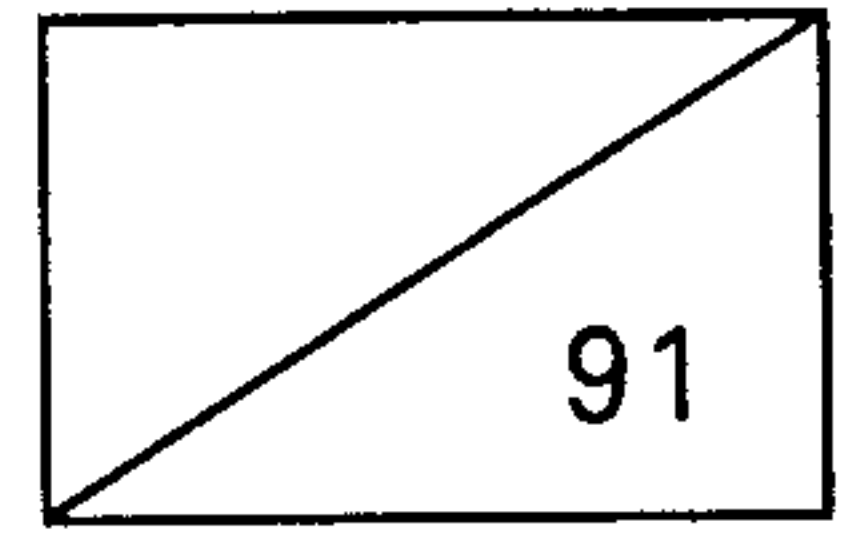


제 2 차 년 도
최 종 보 고 서



인체 기능의 생물학적 연구

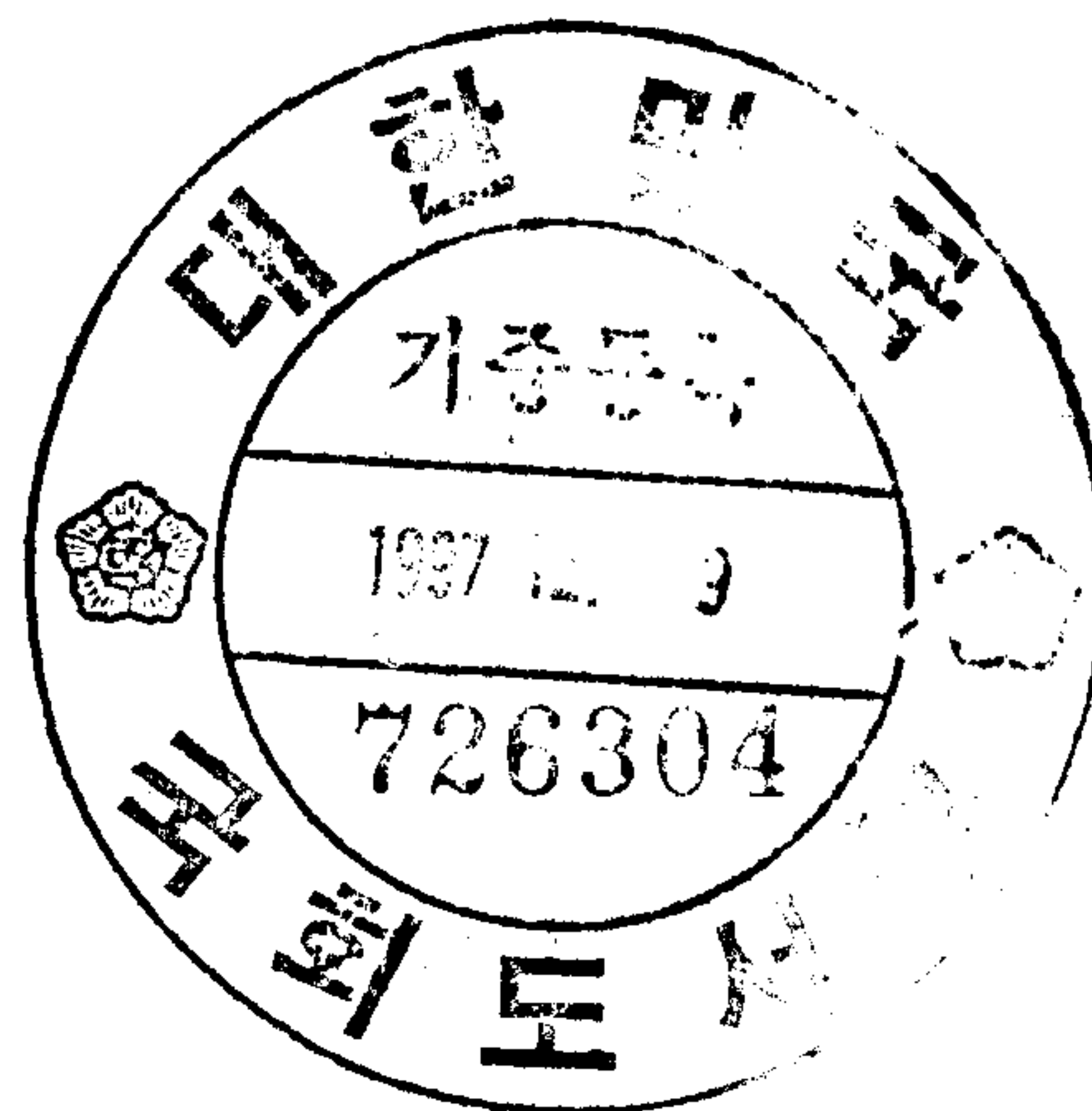
Studies on Molecular Biology of
Human Function

생체효소 저해 단백질의 입체구조 분석에 관한 연구

A Study on the Structural Analysis
of Enzyme Inhibitor Protein

연구 기관

한국과학기술연구원



과 학 기 술 처

제 출 문

과학기술처 장관 귀하

본 보고서를 “생체효소 저해단백질의 입체구조 분석에 관한 연구”과제의 보고서로 제출합니다.

1997 . 9.

주관연구기관명:한국과학기술연구원

총괄연구책임자: 이 강 봉

연 구 원 : 윤 창 노
" : Philip Kim
" : 권 지 혜
" : 이 호 진
" : 송 영 식
" : 최 문 정
" : 박 현 미
" : 지 명 환
" : 문 태 성
" : 김 상 옥

여 백

요 약 문

I. 제 목

생체 효소 저해 단백질의 입체구조 분석에 관한 연구

II. 연구개발의 목적 및 필요성

생체내의 고분자 물질로부터의 신제품 개발을 위해서는 인체기능 생체물질의 분자생물학적 연구중 분자 구조분석 기술의 확보가 인체질병의 원인규명과 진단 치료를 위한 신제품 개발의 열쇠가 된다는 판단에 따라 선진국에서는 대기업 연구소 및 대학등에서 이에 대해 약 10여년전 부터 활발한 연구가 권이 달린 화학 및 생물 계통의 신제품 개발 및 기술확보가 국가 경쟁력의 중요한 현안문제가 되고 있다. 따라서, 1950-1960 년대에 분자구조규명을 위해 X-ray와 NMR이 사용되기 시작한 이래 1980년대 중반에 이르기까지 선진국등에서 생체고분자의 구조가 규명된것은 20-30개 정도에 불과하였으나, 1980년대 중반이후 생체분자의 구조분석연구가 인체기능 고분자의 분자생물학적 기능 규명을 위해 필수적 이라는 사실의 인식과 함께 폭발적으로 증가하였다. 특히 NMR과 분자 모델링을 이용한 분자구조 규명에 관한 연구는 생체물질의 작용기작을 분자 level에서 근본적으로 설명할 수 있으며, 이러한 생체물질의 구조로부터 효소의 저해제 및 촉진제의 모델을 제시함으로써 신의약 개발에 획기적인 idea를 제공할 수 있는 미래지향적 고부가가치 산업으로 발전시킬 수 있다.

III. 연구개발의 내용 및 범위

Serine 프로테아제 저해제의 활성 부위는 가장 전형적인 프로테아제 저해제들의 활성부위와 유사한 형태를 가지고 있으며, 이는 Chymotrypsin/elastase의 저해제가 저해제의 가장 전형적인 메카니즘을 따른다는 것을 확인해주고 있다. 비록 Serine 프로테아제 단백질의 다양한 종류에도 불구하고 이러한 활성부위의 구조는 아주 유사하며 이러한 유사성으로 부터 Serine 프로테아제 저해제를 개발함이 이번연구의 목표가 되고 있다. 따라서, 컴퓨터 모델링 및 모의 실험을 통하여 Human Leukocyte Antigen(HLA) 효소와 이에 결합 하여 탁월한 fitting을 보임으로서 효소의 저해제로서 작용하는 펩타이드 및 유사체를 고안하고, 이들이 효소에 binding되어 있을때의 active conformation을 NMR을 이용하여 구조를 분석하고자하는 것이 이번 연구의 범위이다.

IV. 연구개발결과

컴퓨터 시뮬레이션 및 모델링을 통한 Human Leukocyte Antigen(HLA) 분자와 이에 결합하는 리간드 펩타이드간의 상호 작용을 이해하고 이로 부터 펩타이드가 HLA에 결합했을 때 가 질수 있는 삼차원적인 구조를 분석하기 위한 모의 실험을 수행 하였다. Complexed form과 uncomplexed form의 경우에 HLA의 residues간의 상관관계 계수의 지도를 그려봄으로써, α_1 -helix 가 시작되는 부분과 α_2 -helix 부분에서 현저히 다르게 나타났다. 또한, 상관관계의 정도는 complexed form인 경우에 더 크

게 나타났다. Hydrophobic pocket에서 HLA와 peptide의 움직임은 같은 경향을 갖는다. HLA의 α_2 -helix의 움직임도 concerted 하다. 이는 α_2 -helix가 T-cell receptor과 같은 물질들과의 상호작용을 가능하게 해줄것으로 기대된다. 결론적으로, HLA의 conformation은 rigid 하지만 원자들의 움직임은 complexed form과 uncomplexed form의 경우에 각각 다르게 나타났다. α_1 -helix 부분은 peptide와 강한 상호작용을 일으켜 α_2 -helix 부분의 이러한 concerted motion은 T-cell receptor과 같은 분자와의 상호작용을 유도할 것으로 기대된다.

NMR을 이용한 짧은 펩타이드 및 유사체의 규명에 앞서 선행연구를 통하여 밝혀진 RNase(1-13) 펩타이드의 NMR 파라미터를 구하고 이러한 NMR parameter(Coupling constant, NOE)들로부터 용액 상태의 3차원 구조를 규명하고 이들 펩타이드의 구조가 X-ray를 이용하여 얻어진 Native RNase의 구조와 비교되어 졌다.

V. 연구개발결과의 활용계획

이번의 연구개발 결과 활용은 기술적 측면에서 NMR 및 컴퓨터 모델링을 이용한 인체기능 생체 고분자의 구조 분석 기술을 확립함으로써 인체질병의 원인규명과 치료를 위한 펩타이드계 항생제 및 호르몬제등의 생물신약 개발을 위한 원천기술을 제공 했을 뿐만 아니라 효소 저해 펩타이드의 구조로부터 새로운 신약 개발에의 가능성을 제시하였으며 이는 신약 개발에 직접적으로 활용되어 질수 있다. 또한, 구조분석과 분자기능간의 관계 규명을 통한 신물질 개발의 모델을 제시함으로써

기존의 선도물질로 부터의 신약개발보다 막대한 부가가치를 갖고 있는 신약을 개발하는데 활용되어 질수 있다.

경제·산업적측면에서의 활용도를 구조분석의 시간감소와 정확성 증대로 관련 산업의 생산성 증대되며, 구조분석과 기능 예측의 방법을 물질개발에 도입함으로써, 시간과 비용 절감을 절감할수 있고 독창적 신물질 개발을 위한 기반 기술 제공으로 경쟁력 확보를 할 수가 있으며, 생명과학관련 고부가가치의 미래 산업 창출에 활용되어질수 있다. 또한 신의약개발 및 생물 신물질 개발에 직접적으로 활용되어 질수 있다. 즉, 효소의 기능을 활성화 혹은 억제 시킴으로써 질병의 치료에 사용되는 생물학적 신의약은 효소의 구조를 분석하고 active site의 위치를 확인함으로써 가능하다. 또한 생체물질의 구조확인과 생화학적 메카니즘을 밝힘으로서 인체 질병의 원인규명과 진단·치료제 개발등의 신의약 개발에 결정적인 역할을 수행할 수가 있다.

S U M M A R Y

I. Title

A Study on the Structural Analysis of Enzyme Inhibitor Protein

II. The Objective and the necessity of the Research Development

It has been decided that the structural analysis techniques play a key role in producing new bioproducts involving human disease treatment. Thus, since X-ray and NMR spectroscopies had been used for the characterization of molecular structure from 1950s~1960s, only the 3-dimensional structure of 20~30 biomolecules has been characterized until the middle of 1980s. However, the structural analysis of biomacromolecules has been increased dramatically after the middle of 1980s once they recognized that the structure of biomolecules is closely involved with their functions. Specifically, NMR and computer modelling play an important role in understanding of the function of molecular level, and their structure can afford to suggest the model of the inhibitor and give rise to the breakthrough of its development.

III. The Content and the Area of Research Deveopment

The active site of serine protease inhibitor protein is very similar with that of typical protease and it confirmed that the mechanism of chymotrypsin/elastase inhibitor follows a typical serine protease inhibitor. Although various serine protease exist, the structure of active site of serine protease is very similar and it is our research goal to develop the inhibitor of serine protease on the basis of structural similarity. Thus, this research content will cover the design of inhibitor peptide and peptide mimetics for Human Leucocyte Antigen(HLA) using computer modelling and simulation. Also, when designed and synthesized peptides is bound to enzyme, their active conformations will be characterized by NMR spectroscopy.

IV. The Result of the Research Deveopment

The computer simuation experiments has been performed to understand and analyze the 3-dimensional structure and interactions of the inhibitor peptide when the inhibitor peptide is bound to Human Leukocyte Antigen(HLA). The map of interrelationship coefficient has

been drawn for complexed form and uncomplexed form of HLA with inhibitor peptides and we are able to visualize the initiation part of α_1 -helix and α_2 -helix and their map differs remarkably. Also, complexed form is displayed more significantly than uncomplexed one in the measure of interrelation of the map. The mobility of HLA and peptide shows the same tendency, and the motion of α_2 -helix of HLA is concerted. Thus, α_2 -helix is expected to interact with T-cell receptor. We conclude that the conformation of HLA is rigid, but the mobility of atoms for complexed form and uncomplexed form shows differently. α_1 -helix part is strongly interacted with inhibitor peptide and the concerted motion of α_2 -helix generate to induce the interaction with T-cell receptor.

In order to characterize the 3-dimensional structure of short peptides in solution, we chose the RNase(1-13) peptide to establish the methodology for the characterization of solution structure before we get into the HLA inhibitor peptide and mimetics. NMR parameters(Coupling constants and NOEs) for RNase(1-13) peptide has been generated and molecular dynamics in conjunction with NMR constraints has been applied. The structure by NMR has been compared with native structure by X-ray crystal.

V. The Application Plan of the Research Development

This research result will be utilized for the establishment of the structural characterization techniques for bioactive peptides, and will provide the basic ideas for the development of new drugs. The structural characterization of enzyme inhibitor peptide will suggest the possibility for new drug development. Also, the way of the structural and functional analysis was introduced through this research result, and time and expense will be saved. Also, the characterization of the structure and reaction mechanism will play important role in diagnosis and treatment of disease and the development of new drugs.

C O N T E N T S

Chapter 1. Introduction-----15

Chapter 2. The Present Situtation of the domestic and
foreign Research Technology Development-----17

Chapter 3. The Contents and the Results of Research
Deveopment Performance-----21

Chapter 4. The Achievement and Contribution of Research
Deveopment Objective-----39

Chapter 5. The Application Plan of Research Deveopment
Results-----41

Chapter 6. References-----47

여 백

목 차

제 1 장 서론-----	15
제 2 장 국내외 기술개발 현황-----	17
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과-----	21
제 4 장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도-----	39
제 5 장 연구개발결과의 활용계획-----	41
제 6 장 참고문헌-----	47

여 백

제 1 장 서론

최근의 국제추세는 냉전체제에서 무한기술경쟁체제로 바뀌어짐에 따라 국가의 기본 산업들 중에서도 생존히, UR의 타결로 그동안 선진국에만 의존하던 기술력이 한계에 도달함에 따라, 국내에서의 생물·화학 계통의 신의약, 식품, 신소재등 고부가 가치의 기술집약산업이 국가산업경제의 국제 경쟁력을 확보하는데 있어서 중요성이 인식되어지고 있다. 특히, 생체 내의 고분자 물질로 부터의 신제품 개발을 위해서는 인체기능 생체물질의 분자생물학적 연구 중 분자 구조분석 기술의 확보가 인체질병의 원인규명과 진단 치료를 위한 신제품 개발의 열쇠가 된다는 판단에 따라 선진국에서는 대기업 연구소및 대학 등에서 이에 대해 약 10여년전 부터 활발한 연구가 권이 달린 화학및 생물 계통의 신제품 개발 및 기술확보가 국가 경쟁력의 중요한 현안문제가 되고 있다. 따라서, 1950-1960년대에 분자 구조규명을 위해 X-ray와 NMR이 사용되기 시작한 이래 1980년대 중반에 이르기까지 선진국등에서 생체고분자의 구조가 규명된것은 20-30개 정도에 불과하였으나, 1980년대 중반이후 생체 분자의 구조분석연구가 인체기능 고분자의 분자생물학적 기능 규명을 위해 필수적 이라는 사실의 인식과 함께 폭발적으로 증가하였다. 특히 NMR과 분자 모델링을 이용한 분자구조 규명에 관한 연구는 생체물질의 작용기작을 분자 level에서 근본적으로 설명할 수 있으며, 이러한 생체물질의 구조로 부터 효소의 저해제 및 촉진제의 모델을 제시함으로써 신의약 개발에 획기적인 idea를 제공할 수 있는 미래지향적 고부가가치 산업으로

발전시킬 수 있다.

특히 이러한 생체고분자의 구조규명연구가 선진국에서는 신약개발 및 단백질 공학의 핵심적인 연구분야로 진행되고 있는 상황에서 국내에서도 분자구조 연구를 통하여 독자적이고 독창적인 물질개발의 단계로 발전되어야 할 것이다. 따라서, 생명공학기술개발의 근간이 되는 생체물질 구조분석연구는 기술적인 면에서 뿐만 아니라 경제·사회적으로도 아주 중요한 것으로 판단되며 본 연구는 2000년대초까지 생명공학분야의 우리 기술 수준을 선진 7개국권에 진입시켜 생물산업을 21세기 수출 전략산업화에 크게 기여할 것으로 사료된다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

NMR분야에서 1991년 R.R.Ernst 박사가 노벨상을 수여함으로써, NMR 및 분자 모델링에 의한 생체분자의 구조 규명의 중요성이 선진국에서는 오래전부터 인식되어 오고 있다. 미국과 유럽의 선진국에서는 생명과학의 각분야에서 발견된 물질들을 분리정제하여 3차원적 입체구조를 찾기위한 연구가 활발히 진행되어지고 있으며, 이들의 구조로부터 새로운 신약을 개발하기 위한 연구가 급속히 발전하고 있다.

현재까지 국내에서는 NMR 및 Computer Modeling, X-ray를 이용한 생체분자구조 규명작업이 거의 초기 단계에 머물러 있으며 최근 2-3년내의 high-field NMR의 도입, 설치 및 선진 기술 도입등 기반구조 구축중에 있다. 선행과제를 통하여 분자 모델링 방법을 효소 단백질에 대한 리간드 펩타이드들의 결합력 비교 연구에 응용하였고 효소 단백질과 펩타이드간의 상호 결합을 보기위한 도킹실험 알고리즘을 개발하였다. 한편, 선행과제를 통하여 디자인된 Serine Protease 계열의 저해제를 합성, 정제하여 그들의 활성구조 규명을 위해 NMR과 분자 모델링을 이용하여 구조 분석중에 있다.

생체분자의 입체구조 규명에 관한 국내의 연구수준은 연구개발실적에서 보여주듯이 시작단계에 있다고 할수있다. 이분야의 국내기술상태가 이렇게 취약한 것은 생체고분자의 구조를 규명할 수 있는 고가의 첨단장비가 부족했고 이분야의 전문인력도 극히 적었기 때문이었다. 또한 이분야의 중요성에 대한 인식부족으로 연구 기반구축및 기술개발에 대한 지원이 그

동안 아주 미미했다. 비록 연구가 시작 되었다 할지라도 주로 효소 전체의 구조를 밝히는데 접근함으로써 NMR로 접근이 가능한 적당한 크기의 Target 효소의 선정에도 많은 어려움에 봉착해 있었다.

한편 컴퓨터 모델링 분야 에서도 기본적인 분자 시뮬레이션을 포함하는 모델링 소프트웨어들이 많이 있어 손쉬운 분자 계산이 가능하게 되었으나 실질적인 응용을 위해서는 다양한 시뮬레이션 방법들을 알맞는 모델 시스템에 적용해야 되는데 이를 위해서는 많은 실제적인 경험과 이론적인 배경이 축적되어야 한다. 이러한 개념의 응용이 국내외를 통털어서 그리 많지 않기 때문에 국내의 분자 모델링 기술 축적과 국제적으로는 모델링 분야의 선도적인 위치를 차지하기 위해서도 지속적인 응용연구가 요구 된다.

현재 생체분자구조 분석연구에 활용할 수 있는 NMR의 국내보유 현황은 대학, 기업및 연구소를 합하여 10 여대, 600 MHz는 기초과학지원센터, LG 연구소, 본원에 3대가 가동중에 있었으며 생명과학 연구소가 최근에 설치 가동중에 있다. 또한 컴퓨터 모델링을 위한 컴퓨터및 software도 최근에 모두 확보 되어 있는 상태이고 전문인력도 확보되어 이제는 국내에서도 생체고분자의 입체 구조구명을 위한 연구를 시도할 단계에 이르렀으며, 인체기능에 매우 중요한 역할을 하는 단백질의 구조로 부터 대체물질이 되는 신약개발의 획기적인 idea를 제공할 수 있는 단계에 있다고 할수있다. 또한 유용단백질의 구조로 부터 유용단백질의 생산, 치료제의 선도물질 생산 등을 위해 의약계및 제약회사의 요구가 지속적으로 증대될 것으로

전망된다.

화학계산기능과 컴퓨터 그래픽 기능의 발달에 따라 컴퓨터 시뮬레이션의 응용 범위는 점차 확대되어가고 있으며 단순한 단백질 분자의 표현에서 벗어나 분자간의 상호 작용과 결합 반응 등의 실질적인 응용의 영역에서 그 효력을 보이고 있다. 이러한 추세는 계속될 것이며 분자 모델링 기법에 의한 삼차원적인 단백질 구조 예측이 이루어 지게 되면 매우 강력한 구조 분석 기법의 하나로 떠오르게 될 것이다.

기술적으로 생체분자의 구조분석 기술은 모든 화학및 생물분야연구의 원천이 되는 기반기술로서, 어느 특정한 기술을 외국에서 도입한다는 것은 지속적으로 선진국에 의존하게 되어 전반적인 국내의 분자생물학 연구 발전에 전혀 도움을 주지 못하게 될것이다. 따라서, 현재 국내 연구환경은 선진국에 비해 열악하다고 하더라도 국내에서 분자구조규명의 기본적 이론과 기술의 자체 교육및 연구환경의 개선등 국내연구 기반 구축이 필요하므로, 이에 대한 기술도입은 바람직한 정책은 아닌것으로 사료된다.

