

## 포스포리파제 D 촉매반응에서 포스파티딜 전달반응 활성화에 미치는 알코올의 영향

고 은 희

덕성여자대학교 화학과

(접수 2010. 1. 18; 수정 2010. 2. 9; 게재확정 2010. 2. 11)

### Effect of Alcohols Toward the Transphosphatidylation Activity in Phospholipase D Catalyzed Reaction

Eun-Hie Koh

Department of Chemistry, Duksung Woman's University, Seoul 132-714, Korea. E-mail: ehkoh@duksung.ac.kr

(Received January 18, 2010; Revised February 9, 2010; Accepted February 11, 2010)

**요약.** 포스포리파제 D(PLD)는 알코올 존재 하에서 포스파티딜 전달반응이 일어나며 동시에 PLD의 전체 반응속도도 증가하는 것으로 알려져 있다. 이 포스파티딜 전달반응을 자세히 구명하기 위해 본 실험에서는 양배추에서 정제한  $\alpha$ -type PLD를 가지고 여러 종류의 알코올 존재 하에서 포스파티딜 전달반응의 반응속도를 검토하였다. 실험 결과 검토한 1차 알코올들에 의해 PLD의 포스파티딜 전달반응 속도는 기대했던 대로 크게 증가하였다. 부탄올의 경우 2차 반응속도는  $33.33 \pm 1.33 \text{ M}^{-1}\text{sec}^{-1}$ 로 얻어졌으며, 이 전달반응 속도를 물의 농도를 고려한 가수분해 속도( $0.078 \text{ M}^{-1}\text{sec}^{-1}$ )와 비교하면 무려 400배 이상의 격차를 보여주었다. 알코올의  $\text{pK}_a$ 와 포스파티딜 전달반응 속도와의 자유에너지 선형 관계로부터 브뢴스테드  $\beta_{\text{nu}}$  값  $0.12 \pm 0.03$ 을 얻었다. 비교적 적은  $\beta_{\text{nu}}$  값으로 미루어보아 끊어지는 포스파티딜-효소 중간체(E-P)의 전이상태는 상당히 해리된 상태일 것으로 추정된다. 이들 결과와 양배추 PLD의 활성화부위의 히스티딘 잔기를 참작하여 양배추 PLD의 반응메커니즘을 제안하였다.

**주제어:** 포스포리파제 D, 포스파티딜 전달반응, 알코올 영향, 브뢴스테드  $\beta$  값

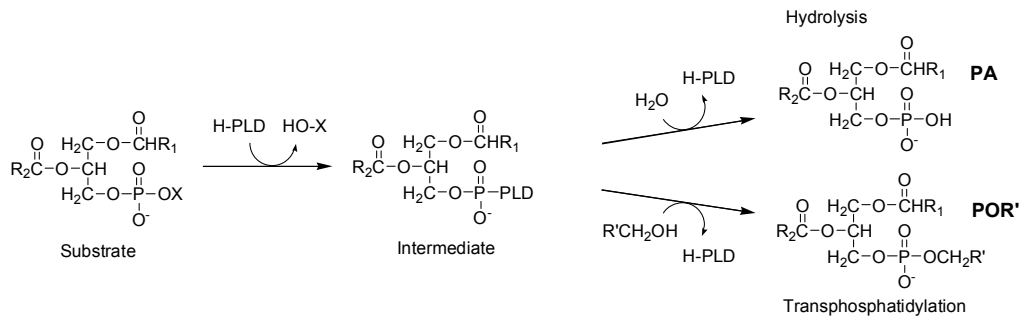
**ABSTRACT.** In the presence of alcohol, phospholipase D (PLD) is known to perform transphosphatidylation activity, during which the overall reaction rate of PLD increased. To elucidate the reaction mechanism of transphosphatidylation further, we investigated rate constants of transphosphatidylation reaction of the purified  $\alpha$ -type PLD from cabbage in the presence of various alcohols. The second-order rate constants of PLD transphosphatidylation showed a large increase with the primary alcohols examined as expected. In the case of butanol we observed the second-order rate constant of  $33.33 \pm 1.33 \text{ M}^{-1}\text{sec}^{-1}$ . This second-order rate constant of transphosphatidylation was as 400 times greater as the second-order hydrolysis rate constant of  $0.078 \text{ M}^{-1}\text{sec}^{-1}$  which was adjusted for the water concentration. A linear free energy relationship between the  $\text{pK}_a$  of alcohol and transphosphatidylation rate gives a Brønsted slope of  $\beta_{\text{nu}} = 0.12 \pm 0.03$ . This small  $\beta_{\text{nu}}$  value implicates that the transition state of break down of phosphatidyl-enzyme intermediate (E-P) is likely dissociative. Finally, a reaction mechanism of cabbage PLD is suggested on the basis of our results presented here and the histidine residue known to be located in the active site of cabbage PLD.

