

아세틸콜린에스터라제 촉매에 의한 티오에스테르의 가수분해 반응 메카니즘 연구

정대일* · 최순규 · 이용균 · 박유미 · 곽문정 · 신영주 · 최병욱¹ · 이봉호¹ · 한정태²

*동아대학교 화학과

¹한밭대학교

²영동대학교

Reaction Mechanism of Acetylcholinesterase Catalyzed Hydrolysis of Thiocholine Esters

Dai-Il Jung*, Soon-Kyu Choi, Yong-Gyun Lee, Yu-Mi Park, Moon-Jung Gwak,
Young-Ju Shin, Byung-Wook Choi¹, Bong-Ho Lee¹ and Jung-Tae Han²

*Department of Chemistry, Dong-A University, Pusan 604-714, Korea

¹Department of Chemical Technology, Han-Bat University, Daejeon 305-320, Korea

²Department of Chemistry, Young-Dong University, Chungbuk 370-701, Korea

Abstract

It was researched to react *horse serum*-BChE with hexanoylthiocholine chosen among choline esters. According as number of carbon of acyl group in choline esters was increased, reactivity was decreased but strength of ES complex was increased ($K_m=0.140\text{mM}$). The pH - V/K profile for BChE-catalyzed hydrolysis of hexanoylthiocholine yields a $pK_a=4.974\pm 0.028$. This value is equal to recent literature that shows systematic shift from dependence of activity on the basic form for a residue that has a $pK_a=6.2\sim 6.4$ to catalysis by a residue or residues that has a $pK_a=4.7\sim 5.0$. The resulting kinetic solvent isotope effect of hexanoylthiocholine is $^D V/K=1.18$. The magnitude of the isotope effect suggests that proton transfer is not an element of transition-state stabilization.

Key words – *horse-serum* BChE, hexanoylthiocholine, kinetics, hydrolysis

서 론

Alzheimer's disease(AD)[1]는 치매의 한 종류로, 현대에 가장 관심을 가지고 연구되는 질병의 하나이다. AD는 점진적으로 진행되는 신경퇴행성 질병으로 중추신경계(cen-

tral nervous system; CNS)에 이상을 초래하여 기억력과 사고력, 행동에 손상을 가져온다. AD 환자중 약 10%가 유전성이고 약 90%는 비유전성이라고 알려져 있으나 아직 그 확실한 이유는 밝혀지지 않았으며 단지 이 병에 걸린 환자의 뇌에서 관찰되는 특징은 중추신경계의 해마(hippocampus)와 연합피질(association cortex)에 있는 뉴런과 시냅스의 손실과 신경전달물질의 감소이다. 또 다른 특징은 아밀로이드 전구체 단백질(amyloid precursor protein ; APP)

*To whom all correspondence should be addressed

Tel : 82-51-200-7249, Fax : 82-51-200-7259

E-mail : dijung@daunet.donga.ac.kr

의 이상 대사에 의해 생성되는 β -병풍(β -pleated sheet)구조의 아밀로이드 단백질(amyloid protein)이 다량 침전되어 있는 것이 관찰되는 것이다[2-4]. 이러한 아밀로이드가 축적된 부위의 뇌내 콜린성 신경계 말단에서도 아세틸콜린(acetylcholine; ACh)의 감소라는 병리조직학적 특징이 나타난다[5]. 현재 AD의 발생 원인과 그 치료법에 관한 연구가 활발히 진행되고 있으나 아직 획기적인 발병 원인이나 치료법에 관한 보고는 알려지지 않고 있다. 치료법의 진행은 Wurtman 등의 연구 결과에 따라 뇌에서 전구체 콜린의 농도를 증가함으로써 아세틸콜린의 생성을 촉진시키고자 하는 많은 시도가 있어 왔다[6].

다른 방법으로써 ACh의 분해효소인 acetylcholinesterase (AChE)를 억제하여 시냅스 틈(synaptic cleft)으로부터 ACh의 제거를 막아 ACh의 농도를 증가시키는 방법이 있고 이러한 방법에서 AChE 억제제의 연구가 진행되었다[7].

치매 환자의 뇌내 ACh의 농도는 정상인에 비해 50%의 손실을 보인다. 대뇌의 ACh은 choline과 acetyl coenzyme A에서 합성되며 이 때 choline acetyltransferase (ChAT)라고 하는 효소가 관계된다. Choline 흡수가 낮아지면 ACh 합성 시 신경세포 구성물질 중의 하나인 phosphatidyl choline (PC)을 choline으로 사용하게 된다[8]. 이 경우 콜린성 뉴런이 파괴되어 치매와 같은 퇴행성 질병을 일으키게 된다. 따라서 ACh을 분해하는 효소인 AChE를 억제시켜 ACh 농도를 증가시키는 치료법 개발을 시도하게 되었다. 실제로 physostigmine (1)과 edrophonium (2) 등의 AChE 억제제들이 임상 실험에 사용되었으며, 최근 tetrahydroaminoacridine (THA, tacrine)(3)가 FDA에서 치매치료제로 허가되어 시판되고 있다. THA는 강력한 AChE 억제제이나, 간 독성의 문제점을 가지고 있다. 그 외에도 여러 가지 억제제들이 여러 임상단계에 걸쳐 연구중이며, 그 중 석송에서 추출한 huperzine A (4)라고 하는 AChE 억제제가 현재 주목되고 있다.

이와 같이 최근에 이르러 AChE 촉매작용의 경제적, 의학적, 그리고 국가적 안전에 대한 상당한 관심을 표명하고 있다.

AChE 활성자리는 중요한 anion locus(음이온 영역), esteratic locus(에스테르 영역), 그리고 hydrophobic region(소수성 영역)의 세 주된 영역과 주변 음이온 영역(peripheral anionic site)으로 이루어져 복합 반응 역학(complex reac-

tion dynamics)과 활성자리 형태역학을 도출하기 위해 서로 협력한다[9-13].

지금까지 기질 억제제가 peripheral site(주변영역)를 통해 간접적으로 일어나는 것으로 알려져 있었으나 최근에는 활성중심에서 직접적으로 일어날 가능성도 배제할 수 없어 기질 억제제의 차이를 활성 중심 주위의 분자환경에서 설명하고자 하였다. Daniel M. Quinn은 choline esters에 대해 촉매화된 AChE 가수분해에 대한 kinetic parameter를 비교, 실험 결과에서 butanoylthio-choline (BuTCh)의 큰 K_m 값은 AChE 활성자리와 BuTCh과의 반응결합이 약하다는 것을 제시하며 또한 기질이 변함에 따라 세 가지 중요한 활성영역 중 esteratic 영역에 지대한 영향이 있다고 볼 수 있다고 보고하였다.

