

## *Poria cocos* 균핵에서 분리한 성분들과 DNA Topoisomerase I의 반응양상 및 효소저해 활성

최인희 · 김지현 · 김춘미\*

이화여자대학교 약학대학

(Received September 23, 2005; Revised October 13, 2005)

### Binding Mode and Inhibitory Activity of Constituents Isolated from Sclerotium of *Poria cocos* with DNA Topoisomerase I

Inhee Choi, Ji-Hyun Kim and Choonmi Kim\*

College of Pharmacy, Ewha Womans University, Seoul 120-750, Korea

**Abstract** — DNA topoisomerase I (TOP1) helps the control of DNA replication, transcription and recombination by assisting breaking and rejoining of DNA double strand. Camptothecin (CPT) and its derivative, topotecan, are known to inhibit TOP1 by intercalating into TOP1-DNA complex. Recently various non-CPT intercalators are synthesized for a new class of TOP1 inhibitors. In this study, six compounds isolated from *Poria cocos* were investigated for their interaction with TOP1-DNA complex using the flexible docking program, FlexiDock. The binding modes were analyzed and compared with the TOP1 inhibition activities. The compounds that showed potent activity were intercalated between the +1/-1 base pairs of DNA, located near the active site phosphotyrosine723 and formed hydrogen bonds with active site residues. On the other hand, compounds with no activity were not docked at all. The binding modes were well correlated with the inhibition activity, suggesting the possibility that potent inhibitors can be designed from the information presented by the docking study.

**Keywords** □ DNA topoisomerase I, *Poria cocos* isolates, inhibitor, docking, binding mode

Human topoisomerase I(TOP1)은 세포의 핵에 존재하는 효소이며, DNA의 이중나선을 끊어 꼬임을 풀거나 다시 연결하는 역할을 함으로써 DNA의 위상을 조절하여 세포 내에서 일어나는 전사, 재조합 그리고 복제를 가능하게 한다.<sup>1-4)</sup> TOP1의 활성 부위 잔기인 Tyr723의 phosphate는 DNA 절단가닥(scissile strand)의 -1 deoxynucleoside의 3'-end와 결합을 형성하여 한쪽 가닥의 끊어짐을 유도한다. 그 결과 3'-phosphotyrosine(Ptr723) 결합이 형성 되면 DNA와 TOP1은 절개가능 복합체(cleavable complex)라고 불리는 가역적인 복합체를 이루게 되고, 생성된 DNA의 일시적 절단에 의해 끊어진 가닥이 회전하여 DNA의 이완이 가능하게 된다. DNA가 충분히 풀린 후에는 자유롭게 남겨졌던 +1 deoxynucleoside의 5-OH가 Ptr723 결합을 다시 공격하여 재연결이 일어나 DNA 이중나선이 복구된다.<sup>5)</sup> TOP1 저해

제는 절단중간체를 안정화시킴으로써 재연결 단계를 특이적으로 저해하여 세포 독성을 가지는 것으로 알려져 있다.<sup>6,7)</sup> S-phase에서 일어나는 DNA 재연결 도중에 TOP1 저해제가 TOP1-DNA와 결합하면, 안정한 삼성분-복합체가 형성되어 재연결이 억제되고, 이 복합체가 복제 포크와 충돌하여 이중가닥 절단이 일어나 세포의 apoptosis가 유도된다.<sup>4)</sup> 최초의 TOP1 저해제로 밝혀진 것은 *Camptotheca acuminata*에서 분리된 식물 alkaloid인 camptothecin(CPT)이다. CPT의 항암 활성이 밝혀진 이후 이것을 선구물질로 하여 많은 유도체들이 합성되었고, CPT의 수용성 유도체인 topotecan(TPT/Hycamtin®)은 난소암의 치료제로, irinotecan(CPT-11/Camptosar®)은 대장암의 치료제로 임상에서 사용되고 있다.<sup>1,6,8)</sup> CPT가 TOP1-DNA 복합체를 저해하는 기전을 밝히기 위해 여러 모델들이 제시되어 왔으며 다음 세 가지 모델로 정리할 수 있다. 첫번째 모델은 base-flipping 모델로 이 모델을 제시한 Redinbo 등은 +1 base가 flip out 되어 생성된 공간에 CPT가 수직으로 결합되어 DNA 이중나선과 겹쳐지는 상호작용을 한다고 주장하였고,<sup>9)</sup> Laco 등도 역시 Evolution

\*본 논문에 관한 문의는 저자에게로  
(전화) 02-3277-3001, 3039 (팩스) 02-3277-2851  
(E-mail) cmkime@ewha.ac.kr

Programming procedure를 사용하여 +1 guanine 염기가 180도 회전하여 flip out 된 공간에 CPT가 수직으로 결합한다고 주장하였다.<sup>10)</sup> Pommier 등은 TOP1이 DNA에 결합하면 +1 deoxyguanine이 이중나선 밖으로 회전하여 이중나선 DNA의 이완이 가능하다고 제시하였다.<sup>8)</sup> 두 번째 모델은 Fan 등이 제시한 삽입(intercalation) 모델로, CPT의 E-ring이 DNA 절단부위 가까이 위치하면서 DNA 염기들 사이에 삽입되어 겹쳐지는 상호작용을 할 것이라고 주장하였다.<sup>11)</sup> 세 번째로 Kerrigan과 Pilch는 혼합모델을 제시하였다. 이들은 AutoDock이라는 docking 프로그램을 사용하여 CPT를 TOP1-DNA<sup>9)</sup>에 docking 시킨 결과 CPT가 -1/+1(T10-G11) 부위의 DNA 염기 사이에 수직으로 결합하며 CPT의 E-환이 minor groove를 향하면서 Arg364 및 Asp533과 상호작용 한다고 주장하였다.<sup>7)</sup> 그러던 중 Stewart 등은 2002년에 사람 TOP1과 DNA의 공유결합 복합체에 TPT가 결합된 삼성분-복합체의 X-ray 결정체 구조(1K4T.pdb)와 ligand가 결합되지 않은 이성분-복합체의 X-ray 결정체 구조(1K4S.pdb)를 발표하였다.<sup>2)</sup> 이 두 개의 결정체 구조를 비교, 분석함으로써 TPT가 -1/+1의 염기쌍과 겹치는 상호작용을 하며 평행하게 삽입되었음이 확인되었다. 특히 TPT의 결합위치가 약물이 결합되지 않은 이성분-복합체에서 -1/+1의 염기쌍이 존재하는 곳과 같은 공간에 위치하기 때문에 TPT의 평면적인 5환링이 DNA 염기쌍과 유사하게 작용하는 것으로 밝혀졌다. 또한 삽입되기 위한 결합자리는 비절단가닥의 phosphodiester 결합의 작은 회전으로 생성되기 때문에 먼저 언급된 flip out 모델에서 주장한 것과 같이 DNA 염기가 나선 밖으로 flip out 될 필요가 없는 것으로 밝혀졌다.<sup>2)</sup>