**Keywords:** Phospholipase D, Transphosphatidylation, Effect of alcohol, Brønsted  $\beta$  value

### 서론

포스포리파제 D (Phospholipase D(PLD); EC 3.1.4.4)는 처음 홍당무에서 포스파티딜콜린 (phosphatidylcholine (PC))을 가수분해 시키는 lecithinase로 알려졌으나 그 후 여러 동식물들에 광범위하게 분포되어있는 효소로 밝혀졌다.<sup>1</sup> PLD의 효소활성은 단순한 세포막 인지질의 분해효소가 아니라 세포의 기능조절에 관여하는 것으로 인식되고 있어, 다른 세포막 포스포리파제들과 같이 신호전달 관련

효소로서의 그 중요성이 크게 부각되고 있다.<sup>2,3</sup> PLD는 phosphodiester 결합의 끝부분에 작용하여 글리세롤 인지질을 포스파티드산(phosphatidic acid (PA))과 OH기를 갖는 머리그룹으로 가수분해하거나, 또는 알코올 존재 하에서 포스파티딜 기(phosphatidyl group)를 각종 알코올에 옮겨주어 다른 형태의 인지질(POR')을 생성하는 포스파티딜 전달반응(transphosphatidylation)을 촉매한다(Scheme 1). 식물에서의 PLD 역할은 신호전달 과정은 물론 외부 스트레스에 민감하게 관여하는 것으로 널리 인식되어져 있



**Scheme 1.** Reactions catalyzed by PLD.

다.<sup>4</sup> 예를 들면 식물성장, 활성산소들(ROS)에 의한 손상, 노화현상 등에 관여하는 것으로 보고되어 있다.<sup>5</sup> 그리고 식물 PLD의 cDNA 복제와 발현은 castor bean<sup>6</sup>을 필두로 하여 양배추,<sup>7</sup> 아기장대,<sup>8</sup> 딸기<sup>9</sup> 등에서 이루어져 PLD의 유전자 연구의 토대를 마련해 주고 있다. 모든 PLD 초과(superfamily)에 속하는 효소들은 한 개 또는 두 개의 보존 유전자 HXKXXXXD를 가지고 있으며, 이 HKD 주제(motif)는 촉매반응에 핵심 역할을 하는 것으로 알려져 있다.<sup>10</sup> 식물 PLD는 이러한 중요성과 많은 연구에도 불구하고 그 구조와 활성조절 메커니즘에 대한 이해는 아직도 미흡한 측면이 많다.<sup>11,12</sup> 그러나 박테리아에서 얻어진 PLD 초과에 속하는 endonuclease(Nuc)나 *Streptomyces*에서 분리한 PLD는 그 3차원 구조가 밝혀져 있고 또한 반응메커니즘도 제시되어 있다.<sup>13</sup>

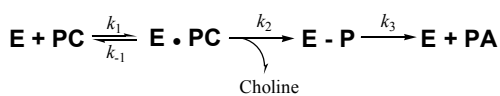
PLD 촉매반응 메커니즘의 윤곽은 초기 양배추 PLD에 의한 가수분해 실험에서 기질인 인지질의 인(P)의 원자배열이 유보 된다는 것이 드러났으며, 이에 따라 포스파티딜-효소 중간체의 형성을 통한 '핑퐁' 형태의 반응일 것으로 추정되었다.<sup>14</sup> 첫 단계는 효소 활성부위의 친핵성 잔기에 의한 인지질 인 원자에 대한 공격으로 머리그룹이 떨어져 나가면서 그 잔기와 공유결합으로 연결된 포스파티딜-효소 중간체(E-P)가 형성되고, 다음 단계는 이 중간체가 물 분자에 의해 가수분해 된다는 것이다(Scheme 2).

최근에 밝혀진 PLD들의 유전자 서열과 구조 등으로 미루어 보아, 촉매반응에서 두 개의 HKD 주제에 있는 하나의 히스티딘 잔기는 친핵성으로 작용하여 인을 공격하고 다른 히스티딘 잔기는 일반 산(general acid)으로 작용하여 떨어져 나가는 머리그룹에 수소를 제공하여 중간체 형성을 촉진하는 것으로 알려졌다.<sup>13</sup> 이 중간체는 일반 염기로

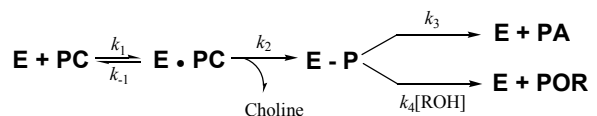
작용하는 히스티딘에 의해 활성화된 물 또는 알코올에 의해 공격당하여 최종의 생성물인 PA나 새로운 알코올 머리를 갖는 인지질이 얻어지는 것으로 추정하고 있다.

알코올 존재 하에서 일어나는 포스파티딜 전달반응은 PLD 촉매반응의 특유한 반응으로 물 분자 대신 알코올이 포스파티딜-효소 중간체에 친핵성으로 작용하여 가수분해 생성물인 PA 대신 알코올 머리가 들어간 새로운 인지질을 생성한다. 이에 따라 이 포스파티딜 전달반응은 PLD 활성측정에 널리 이용되고 있고,<sup>15</sup> 또한 새로운 인지질 합성에도 활용되고 있다.<sup>16</sup> 생리적 측면에서도 알코올 섭취와 혈액속의 포스파티딜에타놀 농도가 비례한다는 보고가 있다.<sup>17</sup> 알코올 존재 하에서의 포스파티딜 전달반응은 단순한 가수분해 반응의 유사1차 반응(pseudo-first order reaction)과는 달리 반응용기에 넣어준 알코올 양에 비례하고 있어 새로운 친핵성 물질의 존재로 반응속도가 증가하는 것으로 관찰된다. 즉 전체 반응속도는  $k_3$ 와  $k_4[\text{ROH}]$ 를 합한 것이 된다(Scheme 3). 이런 포스파티딜 전달반응의 중요성에도 불구하고 포스파티딜 전달반응에 대한 반응속도 연구는 아직까지 별 진전이 없었다.

