

重合過程에서의 Oligopeptide 의 構造發生

金 啓 用* · 徐 漢 洙** · 甲 本 忠 史*** · 河 合 徹***

*漢陽大學校 工科學部 工業化學科

**韓國科學技術情報센터

***東京工業大學 工學部 高分子工學科

152 日本國 東京都 目黒區 大岡山 2-12-1

(1980년 1월 8일 접수)

Growth Mechanism of Crystals of Oligopeptides in the Course of Polymerization

Kim, Kea Yong*, Suh, Han Soo** Komoto, Tadashi***, Kawai, Toru***

*Dept. of Industrial Chemistry, College of Engineering,
Hanyang University, Seoul 133, Korea

**Korea Scientific and Technological Information Center

***Dept. of Polymer Technology, Tokyo Institute of Technology,
Ookayama, Meguro-Ku, Tokyo, Japan

(Received January 8, 1980)

요약 : α -아미노酸無水物의 重合過程에서 β -構造形成의 必然性和 그의 臨界鎖長을 알기 위하여 아세토니트릴중에서 1 차아민인 n-부틸아민을 開始劑로 glycine, L-valine 및 L-isoleucine의 oligopeptide를 合成하고 다시 이것을 開始劑로 하여 L-alanine NCA를 重合하였다.

β -構造를 가지고 있는 oligoglycine, oligo-L-valine 및 oligo-L-isoleucine을 開始劑로 L-alanine NCA를 不均一系로 重合하여 結晶成長機構를 檢討한 結果 β -poly-L-alanine의 形成없이 α -helical conformation을 가진 poly-L-alanine이 形成됨을 확인하였다. 이때의 β -oligopeptide들의 臨界鎖長은 重合도가 約 8 정도였다.

Abstract: In order to examine the requirement for the formation of β -conformation in the course of nascent polymerization step and the critical length of β -conformation, the peptides containing glycine, L-valine and L-isoleucine were synthesized by heterogeneous polymerization of their α -amino acid N-carboxy anhydrides (NCA) in acetonitrile with n-butylamine as an initiator and the poly-L-alanine were polymerized by those of active oligopeptides.

The polymerization of L-alanine NCA were carried out by the oligoglycine, oligo-L-valine and oligo-L-isoleucine which were in β -conformation as initiator. The helical α -poly-L-alanine could be formed rather than forming the β -poly-L-alanine, and the critical length of β -oligopeptides were found to be about eight of degree of polymerization.

1. 서 론

α -아미노산의 중합체인 폴리펩티드는 α -helical Conformation, β -conformation 및 random conformation의 세가지 구조를 가지고 있다. 천연 단백질인 wool proteine과 silk fibroin도 중합체의 구성단위가 α -아미노산으로 된 폴리펩티드인데 전자의 구조는 α -conformation이고 후자의 구조는 β -conformation으로 되어 있다.

α -와 β -conformation을 가지고 있는 폴리펩티드를加熱하거나 강한 極性溶媒에 넣으면 변성하여 random conformation이 된다. 이와 같이 폴리펩티드 구조는 溶媒나 熱等 物理的인 條件에 의하여 變化한다. 또 아미노산의 種類와 重合溶媒의 性質에 따라 重合過程에서 이미 特定構造를 가진 폴리펩티드가 形成된다. 本 研究者들은 最近 數年間 아미노산을 原料로 不均一系로 重合할 때의 構造發生에 關한 研究를 하고 있다.

Blout¹ 등은 균일계에서 중합한 여러가지 중합도를 가지고 있는 poly- γ -benzyl-L-glutamate를 적외선분광 측정 실험을 한 결과 중합도가 6 이상인 것은 α -helical conformation을 가질 수 있다고 주장하였으며 Goodman¹ 등은 poly- γ -methyl-L-glutamate를 helix를 형성할 수 있는 용매인 dimethyl formamide로 희석한 다음 선풍분산(optical Rotatory dispersion)을 측정하고 Moffitt Yang의 식을 이용하여 b₀ 값을 계산한 결과 용액속에서 중합도가 9 이상일 때 α -helical conformation을 형성한다고 주장하고 있다.

