

<효소의 활성화(C & EN, Feb. 25, 9(2002)>

**효소의 아미노산 잔기의 움직임은 촉매하는 메카니즘과 관계가 있음을 발견하였다.**

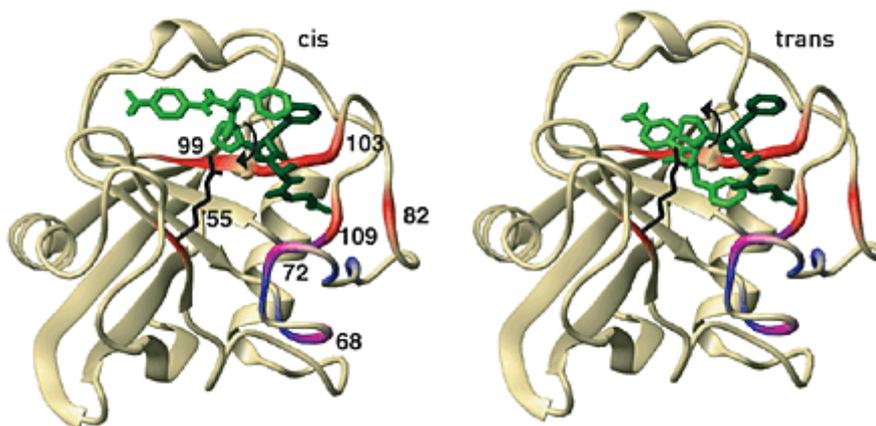
효소가 촉매하는 전이상태에 있을 때 효소의 아미노산 잔기들의 빠른 움직임이 발견되었다. NMR에 의해 효소 cyclophilin A의 backbone의 움직임을 감지하였고, 한 아미노산 잔기의 움직임이 촉매 메카니즘과 밀접하게 관계가 있는 것을 알아내었다(Science, 295, 1520(2002)).

연구자들은 전에 크리스탈 구조와 같은 정적인 상태와 효소들의 움직임에 관해 연구해 왔는데, 이러한 연구들은 효소가 촉매하는 상태에서 이루어진 것이 아니었다. 전이상태는 잠시동안만 존재하기 때문에 전이상태의 형성 및 와해동안 효소의 동역학은 용액에서 효소가 촉매하는 반응동안 직접적으로 감지된 적은 없었다.

이 연구팀은 효소 cyclophilin A가 촉매하는 동안 160개의 amide nitrogen들의 움직임을 감지하기 위하여 NMR relaxation method를 사용했다. 이들은 backbone중 10개의 움직임을 감지하였고, 이중 9개는 주로 기질의 결합하고 떨어져 나가는 것과 관계있는 것으로 밝혀졌다. 그러나 속도를 분석해 볼 때 1개의 아미노산 잔기(arginine-55)는 촉매작용과 직접적으로 관계있는 것을 보여준다. Arginine-55의 잔기는 기질과 수소결합을 하고 촉매작용에 매우 핵심적인 역할을 한다는 사실이 이미 알려져 있었는데, 이를 증명하게 되었다.

이들의 연구는 backbone의 움직임을 분석하였지 촉매작용에 직접적으로 관계된 잔기의 움직임을 분석한 것이 아니다. 그러나 현재 이 기술을 잔기에도 적용하는 연구를 하고 있다.

현재 단백질의 움직임과 rational drug design과의 관계가 확립된 상태가 아니어서 제약회사들에게는 흥미있는 기술일 수 있다. 이 연구팀의 팀장은 rational drug design은 주로 rigid-body docking에 의해 이루어진 것이어서, 지난 10년동안 단백질과 약물의 유동성을 고려해야 했기 때문에 제대로 개발이 되지 않았고, 따라서 단백질의 동역학적인 연구가 필요함을 말하고 있다.



<Cyclophilin A의 arginine-55 잔기(black)의 움직임: 효소의 기질의 cis-trans 전환(light & dark green). 다른 9개의 잔기들(red)>

<효소의 작용(C & EN, May 13, 41(2002))>

phosphoryl-transfer reaction으로부터 나오는 에너지는 촉매활성의 제어를 돕는 효소작용의 근원이다.