본 실험에서는 양배추에서 정제한  $\alpha$ -type PLD(PLD $\alpha$ )를 가지고 포스파티딜 전달반응속도를 여러 종류의 알코올 존재 하에서 검토하였다. 특히 포스파티딜-효소 중간체가 어떤 전이상태(transition state)를 거쳐 끊어지는지를 추정하기 위해 포스파티딜 전달반응속도( $k_4$ )와 공격하는 알코올의 염기성( $\text{pK}_a$ ) 변화와의 자유에너지 선형 관계(linear free energy relationship)를 관찰하였다. 본 실험결과 검토한 1차 알코올에 의해서 포스파티딜 전달반응은 기대했던 대로 그 반응속도가 증가해 포스파티딜-효소 중간체(E-P)의 해체가 PLD 촉매의 속도제한 단계(rate-limiting step)임



**Scheme 2**



**Scheme 3**

을 확인할 수 있었다. 알코올의  $pK_a$ 과 전달반응속도와와의 상관관계로부터 얻어진 브윈스테드  $\beta_{nu}$  값이 비교적 적은 것으로 미루어보아 끊어지는 포스파티딜-효소 중간체의 전이상태는 나가는 그룹이 상당히 해리된 상태일 것으로 추정되었다. 본 반응속도 결과와 양배추 PLD의 활성부위를 참작하여 양배추 PLD의 반응메커니즘을 제안하였다.

## 재료 및 방법

### 재료

계란 phosphatidylcholine (PC), sodium dodecylsulfate (SDS), 및 1,4-piperazinediethanesulfonic acid (PIPES)는 Sigma 회사(St. Louis, MO, U.S.A.)로부터 구입하였고, ethyl alcohol, 1-propanol, 1-butanol, allyl alcohol, propargyl alcohol과 tri-fluoroethanol은 Aldrich (St. Louis, MO, U.S.A.)에서 구입하였다. t-Butyl alcohol과 TLC 판(Kieselgel 60 F254)은 Merck (Damstadt, Germany) 제품이며, octyl sepharose CL-4B와 MonoQ ion exchange는 Pharmacia Biotech (Uppsala, Sweden) 제품을 사용하였다.  $[9,10-^3H]$ Palmitate (5 mCi/mL)는 Dupont NEN (Wilmington, DEL, U.S.A.)에서 구입하였고, 이를 사용하여  $[^3H]$ palmitoyl PC를 Murakami 등의 방법에 따라 LPC로부터 합성하였다.<sup>18</sup> 액체섬광계기(liquid scintillation counter)는 Wallac 1409 (LKB, Mt. Waverley, Australia)를 사용하였다. 순수하지 못한 계란 PC는 산화알루미늄 대롱 크로마토그래피로 정제하였다. 그 외의 모든 시약들은 상업적으로 구매할 수 있는 시약 등급을 사용하였다.

### 양배추 포스파리파제 D정제

양배추는 야채시장에서 구입한 신선한 사보이(savoy) 품종을 사용하였다. 양배추 PLD는 Lee와 Choi 방법에 따라 정제하였다.<sup>19</sup> 양배추의 아세톤 가루는 양배추 속의 노란 흰 잎 주스를 55 °C로 열처리한 후 냉동 건조시켜 만들었다. 이 아세톤 가루를 Lambrecht and Ulbrich-Hoffman 방법에<sup>20</sup> 따라 50 mM  $CaCl_2$ 를 포함하는 20 mM PIPES buffer (pH 6.2)로 평형시킨 octylsepharose CL-4B column에 넣고  $Ca^{+2}$ 의 농도를 변화시키면서 용출시켰다. 이렇게 얻은 부분 정제된 PLD를 다시 20 mM MES buffer (pH 5.0)로 평형시킨 monoQ ion exchange column에 넣고 NaCl 농도를 2 M 까지 변화시키면서 용출시켰다. 이 정제된 PLD는 SDS-PAGE 상에서 89 kDa의 단일 띠로 나타났다.

### 포스포리파제 D의 Steady-State Kinetics

PLD 활동도 측정은 기질로 방사성 동위원소를 포함한 달걀 PC를 사용하였고, 이 PC는 SDS와 섞어서 micelle 상태로 하여 활동도를 측정하였다. 반응 혼합액 50  $\mu$ L에는 50 mM MES 완충용액(pH 6.3), 4 mM PC, 0.1 mCi  $[^3H]$ palmitoyl

PC, 1  $\mu$ g PLD, 20 mM  $CaCl_2$ , 2 mM SDS 넣었다. 포스파티딜 전달반응을 측정하기 위해선 적절한 양의 알코올을 반응 혼합액에 미리 넣어주었다. 반응은 효소 첨가로부터 시작하였으며, 37 °C에서 15분간 반응시켰다. 반응은 250  $\mu$ L chloroform/methanol/1 N HCl (100 : 50 : 3, v/v/v)를 넣어 종결시켰으며, 150  $\mu$ L 0.1 M KCl를 첨가한 후 3,000 g에서 3분간 원심 분리하여 유기층을 얻었다. 이 유기층을 말려 얻은 지질들은 50  $\mu$ L chloroform에 녹인 후 표준 지질과 함께 TLC판에 전개하여 분리하였다. 전개용매 조성은 ethylacetate/isooctane/acetic acid/water (13 : 2 : 3 : 10, v/v/v/v)였다. 요오드 증기로 전개된 인지질을 식별하였고, 새로 생성된 인지질과 PA는 따로 긁어내어 액체섬광계기(liquid scintillation counter, Wallac 1409)로 그 방사능을 측정하였다. 모든 측정들은 이중으로 하였으며 측정값 사이의 편차가 가능한 5% 내외가 되도록 측정을 반복하였다. 각 측정치의 결과로 평균값을 취하였으며 알코올 농도에 따른 2차 반응속도 등은 선형최소제곱 방법으로 처리하여 그 표준 편차를 얻었다.

