

단백질의 구조연구 : ACE의 기질 HHL을 이용한 신규 살충제 표적 AnCE에 대한 약리단 연구

이정경 · 김경이*

한양대학교 화학과, *서일대학교 식품가공과

요약 : 신규 살충제 표적 단백질인 AnCE의 활성부위 잔기들과 상호작용 가능한 약리단 (pharmacophore)을 세 개의 펩타이드로 이루어진 ACE 기질 Hippuryl-L-histidyl-L-leucine (Hip-L-His-L-Leu, HHL) 분자의 구조를 모델로 하여 예측하였다. HHL의 분자구조, 용액상 내에서의 구조변화 그리고 약리단을 구성하는 원자들의 전하밀도 분석을 위해 순이론적인 양자화학 계산방법을 이용하여 구조 최적화, NMR 화학적 이동 및 NPA 계산을 수행하였다. 이론적인 NMR 화학적 이동 값들은 실험 결과와 잘 일치함을 보였고 전하밀도 계산 결과는 해당원자의 약리단을 분석하는데 사용되었다. 결과적으로 HHL 분자 구조를 통해 소수성(aromatic, aliphatic), 수소결합 주계, 수소결합 받계, 금속 아연 결합부위의 5개 약리단을 추출할 수 있었다.(2005년 7월 28일 접수, 2005년 9월 20일 수리)

색인어 : 순이론적 계산, 약리단, 전자밀도, AnCE, HHL.

서 론

일반적으로 Angiotensin converting enzyme(ACE, dipeptidyl dipeptidase A)은 renin-angiotensin system 내에 존재하여 포유동물에서 혈압을 조절하는 regulatory zinc protease로 알려져 있다. ACE는 C-terminal dipeptide를 절단하여 10개의 아미노산으로 구성된 Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu를 vasoconstrictive octapeptide angiotensin II로 전환하고 (Skeggs 등, 1954; Patchett 등, 1980) hypotensive activity를 나타내는 bradykinin(nonapeptide)을 가수분해하는 역할을 하여 결과적으로 혈압을 상승시키는 작용을 한다(Yang 등, 1970). 포유동물에 있어서 ACE는 두 가지 형태로 존재하는 데 분자량 140-180 kDa의 somatic ACE(sACE)와 한 개의 활성부위를 갖는 분자량 90-110 kDa (Corvol, 1995)의 testicular ACE(tACE)가 있다. sACE는 다른 많은 조직에서 발현이 되는 반면 tACE는 정소에서만 독특하게 존재한다. 보통 혈압과 관련하여 전해질 균형 등에 있어서 조절작용과 관련된 sACE의 기능은 잘 알려져 있으나 tACE의 정확한 기능에 대해서는 아직 많이 알려지지 않았다.(Turner 와 Hooper, 2002).

최근에 몇몇 곤충들에 있어서 포유동물의 ACE와

유사한 효소적 특성을 갖는 peptidyl dipeptidase가 발견되었고(Cornell 등, 1995; Wijffels 등, 1996; Schoofs 등, 1998; Isaac 등, 1999) ACE와 동종성 효소(homologous enzyme)인 AnCE와 Acer를 코딩하는 두 가지 유전자가 *Drosophila melanogaster*에서 발견되었다. 일반적으로 곤충들은 포유동물과는 다른 열린 순환체계를 갖고 있기 때문에 그 안에 존재하는 동종성 ACE의 발견은 이미 알려진 ACE의 기능뿐만 아니라 아직 알려지지 않은 새로운 생리화학적 기능에 대한 연구로 연구범위를 확장하는 계기가 되었다. 집파리인 *Musca domestica*에서 분리된 ACE의 경우 수용성이며 67 kDa의 분자량을 갖고 있는데 이 효소에는 하나의 구역(single domain) 안에 단지 하나의 활성부위가 존재한다. 아직까지 이 효소에 대한 자세한 생리학적 기능은 밝혀지지 않았지만 선행 연구에서 기존 고혈압 치료제로서 ACE에 강력한 저해활성을 보이는 captopril(D-3-mercapto-2-methyl-propionyl-L-proline, Fig 1)이 ACE와 동종성 효소인 AnCE에도 같은 저해활성을 보인 결과가 보고되었다(Williams 등, 1996).

또 다른 연구에서는 쌍시류 곤충(dipteran insect)에 있어서 생식에 관여하는 ACE의 기능에 대한 연구가 진행되었는데 수컷 모기(*Anopheles stephensi*) 성충에 ACE 저해제를 먹이고 조사한 결과 AnCE는 수컷의 생식에 중요한 영향을 미치고 ACE 저해제를 먹은 수컷 모기와 교미한 암컷 모기의 경우 생식력이 매우

*연락처

크게 급감한다는 것이 밝혀졌다(Ekbote 등, 2003a). 이 밖에도 회색 쉬파리(*Neobellieria bullata*)에 존재하는 Neb-ACE에 대해 captopril이 저해작용을 하여 트립신의 활성에 미치는 영향(Vandingenen 등, 2001)과 누에 나방(*Bombyx mori*)에서 ACE가 날개를 형성하는 변태 과정에서 나타나는 것이 발견되었다(Quan 등, 2001).