한편, Cho 등은 기질로서 choline esters ($C_2 \sim C_{10}$)가 효소인 AS-AChE (aqueous soluble AChE)와 DS-AChE (detergent soluble AChE)에 대해 어떠한 억제력이 존재하는지를 연구하였는데, choline esters의 아실기 탄소가 2개에서 4개로 증가함에 따라 억제력은 감소하며 아실기가 더욱 길어지면 억제력은 증가하다가 다시 감소함을 알 수 있었다. 이 결과를 통해 Cho등은 AChE에 새로운 소수성 아실 영역(hydrophobic acyl region)이 존재할 것으로 보고하였다.

본 연구에서는 아실기 탄소 개수가 6~10개인 acylthiocholine을 ethylene sulfide를 출발물질로 하여[14] 두 가지 방법으로 합성하여 그 합성되어진 thiocholine ($C_6 \sim C_{10}$)을 기질로서 효소인 AChE와의 반응성 연구를 통해 효소-기질 결합자리의 분자환경을 정확히 해석하고자 한다(Fig. 1).

재료 및 방법

본 연구에서 사용한 시약은 모두 특급시약을 사용하였고 각 용매와 반응물질은 반드시 문헌[15]의 방법에 따라 정제하여 사용하였다.

초기반응속도 실험에 사용된 HexTCh chloride, HepTCh iodide, OctTCh chloride은 위에서 설명한 방법으로 합성하여 정제하였다. 효소 BChE는 더 이상의 정제 없이 직접 사용하였는데 V-S급의 냉동건조된 분말로 순도가 70%이다. ATCh, PrTCh, BuTCh과 발색제인 5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)(DTNB)와 효소는 특급시약으로 Sigma

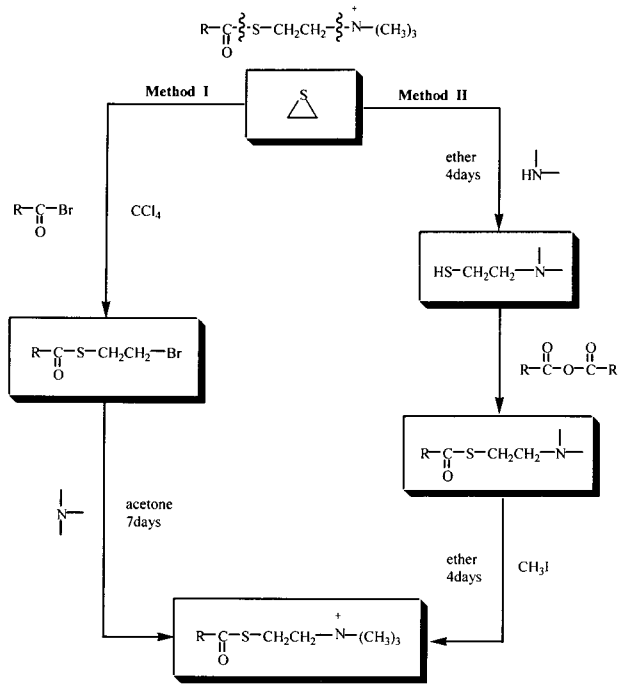


Fig. 1. Synthetic methods of acylthiocholine.

Chemical Co.에서 구입하였다. 기질과 효소, DTNB는 pH 7.3인 0.1M sodium phosphate buffer (NaCl 첨가로 $\mu=0.2$)에 각각 녹였다. 실험에 사용된 효소를 제외한 모든 용액은 0.25~0.45 μm 의 주사기용 필터(Gelman Sciences Co.)로 여과하였고, 필요한 경우 효소도 여과하여 사용하였다. 완충용액 제조용 물은 증류하였고 탈이온화 시켜 사용하였다 (18 M Ω /cm resistance, Millipore Co.). pH-rate profile에 사용된 용액 제조 시약은 초기반응속도 실험과 동일하다. pH-rate profile 실험에서 넓은 범위의 pH 완충용액은 인산염 완충용액(pH 5.75~7.95)과 sodium acetate 완충용액(pH 3.98~5.56)을 대략 pH가 0.2 정도 차이가 생기도록 각각 제조하였으며 이 완충용액들로 각각의 용액을 만들었다. 반응속도 측정의 UV-Visible 스펙트럼은 Hewlett Packard사의 HP8452A Diode Array UV-Visible spectrophotometer에 peltier temperature controller를 사용하여 $25 \pm 0.1^\circ\text{C}$ 로 유지하며 분석하였고 cuvette은 1000 μl 용량의 석영 재질이였다. 마이크로리터 단위의 시료 채취는 Gilson사의 pipetman autopipettes을 사용하였다. 완충용액의 pH와 pD (pH+0.4) 값은 유리전극을 갖춘 Istek사의 Model-720P pH측정기를 사용하였다.

Acylthiocholine 기질에 대한 속도상수의 측정

(1) BChE에 의한 Choline ester의 가수분해 반응 측정법

ACh와 유사한 기질인 ACh는 AChE에 의해 acetic acid와 thiocholine으로 가수분해된다.

Fig. 2와 같이 thiocholine이 DTNB (5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)와 반응했을 때 생기는 노란색의 5-thio-2-nitrobenzoate에 의한 흡광도 증가를 관찰함으로써 측정이 가능하다(Ellman's coupled enzyme assay).

(2) Acylthiocholine ester의 ChE에 의한 가수분해 속도상수

축매화된 BChE에 의한 acylthiocholine의 가수분해는 Ellman에 의해 설명된 coupled enzyme assay로 측정하였다.

