

고리형 헥사펩티드의 형태 및 5,5-디페닐하이덴토인에 의한 양이온 전달방해에 관한 이론적 연구

梁奇烈* · 丘寅鮮 · 李益春[†] · 孫昌國[‡]

慶尙大學校 師範大學 科學教育科

[†]仁荷大學校 理科學 化學科

[‡]全南大學校 師範大學 化學教育科

(1992. 2. 6 접수)

Theoretical Studies on Conformation of Cyclic Hexapeptides and Blocking for the Cation Transport by 5,5-diphenylhydantoin

Kiyull Yang*, In Sun Koo, Ikchoon Lee[†], and Chang-Kook Sohn[‡]

Department of Chemical Education, Gyeongsang National University, Chinju 660-701, Korea

[†]Department of Chemistry, Inha University, Incheon 402-751, Korea

[‡]Department of Chemical Education, Chonnam National University, Kwangju 500-757, Korea

(Received February 6, 1992)

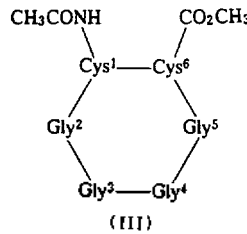
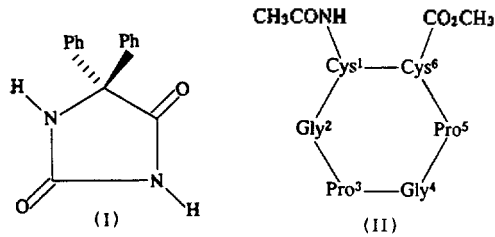
요 약. ECEPP/2 및 MM2 방법을 이용하여 고리형 헥사펩티드의 형태 및 알칼리 금속 양이온과의 착물형성 그리고 DPH에 의한 양이온 전달방해를 이론적으로 살펴 보았다. 착물을 형성하지 않은 고리형 펩티드에 대하여 여러 가지 안정한 형태가 얻어졌으며, 대부분의 아미드 수소원자는 카르보닐 산소와 분자내 수소결합을 이루고 있어 조밀한 구조를 나타내었다. 펩티드와 Na⁺ 이온 및 DPH간의 착물형성에너지는 각각 -60 kcal/mol 및 -18 kcal/mol 이었다. 그러나 헥사펩티드의 국부최소에너지 구조들에는 금속 양이온을 결합할 수 있는 공동이 존재하지 않았고 공동이 존재하는 헥사펩티드의 에너지는 본 연구의 최저에너지 구조 보다 10 kcal/mol 정도 높은 에너지를 주었으며, 이러한 에너지 차이와 금속양이온의 탈수과정을 고려하면 DPH에 의한 양이온 전달방해를 설명할 수 있었다. 또한 DPH와 결합하는데 있어서의 가장 중요한 아미노산 잔기는 글리신⁴이었으며 이를 사코신(N-메틸 글리신)으로 치환할 때 양이온 전달이 저해되는 실험적 사실을 설명할 수 있었다.

ABSTRACT. The conformations of hexapeptides, their complexation with alkali cations and the inhibition of the cation transport by 5,5-diphenylhydantoin(DPH) were studied theoretically using ECEPP/2 and MM2 force field. Several low energy conformations of uncomplexed cyclic hexapeptides are obtained, and they adopt compact conformations in which most amide hydrogens form intramolecular hydrogen bond to amide carbonyl oxygens. The complexation energy of the peptide with Na⁺ ion and DPH is -60 kcal/mol and -18 kcal/mol, respectively. However, no suitable cavity to bind metal cation exists for the local minima of the peptide, and the internal energy of the uncomplexed hexapeptide having cavity is higher than that of the uncomplexed global minimum of this work by 10 kcal/mol. Also, one of the most important amino acid residue to bind DPH is Glycine⁴, and this can explain experimental observation that the replacement of Gly⁴ by Sarcosine (N-methyl Glycine) reduce the inhibition ability of the cation transport.

서 론

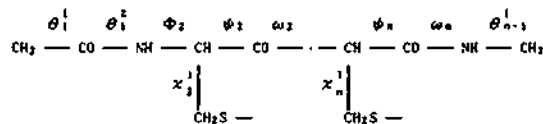
양이온 운반이나 통로(channel) 등의 기능을 가지는 펩티드 이온운반체(Ionophore)들은 호스트-게스트(Host-Guest) 상호작용의 폭넓은 관심과 분자 모델링(Molecular Modeling)²을 통한 효소반응기구의 이해 또는 분자설계에 대한 광범위한 관심으로 많은 연구의 대상이 되고 있다. 한편 항경련제로 널리 사용되어 왔던 Phenytoin³(5,5-diphenyl hydantoin, I, 이하 DPH)의 약리작용은 Na⁺ 이온 통로의 특수한 비활성화가 그 요인이 알려져 있으며⁴ 최근의 연구에 의하면 이러한 통로는 Glycoprotein임이 밝혀졌다⁵. 특히 Noda와 Kosower 등의 Na⁺ 통로 모델⁶에서는 양이온 전달과정에 이러한 통로의 열림(활성화)-닫힘(비활성화) 과정이 관여하고 있으며 이들 물질은 대부분 온화한 산화제이며 많은 Cystein 잔기를 포함한다. 즉 신경조직의 경련을 일으키게 하는 Na⁺ 이온통로의 열림과정에 대한 화학은 산화과정에 의하여 Na⁺ 이온 선택적인 Cyclopeptide 이온운반체를 만든다고 볼 수 있다⁷. 아울러 많은 고리형 펩티드 이온운반체 및 그 양이온착물 구조가 알려져 있지만^{7,8} 이들 중 Cystein-Cystine 산화-환원 과정이나 Na⁺ 이온 운반에 대한 큰 선택성은 알려져 있지 않다. 한편 Wolfe 등⁹은 Biomimetic 실험연구를 통하여 세포막 환경에서 Na⁺ 이온을 선택적으로 운반할 수 있으며 DPH에 의하여 전달이 방해될 수 있는 고리형 핵사펩티드를 MMPEP force field를 이용하여 제안하고 Boc-L-Cystinyl-Glycyl-L-Prolyl-Glycyl-L-Prolyl-L-Cystinyl-OCHPh₂ (Phencetin)을 합성하여 양이온의 전달과 DPH에 의한 전달방해 등을 확인하였으며 이 때 MMPEP로 얻어진 가장 안정한 펩티드의 형태는 양이온을 결합할 수 있는 공동(Cavity)를 가지고 있었다. 한편 대부분의 이온운반체들은 양이온이 결합된 형태와 양이온이 결합되기 이전의 형태는 동일한 구조가 아니며, 특히 양이온이 결합되지 않은 경우의 가장 안정한 형태의 에너지는 착물형성 때보다 더 낮은 것을 볼 수 있으며 형태도 다양하다¹⁰. 따라서 본 연구에서는 Cystine-Cystine 구조를 가진 유사한 핵사펩티드인 Cys-(Gly-Pro)₂-Cys(II)와 내부 잔기가 모두 Glycine인 Cys-(Gly)₄-Cys(III)에 대하여

착물형성 이전의 형태(uncomplexed)와 에너지 그리고 몇 가지 알카리 양이온과의 착물에 대한 구조 및 에너지를 무작위 탐색법¹⁰을 도입한 ECEPP/2¹¹ 방법과 MM2¹² 방법을 이용하여 검토하고자 한다. 또한 DPH 첨가에 의한 양이온 전달 방해는 펩티드-DPH와 펩티드-양이온간의 착물형성에 대한 경쟁반응으로 진행될 것으로 예측하며 펩티드-DPH간의 착물형성시 관여하게 될 아미노산 잔기들의 위치를 살펴보고자 한다.