생체물질의 구조분석 연구는 원천기술로서 고가의 첨단 장비도입과 장기적이고도 지속적인 투자가 요구됨으로 단기적으로 산업체는 기존의 신물질 개발 연구에 참여하고 분자구조 분석과 관련된 원천기술연구는 당분간 KIST와 같은 정부출연연구소가 주도하여 어느정도 신약개발 단계에 접어들 수 있는 선도물질이 도출되어 지고 난후에 점차적으로 산업체가 공동으로 참여하는 방식이 되어야 할 것으로 사료된다.

여 백

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 분자모델링을 이용한 생체효소 저해 단백질의 입체구조 분석 연구

1. 실험배경

생체효소 저해 단백질의 활성 상태에서의 입체구조를 규명하기 위한 분자모델링 기법 개발을 위하여 모델이 되는 효소 단백질과 이것과 결합할수 있는 리간드 단백질의 선택이 중요하다. 이를 위해 적당한 크기를 가지고 삼차적인 구조를 이룰수 있는 대상으로 Human Leukocyte Antigen (HLA) 분자와 이에 결합하는 리간드 펩타이드를 선택하였다. 또한 수용액 상태에서의 HLA 분자와 리간드 펩타이드간의 상호작용을 이해하고 이로부터 peptide가 HLA에 결합했을 때 가질수 있는 삼차원적인 구조를 살펴보기 위해 컴퓨터를 사용한 모의 실험을 행하게 되었다.

이 모의실험에서는 Insight/Discover software를 사용하였고 원자간의 상호작용을 계산하기 위하여 CVFF(Consistent Valence Force Field)를 사용하였다. 이 모델 시스템에 수용액 상태를 만들어 주기 위하여 HLA 와 peptide complex는 55.92 x 56.63 x 57.91Å의 water box에 그리고 HLA는 68.54 x 57.00 x 42.00Å의 water box에 넣었다. Water box에 edge effect를 없애주기 위하여 periodic boundary condition을 적

용하여 solute 분자들이 용액상태에 있도록 모델링하였다. 대부분의 nonbond interaction은 10Å 미만에서 서로의 영향이 사라지므로 10Å 내에 들어오는 원자사이의 상호작용만 고려되었다.

2. 실험방법

가. Molecular dynamics

생체내에서의 분자들의 움직임을 연구하는 이론적인 방법 중의 하나로서 사용되고 있으며 이 방법을 적용하여 분자의 운동을 연구하기 위해서는 분자를 구성하는 각 원자 사이의 상호작용을 묘사할수 있는 실험적인 parameter를 얻는 것이 중요한데, 이렇게 얻은 parameter를 potential function 또는 force field라 한다. 이들 potential function 또는 force field 는 여러 과학자들에 의해 고안되었는데 많이 사용하는 potential function으로는 MM2, MM3, AMBER, CHARMM, ECEPP, CVFF 등이 있다. 이들 potential function들은 고안된 방법들이 각각 다르기 때문에 취급하는 system에 따라 알맞은 것을 골라 사용해야 하며 나름대로의 장단점을 가지고 있지만 기본꼴에 있어서는 아래의 식과 같이 똑같은 형태를 갖는다.

$$\begin{aligned}
 E_{\text{pot}} &= E_{\text{bond}} + E_{\text{bend}} + E_{\text{torsion}} + E_{\text{nonbonded}} \\
 &= \sum k(b-b_0)^2 + \sum k(\theta - \theta_0)^2 + \sum (1 + \cos(n\phi)) \\
 &\quad + \sum \left(\frac{1}{r} + \frac{A_{ij}}{r^{12}} + \frac{B_{ij}}{r^6} \right) \quad (1)
 \end{aligned}$$

이와같은 potential function을 사용하여 분자의 총에너지를 계산할수 있고 원자의 상호작용 에너지 및 힘을 계산할수 있게 된다. 분자내의 원자들의 움직임은 Verlet algorithm을 이용하여 trajectory를 계산함으로써 묘사할수 있게 된다. 즉 시간이 t 일 때 그때부터 Δt 시간이 경과한 후의 한 원자의 위치는 다음과 같이 (2)식처럼 정의된다.

$$r(t+\Delta t) = r(t) + \frac{d}{dt} r(t)\Delta t + \frac{1}{2!} \frac{d^2}{dt^2} r(t)\Delta t^2 + \dots (2)$$

여기서 Δt 가 매우 작다면 (3)식과 같이 식을 간략화 시킬수 있다.

$$r(t+\Delta t) = r(t) + \frac{d}{dt} r(t)\Delta t + \frac{1}{2!} \frac{d^2}{dt^2} r(t)\Delta t^2 \quad (3)$$

이 식에다가 Newtonian mechanics를 도입하여 식을 다시 정리하면 (4)식과 같다.

$$r(t+\Delta t) = r(t) + v(t)\Delta t + \frac{1}{2!} \frac{F}{m} \Delta t^2 \quad (4)$$

$$\text{where } \frac{d}{dt} r(t) = v(t) \text{ and } \frac{d^2}{dt^2} r(t) = a = \frac{F}{m}$$

여기서 원자가 움직이는 초기 속도는 Maxwell-Boltzmann equation을 풀어서 구할수 있고 원자-원자 상호간의 interaction은 potential function에서 얻을수 있다. 따라서

실제 분자가 움직이는 모습을 계산해 낼수 있고 그렇게 해서 구해진 coordinate를 가지고 computer graphics technique를 사용하여 눈으로 확인 가능하다.

나. Periodic Boundary Condition

분자들간의 수용액에서의 연구를 위해서 분자 주위에 물분자가 존재하도록하여 계산한다. 이때 물분자를 무한히 많이 고려 할 수 없다. 따라서 수용액 상태에서 solute가 물 전체에 균일하게 퍼져있고 또한 물분자는 solvent이기 때문에 어떤 부분이든지 유사성을 가진다고 생각할수 있다. 따라서 solute을 일정수의 물로싼다음 이를 3차원으로 반복시키면 원래의 solute와 물을 확장된 부분에 의해 그림 1과 같이 둘러 싸이게 된다.

이때 실제 움직이는 분자는 Real Molecule에 해당하는 부분이고 ghost는 Real Molecule에 반복이고 ghost molecule는 real molecule에 힘을 줄 뿐이며 받지는 않는다. 따라서 box surface 물분자는 edge effect에 의해 물이 증기화되는 것을 막을수 있고 solute는 완벽하게 solvation 된 것 처럼 느끼게 된다.

3. 연구결과 및 고찰

수용액 상태에서 HLA + peptide인 경우와 peptide가 결합하

지 않은 HLA의 경우에 대하여 모의실험을 수행하였다.

Energy의 Fluctuation은 100kcal/mol 내외 정도이다(그림 1). 예상했었던 바와같이 평형상태에서 HLA & peptide complex의 conformation은 X-ray 구조에서 크게 벗어나지 않았다(그림2, 표1). 반면에 HLA만의 conformation의 경우 helical한 부분과 beta-pleated sheet 부분은 X-ray 구조로부터 약간의 fluctuation을 보이며, loop 부분은 상대적으로 flexible하기 때문에 helical한 부분과 beta-pleated sheet 부분보다는 X-ray 구조로부터 fluctuation 정도가 크다(그림3, 표2).

가. 배향 상관관계함수로 본 tryptophan ring의 움직임

일반적으로 peptide와 결합하는 HLA의 side chains은 complexed 형태와 uncomplexed 형태의 경우 motion과 averaged position이 다르게 나타난다. 특히, tryptophan (이하 TRP로 칭함) ring의 움직임의 변화는 주목할 만하다. 왜냐하면, TRP ring의 움직임의 변화가 T-cell receptor를 인지하는데 관련이 있을수 있다고 알려져 있기 때문이다. TRP ring의 움직임의 특징을 보기 위해 다음과 같이 정의되는 배향 상관관계 함수 (orientational correlation function)를 구해 보았다.

$$C_l = \langle P_l[\cos \theta(t)] \rangle$$

$$\cos \theta = \frac{A(t) \cdot B(t)}{|A(t)| |B(t)|}$$

여기서 θ 는 TRP ring을 정의하는 단위 벡터간의 각이며, P_ℓ 은 이 단위 벡터에 대한 ℓ -th order Legendre Polynomial에 해당한다. 각 TRP ring에 대한 배향 상관관계함수를 보면 첫째, TRP-167 ring의 움직임은 uncomplexed form인 경우보다는 complexed form인 경우에 좀더 제한적임을 볼 수 있다. T-cell receptor에 접근하기 위해서는 surface accessibility가 중요해지는데, HLA & peptide complex에서 TRP residue은 용매분자들에 노출된다. 그러나 uncomplexed form에서 TRP ring은 단백질 내부로 묻히게 되고 peptide의 부재 때문에 flexible motion을 하게 된다. TRP-147의 경우 complexed form과 uncomplexed form에서 TRP residue의 conformation은 유사하나, 움직임에 있어서는 약간의 차이가 있다. 이 TRP-147는 P9 antigenic peptide에 접촉해 있다. 그래서 이 residue는 uncomplexed form의 경우 보다는 complexed form 경우에 좀더 안쪽으로 파묻혀 있다. TRP-133은 TRP-147과 같은 특징을 보인다. 모의실험동안 TRP-133과 antigenic peptide 사이의 거리는 12Å으로 일정하게 유지된다. 한편, TRP-50과 TRP-61은 uncomplexed form과 complexed form에서 유사한 움직임을 보여준다. 이것은 이 두 residue가 peptide에 가까이 있지 않아서 uncomplexed form과 complexed form에서 환경의 변화가 없기 때문이다. TRP-107은 uncomplexed form과 complexed form의 두 경우를 비교해 보면, 배향 상관관계함수와 conformation에서 차이를 보인다. 비록 이 residue가 loop 부분에 위치에 있기는 하지만, complexed form에서 이 residue의 움직임은 좀더 제한적이다. 이는 complexed form에서 HLA

의 경직성을 보여주는 것이다.

나. HLA와 peptide 사이의 correlated motion

분자동역학 모의실험에서 단백질을 구성하는 원자들은 atomic force field에 의해 동시적 (concerted)이고 상관관계적 (well-correlated)인 움직임을 보인다. 이런 상관 관계적 움직임은 다음과 같이 정의되는 cross-correlation coefficient에 의해 살펴볼수 있다.

$$C_{ij} = \frac{\langle \Delta r_i \cdot \Delta r_j \rangle}{(\langle \Delta r_i \rangle \langle \Delta r_j \rangle)^{1/2}}$$

여기서 Δr_i 는 i 번째 원자의 평균적 위치로부터의 변화이다. 그림 4와 5에서 HLA와 antigenic peptide사이의 상관관계적 움직임을 보여주는데, cross-correlation coefficient 절대치가 0.35 이상인 경우의 각 쌍을 보여주고 있다. Hydrophobic pocket에 결합되어 있는 peptide residues, 즉 P2와 P9은 hydrophobic binding force 때문에 HLA와 상관관계를 갖지 않는다. 반면에, 용매분자들에 노출되어 있고 HLA와 약하게 상호작용하는 residues, 즉 P3부터 P7까지의 residues은 HLA의 α_1 helix 부분과 강한 상관관계를 갖는다.

다. HLA의 residues간의 상관관계

Complexed form (그림 6)과 uncomplexed form의 경우에

HLA의 residues간의 상관관계 계수의 지도를 그려보았다. 각 경우의 지도는 α_1 -helix가 시작되는 부분과 α_2 -helix 부분에서 현저히 다르게 나타났다. 또한, 상관관계의 정도는 complexed form인 경우에 더 크게 나타났다. Hydrophobic pocket에서 HLA와 peptide의 움직임(그림7과 8)은 같은 경향을 갖는다. HLA의 α_2 -helix의 움직임도 concerted 하다. 이는 α_2 -helix가 T-cell receptor과 같은 물질들과의 상호작용을 가능하게 해줄것으로 기대된다. 결론적으로, HLA의 conformation은 rigid 하지만 원자들의 움직임은 complexed form과 uncomplexed form의 경우에 각각 다르게 나타났다. α_1 -helix 부분은 peptide와 강한 상호작용을 일으켜 α_2 -helix 부분의 이러한 concerted motion은 T-cell receptor과 같은 분자와의 상호작용을 유도할 것으로 기대된다.

제 2 절 NMR을 이용한 생체효소 저해 단백질의 입체구조 분석 연구

Serine 프로테아제들중 대부분의 단백질 저해제는 보통 같은 메카니즘에 의해 작용하는 것으로 제안 되어져 있다. 그들은 동종의 효소와 매우 단단히 결합하여 서서히 가수분해됨으로서 작용을 하게 된다. 이러한 단단한 결합은 저해제의 활성 부위와 효소의 활성부위 사이의 접촉면을 나타내는 X-Ray 구조 연구에 의해 밝혀졌다. 그래서, 단백질 저해제들은 좋은 기질과 마찬가지로 방식에서 그들의 대응 효소들을 인지하고 결

합한다. 아마도, 효소와 저해제 접촉면의 탁월한 fitting은 free-energy profile에서의 최소 에너지에 해당하며 hydrolysis 와 dissociation으로 high-activation energy barrier를 제공한다. Serine 프로테아제 저해제의 활성 부위는 가장 전형적인 프로테아제 저해제들의 활성부위와 유사한 형태를 가지고 있으며, 이는 Chymotrypsin/elastase의 저해제가 저해제의 가장 전형적인 메카니즘을 따른다는 것을 확인해주고 있다. 비록 Serine 프로테아제 단백질의 다양한 종류에도 불구하고 이러한 활성부위의 구조는 그림 (10)에서 보여 주듯이 아주 유사하며 이러한 유사성으로 부터 Serine 프로테아제 저해제를 개발함이 이번연구의 목표가 되고 있다. 따라서, 제일 먼저 시도된 구조 분석 작업은 그동안 짧은 펩타이드중에서 Ribonuclease A 단백질에서의 N-terminal중 1~13 fragment(K-E-T-A-A-A-K-F-E-R-Q-H-M)의 구조에 관하여, 그동안 CD(Circular Dichroism)의 연구를 통한 2차구조를 형성하고 있는 것으로 단순 예측되어져 있었으나, 2차원 NMR, CD 그리고 Molecular Dynamics연구를 통하여 용액 상태에서의 3차구조를 예측하고, 이의 구조를 native RNase A의 구조와 비교 함으로써 짧은 펩타이드에서의 2차구조형성 과정을 찾고자 하였다.

일반적으로 짧은 선형 펩타이드(<30 residue)는 aqueous 용액에서 현저한 구조적 특징을 갖지 못하며 따라서, 오직 몇 개의 특이한 펩타이드에 대해서만 오직 single favored conformation을 갖는 것으로 관측되어져 왔다. 그러나, 단백질의 folding 문제와 관련해서 단백질의 짧은 fragment가 일정한 구조를 갖으며 이것이 단백질과 분리되어 있을 때 같은 native

상태의 구조를 채택할수 있는지를 확인하는 것은 매우 중요하다. 이것은 잠재적인 "kinetic intermediate"가 실험적으로 관측 가능하고 확실히 규명되어질때만이 가능하다.

우리가 알고 있는한 RNase부터의 N-terminal 펩타이드는 짧은 펩타이드로서 그들의 구조가 잘규명 되어졌 있고 Native conformation과 아주 유사한 구조를 갖는 것으로 알려져 있다. 단백질 folding의 기본 모델에 따르면 2차 구조의 성분들은 folding과정의 초기에 형성되며, 이들이 서로 상호 인력이 작용하고 안정화 되면서 단백질의 3차 구조는 이러한 인력의 합으로 부터 형성된다. 2차구조의 형성을 주는 요소들은 단백질 folding의 초기단계를 거치는데 영향을 준다. 특히, 짧은- 그리고 중간-범위의 인력은 이러한 folding의 초기 단계에서 먼 범위나 3 차 인력보다 우선적으로 작용한다. 이러한 예언은 단백질 folding의 초기 단계에서 2차구조 형성의 연구를 위한 모델 시스템으로서 선형 펩타이드에 많은 관심을 갖게 한다. 최근까지 선형 펩타이드는 물에서 거의 구조를 갖지 않는 것으로 믿어졌다. 이러한 견해는 또한 helix/coil 이론에 의해 support되어진다. 그러나, ribonuclease A의 c-peptide는 낮은 온도에서 helix를 형성하는 것으로 알려져 있으며, β -turn과 초기의 helix가 2차원 ^1H NMR에 의해 관측되어졌다. Ribonuclease A의 c-peptide에 있어서 helix형성은 Circular Dichroism에 의해 광범위하게 연구되어졌다. 아미노산의 치환 연구는 salt-bridge 형성을 포함하는 아미노산기간의 특이한 인력, 방향족기간의 인력 그리고 helix dipole을 갖고 있는 terminal charge그룹간의 인력들을 보인다. 여기서 우리는 낮

은 온도의 물에 존재하는 Ribonuclease A의 N-terminal 펩타이드에 대한 용액 상태에서의 conformation을 규명하기 위해 CD 및 2-차원 ^1H NMR 그리고, Molecular Dynamics 연구의 결과를 보인다. 그림 11에서 보여 주듯이 실험의 overview를 도표로 표시하였다. Circular Dichroism을 이용하여 pH, 온도 그리고, TFE의 농도에 따른 펩타이드의 2차 구조형성 변화를 연구 하였고, 가장 2차 구조 형성의 최적 조건을 얻어낸후에 NMR 연구를 시작 하였다. 그림 11의 도표에서 보여 주듯이 1-D 스펙트럼으로 부터 $^3\text{J}(\text{NH}, \text{C}_\alpha\text{H})$ 를 구하여, 이들로 부터 구조의 angle constraints을 결정 하였다. 또한 시그날에 대한 assignment는 각각 아미노산의 COSY 그리고 TOCSY cross-peak로 부터의 특징적인 패턴과 CAPRI software를 이용하여 명백하게 assign 되어 졌다. 한편, 핵간의 거리에 관한 정보를 얻기 위해서 NOESY 스펙트럼을 이용하였으며, NOESY cross-peak의 volume은 Mardigras' software를 이용하여 distance constraints을 결정 하였다. 그후 구조에 관한 계산을 위해 DIANA라는 distance geometry software를 이용하여, 구조를 계산하였다. 마지막으로 Restrained Molecular Dynamics를 이용하여 final 3-D structure를 규명하였다.

펩타이드 합성과 정제는 이미 기술되어진대로 수행되어 졌다.

그림 12는 RNase 1~13에 대한 CD 스펙트럼의 결과를 나타낸다. 그림 12의 (A)는 25 °C에서 100 % H_2O 와 점차적으로 TFE의 농도를 증가 시키면서 Helix가 증가하는 과정을 측정하였다. 그림 12의 (B)는 0 °C에서 TFE의 농도 변화에 따라

Helix가 증가하는 과정을 측정하였다. 이러한 결과 pH 5.3과 TFE의 농도가 50%일때 예상 했던대로 가장 Helix형성을 많이 하고 있는 것으로 결정되어졌다. 따라서, 이러한 조건하에서의 구조분석을 NMR을 이용하여 수행하였다. 그림 13은 0 °C에서의 TOCSY실험을 보여 주며, 시그날에 대한 assignment는 전문적으로 수행하여졌다. Table 3에 각각의 시그날에 대한 assignment가 tabulation되어 있다. 그림 14는 NOESY 스펙트럼을 보여주며, 이러한 펩타이드는 0°C에서 0.1 M NaCl, pH 5.25에서 50~60%의 CD에 의해 측정된 Helix형성의 최대점을 보인다. NMR을 위한 시료는 50% ¹H₂O/50% TFE, 0.02M NaCl, pH 5.2 ±0.05에서 준비 되었고 측정되어졌다. pH값은 pH meter값이 수정되지 않은채 사용되었다. 이차원 NMR 스펙트럼은 Unity plus 600 MHz로 기록 되었으며, 온도는 methanol 표준액을 사용하여 보정되어졌다. COSY, TOCSY 및 NOESY 실험은 States-Haberker 방법을 사용하여 phase-sensitive mode에서 수행되어졌다. 물 peak는 presat이나 pulse-field gradient에 의해 suppression 되어졌다. 4096 complex points에 대해 ~512 t₁값들이 모아졌으며, t₁ block당 128 scan이 모아졌다. NOESY 스펙트럼은 200, 300, 400 그리고 800 ms의 mixing time을 갖고 얻어졌다. ω₂ dimension은 Lorentzian-to-Gaussian weighting을 이용하여 processing되어졌고 ω₁ dimension은 π 혹은 π/2 phase-shifted sinebell weighting함수를 이용하여 processing하였다. NOE cross-peak의 강도는 volume integration에 의해 결정되었다. ³J_{HNα} coupling constant는 1 차원 스펙트럼에 의해 측정되어 졌으며, coupling constant를 이용한 backbone

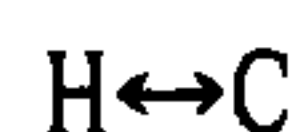
torsion angle이 계산되어, Table 4에 tabulation 되어졌다.

RNase(1-13) ^1H NMR 스펙트럼의 시그널 지정은 2차원 NMR 이용하여 수행되었다. g-cosy 및 tocsy로 부터 결정된 스핀 시스템의 지정은 phase-sensitive NOESY를 이용하여 sequence-specific assignment 방법으로 수행되어졌다. 모든 $d_{\alpha\text{N}}(i, i+1)$ NOE들이 관측되어졌고, 강한 $d_{\alpha\text{N}}(i, i+1)$ NOE의 관측은 conformational space의 β -영역에서 back-bone dihedral 각도와 함께 extended-chain 구조의 많은 비율을 포함한다는 것을 의미한다. 강한 $d_{\alpha\text{N}}(i, i+1)$ NOE들은 물에 녹아 있는 많은 짧은 펩타이드에서 관측된다. 한편, $d_{\text{NN}}(i, i+1)$ connectivity가 모든 아미노산에서 관측되어졌다. 또한 가능한 10 $d_{\alpha\text{N}}(i, i+3)$ NOE와 10 $d_{\alpha\beta}(i, i+3)$ NOE가 관측된다. Sequential $d_{\text{NN}}(i, i+1)$ NOE와 overlapping medium range $d_{\alpha\text{N}}(i, i+3)$ 와 $d_{\alpha\beta}(i, i+3)$ NOE connectivity는 helix의 존재를 표시하며, 적어도 helix는 펩타이드 residue 2-6과 residue 8-12는 helix구조를 형성한다는 것을 암시한다. 여기서 주목해야할 사실은 현재의 NMR 실험이나 CD 실험이 α -helix와 3_{10} helix를 구별할 수는 없다. Ala 5와 Lys 7과 Phe 8 및 Arg 10사이에 관측된 매우 약한 $d_{\alpha\text{N}}(i, i+2)$ NOE connectivity는 3_{10} helix이거나 초기 helix turn의 low population으로 부터 생성될수 있다. 보고된 모든 NOE는 400 ms 혹은 더짧은 mixing time에서 측정되어졌으며, 일련의 NOESY실험으로 부터 유도된 NOE build-up curve는 200, 300, 400ms의 mixing time을 갖고 수행된 결과는 이러한 mixing time에서 spin-diffusion 현상이 무시할수 있다는 것을 암시한다. Helical conformation의 존재를 의미하는 NOE에 첨

가해서 펩타이드 back-bone에서 kink를 알 수 있는 아미노산 residue 간의 NOE도 또한 존재한다. 이러한 NOE들이 보통의 regular helix에서는 보이지 않으며 RN(1-13)에서는 특이한 NOE의 class 를 보인다.