축매화된 EE-BChE에 의한 가수분해 초기반응속도의 측정에 사용된 기질, 효소, 발색제는 cuvette내의 농도로 계산하여 제조하였고 염화나트륨(NaCl)이 0.1N 첨가된 pH 7.3인 0.1M 인산염(sodium phosphate) 완충용액에 녹였다. 각 기질(200 μl /1000 μl)은 예상되는 K_M 의 1/10배 농도에서부터 시작하여 10배 농도까지, Michaelis 상수 K_M 과 최대 속도 V_{max} 가 큰 오차 없이 유도될 수 있도록 2배수의 농도로 여덟 가지를 제조하였다. DTNB는 0.5mM(100 μl /1000 μl)이 되도록 제조하였고, 측정이 용이하도록 BChE(50 μl /1000 μl)의 농도는 4unit가 되도록 제조하였다. 반응속도 측정 시 cuvette내의 최종량이 1000 μl 가 되도록 준비된 시료들은 냉동 보관하면서 각각의 농도로 제조한 acylthiocholine 한가지씩을 준비된 DTNB와 인산염 완충용액과 함께

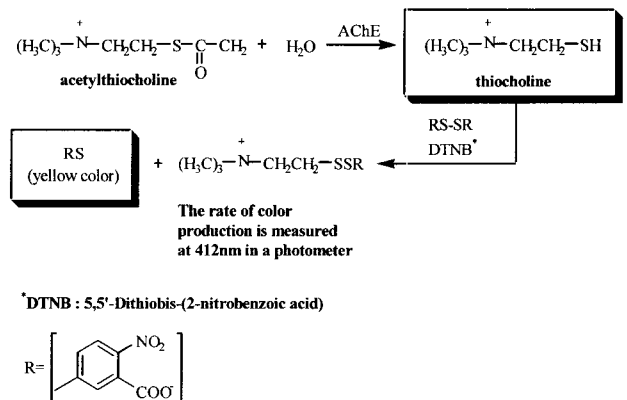


Fig. 2. Ellman's assay for determination of AChE activity.

autopipettes을 사용하여 cuvette에 채우고 온도를 $25.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$ 를 유지하며 BChE가 없는 상태로 3분 40초간 cuvette 안에서 배양시킨 후 BChE를 넣고 잘 섞은 다음 60초 동안의 초기반응속도를 측정하였다. 각 농도에 대해 2회씩 반복하여 측정하였다.

HepTCh, OctTCh의 촉매화된 BChE에 의한 가수분해 초기반응속도의 측정은 신뢰성을 확보하기 위해 HexTCh의 실험과 동일한 조건에서 진행하였고, 실험 결과의 대조구가 되는 ATCh, BuTCh, PrTCh의 가수분해 초기반응속도의 측정값과 비교하였다.

HexTCh에 의해 촉매화된 BChE의 pH-rate profile

HexTCh의 cuvette내의 농도는 초기반응속도 연구에서 얻은 K_M (1.4mM)의 약 1/15배(0.01mM)의 아주 낮은 때와 8배(10mM)의 아주 높을 때로 나누어 실험하였다. 즉 HexTCh의 농도가 K_M 보다 아주 작은 V/K 조건과 K_M 보다 아주 큰 V_{max} 조건이다. 넓은 범위의 pH 완충용액은 0.1M sodium acetate 완충용액(pH 3.98~5.56)과 0.1M 인산염 완충용액(pH 5.75~7.95)을 대략 pH가 0.2 정도 차이가 생기도록 각각 제조하였으며 이 각각의 완충용액에 두 가지 농도의 HexTCh를 제조하였고, DTNB는 HexTCh의 농도가 V/K 조건일 때 0.26mM로, 또 V_{max} 조건일 때 0.5mM DTNB가 되도록 녹여 용액을 만들었다. BChE 용액은 HexTCh의 농도가 V/K 조건일 때 10unit로, V_{max} 조건일 때 3unit로 실험을 진행하였으며, pH 7.1의 완충용액에 녹이되 아주 높은 농도로 제조하여 실제적인 cuvette내의 pH에 주는 영향을 최소화하였다.

Cuvette에 각각의 pH로 제조한 HexTCh, DTNB, 완충용액을 두 가지 농도에 대하여 초기반응속도 측정과 동일한 방법으로 수행하였고, V_{max} 조건일 때는 BChE가 없이 3분 40초 후에 자발적으로 일어나는 가수분해 속도를 측정하여 BChE에 의한 가수분해 반응속도에서 감하여 보정하였다.

HexTCh에 의해 촉매화된 BChE의 용매등위원소 효과 BChE에서 HexTCh의 proton inventory는 cuvette내의 농도가 초기 반응속도 연구에서 얻은 K_M 의 약 1/15의 아주 작을 때와 8배의 아주 클 때로 나누어, V/K조건과 V_{max} 조건을 만들었다. 같은 농도의 인산염을 함유한 중수소 치환된 완충용액(D_2O)과 양성자 치환된 완충용액(H_2O)에

V/K 조건과 V_{max} 조건을 갖도록 두 가지 농도의 HexTCh를 두 완충용액 간에 동일한 농도로 각각 제조하였다. DTNB는 동일하게 0.3mM되도록 각각 녹여 용액을 만들었다. BChE용액은 V/K조건일 때 10unit로, 또 V_{max} 조건일 때 5unit로 실험을 진행하였으며, H_2O 완충용액에 녹이되 아주 높은 농도로 제조하여 실제적인 cuvette내에 미치는 영향을 최소화하였다. 두가지 농도에 대하여 H_2O 완충용액으로 제조한 HexTCh, DTNB, 완충용액과 D_2O 완충용액으로 제조한 HexTCh, DTNB, 완충용액을 물분율에 맞게 0부터 약 1까지 0.1단위, 총 11종류로 교차시켜가며 증감하여 cuvette에 담아 각각의 물분율에 대해 초기반응속도 측정과 동일한 방법으로 2회 이상 측정하였다.

DecTCh은 48%의 수득율로 합성되었는데 분자구조상 4차 암모늄 구조를 가지지만 탄소 사슬이 길어짐에 따라 물에는 용해되지 않았다. 따라서, 먼저 물로 세척하여 불순물을 제거한 후 alcohol, ether, methylene chloride등에 용해시켜 용해되지 않는 불순물을 제거하여 순수한 DecTCh을 얻었다.

첫 번째 방법으로 합성한 acylthiocholine chloride는 매우 흡습성이 강하여 효소와의 반응을 위한 기질로 사용하기 위해 매우 조심스레 다루어야 했다. 반면에 두 번째 방법으로 합성한 acylthiocholine iodide는 흡습성을 가지지 않았고 아실기 탄소 개수가 10개인 DecTCh은 물에 용해되지 않았다. 첫 번째 방법으로 DecTCh chloride를 합성한다면 반응속도론적 연구에 적합한 수용성 DecTCh을 합성할 수 있을 것으로 기대된다.

