

고세균 *Pyrobaculum* sp. 1860의 카르복실에스테라제의 립체구조예측과 열안정성에 대한 분자동력학적연구

계려연, 김지인, 강정규

경애하는 최고령도자 김정은동지께서는 다음과 같이 말씀하시였다.

《과학기술부문에서는 원료와 연료, 설비의 국산화에 중심을 두고 공장, 기업소들의 현대화와 생산정상화에서 나서는 과학기술적문제들을 푸는데 주력하여야 합니다.》

Pyrobaculum sp. 1860은 로씨야의 화산분화구(84°C, pH 6.8)에서 동정된 혐기성초호열 고세균으로서 내열성효소들의 중요한 원천으로 주목되고있다.[1] 지난 시기 수많은 미생물 기원의 리파제, 에스테라제들이 소개[2]되었지만 일반적으로 가혹한 조건(높은 온도와 pH, 염, 유기용매의 존재 등)에서의 반응을 촉진하지는 못하였다.

우리는 *Pyrobaculum* sp. 1860의 카르복실에스테라제 추정유전자(UniProt: G7VG08)의 아미노산배열로부터 효소의 립체구조를 모형화하고 분자동력학적모의를 통하여 열안정성을 분석하였다. 이 효소단백질에 대한 립체구조모형화를 진행한 결과 배렬상동성은 높지 않지만 다른 카르복실에스테라제들과 마찬가지로 Ser97, His172, Asp147로 이루어진 촉매3잔기조를 가지며 전형적인 α/β 히드롤라제의 포켓구조를 취한다는것을 알수 있었다. 또한 27, 80, 100, 200°C의 각이한 온도에서 분자동력학적모의를 진행하고 비교한 결과 이 효소의 열안정성이 배좌적견고성과 관련된다는것을 밝혔다.

재료 및 방법

립체구조예측 *Pyrobaculum* sp. 1860 카르복실에스테라제의 립체구조예측은 상동모형화 방법으로 진행하였다.

먼저 립체구조를 예측하려는 목적단백질의 아미노산배열을 질문배열로 하여 PDB에 등록된 단백질들의 배렬자료기지에 대한 BLAST상동성검색을 진행하고 그에 기초하여 주형단백질을 선택한다. 다음 목적단백질과 선택된 주형단백질과의 배렬정렬로부터 단백질립체구조예측프로그램 Modeller 9.13[3]을 리용하여 모형을 생성한다.

작성된 모형의 정확성은 라마찬드랑그래프와 Profiles-3D[4]를 리용하여 평가하였다.

분자동력학모의의 예측된 모형을 1.0nm 크기의 립방체계에 배치하고 SPC물모형으로 용매화를 진행하였다. 계를 중성화시키기 위해 1개의 물분자를 1개의 나트륨이온으로 교체하고 공액구배법으로 구조를 최적화한 다음 속도재조정합수를 리용하여 온도를 각각 300K(27°C)과 353K(80°C), 373K(100°C), 473K(200°C)으로 가열하여 평형화시켰다. 평형화된 구조를 리용하여 5ns동안 분자동력학모의를 진행하였다. 분자동력학모의는 GROMOS 43a1힘마당에서 GROMACS 4.5.4[5]로 진행하였으며 결과는 Chimera 1.10[6]으로 분석하였다.

결과 및 론의

1) *Pyrobaculum* sp. 1860 카르복실에스테라제의 배열해석 및 립체구조모형화

Pyrobaculum sp. 1860은 극단환경(84°C, pH 6.8)에서 생존할수 있는 미생물로서 내열성 효소의 중요한 원천으로 되며 이미 게놈해석이 진행되었다. 이로부터 카르복실에스테라제 추정유전자가 암호화하는 아미노산배열(Pest)을 얻었다. 이 유전자는 GC함량이 63.6%이며 길이가 585bp이다. 또한 이 유전자가 암호화하는 단백질은 194개의 아미노산으로 이루어졌으며 이론적인 분자량과 등전점은 각각 21 131Da과 6.32이다. Pest배열을 단백질립체구조자료기지 PDB에 대하여 BLAST상동성검색을 진행한 결과 다른 카르복실에스테라제들과는 상당히 차이나는 새로운 에스테라제였다.(표 1)