RN(1-13)에 대한 interresidue NOE connectivity가 그림 15의 (A)에 요약되어져 있다. 그림 15의 B는 native RNase A의 NMR 구조가 요약 되어져 있다. 두 개의 그림에서 보여 주듯이 기본적으로 펩타이드 N-terminal 1~13 구조는 기본적으로 단백질의 그것과는 차이가 있음을 보여준다. 이러한 차이는 부분적으로 존재하는 random coil과의 average 구조에 기인 하는 것으로 보인다

RN(1-13) 펩타이드가 5 mM, .05M NaCl의 H_a 수소의 chemical shift 변화가 pH 변화에 따른 함수로 그림 16에 보여 졌다. 스펙트럼에 대한 assignment는 아래에서 처럼 보고 되어 졌다. Ala 4, Ala 5 그리고, Ala 6의 resonance들은 펩타이드의 초기 titration실험에 의해 보고 되어진바 있다. 그들의 pH 변화에 따른 chemical shift의 변화는 45 °C의 것과 비교 되어 졌으며, 45 °C에서는 완전한 random coil을 형성한다는 것으로 고려 되어졌으며, 그 이유는 구조의 변화에 의한 원인이 아닌 단순 pH 변화에 따른 영향을 제거하기 위해서다. 그러므로, 빠르게 두 개의 상태를 오가면서 평형을 유지하고 있다고 가정한다.



여기서 H는 folded species 그리고 C는 Coil species를 각각 나타내며 이러한 curve는 helical state의 상대적인

population의 pH dependence를 보인다. 32개의 수소 시그날에 대한 weighted average curve가 보여 졌다. 커브는 최대의 shift 차이값에 대해 임의로 100%를 주도록 scale되어졌다. Helix형성은 pH ~5에서 최대가 되며, Helix형성은 pH<3 과 pH>8에서 최대 77%와 57%로 감소한다. 비록 pH dependence커브의 일반적인 모양이 CD 스펙트럼에 의해 얻어 진것과 유사성을 보인다.

펩타이드나 단백질에서 helical 구조에서의 Amide chemical shift는 periodicity를 가지고 있다는 것이 판명되어 졌다. 과거의 helical 구조에서는 아마이드 수소의 평균 chemical shift는 약 0.2 ppm upfield shift되고 β -sheet 구조에서는 약 0.3 ppm down-field로 shift된다는 여러번의 보고가 있어왔다. 이러한 helical 구조에서의 chemical shift에서의 변화는 NMR시그날에서 amide 수소의 NMR chemical shift가 3~4 residue/cycle의 periodicity를 갖고 있는 것으로 판명되었다. 이러한 helical periodicity의 유래는 수소결합 길이의 주기적인 변화에 기인하며 이러한 수소결합 길이에서의 perturbation은 아마이드 수소의 chemical shift에 약 1 ppm의 변화를 준다. 더군다나, 이러한 모델은 helices의 hydrophobic face와 관련된 상대적인 downfield shift와 일치한다 따라서, 수소결합 길이의 변화가 Chemical shift변화의 원천이 된다는 몇가지 증거가 있다. 첫째로 residue i와 i+3 아마이드 수소와의 NOE강도에서의 작은 변화가 측정되어지며, chemical shift에서의 주기성(periodicity)은 hydrophobicity가 감소할수록 비록 전체적인 helical 성격은 증가한다고 할지라도 감소한다.

이러한 아마이드 수소 Chemical Shift의 periodicity는 작지만 수소결합 길이 및 각도에서의 주기적인 변화에 기인하여 단백질이나 aqueous용액에서 펩타이드 helical 구조의 특징이다. 그러나, 단백질의 helical 구조가 아주이상적인 geometry를 갖고 있거나 kink 혹은 심하게 휘어진 경우는 이러한 oscillatory chemical shift를 보이지 않을수 있다.

그림 17은 RNase A 펩타이드 fragment의 helix 구조의 형성 정도를 확인하고 native RNase A 단백질과의 구조적 차이를 조사하기 위해 펩타이드 α -H와 random coil간의 차이를 펩타이드 sequence별로 보여 주었다. 여기에서 나타나듯이 펩타이드와 native protein간의 큰 차이를 보이지 않는 chemical shift의 periodicity를 보여 준다. 한편, 그림 17의 (B)는 펩타이드 N-H의 chemical shift 변화를 보여 준다. 이그림에서 보여주듯이 native protein에서는 3~4 residue/cycle의 periodicity를 가지고 chemical shift가 oscillation하는 것을 보여 완전한 α -helix를 형성하는 것을 보여준다. 그러나, 펩타이드 fragment는 반드시 그러한 패턴을 보이지 않으며, 이는 random coil과 α -helix를 빠르게 오가면서 평형을 이룬다는 사실을 보여준다.

그림 18의 (A)는 coupling constant로 부터 나온 angle constraints과 NOESY spectrum으로 부터 얻은 distance constraint을 이용하고, DIANA program을 이용하여 계산한 RNase A 펩타이드의 3차원 구조를 보여주며, 그림 18의 (B)는 Molecular Dynamics를 이용하여 펩타이드의 dynamic form들의 superimposed structure 이다.

위에서 얻은 결과와 같은 방법으로 디자인된 inhibitor peptide의 구조를 규명하여, inhibitor peptide의 active conformation을 규명함으로써 신약 개발의 기반을 제고하고자 하였다.

여 백

제 4장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도

연구개발 목표는 컴퓨터 모델링 및 NMR 분광법을 이용한 리간드 펩타이드의 활성구조 분석과 리간드 펩타이드 구조와 기능간의 상관관계를 규명하고자 함을 목표로 하였으며 이를 위해 리간드 펩타이드의 활성구조 규명을 위한 분자 시뮬레이션 기법을 개발하고 리간드 펩타이드들간의 결합력 비교기술, 리간드 펩타이드 및 단백질의 합성 및 분리, 정제 그리고 합성된 리간드의 활성 검색, NMR data 수집, 다차원 NMR 기법, DSP 및 PFG 기술 획득 및 활용, 컴퓨터 모델링을 통한 분자구조 규명기술 확립, 아미노산의 선택성 연구를 위한 분자 시뮬레이션 방법 개발과 선택성 활성구조간의 관계를 이용한 리간드 설계기술등이 확립 되었다. 또한 활성구조와 리간드 펩타이드의 선택성 요인 규명 및 NMR 파라미터를 이용한 분자 모델링 작업, 모델링과 실제 NMR data의 비교 분석, 컴퓨터 모의실험을 통한 용액상의 생체분자 구조 확인과 NMR data의 분석 및 모델링을 통한 리간드의 활성구조 결정, 그리고 구조와 기능간의 상관 관계규명작업을 수행하였다. 이번 연구 수행을 통하여 분자량이 작은 펩타이드도 구조를 갖을 경우 NMR constraints와 Molecular Dynamics를 사용하여 용액 상태에서의 입체구조를 규명할수 있었으며, 이러한 분자 구조 분석 기술은 작은 유기분자에서부터 bioactive 펩타이드 그리고, 효소와 같은 거대 분자에 이르

기까지 용액 상태에서의 입체 구조를 규명할수 있다. 이번 연구수행을 통하여 확보된 기술은 대학 및 관련기관 그리고, 산업체에 이전하여 연구 및 신약 개발에 활용되어 질수 있다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

이번의 연구개발 결과 활용은 기술적 측면에서 NMR 및 컴퓨터 모델링을 이용한 인체기능 생체 고분자의 구조 분석 기술을 확립함으로써 인체질병의 원인규명과 치료를 위한 펩타이드계 항생제 및 호르몬제등의 생물신약 개발을 위한 원천기술 제공 했을 뿐만 아니라 효소 저해 펩타이드의 구조로 부터 새로운 신약 개발에의 가능성을 제시하였으며 이는 신약 개발에 직접적으로 활용되어 질수 있다. 또한, 구조분석과 분자기능간의 관계 규명을 통한 신물질 개발의 모델을 제시함으로써 기존의 선도물질로 부터의 신약개발보다 막대한 부가가치를 갖고 있는 신약을 개발하는데 활용되어 질수 있다.

경제·산업적측면에서의 활용도를 구조분석의 시간감소와 정확성 증대로 관련 산업의 생산성 증대되며, 구조분석과 기능예측의 방법을 물질개발에 도입함으로써, 시간과 비용 절감을 절감할수 있고 독창적 신물질 개발을 위한 기반 기술 제공으로 경쟁력 확보를 할 수가 있으며, 생명과학관련 고부가가치의 미래 산업 창출에 활용되어질 수 있다. 신약개발 및 생물신물질 개발에 직접적으로 활용되어 질 수 있다. 즉, 효소의 기능을 활성화 혹은 억제시킴으로써 질병의 치료에 사용되는 생물학적 신약은 효소의 구조를 분석하고 active site의 위치를 확인함으로써 가능하다. 또한 생체물질의 구조확인과 생화학적 메카니즘을 밝힘으로써 인체 질병의 원인규명과 진단·치료제 개발등의 신약 개발에 결정적인 역할을 수행할 수가 있다.

Figure Caption

Figure 1. Root mean square fluctuations in kinetics, potential, and total energy measured at 100ps

Figure 2. A set of equilibrated conformation of HLA compares with X-ray data, which is represented as ribbon model.

Figure 3. (a) Root mean square fluctuations about the structure averaged at given time interval, t , from 100-ps simulation of HLA (b) Root mean square fluctuation compares with the B-factor derived from Debey-Waller factor.

Figure 4. Cross correlation coefficient of time series between HLA-A2 and viral peptide shows about each P1,P2...P9 of viral peptide.

Figure 5. Residue-Residue electrostatic energy between each residues of viral peptide and HLA, which are plotted versus residue sequence of HLA.

Figure 6. Averaged cross correlation coefficient of between residues of HLA is plotted above the absolute

value, 0.3. The bright mark shows same direction of motion and the dark mark show the opposite direction of fluctuation.

Figure 7. The geometry of particular residues of HLA to form the hydrogen bond with the peptide bond of P1 and P2, P2 and P3, and P8 and P9 of viral peptide.

Figure 8. Dihedral angle and distance fluctuation of particular HLA residues to need the formation of hydrogen bond between the peptide bond of binding peptide and HLA.

Figure 9. Dihedral angle and distance fluctuation of center of each pairs for keeping the plane of backbone torsion, ω , in binding peptide geometry.

Figure 10. Superposition of residues P3 to P2' of the reactive site loops from a selection of protein inhibitors of serine protease (Chymotrypsin/Elastase inhibitor, BPTI, Ovomuroid inhibitor, Chmotrypsin inhibitor, Leech inhibitor and Bowman-Birk inhibitor)

Figure 11. Experimental Overview

Figure 12. CD spectra for RNase A N-terminal pepride

fragment(1~13)

Figure 13. TOCSY spectrum(mixing time, 125 ms) of RNase A (1~13) fragment in 50 % TFE/ 50 % water solution at pH = 5.35, 273 K

Figure 14. NOESY spectrum(mixing time, 800 ms) of RNase A (1~13) fragment in 50 % TFE/ 50 % water solution at pH = 5.35, 273 K

Figure 15. Summary of sequential and intermediate-range NOE data for (a) RNase A (1~13) peptide in 50 % TFE/water solution at pH = 5.35, 273 K (b) native RNase A protein(Biochemistry 1989, 28, 5930)

Figure 16. The chemical shift change as a function of pH for Thr³C₇H₃ and Lys⁷C₈H at 0 °C and 45 °C.

Figure 17. (A) α H chemical shift difference from random coil chemical shift (B) Amide chemical shifts for native RNase A protein(■), Rnase A peptide in 90% H₂O/10% 2H₂O (●) and Rnase A peptide in 50% TFE/50% H₂O(▲)

Figure 18.(A) The starting conformations used by dynamic force protocol, as derived from DIANA (B) Ten superimposed

peptide conformations, which were calculated by molecular dynamics during 10 ps.

Table Caption

Table 1. Root mean square departure of HLA from X-ray structure averaged at molecular dynamics simulation

Table 2. Residues of HLA which is contact to each atoms of side chain of P1, P2, and P9.

Table 3. NMR Parameters for RNase 1~13, pH 5.3, 273 K in 50% TFE/water solution. Chemical shifts are in referenced to DSS and are accurate ± 0.01 ppm

Table 4. $^3J_{\text{NH}, \alpha\text{H}}$ Coupling constants(Hz) for Ribonuclease A (1~13) fragment and calculated backbone torsion angle.

제 6 장 참고문헌

1. L. J. Stern & D. C. Wiley, *Structure*, 2, 245-251 (1994)
2. M. Matsumura, D. H. Fremont, P. A. Peterson, & I. A. Wilson, *Science* 257 927 (1992)
3. K. Falk, O. Rotzschke, S. Stevanovic, G. Jung & H. G. Rammensee, *Nature* 351 290 (1991)
4. D. F. Hunt, R. A. Henderson, E. Shabanowitz, K. Sakaguchi, H. Michel, N. Sevilir, A. L. Cox, E. Appella & V. H. Engelhard, *Science*, 255, 1261 (1992)
5. H. C. Guo, T. S. Jardetzky, T. P. J. Garrett, W. S. Lane, J. L. Strominger & D. C. Wiley, *Nature*, 360 364 (1992)
6. T. S. Jardetzky, W. S. Lane, R. A. Robinson, D. R. Madden & D. C. Wiley, *Nature* 353 326 (1991)
7. D. R. Madden, J. C. Gorga, J. L. Strominger & D. C. Wiley, *Nature* 353 321 (1991)
8. H. C. Guo, D. R. Madden, M. L. Silver, T. S. Jardetzky, J. C.

gorga, J.L Strominger & D.C. Wiley, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 8053 (1993)

9. T.P.J. Garrett, M.A. Saper, P.J. Bjorkman, J.L. Strominger & D.C. Wiley, Nature 342 692 (1989)

10. J. Ruppert, J. Sidney, E. Celis, R.T. Kubo, H.M. Grey & A. Sette, Cell, 74 929 (1993)

11. M.R. Jackson, E.S. Song, Y. Yang & P.A. Peterson, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 12117 (1992)

12. T. Elliott, V. Cerundolo, J. Elvin, & A. Townsend, Nature 351 402 (1991)

13. D.N. Garboczi, D.T. Hung, & D.C. Wiley, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 3429 (1992)

14. P.J. Bjorkman, M.A. Saper, B. Smraoui, W.S. Bennett, J.L. Strominger & D.C. Wiley, Nature 329 506 (1987)

15. M.A. Saper, P.J. Bjorkman & D.C. Wiley, J. Mol. Biol 219 277 (1991)

16. M.L. Silver H.C. Guo, J.L. Strominger, & D.C. Wiley,

Nature 360 367 (1992)

17. D.H. Fremont M. Matsumura, E.A. Stura, P.A. Peterson & I.A. Wilson, Science 257 919 (1992)

18. W.Zhang, A.C.M. Young, M.Imarai, S.G.Natheson, & J.C. Sacchettini, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 8403 (1992)

19. D.R.Madden, D.N. Garboczi & D.C. Wiley, Cell 75 693 (1993)

20. A.T.Hagler, P.S. Stern, R.Sharon, J.M. Becker & F.J. Naider, J. Am. Chem. Soc 101 6842 (1979)

21. Nuclear Magnetic Resonance (Part A : Spectral techniques and Dynamics) in "Methods in Enzymology" Vol 176, Editors : N.J. Oppenheimer and T.L. James, 1989, Academic Press

22. Nuclear Magnetic Resonance (Part B : Structure and Mechanism) in "Methods in Enzymology" Vol 177, Editors : N.J. Oppenheimer and T.L. James, 1989, Academic Press

23. NMR of Proteins and Nucleic Acids (1986), Kurt Wuthrich, John Wiley & Sos. Inc.

24. The Nuclear Overhauser Effect in Structural and Conformational Analysis, David Nehaus and M. P. Williamson (1989) VCH Publishers, Inc
25. NMR in Drug Design, Edited by D. J. Craik, CRC Press, 1995
26. K. Huang, N. C.J Strynadka, V.D. Bernard, R.J. Peanasky and MNG James, Structure 2, 679-689(1994)
27. D. S. Wishart, B. D. Sykes and F. M. Richards
J. Mol. Biol. 222, 311-333(1991)
28. M.S. Lee and B. Cao Protein Engineering, 9, 15-25(1996)
29. J.J. Dsterhout, Jr., R. L. Baldwin, Eunice J. York, J. M. Stewart, H. Jane Dyson and P. E. Wright, Biochemistry 1989, 28, 7059-7064
30. A. D. Robertson, E. O. Purisima, M. A. Eastman and H. A. Scheraga, Biochemistry 1989, 28, 5930-5938
31. P. S. Kim, A. Bierzynski and R. L. Baldwin, J. Mol. Biol., 1982, 162, 187-199

32. A. Bierzynski and R. L. Baldwin, J. Mol. Biol., 1982, 162, 173-186
33. A. Bierzynski, P. S. Kim and R. L. Baldwin, 1982, 79, 2470-2474
34. D. S. Kemp, T. J. Allen and S. L. Oslick, J. Am. Chem. Soc., 117, 6651-6657
35. P. E. Wright, H. J. Dyson and R. A. Lerner, Biochemistry, 27, 7167-7175
36. I. D. Kuntz, P. A. Kosen and E. C. Craig, J. Am. Chem. Soc., 113, 1406-1408

여 백

여 백

여 백

Figure 1.

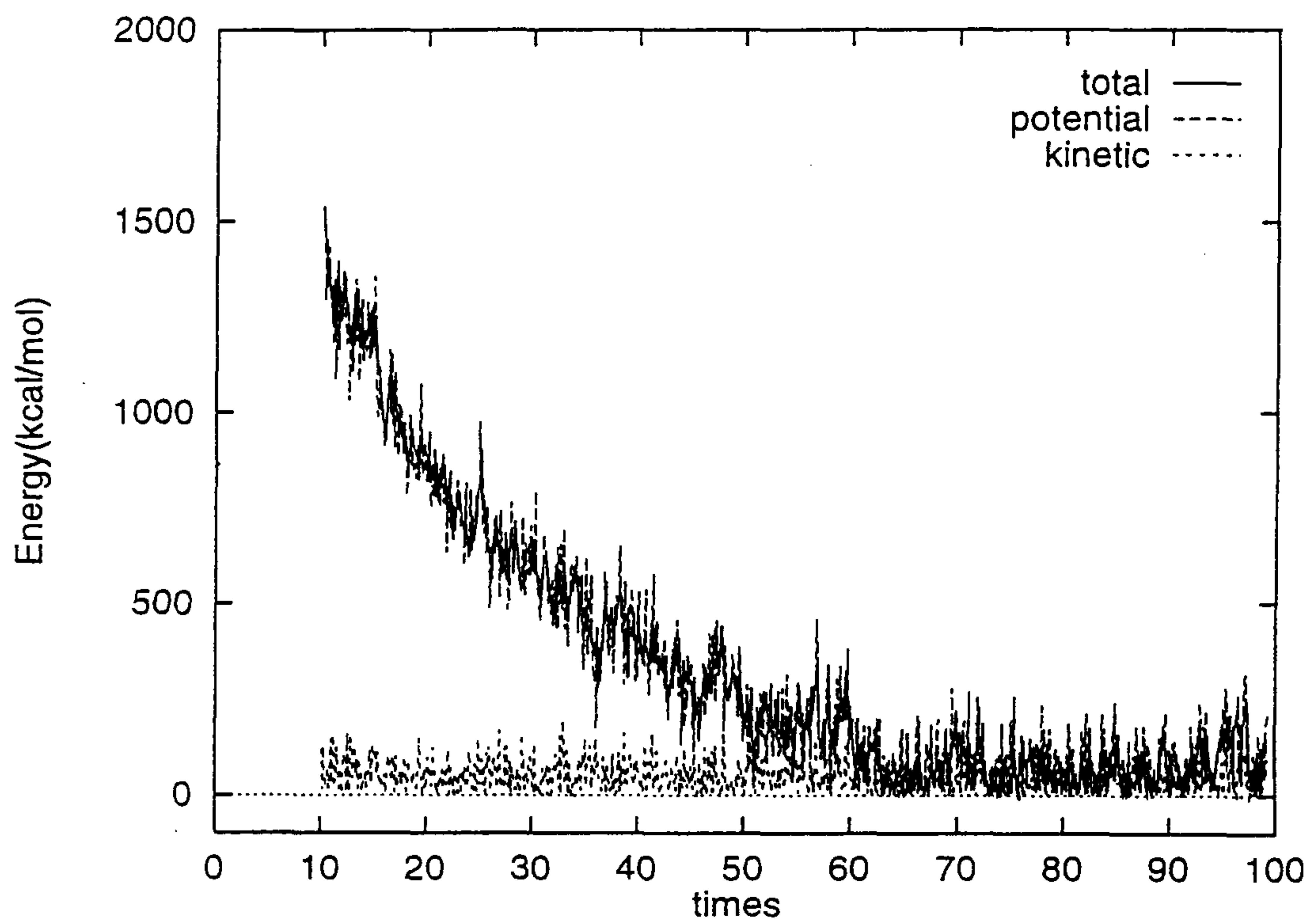


Figure 2.

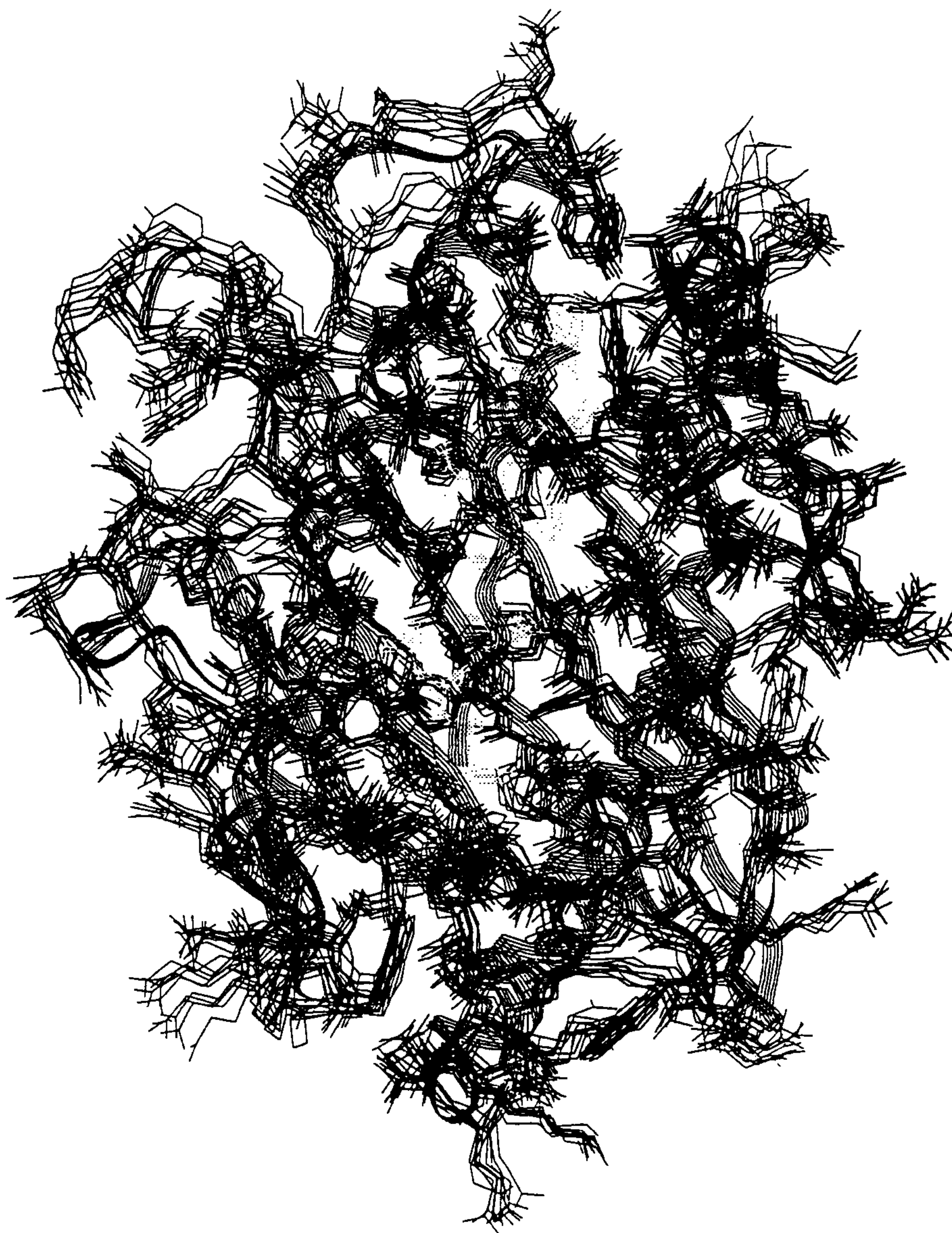


Figure 3.

