

# DNA 모델인 Bis(p-nitrophenyl)phosphate에 대한 2핵 Ni(II) 착 화합물의 촉매 가수분해 반응에서 물 분자와 금속 이온의 역할

성낙도\* · 윤기섭

충남대학교 형질전환복제돼지연구센터, 농업생명과학대학 응용생물화학부

## The Roles of Metal Ions and Water Molecules in the Hydrolysis of Bis(p-nitrophenyl)phosphate as a DNA Model Catalyzed by Dinuclear Ni(II) Complex

Nack-Do Sung\* and Ki-Seob Yun

Research Center for Transgenic Cloned Pigs, Division of Applied Biology and Chemistry, College of Agricultural and Life Science, Chung-Nam National University, Daejeon 305-764, Korea

Received April 15, 2005; Accepted May 24, 2005

The catalytic hydrolysis reactivities of dinuclear nickel (II) complex,  $\mu$ -aqua-pentaaqua[ $\mu$ -3,6-bis(6'-methyl-2'-pyridyl)pyridazine]chlorodinickel (II) trichloride trihydrate (APNT) for bis(p-nitrophenyl)phosphate (BNPP) as a DNA model compound were investigated. The dissociation constants of APNT were  $pK_{a1}=7.9$  and  $pK_{a2}=9.6$ , respectively. The hydrolysis rate constant of BNPP compound by APNT was showed the rate enhancement of about 370,000 times in the case of none catalyst at pH 7.0 and 50°C. Based on the findings, we proposed the catalytic cycle for the hydrolysis of BNPP by APNT complex. The metal ions of dinuclear nickel (II) complex significantly enhance the transfer rate of phosphoryl group in the catalytic process and the water molecules as nucleophile and proton transfer agent act in different steps.

**Key words:** Catalytic hydrolysis, bis(p-nitrophenyl)phosphate, dinuclear Ni (II) complex, water molecule,  $\mu$ -aqua-pentaaqua[ $\mu$ -3,6-bis(6'-methyl-2'-pyridyl)pyridazine]chlorodinickel (II) trichloride trihydrate, metal ion.

### 서 론

자연이 유전정보의 보존 및 대사과정에 이용하는 화합물로서 phosphate ester를 선택한 이유는 이들이 모든 pH 조건하에서 이온화 될 수 있는 능력과 가수분해 반응에 대한 안정성이 대단히 크기 때문이다.<sup>1)</sup> 유기반응에서 친핵 치환반응이나 제거반응 등은 할로젠 원자, tosylate 및 trimethylamine과 같은 좋은 이탈기를 필요로 하지만 생체 반응에서는 주로 phosphate나 pyrophosphate 등, 좋지않은 이탈기들을 사용하므로 이들 유기 인계 화합물들은 느린 가수분해 반응성을 보인다. 특히, DNA 모델 화합물로서 dimethylphosphate의 가수분해 반응을 근거로 한<sup>2)</sup> 실온의 pH 7.0 조건에서<sup>3)</sup> DNA의 가수분해 반감기는 대략 300억년이나 되는 것으로 추정된다.

이처럼 자연은 매우 안정한 결합으로 DNA에 유전 정보들을 간직하고 있으나 DNase들은 짧은 시간대에 phosphodiester

backbone을 분해하는 놀라운 반응성을 갖고있다. 이러한 DNA와 DNase 사이의 상호작용을 이해하고자 phosphate ester 결합을 분해하는 촉매로서 유기금속 착 화합물에 관한 연구가 시작되었다. 최근에는 인공핵산 분해효소(artificial nuclease)<sup>4)</sup>를 개발하기 위한 연구의 일환으로 전이금속 착 화합물을 이용한 연구들이 이루어지고 있으며<sup>5,6)</sup> 생체 내에서 metalloenzyme의 활성이 일반 효소들 보다 훨씬 더 크다는 연구보고 이후에 금속 이온을 함유하는 착 화합물에 대한 연구가 흥미롭게 진행되고 있다.<sup>7,8)</sup> 따라서 phosphate들을 대상으로 한, 여러 가지 금속 착 화합물과의 가수분해 반응을 위시하여<sup>9,10)</sup> DNA 및 RNA 모델 화합물의 가수분해를 촉진하는 다양한 연구들이 활발하게 이루어지고있다.<sup>11-13)</sup>

본 연구에서는 인공핵산 분해효소(artificial DNase)<sup>14)</sup>로서의 기능이 예상되는 2핵 Ni(II) 착 화합물인  $\mu$ -aqua-pentaaqua[ $\mu$ -3,6-bis(6'-methyl-2'-pyridyl)pyridazine]chlorodinickel(II) trichloridetrihydrate(APNT)<sup>15)</sup>에 의한 DNA 모델 화합물인 bis-(p-nitrophenyl)phosphate(BNPP)의 촉매 가수분해 반응성에 따른 금속이온과 물 분자들의 역할을 검토하였다.

