

생물학적 자극 통제 수단으로 활용하기 위한 돼지 페로몬 성 냄새 물질의 탐색: N¹-allyl-N²-(tetrahydrofuran-2-ylmethyl)oxalamide 분자의 합성과 돼지의 발정 유도효과

박창식¹ · 송석오² · 임재삼² · 성민규³ · 성낙도^{3,*}

¹충남대학교 형질전환복제돼지연구센터, ²충남 축산기술연구소, ³충남대학교 농업생명과학대학 응용생물화학부

The Search of Pig Pheromonal Odorants for Biostimulation Control System Technologies: Synthesis of N¹-allyl-N²-(tetrahydrofuran-2-ylmethyl)oxalamide Molecule and Induction Effect of Pig Estrus

Chang-Sik Park¹, Suck-Oh Song², Jae-Sam Lim², Min-Gyu Soung³ and Nack-Do Sung^{3,*}

¹Research Center for Transgenic Cloned Pigs, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

²Chungnam Livestock Technology Research Institute, Cheongyang-Gun, Chungnam 305-764, Korea

³Division of Applied Biological Chemistry, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

ABSTRACT

To search a new pig pheromonal odorant, the N¹-allyl-N²-(tetrahydrofuran-2-ylmethyl)oxalamide molecule predicted by ligand based approach and molecular docking method was synthesized by nucleophilic addition-elimination reaction (Ad_{NU-E}) between N-allyloxalamic acid ethylester and tetrahydrofurylmethylamine. According to the evaluation results for efficiency of pig estrus control, the synthesized pig pheromonal N¹-allyl-N²-(tetrahydrofuran-2-ylmethyl)oxalamide molecule advanced the estrus by 11.3 days ($p < 0.05$) compared with the non-pheromone group. And from these results, it is predicted that the synthesized pig pheromonal compound will be able to increase the reproduction efficiency of pig.

(Key words : Pig pheromonal compound, N¹-allyl-N²-(tetrahydrofuran-2-yl-methyl)oxalamide, Induction effect of estrus)

서 론

오래 전부터 양돈 산업에서 번식조절 방법으로 인공수정 방법이 보편적으로 이용되고 있다(Lucas, 2003; Abeydeera 등, 1998). 근래에는 더 나아가 후대의 성별을 조절하여 번식을 조절하고자 특정 항체를 이용하여 정액 중, X와 Y 정자 세포를 분리하는 방법 및 초음파를 이용하여(Joerg 등, 2004) 실질적인 임신 여부를 진단하는 방법도 이용하고 있다. 또한, 정액의 장기간 보관을 위한 수정란 동결 방법의 개선 및 형질전환을 위한 복제기술 등이 돼지의 번식을 관리하고 조절하는데 활용되고 있을 뿐 아니라(Dobrinsky와 Johnson, 1994), 장기적인 목적으로 발정과는 별개로 번식 효율을 개선하기 위하여 일정량의 정액으로 정기적인 교배에 활용할 수 있는 프로토콜을 개발하는 연구도 진행되고 있다. 이러한 맥락에서 돼지의 발정을 유도하기 위하여 성선자극호르몬(GnRH)이나 황체 호

르몬이 사용되기도 하였으며(Knox 등, 2001), PMSG (Pregnant Mare Serum Gonadotropin)와 황체형성호르몬(LH)이 조합된(eCG 및 hCG 혼합물) PG600을 사용하여(Estienne 등, 2001) 초산돈의 첫 발정을 유도하고 모돈의 재귀 발정일을 단축시키는데 이용하고 있다. 또한, 황체 호르몬인 Matrix(Regumate)는 지금도 많이 사용되고 있다.

가축들을 생물학적으로 통제하는 활용성이 시사된(Rewok 등, 2001) 이후로 돼지 페로몬을 활용한 연구에 의하면 상품화된 SOA(Intervert, Millsboro Holland)를 돼지의 비경 주위에 분사하여 발정을 유도한 결과, 돼지의 재생산 효율이 개선되었다는 보고(Shrestha 등, 2001)가 있었다. 이외에도, Altrenogest (Regumate 또는 17 α -allyl-17 β -hydroxyestra-4,19,11-trien-3-one)을 사료에 혼합하여 투여하는 발정 동기화를 위한 다양한 기술들이 사용되고 있다(Horsley 등, 2005). 그러나 돼지 페로몬 스프레이(SOA)와 Altrenogest 등은 유효한 성분들이 모두 steroid계 화합물로서 합성이 난해하다. 따라서, 효과적으로 돼지의

*본 연구는 한국과학재단(KOSEF) 우수연구센터(ERC) 지원으로 이루어진 것임(R11-2002-100-05003).