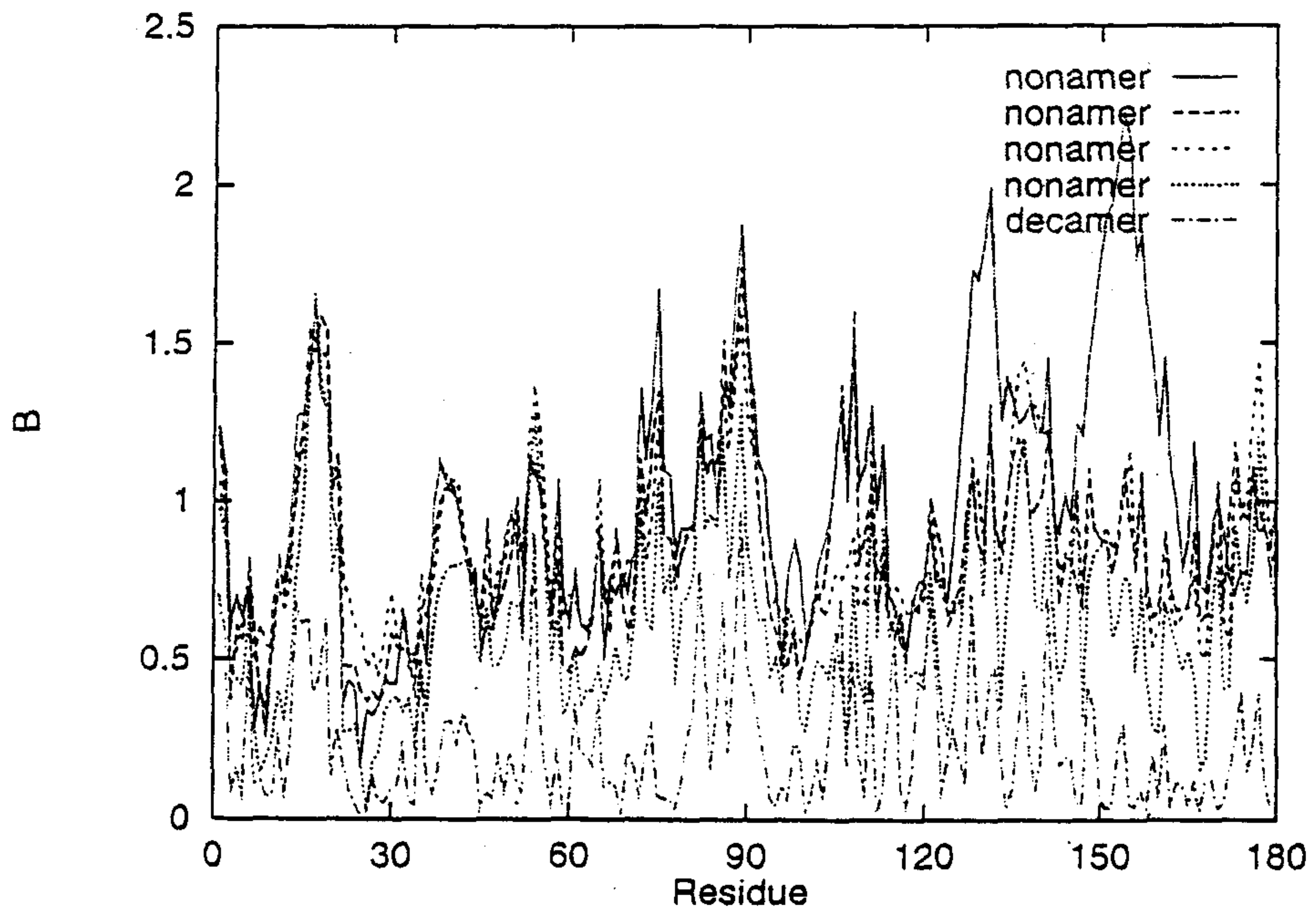
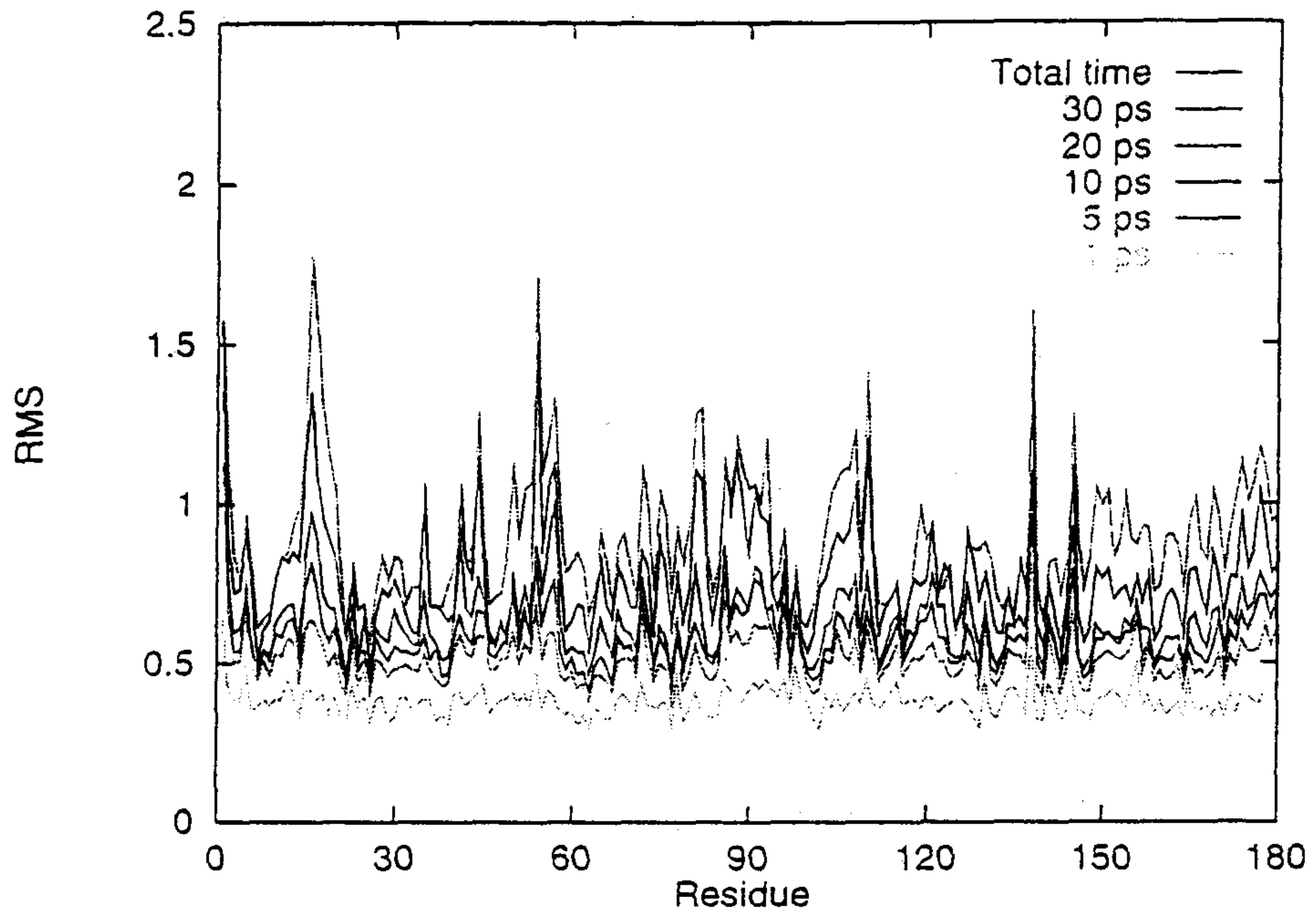


Figure 4-1.

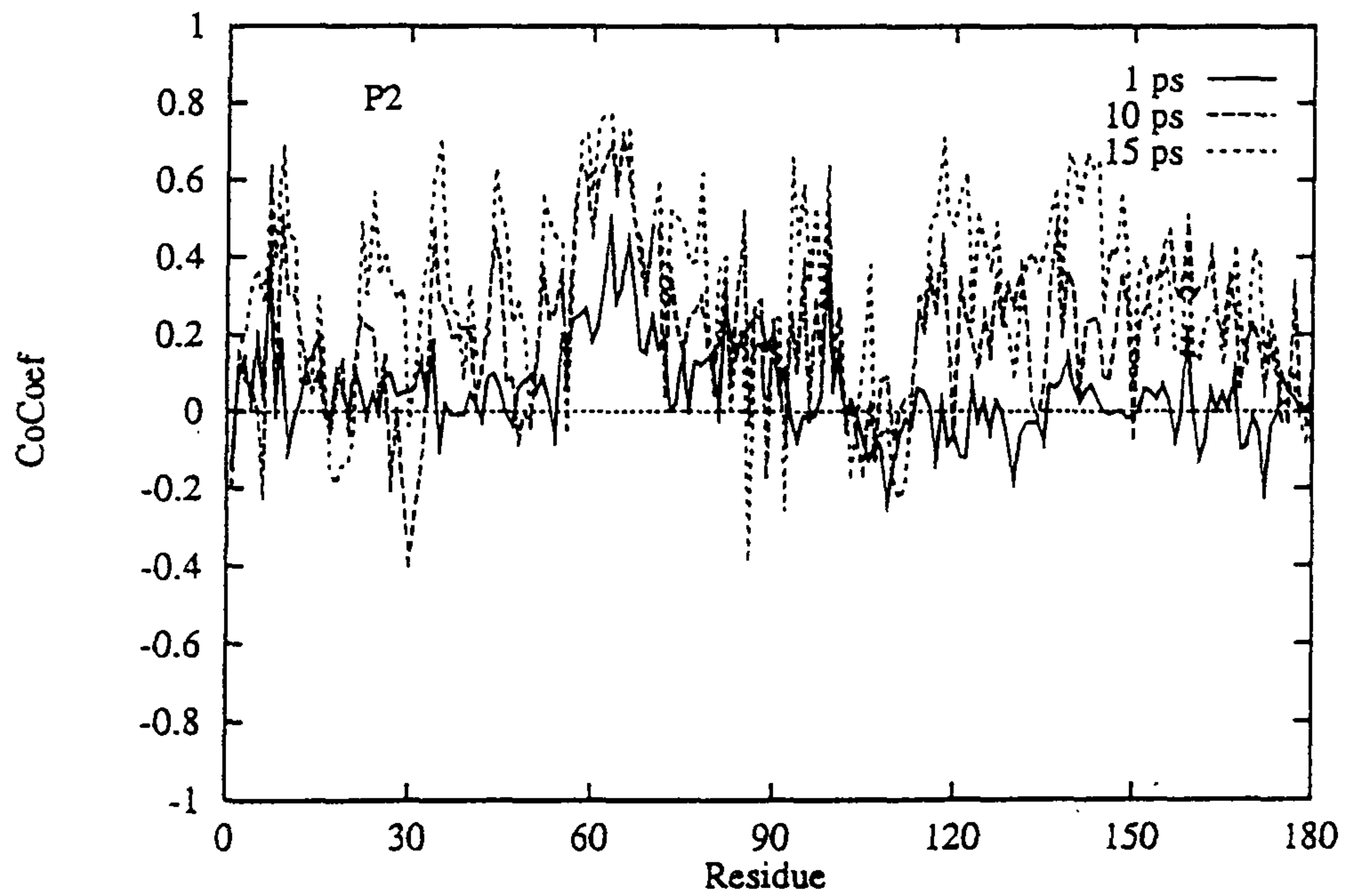
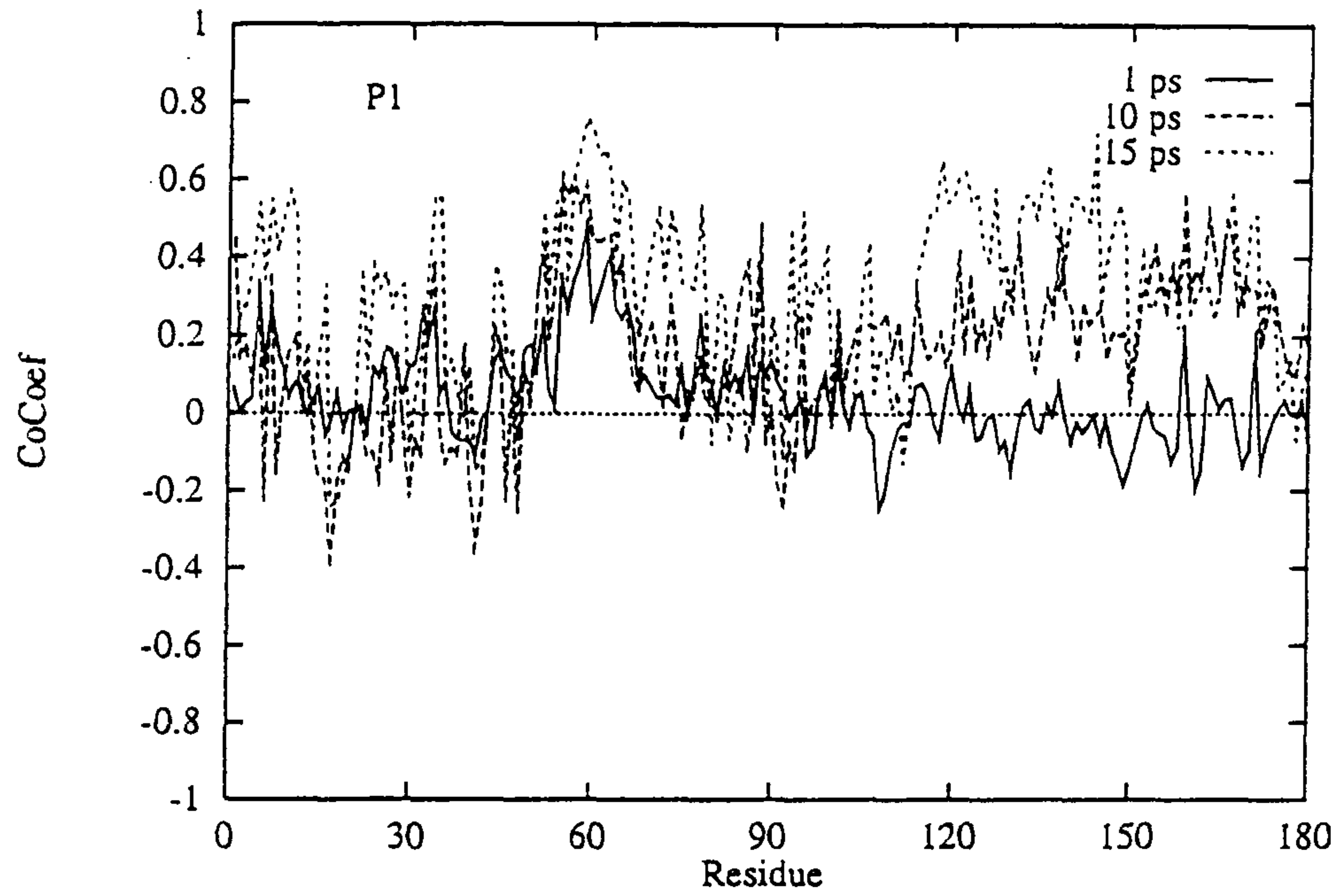


Figure 4-2.

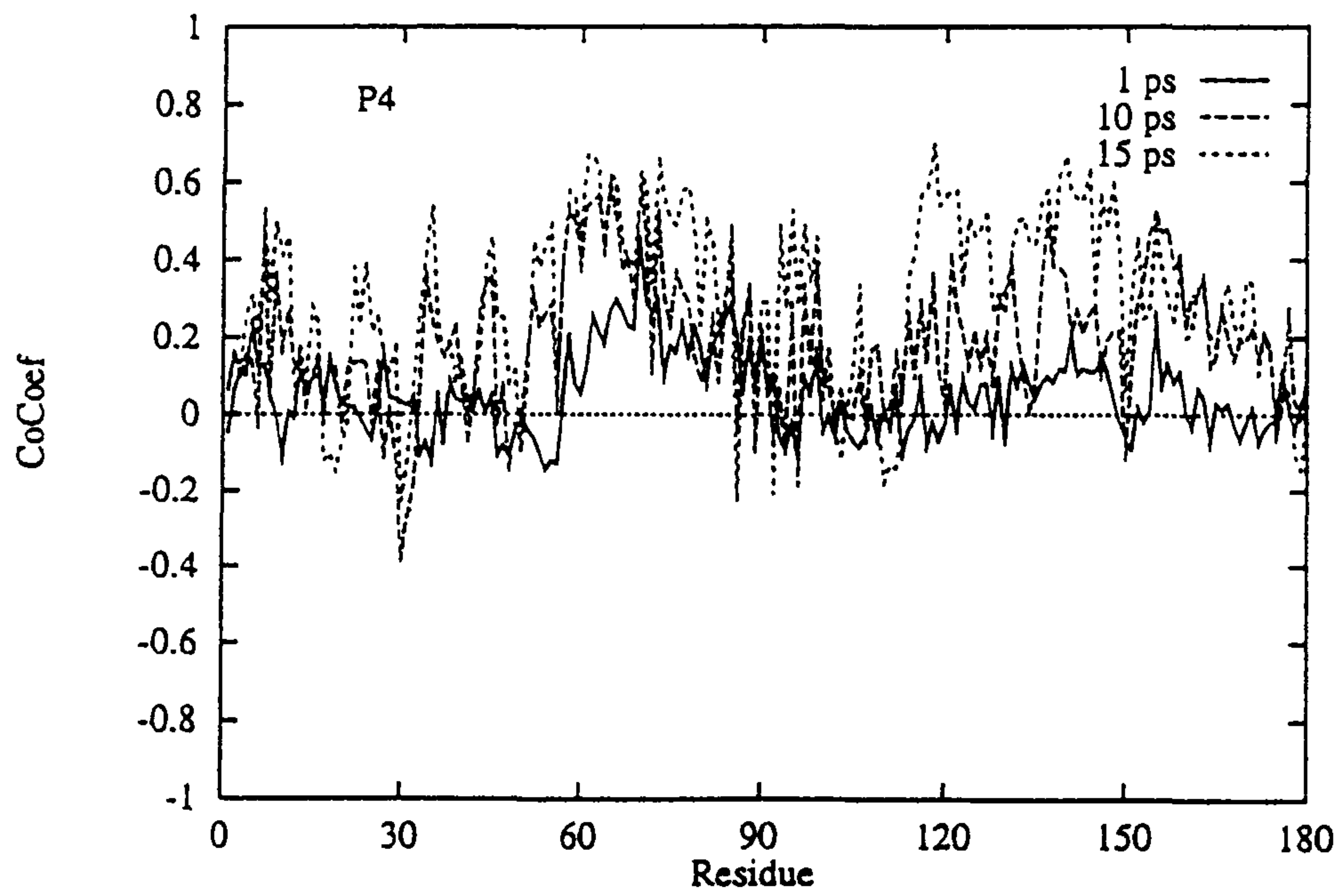
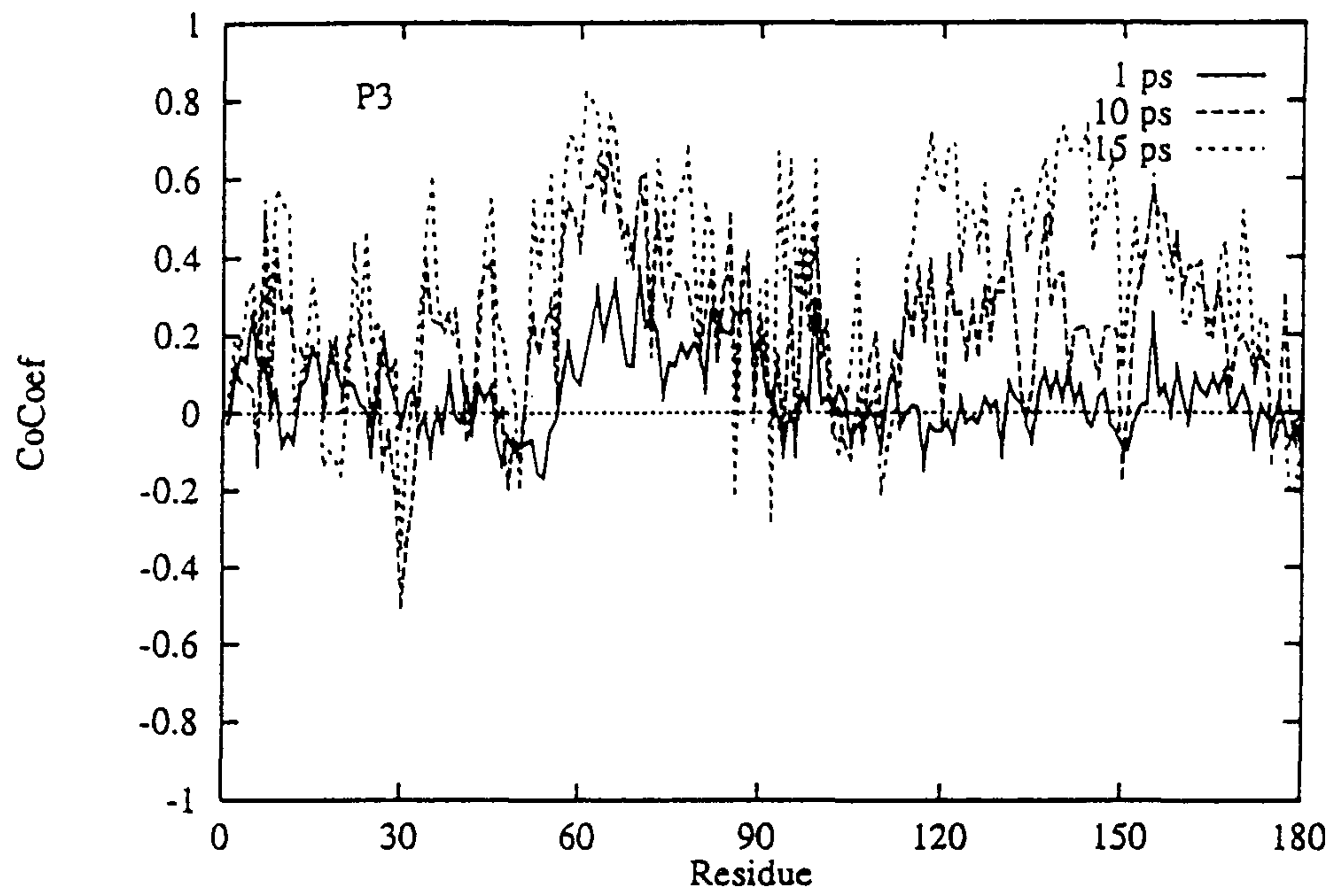


Figure 4-3.