표 1. 단백질립체구조자료기지에 대한 Pest배열의 BLAST상동성검색결과

PDB번호	기원생물종	일치률/%	정렬수/%
3BDI	<i>Thermoplasma acidophilum</i>	30	99
4CCW	<i>Bacillus subtilis</i>	29	87
3HI4	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	27	82
4FHZ	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	32	69

다중배열정렬결과 Pest배열에는 촉매3잔기조가 Ser97과 Asp147, His172로 이루어진다고 예측된다. 일반적으로 촉매성세린잔기는 보존배열 G-X-S-X-G에 놓여있지만 Pest의 Ser97은 G-X-S-X-S에 위치하며 이러한 배열을 가진 리파제나 에스테라제는 거의 발표된것이 없다.

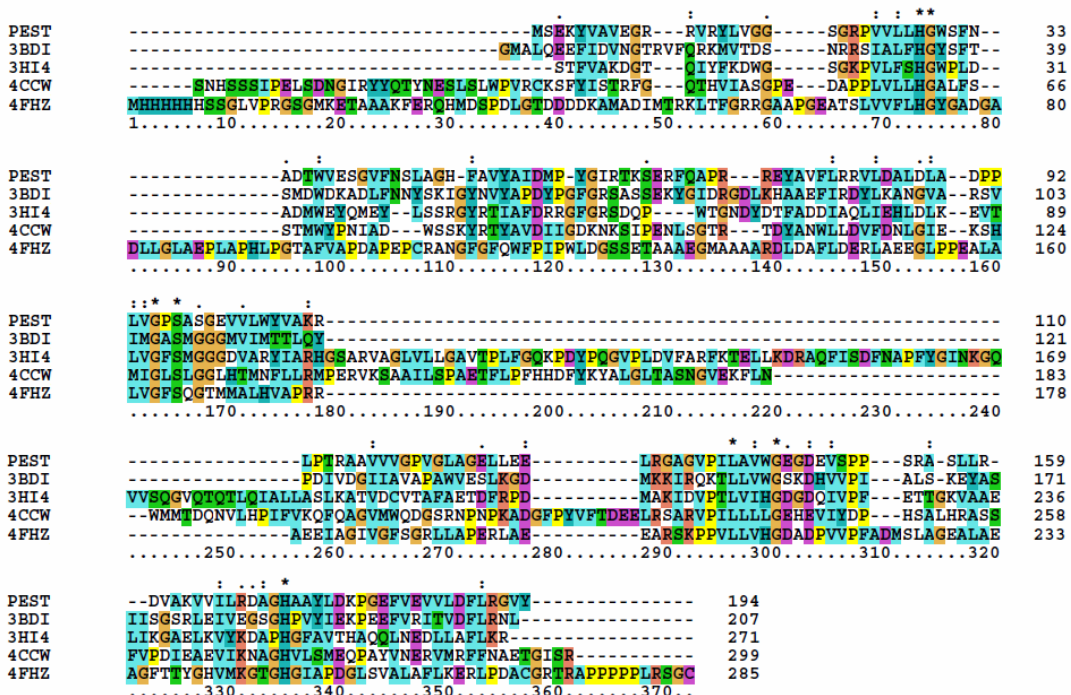


그림 1. Pest와 4종의 각이한 세균유래 카르복실에스테라제들의 다중배열정렬결과

결정구조의 분해능과 전체적인 배열상동성을 고려하여 가장 적합한 주형구조로 *Thermoplasma acidophilum*의 카르복실에스테라제 3BDI(분해능 1.45nm)를 선택하였다. 일반적으로 배열상동성이 30~50%인 단백질들은 적어도 80%가 유사한 립체구조를 가진다. 단백질립체구조예측프로그램 Modeller 9.13을 리용하여 100개의 모형들을 생성한 다음 가장 낮은 DOPE(불린속최적단백질에네르기) 평가점수를 가진 모형을 최종적으로 선택하였다.(그림 2의 ㉠) 모형의 질을 평가하기 위하여 최종모형의 기하학적분석을 진행한 결과 96.4%의 잔기들이 라마찬드랑그래프의 중심구역에, 2.6%의 잔기들이 허용구역에 놓였으며 Gly10과 Gly60 2개의 잔기만이 금지구역에 놓였다.(그림 2의 ㉡) 또한 Profiles-3D를 리용한 질 평가에서도 최종모형의 평가값은 94.7이었으며 최대기대값은 87.513, 최소기대값은 39.381이었다. 이러한 결과들은 모형이 충분히 믿을만 하다는것을 보여준다.