결과 및 고찰

Acylthiocholine ester에 대한 속도상수의 측정

각 기질이 촉매화된 BChE에 의해 가수분해되는 초기반응속도는 Table 1과 같으며 전형적인 Michaelis-Menten 반응과정을 따른다. 즉 BChE의 고정된 농도에서 기질의 농도가 낮을 때는 1초 동안에 생성된 니트로벤조산 음이온의 몰 수 V가 기질의 농도에 정비례하여 증가하지만 농도가 아주 높을 때는 V가 기질의 농도에 거의 무관하다.

(1) Hexanoylthiocholine의 BChE에 의한 초기반응속도 HexTCh을 기질로 하여 촉매화된 horse serum-BChE에 의해 가수분해되어지는 초기반응속도는 Table 2와 같으며 DTNB 농도가 0.5mM이고 BChE는 4unit로 고정된 가수분

Table 1. Initial rate of thiocholine esters

[S] (mM)	사 용 량 (μl)			
	Buffer	HexTCh	DTNB	BChE
0.05	870	10	100	20
0.1	860	20	100	20
0.2	840	40	100	20
0.4	800	80	100	20
0.8	720	160	100	20
1.6	560	320	100	20
3.2	240	640	100	20

Table 2. Initial rate of BChE-catalyzed hydrolysis of HexTCh

[HexTCh] (mM)	Result	
	Rate (10^{-4} AU/sec)	Std.Dev (10^{-6} AU/sec)
0.05	7.688	5.38
	6.434	3.62
0.1	7.989	14.2
	9.985	2.72
0.2	13.427	4.69
	11.347	13.7
0.4	16.063	6.25
	18.014	3.95
0.8	19.634	6.75
	19.869	2.58
1.6	21.705	8.94
	20.412	4.19
3.2	21.983	6.29
	21.011	5.27

해 반응에서 Michaelis-Menten 식에 의해 얻은 각 기질의 BChE에 의한 K_M 은 $0.101 \pm 0.009 \text{mM}$ 이고 V_{\max} 는 $0.0023 \pm 4.8E-05 \text{(AU/sec)}$ 로 유도되었다. 이것을 반응속도 측정하여 그래프화 한 것을 Fig. 3에 나타내었고 Lineweaver-Burk 작도하여 Fig. 4에 나타내었다.

(2) Heptanoylthiocholine의 BChE에 의한 초기반응 속도

HepTCh를 기질로 하여 촉매화된 horse-serum-BChE에 의해 가수분해 되어지는 초기반응속도는 Table 3와 같으며 DTNB 농도가 0.5mM 이고 BChE는 4unit로 고정된 가수분

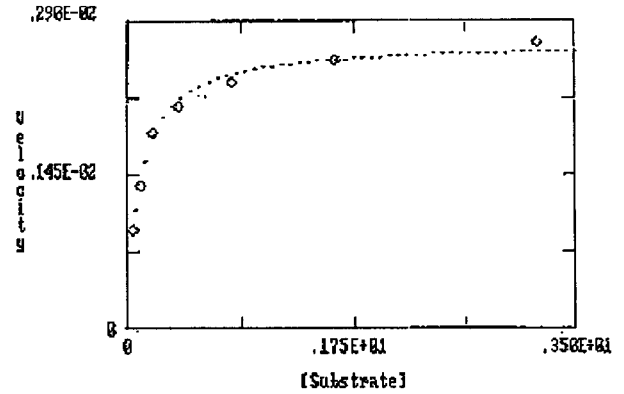


Fig. 3. A plot of initial rate vs. [HexTCh] for BChE-catalyzed hydrolysis.

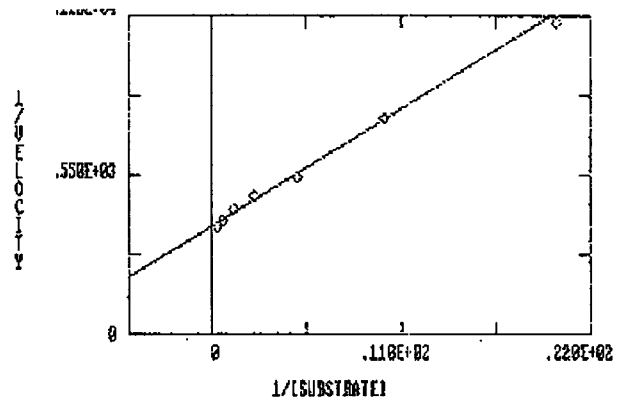


Fig. 4. Lineweaver-Burk plot of initial rate of HexTCh.

Table 3. Initial rate of BChE-catalyzed hydrolysis of HepTCh

[HepTCh] (mM)	Result	
	Rate (10^{-4} AU/sec)	Std.Dev (10^{-6} AU/sec)
0.05	6.61	3.931
	7.21	7.356
0.1	12.0	3.845
	9.12	8.651
0.2	15.79	6.954
	11.95	3.168
0.4	16.47	2.241
	14.85	7.758
0.8	16.81	15.244
	14.76	9.351
1.6	18.11	10.656
	17.65	9.487
3.2	18.11	5.268
	20.16	6.311

해 반응에서 Michaelis-Menten 식에 의해 얻은 각 기질의 BChE에 의한 K_M 은 $0.094 \pm 0.030 \text{mM}$ 이고 V_{max} 는 $0.0029 \pm 2.4 \times 10^{-4} (\text{AU}/\text{sec})$ 로 유도되었다. 이것을 반응속도 측정하여 그래프화 한 것을 Fig. 5에 나타내었고 Lineweaver-Burk 작도하여 Fig. 6에 나타내었다.

(3) Octanoylthiocholine의 BChE에 의한 초기반응속도

OcTCh를 기질로 하여 촉매화된 horse-serum- BChE에 의해 가수분해 되어지는 초기반응속도는 Table 4와 같으며 DTNB 농도가 0.5mM 이고 BChE는 4unit로 고정된 가수분해 반응에서 Michaelis-Menten 식에 의해 얻은 각 기질의 BChE에 의한 K_M 은 $0.086 \pm 0.014 \text{mM}$ 이고 V_{max} 는 $0.0043 \pm 1.5 \times 10^{-4} (\text{AU}/\text{sec})$ 로 유도되었다.