어떤 효소들도 그 능력에 있어서 phosphoryl group을 한 분자로부터 다른 분자로 이동시키는 것만큼 인상적인 것은 없다. 생체시스템에서 빈번한 adenosine 또는 guanosine의 triphosphate의 가수분해 형태로의 phosphoryl transfer는 에너지를 공급하여, 화학반응이 정상적으로 일어나게 한다. 이렇게 생긴 뉴클레오티드 monophosphate는 DNA 합성이나 복구와 같은 효소에 의한 중요한 여러 반응들에서 그 자체가 반응물로 작용한다. kinase 활성화와 같은 경우에는 효소가 목표 분자에 결합하는 것이 바로 phosphoryl group이다. 아마도 phosphoryl transfer는 생화학자나 분자생물학자가 연구하는 효소 촉매반응의 반이상이 연관되어 있다고 생각된다.

많은 phosphoryl-transfer enzyme들은 효율적인 촉매작용뿐만 아니라 외부의 signal에 의해 활성화될 때 제어적인 방법으로 촉매화학을 수행한다. 종종 효소는 촉매작용을 하기 위해 적절한 configuration을 유지하여야 하고, conformation 변화는 효소활성을 제어하는 것과 관계있는 것으로 보인다.

한 연구자는 이해해야 할 중요한 것들중의 하나는 이러한 효소들과 기질들과의 상호작용과 효소가 촉매작용을 할 수 있도록 하는 동역학적인 사실이 어떠한 연관성을 갖는가를 이해하는 것이라고 말한다.

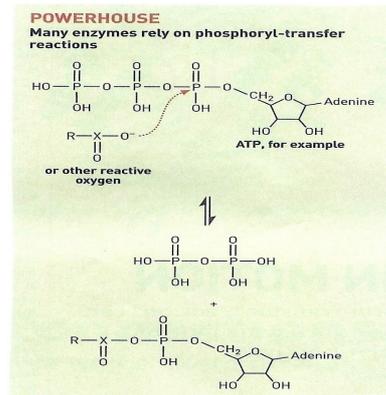
또한 효소들은 활성부위에서 기능적 화학반응만을 수행하는 것이 아니고, 주어진 pathway에서 다른 효소들과 같이 작용하며, 또한 pathway들 역시 제어되어야 한다. 물론 효소기능의 제어를 돕는 외부적인 요인이 있지만, 서로 다른 pathway들은 부분적으로 효소들 자체의 구조화학적인 면에 의해 같이 작용하거나 제어된다.

예를들면 Scripps Research Institute의 분자 및 화학생물과 Tainer교수가 연구해왔던 Rad50으로 알려져 있는 adenosinetriphosphatase(ATPase)는 DNA에서 손상된 부분을 복구하기 위해 Mre11로 불리는 endonuclease와 연계하여 작용한다. 이 연구실의 크리스탈 구조 데이터는 Rad50이 lollipop(나무가지 끝에 붙인 사탕과자)모양의 분자임을 밝혔고, 효소의 두 끝부분이 촉매작용을 하는 부분을 형성하기 위해 같이 모여있으며(사탕부분), 효소의 주 부분으로부터 약 수백 앙스트롬의 길이로 뻗어져 있는 코일모양의 나뭇가지 모양으로 형성되어 있는 상당히 긴 중간부분을 갖고 있다. Mre11은 촉매작용을 하는 도메인에 근접해 있는 코일모양의 부분에서 Rad50과 결합한다.

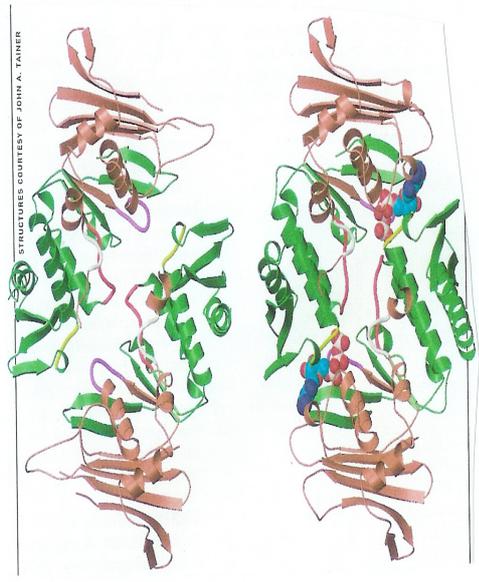
결합되어 있는 ATP가 있거나 없는 Rad50의 크리스탈 구조들은 ATP결합과 그 후의 가수분해는 효소의 conformation에 있어 중요한 변화들을 야기함을 보여주고 있다. ATP 결합은 2개의 Rad50의 촉매작용을 하는 도메인들이 dimer를 형성하게 하고 각각의 도메인이 서로 가까워진다. 어떤 도메인들은 DNA가 결합할 수 있는 정전기적으로 양극인 홈을 만들기 위해 30°만큼이나 회전하기도 한다. 또한 이러한 reconfiguration은 2개의 Mre11 endonuclease를 올바른 orientation으로 유도해 DNA를 쪼갬다. ATP가 가수분해될 때 이 구조는 DNA를 방출하고 효소 complex가 복구과정에서 다음 단계를 위한 위치로 이동하게 하기 위해 열린다. Rad50의 이러한 구조변화는 DNA복구를 위해 작용하고 제어한다.

