

## 분자도킹에 의한 대장균유래 L-아스파라기나제(II형)와 기질인 아스파라긴의 복합체구조예측

김명욱, 강정규, 윤철일

경애하는 최고령도자 김정은동지께서는 다음과 같이 말씀하시였다.

《수학, 물리학, 화학, 생물학과 같은 기초과학부문에서 과학기술발전의 원리적, 방법론적기초를 다져나가면서 세계적인 연구성과들을 내놓아야 합니다.》(《조선로동당 제7차대회에서 한 중앙위원회사업총화보고》 단행본 40페이지)

L-아스파라기나제(L-아스파라긴아미드물작용분해효소, EC 3.5.1.1)는 L-아스파라긴을 L-아스파라긴산과 암모니아로 전환시키는 반응을 촉진하는 효소로서 특히 대장균과 *Erwinia chrysanthemi* 유래의 L-아스파라기나제들은 1970년대초부터 어린이들의 급성백혈병 치료에 적용되고있다.[1, 2] 또한 식료공업에서 음식물의 아크릴아미드제거[3]와 새로운 약물운반체계의 개발을 위한 모형효소[4], 백혈병치료에 리용되는 L-아스파라긴생물감수기[5] 등 여러 분야에서 리용되고있다. L-아스파라기나제의 분자구조[6], 촉매물림새[7], 전사발현조절[8], 림상응용[9], 안정성과 반감기[10] 등에 대하여 많은 연구들이 진행되었지만 아직까지 대장균유래 L-아스파라기나제의 촉매작용물림새에 대하여 정확히 밝히지 못하고있다.

우리는 대장균유래 L-아스파라기나제와 기질인 아스파라긴의 복합체구조를 분자도킹 방법으로 예측하고 그에 기초하여 촉매작용물림새를 논의하였다.

### 재료 및 방법

대장균유래 L-아스파라기나제(EcAII)의 구조는 단백질립체구조자료기지 PDB(Protein Data Bank)에 등록된 구조(등록번호 3ECA)를 리용하였다.[11]

생성물 Asp와 기질 Asn의 분자구조는 ChemOffice의 ChemDraw기능을 리용하여 생성하고 다시 MM2법으로 최적화를 진행하였다.

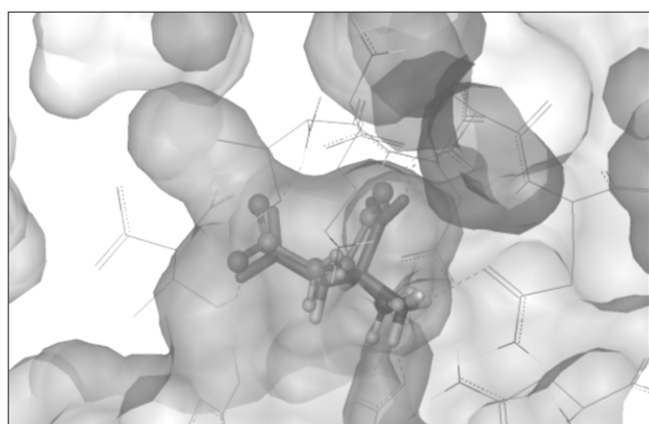
효소-리간드복합체의 구조예측에 분자도킹 프로그램 FlexX[12]를 리용하였다. FlexX는 단백질과 리간드를 유연한 분자로 보고 복합체의 구조와 그것들사이의 호상작용세기를 평가할수 있는 프로그램이다.

### 결과 및 논의

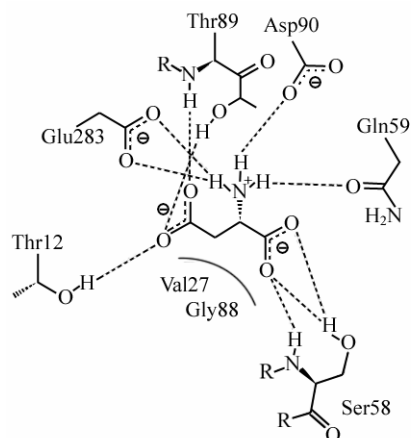
#### 1) EcAII와 Asp 및 Asn의 복합체구조

0.24nm의 분해능으로 EcAII와 생성물인 Asp의 복합체의 X선결정구조가 밝혀졌다.[11] 우리는 EcAII-Asp의 복합체구조(PDB3ECA)에서 EcAII(아포효소)와 Asp(리간드)를 따로 떼내고 프로그램 FlexX를 리용하여 분자도킹계산을 하였다.