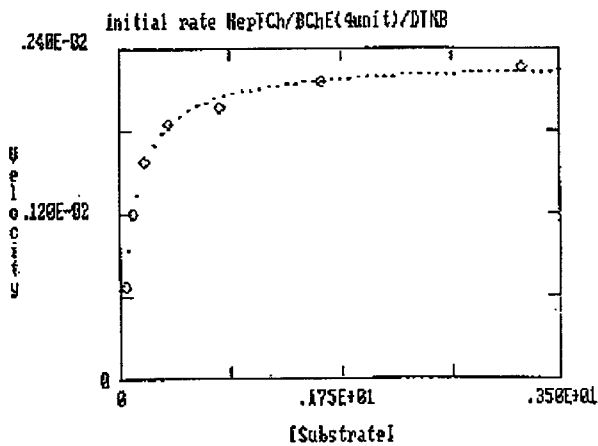


Fig. 5. A plot of initial rate vs. [HepTCh] for BChE-catalyzed hydrolysis.

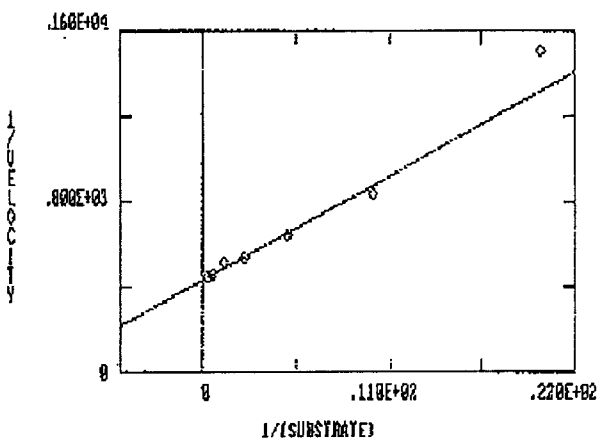


Fig. 6. Lineweaver-Burk plot of initial rate of HepTCh.

Table 4. Initial rate of BChE-catalyzed hydrolysis of OcTCh

[OcTCh] (mM)	Result	
	Rate ($10^{-3} \text{AU}/\text{sec}$)	Std.Dev ($10^{-6} \text{AU}/\text{sec}$)
0.05	2.30	3.23
	1.52	6.85
0.1	2.00	7.58
	2.15	6.05
0.2	3.37	15.7
	4.02	7.3
0.4	3.54	7.03
	2.36	9.81
0.8	3.75	4.83
	2.89	7.81
1.6	2.64	9.14
	3.90	5.46
3.2	4.39	16.8
	3.36	21.3

이것을 반응속도 측정하여 그래프화 한 것을 Fig. 7에 나타내었고 Lineweaver-Burk 작도하여 Fig. 8에 나타내었다.

Fig. 9와 Table 5에 의하면 BChE에 의한 가수분해 반응에서 얻어진 K_M 의 결과는 동족체 choline ester인 ATCh, PrTCh, BuTCh, HexTCh, HepTCh, OcTCh, 각각의 [ES] 복합체간 결합력의 차이가 있음을 뚜렷이 나타낸다. 본 연

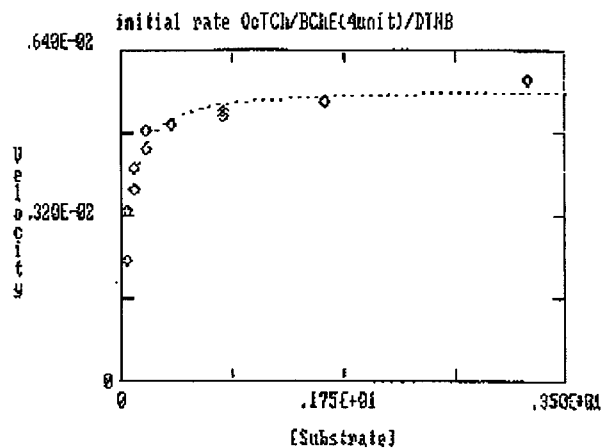


Fig. 7. A plot of initial rate vs. [OcTCh] for BChE-catalyzed hydrolysis.

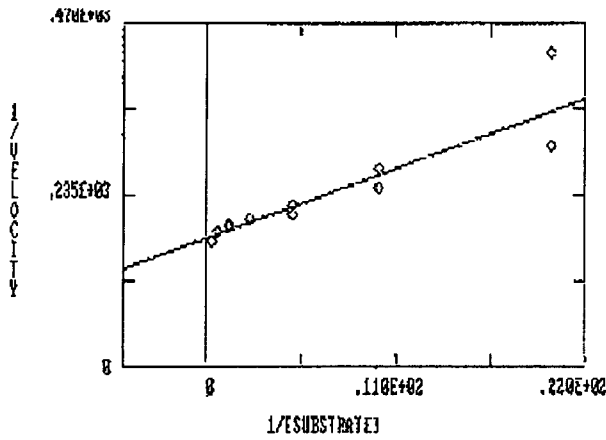


Fig. 8. Lineweaver-Burk plot of initial rate of OcTCh.

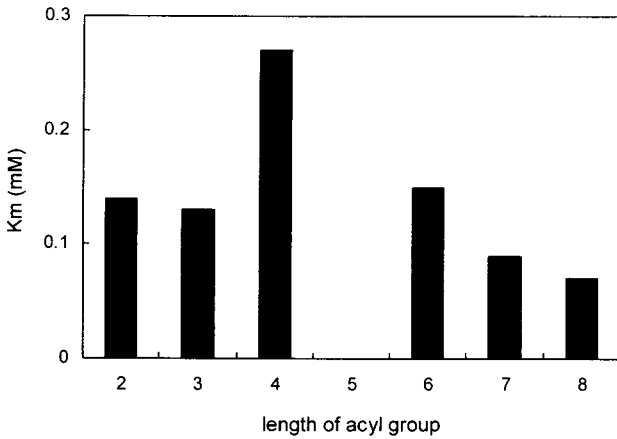


Fig. 9. Correlation between K_m and the length of acyl group in choline esters.