\*Corresponding author

Phone: +82-42-821-6737; Fax: +82-42-825-3306

E-mail: ndsung@cnu.ac.kr

## 재료 및 방법

**시약 및 기기.** DNA 모델 화합물인 bis(*p*-nitrophenyl)-phosphate는 Sigma사제의 1급 시약을 그리고 glacial acetic acid, chloroform, DMF, absolute ethanol 등, 용매들은 Aldrich 및 Fluka사제를 사용하였다. 생성물의 구조 확인에 이용된 <sup>1</sup>H NMR은 CDCl<sub>3</sub> 또는 DMSO-d<sub>6</sub>를 용매로 하고 실온에서 TMS를 내부 표준 물질로 한 Varian EM-360 model(200 MHz)의 spectrometer로 측정하여 chemical shift를 δ(ppm) 값으로 표기하였다. Mass spectrum은 JEOL JMS-DX 303 model로 측정된 MS spectra로부터 구조와 친이온(M<sup>+</sup>)을 확인하였다. 화합물의 녹는점은 Holliston사의 Mel-TempII로 그리고 산 해리상수(pKa) 상수와 소수성 상수(logP) 값은 Serius사의 PCA 101 Auto-titrator를 이용하여 측정하였다.

**반응 속도상수의 측정.** 45°C와 pH 6.0~12.0 범위에서 APNT의 촉매작용에 의한 BNPP의 가수분해 반응 속도상수를 측정하였다. 1차 반응 속도상수를 결정하는 방법에는 substitution 방법, graphical 방법 및 fractional life 방법이 있는데<sup>16)</sup>본 실험에서는 가수분해 반응이 초기 농도에 의존적 일 때 유용하게 사용하는 fractional life 방법을 적용하였다. 즉, APNT의 수용액(UV: λ<sub>max</sub>=307.0 nm 및 logε=4.08) 5 mM을 소정의 무기염류(KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, NaOH 및 H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>)로 제조된 완충용액(pH 6.0~12.0)으로 이온의 세기를 μ=0.1 M로 조정된 반응용액 2.5 ml와 DNA 모델 화합물로서 phosphodiester인 BNPP의 저장용액(5 mM) 0.5 ml를 UV cell에 넣고 50°C에서 BNPP의 가수분해 생성물인 *p*-nitrophenol(λ<sub>max</sub>=400 nm)이 생성되는 BNPP의 농도 변화를 UV 분광법으로 측정하여 시간에 따른 *p*-nitrophenolate의 흡광도 변화로부터 초기농도와 최종농도(흡광도의 1/2이 되는 반감기(k=0.693/T<sub>1/2}))를 구하여 1차반응 속도상수(k<sub>sec</sub><sup>-1</sup>)를 계산하였다.</sub>

**가수분해 생성물의 분석.** 2핵 Ni(II) 착 화합물, APNT에 의한 BNPP의 가수분해 생성물을 확인하기 위하여 pH 8.0으로 조정된 반응용액에 APNT 착 화합물, 0.1 g(0.15 mM)과 BNPP(1 eq.)를 녹인 후, 72시간 동안 환류하였다. 반응 용액을 0.5 N HCl로 산성화(약 pH 4) 한 후, ethyl acetate로 추출하여 TLC로 전개(용매: ethyl acetate: *n*-hexane = 1:4)시켜 R<sub>f</sub>=0.3 인 화합물을 확인할 수 있었다. 이 화합물을 column chromatography로 분리 정제하여 <sup>1</sup>H NMR 스펙트럼(<sup>1</sup>H NMR: CDCl<sub>3</sub>/TMS, δ): 6.8~6.9(d, 2H), 8.1~8.2(d, 2H)과 mass 스펙트럼(MS: *m/z*, %): 139(100), 140.10(M+1, 20.14), 141.15(M+, 2.47)을 검토한 결과, 생성물이 *p*-nitrophenol임을 확인하였다.

**pKa 및 logP 상수의 측정.** 질소 기류하에 20°C에서 APNT(0.5 mM, 3.4 mg)를 0.15 M의 KCl 수용액(10 ml, μ=0.151)에 녹이고 0.5 M의 HCl로 pH를 3.0으로 낮춘 후에 0.5 M의 KOH로 pH 11.0까지 PCA 101 자동 적정기(Serius사)로 적정하여 pKa 상수를 측정하였다. logP 상수를 측정하기 위하여 물로 포화된 octanol 15 ml에 APNT(1.7 mg)를 녹이고 순수한 물 5 ml를 가하여 혼합하였다. 이 혼합물을 0.5 M의 HCl로 pH 3.0으로 낮춘 후, 0.5 M의 KOH로 pH 11.0까지 적정하고 앞에서 측정된 pKa 값을 적용하여 logP 값을 측정하였다. pKa