한편, Komoto¹ 등은 L-alanine NCA를 아세토니트릴 중에서 n-부틸아민을 開始劑로 重合시키면 約 8 量體까지 β -conformation의 β -poly-L-alanine이 生成하게 된다고 주장하고 있다.

이와같이 α -conformation이 生成하기 전에 形成되는 β -conformation의 길이를 α -conformation을 形成하는데 必要한 最小의 臨界鎖長이라고 한다. Poly-L-alanine 以外에도 α -helical conformation을 形成하는 poly-L-leucine이나 poly- γ -benzyl-L-glutamate도 臨界鎖長인 8 量體 程度까지의 β -conformation이 形成된 다음에야 α -helical conformation이 形成하게 된다. 그런데

polyglycine이나 poly-L-valine 및 poly-L-isoleucine 등은 α -helical conformation을 形成하지 않으므로 重合過程에서 重合初期의 α -helix를 形成하는 臨界鎖長은 必要하지 않고 重合開始부터 重合정지까지 β -conformation으로만 結晶이 成長한다.

重合初期부터 α -helical conformation의 poly-L-alanine이 生成하지 못하고 일단 β -conformation을 가진 臨界鎖長の β -poly-L-alanine이 必要한 理由는 不均一系重合過程에서의 構造發生機構로 說明하면 다음과 같다. 重合開始劑에 의하여 L-alanine NCA가 開始反應을 한 다음부터는 分子鎖가 서로 逆平行方向으로 配列된 狀態로 重合되면서 poly-L-alanine이 生成反應을 하게 되는데 重合體의 生成初期에는 β -conformation보다 分子鎖斷面積이 큰 α -helical conformation을 形成할 수 있는 充分한 面積이 없기 때문이다. 그러므로 α -helical conformation을 形成하기 위해서는 重合初期의 폴리머의 臨界鎖長이 約 8 程度가 되어야 하는데 이 臨界鎖長까지는 分子鎖斷面積보다 작은 β -conformation으로 分子가 成長할 수 밖에 없다는 것이다.

펩티드의 構造發生過程에서 이와 같이 α -helical conformation을 形成하기 위해서 β -conformation의 臨界鎖長이 必要하다면 poly-L-alanine의 構造發生過程에서 初期의 β -構造發生段階는 다른 아미노산으로 臨界鎖長 길이를 부여한 다음에 이것을 開始劑로 L-alanine NCA를 重合시킨다면 β -poly-L-alanine의 生成없이 α -helical conformation의 poly-L-alanine의 生成하게 될 것이다.

그러므로 本研究에서는 아세토니트릴 중에서 부틸아민을 開始劑로 β -conformation을 가진 oligopeptide를 合成한 다음 이 oligopeptide를 開始劑로 L-alanine을 重合시킴으로써 α -helical conformation을 가진 poly-L-alanine의 構造發生過程에서 필수적으로 生成한다는 β -conformation의 臨界鎖長과 β -poly-L-alanine의 發生없이 直接 α -helical conformation을 生成할 수 있는지를 알기 위하여 本研究를 하였다.

2. 實 驗

2-1. NCA 의 合成

Glycine(G)NCA, L-alanine(A)NCA, L-valine(V) NCA 및 L-isoleucine(I) NCA 는 前報^{1~4}와 같은 方法으로 合成하였다. L-아미노酸은 일본 Takara Kohsan 社 製品(特級)을 減壓乾燥하여 사용하였다. 포스겐화제로는 일본 Hotogaya 社 製品인 trichloromethyl chloroformate 를 사용하였다. n-butylamine 은 特級試藥(日本, 和光藥品)을 그대로 사용하였다.

2-2. 重 合

모노머인 NCA 의 濃度는 0.217mol/dm^3 로 調節하였다. 溶媒는 不均一系溶媒인 아세토니트릴을 使用하였고 重合溫度는 30°C 로 하였다.

