

## The Mechanism : Hydrolysis of Formamide

백용수, 최철호\*

대구광역시 북구 산격동 1370 경북대학교 자연과학대학 화학과, 720-701

E-mail: windstar527@gmail.com

Formamide의 중성가수분해 mechanism은 QM/MM (quantum mechanics/ molecular mechanics) molecular dynamics simulations 및 CPMD과 같은 방법으로 연구되어왔다. 본 연구에서는, Umbrella sampling을 이용한 QM/MM-MD simulation을 사용하여 4가지 반응의 free energy surface를 도출해냈다. 전체적으로, 가장 선호되는 메커니즘은 two step으로 구성된 water assisted stepwise mechanism이었으며 모든 mechanism은 ab-initio calculation과 QM/MM-MD simulation이 수행되었다. water assisted stepwise mechanism을 살펴보면, 첫 번째 step에서 formamide의 carbonyl group이 hydrate되면서 gem-diol intermediate를 형성한다. 다음 step에서, intermediate의 hydroxyl group으로부터 amino group으로 water-assisted proton transfer이 일어난다. 두 반응 모두에서 물이 proton transfer를 직접적으로 도와주는 것을 관찰할 수 있었다. 특히, ab-initio calculation과는 다르게 QM/MM-MD에서는 gem-diol intermediate가 안정화되는 것으로 solvent effect를 잘 보여준다.

**핵심어** : QM/MM-MD, Formamide, Mechanism, solvent effect

### 서론

Peptide bond hydrolysis는 세포 내외의 생화학반응에 있어서 핵심이다. 놀랍지 않게도, 펩티드-본드 가수분해는 매우 많이 보고되어있다. 다양한 반응 메커니즘에 대해 아주 많은 관점에서 연구되어왔다. 몇몇 연구들은 수용액 상에서 효소의 효율을 결정하는 uncatalyzed hydrolysis에 초점을 두었다.<sup>1-3</sup> 중성 수용액 상에서의 uncatalyzed hydrolysis가 일어난다는 몇몇 연구가 있음에도 불구하고 반응 메커니

즘에 대해서는 여전히 논란이 있다. 다른 연구들에서는 중성인 물에서조차 base-catalyzed 메커니즘이 선호된다고 말하지만,<sup>4</sup> 최근 연구에서는<sup>5</sup> uncatalyzed hydrolysis 또한 충분히 일어난다고 한다. 최근에는 양자-화학적 계산이 실험적 데이터를 완성시키거나 심지어 실험이 어려운 상황에서는 그를 대체하는 등, 강력한 이론적 도구로 사용되고 있다. 산<sup>6-10</sup>, 염기<sup>6,10-18</sup> 촉매 하에서 아마이드 가수분해의 이론적 연구가 많이 보고되어왔지만, 본 연구에서는

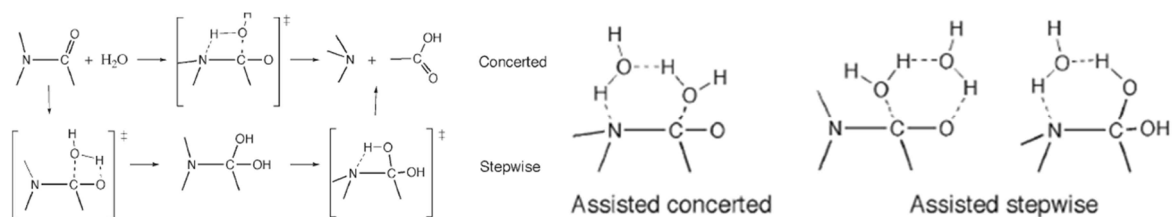


그림 15. non-assisted concerted, non-assisted stepwise, assisted concerted, assisted stepwise reaction Mechanism<sup>19</sup>

중성 uncatalyzed hydrolysis를 다음과 같은 4가지 가능한 경로(non-assisted concerted, non-assisted step-wise, assisted concerted, assisted step-wise)<sup>19</sup>로 생각하여 계산하였다.