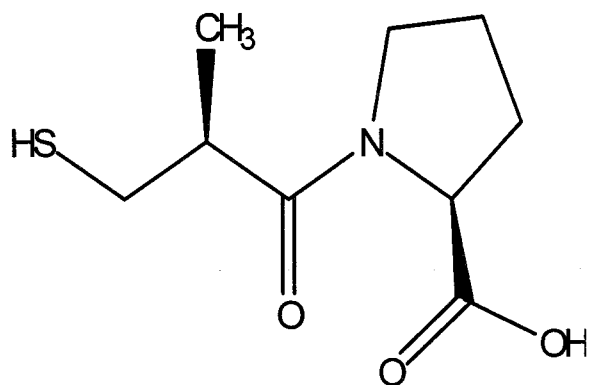


Fig. 1. 2-D Molecular structure of captopril, a strong and specific inhibitor of ACE

Captopril은 최초로 개발된 경구용 ACE 저해제로서 임상학적인 유용성을 지니고 있는 화합물인 반면 Hippuryl-L-histidyl-L-leucine(Hip-L-His-L-Leu, HHL, Fig 2)은 ACE의 저해 동역학 연구에 자주 사용되는 기질(Cushman 등, 1977; Galardy 등, 1983; McEvoy 등, 1983; Vrielink 등, 1996)로서 captopril 보다 활성부위에 대한 정보를 얻어내기에 적합하다. HHL의 결정구조 데이터(Vrielink 등, 1996)가 존재하지만 단백질 활성부위와의 정확한 작용기작 또는 어떠한 구조적인

응용연구도 이루어져 있지 않다.

인간의 ACE와 살충제 표적 단백질인 AnCE는 서열상의 유사성이 36% 정도(Taylor 등, 1996)로 비교적 높다는 점과 기질은 활성부위의 잔기와 상보적인 관계를 갖고 있으므로 기질로부터 얻은 약리단 정보는 활성 부위의 정보를 반영하는 점을 이용하여 본 연구에서는 살충제 표적 단백질 AnCE의 활성 부위와 상호작용 할 수 있는 약리단(pharmacophore)을 ACE 기질인 HHL 분자구조를 바탕으로 예측하였다. 이를 위해 최초로 HHL 분자적 특성에 대해 순이론적 계산 방법을 사용하였고, 예측된 약리단의 특성과 비교하여 분자적인 관점에서 해석하였다.

계산방법

본 연구의 모든 계산은 Gaussian사의 Gaussian03 program package(Frisch 등, 2004)를 이용하였다. 특히 구조 최적화와 NMR 화학적 이동 그리고 분자 내 수소결합 에너지 등 순이론적인 계산은 모두 밀도 범함수 이론(DFT) 방법(Kohn 과 Sham, 1965) 중에서 Lee-Yang-Parr의 non-local correlational functional과 Becke의 3-parameter functional을 결합한 B3LYP 레벨(Becke, 1993)을 사용하였다.

경제성과 정확성을 고려하여 B3LYP/6-31G(d) 레벨에서 구조 최적화를 수행하였고 frequency 계산을 통하여 최적화된 구조를 검증하였다. 계산에 사용된 시스템은 PC cluster(12-node, Intel™)이고 사용된 OS는 레드햇 리눅스 9.0이다.

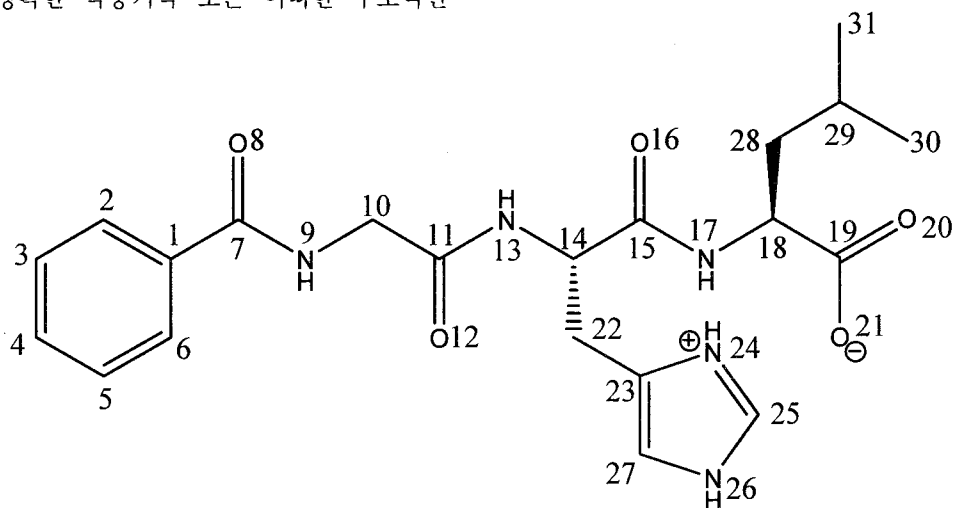


Fig. 2. Schematic representation of Hip-L-His-L-Leu (HHL) molecule with its numbering scheme. Numbering scheme of H atoms corresponds to carbon and nitrogen atoms where it is attached.