계 산

펩티드의 초기형태를 결정하기 위하여 Scheraga의 ECEPP/2(Empirical Conformation Energy Program for Peptides) 방법과 무작위 탐색법을 이용하였다. ECEPP/2 방법의 기본 골격은 각 아미노산 잔기별로 주로 실험적인 기하구조 및 변수들을 토대로하여 폴리펩티드의 에너지를 계산하고 이때 계산에 필요한 자료는 각 펩티드결합 및 결사슬들에 대한 이면각(Dihedral Angle)과 아미노산 순서이며, 말단기(End Group) 및 잔기들(Residues)의 이면각을 다음과 같이 정의한다.



아미노산 순서가 결정되면 θ , ϕ , ω , ψ 및 χ 등을 부여한 뒤 이러한 이면각들에 의해서 만들어지는

원자좌표를 이용하여 전체에너지를 계산한다.

$$U_{TOT} = U_{EL} + U_{NB} + U_{HB} + U_{TOR} + U_{LOOP} \quad (1)$$

여기서 U_{TOT} 는 전체에너지이며 U_{EL} 는 정전기에너지, U_{NB} 는 비결합 상호작용에너지, U_{HB} 는 수소결합에너지, U_{TOR} 는 이면각 회전에너지 그리고 U_{LOOP} 는 Cysteine-Loop Closing 에너지이다. 이때 수소결합에 참여하는 원자들에 대해서는 U_{NB} 를 계산하지 않는다.

그러나 (1)식에 의한 펩티드의 에너지는 주어진 이면각인 $\{\theta, \phi, \psi, \omega, \chi\}$ 의 조합, 즉 주어진 형태에 대한 에너지이므로 가능한 형태들에 대하여 계산하고 에너지들을 비교하여 안정한 형태를 찾아야 하는데, 이때 계산해야 할 구조가 너무 많아 불가능하다. 따라서 단백질이나 거대분자에 대한 안정한 형태를 결정하려는 노력은 매우 다양하게 진행되고 있으며¹³ 본 연구에서는 Wolfe 등의 무작위 탐색(Random Search) 방법을 도입하였다¹⁰. 이 방법의 기초는 어떠한 형태의 에너지 곡면이거나 에너지가 주위의 곡면에 비해 매우 급격하게 낮아지지 않는다고 가정하고, 대개의 경우 최소에너지 구조 근처에서는 2차 함수형태로 주어지는 곡면을 이루고 있어서 대략적인 최소점을 얻은 뒤 다시 이면각을 최적화하여 국부최소점(Local Minima)들을 찾는 방법이다. 이를 위하여 무작위 추출법을 이용하여 계산된 구조 중 안정한 구조를 수 개 선정된 뒤 다시 전체 원자좌표를 에너지최소화 방법으로 최적화하여 국부최소점들과 그중 가장 에너지가 낮은 구조를 찾는다. 이러한 무작위 탐색법을 수행하기 위해서는 비교적 구조가 잘 알려진 단백질이나 폴리펩티드들에서 자주 관측되는 이면각들을 기초로 하여 일정한 단일 계산을 수행하며, 이때 θ, ϕ 및 ψ 의 초기값들은 모두 $0^\circ, \pm 90^\circ, 180^\circ$ 들을 선정하고 결사슬의 첫번째 이면각(χ)은 $-60^\circ, 180^\circ$ 를 선정하였으며 ω 및 χ^1 은 180° 를 사용하였다. 여기서 무작위 수(Random Number)의 최하위 2 비트(bit)의 조합 $2^2(4)$ 으로 위의 4종류의 각을 표시할 수 있다. 이렇게 무작위로 추출된 200,000개의 구조를 계산하고 그중 안정한 50개의 구조를 다시 Powell 방법으로 최적화하였다. Powell 최적화방법은¹⁴ 1차 미분이 필요하지 않지만 국부최소점이 여럿으로 추정되는

경우 초기값을 여러가지로 변화시켜 계산할 필요가 있으며, 본 연구에서와 같이 여러개의 국부최소점이 존재하고 초기구조들로부터의 미분이 불가능할 때 사용할 수 있는 방법이라고 볼 수 있다. 이렇게 찾은 초기구조들은 이면각들에 대하여서만 최적화된 구조이며, 아미노산 잔기가 포함되지 않은 DPH나 양이온들과의 상호작용을 살펴보기 위하여서는 전체 원자의 좌표를 최적화하여 상호작용에너지를 계산하여야 하므로 MM 계산을 수행하여 다시 전체 원자를 최적화하였다.

이용이 가능한 MM(Molecula Mechanics) 프로그램은¹⁵ 종류가 상당히 다양하지만 Allinger 등의 펩티드에 대한 변수와¹⁶ MM2 프로그램은 이 분야 프로그램 중 Source Code를 개방하고 그와 관련된 자료도 풍부하며, 사용자가 Force Field 변수를 쉽게 조정할 수 있다. 전체에너지(ETOT)는 신축에너지(EC), 굽힘에너지(EB), 신축-굽힘에너지(ESB), 이면각 에너지(ET), van der Waals 에너지(EV), 및 쌍극자 상호작용에너지(ED)의 합으로 주어지며, 쌍극자를 형성할 수 없는 양이온-펩티드간의 상호작용에너지는 점전하에 의한 정전기에너지(EP)를 구하였다. 일반적으로 다른 종류의 분자역학 프로그램에서는 수소결합에너지를 별도의 퍼텐셜함수를 이용하여 계산하나 Allinger는 EV에 포함시켜서 계산하며 이때 수소결합에 참여하게 되는 수소원자와 수소결합 받게원자(O, N 등)의 van der Waals 변수를 조정하여 비교적 간단하게 수소결합을 재현하고 있다¹⁷. 아울러 MM2에 포함되어 있는 최적화 방법은 Newton-Raphson 방법을 이용하고 있어서 ECEPP/2에서 얻어진 초기형태를 크게 변화시키지 않을 것으로 생각된다.

ECEPP/2 및 MM2 계산에서의 유전상수는 각각 프로그램내의 값인 2.0과 1.5 이용하여 진공 또는 기체상태로 생각하였으며 이는 세포막환경 즉, 유기층에서 펩티드 형태결정시 펩티드-비극성용매간의 극성 상호작용이 거의 없으며, 펩티드 착물형성시에도 두 분자사이에서 용매분자가 제거되어야 하므로 작은 유전상수의 선정에 무리가 없다고 본다.