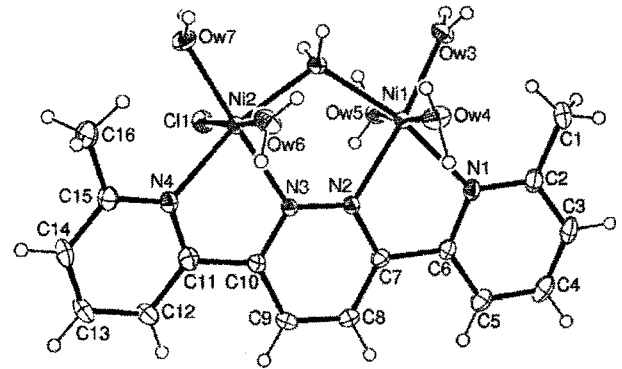
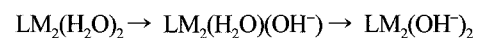


Fig. 1. X-ray crystal structure of  $\mu$ -aqua-pentaaqua[ $\mu$ -3,6-bis(6'-methyl-2'-pyridyl)-pyridazine]chlorodinickel(II) trichloride trihydrate (APNT). (ORTEP representation: Thermal ellipsoids are drawn at the 50% probability level. The three chlorine anions and three water molecules are omitted for clarity).<sup>15)</sup>

상수와 logP 상수의 측정은 각각 3회 반복하여 평균값을 자료화하였다.

## 결과 및 고찰

**2핵 Ni(II) 착 화합물과 pKa 상수.** 2핵 Ni(II) 착 화합물인  $\mu$ -aqua-pentaaqua[ $\mu$ -3,6-bis(6'-methyl-2'-pyridyl)pyridazine]chlorodinickel(II)trichloridetrihydrate<sup>15)</sup>(APNT)의 X-선 결정 구조를 Fig. 1에 나타내었다. Ni(II)1 원자는 pyridine N1 원자, pyridazine N2 원자 그리고 4개의 물 분자(OW1, OW3, OW4 및 OW5)에 의하여 팔면체로 배위되어 있으며 Ni(II)2 원자는 pyridazine N3 원자, pyridine N4 원자, 3개의 물 분자(OW1, OW6 및 OW7) 그리고 Cl1 원자에 의해서 팔면체로 각각 배위되어있다. OW1, 물 분자는 두 Ni(II) 원자(Ni(II)1...OW1...Ni(II)2)와 다리걸친 결합(bridged bond)을 하고있으며 2.3797Å의 Ni(II)2...Cl1 거리는 Ni(II)...OW와 Ni(II)...N 거리에 대해서 확인된 2.0864Å보다 0.2932Å 더 길었다. 세 개의 육각형 aromatic 고리에 있는 모든 원자들의 결합 거리는 normal sp<sup>2</sup>-혼성화 된 결합길이이었고 3개의 고리들 각각은 완벽하게 평면이었다. 3개의 고리는 0.181Å 이내에서 평면이었고 Ni(II)1, Ni(II)2 그리고 OW1 원자들은 평면으로부터 각각 0.415Å, 0.448Å 및 0.798Å 벗어나 있었다. 이러한 구조적인 특징을 가지는 APNT의 적정곡선 및 분배 곡선들로부터 측정된 APNT의 산 해리상수(pKa)는 각각 pKa<sub>1</sub>=7.9 및 pKa<sub>2</sub>=9.6이었다. 이들 pKa 상수들은 다음 식에 따라 서로 다른 물 분자중의 수소 원자가 해리함에 따른 결과로 믿어진다. 여기에서 M은 Ni(II) 그리고 L은 리간드 분자를 의미한다.



이와 같이 pKa 상수들은 두 개의 Ni(II)1-Ni(II)2 원자 사이에 다리걸친 결합의 물 분자와 한 개의 Ni(II)1 또는 Ni(II)2 각 원자에 결합된 물 분자 각각에서 수소원자 한 개씩의 이탈로 인한 결과라고 판단된다. 왜냐하면, 다리걸친 물 분자중에서 2개의 수소 원자들의 이탈에 따른 해리 상수라면 pKa 상수 차이가 매우 작아야 할 것이다. 그러나 두 pKa 상수의 차이가 크