### 이론 및 계산방법

먼저, Formamide의 Hydrolysis의 ab-initio 계산을 GAMSS프로그램을 이용하여 계산하였다. self-consistent field wavefunction(SCF)계산을 이용하였고, SCF Type은 default인 Restricted Hartree Fock calculation(RHF)을 사용하였다. 처음에는 정확한 계산보다는 빠른 계산을 위해서 basis set 을 6-31G(d)을 먼저 사용하여 Chem 3D로 구성된 각 분자들을 모두 Run type=optimize을 통해서 구조 최적화를 하였으며, Transition state를 알기위해 Transition State의 structure를 예상해 MacMolPlt를 사용하여 분자를 적절히 배치한 후 Run type=HESSIAN 계산을 통하여 second derivatives를 구하고 harmonic vibrational analysis로 단 한 개의 imaginary frequency를 찾은 다음 Run type=SADPOINT 계산을 하여 saddle point (transition state)를 찾았다. 얻어진 TS 구조는 Intrinsic reaction coordinate(IRC) calculation 을 통해 정확한 TS 여부를 판단하였다.

더 정확한 에너지 값을 산출하기위해서 Moller-Plesset perturbation theory level 2(MP2) 계산을 수행하고 basis set은 CCT을 사용하여 앞서 했던 계산을 반복하였다. QM/TIP5P-MD simulation을 위해서 290개의 물 분자가 가운데 formamide system을 약 11Å만큼의 지름으로 둘러싸고 있는 물 구체가 준비했다. QM부분은 HF/6-31G(d)으로 계산하였으며, MM으로는 TIP5P를 사용하였다. 긴 simulation 시간 (100ps) 동안 물의 evaporation 을 막기 위해서, harmonic restraint potential을 boundary solvent molecules에 가해주었으며 이는 CHARMM으로 수행했다. Asymmetric umbrella sampling coordinate (AC)에 따른 Umbrella samplings은 다음과 같은 harmonic constraint potential으로 수행되었다.  $V = \frac{k}{2}(r_{us} - r_0)^2$

Non-assisted mechanism의 경우 one dimension으로 구상하였으며, 분자간 proton transfer에 따른 potential of mean forces (PMF)을 얻기 위해서, umbrella sampling reaction coordinate ( $r_{us}$ )는 다음과 같이 정의된다 :

$$\text{step-wise: } TS1, r_{us} = \frac{1}{\sqrt{2}}(r_{4-8} - r_{3-8}) \quad TS2, r_{us} = \frac{1}{\sqrt{2}}(r_{4-9} - r_{1-9})$$