† Corresponding author :Phone: +82-42-821-6737, E-mail: ndsung@cnu.ac.kr

발정을 유도하면서도 합성이 용이하여 수급이 안정적이고 경제적인 돼지발정 유도제가 요구되고 있다.

본 연구에서는 ligand based approaches (Akamatsu, 2002)와 molecular docking (Walter 등, 1998)에 기초하여 예측된(Soung 등, 2008) 돼지 페로몬성 화합물로서 *p*OBP (porcine odorant binding protein)에 높은 결합 친화력이 기대되는 *N*¹-allyl-*N*²-(tetrahydrofuran-2-ylmethyl)oxalamide 분자를 합성하고 돼지 발정유도 효과에 대하여 논의하였다.

재료 및 방법

시약 및 기기

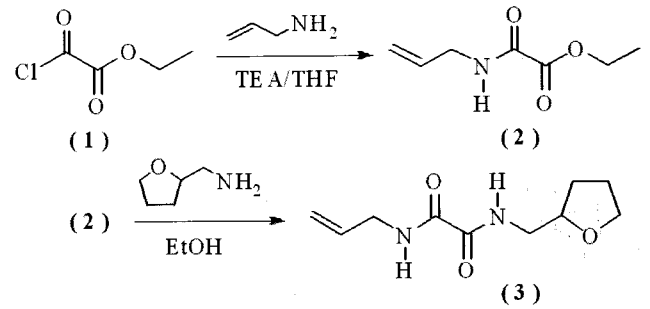
합성에 사용한 시약들은 모두 Aldrich 및 Fluka제의 1급 시약들이었으며, tetrahydrofuran (THF), ethylacetate, ethanol 및 기타 용매들은 가능한 한 정제하여 사용하였다. 화합물의 분리는 재결정 방법을 이용하였고 반응의 진행 여부를 확인하기 위한 TLC (Thin layer chromatography)는 precoated silicagel plate (Merck Co.)를 사용하였다. 그리고 합성물의 구조를 확인하기 위하여 ¹H-NMR spectrum은 Varian 400 MHz 모델로, 그리고 mass spectrum은 HP 1100 series LC/MSD 모델을 이용하여 EI 측정방법으로 측정하였다.

N-allyloxalamic Acid Ethylester (2)의 합성

출발 물질로 ethyloxalylchloride (1) 5.0 ml (44.9 mM)와 triethylamine (TEA) 12.5 ml (89.8 mM)를 무수 tetrahydrofuran (THF) 150 ml에 녹인 혼합 용액에 allylamine 3.4 ml (45.4 mM)를 무수 THF에 녹인 용액 60 ml를 0 °C에서 천천히 적가하고 강하게 교반시키면서 8시간 동안 반응시켰다. 미반응 물질의 추가 반응을 위하여 반응 혼합물을 실온에서 1시간 이상 더 반응시켰다. 그리고 그 반응 혼합물 용액을 감압 증발시키고 1N-hydrochloric acid 용액을 혼합한 후에 ethylacetate로 두 번 이상 추출하였다. 유기용매 층을 magnesium sulfate (MgSO₄)로 건조하고 감압 증발시켜 기름상 액체로서 *N*-allyloxalamic acid ethylester (이하 ethyl ester로 생략함) (2) 6.9 g (수율; 97 %)을 얻었다. 이와 같은 방법으로 얻어진 ethyl ester (2)는 정제하지 않고 다음 반응에 이용하였다.