$D_p = [M]/[I]$ 되게 모노머와 開始劑를 調節하여 4日間重合시킨 다음 이 重合物에 다시 모노머를 소정량 투입하여 블록共重合體를 合成하였다⁴. 이 때 重合度는 重合時 發生하는 CO_2 를 定量하여 算出하였다^{4~6}. 여기서 D_p 는 重合度, M 는 α -아미노산 NCA 의 몰수, I 는 開始劑의 몰수이다. 重合物을 유리필터로 濾過하고 重合溶媒로 몇번 씻은 다음 데시케이터에서 減壓乾燥하였다.

2-3. 分析實驗

赤外線스펙트럼測定은 Beckmann 社製 18-A 를 사용하여 KBr 法으로 測定하였다.

重合體組成 및 重合度測定實驗은 Varian 60 MHz 高分解能 NMR 을 使用하여 室溫에서 하였다. 共重合體의 組成과 重合度を 알기 위하여 試料濃度を 10% (溶媒는 trifluoroacetic acid) 溶液으로 測定하였다. 共重合體의 組成은 炭素와 結合한 陽性子の 面積으로부터, 重合度는 펩티드의 $\sim\text{NH}_3^+$ 와 $\sim\text{NH}$ 의 陽性子の 面積比로 測定하였다.

重合한 oligopeptide 의 理論重合도와 NMR 에 의한 測定값은 다음과 같다. 괄호안 값은 NMR 로부터 측정한 값이다.

$\text{IG}_4\text{-A}_8(\text{IG}_{3.5}\text{-A}_{8.5})$, $\text{IG}_6\text{-A}_4$, $\text{IG}_{10}\text{-A}_{7.5}$, $\text{IA}_{7.5}\text{-}$

G_8 , $\text{IV}_4\text{-A}_6(\text{IV}_{3.7}\text{-A}_{6.3})$, $\text{IV}_6\text{-A}_3$, $\text{IV}_8\text{-A}_{7.5}$, $\text{II}_4\text{-A}_6(\text{II}_{4.2}\text{-A}_{5.8})$, $\text{II}_6\text{-A}_3$, $\text{II}_8\text{-A}_{7.5}$,

NMR 法으로 측정한 重合度는 重合時 發生하는 CO_2 測定으로 算出した 重合도와 비슷하였다. 괄호안 값은 NMR 法으로 測定한 값이다.

$\text{IG}_4\text{-A}_8(13.1)$, $\text{IV}_4\text{-A}_6(12.2)$, $\text{II}_4\text{-A}_6(11.5)$

X-線回折測定은 Shimadzu 社의 X-ray diffractometer type VD-1을 使用하였다.

3. 實驗結果 및 考察

1 차아민인 n-부틸아민을 重合開始劑로 아미노산 NCA 를 아세토니트릴 중에서 重合시키면 單分散인 폴리펩티드를 얻을 수 있다⁷. 重合時에 發生하는 CO_2 를 測定하면 重合度を 알 수 있다. n-부틸아민을 開始劑로 glycine NCA, L-valine NCA 및 L-isoleucine NCA 를 원료로 일정중합도의 oligopeptide 를 合成한 다음 다시 이것을 開始劑로 L-alanine NCA 를 重合하여 oligo-glycine-L-alanine(IG-A), oligo-L-valine-L-alanine(IV-A) 및 oligo-L-isoleucine-L-alanine(II-A)를 合成하였다. 이들 oligopeptide 의 重合度는 $M/I=D_p$, CO_2 測定과 NMR 로 分析한 結果 거의 理論量과 비슷함을 알 수 있었다.