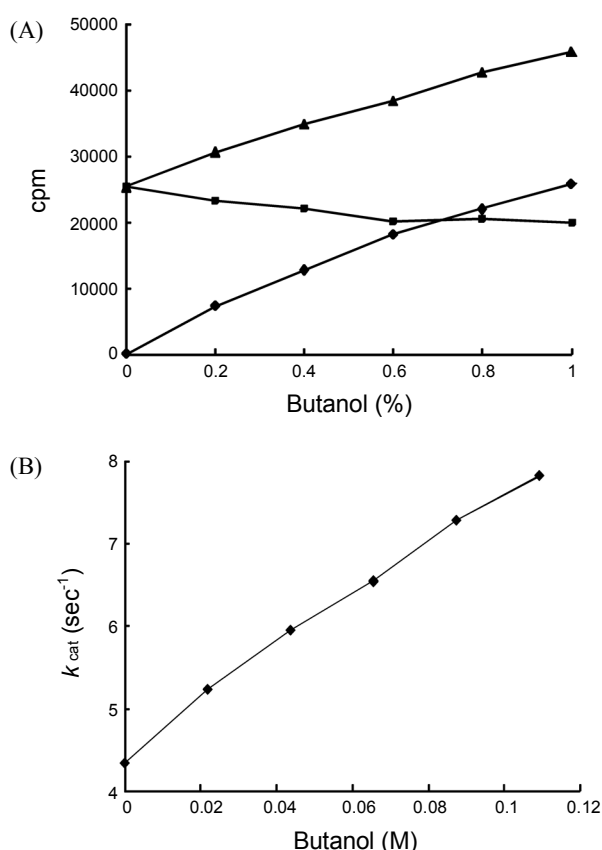
### 단백질 정량

PLD시료의 단백질 함량은 Bradford 방법<sup>21</sup>으로 수행하였다.

## 결과 및 고찰

### PLD $k_{cat}$ 에 미치는 알코올의 영향

PLD는 인지질을 가수분해 시키는 효소이나 알코올 존재 하에서는 포스파티딜 전달반응이 일어나 물대신 알코올이 들어간 포스파티딜 알코올의 생성을 촉진한다. 즉 알코올 존재 하에서는 포스파티딜-효소 중간체(E-P)가 물에 의한 가수분해 생성물과 알코올에 의한 포스파티딜 알코올의 생성으로 분할되는 것으로 판단된다(Scheme 3). 본 실험에서는 특히 이 전달반응을 체계적으로 연구하기 위해 여러 형태의 알코올을 PC/SDS 혼합 미셀 계(mixed micelle system)에서 검토했다. Fig. 1에 부탄올(butanol)의 결과를 도시하였다. 양배추 PLD의 활성측정은 가수분해 생성물인 PA와 포스파티딜 전달반응의 생성물인 포스파티딜 부탄올(PBut)을 각각 TLC로 분리하여 그 방사능을 측정하였다(Fig. 1A). 부탄올 농도에 따라 그 생성물인 PBut가 증가하는 것으로 나타났으나 PA의 생성은 점차 줄어드는 것으로 밝혀졌다. 부탄올의 농도가 0.8% 정도가 되면 PBut의 양이 PA의 양을 능가하는 분할을 보여주었다. 그러나 두 생성물을 합한 전체 효소 활성은 계속 증가하는 것으로 나타나 결국 부탄올이 PLD를 활성화시키는 것으로 여겨진다. Scheme 3를 근거로 알코올 존재 하에서의 기질 PC에 대한 전체 반응속도(overall reaction rate)  $k_{cat}$ 은 equation 1



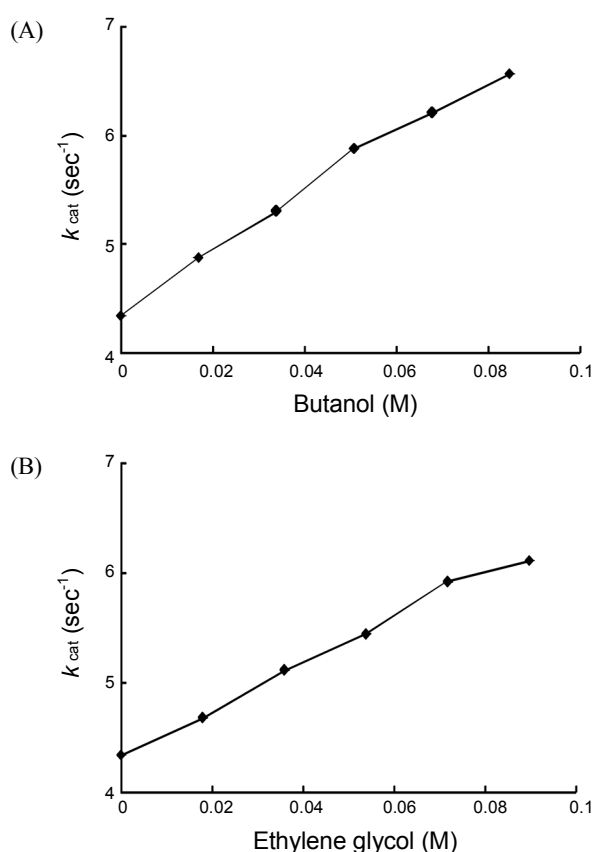
**Fig. 1.** Reaction of cabbage PLD with PC-SDS micelle system in the presence of butanol. (A) Effect of butanol on the products of PC catalyzed by cabbage PLD at 37 °C and pH 6.3. PA(■), PBut(◆), Total(▲); (B) Effect of butanol on the cabbage PLD  $k_{cat}$  at 37 °C and pH 6.3.