TOP1의 저해 기전이 밝혀짐에 따라 근래에는 CPT 유도체뿐만 아니라 강한 세포독성을 가지는 여러 DNA 삽입물질들이 새로운 non-CPT TOP1 저해제의 후보 물질로서 개발되고 있다. Indoquinolinediones,<sup>12)</sup> protoberberine alkaloids,<sup>13)</sup> indenoisoquinolines,<sup>14)</sup> anthracyclines,<sup>15)</sup> saintopin<sup>16)</sup> 등의 유도체들은 DNA 삽입물질로서 DNA에 결합하여 CPT와 유사하거나 혹은 그 이상의 TOP1 저해 효과를 나타내는 것으로 밝혀졌다.<sup>6)</sup>

*Poria cocos*(Polyporaceae)의 균핵은 이노, 진정 그리고 강장약으로 오래 전부터 사용되어 왔으며,<sup>17,18)</sup> Tai 등은 여러 가지 lanostane-형 triterpene acids를 분리하여 약효를 나타내는 주요 성분으로 제시하였다.<sup>19)</sup> 이후 이 물질들은 항균, 면역조절, 항염 활성을 나타내며,<sup>18,20-22)</sup> 암세포의 성장을 억제하고, DNA polymerase를 저해함으로써 세포독성을 가지는 것으로 밝혀졌다.<sup>23)</sup> 최근 Li 등은 *Poria cocos*의 6가지 메칠알콜 추출물을 분리하여 세포독성과 TOP1의 저해 활성을 실험하여 분리물질들의 항암 활성 기전이 TOP1-DNA의 저해에 기인할 수 있다는 가능성을 제시하였다.<sup>17)</sup> 본 연구에서는 docking이라는 컴퓨터 모델링의 방법으로 이들 6가지 성분이 TOP1-DNA에 결합하여

TOP1 저해 작용을 나타내는지를 확인하고자 한다. 즉 X-ray 결정체 구조에서 밝혀진 TPT의 결합양상을 근거로, 이 화합물들을 사람 TOP1-DNA-TPT 삼성분-복합체(1K4T.pdb)에서 TPT를 추출한 이성분-복합체에 docking시켜 그 결합양상을 규명함으로써 실험적으로 측정된 저해 활성과의 상관관계를 설정하고 docking 연구의 신뢰성과 정확성을 제시하고자 한다.

## 실험 방법

### Docking 실험 프로그램

Docking 실험은 Silicon Graphics Octane workstation에서 SYBYL 프로그램(version 6.9.2, Tripos Co., U.S.A)의 docking module인 FlexiDock을 사용하여 실행하였다.

### TOP1-DNA 처리방법

사람 TOP1-DNA 복합체로는 TOP1 저해제인 TPT가 결합된 1K4T.pdb를 선택하였다. 해상도가 2.10 Å인 이 구조는 2002년에 보고되었으며 돌연변이가 되지 않고 Tyr723이 DNA의 +1 부위인 T10과 phosphotyrosine 결합으로 연결되어 있는 야생형 구조이다. Docking에 적합한 상태로 수정하기 위하여 잘못된 원자형을 고친 후 끊어진 상태였던 G11과 G12를 연결하였다.<sup>3)</sup> 활성부위 잔기와 중요한 수소결합을 형성하는 것으로 밝혀진 세 개의 물 분자들(Wat1, Wat2, Wat3)을 제외한 나머지 물 분자들을 제거하고,<sup>2)</sup> DNA와 물 분자들에 수소를 더한 후 Gasteiger-Hückel 전하를 가하였다. 단백질 구조에는 잘못된 결합자들을 수정한 후 수소를 더하고, Kollman-all-atom 전하를 가하였다.<sup>24)</sup> X-ray 구조에서 추출하여 수정을 완료한 DNA와 물 분자들을 TOP1에 다시 가한 후 Tyr723과 절단가닥의 T10을 phosphotyrosine 결합으로 연결하였다.

### Ligand 처리방법

Ligands로 사용된 *Poria cocos*의 6개 화합물과 CPT의 구조는 Table I에 제시하였다. 에너지 계산이 원자형에 근거하므로 ligand 구조의 잘못된 원자형과 결합순서를 수정한 후 ligand에 수소를 첨가하고 gradient 0.001 kcal/mol로 Tripos force field에서 Powell method를 사용하여 에너지최소화를 실행하였다.<sup>24)</sup> 이때 Gasteiger-Hückel 전하를 부여하였고 반복(iteration) 수는 1000이었다. 에너지최소화가 완료된 ligand들에 대해서는 random conformational search를 하여 에너지가 가장 낮은 구조를 최종 ligand로 선택하여 docking에 사용하였다.