3-1. Oligopeptide 의 Conformation

Polyglycine 은 polyglycine I 과 polyglycine II 의 두 가지 구조를 가지고 있다⁸. Glycine 은 아미노산 중에서 비대칭 탄소원자를 가지고 있지 않은 유일한 것이다. 보통 方法으로 重合하면 Polyglycine 은 polyglycine I 構造를 形成한다. Polyglycine I 은 1630cm^{-1} , 1520cm^{-1} 및 704cm^{-1} 의 아미드 I, II 및 V의 흡수띠와 1689cm^{-1} 의 逆平行構造를 反映하는 흡수띠를 가지고 있는 β -構造로 되어 있다. Fig. 1 에는 $\text{IG}_6\text{-A}_4$, $\text{IG}_4\text{-A}_6$, $\text{IG}_{10}\text{-A}_{7.5}$, $\text{IA}_{7.5}\text{-G}_8$ 의 IR 스펙트럼을 나타냈다. α -Helical conformation 의 poly-L-alanine 은 1660cm^{-1} 에 아미드 I 과 1305cm^{-1} 에 아미드 III, 그리고 아미드 V는 658cm^{-1} 와 610cm^{-1} 에 약한 흡수띠가 나타난다². β -Poly-L-alanine 은 1630cm^{-1} , 1530cm^{-1} 에 아미드 I 과 아미드 II 를 反映하는 흡수띠가 나타나 있고²

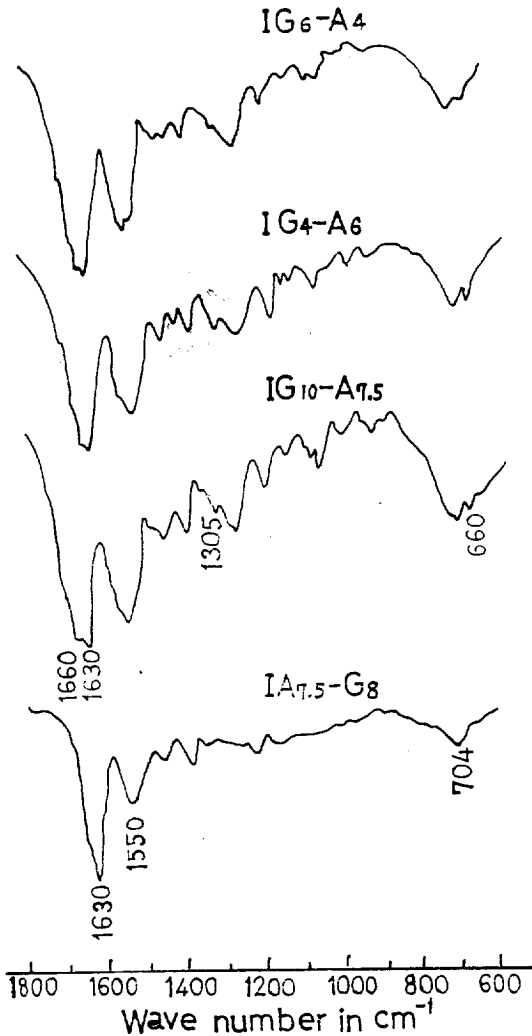


Figure 1. IR-spectra of the oligopeptides obtained from polymerization of glycine(G) N-carboxy anhydride and L-alanine(A) NCA.

1305cm⁻¹에 아미드 III을反映하는 흡수띠는 없다. α-와 β-構造의 poly-L-alanine을 區別하기 위해서는 아미드 I과 아미드 III의 IR 스펙트럼을 比較하면 알 수 있다. IA_{7.5}-G₈에는 1630cm⁻¹와 1530cm⁻¹ 및 704cm⁻¹에 아미드 I, II 및 V에 의한 흡수띠를 나타내고 있다. IG₆-A₄와 IG₄-A₆는 1630cm⁻¹에 아미드 I의 흡수띠가 있고 1660cm⁻¹와 1305cm⁻¹에 아주 약한 흡수띠가 보일 뿐이다. 그러나, IG₁₀-A_{7.5}에서는 1660cm⁻¹