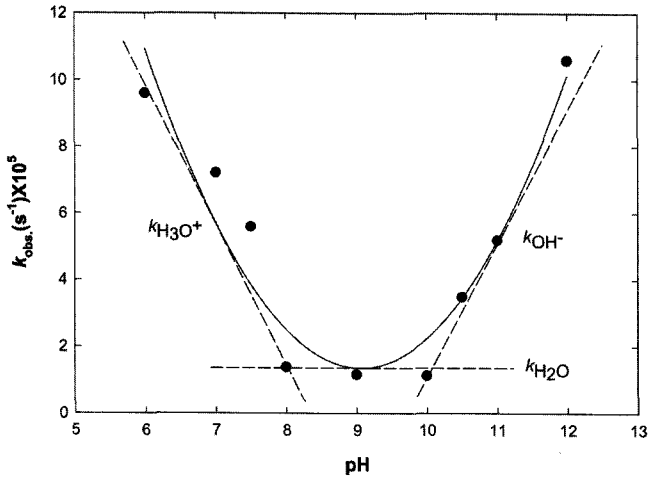


Fig. 2. pH-rate profile for APNT promoted hydrolysis of BNPP at 45°C. The points are experimental and the solid line is calculated values by the equation (4):  $pK_{a1}=7.9$  and  $pK_{a2}=9.6$ .

다( $\Delta pK_a = 1.7$ )는 사실은 서로 다른 환경의 물 분자에서 수소 원자가 이탈하기 때문이며 pH 8.0~10.0 구간에서 pH에 무관한 반응 속도상수를 나타내는 일반 염기-촉매반응이 일어난다는 사실이다. 이때 Ni(II)-CII 결합은 수용액중에서 CII 원자가 즉시 물 분자로 치환되므로 Ni(II)에 물 분자들이 결합된 환경과 같게 된다. 따라서 다리걸친 결합의 물 분자에서 2개의 수소원자 중 1개의 수소원자가 이탈하여 BNPP와 bidentate를 형성한 이후에 또 다른 1개의 수소원자가 이탈하여 다리걸친  $O^{2-}$  이온이 생성된다고 하더라도 구조상 BNPP와 결합이 불가능하다. 따라서 산 해리 상수에 기여하는 물 분자는 한 개의 Ni(II) 원자에 결합된 물 분자보다 다리걸친 물 분자의 수소원자가 두 Ni(II) 원자들에 의한 전기 양성도 크기로 인하여 더 잘 해리된다. 그러므로  $pK_{a1}$ 은 다리걸친 물 분자의 수소원자가 해리하는 산 해리상수이고  $pK_{a2}$ 는 한 개의 Ni(II) 원자에 결합된 물 분자에서 1개의 수소원자가 해리되는 것이며  $pK_{a1} > pK_{a2}$ 의 경향을 보이는 것은 공통이온 효과에 따른 현상이다. 또한, 분자의 소수성 (hydrophobicity) 척도인  $\log P$ 값은 지질과 물과의 상대적인 용해도를 의미하는 것으로 관측된 소수성 상수는  $\log P = -0.298$ 이었다.

**BNPP의 가수분해 반응.** pH 6.0-12.0에서 BNPP의 가수분해 반응성을 알아보기 위하여 Fig. 2에는 pH에 따른 1차 반응 속도 상수( $k_{\text{obs}}$ )의 변화에 대한 pH rate profile을 제시하였다. 즉, pH 8.0( $pK_{a1}=7.9$ ) 이하에서는 hydronium 이온의 농도에 의존적으로 BNPP에 대한 양성자화가 촉진될수록 반응속도가 증가하며 탈 양성자화가 일어날수록 반응속도가 감소하는 경향을 나타내는<sup>17)</sup>  $A_{AC}2$  유형의 특정 산-촉매(kH) 반응이 일어난다.<sup>18)</sup> pH 8.0~10에서는 pH에 무관하게 일정한 반응속도를 나타내는 물 분자에 의한 일반 염기-촉매( $k_{H_2O}$ ) 반응 그리고 pH 10.0 ( $pK_{a2}=9.6$ ) 이상에서는 hydroxide 이온 농도에 의존적으로 pH가 증가할수록 반응속도가 증가하는  $B_{AC}2$  유형의 특정 염기-촉매(kOH) 반응으로 진행된다. 이로부터 가수분해 반응은 3가지 유형의 반응으로 일어나므로<sup>19)</sup> 실험 사실을 합리적으로 설명할 수 있는 반응 속도식은 다음 (3)식과 같이 나타낼 수 있다.