구조 최적화

선행연구에서 HHL의 결정 구조에 관해 엑스선 회절 실험을 수행(Vrieling 등, 1996)하였고 이를 통해 얻은 (x,y,z) 좌표들을 Gaussview 프로그램(Frisch 등, 2004)을 이용하여 3차원적으로 재구성하였다.

이렇게 얻은 구조를 초기 구조로 하여 B3LYP/6-31G(d) 레벨에서 구조 최적화 및 frequency 계산을 수행하였다. Frequency 계산 결과 imaginary frequency 는 존재하지 않았으며 이를 통해 최적화된 구조는 최소한 local minimum point에 있음을 확인하였다.

NMR 화학적 이동 값 계산

B3LYP/6-31G(d) 레벨에서 구조 최적화를 수행하여 얻은 구조를 토대로 NMR 화학적 이동 값들을 계산하였다. 기준 분자로서 TMS를 선택하였고 같은 레벨에서 계산하여 얻은 ¹H(32.35 ppm)와 ¹³C(196.06 ppm)의 화학적 이동 값을 각각 원자들에 대한 기준점으로 선택하였다.

계산방법은 GIAO(Gauge-Independent Atomic Orbital) 방법(Ditchfield, 1974; Wolinski 등, 1990)을 사용하였고 RHF/ 6-31G(d)레벨에서 계산을 수행하였다.

원자의 natural charge 계산

활성부위의 특정 잔기들과 상호작용을 할 수 있는 HHL 분자 내 기능기들에 대한 전하밀도는 최적화된 구조에 대해 B3LYP/6-31G(d) 레벨에서 natural population analysis(NPA) 방법을 이용하여 계산하였다.

실험방법

시약

ACE(Angiotensin Converting Enzyme)의 기질로서 사용되는 tripeptide 리간드 HHL (Hippuryl-L-histidyl-L-leucine, MW=429.48)은 Aldrich 사로부터 구입하여 정제하지 않고 직접 사용하였다.

시료 준비 및 기기 측정

NMR 실험을 위하여 HHL을 4 mM 농도로 DMSO-d₆에 녹여서 Varian 300 MHz NMR을 이용하여 ¹H, ¹³C, COSY, TOCSY, NOESY, HETCOR 스펙트럼을 얻었다.

이중에서 ¹H 및 ¹³C 화학적 이동 데이터는 분석하여 아래 “Table 1”에 정리하였다.

결과 및 고찰

HHL의 구조

연구에서 요구되는 구조는 용액상태의 안정한 구조인데 반해 본 연구에서 사용된 구조는 결정 상태에서 얻어진 구조이므로 구조적인 차이를 보완하기 위해 양자화학 모듈을 이용하여 기체 상태에서 구조 최적화를 수행하였다. 이를 위해 결정상태의 실험구조를 초기 구조로 하여 최적화를 수행하였고 얻어진 결과는 “Fig 3”에 나타났다. 구조 최적화 수행 후 가장 두드러진 차이는 그림에서 imidazole 고리의 수소원자와

Table 1. Calculated ¹H and ¹³C NMR chemical shift values for optimized geometry of HHL molecule.

| Assignment | HHL | Exp. | Assignment | HHL | Exp. |
|---------------------------|--------------------------------|-----------------|----------------------|--------------------|--------|
| Hip Phenyl ring | C ₂ | 130.20 | His α-Carbon | C ₁₄ | 49.36 |
| | C ₆ | 123.99 | | H ₁₄ | 3.67 |
| | C ₃ | 123.16 | His CH ₂ | C ₂₂ | 26.39 |
| | C ₅ | 121.59 | | H ₂₂₍₁₎ | 3.06 |
| | C ₄ | 129.36 | H ₂₂₍₂₎ | 2.66 | |
| | H _{2(o)^{a)}} | 8.76 | Leu CH | C ₁₈ | 19.34 |
| | H _{6(o)} | 7.90 | | H ₁₈ | 1.21 |
| | H _{3(m)} | 7.62 | Carbonyl Carbon | C ₁₂ | 166.82 |
| | H _{5(m)} | 7.53 | | C ₁₆ | 172.55 |
| H _{4(p)} | 7.76 | C ₂₀ | | 172.60 | |
| Imidazole (2H) (4H) | C ₂₅ | 112.55 | Quaternary Carbon | C ₂₁ | 171.32 |
| | C ₂₇ | 137.83 | | C ₁ | 129.32 |
| | H ₂₅ | 8.03 | | C ₂₃ | 136.10 |
| | H ₂₅ | 7.31 | | | |

^{a)}Numbering scheme of H atoms corresponds to the heavy atom where it is attached.