두 분자간의 착물 또는 Supermolecule의 구조를 결정하는데 있어서 분자의 크기가 작을 경우에는 비교적 용이하게 초기 기하구조를 결정할 수 있으나

3차원 공간에서 원자수가 증가하면 상당한 어려움이 따른다. 즉 활성위치를 통한 효소-기질간의 도킹(Docking)²⁰에 관한 문제점들을 해결하기 위하여 현재 여러 가지 방법들이 제안되고 있으나 모든 경우에 적절히 적용될 수 있는 방법이 다양하지 않다. 일반적으로 두 분자 이상이 도킹하는 방법은 여러 가지가 있을 수 있지만 펩티드들이 포함된 분자에서는 수소결합 등을 통하여 결합이 이루어짐을 알 수 있다. 본 연구에서는 'Super'로 명명한 프로그램¹⁶을 사용하여 수소결합된 Supermolecule의 초기 기하구조를 결정하고 MM2 방법을 이용하여 핵좌표들을 최적화하였다.

기타 DPH에 대한 수소결합 위치선택성을 조사하기 위하여 Dewar 등의 Austin Model One(AM1)¹⁹ 방법과 입체구조의 확인을 위하여 PCDISP²⁰ 프로그램을 이용하였다.

결과 및 고찰

헥사펩티드의 형태. ECEPP/2 계산에 의한 Proline 치환된 헥사펩티드(Proline-Substituted Hexa-

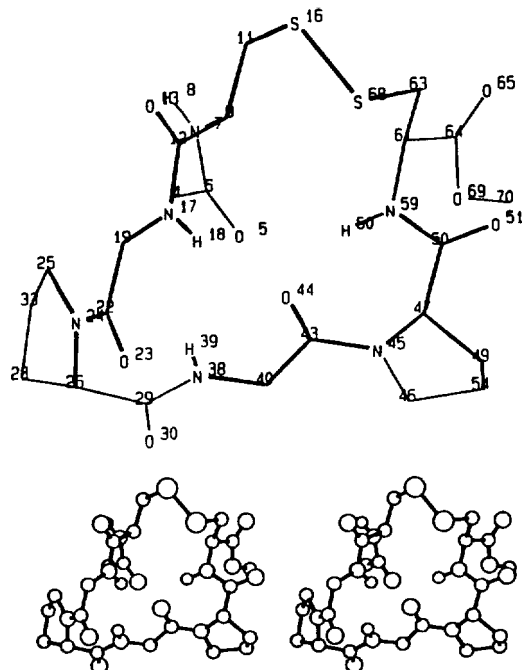


Fig. 1. Numbering scheme and stereoview of proline-substituted hexapeptide(PSH).

peptide, 이하 PSH, Fig. 1) Cys¹-Gly²-Pro³-Gly⁴-Pro⁵-Cys⁶의 200,000 구조 중 안정한 50개의 단일 계산 구조에 대하여 MM2 Force Field로 최적화한 에너지들을 Table 1에 수록하였다. 이들 중 '*'로 표시된 5가지 구조가 다른 구조들에 비하여 비교적 낮은 에너지를 나타내고 있으며 이들에 대한 3차원 그림을 Fig. 2에 도시하였다.

모든 입체그림은 C, N, O 그리고 S 등의 원자를 분명하게 표시하기 위하여 아미드 수소를 제외하고는 수소원자를 나타내지 않았다. 우선 입체적인 구조를 살펴보면 안정한 형태는 대부분의 아미드수소가 분자내 수소결합에 참여하고 있다. 이러한 현상은 n-octane 같은 비극성용매에서 아미노산 잔기가 포함된 이온운반체인 Valinomycin의 모든 아미드 수소원자가 카르보닐 산소원자와 강한 수소결합을 이루는 것과 동일하다고 볼 수 있다²¹. 이때 수소결합에 대한 O-N 결합길이는 2.78~3.02 Å로서 Valinomycin에서의 2.83~3.11 Å과 비슷하였으며 대표적인 안정한 형태 5가지에서 Gly²의 카르보닐기 산소가 가장 자주 분자내 수소결합에 참여하고 있었다. 이러한 분자내 수소결합 성질은 용매의 극성이 증가하면 용매분자와의 분자간 수소결합의 증가로 인하여 감소할 것으로 예측된다. 아울러 금속 양이온이 없을 때의 구조는 내부이면각의 비교적 쉬운 자유회전으로 인하여 다양한 종류의 국부최소에너지 구조가 가능할 것으로 예측된다. 이는 결정구조에서 볼 수 있는 단일구조와는 달리 기체나 액체상에서는

Table 1. Minimized MM2 energies (kcal/mol) of 50 structures of PSH obtained by ECEPP/2. Local minima were asterisked

No.	1-10	11-20	21-30	31-40	41-50
1	-2.18	3.38	-0.14	-2.54	3.56
2	-0.66	2.37	-3.69	-2.89	-0.66
3	1.51	1.80	-8.99*	-1.70	-4.23
4	-12.89*	-1.53	-10.68*	0.66	0.89
5	0.73	-3.28	3.62	-2.73	0.39
6	4.27	-9.17*	2.19	-0.39	7.19
7	6.94	-6.71	2.63	-5.05	-4.32
8	-2.93	-1.20	-5.17	2.19	-5.45
9	-3.60	0.81	-12.53*	4.72	2.41
10	-2.18	0.68	-2.53	3.21	4.60

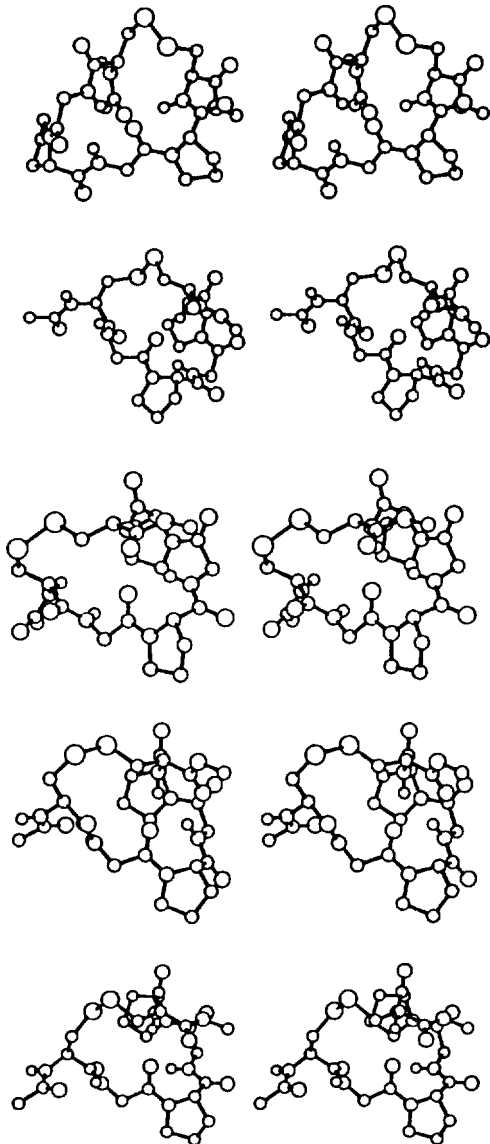


Fig. 2. Stereoviews of the MM2 minimized five relatively low energy PSHs. Top to bottom: PSH4, PSH16, PSH23, PSH24, and PSH29.

다양한 형태를 줄 수 있으며 크라운에테르등의 이온운반체에서도 금속이온이 결합하지 않은 다양한 형태가 제안되어 있다²². 본 연구에서는 최저에너지의 3.0 kcal/mol 이내에서 약 다섯 가지의 서로 다른 형태를 가진다.