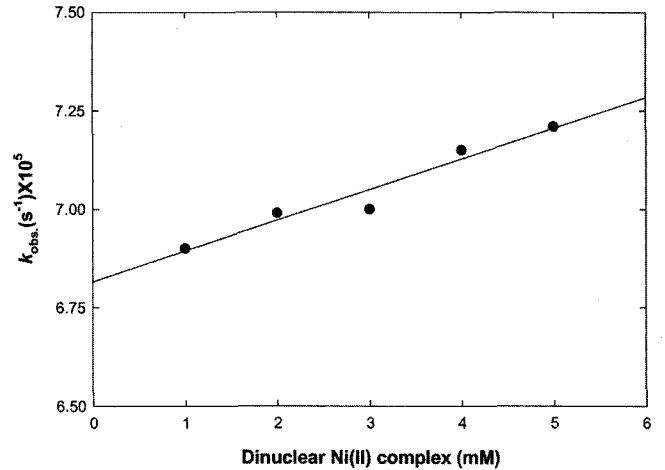


Fig. 3. Effect of increasing the concentration of APNT on the rate of organometallic complex promoted hydrolysis of BNPP (5 mM) at pH 8.0 and 45°C ( $k_2=2.70 \times 10^{-6}$  l/mole/sec).

$$\text{Rate} = -d[\text{BNPP}]/dt = kt[\text{BNP}] \quad (1)$$

$$= (k_{H_2O} + k_H[H_3O^+] + k_{OH}[OH^-])[BNPP] \quad (2)$$

$$= k_{H_2O} + k_H[H_3O^+] + k_{OH}[OH^-] \quad (3)$$

한편, APNT의 농도변화에 따르는 BNPP의 가수분해에 관한 2차 반응 속도 상수와와의 관계를 알아보기 위하여 한 예로, Fig. 3에는 pH 8.0과 45°C에서 APNT의 농도에 따른 반응 속도와와의 관계를 나타내었다. APNT의 농도(1~5 mM)가 증가할수록 반응속도가 증가하므로 반응은 APNT의 농도에 의존적이었으며 직선 관계로부터 2차 반응 속도상수,  $k_2=2.70 \times 10^{-6}$  l/mole/sec을 얻었다. 따라서 pH rate profile(Fig. 2)이 내포하고 있는 APNT와 BNPP 사이의 2차 반응 속도 상수와 APNT의  $pK_{a1}$  및  $pK_{a2}$ 값들에 대하여 잘 맞는 (4)식을 유도하였는데 이때 촉매의 농도는  $[\text{APNT}] = 5 \text{ mM}$ 이다. 여기에서  $k_2$ 는 2차 속도상수(l/mol/sec)이고  $pH_{\text{min}} = (pK_{a1} + pK_{a2})/2 = 8.75$ 에서 최소의 반응 속도 상수를 나타내며 pH 8.0~10( $pK_{a1}=7.9$  및  $pK_{a2}=9.6$ )에서는 속도상수가 pH에 의존적이지 않는 물 분자에 의한 일반 염기-촉매반응( $k_{H_2O}$ )이 일어난다. 또한, (4)식에서  $1 + ([OH^-]/pK_{a1} + pK_{a2}) = 1 + ([OH^-]/17.5)$  또는  $1 + ([OH^-]/pK_{a1} + pK_{a2}) = 1 + ([H_3O^+]/17.5)$ 의 값이 1에 수렴한다. 그러므로 (4)식중  $[OH^-]$ 항을  $[H_3O^+]$ 항으로 대체하여도 무방하다. 따라서 Fig. 2에서 점은 실험 측정 값이고 실선은 (4)식으로 계산된 값을 나타낸 것인데 두 값이 잘 일치하고 있다.

$$k_{\text{obs}} = \frac{k_2[\text{APNT}]}{1 + \frac{[OH^-]}{pK_{a1} + pK_{a2}}} \quad (4)$$

또한, APNT에 의한 BNPP의 촉매 가수분해 반응성을 가늠하기 위하여 같은 조건에서 무 촉매인 경우와 비교하였다. 온도가 10°C 증가할 때마다 반응속도가 평균 2배로 증가한다는 사실에 기초하여<sup>16)</sup> 50°C의 pH 7.0 조건에서 2핵 Ni(II) 착 화합물( $1.1 \times 10^{-4} \text{ sec}^{-1}$ )은 무촉매 경우에( $3.0 \times 10^{-10} \text{ sec}^{-1}$ )<sup>20)</sup> 비하여 약 37만배의 반응속도 증가를 보였다.

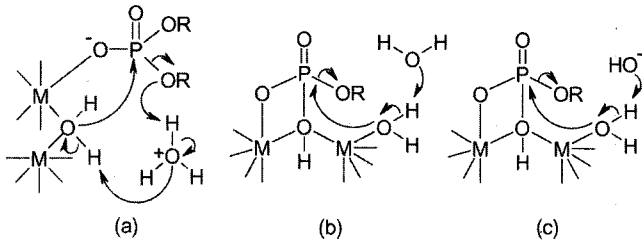
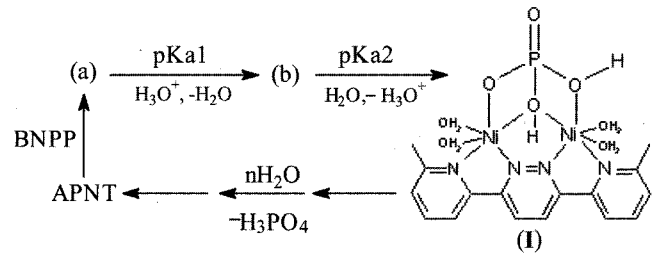


Fig. 4. Proposed interaction between BNPP and APNT molecules with catalysts. (a) specific acid ( $k_{H_3O^+}$ ), (b) general base ( $k_{H_2O}$ ) and (c) specific base ( $k_{OH^-}$ ). (OR: *p*-nitrophenoxy group & M: Ni (II)).