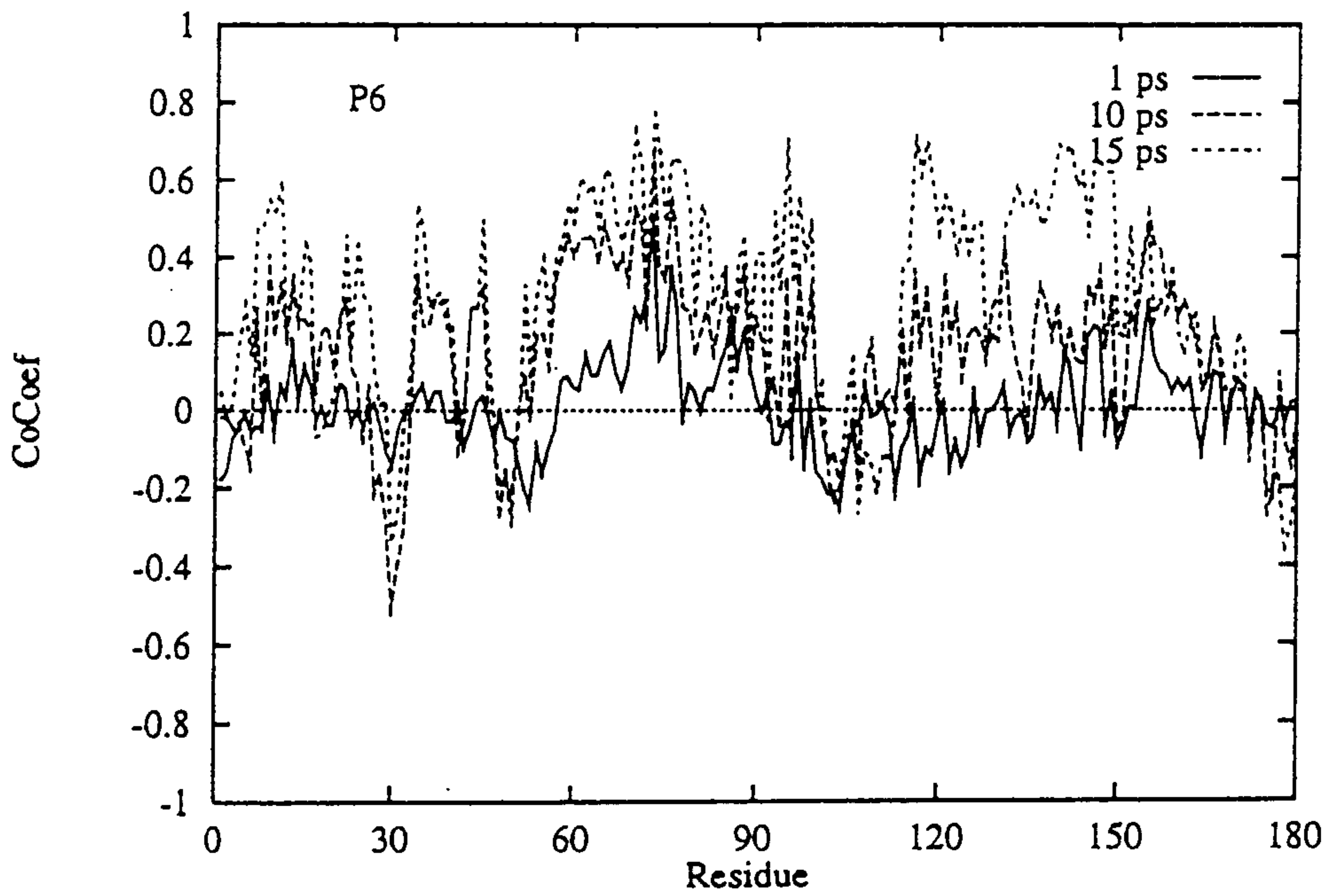
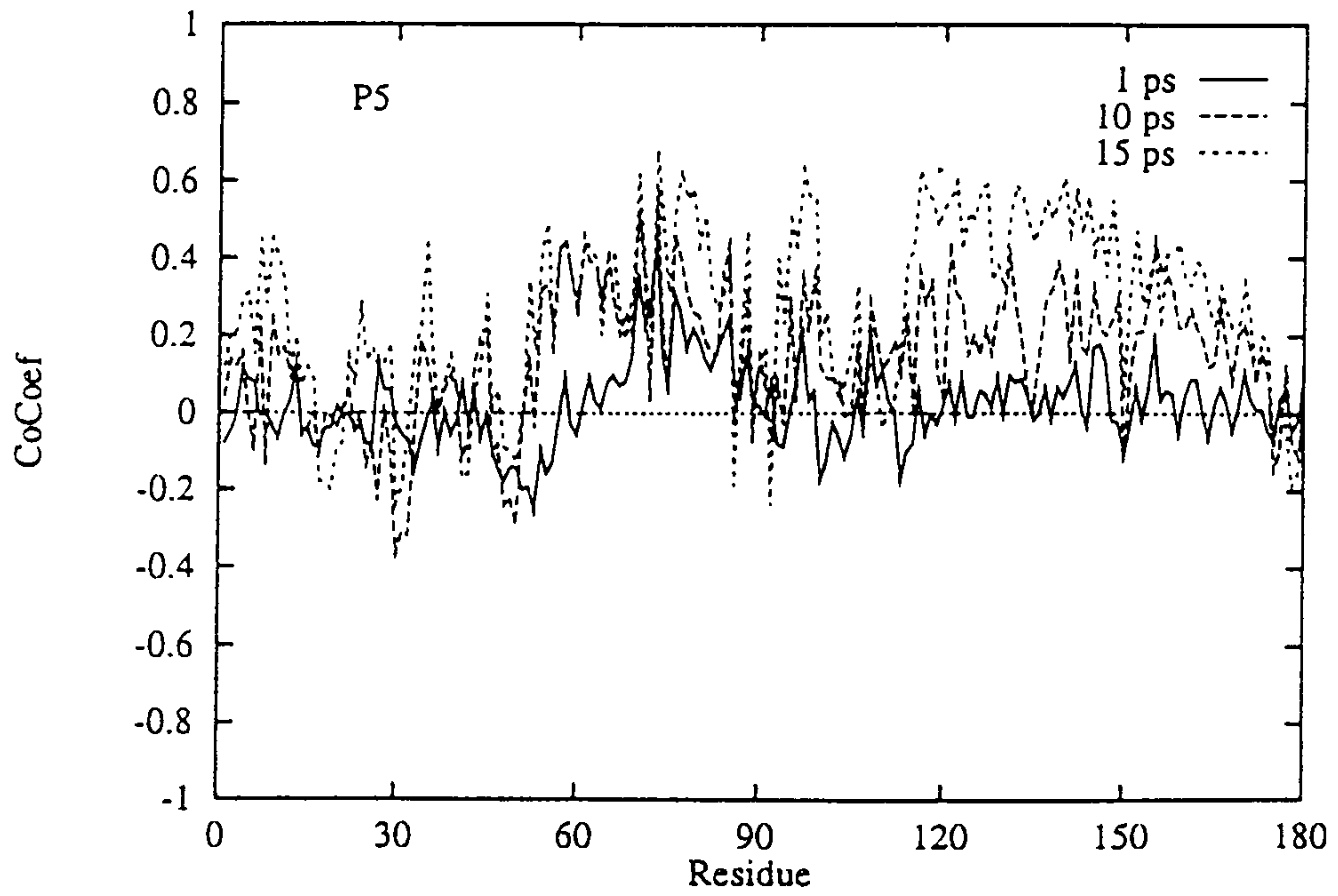


Figure 4-4.

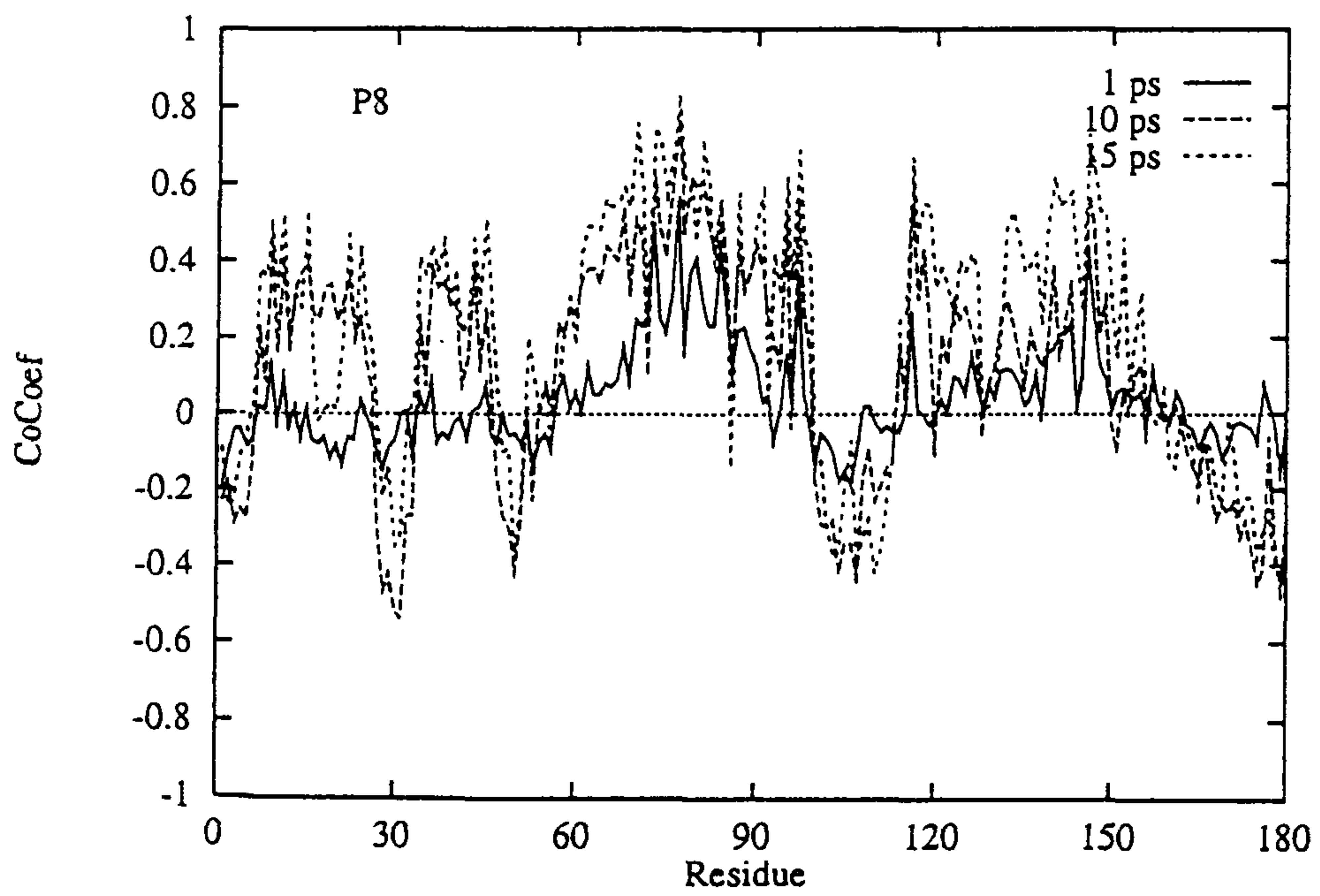
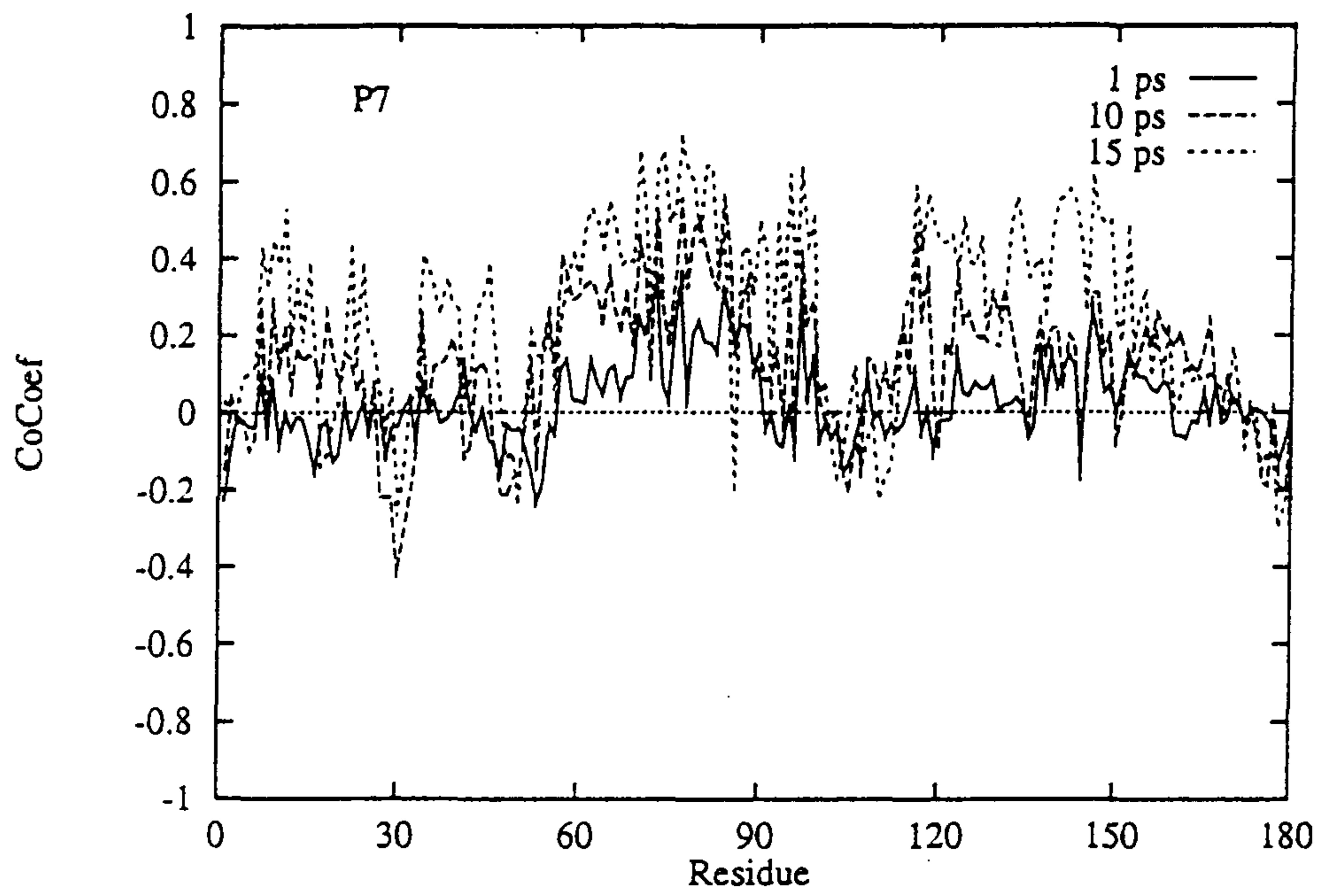


Figure 4-5.

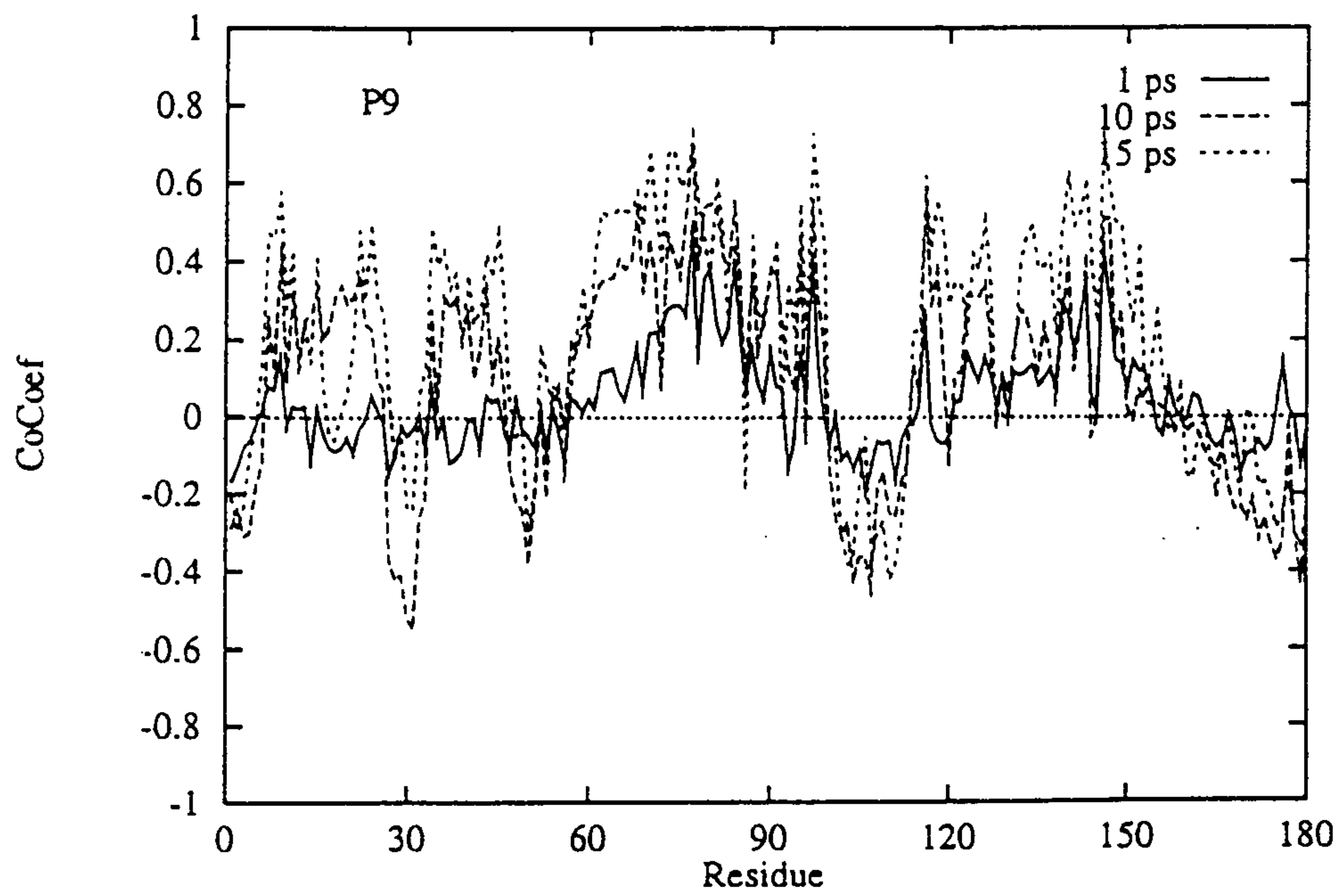


Figure 5.

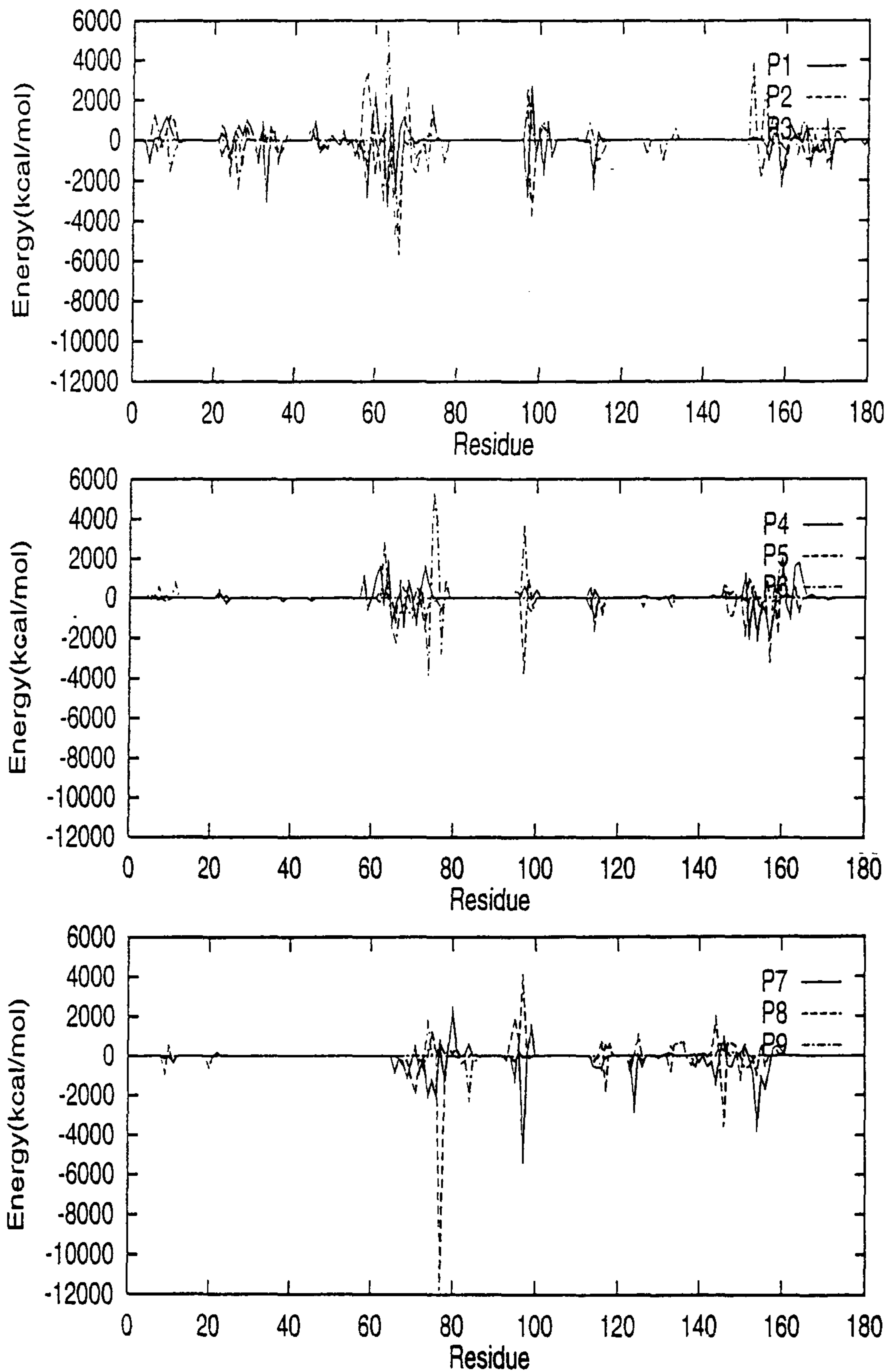


Figure 6.

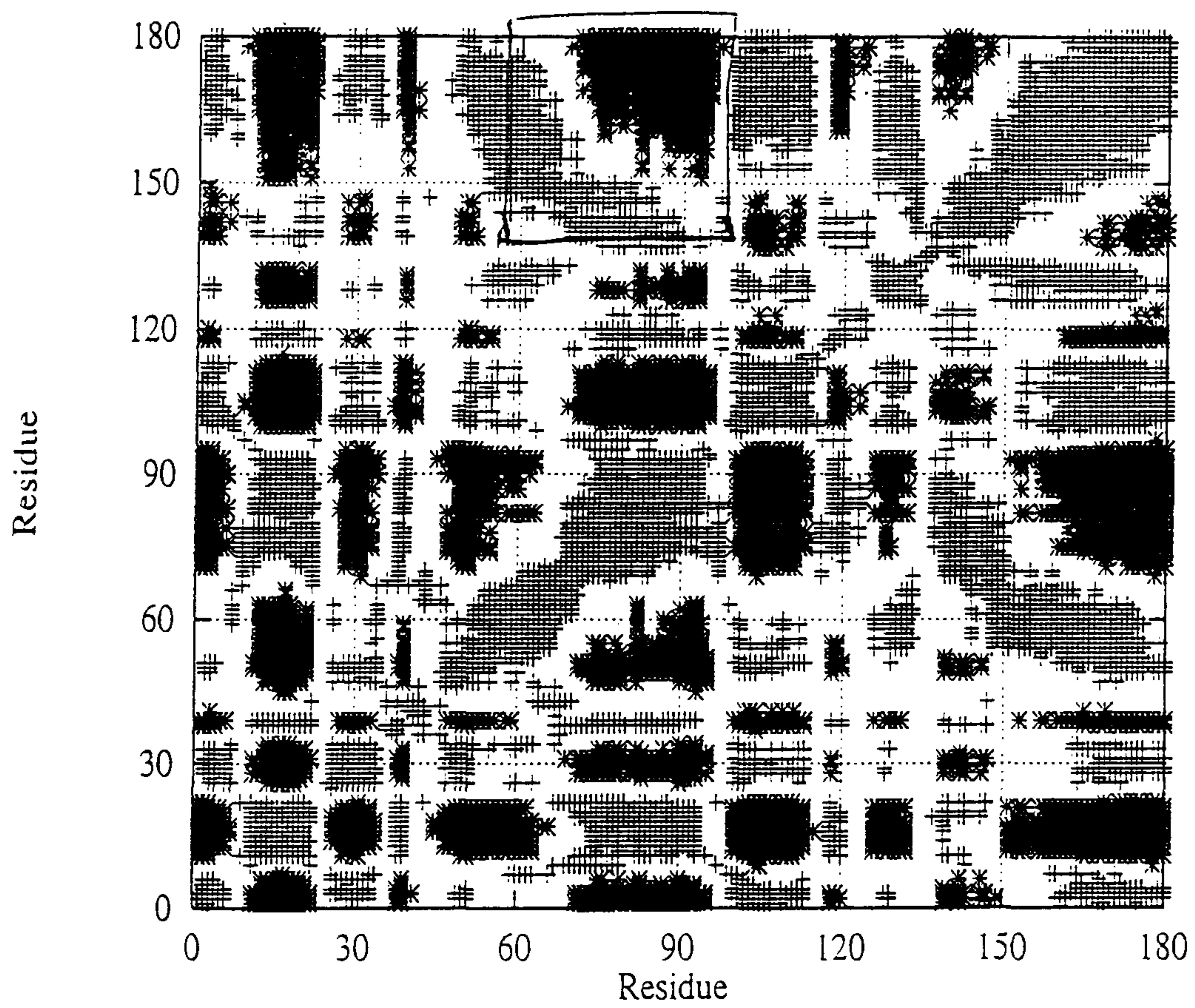


Figure 7.

