않은 펩티드들을 RP-HPLC로 214nm에서 분석한 후 prep. HPLC를 이용하여 정제하고 펩티드 분석용 컬럼을 이용하여 순도를 확인하였다. 그 결과들을 Fig. 2, 3, 4에 나타내었다. 정제된 펩티드들을 6N HCl로 22시간 동안 가수 분해시켜 아미노산 조성을 분석하여⁸⁾ 각 펩티드의 아미노산 조성이 디자인된 펩티드와 일치함을 확인하였고 펩티드의 분자량은 FAB-MS를 이용하여 분자량이 일치함을 확인하였다.

2. GPT 평활근의 수축 활성

평형화된 평활근을 carbachol로 training시키고 정량적으로 희석한 펩티드 용액을 누적 투여하였다. 근육 수축 활성은 carbachol을 기준으로 한 NKA의 최대 수축 활성을 100%로 하여 각 펩티드의 농도별 누적 투여에 따른 수축 정도를 환산하였다. 누적 투여된 펩티드 용액들의 각 누적 투여 단계별 농도는 일정량의 용액에 대해 아미노산 분석으로부터 측정된 펩티드의 mol수로 부터 역산하여 결정하였다. 결과의 처리는 계산된 농도의 역 대수(-log[M])를 x축

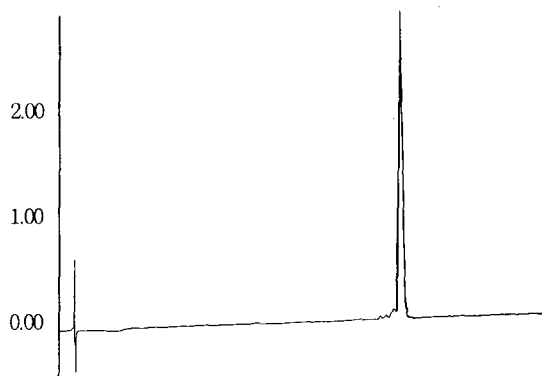


Fig. 2. HPLC profile of NKA.

Delta pak 5 μ , C18, 300A 3.9 \times 150mm Column
 Gradient : A - 0.1% TFA in H₂O (100 \rightarrow 60)
 B - 0.1% TFA in acetonitrile (0 \rightarrow 40)
 Flow rate : 1ml/min, Run time : 60min

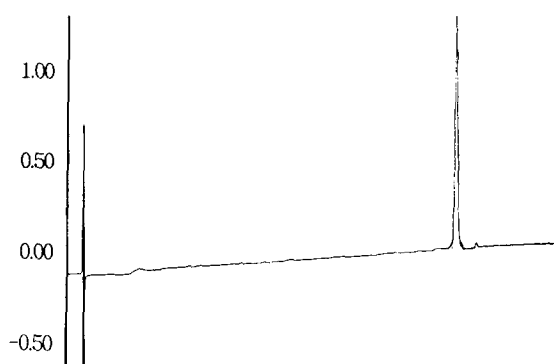


Fig. 4. HPLC profile of [Nle⁷]NKA.

Performed under the same conditions in Fig. 2.

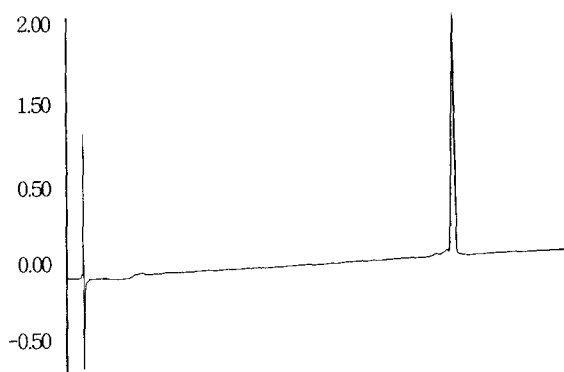


Fig. 3. HPLC profile of [Leu⁷]NKA.

Performed under the same conditions in Fig. 2.

으로, 환산된 수축 활성을 y축으로 하여 $-\log[M]$ concentration-response(100% NKA)에 대하여 도시하고(Fig. 5), 각 펩티드의 pD₂(최대 응답의 50%에 필요한 agonist의 몰농도의 $-\log$ 값) 값을 계산하였다. 결정된 pD₂ 값을 M 농도로 환산하고 NKA의 M 농도에 대하여 R.A.[NKA(100%)의 친화도의 분율로 표시한 상대적 친화도] 값을 구하여 Table 2에 나타내었다. 이들 합성된 펩티드들의 GPT 평활근 수축 활성은 NKA(R.A. = 100%) \gg [Nle⁷]NKA(5.64

%) \geq [Leu⁷]NKA(1.55%) 순으로 나타났다.