Table 5. Kinetic constant for BChE-catalyzed hydrolysis of thiocholine esters

ChE (unit)	substrate	K_M	V_{max}
	ATCh	0.1401 ± 0.016	$0.0010 \pm 2.8E-05$
	PrTCh	0.134 ± 0.016	$0.0065 \pm 1.9E-04$
BChE (horse : 4)	BTCh	0.274 ± 0.07	$0.0018 \pm 1.4E-04$
	HexTCh	0.101 ± 0.009	$0.0023 \pm 4.8E-05$
	HepTCh	0.094 ± 0.030	$0.0029 \pm 2.4E-04$
	OcTCh	0.086 ± 0.014	$0.0043 \pm 1.5E-04$

구에서 아실기의 탄소 수가 두 개에서 네 개로 길어지면 반응성의 감소와 더불어 K_M 이 증가하는 경향에서 알 수 있듯 [ES] 복합체의 결합력이 약화되나, 네 개보다 더욱 길

어진 여덟 개의 탄소 사슬을 갖는 OcTCh은 비록 반응속도는 감소하지만 보다 강화된 [ES] 복합체를 형성한다는 것을 나타낸다. 다시 말해 이는 촉매화된 BChE의 활성자리에 더 긴 사슬의 아실기가 결합할 때 촉매반응에 관여하는 새로운 esteratic 활성자리의 존재를 제안한다.

HexTCh에 의해 촉매화된 BChE의 pH-rate profile $[S] \gg K_m$, $[S] \ll K_m$ 에 대하여, 즉 $[S]=1.2mM$, $[S]=0.01mM$ 에 대하여 pH 범위 4.08~8.03에서의 BChE와의 반응속도를 측정하였다(Table 6, 7). 이것을 그래프화 한 것이 Fig. 10, 11에 나타나 있다. $[S]=1.2mM$ 일 때 pK_a 는 5.12 ± 0.21 로, $[S]=0.01mM$ 일 때 pK_a 는 4.974 ± 0.028 로 계산되었다.

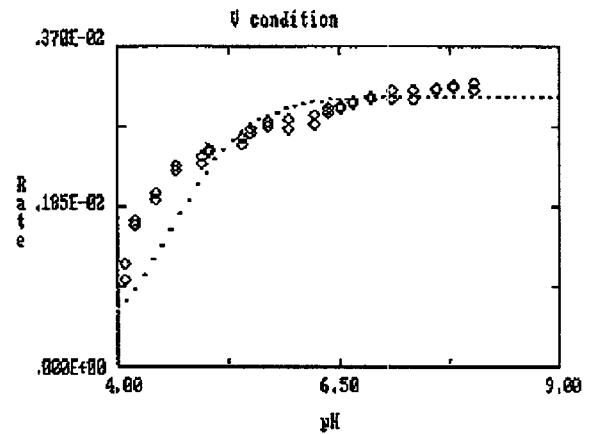


Fig. 10. pH-rate profile for hydrolysis of HexTCh (1.2 mM, V).

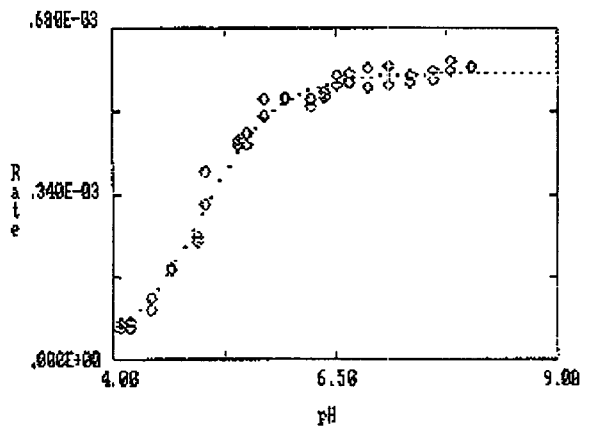


Fig. 11. pH-rate profile for hydrolysis of HexTCh (0.01 mM, V/K).

Table 6. pH-rate profile for hydrolysis of HexTCh (1.2 mM, V) : [S] ≫ K_m

pH	Spontaneous hydrolysis result		Result		Correction rate (10 ⁻³ AU /sec)
	Rate (10 ⁻⁴ AU /sec)	Std.Dev (10 ⁻⁵)	Rate (10 ⁻³ AU /sec)	Std.Dev (10 ⁻⁵)	
4.08	1.437	0.838	0.517 0.569	0.306 1.025	0.373 0.425
4.20	1.349	0.959	0.746 0.799	0.649 0.574	0.611 0.664
4.43	1.122	1.211	0.885 0.923	0.506 0.540	0.773 0.811
4.65	1.105	1.319	1.102 0.772	0.404 2.032	0.992 0.662
4.95	1.123	1.329	0.968 1.023	0.683 0.909	0.856 0.911
5.03	0.960	1.318	0.939 0.961	1.209 1.834	0.843 0.865
5.40	0.850	1.092	0.896 0.866	1.599 2.323	0.811 0.781
5.50	-0.222	0.921	0.840 0.789	1.197 1.639	0.862 0.811
5.70	-0.356	0.964	0.757 0.795	1.865 1.777	0.793 0.831
5.93	-0.626	1.039	0.832 0.844	1.103 2.543	0.895 0.907
6.22	-0.560	0.961	0.882 0.798	0.988 1.668	0.938 0.854
6.37	-0.960	0.911	0.812 0.720	2.268 1.594	0.908 0.816
6.51	-0.707	1.358	0.730 0.797	1.610 1.549	0.801 0.868
6.65	-1.310	0.761	0.763 0.772	1.705 1.572	0.894 0.903
6.86	-1.441	1.057	0.722 0.746	2.209 2.336	0.866 0.890
7.10	-0.366	0.474	0.842 0.844	1.103 2.543	0.895 0.907
7.33	-1.317	0.861	0.882 0.738	0.758 1.688	0.938 0.854
7.60	-0.532	0.241	0.812 0.725	2.268 1.594	0.908 0.816
7.79	-0.580	0.997	0.760 0.737	1.619 1.569	0.801 0.868
8.03	-0.945	0.431	0.857 0.765	1.745 1.788	0.793 0.831