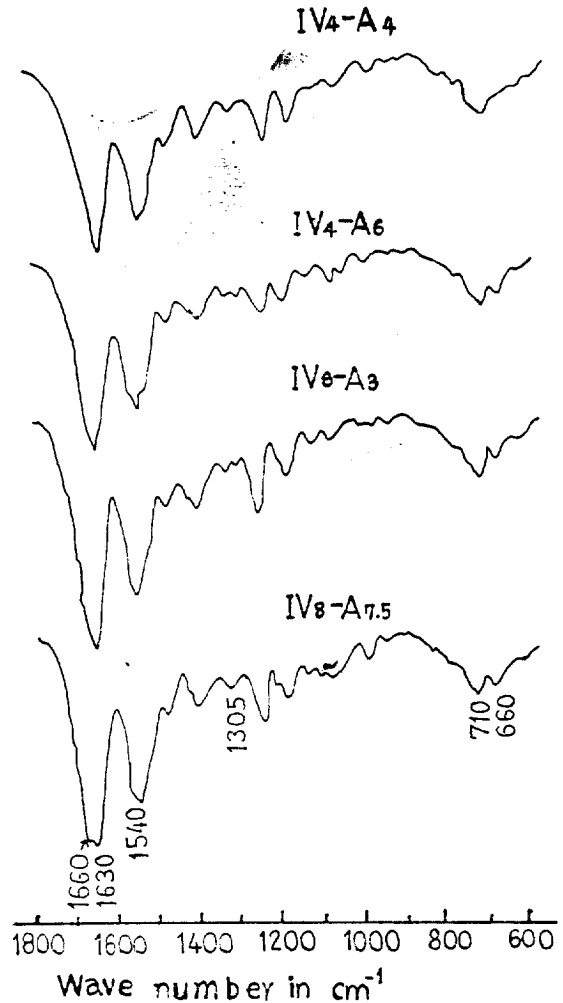


Figure 2. IR-spectra of the oligopeptides obtained from polymerization of L-valine (L) N-carboxy anhydride and L-alanine(A) NCA.

와 1305cm⁻¹의 흡수띠는 IG₆-A₄의 흡수띠보다 약간크다.

Fig. 2의 oligo-L-valine-L-alanine인 IV-A의 IR-스펙트럼에서는 poly-L-valine의 β-構造를反映하는 아미드 I의 1630cm⁻¹와 아미드 V의 710cm⁻¹의 스펙트럼을 볼 수 있다. 그러나 IV₈-A_{7.5}에는 1630cm⁻¹의 아미드 I과 710cm⁻¹의 아미드 V의 스펙트럼 이외에 poly-L-alanine의 α-helix를反映하는 1660cm⁻¹의 아미드 I과 아

미드 III을 反映하는 스펙트럼을 볼 수 있다. Poly-L-valine의 β -構造를 反映하는 스펙트럼은 이미 報告한 바와 같이 1630cm^{-1} 와 1540cm^{-1} , 710cm^{-1} 의 아미드 I과 II 및 V의 흡수띠가 있다.

Fig. 3은 oligo-L-isoleucine-L-alanine의 IR 스펙트럼이다. Poly-L-isoleucine은 1640cm^{-1} 와 713cm^{-1} 에 아미드 I과 V를 反映하는 흡수 스펙트럼이 있고 1704cm^{-1} 의 스펙트럼은 逆平行構造를 나타낸다³. 이 Poly-L-isoleucine은 β -構造

이다. II₄-A₄는 poly-L-isoleucine과 같은 IR 스펙트럼을 나타내는 것으로 보아서 β -구조이다. II₆-A₃, II₄-A₆는 혼적 정도의 1660cm^{-1} 와 1305cm^{-1} 에 아미드 I과 III의 스펙트럼이 보인다. 그러나 II₆-A_{7.5}에서는 1660cm^{-1} 와 1305cm^{-1} 에 어느 정도의 강한 스펙트럼을 볼 수 있다. 여기서는 β -poly-L-alanine의 構造發生없이 α -poly-L-alanine이 poly-L-isoleucine의 β -구조에 연결되어 있음을 알 수 있다.