그림 1에서 보는바와 같이 예측된 EcAII-Asp의 복합체구조는 X선결정법으로 얻어진 복합체구조와 잘 일치하였으며 이때 두 생성물분자 Asp(리간드)구조들의 RMSD는 0.050 2nm 였다. 이로부터 우리는 EcAII-Asp의 복합체에 대하여 FlexX를 리용한 분자도킹계산이 비교적 잘 들어맞는다고 보았다.



ㄱ)



ㄴ)

그림 1. EcAII와 Asp의 복합체구조(ㄱ)) 및 Asp의 배향(ㄴ))

공-막대모양은 X선결정구조, 막대모양은 예측구조

다음 우리는 EcAII와 기질인 Asn의 복합체구조를 예측하였다. L-Asn의 구조를 최적화 하고 앞서 계산한 Asp의 배향을 참고하여 EcAII-Asn의 복합체구조를 예측한 결과는 그림 2와 같았으며 이때 Asn의 배향은 Asp의 배향과 유사하였다. EcAII-Asn의 복합체에서 주요 원자들사이의 거리를 표에 주었다.

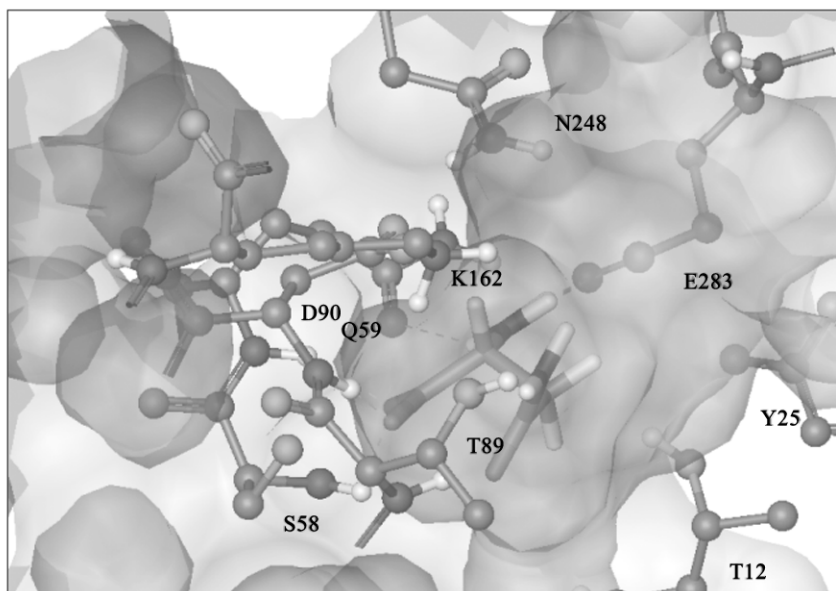


그림 2. EcAII와 Asn의 복합체구조

공-막대모양은 EcAII의 잔기들, 막대모양은 Asn

표. EcAII-Asn의 복합체에서 주요원자들사이거리

호상작용하는 두 원자들	원자사이거리/nm	호상작용하는 두 원자들	원자사이거리/nm
OG(T89)-ND(Asn)	0.229	OE1, 2(E283)-N(Asn)	0.238, 0.297
OG(T89)-NZ(K162)	0.274	OD2(D90)-N(Asn)	0.342
N(D90)-O1(Asn)	0.268	OE(Q69)-N(Asn)	0.276
N(S58)-O2(Asn)	0.239	OD1(D90)-NZ(K162)	0.258
N(T89)-OD(Asn)	0.212	N(T12)-OD(Asn)	0.294

## 2) EcAII의 촉매작용물림새

앞에서 EcAII와 기질인 Asn의 복합체구조를 예측한데 기초하여 우리는 이 효소의 작용물림새를 해석하였다. 선행연구[7]에 의하면 효소작용물림새는 명백하지 않지만 반응은 아마 기질인 Asn의  $\beta$ -아미노기에 대한 친핵공격으로 아실-효소중간체가 형성되면서 일어나는것으로 보고있다.