N-allyl-*N*'-(tetrahydrofuran-2-ylmethyl)oxalamide (3)의 합성

Ethylester (2) 1.0 g (6.36 mM)과 tetrahydrofurylmethylamine 675 mg (6.67 mM)을 녹인 ethanol (100 ml) 용액을 8시간 동안 환류시켰다. 반응이 완결되도록 tetrahydrofurylmethylamine 0.3 ml (2.89 mM)를 더 가하고 30분간 추가적으로 반응시켰다. 반응이 완결된 것을 TLC를 통해 확인한 후, 반응 혼합물을 감압 증발시키고 잔사를 ethylacetate 20 ml로 희석하여 1N-hydrochloric acid 용액과 포화된 sodiumbicarbonate (NaHCO₃) 용액으로 세척하였다. 유기층을 magnesium sulfate (MgSO₄)로 건조하고 감압하에서 증발시켜 얻어진 고체 화합물을 *n*-hexane 용액으로 세척하여 백색 고체 *N*-allyl-*N*'-(tetrahydrofuran-2-ylmethyl)oxalamide (이하 oxalamide로 생략함) (3) 1.19 g (수율: 88%)을 얻었다.



Scheme. Synthetic process of *N*-allyl-*N*'-(tetrahydrofuran-2-ylmethyl)oxalamide (3) molecule.

시료저장 용액의 제조

Oxalamide (3) (분자량=214.25 amu.)는 소수성상수 (logP=-0.459)가 음의 값을 나타내는 극성이므로 수용성이 크다. 따라서 oxalamide (3) 1.454 mg (1.37×10^{-5} M)을 증류수 500 ml와 THF 0.1 ml를 혼합한 용매에 함께 녹여(Sung 등, 2008b) 상용화된 SOA(PBS) (0.28 mg/75 ml)와 동일한 농도(1.37×10^{-5} M) 조건의 저장 용액을 제조하였다.

돼지 발정유발 실험

합성된 페로몬 성 oxalamide (3)의 초산돈에 대한 발정 동기화 및 조절 효율성을 평가하기 위하여 앞에서 제조한 시료저장 용액으로 돼지 발정유발 실험을 실시하였다. 즉, 임신 둔방(stall)에 생후 8개월 이상이 경과한 성숙한 돼지(체중: $122.9 \pm 2.5 \sim 125.6 \pm 2.7$ kg) 암컷 1두씩을 개체 사양하면서 총 50두(랜드레이스 30두 및 요크샤 20두)에 대하여 각 개체별로 코 주위에 1일 오전 10시경 1회씩 1~2초간, 시료 저장 용액을 2주일 동안 분무 접촉시킨 후, 발정 징후를 60일간 육안 관찰하였다. 이 같은 실험은 충남대학교 동물사육장과 충청남도 축산기술연구소에서 각각 실시하였다.

결 과

돼지 페로몬성 분자

Ligand based approach 및 molecular docking에 의하여 예측된(Soung 등, 2008) 돼지 페로몬성 oxalamide (3)은 출발 물질로 ethyloxalylchloride (1)과 allylamine으로부터 합성된 ethyl ester (2) (수율 97 %)와 tetrahydrofurylmethylamine를 반응시켜 얻었으며, 전체 반응식을 Scheme에 나타내었다. 다음과 같은 기기분석 결과로부터 목적하는 화합물 oxalamide (3) (수율 88%)을 합성하였다. 한 예로, oxalamide (3)의 구조 확인을 위한 기기분석 근거로 ¹H-NMR spectrum을 Fig. 1에 나타내었다. M.p.: 297 °C, ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃/TMS) (δ) 1.5~1.9 (*m*, 4H, -CH₂-CH₂-), 3.2~3.4 (*m*, 4H, N-CH₂), 3.6~4.0 (*m*, 1H, -O-CH-), 3.7~3.8 (*m*, 2H, -O-CH₂-), 5.0~5.2 (*m*, 2H, -CH₂=), 5.7~5.9 (*m*, 1H, =CH-), 8.5 (*bs*, 1H, C(=O)NH), 8.8 (*bs*, 1H, C(=O)NH); LC/MS (EI), *m/z* (relative intensity) [M+H]⁺ (213).

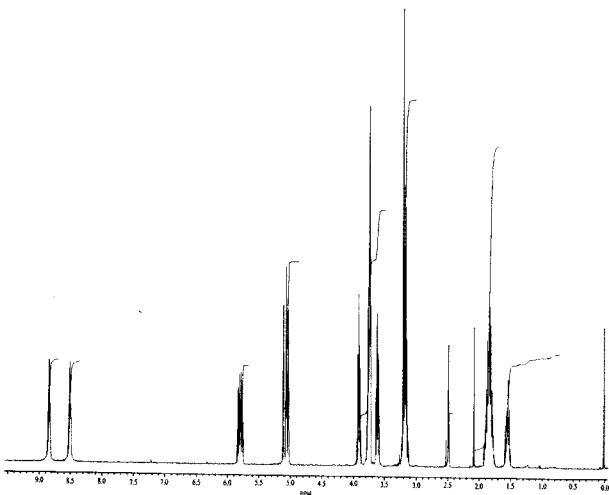


Fig. 1. ¹H-NMR spectrum of oxalamide (3) molecule in CDCl₃/TMS.