$$\text{Concerted: TS, } r_{us} = \frac{1}{\sqrt{2}}(r_{4-9} - r_{1-9})$$

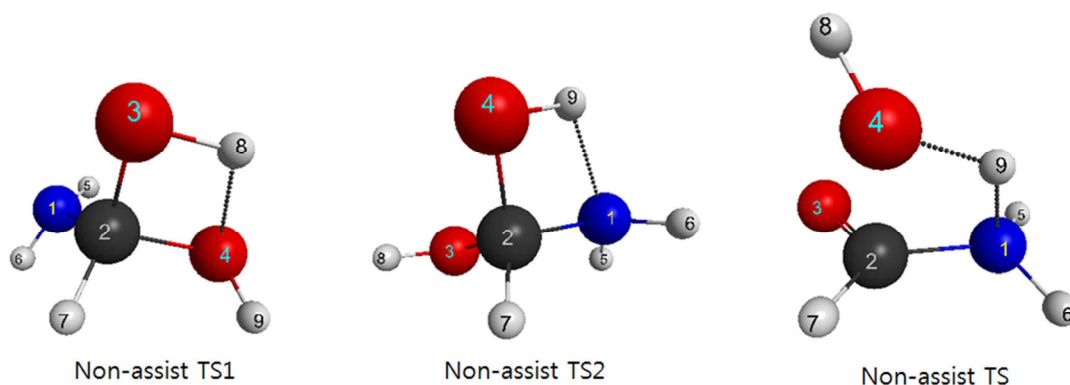


그림 2. Non-assisted mechanism 에서 각 Transition State 의 원자구조와 번호

기본적으로 전이상태를 중심으로 reactant에서 product로의 다음과 같은  $r_{us} = -1, -0.7, -0.3, 0, 0.3, 0.7, 1.0 \text{ \AA}$  인 7개 window를 준비했다. umbrella sampling의 통제를 위해서 적게는  $2 \text{ kcal/mol/\AA}^2$ , 보통  $100 \text{ kcal/mol/\AA}^2$ , 많게는  $200 \text{ kcal/mol/\AA}^2$  만큼의 힘 상수를 가해주었다. 처음, system을 안정화시키기 위해서 7개의 window 각각 300K 하의 NVT QM/MM-MD simulations을 50ps까지 계산하였다. 그 다음, 같은 NVT ensemble과 300K 하에서 안정화 계산 마지막 단계로부터 얻은 구조로 QM/MM-MD 결과물을 100ps까지 이어서 계산하였다. 1차원 potentials of mean force (PMF)를 umbrella samplings을 얻기 위해서 weighted histogram analysis method (WHAM)를 사용하였다.

assisted mechanism의 경우 two dimension으로 구상하였으며, 분자간 proton transfer에 따른 potential of mean forces (PMF)을 얻기 위해서, umbrella sampling reaction coordinate ( $r_{us}$ )는 다음과 같이 정의된다 :

$$\text{step-wise: TS1, } r_{1,us} = \frac{1}{\sqrt{2}}(r_{7-8} \oplus r_{3-8}) \quad r_{2,us} = \frac{1}{\sqrt{2}}(r_{10-11} \oplus r_{7-11})$$

$$\text{TS2, } r_{1,us} = \frac{1}{\sqrt{2}}(r_{3-8} \oplus r_{7-8}) \quad r_{2,us} = \frac{1}{\sqrt{2}}(r_{7-9} \oplus r_{1-9})$$

$$\text{Concerted: TS, } r_{1,us} = \frac{1}{\sqrt{2}}(r_{7-8} \oplus r_{1-8}) \quad r_{2,us} = \frac{1}{\sqrt{2}}(r_{11-10} \oplus r_{2-10})$$

기본적으로 전이상태를 중심으로 reactant에서 product로의 다음과 같은  $r_{1,us} = -1, -0.7, -0.3, 0, 0.3, 0.7, 1.0 \text{ \AA}$ ,  $r_{2,us} = -1, -0.7, -0.3, 0, 0.3, 0.7, 1.0 \text{ \AA}$  인 49개의 window를 준비했다. umbrella sampling의 통제를 위해서 적게는  $2 \text{ kcal/mol/\AA}^2$ , 보통  $100 \text{ kcal/mol/\AA}^2$ , 많게는  $200 \text{ kcal/mol/\AA}^2$  만큼의 힘 상수를 가해주었다. 그 다음 작업은 one dimension계산과 동일하게 구상하였다. 또한 2차원 potentials of mean force (PMF)를 umbrella samplings을 얻기 위해서 weighted histogram analysis method (WHAM)를 사용하였다.