**물 분자와 금속이온의 역할.** 인산기 전이반응(phosphoryl transfer reaction)을 촉매하는 2핵 또는 3핵 metalloenzyme의 구조에 대한 연구는 많이 보고되었지만<sup>5,21)</sup> 문제점 중 하나는 전체적인 catalytic mechanism을 해명하거나 금속 이온의 역할을 명확하게 증명하는 것이 어렵다. 그러나 phosphoester bond의 해리과정은 dissociate path와 associative path로 중간체나 전이상태가 생성되는 과정으로 나누어 진다.<sup>22)</sup>

이 과정에서 금속이온이 phosphate ester의 가수분해 속도를 가속시키는 사실을 설명하는 5가지 활성화 유형에 근거하여<sup>3)</sup> BNPP와 APNT 분자 간 pH-rate profile(Fig. 2)을 설명하고자 본 반응의 상호작용을 Fig. 4와 같이 제안하였다. APNT에 의한 Lewis acid activation에 따른 anation으로 생성된 monodentate 및 bidentate<sup>23)</sup>에서 2핵 Ni(II) 이온과 물 분자들의 역할과 작용을 정리하였다. 즉, (a)는 pH = 8.0( $pK_{a_1} = 7.90$ ) 이하의 산성 용액에서 phosphate 중 이탈기인 OR-기가 hydronium 이온으로부터 수소 원자를 받아들인 다음에 양성자를 잃은 물 분자가 두 Ni(II) 원자와 다리걸친 물 분자 중의 수소원자를 공격하고 생성된 OH가 친핵체로 작용하여 phosphoryl group의 P원자를 공격함으로써 이탈기가 제거되어 결국 C-O 결합이 분해되는<sup>17)</sup> 특정-산(kH) 촉매반응에 의한 상호작용이 일어 날 것이다. (b)는 pH 8.0~10( $pK_{a_1} \sim pK_{a_2}$ )에서 물 분자에 의하여 다리걸친 물 분자가 수소원자 하나를 잃고 난 다음에 형성된 OH가 BNPP 중의 P원자를 공격하는 친핵체로 작용하여 P-O 결합이 분해되는 반응으로<sup>24)</sup> 이탈기가 제거되는 일반-염기(kH<sub>2</sub>O) 촉매와의 상호작용을 나타낸다. 이때 *p*-nitrophenoxide 이탈기(*p*-nitrophenol:  $pK_a = 7.20$ )는 pH 7.20 이하에서 수소 원자를 받아들여 *p*-nitrophenol로 되지만 그 이상의 pH 조건에서는 *p*-nitrophenoxide 음이온으로 존재하게 된다. 그리고 (c)는, pH 10.0( $pK_{a_2} = 9.6$ ) 이상에서 hydroxide 이온의 농도가 증가함에 따라 반응속도가 증가하는 특정-염기 촉매반응에 따른 상호작용( $k_{OH^-}$ )을 나타낸 것으로 하나의 Ni(II) 원자에 결합된 물 분자가 수소원자를 잃고 활성화 된 OH가 강한 친핵체로 작용하여<sup>13)</sup> P 원자를 공격하므로써 두 번째 이탈기가 *p*-nitrophenolate 음이온 형태로 이 탈되어 phosphodiester backbone인 P-O결합이 분해되는 일련의 상호작용을 제안하였다.

이와 같이 제한 효소들에 의한 촉매반응에서 물 분자는 각기 상이한 기능으로 각각 상이한 과정의 촉매과정 중 양성자 전달 매체(proton transfer agent)로 참여한다. 그리고 금속 이온들은 친핵체와 이탈기의 활성화를 위시하여 물 분자들을 활성



Scheme 1. Catalytic cycle for the dinuclear Ni (II) complex, APNT promoted hydrolysis of BNPP in neutral media.