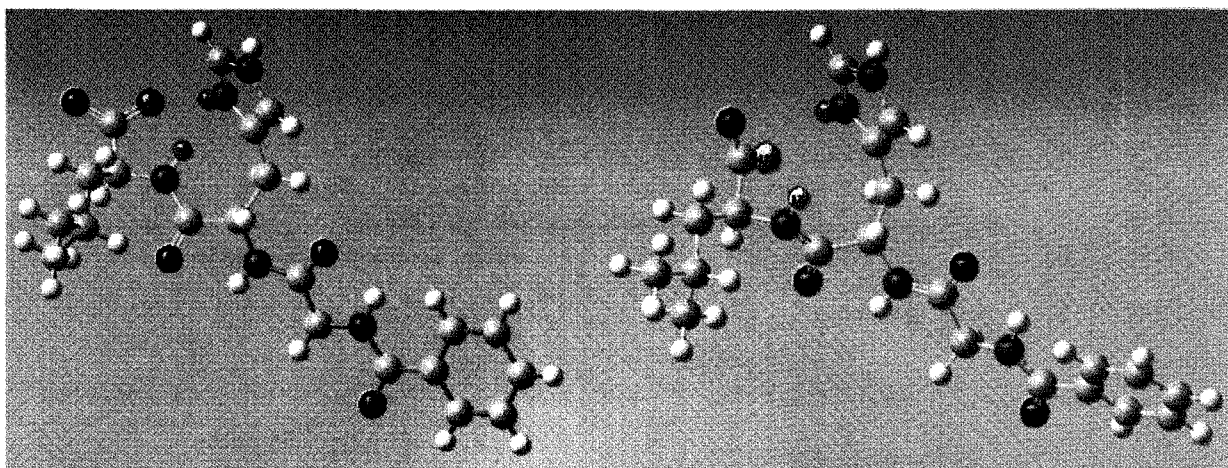


Fig 3. The 3D-structures of HHL molecules taken from crystallographic coordinate(left side) and geometry optimization(right side). The oxygen and hydrogen atoms related to possible hydrogen bonding network are represented by cyan colors.

상호작용(하늘색)하는 카르보닐 그룹의 공간적인 배치에서 나타났다. 결정구조에서는 카르보닐 그룹이 인접한 펩타이드 결합평면과 거의 같은 평면에 존재하였으나 최적화 후에는 그림에서 보는바와 같이 거의 수직의 공간적 배치를 하고 있다. 이는 격자장의 영향이 제거됨으로서 생기는 현상으로 그 결과 산소원자와 imidazole 수소 사이의 상호작용 거리가 1.688 Å에서 2.076 Å으로 0.38 Å 이상 증가하였고 인접한 펩타이드 결합의 수소원자와는 1.756 Å에서 3.158 Å으로 1.40 Å 이상 증가하는 결과를 나타냈다. 이러한 경향성은 뒤에서 언급할 NMR 화학적 이동 계산에서 실험값과 차이를 보이는 요인이 되었다. 대체로 펩타이드 결합들은 안정한 트랜스 구조를 형성하고 있으며 이는 전체 분자의 크기를 결정하는 중요한 인자가 된다. 뒤에서 논의할 단백질 분자와의 상호작용기작에 있어서 저해제 분자의 길이는 “Fig 4”에서 보는 바와 같이 기능기의 위치만큼이나 중요한 요소가 된다. 최근에 보고된 ACE의 활성부위(Natesh 등, 2003)에 lisinopril 분자가 결합한 유형뿐만 아니라 기존에 알려진 저해제 분자들의 구조를 살펴보면 결합에 필요한 기능기들이 펩타이드 결합과 같은 적절한 spacer로 연결되어 분자 전체에 분포되어 있는 것을 볼 수 있다. 이러한 이유로 저해제 분자의 길이도 분자의 활성을 예측하는 데 있어서 하나의 요인으로 작용할 수 있다.

NMR 화학적 이동

최적화된 HHL의 분자구조와 용액상태의 구조사이 차이점을 알아보기 위해 이론적인 NMR 화학적 이동

을 계산하여 실험값과 함께 “Table 1”에 나타냈다. 아직까지 이론적인 NMR 화학적 이동 계산은 알고리즘 자체가 기체 상태에 대해서만 가능하도록 되어 있는 것을 고려하면, 계산 값들은 오차 범위 내에서 실험값과 비교적 잘 일치하고 있음을 알 수 있다. “Table 1”에 나타난 HHL 구조도 역시 용매분자를 고려하지 않고 계산한 값들로서 기체 상태에 해당한다. 실험값과 벗어나는 계산 값들은 첫째, 제시된 구조가 용액상태의 구조와 차이가 있기 때문이고 둘째는 용매효과가 고려되지 않았기 때문이다. 첫 번째 문제는 NMR을 이용한 구조 분석을 통해서 해결해야 할 문제로서 정확한 3차원 구조를 결정하면 오차는 매우 근소한 범위로 좁혀질 수 있다*. 마찬가지로, Hip 페닐 고리의 화학적 이동 값들은 정확한 구조와 다소 차이가 있기 때문에 생기는 오차로 보이며 imidazole 고리의 C₂₅과 H₂₅는 인접한 카르보닐 그룹과 NH 사이의 분자 내 수소결합으로 인한 전자밀도의 변화에 의해 실험값과 차이를 보였다. 또한 카르보닐 탄소 C₂₁을 보면 같은 효과로 인해 실험값에서 조금 벗어난 결과를 나타냈다. 지금까지 논의한 바를 토대로 용액상태의 구조는 이론적으로 최적화된 구조와 크게 다르지 않음을 알 수 있다.