### TOP1-DNA 복합체에 대한 ligands의 docking 실험

우선 결합자리를 설정하기 위하여 TOP1의 활성부위 잔기로

Table I - Structures of compounds isolated from *Poria cocos* and camptothecin

Compound	Structure	Compound	Structure
(S)-(+)-Turmerone		Ergosterol peroxide	
Pachymic acid		Polyporenic acid C	
Dehydropachymic acid		Tumulolic acid	
Camptothecin			

알려진 Phe361, Gly363, Arg364, Lys374, Lys532, Asp533, Thr718, Asn722, Ptr723 및 DNA 염기인 T10, G11, C112, A113을 구성하는 원자들을 기준으로 4 Å 이내의 잔기들을 선택하였다.<sup>2)</sup> FlexiDock 실험에서는 ligand와 결합자리 내의 잔기들이 docking이 진행되는 동안 유동적으로 움직이므로 활성부위 잔기 중 DNA의 T10과 phosphotyrosyl 결합으로 연결되어 있는 Ptr723을 제외한 모든 아미노산 잔기들을 유동적으로 설정하였다. TOP1과 ligand의 원자들 중 수소결합을 형성할 수 있는 공여체와 수용체를 선택하여 지정한 후 ligand를 미리 위치시키고 반복 수를 50000으로 설정하여 docking을 수행한 후, 얻어진 구조들 중 가장 낮은 에너지의 구조를 택하여 활성부위 잔기들과 ligand의 상호 작용을 살펴보았다.

### 평가기준

Docking 결과 분석 시 결정체 구조에서 보여진 TPT의 결합 위치와 수소결합을 중요한 판정기준으로 사용하였다.<sup>2)</sup> 또한 촉매작용을 하는 Tyr723과 가까운 위치에서 TOP1과 저해제가 서로 상호작용하면서 TOP1-DNA 결합자리 사이에 수소결합이 형성 되면 절개가능 복합체의 추가적인 안정화를 유도할 수 있다는 주장에 근거하여 다음의 세가지 판정 기준을 설정하였다.<sup>11)</sup> 첫째 평면구조를 가지는 ligand의 모핵이 DNA의 +1/-1 부위 (G11-T10) 사이에 삽입형태로 결합하여 염기와 겹쳐지는 상호작용을 하는지의 여부, 둘째 ligand와 활성부위 잔기인 Ptr723과의 거리, 그리고 셋째 TOP1의 활성부위 잔기로 예측되는 9개의 잔기들과 3개의 물 분자, 그리고 DNA 중 복합체의 안정화에 기여

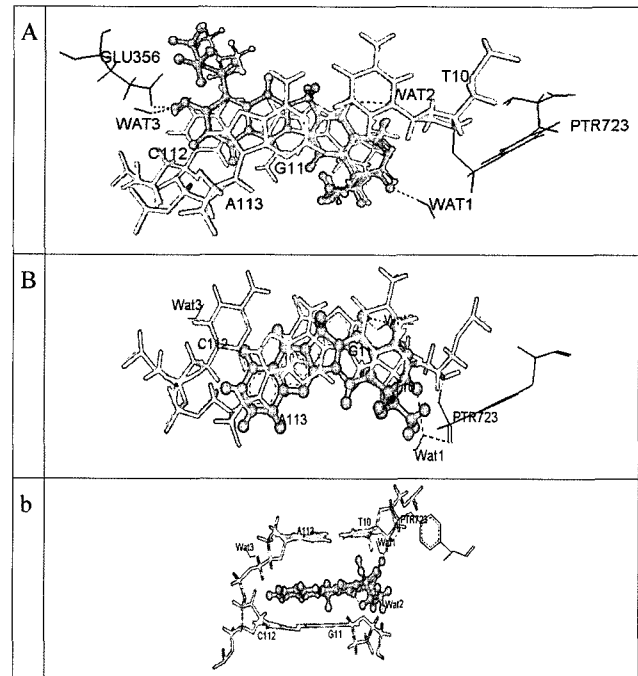
하는 것으로 알려진 G11과의 수소결합 여부를 검토하였다. 이상의 세 가지 기준에 어느 정도 부합하는가를 판정하여 TOP1 저해작용과의 상관관계를 설립하였다.

## 실험결과 및 고찰

### TPT 및 CPT의 docking 실험

**TPT** - 새로운 화합물들을 docking 하기 전에 X-ray 구조에서 lactone 형태의 TPT를 추출하여 재현성 실험을 하였다. Docking 결과로 얻은 복합체 구조와 X-ray 구조를 겹쳤을 때 TPT 간의 root mean square deviation(RMSD)은 1.06 Å이었으며 방위(orientation)와 입체구조(conformation)가 거의 같은, 높은 수준의 재현성을 나타내었다(Fig. 1). TPT는 X-ray 결정체 구조처럼 +1/-1 염기 사이에 평행하게 삽입형태로 결합되었으며, 모핵인 5환링이 염기와 겹쳐지는 상호작용을 하였다.<sup>2)</sup> 두 구조 사이의 수소결합은 조금 다르게 나타났다. 즉 docking 된 구조에서는 X-ray 구조의 Asp533과의 수소결합이 형성되지 않고 대신 Glu356과의 결합이 형성되었으며 추가적으로 Wat1 및 Wat2와 두 개의 수소결합을 하였다. 물 분자와의 수소결합은 이 결합을 통하여 중요한 잔기인 Asn722나 Ptr723과 수소결합을 형성할 수 있음을 의미한다.<sup>2)</sup> 전체적으로 TOP1의 작용기전에 중요한 역할을 하는 활성부위 잔기들 및 DNA 염기와의 상호작용이 docking 결과에서 정확히 재현되었다.