3-2. Oligopeptide의 構造

Poly-L-alanine의 β 構造의 X-線回折圖는 다음과 같다. (020)面과 (110)面에 해당하는 $2\theta = 16.1^\circ$ ($5.5\text{\AA}$)에 20.1° ($4.41\text{\AA}$)에 回折피크를 가지고 있는데 이것은 β 構造의 特徵적인 散亂피크이다¹. β -Poly-L-alanine結晶의 單位格子는 空間群이 $P2_1$ 의 斜方晶系이고 a軸(水素結合軸)方向의 分子鎖間距離는 $4.79\text{\AA}$, b軸方向의 側鎖距離는 $5.35\text{\AA}$ 이다^{9,10}. 한편, α -Poly-L-alanine結晶의 單位格子는 六方晶系로 α -helix의 分子間距離는 $8.55\text{\AA}$, (100)面の 面間隔은 $7.40\text{\AA}$ ($2\theta = 11.9^\circ$)이다^{9,10}. $2\theta = 11.9^\circ$ 에 唯一하게 粉末回折圖에 나타나는 特徵적인 α -helix의 흡수피크이다. β -構造인 polyglycine I의 X-線回折圖는 다음과 같다.

$2\theta = 20.6^\circ$ 와 25.8° (100)面은 主鎖과 側鎖間의 길이인 $4.31\text{\AA}$ 과 $3.45\text{\AA}$ 이다.

Fig. 4에서 IA_{7.8}-G₈의 X-線回折피크를 보면 β -poly-L-alanine의 β -構造를 나타내는 (020)面の $2\theta = 16.8^\circ$ 의 X-線回折피크가 존재하므로 結晶生成初期에는 β -poly-L-alanine이 生成한 다음에 β -構造인 polyglycine이 重合된 것으로 보여진다. 그러므로 α -helical conformation을 가진 poly-L-alanine은 生成하지 않고 있다. 그런데 IG₆-A₄, IG₄-A₈ 및 IG₁₀-A_{7.5}에는 α -helical conformation을 가진 poly-L-alanine의 (100)面の 面間隔을 나타내는 피크는 L-alanine의 함량이 增加함에 따라 커진다. IG₆-A₄와 IG₄-A₈는 β 構造의 臨界鎖長인 8量體보다 若干 큰 oligopeptide도 α -helical conformation을 形成 가능한 길이를 가지고 있고 IG₁₀-A_{7.5}에서는 glycine殘

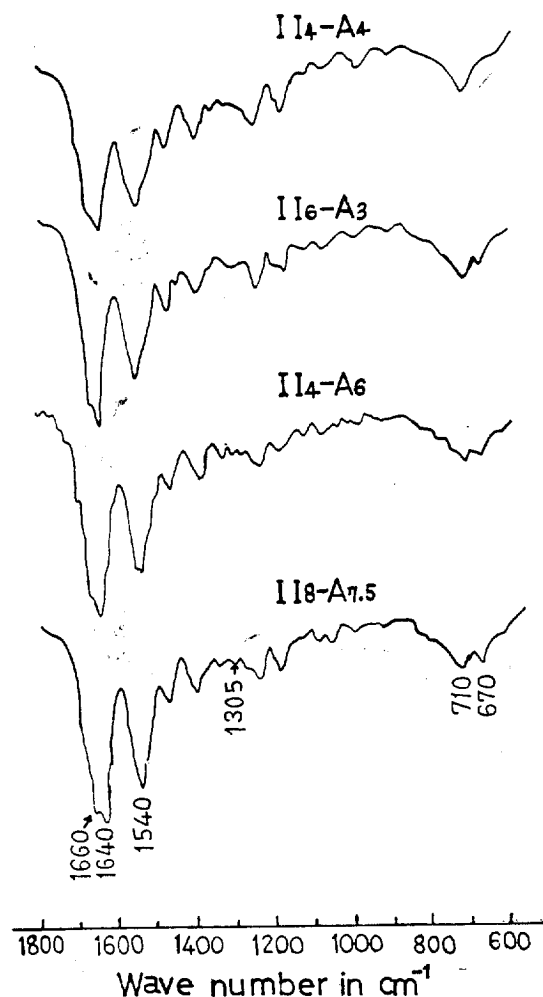


Figure 3. IR-spectra of the oligopeptides obtained from polymerization of L-isoleucine(I) N-carboxy anhydride and L-alanine (A) NCA.