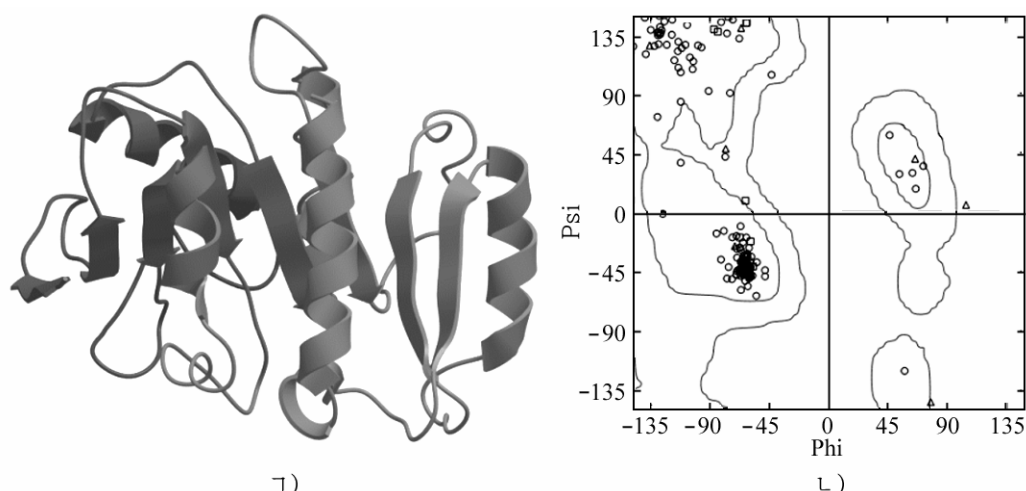


그림 2. *Pyrobaculum* sp. 1860유래 카르복실에스테라제의 예측모형(㉠)과 라마찬드랑그래프(㉡)

예상한것처럼 Pest의 립체구조모형은 다른 카르복실에스테라제들과의 상동성이 높지 못하였지만 중심에 7개의 β 오리들로 이루어진 혼합형 β 판대기와 그 주위를 둘러싼 α 라선들을 가진 전형적인 α/β 히드롤라제 포켓구조를 취하였다.(그림 2의 ㉠) 활성중심을 이루는 주머니는 Gly29, Trp30, Ser31, Phe32, Pro96, Gly120, Val149, Ala173, Tyr175잔기들로 이루어지며 촉매3잔기조인 Ser97과 Asp147, His172들은 각각 β_4 - β_3 과 β_6 - β_7 , β_7 - β_5 사이의 루프들에 놓여있다. Ser97의 산소원자(O_γ)는 His172의 질소원자(N_δ)와 0.32nm 떨어져있으며 또한 His172의 다른 질소원자(N_δ)는 Asp147의 산소원자(O_δ)와 0.29nm 떨어져있어 각각 수소결합을 형성할수 있다.

2) 분자동력학(MD)모의

Pest의 열안정성을 평가하기 위하여 4개의 서로 다른 온도(300, 353, 373, 473K)에서 MD 모의를 진행하고 비교하였다.

효소의 동적인 거동은 MD모의를 통하여 분석하였다.