**CPT** - TOP1 저해활성 검사의 기준 약물이었던 CPT를 docking한 결과 TPT와 같이 +1/-1 DNA 염기 사이에 평행하게 삽입되었다(Fig. 1B, b). CPT 구조에서 활성부위 잔기와 상호작용



**Fig. 1** - Docking of TPT (A) and CPT (B) into TOP1-DNA. A and B: Front view, b: Side view, Dark grey ball and stick: TPT/CPT in the docked structure, Grey ball and stick: TPT in X-ray structure, Light grey stick: DNA bases, Black thin line: TOP1 residues and water molecules, Black dotted lines: Hydrogen bonds.

용하는 E-환은 T10과 G11 염기 사이에 docking되었고 E-환의 carbonyl O는 Wat1과의 수소결합을 통하여 Ptr723과 수소결합을 하였다. D-환의 carbonyl O는 Wat2와 수소결합을 함으로써

**Table II** - Docking results and % inhibition of 6 compounds isolated from *Poria cocos* and CPT

Compound	% inhibition <sup>a</sup>	Degree of interaction	Distance from Ptr723 (Å)	Binding mode
(S)-(+)-Turmerone	0	0	10.04	1. No intercalation 2. No H-bond
Ergosterol peroxide	0	0	8.90	1. Intercalated between bases of non-scissile strand 2. No H-bond
Pachymic acid	43.5	++	6.21	1. Intercalated perpendicular to the -1/+1 bases of scissile strand but located between the two strands 2. H-bond with Arg364
Polyporenic acid C	55.8	++	5.44	1. Intercalated perpendicular to the -1/+1 bases of scissile strand but located between the two strands 2. H-bond with Wat2 and G11
Dehydropachymic acid	60.7	+++	4.60	1. Intercalated perpendicular to the -1/+1 bases of scissile strand with proper location 2. H-bond with Asn352
Tumulosic acid	83.3	++++	4.03	1. Intercalated perpendicular to the -1/+1 bases of scissile strand with proper location 2. H-bond with Thr718
CPT	94.6	+++++	3.51	1. Intercalated parallel to the -1/+1 bases of scissile strand 2. H-bond with Ptr723 through Wat1 and directly with Wat2

<sup>a</sup>Relaxation assay for TOP1 catalytic activity (at 100 μM)<sup>17)</sup>

그 물 분자를 경유하여 Asn722와의 수소결합 가능성을 제시하였다. CPT가 절단부위에 매우 가까이 위치하며(3.51 Å), TOP1 및 DNA와 적절한 상호작용을 함으로써 저해 효과가 높게(94.6%) 나타난 것으로 예상된다(Table II).

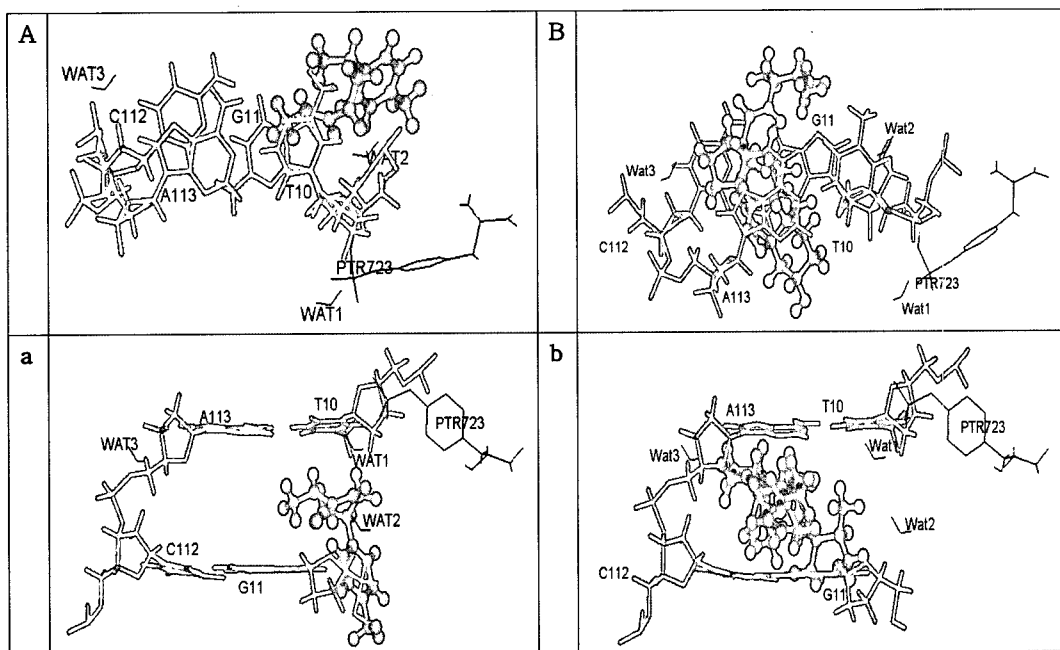
### 분리성분의 docking 실험

(S)-(+)-Turmerone과 ergosterol peroxide -*Poria cocos*에서 분리한 sesquiterpene ketone체는 (S)-(+)-turmerone이며 ergosterol peroxide는 sterol로 두 화합물은 Li 등에 의해 TOP1 저해 효과가 0%로 밝혀졌다.<sup>17)</sup> Docking을 수행한 결과, (S)-(+)-turmerone은 절가지의 입체장애에 의하여 공간이 넓은 major groove로 빠져나가 DNA에 삽입되지 않았고(Fig. 2A, a), ergosterol peroxide의 sterol 모핵은 결합되기는 하였으나 저해 작용을 나타낼 수 없는 위치인 DNA 비절단가닥에 세로로 docking 되었다(Fig. 2B, b). 또한 모두 TOP1의 활성부위 잔기와 수소결합을 형성하지 못하였다.