예측된 EcAII-Asn복합체구조로부터 Asn의 배향상태를 보면 그림 3과 같다.

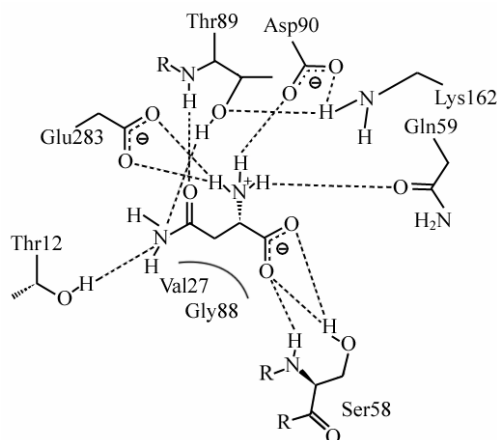


그림 3. EcAII와 Asn의 반응초기상태 구조

프로테아제에서와 유사한 4면체형과도상태중간체가 생성되며 이것은 음전하를 띤 산소에 Thr89와 Thr12의  $\alpha$ -아미드기(옥시음이온구멍)의 수소가 배위되어 안정화될수 있다. 한편 프로톤화된 Lys162의  $\epsilon$ -아미노기는 Asp90의  $\delta$ -산소(1)에 의해 안정화된다.

2단계 1단계에서 생성된 4면체과도상태중간체가 아실-효소중간체로 분해된다. 이때 기질 Asn의  $\beta$ -아미노기가 떨어지면서 Lys162의 수소를 넘겨받아 암모니아로 되어 나온다.

3단계 물에 의한 공격이다. 1개의 물분자가 기질과 효소사이의 에스테르결합을 공격한다. 물분자의 수소중 하나가 Lys162에 결합하면 4면체과도상태중간체가 다시 형성된다.

4단계 물작용분해과정이다. 즉 3단계에서 생성된 4면체과도상태중간체가 분해되어 생성물인 Asp를 내보낸다. 이때 Thr89는 Lys162로부터 수소를 받아 효소는 초기상태로 되돌아간다.

대장균 L-아스파라기나제는 하나의 아단위가 326개의 아미노산으로 이루어진 호모4량체이며 보다 정확하게 표현하면 밀접한 2량체들의 2량체라고 볼수 있다. 밀접한 2량체들의 아단위사이 접촉면들에 4개의 독립적인 활성부위가 존재한다. 이 효소는 세린프로테아제의 고전적인 2단계 《타구》물림새와 유사한 촉매물림새를 가지며 여기서 촉매잔기로는 Thr89, Lys162, Asp90이 포함되는것 같다.

Lys162의  $\epsilon$ -아미노기는 Thr89의 히드록실기와 Asp90의  $\delta$ -산소(1)와 수소결합을 형성할수 있다. Gln59, Asp90, Glu283(C사슬)의 곁사슬들은 기질인 Asn의  $\alpha$ -아미노기를 둘러싸면서 아마도 기질 및 생성물을 고착시키는 기능을 수행하는것 같다. 한편 Ser58과 Asp90의  $\alpha$ -아미드기들은 기질인 Asn의  $\alpha$ -카르복실기와 접촉하여 안정화시킬수 있다.

이로부터 우리는 EcAII의 효소작용물림새를 그림 4와 같이 논의한다.