DNA strand에 관계된 과정들에 중요한 역할을 하는 많은 효소들은 Rad50과 같이 긴 코일 부분을 갖고 있다. lollipop의 긴 막대모양의 부분은 약 1000앙스트롬까지 뻗어져 있는

DNA strand들에서 일어나는 화학반응들을 위한 길을 제공한다. 2개의 독립된 DNA에 결합하는 머리부분이 DNA의 각각의 strand에 결합되는데, 어떻게 ATP-mediated conformational switching에 의해 1000 옹스트롬이 넘는 거리에서 서로 작용하는지를 보여주는 구조들을 알아내었다. ATP가 결합된 Rad50의 형태가 DNA에 결합하고 가수분해된 형태가 방출될 때, conformation 변화는 직접적으로 코일에 연결된 효소의 도메인으로 이동하는데, 이는 전체 lollipop의 막대모양의 이동을 야기한다. 또한 Tainer교수는 DNA의 각각의 strand와 작용하는 그러한 2개의 분자들의 코일들의 맨 끝부분에서 동역학적인 상호작용을 제안하였다. 그러한 상호작용은 한 효소의 결합상태를 다른 효소에 신호를 보낼 수 있다고 생각된다. 이와같은 효소들은 다목적의 도구이기 보다는, 서로 상호작용해야만 하는 복잡한 메카니즘을 갖고 있다.



<많은 효소들은 phosphoryl-transfer reaction에 의존한다>



<ATP가 Rad50으로 불리는 DNA결합 단백질의 촉매작용을 하는 부분에 결합하면 효소들이 서로 가까워져 많은 개개의 도메인들이 재배열을 하게 된다(오른쪽). ATP가 없는 Rad50은 왼쪽에 보여준다>

<질병과의 싸움(C & EN, May 13, 41(2002))>

**효소의 작용을 이해함으로써 더 나은 약물(drug)를 만들 수 있을 것이다.**

HIV 및 암과 싸우기 위한 유망한 접근은 phosphoryl-transfer enzyme의 구조와 기능간의 상호관계를 밝히는 것이다. AZT로 알려진 항 HIV 약물은 처음에 HIV와 같은 retrovirus의 생활사에서 핵심단계인 viral RNA로부터 DNA를 transcription하는 단계를 저해하기 전에 세포내의 효소에 의해 phosphorylation되어 triphosphate의 형태로 됨에 틀림없다. 한 연구팀은 이러한 효소들의 하나인 thymidylate kinase는 AZT 대사물이 기질로 작용할 때 비효율적이라고 보고하였다.

이 연구팀은 반응의 여러 중간 단계에서 human thymidylate kinase의 3차 구조를 검토함으로써 촉매작용을 위한 필수적 단계인 특이한 conformation의 변화를 확인하였다. 이러한 구조에 대한 연구는 AZT 대사물인 AZT monophosphate가 conformation 변화를 하기 위해 거대한 azido group을 포함하는 것을 보여주고 있다.

또한 human enzyme의 변이 형태를 설계하고 확립하기 위해 human, 효모, 박테리아의 thymidylate kinase에 대한 X선 크리스탈 구조 데이터를 사용하였다. 이들 변이체들은 자연적인 효소보다 훨씬 빨리 AZT monophosphate를 phosphorylate할 수 있다. human 세포를 이용한 배양실험에서 세포들은 AZT가 존재할 때 생산되는 약물의 활성형태인 AZT triphosphate의 양을 상당히 증가시킬 수 있었다.

이러한 결과를 AIDS 요법에 응용하기 위해 HIV virus에 의해 특정하게 표적이 된 세포들을 human thymidylate kinase의 변이체로 transfect시키는 제안이 있었다. 이러한 접근은 HIV의 표적이 된 바로 그 세포들을 목표로 해서 AZT의 phosphorylation을 향상시킬 수 있는 장점이 있다.