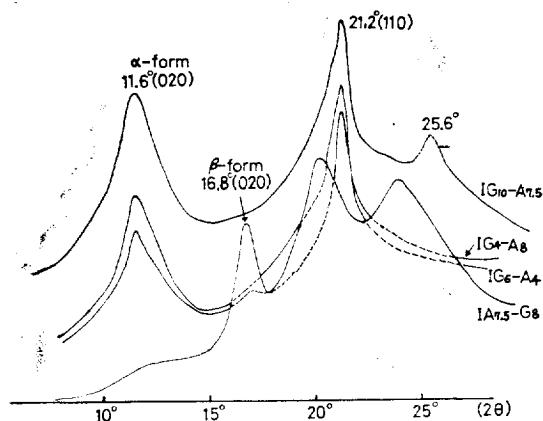


Figure 4. X-ray diagrams of the oligopeptides obtained from polymerization of glycine(G) N-carboxy anhydride and L-alanine(A) NCA.

基가 β -構造形成의 臨界鎖長으로 消費되고 L-alanine은 α -helical conformation을 形成하는데만 消費되고 있다.

한편, 이 X-線 피크에는 glycine의 β -構造와 L-alanine의 α -helix 構造가 共存하는 뚜렷한 경향을 나타내고 있는데 이것은 Fig. 1의 IR-스펙트럼結果와 좋은 一致點을 보여준다.

Poly-L-valine의 $2\theta=9.3^\circ$ 와 19.1° 는 面間隔이 $4.79\text{\AA}$ 과 $19.0\text{\AA}$ 인 主鎖와 側鎖의 길이로 이것은 (020)와 (100)面에 해당한다³. IV₄-A₆와 IV₆-A₃ 및 IV₈-A_{7.5}에서 볼 수 있는 $2\theta=9.3^\circ$ 와 18.9° 는 poly-L-valine의 β -構造를 反映하며, $2\theta=11.7^\circ$ 는 poly-L-alanine의 α -構造를 反映하는 피크이다. β -構造의 poly-L-valine의 $2\theta=9.3^\circ$ 인 (020)面の 面間隔의 피크의 영향으로 弱한 回折피크를 나타내고 있다. 그런데, IV₈-A_{7.5}의 回折피크에서는 β -構造인 poly-L-valine의 結晶構造의 피크와 α -構造인 poly-L-alanine의 피크가 다른 回折피크보다 强하게 나타나고 있는 것은 重合度가 큰 것에 起因되는 結果로 보여진다. 그러므로 Fig. 4의 IG₁₀-A_{7.5}나 Fig. 5의 IV₈-A_{7.5}의 結晶에서는 結晶生成初期의 β -構造는 glycine과 L-valine의 臨界鎖長으로 充當되어 있고 L-alanine單位는 β -構造는 形成하지 않고 α -構造만으로 되어 있다.

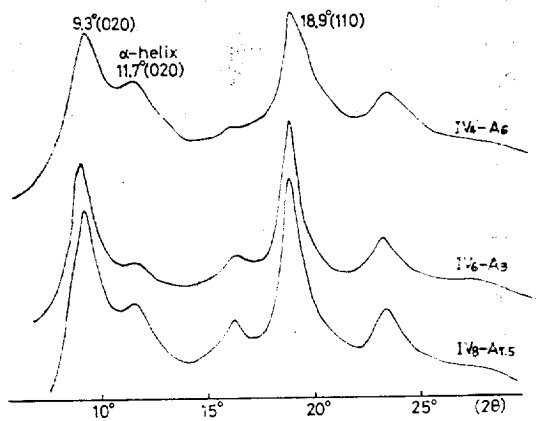


Figure 5. X-ray diagrams of the oligopeptides obtained from polymerization of L-valine N-carboxy anhydride and L-alanine (A) NCA.