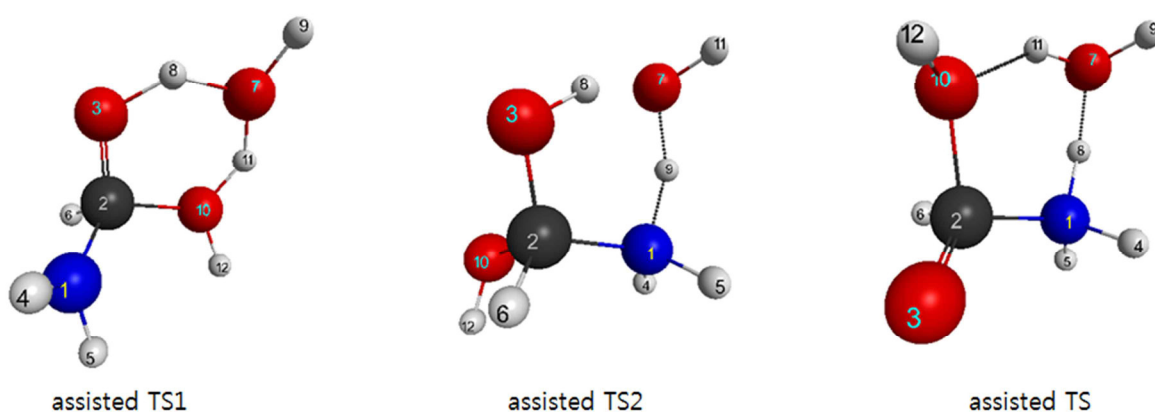


그림 3. assisted mechanism에서 각 Transition State의 원자구조와 번호

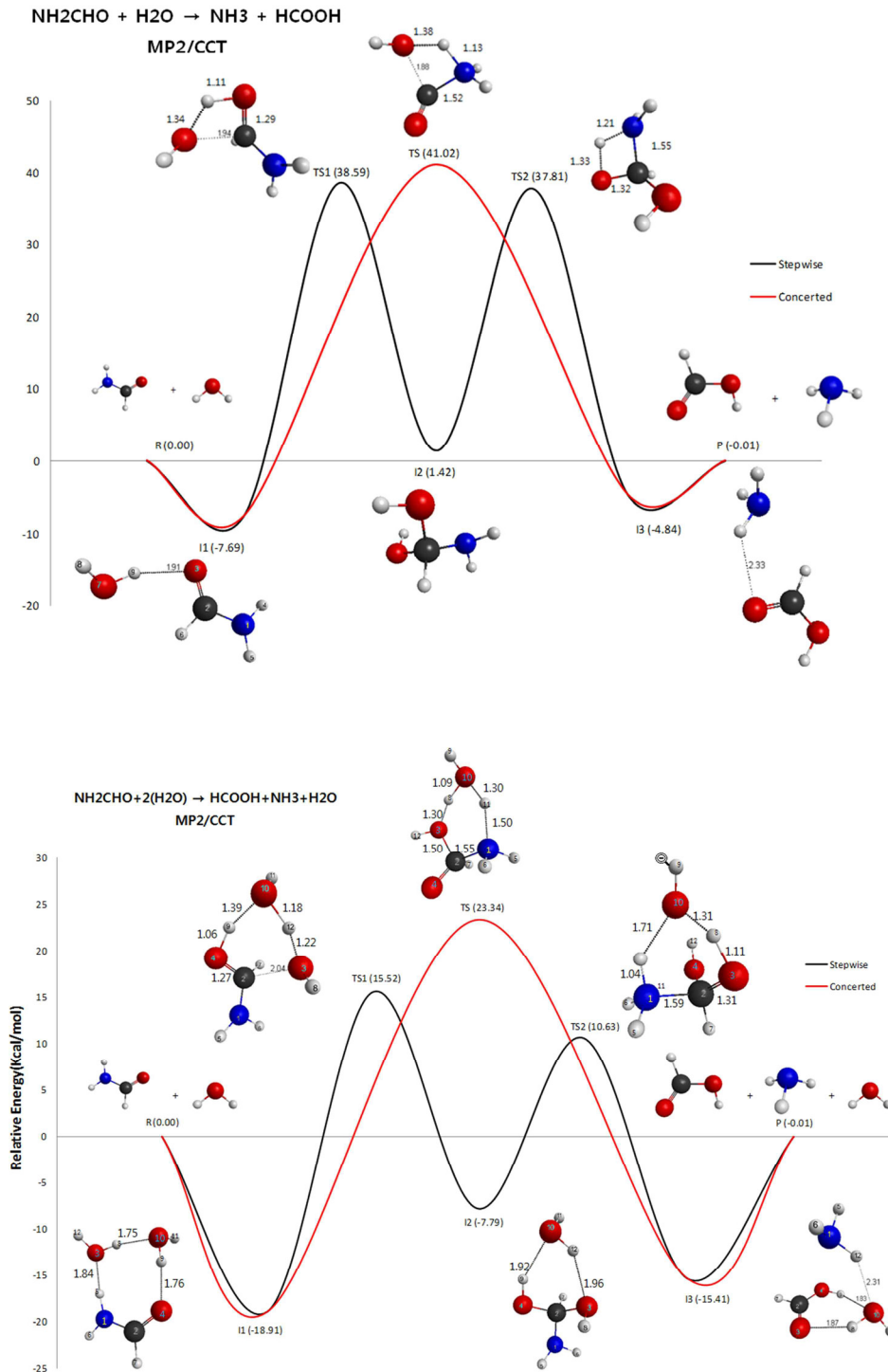


그림 4. 기체상의 반응: Ab-initio 계산

두 경로(Concerted와 Step-wise)의 각각, non-assisted, assisted mechanism Relative energy, 단위는 Kcal/mol이다. Concerted는 R(Reactant), I1(Intermediate1), TS(Transition State), P(Product)순이고 Step-wise는 R(Reactant), I1(Intermediate1), TS1 (Transition State1), I2(Intermediate2), TS2(Transition State2), P(Product)순이다.