일반적으로 펩티드의 접힘(folding) 양식은 (ϕ , ψ)의 조합에 따라서 right-handed α -helix(α_R)(-57, -

Table 2. Dihedral angles of amino acid residues and their folding type

Residud	PSH4	PSH16	PSH23	PSH24	PSH29	
Cys ¹	ϕ	-88.5	-74.0	62.2	-84.0	72.7
	ψ	66.1	-50.0	40.2	58.8	-74.3
	χ	-170.6	-176.4	-165.9	-176.2	-163.5
type	C_7^{2x}	α_R	α_L	C_7^{2x}	C_7^{2x}	
Gly ²	ϕ	163.2	91.6	-86.7	-90.0	92.1
	ψ	-16.3	161.2	-75.0	-176.0	167.9
	type		α_R			
Pro ³	ϕ	-75.9	-80.8	-76.8	-74.7	-80.2
	ψ	29.8	32.5	70.3	74.0	32.9
	type	C_7^{2x}	C_7^{2x}	C_7^{2x}	C_7^{2x}	C_7^{2x}
Gly ⁴	ϕ	172.5	-115.2	-162.7	-171.0	-116.0
	ψ	166.8	-69.6	-64.0	-65.1	-69.4
	type					
Pro ⁵	ϕ	-83.2	-74.9	-72.0	-75.0	-75.0
	ψ	37.8	-25.6	-34.0	-26.6	-27.5
	type		α_R	α_R	α_R	α_R
Cys ⁶	ϕ	-66.0	124.6	129.0	124.3	127.0
	ψ	22.7	45.2	47.0	173.9	45.1
	χ	-46.5	-65.5	-67.0	-67.9	-67.5
type	C_7^{2x}					

47); left-handed α -helix(α_L)(+57, +47); antiparallel β -pleated sheet($\equiv C_5$ bend)(-139, +135) parallel β -pleated sheet(-119, +113), C_7^{2x} bend(-80, +80); C_7^{2x} bend(80, -80); collagen(-75, 150) 등으로 분류된다²³. 이러한 접힘형태를 살펴보기 위하여 Table 2에 위의 5가지 구조에 대하여 그들의 ϕ , ψ 및 χ 를 조사하였으며 자주 나타나는 접힘 양식은 C_7 및 α -helix 등이다.

Pro³ 및 Pro⁵의 ϕ 는 Proline의 5원자 고리의 고정된 형태로 인하여 모두 -80° 근처의 이면각을 보여 주고 있다. 한편 결정구조 등에서 자주 볼 수 있는 첫번째 결사슬의 이면각 ψ 는 -60°²⁴ 및 180° 등이 있으며 Cys¹은 180° 그리고 Cys²는 -60° 근처의 값임을 알 수 있다. 헥사펩티드의 입체적 모양은 금속 양이온과 결합할 수 있도록 카르보닐 산소가 분자의 내부로 향하고 있는 형태가 거의 없다. MM-PEP으로 얻어진 Pceptin의 최소에너지 구조는 양이온을 결합할 수 있도록 카르보닐 산소가 분자 내부로 향하고 있는 적당한 공동을 가진 구조였으나⁹, 이 구조에 대한 MM2 에너지는 -2.46 kcal/

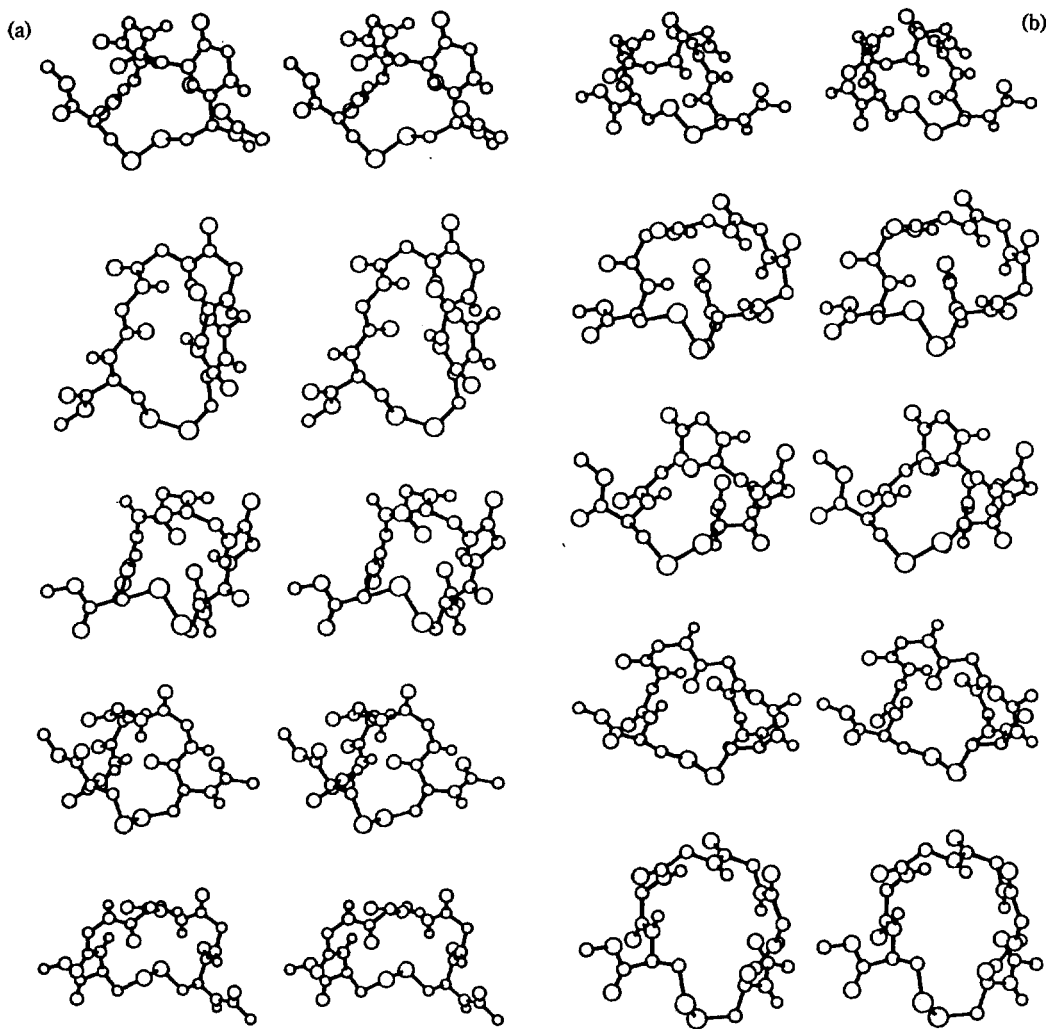


Fig. 3. (a) Stereoviews of the MM2 minimized ten relatively low energy GSHs. Top to bottom: GSH4, GSH7, GSH8, GSH17, and GSH19; (b) Top to bottom: GSH21, GSH28, GSH36, GSH43, and GSH45.

mol로서 본 연구에서의 최소에너지 보다 10 kcal/mol 더 높다. 따라서 Wolfe 등의 최소에너지 구조는 Local Minimum 구조일 가능성이 크다고 볼 수 있거나 사용된 force field 또는 매질의 차이로 생각할 수 있다(Fig. 4).