Pachymic acid와 polyporenic acid C - Pachymic acid는 lanostane-형 triterpene acid로 docking 결과 Arg364와 1개의 수소결합을 형성하며(Fig. 5A) DNA 사이에 삽입형태로 결합하였으나 T10-G11과 C112-A113 사이에 수직으로 위치하여 중요한 활성부위 잔기인 Ptr723과의 거리가 6.21 Å으로 다소 먼 것을 확인하였다(Fig. 3A, a). Tyr723은 DNA에 친핵성 공격을 하여 DNA의 한쪽 가닥의 끊어짐을 유도한 후 끊어진 가닥의 3'-phosphate와 phosphotyrosyl 결합을 형성하는 잔기로서, 생성된

Ptr723과 ligand와의 거리가 TOP1 저해 효과에 매우 중요한 요소임이 밝혀져 있다.<sup>17)</sup> Arg364와의 수소결합은 3-acetyloxy기의 O와 이루어졌으며, lanost-8-en 부분이 T10의 pyrimidine 환 및 G11의 purine 환과 수소성 및 van der Waals 작용을 하였다. Pachymic acid는 Arg364와 수소결합을 형성하지만 삽입 위치가 약간 비절단가닥 쪽으로 향해 있고 Ptr723과의 거리가 멀기 때문에 상대적으로 약한 활성(43.5%)을 나타내는 것으로 판단된다.

Polyporenic acid C 역시 lanostane-형 triterpene acid로서 절가지가 입체장애를 줄이기 위해 minor groove에 위치하고 모핵이 major groove를 향하였다(Fig. 3B, b). Polyporenic acid C는 Ptr723으로부터 5.44 Å 위치에서 T10-G11과 C112-A113 사이에 수직으로 docking 되었다. 절가지의 21-hydroxyl기와 Wat2가 1개의 수소결합을 형성하였고, 20-carboxyl기가 G11과 1개의 수소결합을 형성하였다(Fig. 5B). 이 ligand는 Wat2와 수소결합을 함으로써 TOP1 저해 효과와 관련된 Asn722 잔기와 물 분자를 경유한 수소결합을 형성할 수 있는 가능성을 제시하였으며,<sup>2,7)</sup> lanosta-7,9-diene 부분은 G11의 purine 환과 수소성 및 van der Waals 작용을 하였다. Polyporenic acid C는 DNA 염기 및 물 분자와 수소결합을 형성하면서 삽입되어 중 정도(55.8%)의 활성을 나타내지만 활성부위 잔기와의 직접적인 수소결합이 형성되지 않았고 절단가닥과 비절단가닥 사이에 위치한 삽입 형태도 이 성분이 더 좋은 효과를 나타낼 수 없는 원인이 된다고 판단된다.



**Fig. 2** – Docking of (S)-(+)-turmerone (A) and ergosterol peroxide (B) into TOP1-DNA. (A–B) are views looking down the DNA helix. (a~b) are the side views perpendicular to the DNA helix axis. Dark grey ball and stick: Compounds, Grey stick: DNA bases, Black thin line: TOP1 residues and water molecules, Black dotted lines: Hydrogen bonds.

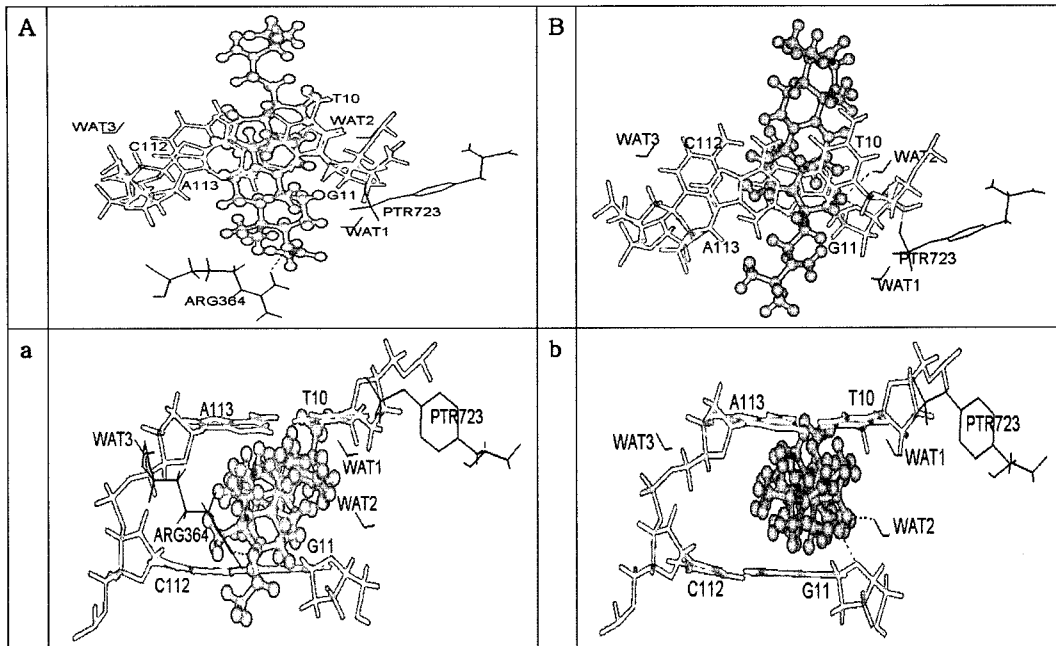


Fig. 3 – Docking of pachymic acid (A) and polyporenic acid (B) into TOP1-DNA. (A~B) are views looking down the DNA helix. (a~b) are the side views perpendicular to the DNA helix axis. Dark grey ball and stick: Compounds, Grey stick: DNA bases, Black thin line: TOP1 residues and water molecules, Black dotted lines: Hydrogen bonds.