Table 1. Effects of synthetic pheromone on the onset of estrus in gilts

Items	Without pheromone	With pheromone ^{a)}
No. of gilts	25	25
Total gilts in estrus	22	23
Initial average weight of gilts (kg)	122.9±2.5	125.6±2.7
Onset of estrus after treatment (day)	25.2±3.4 ^{b)}	13.9±3.1 ^{c)}

^{a)}Concentration of synthesized pheromonal oxalamide (3) was 1.37 × 10⁻⁵M, ^{b,c)}Means±SE in the same row with different letters differ significantly (p<0.05).

돼지발정 동기화

초산돈의 발정유발에 관한 실험을 약 6개월 동안에 걸쳐서 3반복하고 그 결과를 Table 1에 정리하였다. 본 실험 결과에 의하면 돼지 페르몬성 oxalamide (3)을 처리한 구가 처리하지 않은 대조구(control)보다 약 11.3일 정도 발정이 앞당겨지는 결과를 나타내었으며(p<0.05), 발정을 유도하고 동기화하였다. 그리고 실험결과는 통계 프로그램(SAS; Ver. 9.1)을 이용하여 분산분석(ANOVA)을 실행하였으며, 분산분석 후 유의성이 나타나는 효과에 대하여 Student's t-test를 실시하였다(p<0.05).

고찰

돼지 페르몬성 분자의 합성

출발 물질인 ethyloxalylchloride (1)은 dicarbonyl 화합물로 친핵체인 allylamine과의 반응성이 매우 클 것으로 예상되었다. 왜냐하면, 강한 전자끌개인 dicarbonyl group 뿐만 아니라, 좋은 이탈기인 chloro group이 결합된 친핵성 첨가-제거반응(Ad_{NU}-E)의 중심인 carbonyl carbon

원자의 양하전에 대하여 입체장애가 없는 1차 아민인 친핵체의 친핵성 반응이 촉진될 것이기 때문이다. 이상의 반응은 유기염기로서 triethylamine (TEA)을 이용하여 ethyl ester (2)을 97%의 높은 수율로 얻었으며 정제하지 않고 다음의 2단계 반응을 수행하였다.

Ethyl ester (2)와 tetrahydrofurylmethylamine 분자의 반응으로 oxalamide (3)이 합성되는 제2단계의 반응도 제1단계의 반응과 같은 유형으로 진행된다. 즉, dicarbonyl 화합물인 ethyl ester (2)의 ester group내 carbonyl carbon 원자의 양하전에 대하여 친핵체로서 tetrahydrofurylmethylamine 분자의 친핵성 첨가-제거반응으로(Lowry, 1985) ethoxy group이 이탈하는 일련의 반응으로 백색 고체인 oxalamide (3)가 88% 수율로 합성되었다. 제 2단계 반응은 ethyl ester (2)에서 좋지 않은 이탈기로 알려진 ethoxy group이 이탈할 뿐만 아니라, 친핵체로서 allylamine보다 입체장애가 큰 tetrahydrofurylmethylamine 분자가 반응하므로 반응속도가 느리게 진행될 것으로 예상되어 환류시켜 빠르게 반응을 진행시켰다. 따라서 본 반응은 전체적으로 반응과정이 매우 짧고 빠르게 진행되므로 목적하는 물질을 효율적으로 단 시간내에 합성할 수 있는 장점을 가지고 있다. 따라서 최종 생성물인 oxalamide (3)은 합성이 용이하므로 수급이 안정적인 뿐만 아니라, 경제적인 생산이 가능하다.