이상의 결과에서 부터 구조식만으로 보면 NKA의 제7위의 아미노산 잔기인 valine의 경우 그 결사슬의 β -탄소에 2개의 methyl기가 있으며, isoleucine은 β -탄소에 methyl기 및 ethyl기가 있고 leucine의 경우 γ -탄소에 2개의 methyl기가 있는데 비해 norleucine의 경우는 가지없는 결사슬인 점 등의 다소의 차이점은 볼 수 있지만, 구조식만으로 큰 차이점을 뚜렷이 구분하기 곤란하다. 그러나 이들 아미노산의 3차원 구조를 그려본 결과 각 아미노산이 입체적으로 많은 차이를 가짐을 볼 수 있었다. 한편 NKA의 address segment로 알려진 N-말단의 세 잔기가 제거된 NKA(4-10)의 경우 NKA에 비하여 265% 정도 활성을 나타내었는데⁹⁾, 이것은 NKA의 message segment만 존재하는 경우로 생각할 수 있으므로 이 사실과 본 연구의 결과들로부터 NKA의 제7위의 아미노산의 경우 리간드-수용체 상호 작용에 의한 결합이 이루어질 때 단지 소수성 환경만이 아니라 지방성 결사슬의 입체 구조의 작은 차이점도 구분될 정도의 정확한 3차원적 구조가 요구되며-마치 효소 반응에서 효소와 기질의 결합에 대한 lock-key model에서 처럼-message segment 영역 전체에 걸쳐서도 이 3차원적 정확성이 요구되는 것으로 추정된다. 그리고 address segment로 구분되는 부분이 단지 수용체의 각 subtype을 구분하는 역할 외에 리간드-수용체 결합 세기의 정도에도 관여하는 것으로 생각된다. 이러한 것에 대해서는 앞으로 활성과 3차원 구조와 관련된 더 상세한 mechanism 연구가 필요할 것으로 생각

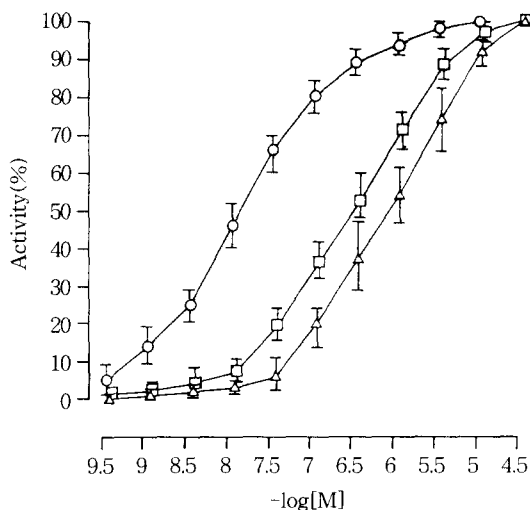


Fig. 5. Smooth muscle contractile activities of NKA and its derivatives.

(○) : NKA, (□) : [Nle⁷]NKA, (△) : [Leu⁷]NKA

Table 2. Smooth muscle contractile activities of NKA and its derivatives

peptide	pD ₂	R.A.(%)
NKA	7.91	100.00
[Leu ⁷]NKA	6.10	1.55
[Nle ⁷]NKA	6.66	5.64

pD₂ : -log of molar concentration of agonist needed to 50% of the maximal response.

R.A. : Relative affinity expressed as a fraction of the NKA affinity(NKA=100%)

E_{max} : Maximal effect expressed as a fraction of the maximal NKA response

되며 이상의 결과는 NKA의 생물 활성과 관련하여 antagonist의 디자인과 개발에 있어 유용한 정보가 될 것으로 생각된다.

요 약

NKA의 제7위의 아미노산에 있어서 결사슬의 구조가 평활근 수축 활성에 미치는 영향을 조사하고자 NKA와 그 유도체, [Leu⁷]NKA 및 [Nle⁷]NKA를 합성하고 이들의 평활근 수축 활성을 측정하였다. 펩티드의 합성은 Fmoc-TFA의 strategy에 의한 고상법(SPPS)으로 합성하였고 GPT 평활근 수축 활성 측정 결과, [Nle⁷]NKA 및 [Leu⁷]NKA는 NKA에 비하여 각각 5.64%와 1.55%로 낮은 활성을 나타내었다. 이러한 본 연구의 결과는 NKA가 생물 활성을 나타내기 위해서는 제7위의 아미노산의 경우 3차원적 구조의 정확성이 요구되며, 아울러 message segment의 영역 전체에 걸쳐서도 이 구조의 정확성이 요구된다고 생각된다.

참 고 문 헌

1. Christopher W. M., Alan C., David L. W., Jeffrey L. V., and Henry I. J., : *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **243**, 500-506 (1987).
2. 신승엽, Munekata, A., : *생화학뉴스*, **12**(4), 242-249 (1992).
3. Yukio T. : *Brain research*, 283-286.
4. Durcan F. R., Boonrut A., and Peter J. B., : *European Journal of Pharmacology*, **174**, 283-286 (1989).
5. Ha, J. M., Shin, S. Y., Hong, H. M., Suh, D. J., Jang, T. S., Kang, S. W., Kuean, S. J., and Ha, B. J. : *J. Biochem. Mol. Biol.* Vol **29**. pp 429-435
6. 장태식 : Neurokinin A 유도체들의 합성과 Guinea Pig Trachea에서의 수축 활성에 대한 연구, 부산대학원 학위논문 (1996).
7. NOVA Biochem, pp. S1-S65 (1997).
8. Bailey, P. D. : *An Introduction to Peptide Chemistry*, Wiley, pp. 67-81 (1992).
9. Shin, S. Y., Ha, J. M., Ha, B. J., Jang, T. S., Kang, S. W., and Munekata E., : *Kor. Biochem. J.*, **27**, 436-440 (1994).