또 다른 연구팀은 다른 human phosphoryl-transfer enzyme인 pancreatic ribonuclease를 가지고, 이를 변형시켜 항암제로 전환시키는 연구를 하고 있다. 이 일은 1990년대에 northern leopard frog(개구리)로부터 얻은 상응하는 ribonuclease가 원래 cytotoxic하다는 사실을 발견함으로써 시작이 되었다.

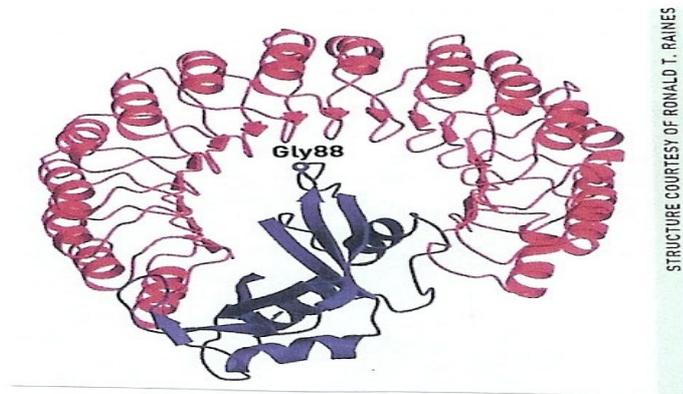
인간에 있어서 환자가 견딜 수 있는 onconase의 복용량은 신장에 독성을 나타내기 때문에 제한이 되어 있었다. 이것은 놀랄 일이 아니고 양서류의 단백질이기 때문이고, 많은 외래 단백질들이 신장에 축적이 되어 있다. 이 연구팀은 인간 또는 적어도 포유동물에 있어서 단백질의 형태가 이러한 문제점을 극복할 수 있을지 모른다고 생각했다. 그러나 human 또는 bovine 형태의 어떤 효소도 세포들을 죽이는데 같은 능력을 보여주지 않았다.

이러한 이유로 ribonuclease 저해제인 두 번째 단백질 때문이라는 사실을 찾아내었다. 인간과 다른 포유동물은 세포에서 많은 양의 이러한 저해제를 생산한다. 크리스탈 구조 데이터는 저해제가 ribonuclease주위를 강하게 둘러싸고 있어 활성을 저해함을 보여주고 있다. onconase의 경우 구조에 있어서 포유동물의 ribonuclease와 약간 다르긴 하지만 이 저해 단백질과 결합하지 않는다.

bovine pancreatic ribonuclease의 연구에 있어서 이 연구팀은 이 단백질 분자의 124개의 아미노산 잔기중 1개를 변화시킴으로써 ribonuclease 저해단백질을 피할 수 있음을 발견하였다. human enzyme를 이용한 최근의 연구에서 역시 이러한 식으로 저해 단백질을 피할 수 있었다.

다시 말하면 인간의 몸에 있는 ribonuclease의 아미노산을 몇 개 바꿈으로써 암세포에 독

성이 있게 만들 수 있다는 것이다. 모든 ribonuclease들은 phosphodiester backbone을 조깅으로서 RNA를 파괴한다. 개구리 ribonuclease와 그와 상응하는 포유동물의 ribonuclease는 선택적으로 암세포의 RNA를 표적으로 하는데, 이 연구팀은 이러한 선택성을 갖는 이유를 알기 원했다. 하나의 가능성은 ribonuclease들이 암세포의 표면에 있는 탄수화물들을 인지할 수 있다는 것이다. 암세포의 표면을 둘러싸고 있는 ganglioside로 알려져 있는 탄수화물 "fingers"는 정상세포의 ganglioside보다 더 많은 sialic acid를 갖고 있다. ribonuclease들은 sialic acid가 많이 들어 있는 ganglioside에 더 좋은 친화성을 가지고 있다고 보고되었으며, sialic acid에 대한 이러한 친화성이 암세포를 표적으로 하는데 중요한 역할을 할 수 있을 것으로 판단된다.



<bovine pancreatic ribonuclease(blue)가 저해제(red)에 의해 둘러싸여 강하게 결합하고 있다. glycin 88을 변형시킴으로서 저해제에서 방출되어 암세포를 죽일 수 있다.>