표 1. State - State 간의  $\Delta E$ , 단위는 Kcal/mol.

Non-assisted mechanism				Assisted mechanism			
Step-wise		Concerted		Step-wise		Concerted	
R → I1	-7.69	R → I1	-7.69	R → I1	-18.91	R → I1	-18.91
I1 → TS1	46.28	I1 → TS	48.71	I1 → TS1	34.43	I1 → TS	42.25
TS1 → I2	-37.17	TS → I3	-45.86	TS1 → I2	-23.31	TS → I3	-38.75
I2 → TS2	36.39	I3 → P	4.83	I2 → TS2	18.42	I3 → P	15.4
TS2 → I3	-42.65			TS2 → I3	-26.04		
I3 → P	4.83			I3 → P	15.4		

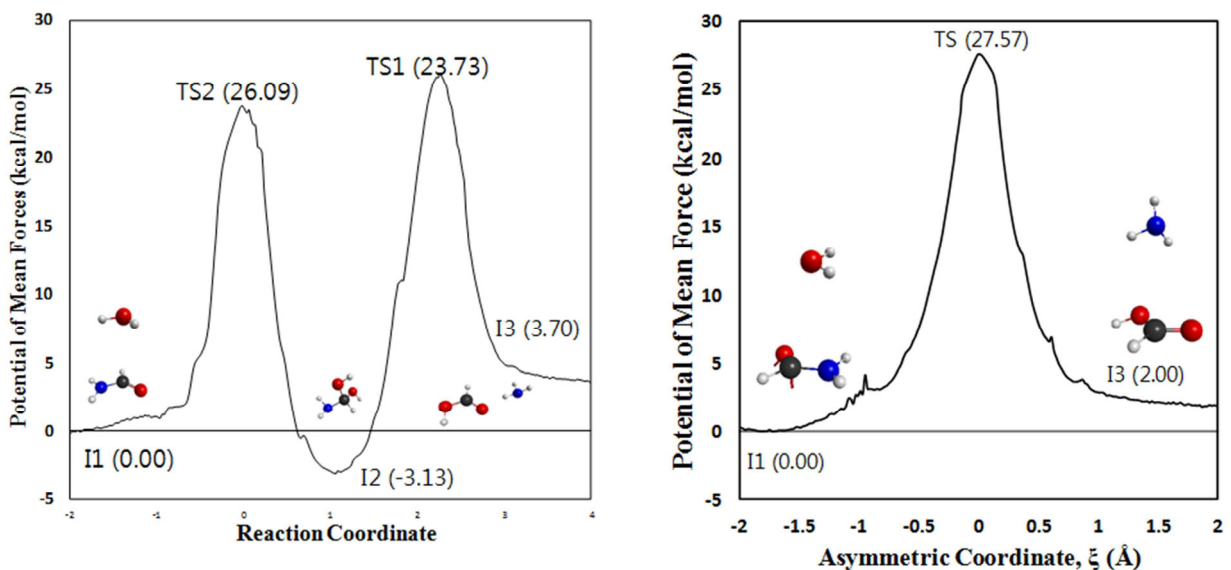


그림 5. 두 경로(Concerted와 Step-wise)의 non-assisted mechanism PMF(Potential of Mean Force)

### 결론 및 토의

Ab-initio 계산을 통해 도출된 4가지 경로 (Non-assisted Concerted, Non-assisted Step-wise, Assisted Concerted, Assisted Step-wise) 를 위의 그래프에 Relative energy로 비교하였다. Reactant를 0Kcal/mol으로 두었다. 또한 각 State - state 간의  $\Delta E$ 를 보기 쉽게 아래 도표에 나타내었다.