Pro³ 및 Pro⁵ 대신 모두 Glycine으로 치환된 헥사펩티드(Glycine Substituted Hexapeptide, 이하 GSH라 함)인 Cys-(Gly)₄-Cys에 대하여 동일한 과정의 계산을 수행하였으며 MM2 계산 결과를 Table 3에 수록하였다. 아울러 안정한 구조들에 대한 이면각과 입체그림을 Table 4와 Fig. 3에 도시하였

다.

PSH의 결과와 비교하여 보면 그들간의 에너지 차이가 크지 않은 상대적으로 안정한 형태의 수가 PSH의 경우 보다 두 배 정도로 증가하였음을 볼 수 있다. 이는 Proline 치환된 경우 ϕ 가 거의 고정된 반면 Glycine에서는 이면각에 대한 회전 자유도가 증가하였으며, PSH에서는 분자내 수소결합에 참여할 수 있는 아미드 수소원자의 수가 4개인 반면 Glycine의 경우 6개의 모든 아미드 수소원자가 수소결합에 참여하여 훨씬 다양한 수소결합의 조합이 가능하기 때문으로 본다. 이때 수소결합에 참여하고

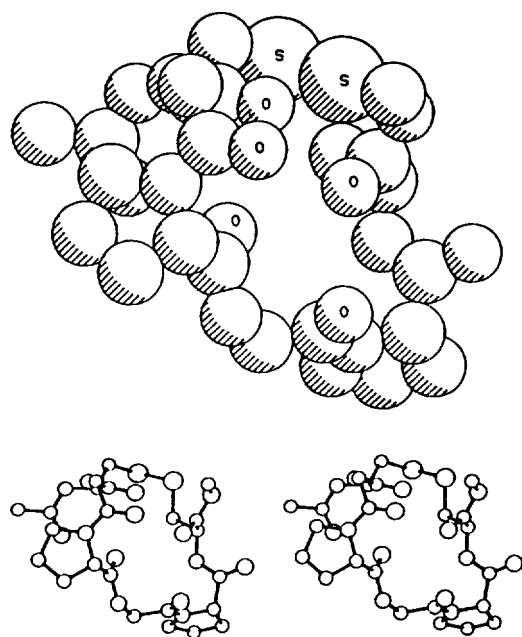


Fig. 4. MMPEP minimized structure of the hexapeptide in reference 9.

Table 3. Minimized MM2 energies (kcal/mol) of 50 structures of GSH obtained by ECEPP/2. Local minima were asterisked

No.	1-10	11-20	21-30	31-40	41-50
1	-7.40	-23.14	-28.13*	-14.46	-22.70
2	-22.54	-18.14	-24.24	-26.78	-20.26
3	-21.41	-26.93	-14.70	-20.16	-27.76*
4	-28.91*	-20.00	-15.99	-25.26	-25.58
5	-13.83	-21.88	-13.41	-20.11	-28.68*
6	-13.53	-25.33	-21.17	-29.70*	-25.96
7	-30.03*	-27.85*	-17.03	-20.35	-14.33
8	-29.96*	-21.59	-29.26*	-15.09	-19.93
9	-22.75	-27.65*	-24.27	-13.79	-14.66
10	-21.69	-22.39	-16.78	-24.13	-14.29

있는 O-N 결합길어도 2.70~3.10 Å이며 O-H간의 평균 결합길이는 2.05 Å이었다. 입체적인 모양의 특성은 대부분 compact한 구조를 이루고 있으며 PSH에서와 같이 카르보닐 산소원자가 모두 분자내부로 향하고 있는 구조는 없다.

MMPEP에서의 구조인 Fig. 4가 본 연구에 의하면 비록 최소에너지 구조는 아니지만 입체적으로 살펴보면 양이온을 분자 내부에서 결합할 수 있는 공동을

Table 4. Dihedral angles of amino acid residues of GSH

Residud	GSH4	GSH7	GSH8	GSH17	GSH19
Cys ¹	φ 67.0	-69.3	-80.0	-64.7	60.0
	ψ -81.5	6.6	67.8	85.0	5.0
	χ 178.7	-161.8	-175.7	-179.4	-159.5
Gly ²	φ 76.8	-51.8	-83.1	127.8	64.3
	ψ -33.2	80.3	40.9	-40.5	-10.0
Pro ³	φ -77.5	80.2	81.7	-65.4	78.4
	ψ 33.8	-40.2	-47.8	-29.4	-49.8
Gly ⁴	φ 61.9	-62.2	-95.0	-121.1	-68.9
	ψ -82.3	-26.3	-178.0	25.8	-26.3
Pro ⁵	φ -78.3	-121.2	70.0	78.5	-72.4
	ψ -24.3	-29.4	-7.5	-179.2	-20.7
Cys ⁶	φ 62.8	-104.5	-63.1	-158.2	-112.2
	ψ 26.9	-55.9	-16.1	158.0	32.6
	χ -47.6	-69.0	-55.2	-163.1	-70.6

Residud	GSH21	GSH28	GSH36	GSH43	GSH45
Cys ¹	φ -78.4	64.3	-82.6	-91.1	74.1
	ψ 30.0	-159.9	69.6	153.7	-75.0
	χ 132.3	-149.3	-175.6	-154.1	-160.4
Gly ²	φ 115.5	-76.3	-78.0	78.5	129.1
	ψ 14.4	41.8	48.6	-47.9	29.2
Pro ³	φ -78.3	65.6	81.0	-74.9	60.8
	ψ 29.9	-153.9	-59.7	22.9	42.1
Gly ⁴	φ 81.3	-65.5	-73.1	73.6	79.8
	ψ -41.2	9.9	17.3	-27.0	-31.5
Pro ⁵	φ -77.6	-72.8	-122.6	-70.7	-81.6
	ψ 29.1	-16.3	-14.6	-47.9	49.7
Cys ⁶	φ -89.5	-90.7	-75.6	51.6	-85.5
	ψ -33.1	39.2	-10.8	32.0	39.3
	χ -169.9	-59.6	-76.0	-50.0	-46.3

가지고 있으며 5개의 카르보닐 산소원자(Cys¹, Gly², Pro³, Gly⁴ 및 Cys⁶)가 삼각쌍뿔 형태의 배치를 가지며 이때 공동의 직경은 산소원자의 원자반경을 0.73 Å으로 할 때 2.5 Å 정도이다.