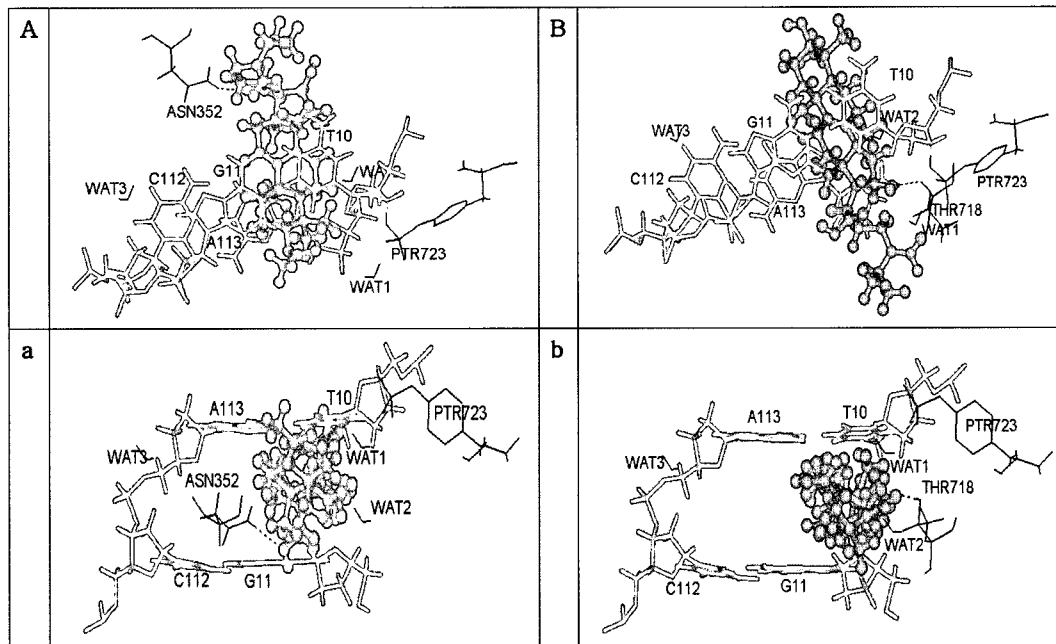


Fig. 4 – Docking of dehydropachymic acid (A), and tumulosic acid (B) into TOP1-DNA. (A~B) are views looking down the DNA helix. (a~b) are the side views perpendicular to the DNA helix axis. Dark grey ball and stick: Compounds, Grey stick: DNA bases, Black thin line: TOP1 residues and water molecules, Black dotted lines: Hydrogen bonds.

**Dehydropachymic acid**와 **tumulosic acid** – 두 성분 다 lanostane-형 triterpene acid이며 dehydropachymic acid는 +1/-1 열기 사이에 세로로 삽입되었고 lanosta-7,9-diene 모핵의 일부는 major groove에 위치하였다(Fig. 4A, a). 따라서 결가지가

major groove를 향하면서 20-carboxyl기가 major groove에 위치하는 Asn352와 한 개의 수소결합을 형성하였다(Fig. 5C). Laco 등은 SN-38을 TOP1-DNA 복합체에 docking 시킨 결과 A-환이 Asn352를 향하는 것을 발견하고 CPT 유도체들이 A-환에 수소

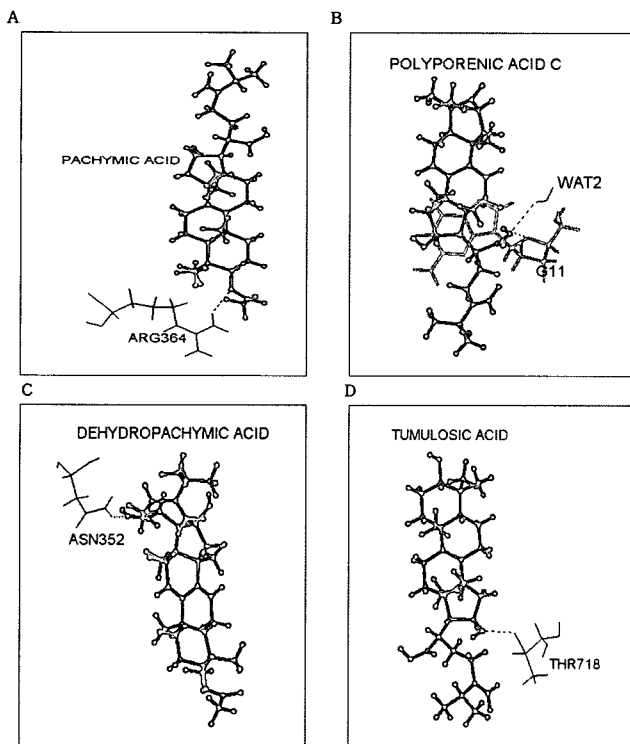
결합을 형성할 가능성이 있는 수용체나 공여체를 가진다면 Asn352와 수소결합을 형성함으로써 TOP1의 저해 효과를 증가시킬 수 있을 것이라고 예측하였다.<sup>10)</sup> 또 Staker 등은 dehydropachymic acid처럼 거대한 indolocarbazole ligand인 SA315F가 Asn352 잔기와의 화학형(chemotype) 특이적인 접촉에 의하여 결합된 ligand의 삽입 결합형태를 증가시킨다고 보고하였다.<sup>25)</sup> 이를 근거로 활성부위 잔기로 설정되지 않은 Asn352와 dehydropachymic acid의 수소결합이 TOP1 저해 작용에 유효한 결합일 것으로 판단하였으며, 절단가닥 쪽의 적절한 위치에 결합된 삽입형태도 이 성분의 증가된 활성(60.7%)을 뒷받침 해주는 결과이다.