로 나타낼 수 있다. 그리고 중간체(E-P)의 분해가 반응속도 결정 단계로 간주되기 때문에( $k_2 \gg k_3 + k_4[ROH]$ ) equation 1은 equation 2로 줄일 수 있다. 즉  $k_{cat}$ 은  $k_3$ 와  $k_4[ROH]$ 의 합으로 나타나며, 이로부터 알코올에 대한 2차 반응속도  $k_4$ 를 얻을 수 있다.

$$k_{cat} = \frac{k_2(k_3 + k_4[ROH])}{k_2 + k_3 + k_4[ROH]} \quad (1)$$

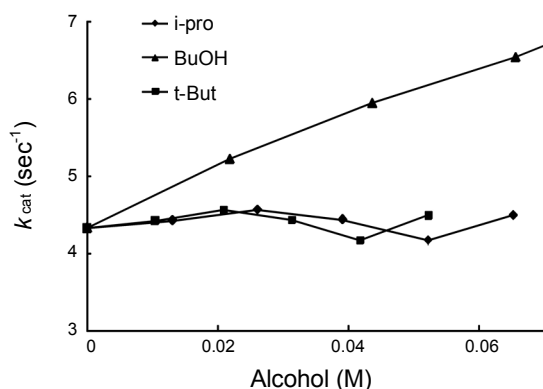
$$k_{cat} = k_3 + k_4[ROH] \quad (2)$$

Equation 2에 의해 부탄올 농도에 대한  $k_{cat}$ 의 변화를 Fig. 1B에 도시하였다. 이 그래프에서 Y축과의 절편에서 가수분해 속도( $k_3$ )가 얻어지고, 기울기에서는 부탄올에 대한 2차 반응속도( $k_4$ )를 얻을 수 있다. 부탄올 존재 하에서의  $k_3$ 는  $4.33 \pm 0.13 \text{ sec}^{-1}$ 이고,  $k_4$ 는  $33.33 \pm 1.33 \text{ M}^{-1}\text{sec}^{-1}$ 으로 얻어졌다. Fig. 2에는 에탄올과 에틸렌 그리콜 존재 하에서의 PLD 촉매반응을 실었다. 이들 알코올들도 여기서 검토한

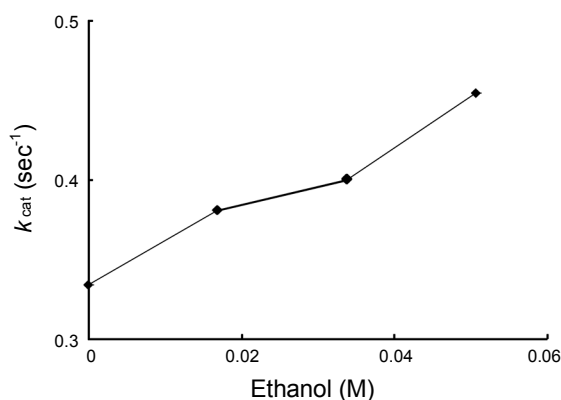


**Fig. 2.** Effect of alcohols on the cabbage PLD  $k_{cat}$  at 37 °C and pH 6.3. (A) Effect of ethanol; (B) Effect of ethyleneglycol.

0.1 몰까지는 알코올 농도의 변화와  $k_{cat}$ 과의 상관관계가 직선 관계를 보여주고 있으며,  $k_4$  값은 각각  $24.53 \pm 0.74 \text{ M}^{-1}\text{sec}^{-1}$ 와  $18.61 \pm 0.93 \text{ M}^{-1}\text{sec}^{-1}$ 으로 계산되었다. 알코올의 종류에 따라  $k_4$  값은 차이가 났으나  $k_3$  값은 당연히  $4.33 \pm 0.13 \text{ sec}^{-1}$ 으로 같은 결과가 얻어졌다. 가수분해 속도를 포스파티딜 전달반응의 2차 속도상수인  $k_4$ 와 비교하기 위해서 가수분해 속도 상수인  $k_3 (=k_3[H_2O])$ 를 물의 농도를 고려하여 55.5 M로 나누어 주면 가수분해 반응의 2차 반응속도인  $k_3$ 는  $0.078 \text{ M}^{-1}\text{sec}^{-1}$ 로 추정된다. 부탄올의 경우  $k_4$  값은 이  $k_3$  값과는 무려 400배 이상의 격차를 보여준다. 에틸렌 그리콜인 경우에도 그 차이가 200배를 훨씬 상회한다. 즉 알코올이 더 좋은 친핵성 물질인 것으로 나타났다. 그러나 물과 알코올의 반응성 차이를 단순히 친핵성 차이로 보기에는 무리가 있다. 왜냐하면 물의  $pK_a(15.7)$ 와 알코올의  $pK_a(\sim 16)$ 와는 크게 틀리지 않기 때문이다. 아마도 이 차이는 포스파티딜-효소 중간체(E-P)에 대한 물과 알코올의 접근성 차이에서 기인하지 않을까하는 추정을 낳게 한다. 즉 알코올의 격앙된 반응성은 효소의 활성부위와 알코올의 알킬 그룹과의 소수성 상호작용(hydrophobic interaction) 같은 추가결합의 가능성으로 설명할 수 있다. 이런