Table 7. pH-rate profile for hydrolysis of HexTCh (0.01 mM, V/K) : [S] ≪ K_m

pH	Spontaneous hydrolysis result		Result		Correction rate (10 ⁻³ AU /sec)
	Rate (10 ⁻⁴ AU/s ec)	Std.Dev (10 ⁻⁵)	Rate (10 ⁻³ AU /sec)	Std.Dev (10 ⁻⁵)	
4.08	1.367	0.755	0.487 0.367	0.533 1.435	0.324 0.387
4.20	1.631	0.355	0.646 0.786	0.422 0.865	0.547 0.564
4.43	1.253	1.866	0.885 0.923	0.653 0.324	0.723 0.811
4.65	1.344	1.244	1.102 0.772	0.404 2.032	0.992 0.662
4.95	1.123	1.245	0.968 1.023	0.683 0.909	0.856 0.911
5.03	0.960	1.465	0.939 0.961	1.209 1.834	0.843 0.865
5.40	0.850	1.092	0.896 0.866	1.599 2.323	0.811 0.781
5.50	-0.222	0.921	0.840 0.789	1.197 1.639	0.862 0.811
5.70	-0.356	0.964	0.757 0.795	1.865 1.777	0.793 0.831
5.93	-0.626	1.039	0.832 0.844	1.103 2.543	0.895 0.907
6.22	-0.560	0.961	0.882 0.798	0.988 1.668	0.938 0.854
6.37	-0.960	0.911	0.812 0.720	2.268 1.594	0.908 0.816
6.51	-0.707	1.358	0.730 0.797	1.610 1.549	0.801 0.868
6.65	-1.310	0.761	0.763 0.772	1.705 1.572	0.894 0.903
6.86	-1.441	1.057	0.722 0.746	2.209 2.336	0.866 0.890
7.10	-0.267	0.021	0.816 0.720	2.278 1.554	0.908 0.816
7.33	-0.765	1.368	0.820 0.730	1.534 1.710	0.816 0.801
7.60	-0.686	1.034	0.797 0.743	1.649 1.305	0.868 0.894
7.79	-0.807	1.558	0.812 0.720	2.268 1.794	0.908 0.816
8.03	-0.890	1.692	0.822 0.753	2.709 2.886	0.866 0.890

ATCh의 촉매화된 EE-AChE 가수분해에 대한 pH-V/K profile은 하나의 활성자리 아미노산 결사슬($pK_a=6.22\pm 0.03$ 을 갖는, H440의 결사슬을 같은)의 기본형에 의존함을 보여준다. 또 PrTCh의 촉매화된 EE-AChE 가수분해에 대한 pH-V/K profile은 단일 활성자리 잔류물의 이온화와 일관된다. 이 데이터의 nonlinear least-squares fitting은 pK_a 값 6.42 ± 0.03 을 준다. 한편 BzTCh의 촉매화된 EE-AChE 가수분해에서의 반응성은 pK_a 값 4.77 ± 0.03 을 갖는 두 잔류물의 이온화를 증가시킴을 보여준다.

BuTCh은 반응성에 있어서 ATCh과 BzTCh 사이에 놓여 있고 BuTCh의 촉매화된 EE-AChE 가수분해에 대한 pH-V/K profile은 위에서 논의된 ATCh과 BzTCh의 pH-rate 거동의 특성을 가진다. Nonlinear least-squares fitting으로부터 $pK_{a1}=4.71\pm 0.03$, $pK_{a2}=6.3\pm 0.1$ 이 계산되었다. pK_{a1} 은 BzCh 가수분해에 대한 pH-rate profile로부터 결정된 pK_a 값과 동일하고, pK_{a2} 는 ATCh과 PrTCh의 촉매화된 EE-AChE 가수분해에 대한 pH-V/K profile로부터 결정된 pK_a 값과 동일하다.

본 연구에서는 HexTCh의 촉매화된 BChE 가수분해에 대한 pH-V/K profile에서 pK_a 값 4.974 ± 0.028 을 얻었다.

pH-rate profile은 $pK_a=6.2\sim 6.4$ 를 갖는 잔류물의 기본형에 활성이 의존하는 것으로부터 하나의 잔류물 또는 $pK_a=4.7\sim 5.0$ 을 갖는 잔류물들에 의한 촉매작용의 계통적인 자리밀립을 보여준다. ATCh과 PrTCh과 같은 빠른 기질에 대해 작용하는 더 높은 pK_a 는 활성자리 S200-H440-E327 삼작용기조의 H440과 비슷하지만 더 낮은 pK_a 는 carboxylate 잔류물의 수반을 제한한다.

HexTCh에 의해 촉매화된 BChE의 용매동위원소 효과

BChE에서 HexTCh의 proton inventory는 V/K(0.01 mM) 조건과 V_{max} (1.2mM) 조건을 각각의 물분율에 대해 반응속도를 측정(Table 8, 9)하여 농도가 아주 작을 때 물분율에 대해 반응속도의 변화율 $^D V/K=1.18$ 와 농도가 아주 클 때 물분율에 따른 반응속도의 변화율 $^D V=1.76$ 을 계산하였다. 이를 그래프로 나타내 양성자 목록을 작도하여 보면 직선형을 나타낸다. $^D V=1.76$ 의 값은 BChE에서 HexTCh의 가수분해 반응은 동위원소 효과에 비교적 둔감한, 기질이 효소로의 확산 단계에서 속도제한적인 ATCh와 유사한 속도결정단계에서 전이상태가 안정화되는 것을 나타낸다.

Table 8. Proton inventory of HexTCh (1.2mM, V) : $[S]\gg K_m$

Atom fraction of (D)	0.1M Pi Buffer		HexTCh; 1.2mM		DTNB; 0.3mM		Enzyme ; 5 units	First result	
	H ₂ O (μ l)	D ₂ O (μ l)	H ₂ O (μ l)	D ₂ O (μ l)	H ₂ O (μ l)	D ₂ O (μ l)		H ₂ O (μ l)	Rate ($10^3 U/sec$)
0.00	590	0	200	0	200	0	10	2.13 2.08	0.162 1.431
0.10	530	60	180	20	180	20	10	2.01 2.05	1.734 0.765
0.20	470	120	160	40	160	40	10	1.92 1.93	0.703 1.442
0.30	410	190	140	60	140	60	10	1.91 1.92	1.154 1.427
0.40	350	240	120	80	120	80	10	1.82 1.79	1.544 1.981
0.50	290	300	100	100	100	100	10	1.67 1.76	1.696 1.415
0.60	230	360	80	120	80	120	10	1.76 1.69	0.579 1.438
0.70	170	420	60	140	60	140	10	1.61 1.63	1.090 1.584
0.80	110	480	40	160	40	160	10	1.53 1.57	1.684 1.249
0.90	50	540	20	180	20	180	10	1.54 1.50	0.557 1.292
0.99	0	590	0	200	0	200	10	1.49 1.42	1.093 1.462