HHL 분자의 결합부위

“Fig 4”는 ACE 활성부위에 존재하는 결합부위들을 간략하게 묘사한 것으로 ACE 저해제 keto-ACE,

* 현재 구조 데이터 분석 중에 있으며 후속 연구에서 제시될 예정이다.

captopril과 기질 HHL을 비교하기 위해 활성정보와 함께 나타났다. 우선 가운데 존재하는 금속 결합부위 (Zn^{2+})와 마지막에 존재하는 양이온 결합부위는 결합 특성을 분명하게 알 수 있으나 S_1 , S_2 , S_1' 과 S_2' 부위의 결합특성을 알기 위해서는 보다 구체적인 정보가 요구된다. 이를 위해 결정구조를 통해 밝혀진 ACE의 활성부위와 저해제 lisinopril 사이의 결합정보 (Natesh 등, 2003)를 “Fig 4”와 관련하여 조사하였다. 첫 번째 S_2 부위의 경우는 거의 배타적으로 페닐 링과 아마이드 결합이 요구되는데 선행연구 결과(Gordon 등, 1986)에 의하면 페닐기를 메틸기로 그리고 아마이드기를 에틸렌기로 치환했을 경우 활성이 각각 28배, 44,000배가 감소하는 것이 보고되었다. 다만 예외적으로 captopril과 lisinopril 분자의 경우 S_2 부위와 상호작용할 수 있는 기능이 존재하지 않지만 HHL 분자의 경우는 keto-ACE 분자와 함께 페닐링 그리고 아마이드 결합을 갖고 있는 것을 확인할 수 있다. 양자화학적 관점에서 페닐 고리와 아마이드 결합은 π 전자들끼리 서로 짝짓기(conjugation)가 되어있어 전자밀도가 고르게 분포되는 특성을 갖고 있으며 이러한 사실들로부터 이 부분은 소수성 그룹(hydrophobic, aromatic)으로 분류할 수 있다.

두 번째 S_1 부위에 대해서는 keto-ACE와 lisinopril 모두 페닐 링을 가지고 있는데 결정구조를 살펴보면 S_1 부위에는 Val 잔기가 존재하고 있어서 lisinopril의 페닐 링과 van der Waals 상호작용을 하는 것으로 알려져 있다. HHL 분자는 위 그림에서 보는 것과 같이 S_1 부위와 상호작용할 수 있는 기능이 존재하지 않지만 keto-ACE와 lisinopril은 각각 페닐에틸, 페닐프로필 그룹이 기능기로 존재한다. 따라서 S_1 부위는 소수성 그룹(hydrophobic)으로 분류가 가능하다. 세 번째 S_1' 부위의 경우 결정구조 정보를 참조하면 lisinopril의 아민기는 주변의 Glu 및 물 분자들과 수소결합 네트워크를 형성하고 있다. 아민기와 Glu 사이의 수소결합 길이는 대략 3.4 Å 정도로서 그렇게 강한 결합은 아니지만 일반적인 저해제에는 존재하지 않는 기능기로서 활성부위와의 상호작용에 있어서 부가적인 요인으로 작용한다. HHL 분자에서는 아민기 대신 히스티딘 잔기의 imidazole 고리가 존재하며 S_1' 부위는 수소결합 주개(hydrogen bonding donor)로 분류 가능하다. 네 번째 특성인 S_2' 부위의 경우는 결정구조에서 볼 때 특정 잔기와의 상호작용 보다는 공간을 채울 수 있는 space-filling의 특성을 갖고 있다. 이 부분은 대부분의 저해제에서 공통적으로 찾을 수 있는 특성