**Fig. 3.** Effect of primary, secondary, and tertiary alcohols on the cabbage PLD  $k_{cat}$  at 37 °C and pH 6.3.



**Fig. 4.** Effect of ethanol on cabbage PLD  $k_{cat}$  obtained in PC LUV system at 37 °C and pH 6.3.

소수성 상호작용의 존재는 알킬 그룹이 긴 부탄올의  $k_4$  값이 에탄올 보다 1.35배 정도 크다는 결과와 더불어 알코올 농도를 높이면 전체 반응속도( $k_{cat}$ )와의 직선관계가 깨지며 결국 포화된다는 관찰(결과는 제시하지 않았음)을 들 수 있다. 그러나 결가지를 가지고 있는 2차 알코올인 isopropyl alcohol이나 3차인 t-butyl alcohol은 그에 해당하는 포스파티딜알코올을 생성하지 못하는 것으로 나타났다(Fig. 3). 즉 결가지 때문에 부피가 너무 커진 알코올들은 오히려 포스파티딜-효소 중간체(E-P)를 공격할 수가 없어 포스파티딜 전달반응이 일어나지 못한다고 추정할 수 있다. 그 외 PLD 활성화 측정에 사용한 SDS의 영향 여부를 배제하기 위해 SDS 없이 기질인 PC를 그대로 LUV (large unilamellar vesicle) 형태로 만들어 에탄올의 영향을 검토하였다(Fig. 4). 이 PC LUV 계에서는 가수분해 속도가 PC/SDS 혼합 미셀 계 보다 12배 이상 줄어들었으나 상대적인 포스파티딜 전달반응 속도(직선의 기울기)는 그대로 유지되었다. 즉 알코올에 의한 포스파티딜-효소 중간체(E-P)의 분할( $k_4/k_3$  비율)에는 큰 차이가 없었다. 따라서 PLD의 포스파티딜 전

**Table 1.** Second-order rate constants for the reaction of alcohols with E-P intermediate at 37 °C and pH 6.3

$\beta$ -substituted ethanol	$pK_a$	$k_4$ ( $M^{-1}sec^{-1}$ )
Trifluoroethanol	12.37	$12.04 \pm 0.72$
Propargyl alcohol	13.55	$11.36 \pm 0.68$
Ethylene glycol	14.22	$18.61 \pm 0.93$
Allyl alcohol	15.52	$16.60 \pm 0.83$
Ethanol	15.9	$24.53 \pm 0.74$
Propanol	16.1	$32.75 \pm 1.15$
Butanol	16.3	$33.33 \pm 1.33$

달반응은 어떠한 활성화도 측정법을 사용하더라도 보존됨을 확인할 수 있었다.

### 중간체 E-P에 대한 알코올의 2차 반응속도

알코올의 존재로 전체 반응속도  $k_{cat}$ 이 증가되고 동시에 가수분해 생성물이 감소된다는 결과는 알코올의 친핵성 공격으로 포스파티딜-효소 중간체(E-P) 해체가 가속화된을 암시한다. 따라서 여러 종류의  $\beta$  치환 에탄올들을 이용해 중간체(E-P)의 해체와 포스파티딜 전달반응과의 상관관계를 검토하였다. Table 1에는  $\beta$  치환 에탄올들의 2차 반응속도  $k_4$ 를 종합해 놓았다. 검토한 알코올 중 부탄올이 가장 큰 포스파티딜 전달반응 속도( $33.33 \pm 1.33 M^{-1}sec^{-1}$ )를 보여주었으며, 트리플소에탄올과 프로파질 알코올은 비교적 작은 속도( $\sim 12 M^{-1}sec^{-1}$ )를 나타냈다. 검토한 알코올들 간의 반응속도 차이는 알코올 사이의 구조적 차이에도 불구하고 그들의  $pK_a$ 와 연계시키면  $pK_a$ 가 커지면 그에 따라 반응속도도 증가함을 짐작할 수 있다. 물론 위향에서 언급했듯이  $pK_a$ 가 가장 적은 트리플소에탄올의 경우도 포스파티딜 전달반응의 속도가 가수분해 반응속도 보다 150배 이상 상회한다. 알코올들에 의한 이러한 포스파티딜 전달반응속도의 압도적 증가와 알코올의  $pK_a$ 와  $k_4$ 와의 연관성은 포스파티딜-효소 중간체(E-P)의 해체 과정을 탐구하는데 알코올이 좋은 도구가 될 수 있음을 시사해주고 있다.