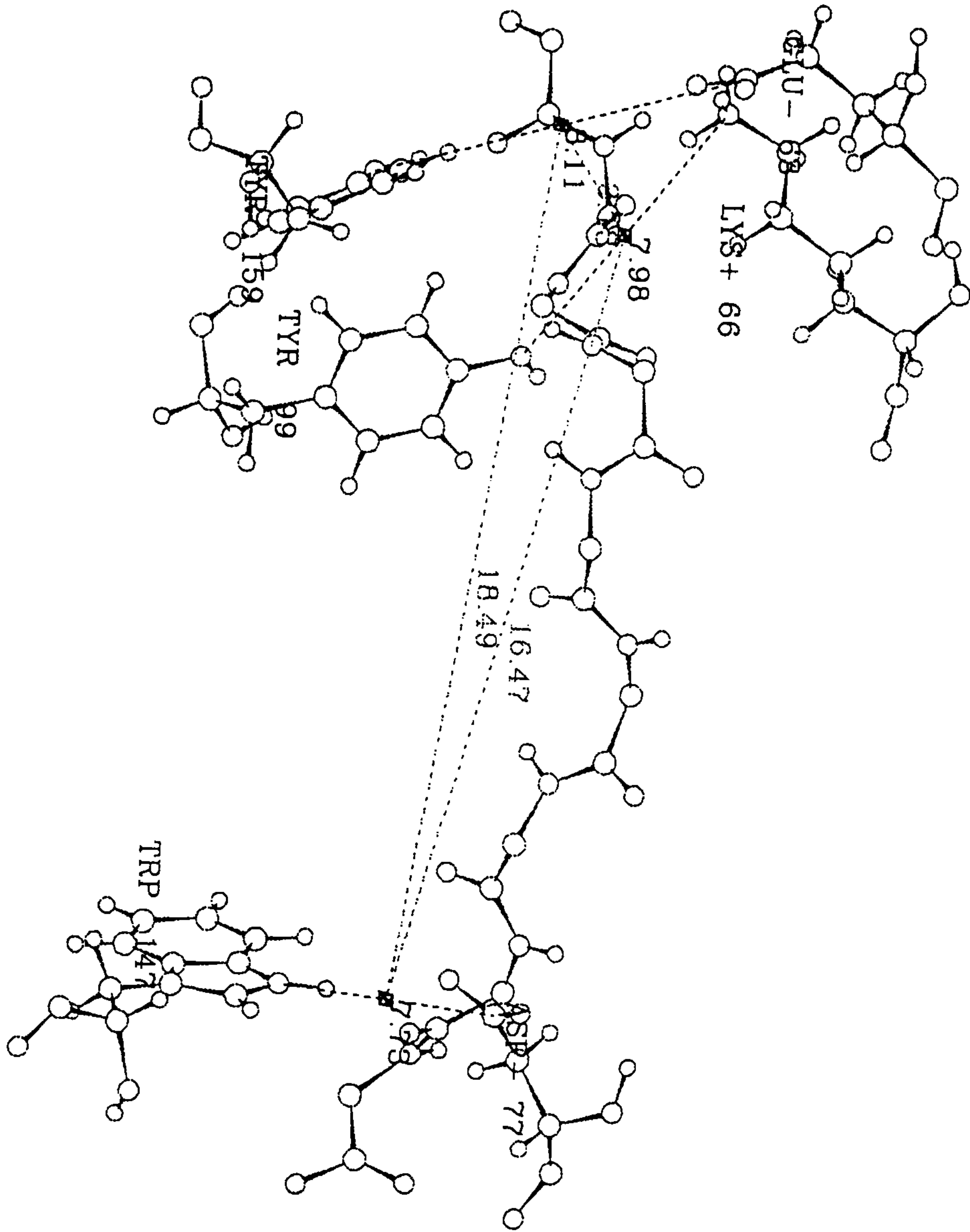


Figure 8.

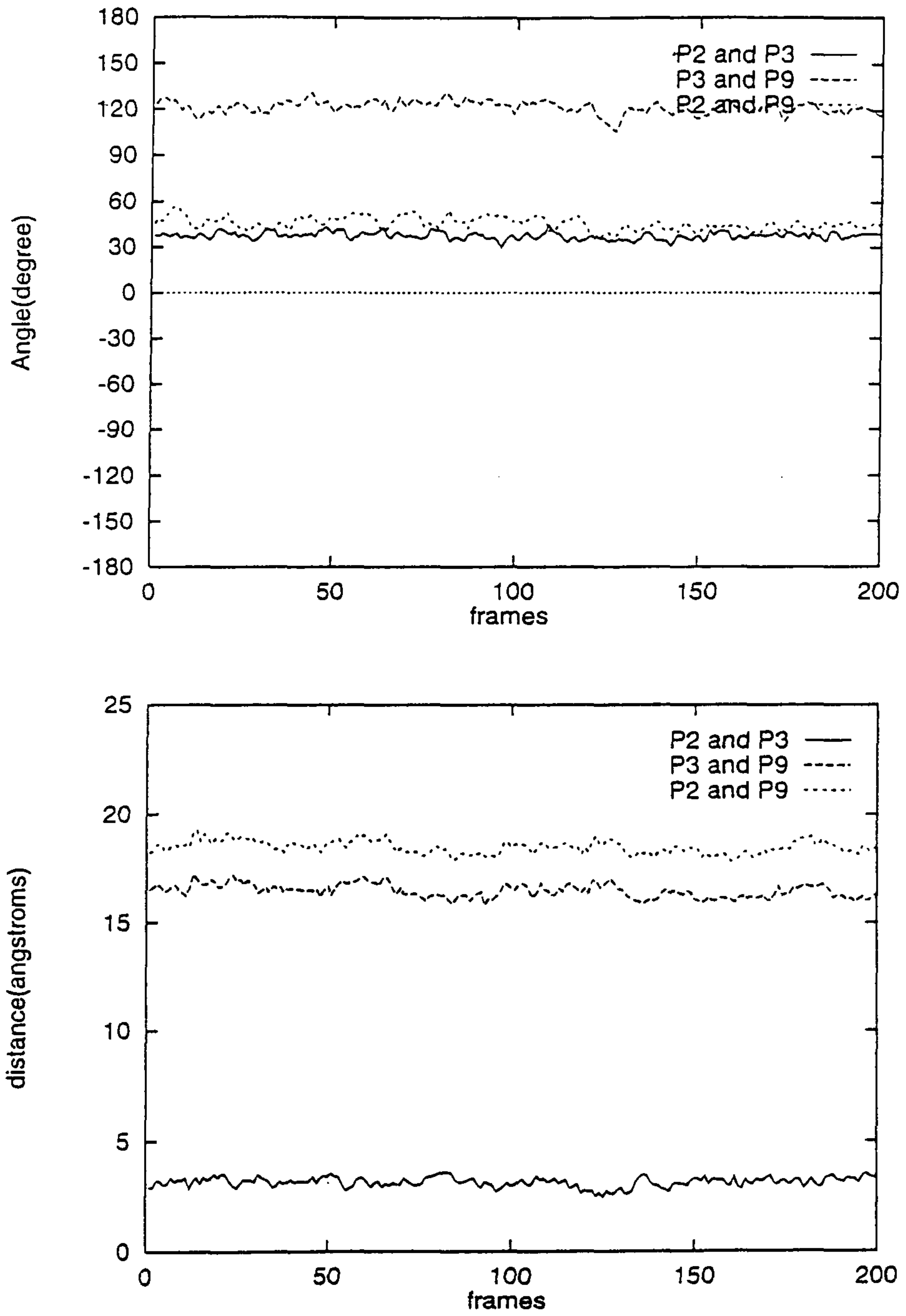


Figure 9.

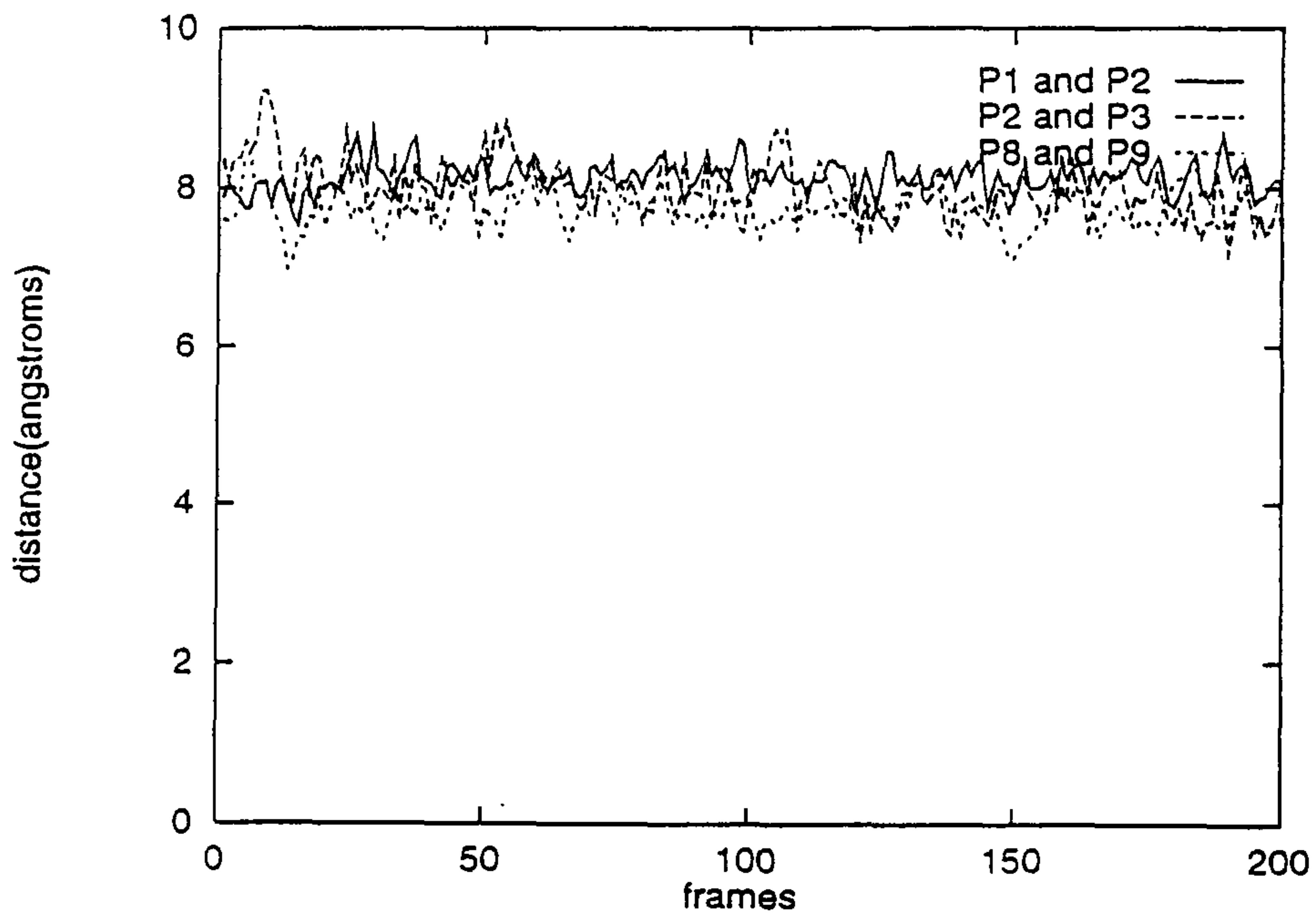
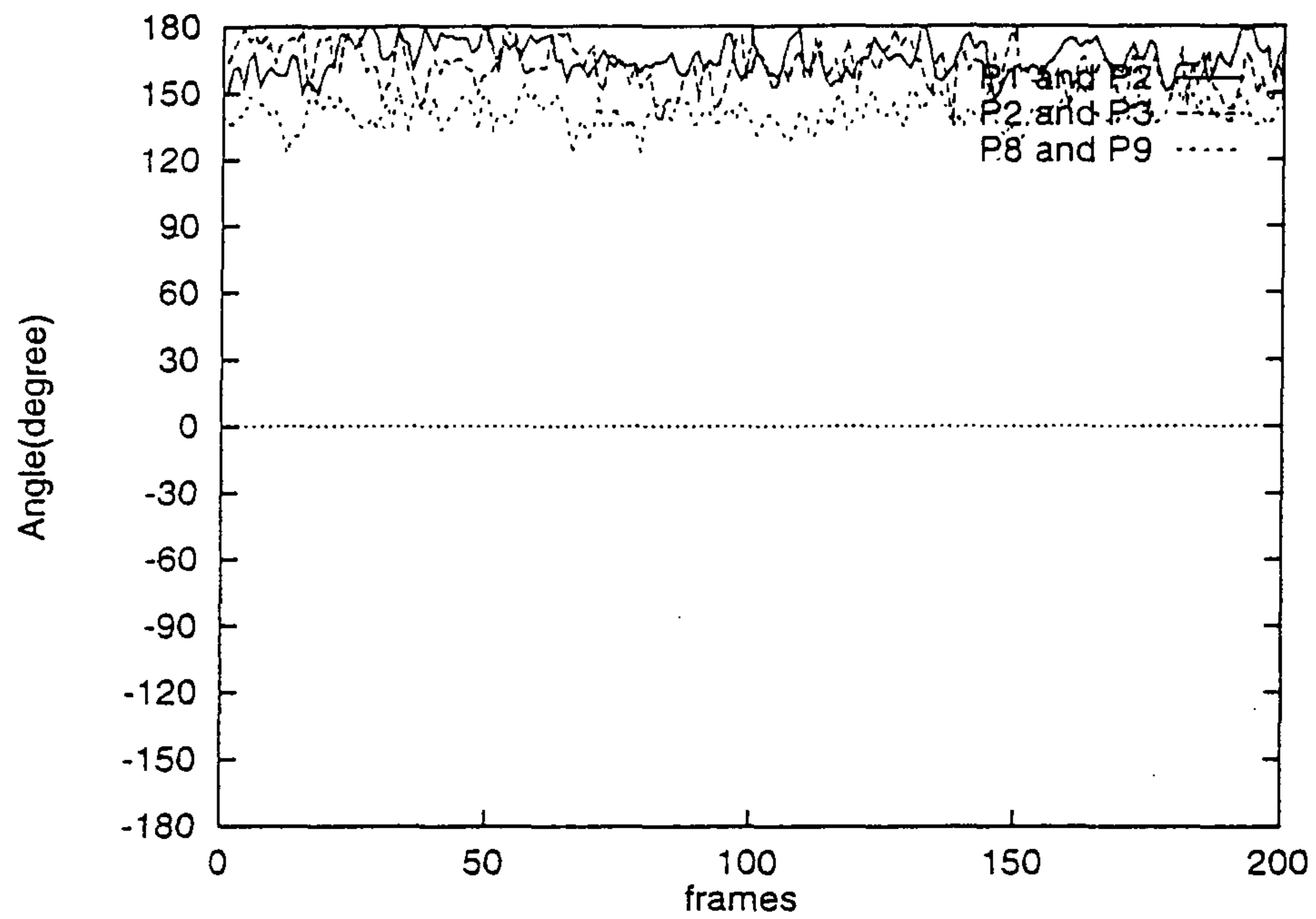


Figure 10.

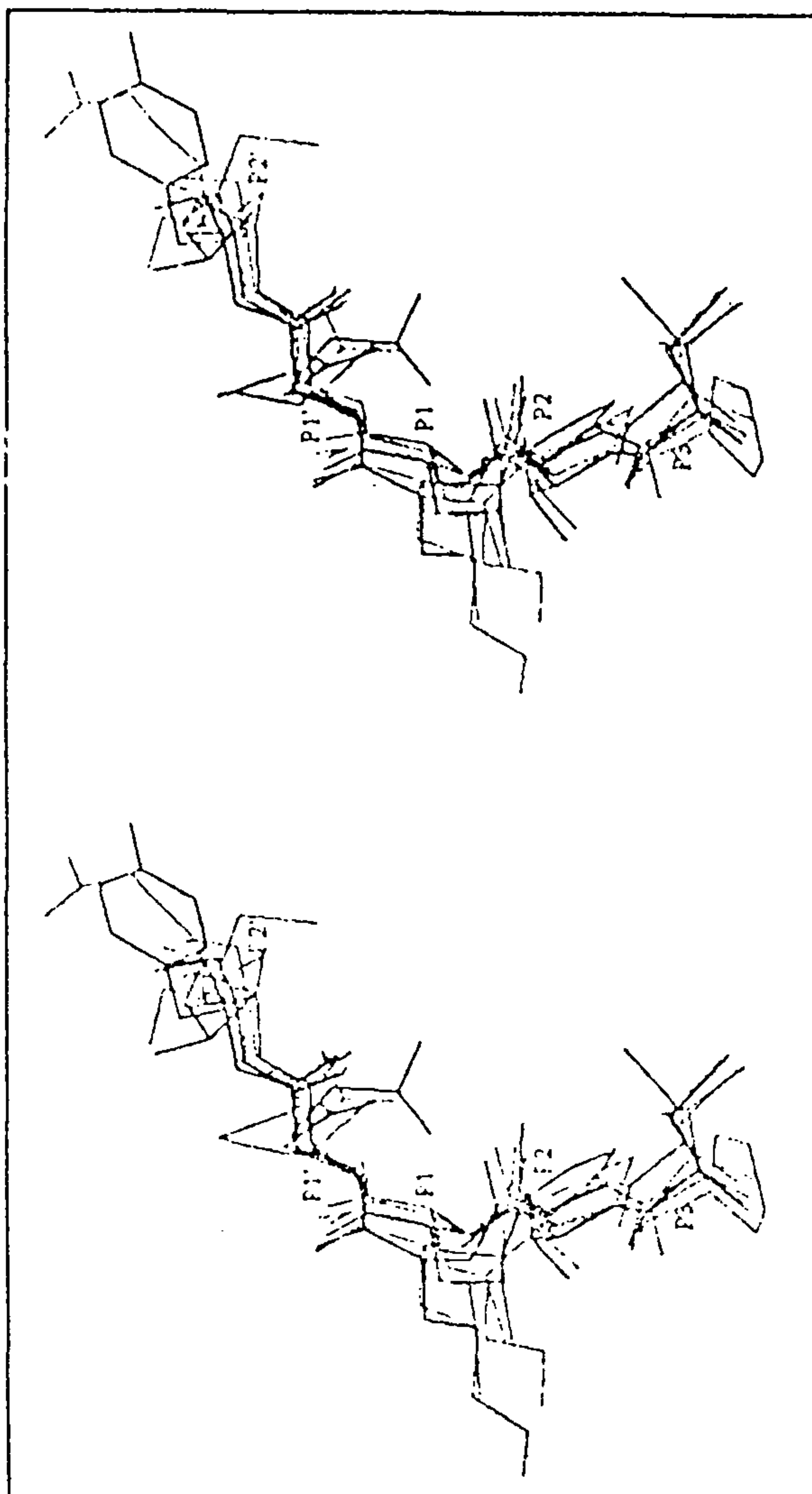


Figure 11.

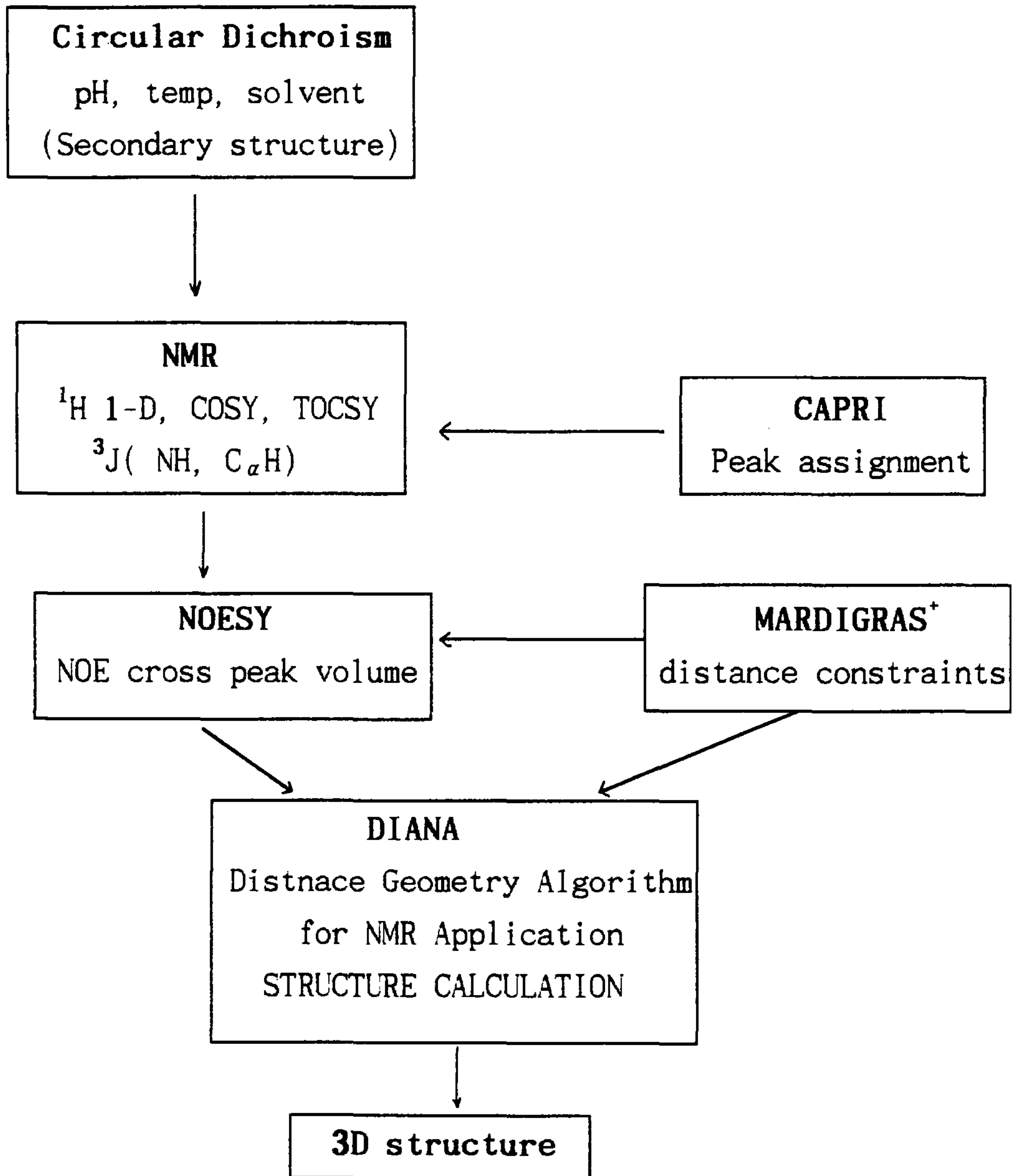


Figure 12.