요 약

합성된 hexanoylthiocholine을 기질로 하여 butyrylcholinesterase와의 반응을 연구하였다. 기질의 농도 변화에 따른 초기반응속도 관찰을 통해 아실기의 탄소수가 증가함에 따라 반응성은 감소하나 K_m 값은 0.140(mM)으로 더 강한 ES 복합체를 형성함을 알 수 있었다. Hexanoylthiocholine의 촉매화된 acetylcholinesterase 가수분해에 대한 pH-V/K profile에서 pK_a 값 4.974 ± 0.02 을 얻었다. 이는 최근 문헌의 보고와 상통하는 것으로 $pK_a=6.2\sim 6.4$ 를 갖는 잔류물의 기본형에 활성이 의존하는 것으로부터 하나의 잔류물 또는 $pK_a=4.7\sim 5.0$ 을 갖는 잔류물들의 촉매작용으로 계통적인

Table 9. Proton inventory of HexTCh (0.01mM, V/K) : [S] \ll K_m

Atom fraction of (D)	0.1M Pi Buffer		HexTCh; 0.01mM		DTNB; 0.3mM		Enz-y me ; 10 units	First result	
	H ₂ O (μl)	D ₂ O (μl)	H ₂ O (μl)	D ₂ O (μl)	H ₂ O (μl)	D ₂ O (μl)		H ₂ O (μl)	Rate (10 ⁻³ U /sec)
0.00	590	0	200	0	100	0	10	3.85 3.67	0.453 0.122
0.10	530	60	180	20	90	10	10	3.82 3.64	0.455 0.340
0.20	470	120	160	40	80	20	10	3.75 3.61	0.446 0.335
0.30	410	190	140	60	70	30	10	3.59 3.43	0.563 0.645
0.40	350	240	120	80	60	40	10	3.63 3.21	0.596 0.638
0.50	290	300	100	100	50	50	10	3.47 3.39	0.322 0.725
0.60	230	360	80	120	40	60	10	3.49 3.51	0.476 0.369
0.70	170	420	60	140	30	70	10	3.47 3.35	0.351 0.360
0.80	110	480	40	160	20	80	10	3.61 3.48	0.486 0.761
0.90	50	540	20	180	10	90	10	3.65 3.46	0.780 1.003
0.99	0	590	0	200	0	100	10	3.29 3.18	0.367 0.259

자리밀립을 보여준다. 이는 촉매화된 BChE의 활성영역 esteratic site 주변에 긴 사슬 아실기의 가수분해에 관여하는 새로운 활성영역이 존재함을 밝히는 증거이다. 분자 조형은 기질의 아실기의 탄소수에 따라 acetylcholinesterase에 의해 표현되어지는 반응과정의 변화의 합리성을 제공한다. 본 연구에서는 한국과학기술원 도핑컨트롤센터와 연계하여 acetylcholinesterase와 기질인 acylthiocholine과의 입체적으로 둘러싸인 acyl-binding site를 분자 조형하고자 노력 중에 있다.

감사의 글

본 연구는 1999년 농림수산부 기초연구비 및 2001년 동

아대학교 교비 및 기초연구비에 의해 수행되었으며 이에 감사 드립니다.

참고 문헌

1. Alzheimer A., 1907. Uber eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde, *Zentralbl. Nervenheilk*, **30**, 177-179.
2. Berman H. A. and M. M. Decker. 1986. Kinetic, Equilibrium, and Spectroscopic Studies on Dealkylation ("Aging") of Alkyl Organophosphonyl Acetylcholinesterase. *J. Biol. Chem.* **261**, 10646.
3. Berman H. A., D. F. Olshefski, M. Gilbert and M. M. Decker. 1985. Fluorescent Phosphonate Labelo for Serine Hydrolases. *J. Biol. Chem.* **260**, 3462.
4. Carson K. A., C. Geula and M. M. Mesulam. 1991. Electron microscopic localization of cholin-esterase activity in Alzheimer brain tissue. *Brain Res.* **540**, 204-208.
5. Dekosky S. T. and S. D. Styren. 1994. Cholinergic changes and synaptic alterations in Alzheimer's disease. In: *Alzheimer Disease Theraperapeutic Strategies*, pp.93-96. Ezio Giacobini, Robert Becker eds. Birkhaelser, Boston.
6. Farber S. A., B. E. Slack and B. M. Cohen. 1994. Choline metabolism, membrane phospholipids, and Alzheimer disease. In: *Alzheimer Disease: Therapeutic strategies*, pp.247-251. E. Giacobini, R. Becker. Birkhauser. Boston.
7. Glenner G. 1983. Alzheimer disease : The commonest from amyloidosis. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **107**, 281-282.
8. Goate A. M. and J. Hardy. 1991. Segregation of missense mutayion in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer disease. *Nature* **349**, 704-706.
9. Kinesella K. G. 1992. Changes in life expectancy. *Am. J. Clin. Nutr.* **55**, 1196s.
10. Nonaka G., M. Harada and I. Nixhioka. 1980. Eugeniin, a new ellagitannin from cloves. *Chem. Pharm. Bull.* **28**, 685-687.
11. Perrin, D. D. and W. L. F. Armarego. 1966. Purification of Laboratory Chemicals. *Pergamon press*, London.
12. Perry, E. K., R. H. Perry, G. Blessed and B. E. Yomlinson. 1977. Necropsy evidence of central cholinergic deficits in senile dementia. *Lanceti* 189.
13. Perry, E. K., B. E. Tomlinson, G. Blessed and P. H.

- Gibson. 1978. Correlation of cholinergic abnormalities with senile plaques and mental test scorers in senile dementia. *Br. Med. j. ii.* 1457-1459.
14. Vander, A. J., J. H. Sherman and D. S. Luciano. 1994. In : *Human physiology : the mechanism of body function.* 6th eds., Academic Press Inc., NY.
15. Yu, J. and H. Fang. 1981. Studies on the essential oils of clove buds and clove leaves. *Zhongcaoyao* **12**, 340-342,339.

(Received December 14, 2001; Accepted January 24, 2002)