표를 보면 먼저, Non-assisted와 assisted mechanism 4가지 경로 모두  $\Delta E$ 가 높아 자유

에너지를 고려하지 않았지만, 기체 상에서는 반응진행이 어려울 것이라는 것을 알 수 있다. 또한 Assisted mechanism에서는 TS에서 6-membering을 이루면서 water가 proton transfer를 도와주어 Non-assisted mechanism보다 에너지상으로 Concerted와 Step-wise 모두 TS로  $\Delta E$ 가 낮아졌고, Intermediate 또한 water와의 분자간 상호작용으로 더 안정화되었다. Non-assisted mechanism 내에서 보면, Step-wise에서는 TS1로의 전이가 46.28으로 Rate-Determining Step이고, Concerted의 TS로 전이 (48.71)보다 -2.43Kcal/mol만큼  $\Delta E$ 가 적어

Step-wise가 선호됨을 알 수 있다. Assisted mechanism 내에서 보면, Step-wise에서는 Non-assisted mechanism과 동일하게 TS1이 Rate-Determining Step이고  $\Delta E$ 는 34.4, Concerted의 TS로의 전이(42.25)보다 -7.82Kcal/mol 만큼  $\Delta E$ 가 적어 역시 Step-wise mechanism이 선호됨을 알 수 있다.

PMF 계산을 통해 도출된 Non-assisted 에서의 2가지 경로(Concerted, Step-wise)를 위의 그래프에 비교하였다. Stepwise에서는 TS1에서의 umbrella sampling과 TS2에서의 umbrella sampling을 연결시켰으며, I3를 0Kcal/mol로 두었다. Concerted에서는 I1을 0Kcal/mol로 두었다. 또한 각 State - state 간의  $\Delta E$ 를 Ab-initio계산과 비교하여 표2에 나타내었다.

전체적으로 Ab-initio계산에서의 보다 energy barrier가 낮음을 보인다. 이는 온도가 고려되어 엔트로피가 더해져 Gibb's Free energy를 구할 수 있게 하였으며, 290개의 water solvent와의 상호작용으로 전체적으로 안정화되었다. 먼저 Step-wise를 보면, 눈에 띄는 점이 I2인 amino-gem-diol 이 2개의 -OH 작용기를 가지고 있어 water solvent와의 hydrogen bond가 amino-gem-diol 을 안정화시켜 I2의  $\Delta E$ 가 매우 낮아졌고, 그로 인하여 Ab-initio계산을 통해 얻은 Gas Phase에서의 반응과는 다르게 TS2로의 전이가 29.08으로 TS1로 전이(23.94)보다 5.14Kcal/mol만큼 커 Rate-Determining Step이 되었다. 이로 인하여 Concerted의 TS로 전이(27.57)가 -1.51만큼 적어 Concerted가 유리한 경로임을 알 수 있다.

표 2. 각 State - state 간의  $\Delta E$ 를 Ab-initio계산과 비교

Step-wise	Ab-initio		PMF	
	Concerted	Step-wise	Concerted	Step-wise
R → I1	-7.69	R → I1	-7.69	
I1 → TS1	46.28	I1 → TS	48.71	I1 → TS1 23.94
TS1 → I2	-37.17	TS → I3	-45.86	TS1 → I2 -27.36
I2 → TS2	36.39	I3 → P	4.83	I2 → TS2 29.08
TS2 → I3	-42.65			TS2 → I3 -22.39
I3 → P	4.83			

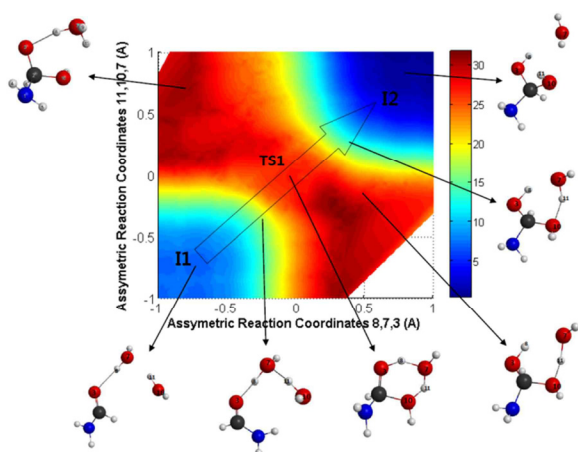
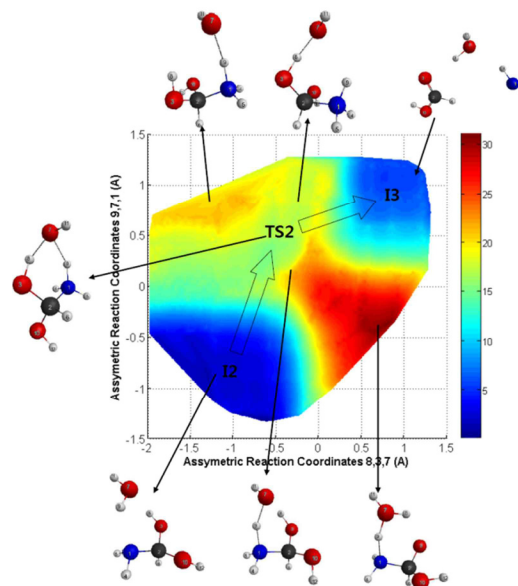