### 알코올 염기성에 대한 Brønsted Plot

자유에너지 선형 관계는 구조와 반응성 상관관계 연구에 주요한 방편을 제공해 주는 것으로 알려져 있다. 양배추 PLD 촉매반응에서 2차 반응속도  $\log k_4$ 에 대한 알코올  $pK_a$ 와의 관계를 Fig. 5에 도시하였다. 이 Brønsted Plot의 기울기로 부터 알코올의 친핵성 반응성이 E-P 중간체에 얼마만큼의 영향을 주는지를 가늠할 수가 있다. 기울기  $\beta_{nu}$ 는  $0.12 \pm 0.03$ 로 추정되었다. 이런 낮은 기울기는 공격하는 알코올들의 염기성 차이는 중간체(E-P)의 해체에 커다란 영향력은 미치지 못하고 있음을 암시한다. 그러나 Brønsted 상관관계가 전이상태의 구조를 추측할 수 있는 강력한 척도가 되고 있어<sup>22</sup>  $\beta_{nu}$  값은 알코올의 공격에 의한 E-P 중간

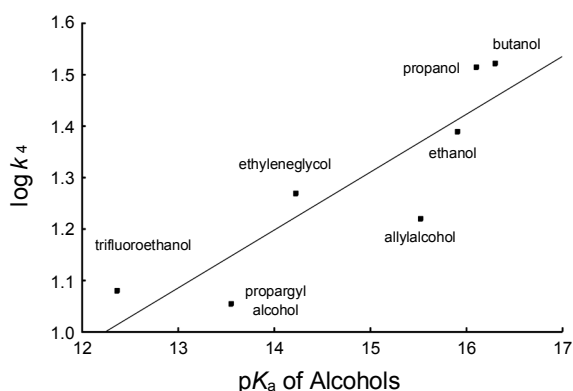
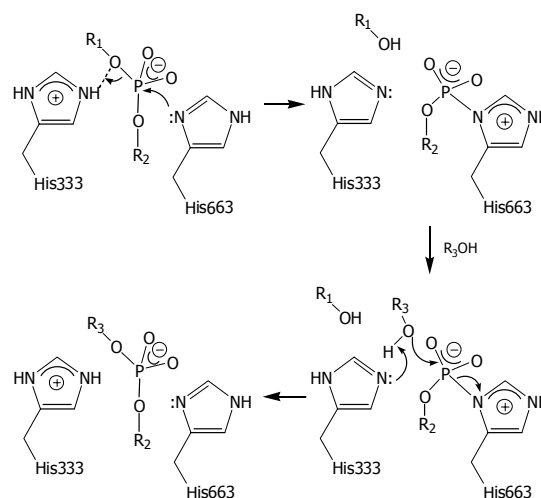


Fig. 5. Brønsted Plot of the second-order rate constant( $k_4$ ) for the alcoholysis of E-P intermediate as a function of the basicity of alcohol.

체의 해체과정의 전이상태를 추리할 수 있는 정보를 제공해준다. 양배추 PLD $\alpha$ 에서 얻어진 작은  $\beta_{nu}$  값은 친핵성 공격에 의한 다른 포스포에스터 반응과 매우 유사하다. 예로써 알코올과 anhydride acetyl phosphate와의 반응에서 얻어진  $\beta_{nu}$  값은 0.10~0.14 범위임이 알려졌다,<sup>23</sup> 포스포모노에스터를 가수분해 시키는 PTPase (protein-tyrosine phosphatase)와 알코올과의 반응에서는 0.14의  $\beta_{nu}$  값이 보고되었다.<sup>24</sup> 이런 일련의 실험들은 포스포모노에스터의 가수분해 메커니즘은 효소반응이든 아니든 간에 그 전이상태는 비대칭적으로 해리되어(dissociative) 있을 것으로 추정하고 있다. 즉 들어오는 친핵성 물질과 인과의 결합은 아주 적고 떠나는 그룹은 인과의 결합이 상당히 깨져있을 것으로 보고 있다.<sup>25</sup> 이런 관점에서 본 실험에서 얻어진 0.12의  $\beta_{nu}$  값은 포스포다이에스터인 PC를 가수분해 시키는 PLD $\alpha$ 의 반응메커니즘도 비대칭적으로 해리된 전이상태를 갖고 있을 것으로 추정할 수 있다. 다시 말해 적은  $\beta_{nu}$  값과 일치하는 포스파티딜 전달반응의 전이상태는 공격하는 알코올은 E-P 중간체의 인과 최소의 결합을 형성하는 반면 떠나는 그룹은 인과의 결합이 상당히 깨져 있을 것으로 간주된다.

#### 양배추 PLD 촉매메커니즘에 대한 제시

알코올 존재 하에서 포스파티딜 전달반응의 반응속도를 측정 한 본 실험의 주요 결과를 요약하면; 첫째, 알코올에 의한 PLD의 활성화는 포스파티딜 전달반응의 2차 반응속도  $k_4$ 의 증가에 기인하며; 둘째, 이러한 알코올의 활성화는 적절한 크기의 알코올의 알킬 그룹과 효소의 활성화 부위와의 수소성 연합으로 여겨지며; 셋째, Brønsted Plot에서 얻어진 적은  $\beta_{nu}$ 의 값(0.12)은 포스파티딜-효소 중간체(E-P)의 해체 과정이 상당히 해리된 상태임을 암시한다. 이들 결과와 함께 양배추 PLD $\alpha$ 의 DNA 서열과<sup>7</sup> 화학적 변



Scheme 4.  $R_1$  group of phosphodiester is removed and incoming  $R_3$  group is attached to the enzyme-phosphatidyl intermediate. Phosphatidic acid (PA) is produced when  $R_3$  is  $H_2O$  whereas the new phospholipid with the corresponding alcohol group is formed when  $R_3$  is alcohol. The position of His residues are according to the amino acid sequence of cabbage phospholipase D $\alpha$