Poly-L-isoleucine의 $2\theta=7.9^\circ$, 15.8° 및 18.9° 는 (020), (040) 및 (110)面에 해당하는 것으로 斜方晶系에 屬한다. 이들의 面間隔의 길이는 $a=4.80\text{\AA}$, $b=22.36\text{\AA}$ 및 $c=6.88\text{\AA}$ 이다. Fig. 6에서 II₆-A₃, II₄-A₆ 및 II₈-A_{7.5}의 순서로 poly-L-alanine의 α -helix 構造를 反映하는 11.7° (020)面の 피크는 그 強度가 커진다. 세 피크에는 全部 poly-L-isoleucine의 β -構造를 反映하는 $2\theta=7.9^\circ$, 15.8° 및 18.9° 에 피크가 존재하는 것

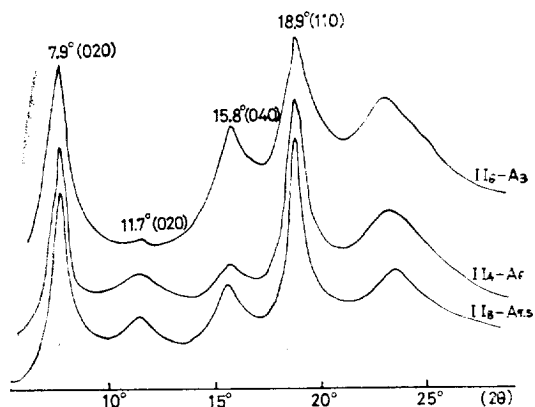


Figure 6. X-ray diagrams of the oligopeptides obtained from polymerization of L-isoleucine N-carboxy anhydride and L-alanine NCA.

으로 보아서 結晶生成初期에는 poly-L-isoleucine 이 β -構造로 成長되어 있음을 알 수 있다. 이 현상은 IG-A 와 IV-A 의 結晶生成過程에서처럼 II₆-A₃ 나 II₄-A₆ 는 폴리머의 길이가 β -構造를 形成하여야 하는 臨界鎖長인 8 量體程度이므로 α -helix 構造를 形成하기 힘들고 거의 isoleucine 과 alanine 은 β -構造를 形成하는데만 消費되는 것으로 보여진다. 그러나 II₈-A_{7.5}의 펩티드에서는 isoleucine 은 β -構造만을 形成하는 것으로 보여진다.

以上の 結果로부터 폴리펩티드의 結晶生成過程에서 α -helix 構造를 形成하려면 結晶生成初期에는 β -構造를 가진 臨界鎖長이 存在하여야 하며 이 臨界鎖長은 約 8 量體 程度이다.

그러므로 alanine NCA 의 重合에서 β -構造를 形成하는 glycine NCA, L-valine NCA 및 L-isoleucine NCA 등을 가지고 臨界鎖長까지 oligopeptide 를 만든 다음 이것을 開始劑로 사용하여 alanine NCA 를 重合하면 β -poly-L-alanine 의 形成없이 α -poly-L-alanine 을 形成할 수 있음을 알 수 있었다.

References

1. T. Komoto, T. Akaishi, M. Oya and T. Kawai, *Makromol. Chem.* **154**, 151 (1972).
2. T. Komoto, K. Y. Kim, Y. Minoshima, M. Oya and T. Kawai, *Makromol. Chem.*, **168**, 261 (1973).
3. T. Komoto, K. Y. Kim, M. Oya and T. Kawai, *Makromol. Chem.*, **175**, 283 (1974).
4. K. Y. Kim and T. M. Taik, *Polymer (Korea)* **1**, 43 (1977).
5. W. C. Chung and K. Y. Kim, *ibid.*, **2**, 256 (1978).
6. K. Y. Kim and H. S. Suh, et al., *ibid.*, **2**, 197 (1978).
7. Y. Iwakura, K. Uno and M. Oya, *J. Polymer Sci.*, **A-1**, **6**, 2156 (1968).
8. F. H. Crick and H. Rick, *Nature*, **176**, 780 (1955).
9. L. Brown and I. F. Trotter, *Trans, Faraday Soc.*, **52**, 537 (1956).
10. C. H. Bamford, A. Elliott and W. E. Hanby "Synthetic Polypeptides" Academic Press, New York, 1956, p. 267.
- M. Idelson and E. R. Blout, *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 3948 (1957).
- M. Goodman and E. E. Schmitt, *J. Am. Chem. Soc.*, **81**, 5507 (1959), **82**, 34383 (1960).