그림 3의 ㉠)에서 보는것처럼 300K과 353K에서 골격원자들의 RMSD는 약 600ps이후부터 평활해졌으며 모의마감까지 각각 0.263nm와 0.270nm의 RMSD값에 수렴하면서 안정성을 유지하였다. 이 결과들은 Pest의 대역적인 3차원구조가 잘 유지되며 결국 모의마감까

지 단백질이 안정하게 존재한다는것을 보여준다. 373K의 모의에서는 골격원자들의 RMSD가 약 600ps이후부터 평활해져 2.5ns까지 잘 유지되었지만 그후에는 RMSD값이 상승하여 0.367nm의 높은 값에 도달하였다. 474K의 모의에서 골격원자들의 RMSD는 모의시작부터 증가하여 0.633nm의 높은 값에 도달하였다. 이 결과들은 353K이상으로 온도를 높여도 천연 구조의 안정성에 거의 영향을 미치지 못하며 373K이상으로 온도를 높이면 효소의 구조가 풀어지기 시작한다는것을 보여준다.(그림 3의 ㄱ))

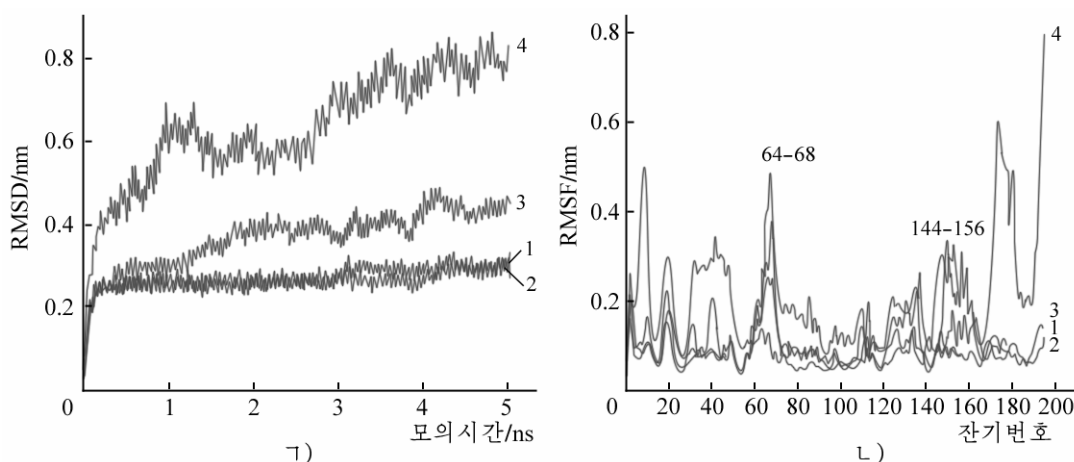


그림 3. *Pyrobaculum* sp. 1860유래 카르복실에스테라제의 예측모형을 리용한 분자동력학적모의

ㄱ) 모의시간에 따르는 RMSD변화, ㄴ) 잔기별 RMSF변화;

1-4는 모의온도가 각각 300, 353, 373, 473K일 때

분자동력학모의에서 잔기별에 따르는 평균RMSF(평균2차뿌리변동)값은 매 잔기의 상대적인 유연성을 특징짓는다. 즉 RMSF값이 보다 높을수록 덜 안정하다. 그림 3의 ㄴ)에서 보는것처럼 300K과 353, 373K의 온도에서 대부분의 잔기들은 상대적으로 작은 변동을 나타내었다. 많은 연구들에서 지적된것처럼 내열성효소들은 중온성효소들보다 구조적으로 견고하다. 한편 64-68과 144-156의 두 잔기영역은 상대적으로 큰 변동을 나타냈는데 이것은 이 두 영역이 열에 민감한 부위라는것을 의미한다. 3개의 촉매잔기들의 RMSF값을 비교해보면 두번째 유연성영역에 놓이는 Asp147은 큰 변동값을 가지는 반면에 Ser97과 His172는 높은 온도에서도 상대적으로 변동이 적다. 따라서 두번째 유연성영역은 기질의 접근이나 촉매작용과 연관되어있다고 가정할수 있다. 그러나 첫번째 유연성영역은 립체구조에서 활성중심과 멀리 떨어져있기때문에 열안정성을 더욱 개선하기 위한 단백질공학적인연구의 대상으로 될수 있다.