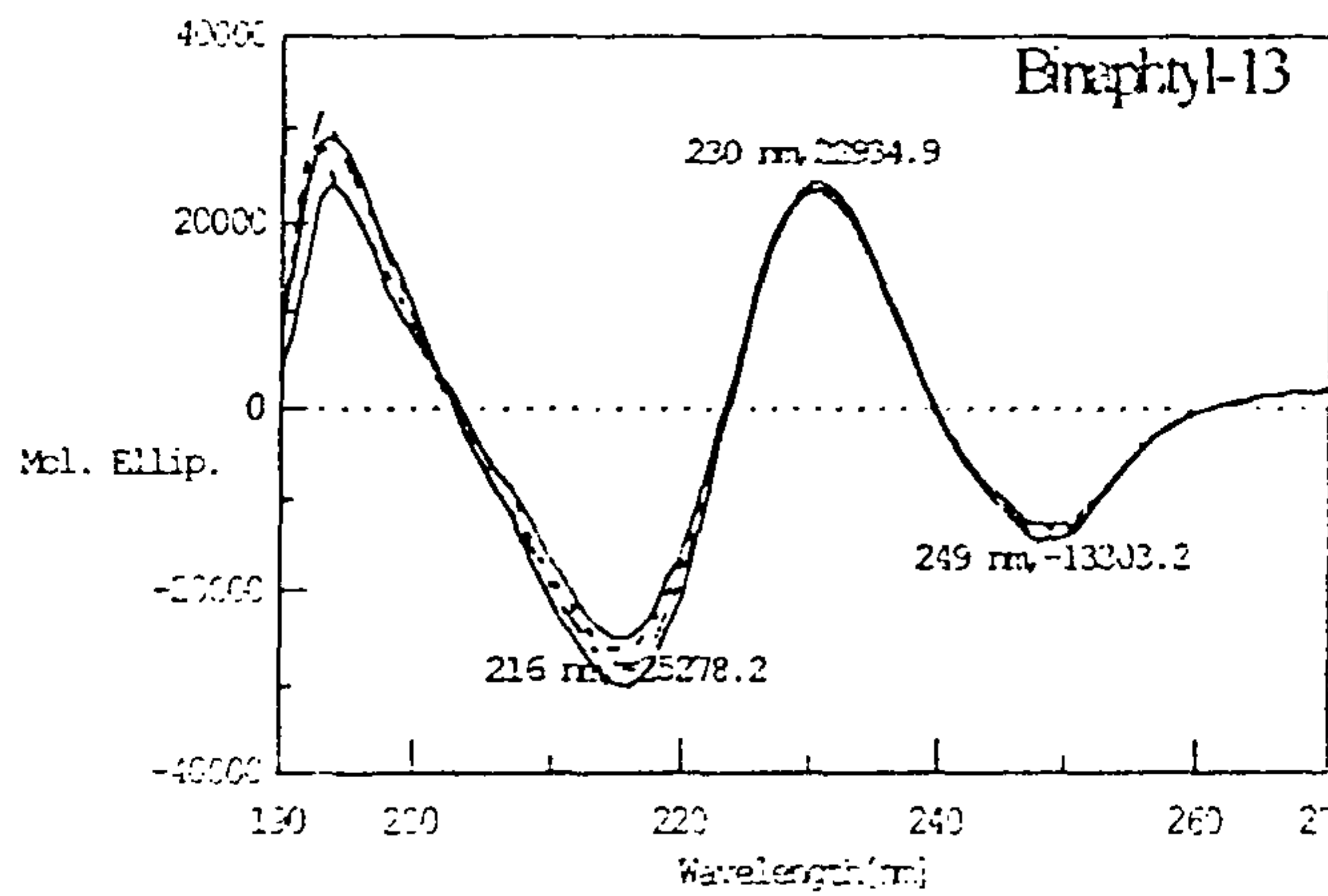
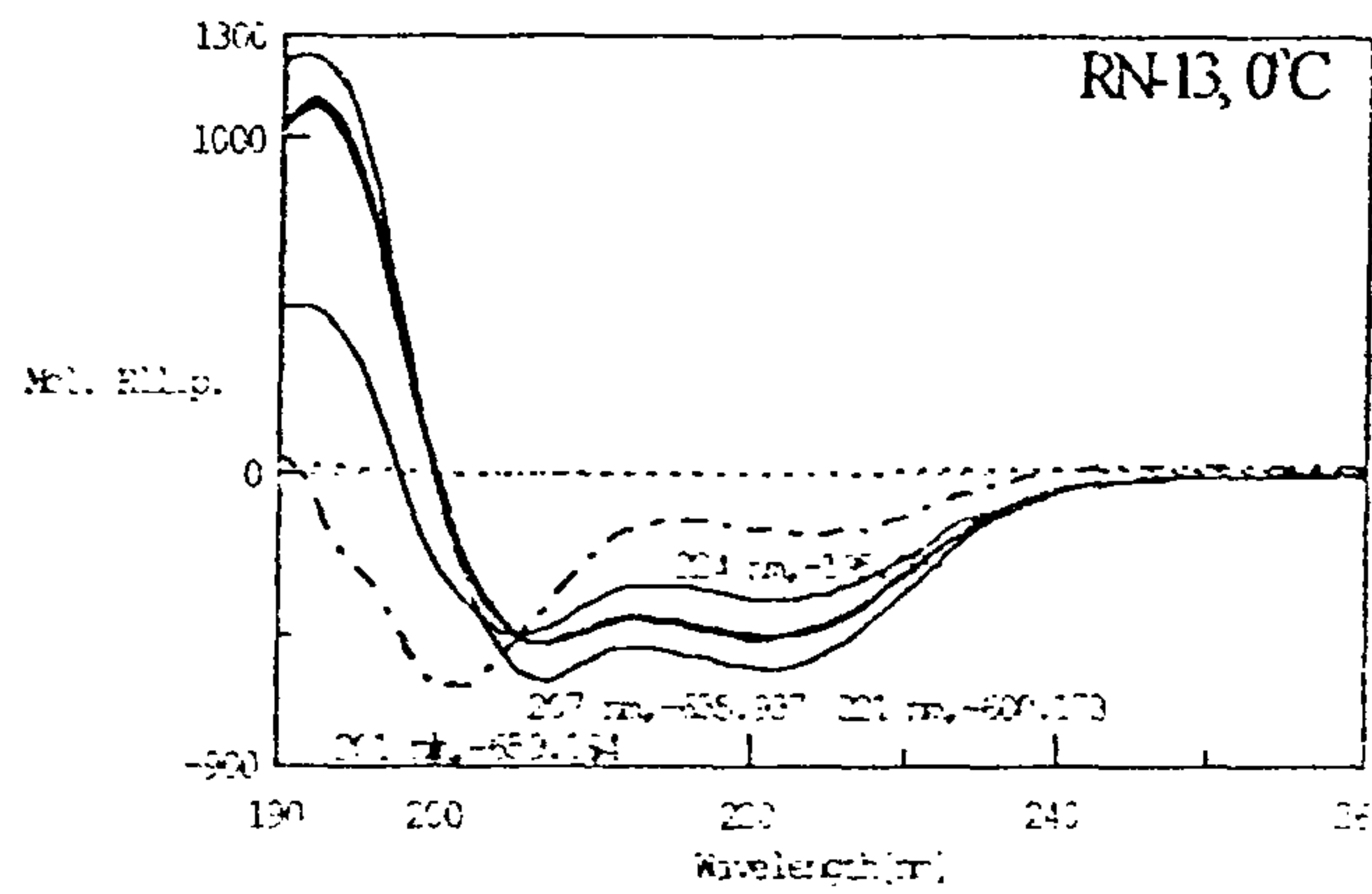
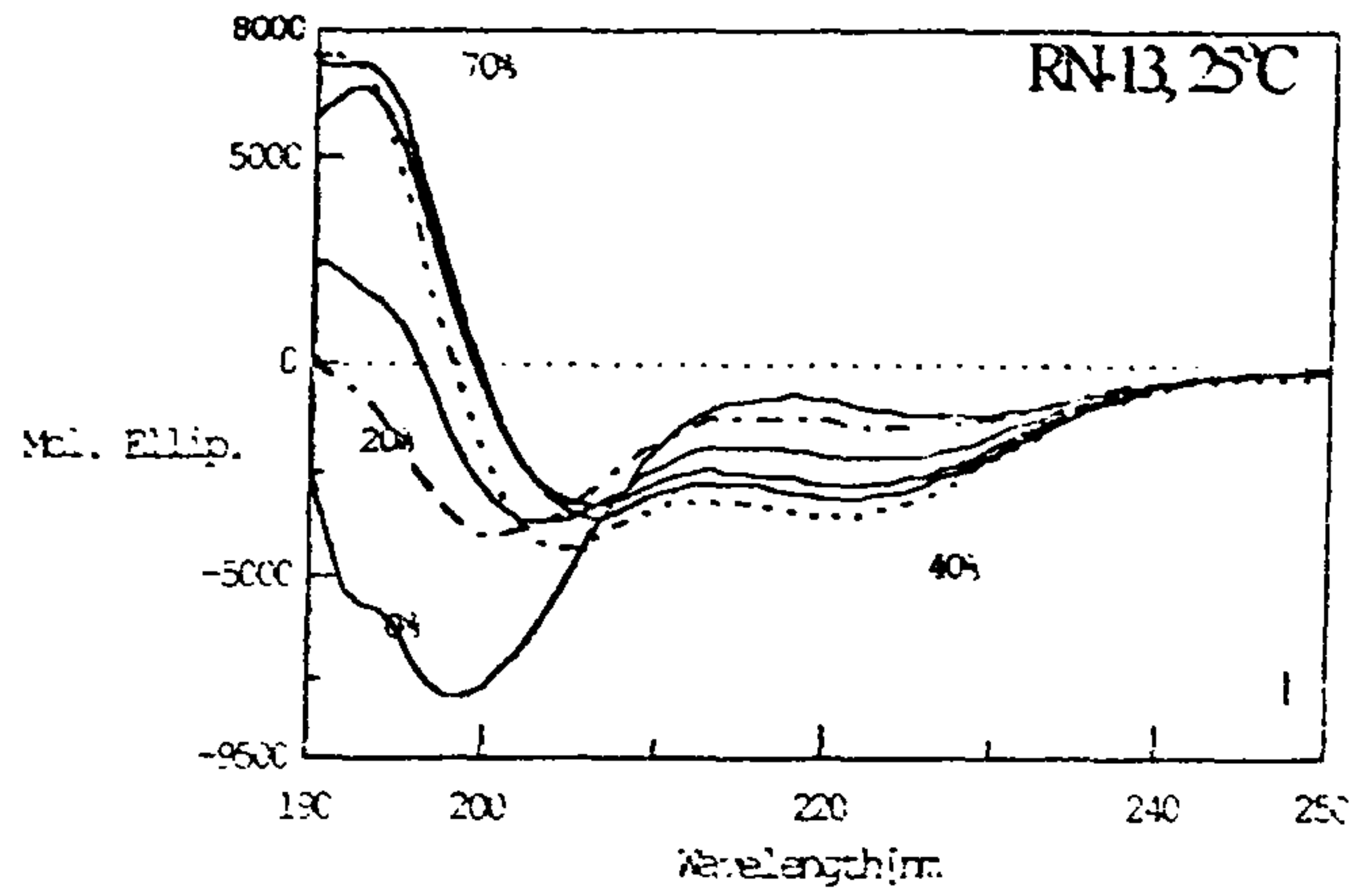


Figure 13.

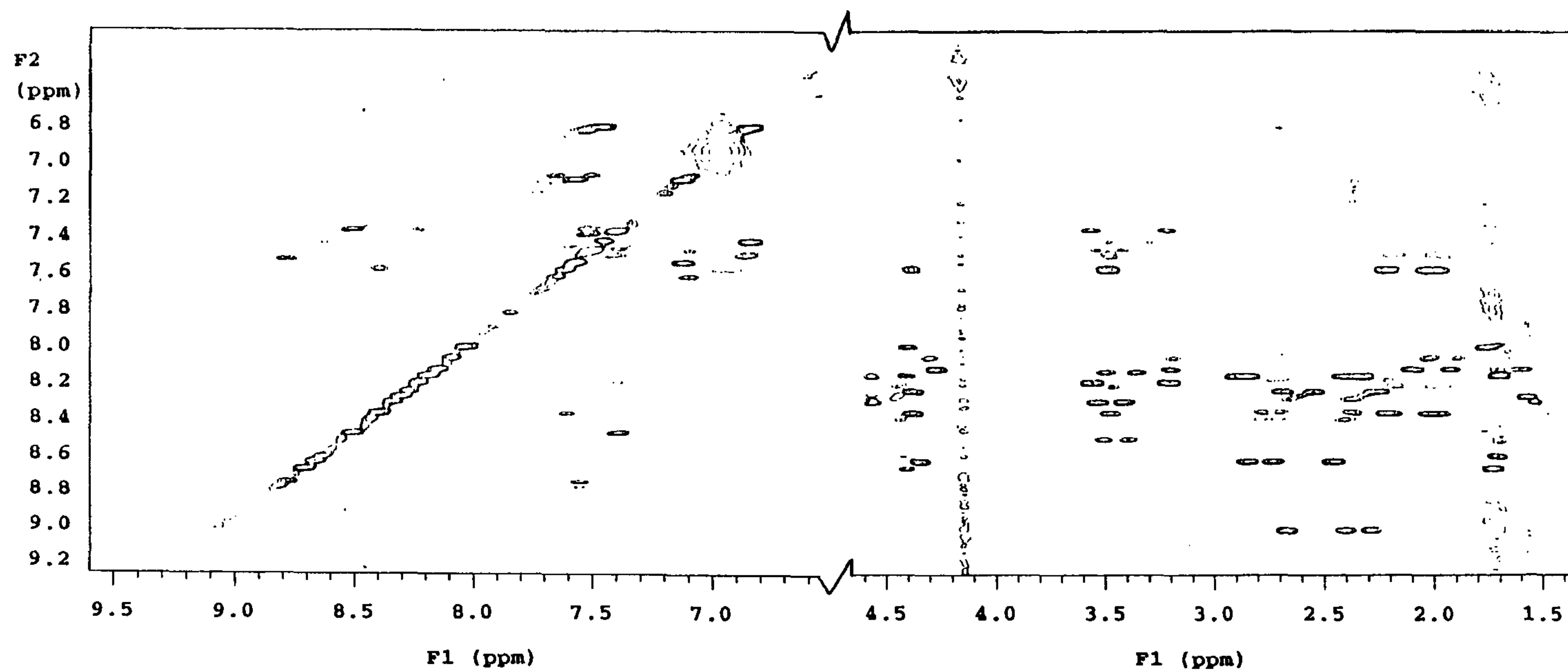


Figure 14.

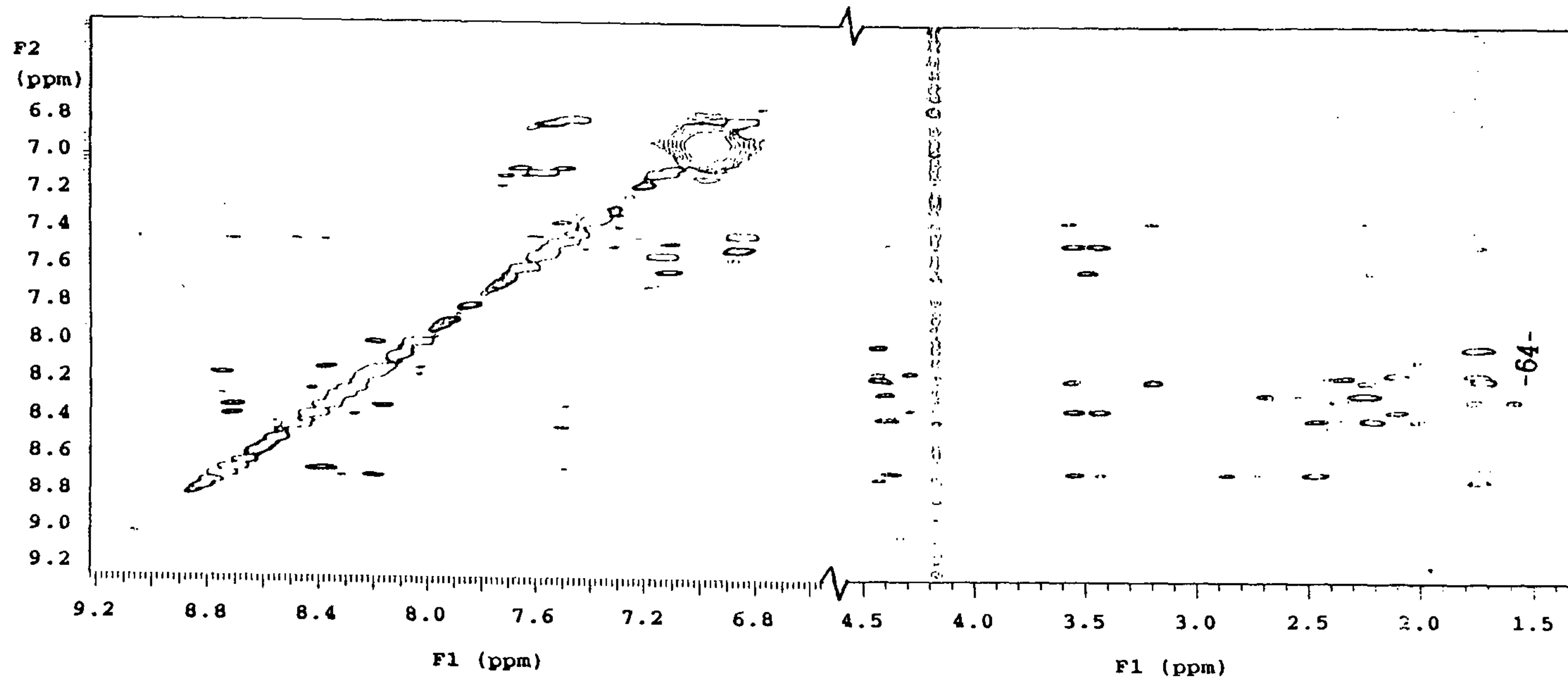


Figure 15.

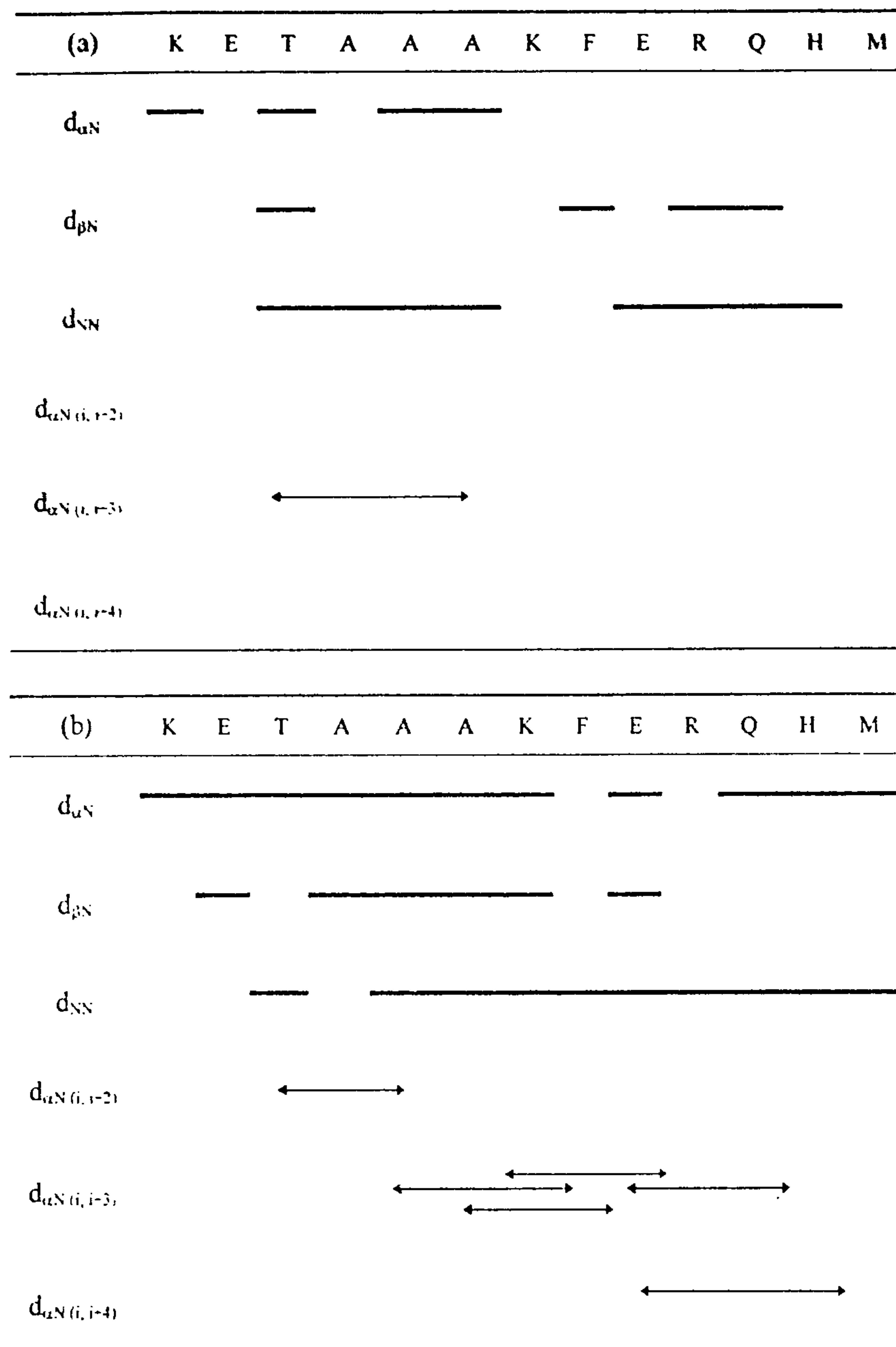


Figure 16.