화 시킬 뿐만 아니라,<sup>25)</sup> 인산기 전달 매체(phosphoryl transfer agent)<sup>13)</sup>로 작용한다. 그러므로 nucleotide의 촉매 가수분해 반응과 인식은 regulator로서 금속 이온들의 특성 뿐만 아니라, 수용체들의 특성에 의존적이라 할수 있다.<sup>22)</sup>

**촉매 가수분해 반응경로.** Phosphate ester의 가수분해 반응에서<sup>4,26)</sup> 검토된 사실에 기초(Fig. 4)하여<sup>3,14)</sup> 최소의 속도상수를 나타내는 pH 9.0( $pK_{a_1} + pK_{a_2}/2 = 8.75$ ) 이하의 중성용액 중에서 APNT의 촉매작용으로 일어나는 BNPP에 대한 촉매 가수분해 반응 경로인 catalytic cycle을 제안하여 scheme에 정리하였다.

먼저, 반응의 R 단계는 BNPP와 APNT 분자 간 anation에 의하여 monodentate가 생성되는 단계이다. 이어서 double Lewis acid activation이 일어나<sup>3)</sup> bidentate가 생성되는 단계로서<sup>13)</sup> pH 8.0 이하에서는 (a)와 같이 hydronium 이온에 의한 특정 산-촉매반응이 일어난 다음에 pH 8.0~9.0 사이에서는 (b)와 같이 물 분자가 Ni(II)원자에 결합된 물 분자를 탈 양성자 화시켜 활성화 된 OH가 친핵체로 작용하는 일반 염기-촉매반응으로 중간체(I)를 경유하는 일련의 cyclic catalysis로 인하여 turnover가 가능 할 것이다. 그러므로 APNT는 인공핵산 분해 효소<sup>14,21)</sup>로서 뿐만 아니라, 생체내에서 인산기 전달 매체<sup>13)</sup>로서의 기능을 가질 수 있을것으로 믿어진다. 따라서 이러한 연구들로부터 얻은 정보들은 생체내에서 metalloenzyme들이 어떻게 작용하는지에 대한 통찰력을 제공할 것이다.

이상과 같은 인공 핵산의 촉매작용에 의한 phosphate의 가수분해 반응에 관한 연구의 목표는 DNase와 같은 수준으로 특정 염기를 감지하여 phosphodiester backbone을 분해 할 수 있는(site directed mutagenesis) 효소를 개발하는 일이다. 그러므로 인공 핵산 분해효소는 다양한 제한효소를 위시하여 새로운 의약이나 수의약 및 농약으로 개발할 수 있다. 그리고 작물에 대한 시비에 의하여 토양에 축적되어있는 불용성 인산 화합물을 분해할 수 있을 뿐만 아니라, 유기인계 농약과 화학무기인 신경가스의 무독성화제로서 활용할 수 있는 실로 다양한 응용이 가능하다.

## 초 록

DNA 모델 화합물인 bis(*p*-nitrophenyl)phosphate(BNPP)에 대한 2핵 니켈(II) 착 화합물,  $\mu$ -aquapentaaqua[ $\mu$ -3,6-bis(6'-methyl-2'-pyridyl)pyridazine]chlorodimickel(II) trichloride trihydrate(APNT)의 촉매 가수분해 반응성을 검토하였다. APNT의 산 해리 상수는 각각  $pK_{a_1} = 7.9$  및  $pK_{a_2} = 9.6$ 이었으며 BNPP의 가수분해

반응 결과, pH 7.0과 50°C에서 무 촉매인 경우에 비하여 가수분해 속도를 약 37만 배 가량 촉진시킴을 확인하였다. 그리고 pH-rate profile로부터 실험 사실을 합리적으로 설명할 수 있는 APNT에 의한 BNPP의 촉매 가수분해 반응에 대한 일련의 catalytic cycle을 제안하였다. 따라서 반응의 각 단계에서 2핵 니켈(II) 착 화합물의 금속 이온들은 phosphoryl group의 전달 속도를 촉진하였고 물 분자는 친핵체와 양성자 전달체로 작용하였다.

**Key words:** 촉매 가수분해 반응, bis(p-nitrophenyl)phosphate, 2핵 Ni(II) 착 화합물, 물 분자,  $\mu$ -aquapentaaqua[ $\mu$ -3,6-bis(6-methyl-2'-pyridyl)pyridazine]chlorodinickel(II) trichloride trihydrate, 금속이온.

### 감사의 글

본 연구는 한국과학재단 우수연구센터(ERC) 지원 연구비(No, R11-2002-100-03005)에 의하여 이루어진 것으로 지원에 감사드립니다.