그림 6. Step-wise assisted mechanism PMF(Potential of Mean Force)



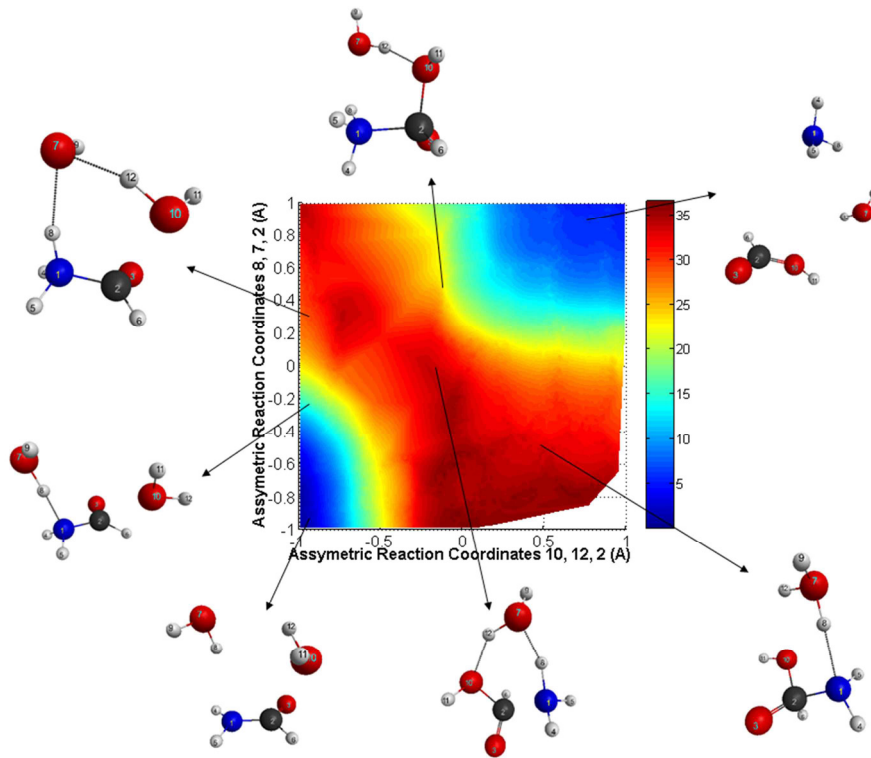


그림 7. Concerted assisted mechanism PMF(Potential of Mean Force)

표 3. 각 State - state 간의  $\Delta E$ 를 Ab-initio계산과 비교

Ab-initio				PMF			
Step-wise		Concerted		Step-wise		Concerted	
R → I1	-18.91	R → I1	-18.91				
I1 → TS1	34.43	I1 → TS	42.25	I1 → TS1	19.48	I1 → TS	30.01
TS1 → I2	-23.31	TS → I3	-38.75	TS1 → I2	-25.46	TS → I3	-25.3
I2 → TS2	18.42	I3 → P	15.4	I2 → TS2	16.05		
TS2 → I3	-26.04			TS2 → I3	-12.38		
I3 → P	15.4						

PMF 계산을 통해 도출된 Assisted 에서의 Step-wise two Dimension PMF와 Concerted two Dimension PMF를 나타내었다. TS1에서는 또한 각 State - state 간의  $\Delta E$ 를 Ab-initio계산과 비교하여 표3에 나타내었다.