Tumulosic acid는 TOP1의 저해 효과가 83.3%로 6개의 화합물 중에서 가장 높은 것으로 나타났다.<sup>17)</sup> Docking 결과 절단가닥의 +1/-1 염기 사이에 수직으로 삽입되었음을 확인하였고(Fig. 4B, b), 또한 16-hydroxyl기의 O가 Ptr723과 근접한 곳에 위치한 Thr718과 한 개의 수소결합을 형성함을 발견하였다 (Fig. 5D). Tumulosic acid와 Ptr723과의 거리는 4.03Å으로 6개의 화합물들 중 가장 가까이 위치하는 것으로 나타났으며, 이 사실은 저해제와 Ptr723과의 거리가 가까울수록 저해 효과가 높다는 주장과 잘 부합된다.<sup>11)</sup> Thr718은 절단가닥의 +1 부위에 위치하는 guanosine의 산소와 수소결합을 형성함으로써 5'-OH가 3'

phosphotyrosine 결합에 친핵성 공격을 하여 재연결이 일어나도록 돕는 것으로 알려져 있다.<sup>2)</sup> 그러므로 tumulosic acid와 Thr718의 상호작용은 이 화합물이 높은 저해 작용(83.3%)을 나타내는 원인이 될 것으로 생각된다. 또한 절단가닥이 입체장애 없이 minor groove에 위치하여 Asp533 및 Thr718과 van der Waals 상호작용을 형성하였고, lanosta-8-en 모핵의 4환링이 절단가닥의 -1 thymine, +1 guanine과 겹쳐지는 상호작용을 하여 삼성분-복합체의 안정화에 기여하였다.

## 결론

본 연구에서는 사람 TOP1-DNA 복합체에 *Poria cocos*에서 분리한 6개의 화합물과 CPT를 FlexiDock 프로그램으로 docking하여 생성된 삼성분-복합체의 결합양상을 규명하고 TOP1 저해 활성과 비교하였다. 저해 효과가 없는 두 화합물 중 (S)-(+)-turmerone의 경우 수소결합을 형성하지 않았으며 DNA 염기 사이에서 빠져나가 major groove에 위치하였고, ergosterol peroxide의 경우는 DNA 비절단가닥의 C112와 A113 사이에 위치하여 적절한 삽입형태로 결합하지 못했음을 확인하였다. 그러나 TOP1 저해 효과가 있는 lanostane-형 triterpene acid를 모핵으로 하는 네 개의 화합물은 절단가닥의 DNA 염기들 사이에 세로로 삽입되면서 활성부위 잔기나 +1 base인 G11과 수소결합을 형성하였다. 즉, 중간정도의 활성을 가진 pachymic acid와 polyporenic acid C의 경우 절단가닥의 -1/+1 염기 사이에 삽입되었으나 그 위치가 약간 비절단가닥 쪽으로 향해 있으며 수소결합은 Arg364 및 G11과 형성하였고 중요한 활성부위 잔기인 Ptr723과의 거리가 6.21 및 5.44 Å으로 좀 멀어서 DNA 재연결을 막는 효과가 크지 않은 것으로 추정된다. 반면에 가장 좋은 작용을 나타내는 dehydropachymic acid와 tumulosic acid는 절단가닥의 -1/+1 염기인 T10과 G11의 사이이면서 Ptr723과 매우 근접한 위치, 즉 4.60 및 4.03 Å 거리에 세로로 삽입되고 중요한 잔기와 수소결합을 형성함으로써 DNA의 재연결을 효과적으로 억제할 수 있는 구조를 형성하였다. Lanostane-형 triterpene acid가 모핵인 이들 화합물은 거대한 모핵이 DNA 염기와 입체장애를 일으키기 때문에 DNA 염기 사이에 평행하게 삽입되는 TPT와 달리 세로로 삽입되었다. 그러나 TOP1의 활성부위 잔기와 수소결합을 형성하면서 안정한 삼성분-복합체를 이루었으므로 높은 저해효과를 나타내는 것으로 생각된다. 또한 활성부위 잔기인 Ptr723과 가까이 위치하는 화합물일수록 저해 효과가 높게 나타남을 확인하였다. 이상의 결과로부터 반응양상과 효소활성 저해 효과 사이에 밀접한 상관관계가 있음을 발견하였고 docking 연구에서 제시되는 반응양상은 강력한 새로운 저해제를 고안할 수 있는 구조적 정보를 제공하여 TOP1을 목표로 하는 항암제 개발에 크게 기여할 수 있을 것으로 판단된다.



**Fig. 5** – Hydrogen-bond interactions of the four compounds, pachymic acid (A), polyporenic acid (B), dehydropachymic acid (C), and tumulosic acid (D). Dark grey ball and stick: Compounds, Grey stick: DNA base, Black thin line: TOP1 residues, Black dotted lines: Hydrogen bonds.

## 감사의 말씀

본 연구는 한국학술진흥재단 연구비 지원으로 이루어졌음을 감사드립니다(KRF-2003-E00003).