### 참고문헌

- Westheimer, F. H. (1987) Why nature chose phosphates. *Science* **235**, 1173-1178.
- Lad, C., Williams, N. H. and Wolfenden, R. (2003) The rate of hydrolysis of phosphomonoesters dianions and the exceptional catalytic proficiencies of protein and inositol phosphates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 5607-5610.
- Williams, N. H., Bryan, T., Mark, W. and Chin, J. (1999) Structure and nuclease activity of simple dinuclear metal complexes: Quantitative dissection of the role of metal ions. *Acc. Chem. Res.* **32**, 485-493.
- Cowan, J. A. (2001) Chemical nucleases. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **5**, 634-642.
- Liu, C., Wang, M., Zhang, T. and Sun, H. (2004) DNA hydrolysis promoted by di- and multi-nuclear metal complexes. *Coordin. Chem. Rev.* **248**, 147-168.
- Sung, N. D., Seo, J. S., Rosemary, C. H. and Chin, J. (1996) Structure and reactivity of a dinuclear cobalt (III) complex with a bridging phosphate monoester. *Inorg. Chem.* **35**, 7472-7473.
- Sung, N. D., Seo, J. S., Rosemary, C. H., Williams, D. and Chin, J. (1998) Structure and reactivity of a dinuclear cobalt (III) complex with peroxide and phosphate diester analogues bridging the metal ions. *J. Am. Chem. Soc.* **120**, 9943-9944.
- Chin, J. and Banaszczuk, M. (1989) Rate-determining complexation in catalytic hydrolysis of unactivated esters in neutral water. *J. Am. Chem. Soc.* **111**, 2724-2726.
- Domingos, J. B., Longhinotti, E., Bunton, C. A. and Nome, F. (2003) Reaction of Bis(2,4-dinitrophenyl)phosphate with hydroxylamine. *J. Org. Chem.* **68**, 7051-7058.
- Hendry, P. and Sargeson, A. M. (1989) Metal ion promoted phosphate ester hydrolysis. Intramolecular attack of coordinated hydroxide ion. *J. Am. Chem. Soc.* **111**, 2521-2527.
- Frey, S. T., Hutchins, B. M., Anderson, B. J., Schreiber, T. K. and Hagerman, M. E. (2003) Catalytic hydrolysis of 4-nitrophenylphosphate by lanthanum (III)-hectorite. *Langmuir* **19**, 2188-2192.
- Gao, J., Martell, A. E. and Reibenspies, J. (2002) Novel Cu (II) Cd (II) macrocyclic complex that hydrolyzes an activated phosphate diester. *Inorg. Chim. Acta* **329**, 122-128.
- Williams, N. H. (2004) Models for biological phosphoryl transfer. *Biochem. Biophys. Acta* 279-287.
- Chin, J. (1997) Artificial dinuclear phosphoesterases. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1**, 514-521.
- Sung, N. D., Yun, K. S., Kim, J. G. and Suh, I. W. (2000)  $\mu$ -aquapentaaqua[ $\mu$ -3,6-bis(6'-methyl-2'-pyridyl)pyridazine]chlorodinickel (II) trichloridetrihydrate. *Acta Cryst.* **C56**, e370-e371.
- Avery, H. E. (1981) In *Basic reaction kinetics and mechanisms* (1st ed.). The Macmillan Press. Ltd. London. pp. 12-47.
- Wolfenden, R., Ridgway, C. and Young, G. (1998) Spontaneous hydrolysis of ionized phosphate monoesters and diesters and the proficiencies of phosphates and phosphodiesterase as catalysts. *J. Am. Chem. Soc.* **120**, 833-834.
- Issacs, N. S. (1987) In *Physical Organic Chemistry*. Longman. Scientific & Technical, pp. 331-358.
- Sung, N. D. (2002) Kinetics and hydrolysis mechanism of insecticide O,O-diethyl-O-(1-phenyl-3-trifluoromethylpyrazol-5-yl)phosphorothioate (Flupyrzofos). *Kor. J. Pesti. Sci.* **6**, 218-223.
- Yun, K. S. (2001) Dinuclear Ni (II) complex promoted hydrolysis of Bis(p-nitrophenyl)phosphate as DNA model. M.S. Thesis. Chungnam National University, Daejeon, Korea.
- Wilcox, D. E. (1996) Binuclear metallohydrolases. *Chem. Rev.* **96**, 2435-2458.
- Franzini, E., Fantucci, P. and Gioia, L. D. (2003) Density functional theory investigation of guanosine triphosphate models catalytic role Mg<sup>2+</sup> ions in phosphate ester hydrolysis. *J. Mol. Catal. A: Chem.* 409-417.
- Humphry, T., Forconi, M., Williams, N. H. and Hengge, A. C. (2004) Altered mechanism of reactions of phosphate esters bridging a dinuclear metal center. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 11864-11869.
- Williams, N. H., Lebus, A. M. and Chin, J. (1999) A structural and functional of dinuclear metallophosphatases. *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 3341-3348.
- Sung, N. D. (1994) The transition state analog for metal catalyzed hydrolysis of an ester. *Agri. Chem. Biotechnol.* **37**, 447-450.
- Sung, N. D. (1998) Hydrolysis of phosphate diesters as nucleic acid model. *Agri. Chem. Biotechnol.* **41**, 611-612.