회전반경(R_g)은 단백질중심으로부터 원자들의 거리로 계산되며 단백질구조의 밀집성을 반영한다. 일반적으로 R_g 값이 작을수록 보다 단백질이 뽁뽁한 구조를 가진다고 볼수 있으며 이것은 단백질의 안정성을 나타내는 지표로 된다. 표 2에서 보여주는것처럼 300K에서 1.597nm로서 R_g 값이 가장 낮았으며 353K과 373K에서는 각각 1.617nm와 1.622nm로서 300K에서보다는 약간 높지만 큰 차이는 없었다. 그러나 473K에서는 R_g 값이 1.672nm로서 크게 높아졌다. 이것은 Pest의 구조가 373K이하의 온도에서 좋은 열안정성을 가진다는것을 의미한다.

표 2. 각이한 온도에서 몇가지 모의특성값들의 변화

특성 값	300K	353K	373K	473K
RMSD/nm	0.263	0.27	0.367	0.633
R_g /nm	1.597	1.617	1.622	1.672
SASA/nm ²	105.926	111.506	112.778	119.897
PSASA/nm ²	54.597	55.215	57.428	56.007
ASASA/nm ²	51.329	56.291	55.349	63.891
내부수소결합개수/개	113	109	104	96
용매와의 수소결합개수/개	403	390	383	303

용매접촉표면적(SASA)은 단백질이 용매에 노출된 정도를 반영하는 값으로서 용매분자와 접촉하는 원자들의 표면적을 계산하여 얻어진다. 300K으로부터 473K까지 온도를 높일 때 SASA값은 약간 높아진다. 특히 극성용매접촉표면적(PSASA)과 비극성용매접촉표면적(ASASA)의 변화를 비교해보면 SASA의 증가에서 대부분은 ASASA가 차지한다는것을 알수 있다. 일반적으로 단백질의 비극성잔기들은 소수성호상작용을 통하여 내부로 향해있다. 그런데 이 ASASA가 증가한다는것은 높은 온도에서 비극성잔기들이 더 많이 노출된다는것을 의미한다. 한편 분자내 수소결합의 평균개수는 온도가 높아지면서 약간 감소하지만 용매와의 수소결합의 평균개수는 473K에서 급격히 감소되었다.(표 2) 이러한 결과들은 모두 Pest의 구조가 373K이하의 온도에서 안정하지만 그 이상의 온도에서는 구조가 파괴된다는것을 보여준다.

맺 는 말

Pyrobaculum sp. 1860 유래의 카르복실에스테라제에 대한 립체구조모형화를 진행한 결과 이 효소는 Ser97, His172, Asp147로 이루어진 촉매3잔기조를 가지며 전형적인 α/β 히드롤라제 포켓구조를 취한다.

Pyrobaculum sp. 1860유래의 카르복실에스테라제의 예측모형을 리용하여 각이한 온도(27, 80, 100, 200°C)에서 진행한 분자동력학모의들을 비교분석한 결과 그것의 열안정성은 배좌적견고성과 관련되어있다.

참 고 문 헌

- [1] A. V. Mardanov et al.; J. Bacteriol., **194**, 727, 2012.
- [2] X. Li et al.; Extremophiles, **18**, 171, 2014.
- [3] M. A. Marti-Renom et al.; Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct., **29**, 291, 2000.
- [4] R. L  thy et al.; Nature, **356**, 83, 1992.
- [5] B. Hess et al.; J. Chem. Theory Comput., **4**, 435, 2008.
- [6] E. F. Pettersen et al.; J. Comput. Chem., **25**, 13, 1605, 2004.

Molecular Modeling of Carboxylesterase from *Pyrobaculum* sp. 1860 and the Study of Its Thermostability through Molecular Dynamics

Kye Ryo Yon, Kim Ji In and Kang Jong Gyu

In this study, three-dimensional structure of carboxylesterase from *Pyrobaculum* sp. 1860 was predicted based on its primary sequences and the X-ray crystal structure of carboxylesterase from *Thermoplasma acidophilum* (3BDI) using homology modeling, and its thermostability was investigated through molecular dynamics simulations.

The predicted model of the enzyme possessed a typical α/β hydrolase fold with the catalytic triad consisting of Ser97, Asp147 and His172. Using this model as starting structure, molecular dynamics simulations were performed at the different temperatures (300, 357, 373 and 473K) for 5 ns of simulation time revealed that the thermostability of the enzyme was associated with its conformational rigidity.

Key words: *Pyrobaculum* sp., carboxylesterase, molecular dynamics, thermostability