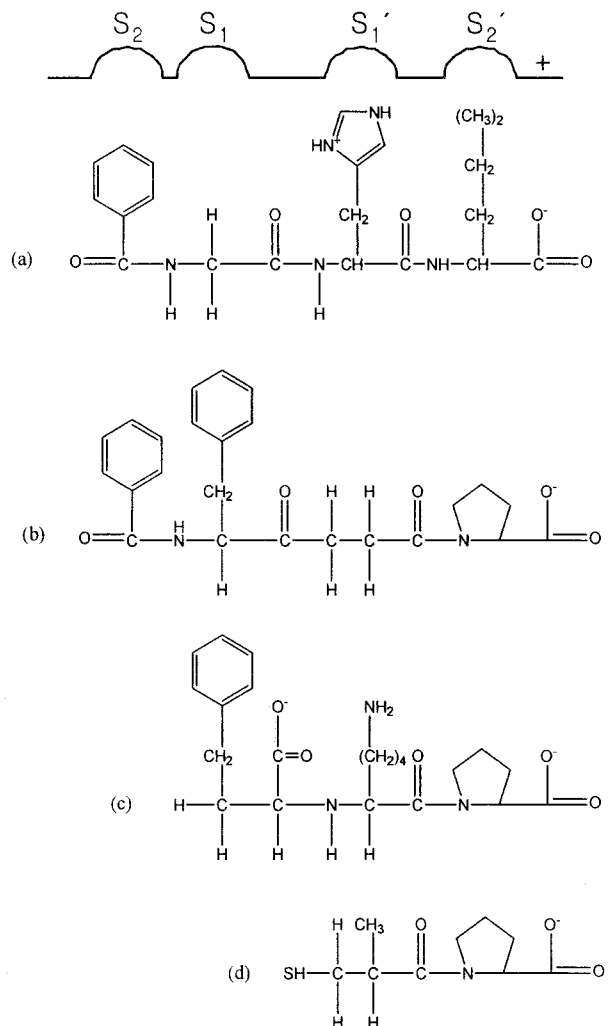


Fig 4. Simple representation of inhibitor binding to the 'generic' ACE active site to explain structure activity relationship(Cushman 등, 1977)((a) HHL, (b) Keto-ACE(IC_{50} =40.0 nM), (c) Lisinopril(IC_{50} =2.4 nM) (d) Captopril(IC_{50} =14.0 nM)).

으로 프롤린 잔기가 주로 사용되며 HHL 분자의 경우 Leu 잔기가 기능기로 위치하고 있다. 이러한 특성들로부터 S_2' 부위는 소수성 그룹(hydrophobic, aliphatic)으로 구분될 수 있다. 소수성 그룹으로 S_2 와 S_2' 이 존재하나 그 특성으로부터 각각 aromatic 및 aliphatic으로 분리하여 명명하였다.

위에서 살펴본 바와 같이 알려진 ACE와 저해제 사이의 결합정보(Natesh 등, 2003) 및 활성 데이터를 참고하여 HHL 분자에 약리단을 도사하고, 전기음성도가 큰 산소와 질소 원자에 대해 natural charge를 분석·종합하여 “Fig 5”에 나타났다. 한 가지 흥미로운 결과는 금속 아연과 상호작용 가능한 산소원자의 전하 값(-0.663)이 인접한 원자들의 전하 값(-0.645,

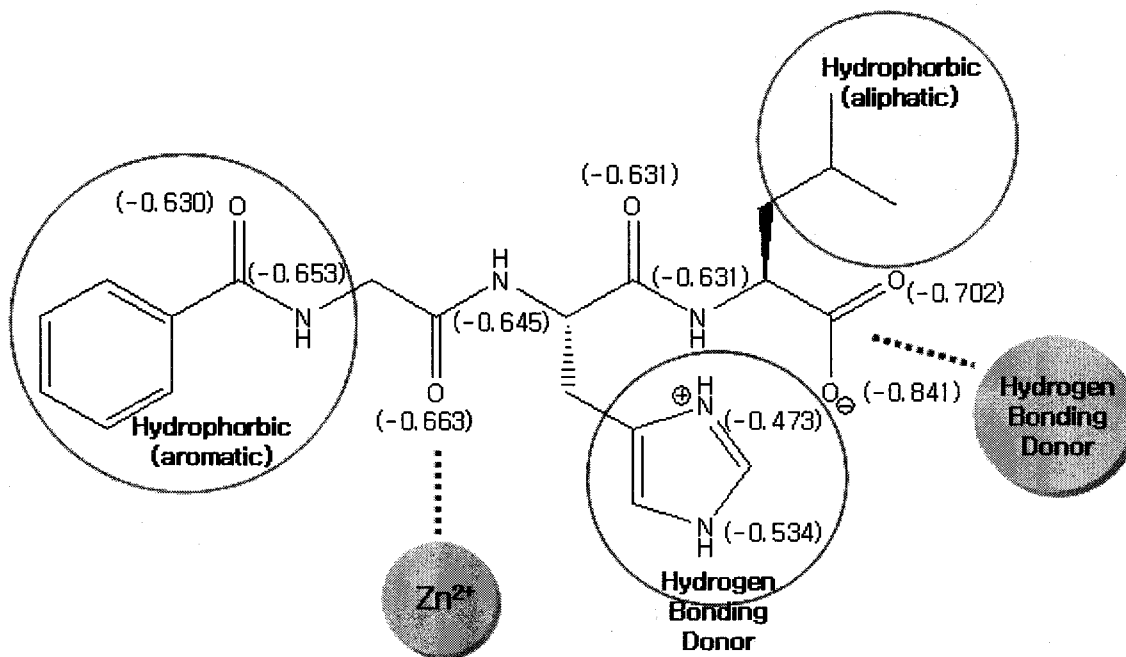


Fig 5. Schematic representation of predicted pharmacophores in HHL molecule including natural charges calculated at B3LYP/6-31G(d).

-0.653 등)보다 큰 것을 알 수 있다. 상대적으로 높은 음전하 밀도는 금속의 양전하와 강하게 결합하는데 captopril의 경우 상대적으로 작은 분자크기에도 불구하고 황 원자의 d-오비탈과 금속원자의 d-오비탈의 중첩으로 인해 산소원자 보다도 더 큰 결합력을 형성하여 captopril을 강력한 ACE 저해제로 만든다.