1 단계 Thr89의 친핵공격이다. 히드록실기의 수소를 Lys162의 아미노기에 넘겨준 Thr89의 친핵산소가 기질 Asn의  $\beta$ -아미노기를 공격한다. 이때 세린

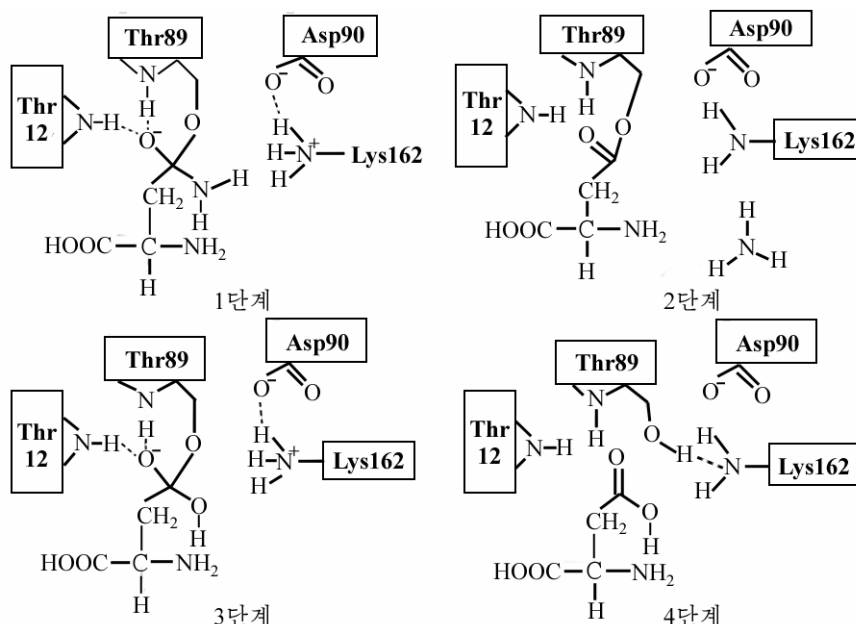


그림 4. EcAII의 촉매 작용물림새

## 맺 는 말

대장균유래 II형 L-아스파라기나제와 기질 및 생성물들과의 복합체구조를 예측하고 그에 기초하여 Thr89, Lys162, Asp90이 촉매 잔기로 작용하는 효소의 작용물림새를 논의하였다.

## 참 고 문 헌

- [1] U. H. Athale et al.; Thrombosis Research, 111, 199, 2003.
- [2] M. P. Gallagher et al.; Essays Biochem., 24, 1, 1989.
- [3] F. Pedreschi et al.; Food Chem., 109, 386, 2008.
- [4] E. Teodor et al.; J. Mater. Sci. Mater. Med., 20, 1307, 2009.
- [5] N. Verma et al.; Artif. Cells Blood Substit. Immobil. Biotechnol., 35, 449, 2007.
- [6] S. Bansal et al.; Biochemistry (Moscow), 75, 3, 375, 2010.
- [7] E. Kelo et al.; FEBS Lett., 528, 130, 2002.
- [8] A. Hüser et al.; FEMS Microbiol. Lett., 178, 327, 2002.
- [9] N. Verma et al.; J. Nat. Prod. Plant Resour., 2, 4, 475, 2012.
- [10] S. Bansal et al.; The FASEB Journal, 26, 1, 2012.
- [11] A. L. Swain et al.; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 1474, 1993.
- [12] M. Stahl; Perspectives in Drug Discovery and Design, 20, 83, 2000.

주제105(2016)년 10월 5일 원고접수

## **Prediction of the Complex Structure of *E. coli* L-Asparaginase(Ⅱ) and Its Substrate, L-Asparagine by Molecular Docking**

*Kim Myong Uk, Kang Jong Gyu and Yun Chol Il*

The complex structures of *Escherichia coli* L-asparaginase Ⅱ (EC 3.5.1.1), an enzyme used for the treatment of acute lymphoblastic leukemia, and its substrate and product have been proposed by means of the molecular docking simulation. On the basis of these structures, we postulate Thr89, Lys162 and Asp90 as its catalytic residues.

Key words: asparaginase, molecular docking, catalytic mechanism