한편, Virtual screening을 적용하여(Lengauer 등, 2004) 기질 분자로서 oxalamide (3) (부피: 182.0 Å³)을 돼지 페로몬(5 α-androst-16-en-3-one 및 5 α-androst-16-en-3-ol)의 수용체인 lipocalin (1GM6)의 X-ray 구조에 대하여 분자 도킹한(Sung 등, 2008a) 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 이에 따르면 oxalamide (3)이 boar salivary lipocalin (Spinelli 등, 2002)의 반응점(biophore)에 도킹되었을 경우, docking score는 -38.1 kcal/mol이었으며 기질-수용체 사이의 결합이 안정적으로 잘 이루어지고 있음을 설명하고 있다. 이때 기질-수용체 두 화합물 사이에는 입체적(steric), 정전기적(electrostatic), 소수성적(hydrophobic) 및 H-결합(H-bond acceptor 및 H-bond donor) 효과 등이 관여하여(Schneider 등, 2007) 착 화합물을 형성한다.



Fig. 2. Docking poses of oxalamide (3) (Volume: 182.0 Å³ & Docking score: -38.1 kcal/mol.) as substrate molecule in boar salivary lipocalin (1GM6).

저장 용액 및 돼지 발정 동기화

시료인 oxalamide (3)의 저장 용액을 사용하여 돼지 발정 동기화 실험결과를 Table 1과 같이 정리하였다. 또한, 초산돈의 발정 동기화를 평가하기 위하여 모두 50두의 초산돈(랜드레이스 30두 및 요크샤 20두)을 대상으로 조사하였다. 그 결과, 발정 효율은 대조구에서는 88.8% 그리고 처리구에서는 92.0%를 나타내어 합성 페로몬에 의한 발정효율은 3.2% 정도로 차이가 없었다. 그러나 발정 개시일을 조사한 결과에 의하면 대조구에서는 약 25.2일 그리고 처리구에서는 약 14일이었다. 그러므로 발정 개시일은 약 11일 가량이 단축되는 것으로 나타났다. 따라서 처리구와 무처리구 간에는 현저한 차이가 인정되었으나 품종간에는 차이가 인정되지 않았다는 보고(Sung 등, 2008b)와 잘 일치한다. 또한, 돼지의 품종과 무관하게 초산돈의 발정일을 유의적으로 단축시켜 발정 동기화를 유발할 수 있으므로 번식돈의 번식효율 향상 및 관리 비용을 절감할 수 있음을 입증하였다.

본 실험에서는 초산돈의 발정 동기화에 대한 효과만을 예시하였으나, 동일한 작용 메카니즘에 의하여 모돈의 재귀 발정일 역시 단축될 것으로 기대된다. 따라서 oxalamide (3)을 유효 성분으로 함유하는 발정동기화 조절용 약학적 조성물은 초산돈의 번식효율을 향상시킬 뿐만 아니라, 노동력을 감소시킴으로써 양돈 경영의 효율성을 높일 수 있을 것으로 판단된다. 또한, 여기에서는 초산돈만을 대상으로 페로몬성 물질의 발정 동기화에 대한 효과를 검증하였다. 그러나 소에서 분리 정제한 OBP 단백질에 대한 결합활성을 분석한 결과, 특이적으로 두 종간의 활성관계가 10배 이하로 유사하였다(Dal Monte 등, 1993). 이 같은 근거에 기초하여 돼지의 발정조절 활성을 갖는 페로몬성 oxalamide (3)이 소와 같은 다른 경제성 동물의 발정 동기화에도 적용할 수 있을 것으로 기대된다. 그러므로 본 연구에서 합성된 돼지 페로몬 성 oxalamide (3)를 유효 성분으로 함유하는 조성물은 돼지 및 소의 발정 동기화를 유발하여 번식효율 향상 및 관리 비용 절감에 효과적으로 이용될 수 있을 것이다.

다음 연구로는 돼지와 소의 OBP 단백질에 대하여 관측된 tetrahydrofuryl-2-yl계 화합물들의 결합 친화력상수 ($Obs.p[Od]_{50}$)(Dal Monte 등, 1993)에 기초한 분자도킹(molecular docking)과 2D-QSAR 분석(Park 등, 2007) 결과로부터 고효성 분자들을 예측하여 보고하고자 한다.