## 문헌

- 1) Chrencik, J. E., Staker, B. L., Burgin, A. B., Pourquier, P., Pommier, Y., Stewart, L. and Redinbo, M. R. : Mechanisms of camptothecin resistance by human topoisomerase I mutations. *J. Mol. Biol.* **339**, 773 (2004).
- 2) Staker, B. L., Hjerrild, K., Feese, M. D., Behnke, C. A., Burgin, A. B. Jr. and Stewart, L. : The mechanism of topoisomerase I poisoning by a camptothecin analog. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**, 15387 (2002).
- 3) Krogh, B. O. and Shuman, S. : Catalytic mechanism of DNA topoisomerase IB. *Mol. Cell* **5**, 1035 (2000).
- 4) Liu, L. F., Desai, S. D., Li, T. K., Mao, Y., Sun, M. and Sim, S. P. : Mechanism of action of camptothecin. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **922**, 1 (2000).
- 5) Carey, J. F., Schultz, S. J., Sisson, L., Fazzio, T. G. and Champoux, J. J. : DNA relaxation by human topoisomerase I occurs in the closed clamp conformation of the protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**, 5640 (2003).
- 6) Pommier, Y., Pourquier, P., Fan, Y. and Strumberg, D. : Mechanism of action of eukaryotic DNA topoisomerase I and drugs targeted to the enzyme. *Biochim. Biophys. Acta.* **1400**, 83 (1998).
- 7) Kerrigan, J. E. and Pilch, D. S. : A structural model for the ternary cleavable complex formed between human topoisomerase I, DNA, and camptothecin. *Biochemistry* **40**, 9792 (2001).
- 8) Laco, G. S., Du, W., Kohlhagen, G., Sayer, J. M., Jerina, D. M., Burke, T. G., Curran, D. P. and Pommier, Y. : Analysis of human topoisomerase I inhibition and interaction with the cleavage site +1 deoxyguanosine, via *in vitro* experiments and molecular modeling studies. *Bioorg. Med. Chem.* **12**, 5225 (2004).
- 9) Redinbo, M. R., Stewart, L., Kuhn, P., Champoux, J. J. and Hol, W. G. : Crystal structures of human topoisomerase I in covalent and noncovalent complexes with DNA. *Science* **279**, 1504 (1998).
- 10) Laco, G. S., Collins, J. R., Luke, B. T., Kroth, H., Sayer, J. M., Jerina, D. M. and Pommier, Y. : Human topoisomerase I inhibition: docking camptothecin and derivatives into a structure-based active site model. *Biochemistry* **41**, 1428 (2002).
- 11) Fan, Y., Weinstein, J. N., Kohn, K. W., Shi, L. M. and Pommier, Y. : Molecular modeling studies of the DNA-topoisomerase I ternary cleavable complex with camptothecin. *J. Med. Chem.* **41**, 2216 (1998).
- 12) Yamashita, Y., Fujii, N., Murakata, C., Ashizawa, T., Okabe, M. and Nakano, H. : Induction of mammalian DNA topoisomerase I mediated DNA cleavage by antitumor indolocarbazole derivatives. *Biochemistry* **31**, 12069 (1992).
- 13) Li, T. K., Bathory, E., LaVoie, E. J., Srinivasan, A. R., Olson, W. K., Sauers, R. R., Liu, L. F. and Pilch, D. S. : Human topoisomerase I poisoning by protoberberines: potential roles for both drug-DNA and drug-enzyme interactions. *Biochemistry* **39**, 7107 (2000).
- 14) Jayaraman, M., Fox, B. M., Hollingshead, M., Kohlhagen, G., Pommier, Y. and Cushman, M. : Synthesis of new dihydroindeno[1,2-c]isoquinoline and indenoisoquinolinium chloride topoisomerase I inhibitors having high *in vivo* anticancer activity in the hollow fiber animal model. *J. Med. Chem.* **45**, 242 (2002).
- 15) Capranico, G. and Binaschi, M. : DNA sequence selectivity of topoisomerases and topoisomerase poisons. *Biochim. Biophys. Acta.* **1400**, 185 (1998).
- 16) Yamashita, Y., Kawada, S., Fujii, N. and Nakano, H. : Induction of mammalian DNA topoisomerase I and II mediated DNA cleavage by saintopin, a new antitumor agent from fungus. *Biochemistry* **30**, 5838 (1991).
- 17) Li, G., Xu, M. L., Lee, C. S., Woo, M. H., Chang, H. W. and Son, J. K. : Cytotoxicity and DNA topoisomerases inhibitory activity of constituents from the sclerotium of *Poria cocos*. *Arch. Pharm. Res.* **27**, 829 (2004).
- 18) Ukiya, M., Akihisa, T., Tokuda, H., Hirano, M., Oshikubo, M., Nobukuni, Y., Kimura, Y., Tai, T., Kondo, S. and Nishino, H. : Inhibition of tumor-promoting effects by poricoic acids G and H and other lanostane-type triterpenes and cytotoxic activity of poricoic acids A and G from *Poria cocos*. *J. Nat. Prod.* **65**, 462 (2002).
- 19) Tai, T. S. T., Kikuchi, T., Tezka, Y. and Akahori, A. : Triterpenes from the surface of *Poria cocos*. *Phytochemistry* **35**, 1165-9 (1995).
- 20) Giner-Larza, E. M., Manez, S., Giner-Pons, R. M., Carmen Recio, M. and Rios, J. L. : On the anti-inflammatory and anti-phospholipase A(2) activity of extracts from lanostane-rich species. *J. Ethnopharmacol.* **73**, 61 (2000).
- 21) Yasukawa, K., Kaminaga, T., Kitanaka, S., Tai, T., Nunoura, Y., Natori, S. and Takido, M. : 3 beta-p-hydroxybenzoyldehydro-tumulosic acid from *Poria cocos*, and its anti-inflammatory effect. *Phytochemistry* **48**, 1357 (1998).
- 22) Mizushima, Y., Akihisa, T., Ukiya, M., Murakami, C., Kuriyama, I., Xu, X., Yoshida, H. and Sakaguchi, K. : A novel DNA topoisomerase inhibitor: dehydroebriconic acid, one of the



- lanostane-type triterpene acids from *Poria cocos*. *Cancer Sci.* **95**, 354 (2004).
- 23) Mizushina, Y., Tanaka, N., Kitamura, A., Tamai, K., Ikeda, M., Takemura, M., Sugawara, F., Arai, T., Matsukage, A., Yoshida, S. and Sakaguchi, K. : The inhibitory effect of novel triterpenoid compounds, fomitelic acids, on DNA polymerase beta. *Biochem. J.* **330**, 1325 (1998).
- 24) Tripos Co. Sybyl ver. 6.9.2. Manual (2004).
- 25) Staker, B. L., Feese, M. D., Cushman, M., Pommier, Y., Zembower, D., Stewart, L. and Burgin, A. B. : Structures of three classes of anticancer agents bound to the human topoisomerase I-DNA covalent complex. *J. Med. Chem.* **48**, 2336 (2005).