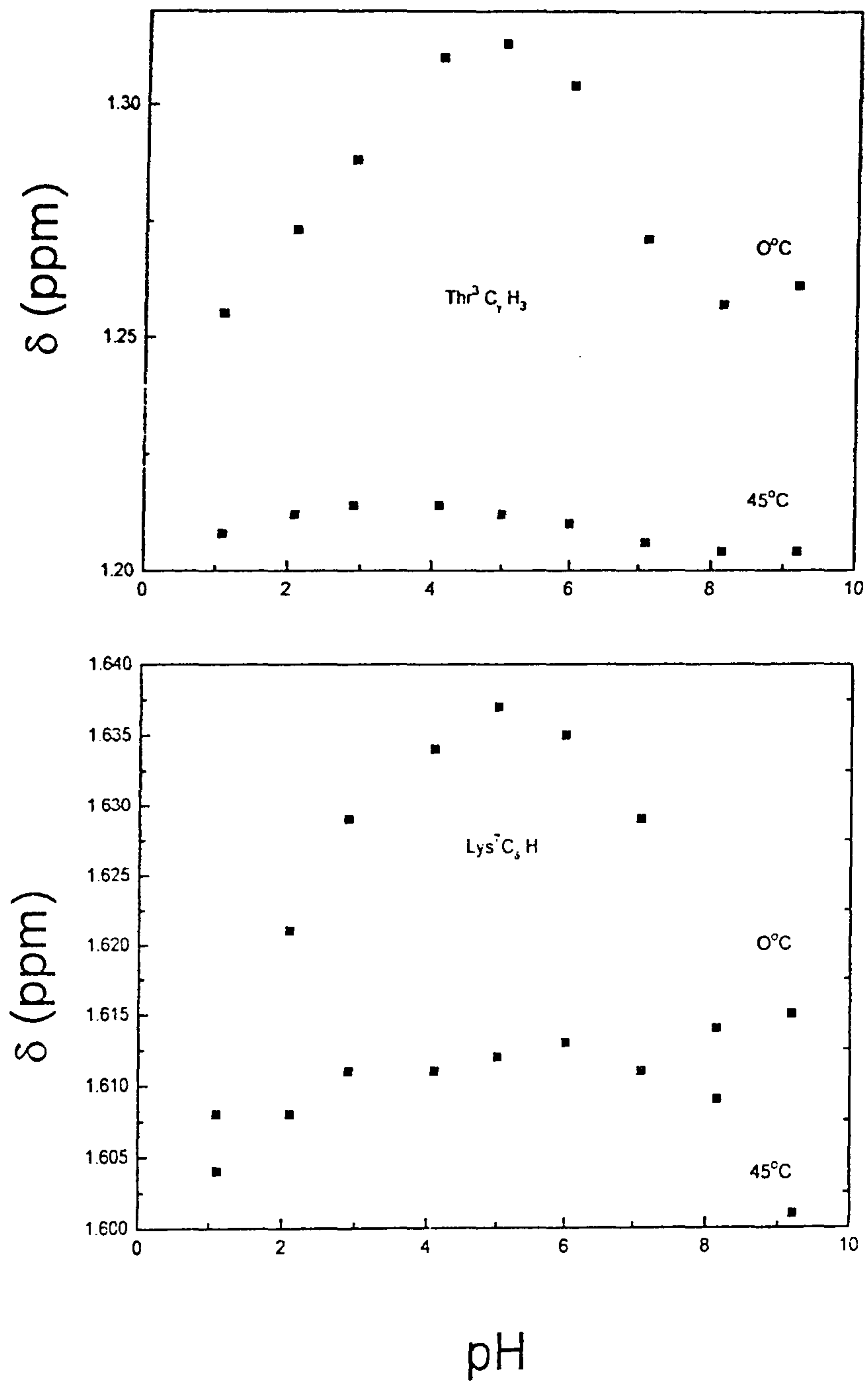


Figure 17.

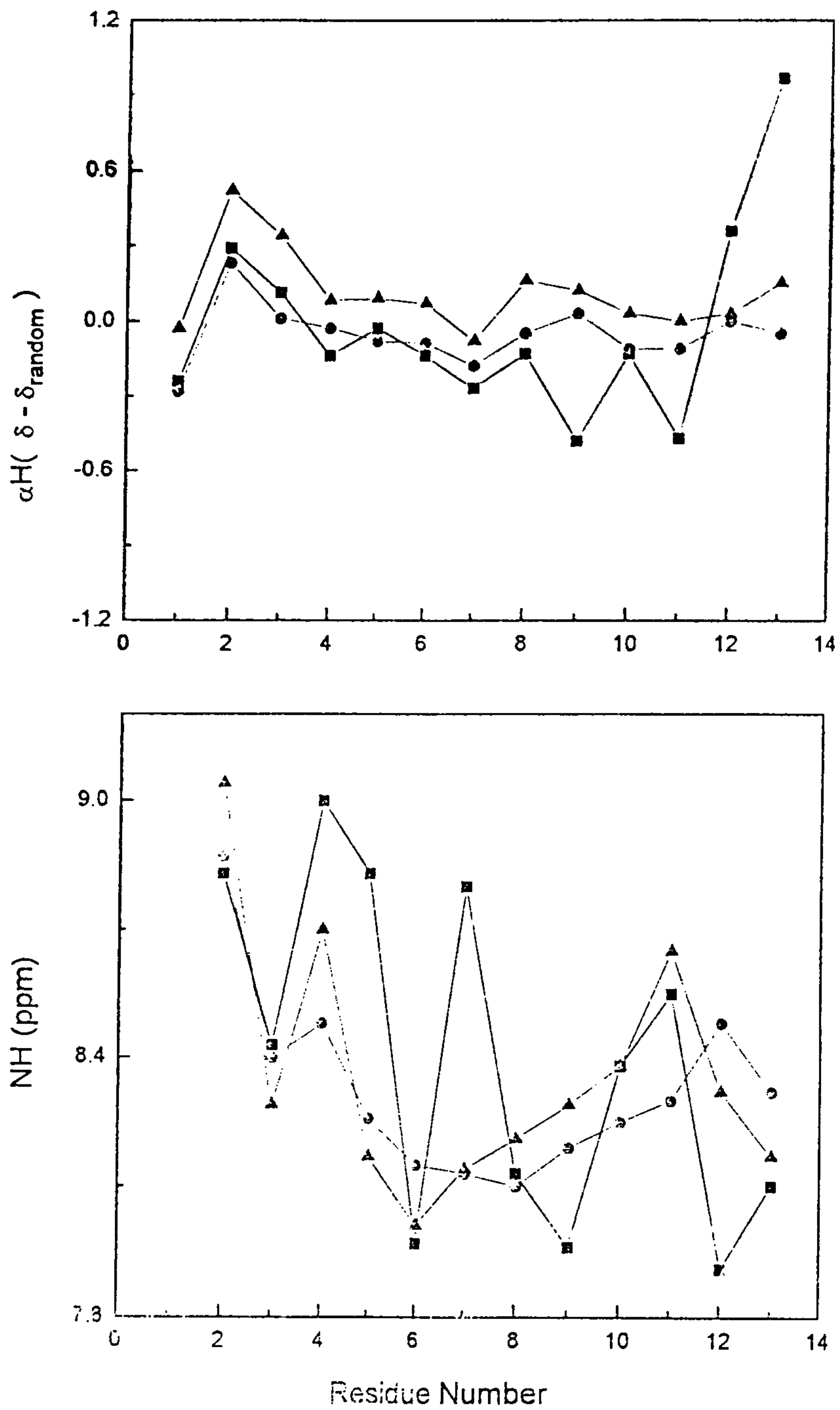


Figure 18.

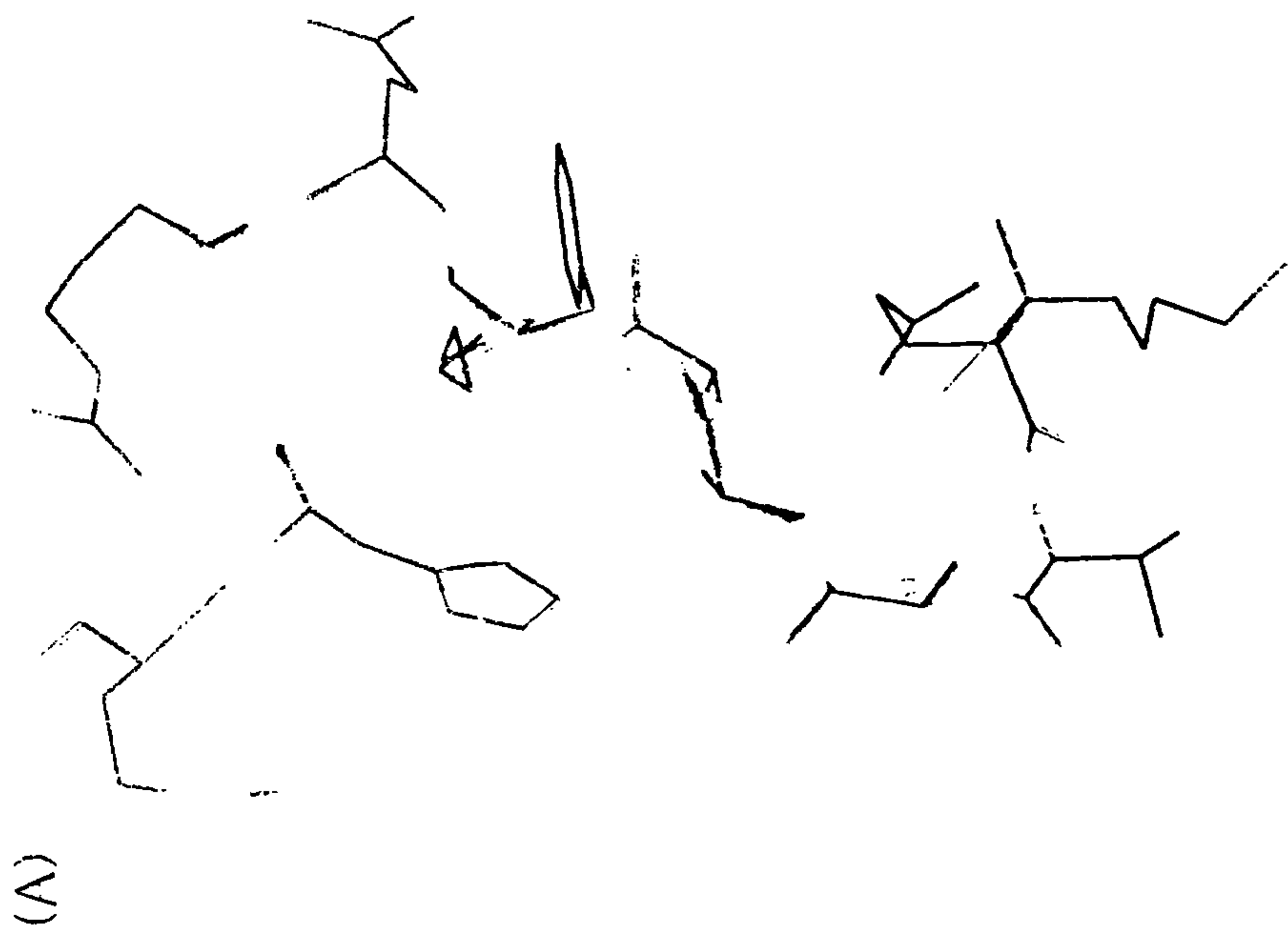
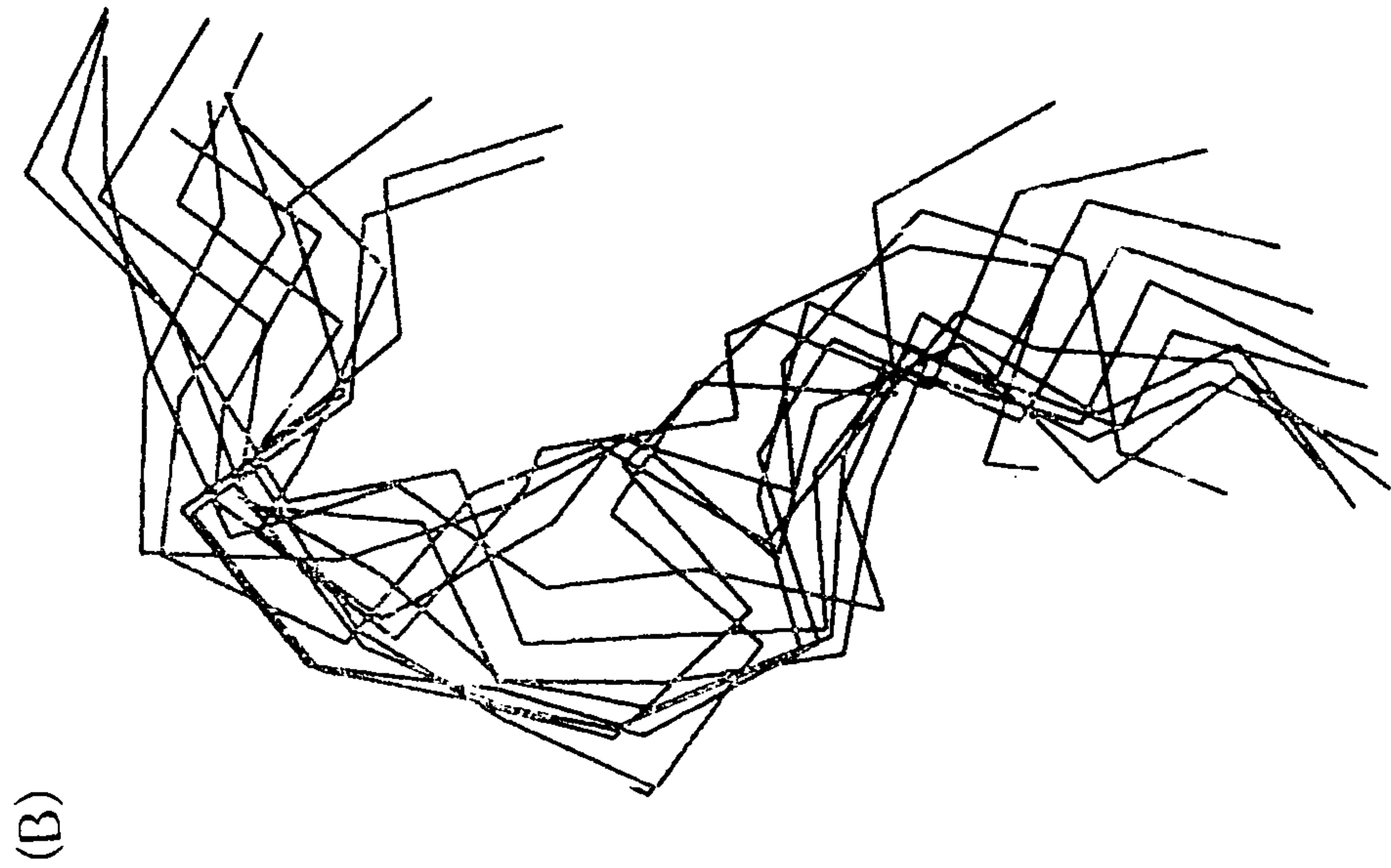


Table I.

Residue	MSD	Residue	MSD	Residue	MSD
GLYn-1	2.220354	ASP-61	1.949049	GLY-121	2.721613
SER-2	1.707931	GLY-62	1.404654	LYS-122	2.012151
HIS-3	3.483039	GLU-63	2.065601	ASP-123	2.911790
SER-4	1.317193	THR-64	2.190602	TYR-124	1.938269
MET-5	2.092099	ARG-65	1.777521	ILE-125	0.9024469
ARG-6	3.263488	LYS-66	1.976580	ALA-126	1.446023
TYR-7	2.996427	VAL-67	2.346754	LEU-127	2.272534
PHE-8	1.851075	LYS-68	3.619310	LYS-128	4.284694
PHE-9	2.923079	ALA-69	2.885932	GLU-129	2.411080
THR-10	1.334852	HIS-70	3.315078	ASP-130	2.564058
SER-11	1.858981	SER-71	2.163494	LEU-131	4.100939
VAL-12	2.131888	GLN-72	2.961194	ARG-132	2.366172
SER-13	2.681310	THR-73	3.028329	SER-133	2.040283
ARG-14	2.214572	HIS-74	2.734226	TRP-134	1.175998
PRO-15	3.414025	ARG-75	3.302910	THR-135	1.329630
GLY-16	4.167842	VAL-76	2.326133	ALA-136	1.485154
ARG-17	5.016471	ASP-77	2.045001	ALA-137	2.358674
GLY-18	3.954391	LEU-78	2.430578	ASP-138	2.738698
GLU-19	3.193508	GLY-79	2.364909	MET-139	2.015826
PRO-20	2.375443	THR-80	2.085000	MET-140	1.750430
ARG-21	2.495743	LEU-81	2.362372	ALA-141	2.582864
PHE-22	1.816054	ARG-82	3.799925	ALA-142	2.631183
ILE-23	1.793883	GLY-83	1.951878	GLN-143	1.876012
ALA-24	2.107814	TYR-84	1.828382	THR-144	1.868130
VAL-25	2.075042	TYR-85	2.514936	THR-145	3.353262
GLY-26	1.489328	ASN-86	3.269105	LYS-146	2.155667
TYR-27	1.906071	GLN-87	2.565025	HIS-147	2.121718
VAL-28	1.893644	SER-88	2.420315	LYS-148	2.454134
ASP-29	3.162542	SER-89	1.725464	TRP-149	2.443368
ASP-30	2.469510	GLU-90	1.809360	GLU-150	3.677772

THR-31	2.348141	ALA-91	1.687448	ALA-151	4.064148
GLN-32	2.608705	GLY-92	3.205628	ALA-152	2.614686
PHE-33	1.838058	SER-93	2.559277	HIS-153	2.512995
VAL-34	1.731580	HIS-94	1.432254	VAL-154	3.966718
ARG-35	2.438353	THR-95	2.219260	ALA-155	3.790596
PHE-36	1.700850	VAL-96	1.563804	GLU-156	4.278584
ASP-37	2.220211	GLN-97	2.244030	GLN-157	4.556818
SER-38	1.707263	ARG-98	1.777879	LEU-158	2.229196
ASP-39	3.512294	MET-99	1.987976	ARG-159	1.542380
ALA-40	3.195119	TYR-100	1.224135	ALA-160	1.387871
ALA-41	3.201798	GLY-101	1.141957	TYR-161	1.890299
SER-42	3.000260	CYS-102	1.299877	LEU-162	1.560178
GLN-43	2.181588	ASP-103	1.687799	GLU-163	1.840971
ARG-44	3.098373	VAL-104	1.503640	GLY-164	1.352102
MET-45	2.608573	GLY-105	1.839533	THR-165	1.529341
GLU-46	2.650274	SER-106	2.955948	CYS-166	2.789709
PRO-47	1.587790	ASP-107	2.025032	VAL-167	1.844293
ARG-48	3.554029	TRP-108	4.582081	GLU-168	1.416283
ALA-49	1.479713	ARG-109	1.513719	TRP-169	2.733412
PRO-50	1.720836	PHE-110	2.185498	LEU-170	2.081881
TRP-51	1.502915	LEU-111	4.601539	ARG-171	1.448414
ILE-52	1.720277	ARG-112	1.329832	ARG-172	1.643226
GLU-53	1.990236	GLY-113	1.139694	TYR-173	2.192842
GLN-54	5.251287	TYR-114	1.915552	LEU-174	2.732751
GLU-55	3.151606	HIS-115	1.121192	GLU-175	1.954173
GLY-56	1.770577	GLN-116	1.458465	ASN-176	3.765551
PRO-57	3.045340	TYR-117	1.331536	GLY-177	5.721435
GLU-58	3.201877	ALA-118	2.382988	LYS-178	2.326481
TYR-59	1.939696	TYR-119	2.518611	GLU-179	2.043425
TRP-60	1.523003	ASP-120	2.151010	THR-180	4.664959

Table II.

Peptide	HLA-A2				
THRn:1:CA	TYR:7(3.47)	TYR:59(3.00)	GLU:63(3.56)	TYR:159(3.75)	TYR:171(3.48)
THRn:1:CB	TYR:59(3.02)	TYR:171(3.67)			
THRn:1:OG1	TYR:59(3.22)	LYS:66(3.47)			
THRn:1:HG1	TYR:59(3.77)	LYS:66(3.68)	THR:163(3.52)	TRP:167(3.72)	
THRn:1:CG2	TYR:159(3.36)	THR:163(3.19)	TRP:167(3.30)		

LEU:2:CA	GLU:63(3.87)	TYR:99(3.63)			
LEU:2:CB	TYR:7(3.44)	GLU:63(3.38)	LYS:66(3.91)		
LEU:2:CG	TYR:7(3.78)	PHE:9(3.49)	TYR:99(3.47)		
LEU:2:CD1	TYR:7(3.65)	PHE:9(3.57)	LYS:66(3.91)	VAL:67(2.96)	
LEU:2:CD2	PHE:9(2.95)	LYS:66(3.21)	VAL:67(3.90)	HIS:70(3.68)	TYR:99(3.76)
VAL:9:CA	THR:143(3.18)	LYS:147(3.71)	TRP:147(3.77)		
VAL:9:CB	TYR:84(3.81)	THR:143(3.13)			
VAL:9:CG1	ASP:77(3.64)	ARG:97(3.78)	TYR:116(3.45)	THR:143(3.27)	TRP:147(3.72)
VAL:9:CG2	ASP:77(3.18)	THR:80(3.89)	LEU:81(3.26)	TYR:84(3.93)	TYR:116(3.91)

* paranthesis is the lowest distance between the assigned peptide and HLA-A2

Table III.

<i>Residue</i>	<i>NH</i>	<i>αH</i>	<i>βCH₂</i>	<i>others</i>	
Lys ¹		4.33	2.21	γ CH ₂	1.76
				δ CH ₂	2.00
				ε CH ₂	3.29
				ε NH ₃ ⁻	
Glu ²	9.04	4.81	2.40, 2.29	γ CH ₂	2.66
Thr ³	8.29	4.69	?	γ CH ₃	1.56
Ala ⁴	8.70	4.43	1.71		
Ala ⁵	8.17	4.44	1.68		
Ala ⁶	8.01	4.42	1.74		
Lys ⁷	8.14	4.28	2.08	γ CH ₂	1.69, 1.58
				δ CH ₂	1.91
				ε CH ₂	3.19
				ε NH ₃ ⁺	
Phe ⁸	8.21	4.82	3.55, 3.19	2,6 H	?
				3,5 H	?
				4H	?
Glu ⁹	8.29	4.41	2.24	γ CH ₂	2.67, 2.54
Arg ¹⁰	8.38	4.41	2.19	γ CH ₂	2.01, 1.96
				δ CH ₂	3.47
				ε NH	7.51
				NH ₂	7.43, 6.82
Gln ¹¹	8.65	4.37	2.44	γ CH ₂	2.84, 2.72
				δ NH ₂	7.54, 7.10
His ¹²	8.32	4.66	3.52, 3.42	2H	8.37
				4H	8.49
Met ¹³	8.17	4.67	2.39, 2.32	γ CH ₂	2.89, 2.82
				ε CH ₃	?

Table IV.

<i>Residues</i>	<i>Random</i> ^a	<i>RN-13</i> ^c	<i>RN-13 in 50% TFE/water</i> ^d	<i>X-ray crystallography</i> ^e
Glu ²	8.7 (-142) ^b	6.1		3.1 (-49)
Thr ³	8.1 (-148)	7.6	7.3 (-155, -85)	6.0 (-74)
Ala ⁴	6.4 (-163)	5.4	3.9 (107, 13, 177, -57)	3.7 (-56)
Ala ⁵	5.9 (-166)	5.8	5.9 (85, 34, -167, -73)	4.4 (-62)
Ala ⁶	6.4 (-164)	5.4	4.4 (102, 18, -178, -62)	3.8 (-56)
Lys ⁷	7.6 (-153)	6.1	4.9 (85, 35, -175, -65)	3.7 (-53)
Phe ⁸	7.9 (-150)	6.6	7.8 (-151, -89)	3.5 (-54)
Glu ⁹	8.6 (-143)	6.6	5.9 (85, 35, -167, -73)	3.6 (-55)
Arg ¹⁰	7.7 (-152)	5.8	4.8 (97, 23, -175, -65)	3.6 (-55)
Gln ¹¹	8.1 (-149)		4.2 (104, 16, 179.7, -60)	6.3 (-77)
His ¹²	8.0 (-149)	7.3	5.6 (89, 31, -169, -71)	9.7 (-120)
Met ¹³	8.4 (-145)	7.6	5.9 (85, 35, -167, -73)	9.7 (-116)

^a the structure was built by using functional groups available in the software. The geometry is minimized by Amber force field till the gradient is 0.05 kcal and ³J_{CHa} coupling constants were calculated Karplus relation $^3J = 6.4 \cos^2(\phi - 60^\circ) - 1.4 \cos(\phi - 60^\circ) + 1.9$ []^b calculated torsion angles, ϕ ^c Experimental values from ID spectrum (²H₂O, pH = 3.80, 303K) ^d from ID spectrum (50% TFE/water, pH = 3.98, 298K) ^e segment of Ribonuclease A is minimized by Amber force field and calculated the coupling constants.