양이온 착물의 형태. 본 연구에서 얻은 착물을 이루고 있지 않은 펩티드는 전술한 바와 같이 적당한 공동을 가지지 않아서 양이온 결합 가능한 Fig. 4의 구조를 초기 좌표로 하여 착물의 에너지를 계산하였다. 양이온 착물을 계산하기 위한 변수들은 Kollman 등의 값²⁵ 이용하였으며 금속 양이온이 펩티드와 공유결합을 이루지 않고 배위되어 있기 때문에 주로 VDW 및 정전기 상호작용에너지 함만

Table 5. MM2 energy components and complexation energies (E_{comp} , kcal/mol) for the complexation between metal cation and PSH

Component	Uncomplexed PSH	Li ⁺	Na ⁺	K ⁺
EC	2.26	2.30	2.39	2.34
EB	15.78	14.49	14.49	14.47
ESB	-0.26	-0.26	-0.24	-0.26
EV	-5.50	8.62	8.01	2.68
ET	3.16	4.96	4.27	2.06
ED	25.82	-64.31	-47.49	-31.02
ETOT	40.65	-33.51	-18.56	-9.73
E_{comp}		-74.16	-59.21	-50.38

Table 6. MM2 energy components and complexation energies (E_{comp} , kcal/mol) for the complexation between metal cation and GSH

Component	Uncomplexed GSH	Li ⁺	Na ⁺	K ⁺
EC	1.30	1.28	1.33	1.37
EB	7.31	7.94	7.64	7.22
ESB	0.09	0.06	0.06	0.09
EV	-14.30	-1.46	-3.13	-4.96
ET	-8.00	-8.24	-8.38	-10.10
EP	21.73	-60.83	-47.39	-33.06
ETOT	8.11	-61.25	-49.88	-39.44
E_{comp}		-69.36	-57.99	-47.55

고려하게 된다. 그러나 Allinger의 MM2 프로그램은 정전기에너지를 계산할 때 쌍극자-쌍극자 상호작용 에너지를 기본선택으로 계산하고 있어서 점전하(point charge)에 의한 정전기에너지를 구하였으며 이때 사용된 점전하는 ECEPP/2 프로그램의 값을 이용하였다. 초기 구조는 Fig. 4에서 삼각쌍뿔형의 배치를 주는 다섯 개의 카르보닐 산소원자의 좌표 중심에 금속이온을 위치하여 계산하였으며, 실험적으로 양이온 운반속도가 측정된 K⁺ 및 Na⁺ 이온 외에 Li⁺ 이온에 대하여 구조 및 착물형성에너지를 비교하였다. 최적화된 에너지와 그들의 성분을 Table 5 및 6에 수록하였으며 얻어진 3차원 구조를 Fig. 5 및 6에 나타내었다.

금속 양이온이 결합된 펩티드의 6개 구조를 입체적으로 살펴보면 대체적으로 PSH의 경우가 GSH

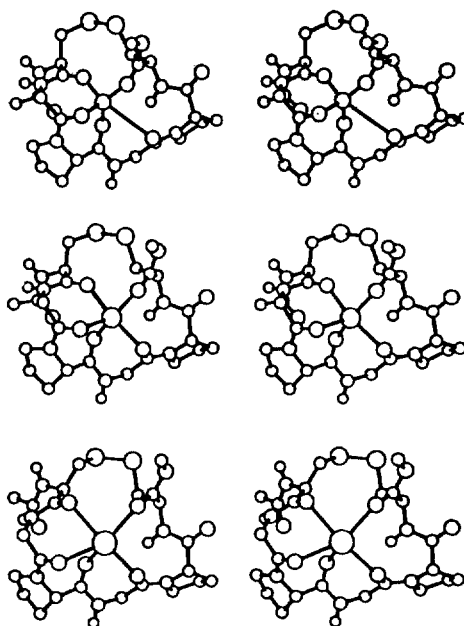


Fig. 5. Stereoviews of the MM2 minimized complexes of PSH with the alkali cations. Top to bottom: the complexes with Li⁺, Na⁺, and K⁺.

경우보다 삼각쌍뿔의 구조에 더 가까운 모양을 가진다. 양이온 종류별로 살펴보면 Na⁺ 이온이 결합된 구조가 삼각쌍뿔 구조에 가장 가까웠으며 Na-O의 평균 결합길이는 PSH 및 GSH에서 각각 2.17 Å 및 2.25 Å이다. K⁺ 이온의 경우는 완전히 분자 내부에서 결합하기 보다는 분자 외곽으로 상당히 치우친 것임을 볼 수 있으며 평균 K-O 결합길이는 PSH 및 GSH에서 각각 2.63 Å 및 2.64 Å이다. 한편 Li⁺ 이온의 경우는 PSH에서 4원자 그리고 GSH에서 3원자가 양이온에 더 가까이 배워되어 있으며 이때 Li-O의 평균 결합길이는 각각 1.72 Å 및 1.67 Å이다. 이와 같은 결합길이는 일반적인 크라운에테르계열의 착물²⁸에 대한 양이온-산소와 0.15 Å 이내 그리고 Valinomycin의 값²⁶과는 0.05 Å내에서 잘 일치하며, 전반적인 구조는 Na⁺-PSH 간의 결합이 가장 좋은 이온운반체의 모양을 가지고 있다. 또한 에너지성분을 살펴보면 점전하에 의한 정전기 상호작용에너지가 전체에너지 성분 중 가장 크며 점전하로 계산된 uncomplexed 펩티드인 PSH와의 착물형성에너지는 Li⁺, Na⁺ 및 K⁺ 이온에 대해 각각 -74.16, -59.21 및 -50.38 kcal/mol로서 Dibenzo-18-crown-6과 위의

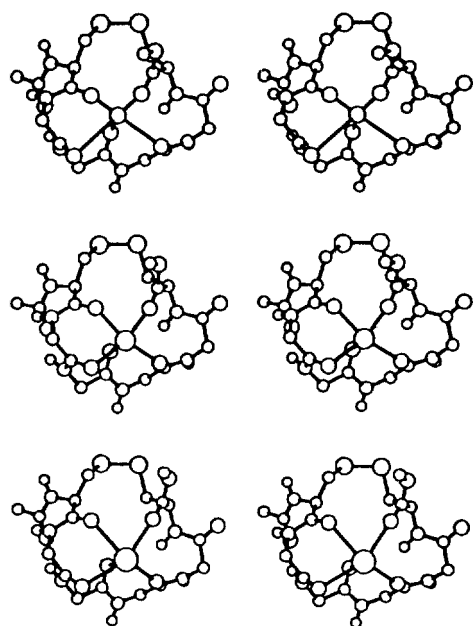


Fig. 6. Stereoviews of the MM2 minimized complexes of GSH with the alkali cations. Top to bottom: the complexes with Li^+ , Na^+ , and K^+ .

양이온들에 대한 Kollman의 값²⁵ -88.3 , -72.5 및 -62.4 kcal/mol과 비교할 만 하다. Dibenzo-18-crown-6와의 약 12 kcal/mol의 착물형성에너지 차이는 18-crown-6에서는 금속 양이온이 6개의 산소 원자에 배워진 반면 본 핵사펩티드의 경우는 5개의 산소원자에 배워져진 결과로 생각하면 그 차이를 고려할 수 있으며 양이온들 간의 상대적인 착물형성에너지도 잘 일치한다.