먼저, stepwise를 보면 PMF에서는 역시 엔트로피가 고려되어 amino-gem-diol이 매우 안정하게 계산되었으며, 전체적인 net barrier 역시

매우 낮게 측정되었다. 또한 Ab-initio 계산과 PMF계산 모두 Step-wise에서 TS2가 낮게 나옴을 알 수 있는데 이는 two dimension PMF를 보면 assister water가 hydroxide를 형성하는 TS2로 이동하면서 전이상태로의 에너지가 낮아짐을 볼 수 있다. concerted에서는 water가 proton transfer를 assist 해주는 반응이 non-assist보다 오히려 더 높아지는 결과를 초래하였다.

## 결론

본 연구에서는 전체적으로 assisted stepwise mechanism이 가장 선호되었고, stepwise에서는 non-assisted system보다 assisted system에서 물이 직접적으로 proton transfer를 돕는 역할을 하기 때문에 assisted mechanism이 선호됨을 보였다. 하지만 concerted에서는 물 분자가 개입함으로 인해서 proton이 transfer하는데에 더 어려움을 준다는 것을 알 수 있다. 또한 assisted stepwise에서 assister water가 hydroxide구조를 취하면서 TS에서 Non-assisted Mechanism보다 안정화되는 것 또한 보여졌다. Intermediate인 amino-gem-diol의 주위를 둘러싼 water MM의 영향으로 수용액 상에서 안정화 또한 관찰되었다. 이는 Ab-initio 계산만 통해서는 정확하게 산출할 수 없는 엔트로피의 영향을 잘 보여준다.

## 감사의 글

본 논문은 2015년도 정부(미래창조과학부)의 재원으로 한국연구재단 첨단 사이언스·교육 허브 개발 사업의 지원을 받아 수행된 연구입니다.

## 참고문헌

1. D. Kahne, W. C. Still, *J. Am. Chem. Soc.* 1988, 110, 7529 – 7534.
2. A. Radzicka, R. Wolfenden, *Science* 1995, 267, 90– 93.
3. A. Radzicka, R. Wolfenden, *J. Am. Chem. Soc.* 1996, 118, 6105 –6109.
4. R. M. Smith, D. E. Hansen, *J. Am. Chem. Soc.* 1998, 120, 8910 –8913.
5. H. Slebocka-Tilk, F. Sauriol, M. Monette, R. S. Brown, *Can. J.Chem.* 2002, 80, 1343 –1350.
6. J. P. Krug, P. L. A. Popelier, R. F. W. Bader, *J. Phys. Chem.* 1992, 96, 7604 – 7616.
7. S. Antonczak, M. F. Ruiz-LEpez, J. L. Rivail, *J. Am. Chem. Soc.* 1994, 116, 3912 –3921.
8. D. Zahn, *Chem. Phys.* 2004, 300, 79–83.
9. D. Zahn, *J. Phys. Chem. B* 2003, 107, 12303 – 12306.
10. Z. Wu, F. Ban, R. J. Boyd, *J. Am. Chem. Soc.* 2003, 125, 6994 – 7000.
11. D. Bakowies, P. A. Kollman, *J. Am. Chem. Soc.* 1999, 121, 5712 – 5726.
12. M. Cascella, S. Raugei, P. Carloni, *J. Phys. Chem. B* 2004, 108, 369 – 375.
13. Y.-J. Zheng, R. L. Ornstein, *J. Mol. Struct.* 1998, 429, 41–48.
14. D. Zahn, *Chem. Phys. Lett.* 2004, 383, 134 –137.
15. D. Cheshmedzhieva, S. Ilieva, B. Galabov, *J. Mol. Struct.* 2004, 681, 105 – 112.
16. K. Hori, A. Kamimura, K. Ando, M. Mizumura, Y. Ihara, *Tetrahedron* 1997, 53, 4317 –4330.
17. X. Lopez, J. I. Mujika, G. M. Blackburn, M. Karplus, *J. Phys. Chem. A* 2003, 107, 2304 – 2315.
18. J. Pliego, R. Josefredo, *Chem. Phys.* 2004, 306, 273 –280.
19. Gorb L, Asensio A, Tunon I, Ruiz-Lopez MF (2005) *Chem Eur J* 11:6743–675.