인용문헌

1. Abeydeera LR, Wang WH, Cantley TC, Prather RS, Day BN (1998): Presence of b-mercaptoethanol can increase the glutathione content of pig oocytes matured *in vitro* and the rate of blastocyst development after *in vitro* fertilization. *Theriogenology* 50: 747-756.
2. Akamatsu M (2002): Current state and perspectives of 3D-QSAR. *Curr Topics Med Chem* 2:1381-1394.
3. Dal Monte M, Centini M, Anselmi C, Pelosi P (1993): Binding of selected odorants to bovine and porcine odorant-binding proteins. *Chem Sences* 18:713-721.
4. Dobrinsky JR, Johnson LA (1994): Cryopreservation of porcine embryos by vitrification: A study of *in vitro* development. *Theriogenology* 42:25-35.
5. Estienne MJ, Harper AF, Horsley BR, Estienne CE, Knight JW (2001): Effects of P.G.600 on the onset of estrus and ovulation rate in gilts treated with Regumate. *J Anim Sci* 79:2757-2761.
6. Horsley BR, Estienne MJ, Harper AF, Purcell SH, Baitis HK, Beal WE, Knight JW (2005): Effect of P.G.600 on the timing of ovulation in gilts treated with altrenogest. *J Anim Sci* (Savoy, IL, United States), 83:1690-1695.
7. Joerg H, Asai M, Graphodatskaya D, Janett E, Stranzinger F (2004): Validating bovine sexed semen samples using quantitative PCR. *J Anim Breeding and Genetics* 121:209-215.
8. Knox RV, Rodriguez-Zas SL, Miller GM, Willenburg KL, Robb JA (2001): Administration of P.G.600 to sows at weaning and time of ovulation as determined by transrectal ultrasound. *J Anim Sci* 79:796-802.
9. Lengauer T, Lemmem C, Rarey M, Zimmermann M (2004): Novel technologies virtual screening. *Drug Discovery Today* 9:27-34.
10. Lowry TH, Richardson KS (1985): Mechanism and Theory in Organic Chemistry (3rd ed.) Harper & Row. Pub., New York, Ch. 7.
11. Lucas X, Martinez EA, Roca J, Vazquez JM, Gil MA, Pastor LM, Alabart JL (2003): Influence of follicle size on the penetrability of immature pig oocytes for homologous *in vitro* penetration assay. *Theriogenology* 60:659-667.
12. Park CS, Choi YK, Sung ND (2007): The search of pig pheromonal odorants for biostimulation control system technologies: A 2D-QSAR model for binding affinities between ligands of 2-(cyclohexyloxy)tetrahydro furane derivatives and porcine odorant binding protein. *Reprod Dev Biol* 31:15-20.
13. PBS: The leader in animal health & nutrition, PBS Animal Health, PO Box 9101, Canton, Ohio 44711-9101. USA.
14. Rewok PI, Ogwu D, Oyedipe EO, Sekoni VO (2001): The role of pheromones and biostimulation in animal reproduction. *Anim Reprod Sci* 65:157-170.
15. SAS (2002): Statistic & Analysis Software on CD-ROM (Ver. 9.1), SAS Institute Inc., Cary NC. 27513 U.S.A.
16. Schneider G, Baringhaus KH (2007): Receptor-ligand interaction. In: Molecular Design, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
17. Shrestha NP, Edwards S, English PR, Robertson JF (2001): An evaluation boar pheromon spray to aid the stimulation and detection of estrus in small farms in Nepal. *Asian-Aust J Anim Sci* 14:697-700.
18. SOA (Sex odor aerosol): Intervert, Millsboro, DE

1996. Holland.
19. Spinelli S, Vincent R, Pelosi P, Tegoni M, Cambillau C (2002): Boar salivar lipocalin: Three-dimensional X-ray structure and androstenol/androstenone docking simulations. *Eur J Biochem*, 269:2449-2456.
 20. Soung MG, Cho YG, Park CS, Sung ND (2008): The search of pig pheromonal odorants for biostimulation control system technologies: Prediction of pig pheromonal tetrahydrofuran-2-yl family compounds by means of ligand based approach. *Reprod Dev Biol* 32: 141-146.
 21. Sung ND, Park CS, Park HY, Kim CK (2008a): Docking and virtual screening studies for new leads of boar salivary lipocalin. *Bull Korean Chem Soc*. 29: 959-962.
 22. Sung ND, Park CS, Soung MG, Choi KS (2008b): Pig pheromonal compounds, their preparation method and a composite for estrus induction containing it. Korean patent registered; No. 10-0881137, 10-0883548.
 23. Walter WP, Stahl MT, Murcko MA (1998): Virtual screening: An overview. *Drug Discovery Today*, 3: 160-178.
(접수일자: 2009. 1. 2 / 채택일자: 2009. 3. 13)