한편 Phenceptin의 양이온 운반속도에 관한 실험결과에 의하면 양이온들의 선택성은 Na^+/K^+ 이 1.7⁹이나 Li^+ 이온의 실험자료는 알려져 있지 않다. 따라서 위의 착물형성에너지에 의하면 Na^+ 이온의 착물형성이 K^+ 이온 보다 유리함을 말해준다. 모두 Glycine이 치환된 $\text{Cys}(\text{Gly})_4\text{-Cys}$ 의 경우도 이와 비슷한 정도의 착물형성에너지를 주고 있음을 볼 수 있으며 PSH의 경우와 유사한 실험결과를 예측할 수 있을 것으로 보이나 실제에 있어서는 PSH의 결과를 그대로 적용할 수 있을 것이라는 확실성은 비교적 어렵다. PSH에서 5원자 고리구조를 가지는 Proline 잔기는 분자의 외부도 향하고 있어서 세포막

환경에서의 이온운반체의 역할을 하기 위한 Lipophilicity를 증가시킬 수 있다. 그러나 Glycine 잔기는 그러한 Lipophilicity를 크게 가지지 못하며 tightly turned 고리형 펩티드 구조를 가져서 원하는 이온 운반체로서의 어려움이 있으며, DPH 같은 양이온 전달 억제제를 첨가하였을 때 억제제와의 입체적인 상호작용이 기회를 줄일 것으로 보인다. 또한 PSH의 경우 Global Minimum과 비슷한 에너지를 나타내는 형태의 수가 대략 다섯인 반면 GSH의 경우는 동일한 수의 무작위 탐색공간에서 두 배나 더 많은 안정한 형태의 증가로 PSH에서 GSH로 바뀌면서 공동을 가지는 Fig. 4와 같은 구조의 확률은 상대적으로 감소할 것이라는 예측이 가능하다.

DPH와의 복합체 및 양이온 전달 방해. Wolfe 등의 실험에 의하면 Phenceptin이 양이온을 전달하는 도중에 DPH를 첨가하면 양이온 운반속도가 DPH를 첨가하기 전의 40% 정도로 감소하여 양이온 운반이 60% 정도 현저하게 방해되는 것을 알 수 있으며¹¹, 이를 살펴보기 위하여 억제제인 DPH와 PSH간의 착물을 계산하였다. 즉, 핵사펩티드-금속 양이온 그리고 핵사펩티드-DPH 간의 착물형성이 경쟁적으로 진행되어 전달속도가 변화한다고 볼 수 있다. 우선 DPH의 구조를 다시 최적화하여 Fig. 7에 도시하였으며 PSH들 중 가장 에너지가 낮은 PSH4와의 Supermolecule 생성을 살펴보기 위하여 가능한 수소결합 위치를 Fig. 1의 PSH4 입체그림에서 찾아 보았다.

DPH의 입체적 장애를 가장 적게 받으면서 수소결합이 가능한 위치는 PSH4에서 $\text{O}_{23}\text{-H}_{39}$ 및 $\text{O}_{44}\text{-H}_{39}$ 등 두 곳이며 모두 Gly⁴의 아미드 수소원자가 관여하고 있으며, 이에 대응하는 DPH의 위치는 $\text{O}_4\text{-H}_6$ (site 1), $\text{O}_5\text{-H}_6$ (site 5) 및 $\text{O}_5\text{-H}_8$ (site 3) 등 세 곳으로 모두 여섯 가지 조합이 가능하다. 이들 여섯 가지 조합에 대한 구조 및 에너지를 프로그램 'Super'를 이용하여 초기구조를 찾고 다시 MM2로 최적화하였다. 프로그램 Super에 사용된 최적화 과정은 이론적으로는 초기좌표에 의존하나 몇 가지 임의의 초기구조들을 가지고 시도한 결과 초기구조에 무관하게 유사한 구조들이 얻어졌으며 이들 중 가장 합리적이며 낮은 에너지 구조들을 채택하였다. 따라서 프로그램 Super는 초기구조에 관계없이 최종

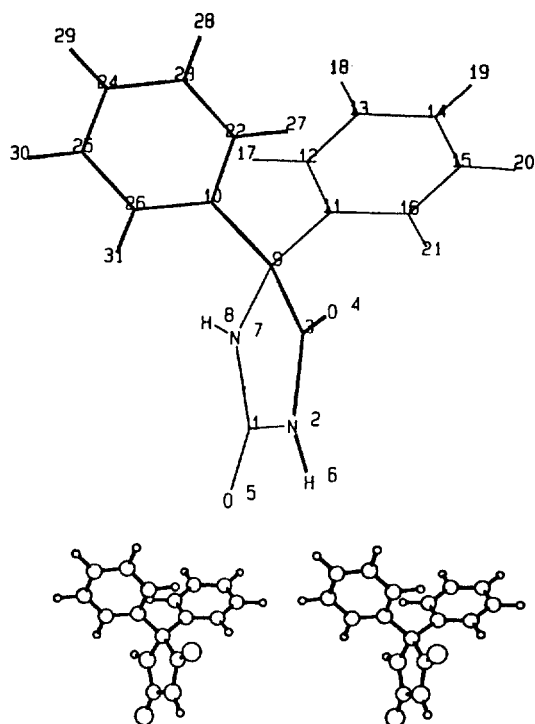


Fig. 7. Numbering scheme and stereoview of the MM2 minimized DPH.

결과를 크게 변화시키지 않고 있음을 알 수 있었다. 계산된 상호작용에너지를 그구성 성분과 함께 Table 7과 8에 요약하고 구조들을 Fig. 8에 나타내었다.

각 경우 상호작용에너지는 $-15 \sim -18$ kcal/mol로 얻어지며 가장 큰 것이 PSH의 ($O_{44}\text{-H}_{39}$)와 DPH의 ($O_4\text{-H}_6$) 조합이다. 한편 DPH의 세 가지 수소결합 위치 중 생물학적으로 활성이 큰 위치로 알려진 것은 DPH의 $O_4\text{-H}_6$ (site 1) 위치이다²⁷. 또한 가장 안정한 에너지를 주는 site 1에서의 착물과 반응물인 PSH 및 DPH의 에너지 구성성분을 살펴보면 $\Delta E[\text{ETOT}(\text{complex}) - \text{ETOT}(\text{PSH}) - \text{ETOT}(\text{DPH})] = -17.63$ kcal/mol의 주된 기여는 $\Delta EB = 1.48$ kcal/mol, $\Delta EV = -15.77$ kcal/mol, $\Delta ET = 1.31$ kcal/mol 및 $\Delta ED = -4.87$ kcal/mol로 상호작용 안정화에너지를 위한 대부분의 기여는 VDW 및 정전기상호작용에너지임을 알 수 있다. 그러나 DPH에서의 위치별 에너지차이는 2 kcal/mol 정도로서 전체 착물형성에너지 약 17 kcal/mol에 비교한다면 위치선택성을 단정하기는 어려운 점이 있다. 이를 다시 전자

Table 7. MM2 minimized energies (kcal/mol) for the complex between PSH4 and DPH with various binding sites. Values in parenthesis are complexation energy [$E_{\text{comp}} = \text{ETOT}(\text{complex}) - \text{ETOT}(\text{PSH4}) - \text{ETOT}(\text{DPH})$].