마지막으로 다른 두 분자에는 없는 imidazole 고리가 HHL 분자에 존재하는데 분자궤도 함수를 보면 imidazole 고리의 전자밀도가 고리 전체의 π-오비탈에 고르게 비편재화 되어 있다. “Fig 5”를 참조하면 imidazole 고리의 질소원자의 전하 값이 다른 질소원자들보다 상대적으로 낮은 값을 갖는 것을 알 수 있다. 결국 imidazole 고리의 질소 원자에 결합되어 있는 수소원자는 주위 환경에 따라 쉽게 떨어질 수도 있고 주변 잔기와 수소결합에 참여할 수도 있다. 이는 위에서 살펴보았던 S₁' 부위의 특성인 수소결합 주계(hydrogen bonding donor) 특성과 잘 일치한다.

일반적으로 인체 내에 존재하는 단백질이나 효소들은 의약품적으로서 많은 연구가 진행되어 왔으나 농약 또는 살충제 연구 분야에 있어서는 표적단백질에 대한 연구가 매우 드물다. 이러한 측면에서 보았을 때 의약품적 단백질과 서열 또는 구조적 유사성이 크거나 의약품으로 연구가 진행된 저해제가 제초제 및 살충제 표적에서 활성을 나타내는 경우에 저해제 설계에 있어서 매우 중요한 정보를 얻을 수 있다. 서론에

서 언급했듯이 살충제 표적 단백질인 AnCE는 인간의 ACE 단백질과 매우 높은 서열의 유사성을 갖기 때문에 ACE의 기질인 HHL 분자구조에 근거한 작용기작의 예측은 신규 저해제의 설계에 있어서 유용한 정보를 제공할 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 글

본 연구는 2004 학년도 서일대학 학술연구비 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

인용문헌

Becke, A. D. (1993) Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange. *J. Chem. Phys.* 98:5648-5652.

Cornell M. J., T. A. Williams, N. S. Lamango, D. Coates, P. Corvol, F. Soubrier, J. Hoheisel, H. Leharch and R. E. Isaac (1995) Cloning and expression of an evolutionary conserved single-domain Angiotensin Converting Enzyme from *Drosophila melanogaster*. *J. Biol. Chem.* 270:13613~13619.

Corvol P, A. Michaud, F. Soubrier and T. A. Williams (1995) Recent advances in knowledge of the structure and function of the Angiotensin-I Converting-Enzyme. *J. Hypertens.* 13:S3~S10.

- Cushman, D. W.; H. S. Cheung, E. F. Sabo and M. A. Ondetti (1977) Design of potent competitive inhibitors of angiotensin-converting enzyme, Carboxyalkanoyl and mercaptoalkanoyl amino acids. *Biochemistry* 16:5484~5491.
- Ditchfield, R. (1974) Self-consistent perturbation theory of diamagnetism I. A gauge-invariant LCAO method for N.M.R. Chemical shifts. *Mol. Phys.* 27:789~797.
- Ekbote U., M. Looker and R. E. Isaac (2003) ACE inhibitors reduce fecundity in the mosquito, *Anopheles stephensi*. *Comp. Biochem. Phys. B* 134:593~598.
- Galarzy, R. E., V. Kontoyiannidou-Ostrem, V. and Z. P. Kortylewicz, (1983) Inhibition of angiotensin converting enzyme by phosphonic amides and phosphonic acids. *Biochemistry* 22:1990~1995.
- Gaussian 03, Revision C.02, Frisch M. J., G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, J. A. Montgomery, Jr., T. Vreven, K. N. Kudin, J. C. Burant, J. M. Millam, S. S. Iyengar, J. Tomasi, V. Barone, B. Mennucci, M. Cossi, G. Scalmani, N. Rega, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, M. Klene, X. Li, J. E. Knox, H. P. Hratchian, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, P. Y. Ayala, K. Morokuma, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, V. G. Zakrzewski, S. Dapprich, A. D. Daniels, M. C. Strain, O. Farkas, D. K. Malick, A. D. Rabuck, K. Raghavachari, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, Q. Cui, A. G. Baboul, S. Clifford, J. Cioslowski, B. B. Stefanov, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, I. Komaromi, R. L. Martin, D. J. Fox, T. Keith, M. A. Al-Laham, C. Y. Peng, A. Nanayakkara, M. Challacombe, P. M. W. Gill, B. Johnson, W. Chen, M. W. Wong, C. Gonzalez and J. A. Pople, Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2004.
- Gordon, E. M., J. D. Godfrey, H. N. Weller, S. Natarajan, J. Pluscec, M. B. Rom, K. Niemela, E. F. Sabo and D. W. Cushman (1986) Design of tripeptide modeled inhibitors of angiotensin-converting enzyme : Studies on the role of the N-terminal acylamino group. *Bioorg. Chem.* 14:148~156.
- Isaac, R. E., U. Ekbote, D. Coates and A. D. Shirras (1999) Insect Angiotensin-Converting Enzyme: A processing enzyme with broad substrate specificity and a role in reproduction. *Ann. NY Acad. Sci.* 897:342~347.
- Kohn, K., and L. J. Sham (1964) Inhomogeneous Electron Gas. *Phys. Rev.* 136:B864~871.
- McEvoy, F. J., F. M. Lai and J. D. Albright (1983) Antihypertensive agents: angiotensin converting enzyme inhibitors. 1-[3-(Acylthio)-3-aryloxypropionyl]-L-prolines. *J. Med. Chem.* 26:381~393.
- Natesh, R., S. L. U. Schwager, H. R. Evans, E. D. Sturrock and K. R. Acharya (2003) Crystal structure of the human angiotensin-converting enzyme-lisinopril complex. *Nature* 421:551~554.
- Natesh, R., S. L. U. Schwager, H. R. Evans, E. D. Sturrock and K. R. Acharya. (2004) Structural details on the binding of antihypertensive drugs captopril and enalaprilat to human testicular angiotensin I-converting enzyme. *Biochemistry* 43:8718~8724.
- Patchett, A. A., E. Harris, E. W. Tristram, M. J. Wyvratt, M. T. Wu, D. Taub, E. R. Peterson, T. J. Ikeler, J. Broeke, N. G. Payne, D. L. Ondeyka, E. E. Thorsett, W. J. Greenlee, N. S. Lohr, R. D. Hoffsommer, H. Joshua, W. V. Ruyle, J. W. Rothrock, S. D. Aster, A. L. Maycock, F. M. Robinson, R. F., Hirschmann, C. S. Sweet, E. H. Ulm, D. M. Gross, T. C. Vassil and C. A. Stone (1980) A new class of angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Nature(London)* 288:280~283.
- Quan G. X., K. Mita, K. Okano, T. Shimada, N. Ugajin, Z. Xia, N. Goto, E. Kanke and H. Kawasaki (2001) Isolation and expression of the ecdysteroid-inducible angiotensin-converting enzyme-related gene in wing discs of *Bombyx mori*. *Insect. Biochem. Mol. Biol.* 31:97~103.
- Schoofs L., D. Veelaert, A. DeLoof, R. Huybrechts and E. Isaac (1998) Immunocytochemical distribution of angiotensin I-converting enzyme-like immunoreactivity in the brain and testis of insects. *Brain. Res.* 785:215~227.
- Skeggs, L. T., W. H. Marsh, J. R. Kahn and N. P. Shumway (1954) The existence of two forms of hypertensin. *J. Exp. Med.* 99:275~282.