형방법으로 친핵성 히스티딘이 N-말단부위 쪽의 His663 잔기라는 결과를<sup>26</sup> 고려하여 양배추 PLD $\alpha$ 의 반응 메커니즘을 Scheme 4에 도시하였다. His663 잔기는 친핵성으로 작용하여 포스포다이에스터( $R_1OPOR_2$ )의 인을 공격하고 His333 잔기는 일반 산으로 작용하여 떨어져 나가는  $R_1$ 에 수소를 제공하여 중간체 형성이 촉진되는 것으로 보여진다. 이 포스파티딜-효소 중간체(E-P)는 이 단계에서는 일반 염기로 작용하는 His333 의해 활성화된  $R_3$ (물 또는 알코올)에 의해 공격당하여 E-P 중간체의 P-N 결합이 끊어지며 최종의 생성물인 PA나 새로운 알코올 머리를 갖는 인지질( $R_3OPOR_2$ )이 얻어지는 것으로 볼 수 있다. E-P 중간체의 해체과정의 전이상태는 새로 들어오는 친핵성 물질(여기서는  $R_3$ )이 접근하면 P-N 결합의 특성상 쉽게 깨질 수 있는 상태 즉 비대칭성 해리상태가 되리라는 것이 지금까지 알려진 사실과 잘 부합된다고 하겠다.

여기서 제시한 양배추 PLD 촉매반응메커니즘은 앞서 발표된 *Streptomyces*에서 분리한 PLD의 반응메커니즘과 근본적으로 일치한다고 볼 수 있다.<sup>13</sup> 3차원 구조가 밝혀진 이 박테리아 효소는 PLD 초과에 속하며 N-말단부위의 HKD 주제에 있는 His170이 친핵성으로 기질의 인 원자를 공격하고, C-말단부위의 HKD의 His443이 일반산으로 작용하여 떨어져나가는  $OR_1$ 에 수소를 제공하여 포스파티딜히스티딘 중간체(E-P)가 형성된다고 알려져 있다. 그 외 PLD 초과에 속하는 tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 (Tdp1)도 비슷한 반응메커니즘을 보이는 것으로 보고되었다.<sup>27</sup> 포유류 PLD에 대한 반응메커니즘은 구체적으로 밝혀진

것이 없다.

본 연구의 실험을 도운 이진환과 Figure 정리에 도움을 준 왕다혜에게 감사드립니다.

## REFERENCES

- Heller, M. *Adv. Lipid Res.* **1978**, *16*, 267.
- Exton, J. H. *FEBS Lett.* **2002**, *531*, 58.
- Jenkins, G. M.; Frohman, M. A. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.* **2005**, *62*, 2305.
- Wang, X. *Plant Physiol.* **2005**, *139*, 566.
- Navari-Izzo, F.; Cestone, B.; Cavallini, A.; Natali, L.; Gior-dani, T.; Quartacci, M. F. *Phytochemistry* **2006**, *67*, 1232.
- Wang, X.; Xu, L.; Zheng, L. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 20312.
- Kim, D. U.; Roh, T.; Lee, J.; Noh, J. Y.; Jang, Y. J.; Hoe, K. L.; Yoo, H. S.; Choi, M.-U. *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1437*, 409.
- Qin, C.; Wang, X. *Plant Physiol.* **2002**, *128*, 1057.
- Yuan, H.; Chen, L.; Paliyath, G.; Sullivan, A.; Murr, D. P. *Plant Physiol. Biochem.* **2005**, *43*, 535.
- Waite, M. *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1439*, 187.
- Stumpe, S.; Konig, S.; Ulbrich-Hofmann, R. *FEBS J.* **2007**, *274*, 2630.
- Cazzolli, R.; Shemon, A. N.; Fang, M. Q.; Hughes, W. E. *IUBMB Life* **2006**, *58*, 457.
- Uesugi, Y.; Hatanaka, T. *Biochim. Biophys. Acta* **2009**, *1791*, 962.
- Bruzik, K.; Tsai, M. D. *Biochemistry* **1984**, *23*, 1656.
- Brown, H. A.; Henage, L. G.; Preininger, A. M.; Xiang, Y.; Exton, J. H. *Methods Enzymol.* **2007**, *434*, 49.
- Dippe, M.; Mrestani-Klaus, C.; Schierhorn, A.; Ulbrich-Hofmann, R. *Chem. Phys. Lipids* **2008**, *152*, 71.
- Aradottir, S.; Asanovska, G.; Gjerss, S.; Hansson, P.; Alling, C. *Alcohol Alcohol.* **2006**, *41*, 431.
- Murakami, M.; Kudo, I.; Umeda, M.; Matsuzawa, A.; Takeda, M.; Komada, M.; Fujimori, Y.; Takahashi, K.; Inoue, K. *J. Biochem. (Tokyo)* **1992**, *111*, 175.
- Lee, J.; Choi, M.-U. *Bull. Korean Chem. Soc.* **1996**, *17*, 905.
- Dittrich, N.; Haftendorn, R.; Ulbrich-Hofmann, R. *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, *1391*, 265.
- Bradford, M. M. *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248.
- Williams, A. In *The Chemistry of Enzyme Action*; Page, M. L. Ed.; Elsevier: New York, 1984; p 127.
- Herschlag, D.; Jencks, W. P. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 7679.
- Zhao, Y.; Zhang, Z.-Y. *Biochemistry* **1996**, *35*, 11797.
- Cleland, W. W.; Hengge, A. C. *FASEB J.* **1995**, *9*, 1585.
- Hwang, I. Ph. D. Dissertation, Department of Chemistry, Seoul National University, 2002.
- Raymond, A. C.; Rideout, M. C.; Staker, B.; Hjerrild, K.; Bur-gin, Jr., A. B. *J. Mol. Biol.* **2004**, *338*, 895.