- Taylor, C. A., D. Coates and A. D. Shirras (1996) The Acer gene of *Drosophila* codes for an angiotensin-converting enzyme homologue. *Gene*. 181:191~197.
- Turner A. J. and N. M. Hooper (2002) The angiotensin-converting enzyme gene family: genomics and pharmacology. *Trends. Pharmacol. Sci.* 23:177~183.
- Vrielink, A., Obel-Jorgensen and P. W. Coddling (1996) Hippuryl-L-histidyl-L-leucine, a Substrate for Angiotensin Converting Enzyme. *Acta. Cryst. C52*: 1300~1302.
- Wijffels G., C. Fitzgerald, J. Gough, G. Riding, C. Elvin, D. Kemp and P. Willadsen (1996) Cloning and characterisation of angiotensin-converting enzyme from the dipteran species, *Haematobia irritans exigua*, and its expression in the maturing male reproductive system. *Eur. J. Biochem.* 237:414~423.
- Williams T. A., A. Michaud, X. Houard, M. T. Chauvet, F. Soubrier and P. Corvol (1996) *Drosophila melanogaster* angiotensin I-converting enzyme expressed in *Pichia pastoris* resembles the C domain of the mammalian homologue and does not require glycosylation for secretion and enzymic activity. *Biochem. J.* 318:125~131.
- Wolinski, K., J. F. Hilton and P. Pulay (1990) Efficient Implementation of the Gauge-Independent Atomic Orbital Method for NMR Chemical Shift Calculations. *J. Am. Chem. Soc.* 112:8251~8260.
- Yang, H. Y., E. G. Erdoes and Y. Levin (1970) A dipeptidyl carboxypeptidase that converts angiotensin I and inactivates bradykinin. *Biochem. Biophys. Acta* 214:374~376.

Protein structure analysis : Pharmacophore study for new insecticide target AnCE using the substrate of ACE, HHL molecule

Jung Kyung Lee and Kyeong Yee Kim* (*Dept. of Chemistry, Hanyang University, Ansan 425-791, Korea, *Dept. of Food Science and Technology, Seoil College, Seoul 131-702, Korea*)

Abstract : Hippuryl-L-histidyl-L-leucine (Hip-L-His-L-Leu, HHL) is the known substrate of ACE, which used often in inhibition kinetic study to design new inhibitor. Here we use HHL molecule as a template to predict pharmacophore which can interact with residues in active site of AnCE, new potential insecticide target protein. To explain physicochemical properties related to molecular geometry and conformational change in reaction field as well as electron density of atoms associated to pharmacophores, geometry optimization, NMR chemical shifts and natural population analysis were performed by ab initio and DFT method. Calculated NMR chemical shifts showed good agreement with the experimental ones and obtained electron densities were used for analyzing pharmacophores of corresponding atoms. Finally, we could extract five pharmacophores related to hydrophobic aliphatic and aromatic site, hydrogen bonding donor and acceptor site and Zn binding site from the HHL molecule.

Key word : ab initio calculation, AnCE, electron density, HHL, pharmacophore.

*Corresponding author (FAX : +82-2-490-7456 E-mail : kykim@seoil.ac.kr)