DPH	Site 1 ($O_4\text{-H}_6$)	Site 2 ($O_5\text{-H}_8$)	Site 3 ($O_5\text{-H}_8$)
PSH4			
$O_{23}\text{-H}_{39}$	-19.39 (-12.66)	-16.90 (-10.16)	-16.00 (-9.26)
$O_{44}\text{-H}_{39}$	-24.36 (-17.63)	-23.41 (-16.67)	-22.13 (-15.40)

Table 8. MM2 energy components and complexation energy (kcal/mol) for the complexation between PSH 4 ($O_{44}\text{-H}_{39}$) and various binding sites of DPH

Component	Uncomplexed		Complex		
	PSH4	DPH	Site 1	Site 2	Site 3
EC	1.99	0.81	2.70	2.72	2.70
EB	15.40	5.01	21.89	22.06	21.56
ESB	-0.15	-0.01	-0.16	-0.15	-0.18
EV	-13.36	5.65	-23.16	-23.20	-22.12
ET	0.49	-11.07	-9.27	-9.41	-8.86
ED	-16.85	5.36	-16.36	-15.41	-15.32
ETOT	-12.49	5.76	-24.36	-23.40	-22.13
E_{comp}			-17.63	-16.67	-15.40

적인 요인을 살펴보기 위하여 핵사펩티드 대신 가장 간단한 아미드인 포름아미드-DPH 및 포름아미드-Hydantoin간의 착물형성에너지를 반경험적 분자계도함수법인 AM1 방법으로 계산하였다. AM1 방법은 MINDO/3나 MNDO 계열의 Hamiltonian으로 수소결합을 다른 두 가지 방법 보다는 비교적 잘 묘사한다고 볼 수 있다²⁰. 계산결과를 Table 9에 수록하였으며 전체적인 상호작용에너지는 $-7 \sim -8$ kcal/mol로서 MM2 방법으로 얻은 에너지 보다는 작아졌으며 수소결합이 유리한 위치도 조금 달라졌다.

상호작용에너지가 작아진 요인은 핵사펩티드에서 포름아미드로 바뀌면서 VDW 에너지가 작게 계산되었기 때문이라고 생각할 수 있다. 한편 DPH와 Hydantoin 간의 상호작용에너지 차이가 거의 없는 것으로 미루어 보아 수소결합력은 DPH의 디페닐기의 고유한 전자적인 영향은 무시되어질 수 있으며 단지 Lipophilic pocket에 구조적으로 적합한 입체적

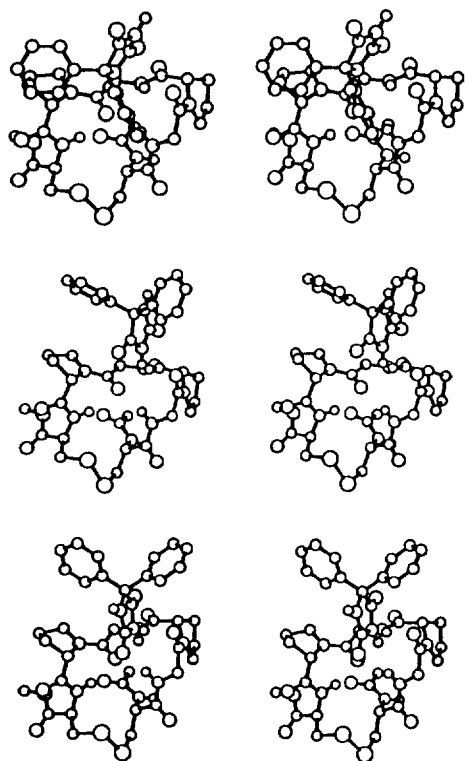


Fig. 8. Stereoviews of the MM2 minimized complexes of PSH with DPH. Top to bottom; site 1, site 2, and site 3.

요인만을 제공하고 있다고 볼 수 있다²⁸.

지금까지의 복합체 구조 및 착물형성에너지들 다시 요약하면 PSH-DPH간의 상호작용 에너지는 약 -18 kcal/mol 정도이며 PSH와 Na^+ 이온 및 DPH가 경쟁적으로 복합체를 형성한다면 에너지의 절대값으로는 Na^+ 이온이 크게 유리하다고 볼 수 있다. 그러나 일반적으로 양이온 전달은 1) 물층으로부터의 양이온 추출 2) 세포막 환경, 즉 유기층에서의 양이온-Ionophore 결합, 그리고 3) 세포안으로의 양이온 전달 등의 과정이 포함되나 본 연구에서는 주로 두번째 과정을 중심으로 살펴 보았다. 따라서 물층으로부터의 양이온 추출에 수반되는 양이온의 탈수과정까지를 고려한다면 DPH-펩티드 결합이 DPH-양이온 결합과정과 비슷한 에너지 변화를 가져오거나 유리하여 양이온 전달에 대한 방해할 설명할 수 있다. 한편 펩타이드의 Gly⁺ 아마이드 수소가 모든 복합체에서 수소결합에 참여하고 있어서

Table 9. Complexation energies (kcal/mol) calculated by AM1 for the reaction of formamide with DPH and Hydantoin

	Site 1	Site 2	Site 3
DPH	-8.27	-7.38	-6.72
Hydantoin	-8.67	-7.44	-6.98

이를 Sarcosine 즉 N-methyl Glycine으로 치환한다면 DPH 첨가시 Blocking이 현저하게 감소한다는 Wolfe 등의 실험결과²⁹를 설명할 수 있다.

결 론

고리형 펩타이드의 안정한 형태를 ECEPP/2 방법과 무작위탐색법 및 MM2 방법으로 결정하여 금속양이온과의 착물 및 디페닐하이덴토인과의 수소결합 착물의 구조 및 에너지를 구한 뒤 양이온 전달과정의 방해에 대하여 검토한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

Proline 치환된 펩타이드(PSH) 및 Glycine 치환된 펩타이드(GSH)의 안정한 형태들은 모두 강한 분자내 수소결합을 이루고 이들 중에는 양이온을 전달할 만한 공동이 존재하지 않았으며, 본 연구에서의 Global Minimum 구조인 PSH4는 유사한 화합물인 Phenceptin의 안정한 구조 보다 10 kcal/mol 더 낮은 에너지를 가짐을 알았다. 아울러 동일 무작위 탐색 공간에 대하여 GSH의 안정한 형태의 수가 PSH의 안정한 형태의 수보다 훨씬 많아서 양이온 전달을 위한 공동을 가지는 구조의 확률은 감소할 것으로 예측되어 PSH가 더 효과적인 이온 운반체가 될 것으로 예측된다.

양이온과 펩타이드간의 결합에너지는 약 $-50 \sim -60$ kcal/mol이며 DPH와 펩타이드간의 결합 에너지는 -18 kcal/mol로서 착물형성에너지만 고려한다면 양이온과의 복합체 형성이 크게 우세하나 양이온의 탈수과정까지를 고려하면 충분히 경쟁적으로 복합체를 형성할 수 있으며 유사한 펩타이드에 대한 실험적으로 알려진 전달 방해의 설명이 가능하다.

프로그램 Super는 초기 기하 변수에 무관하게 원하는 호스트-게스트 착물의 구조를 나타내 주었

으며 결합위치를 예측할 수 있는 두 분자간의 착물형성에 사용될 수 있다. PSH4와 DPH간의 착물형성에 주로 관여하는 위치는 PSH4에서 Gly⁴였으며 이를 Sarcosine으로 치환한다면 이 위치에서 수소결합이 불가능하여 DPH에 의한 양이온 전달방해 효과를 크게 기대할 수 없다. 아울러 DPH에서의 위치별 상호작용에너지 경향은 MM 방법과 MO 방법이 서로 다른 경향을 주었으나 그 차이는 전체 상호작용에너지에 비하면 작았고 페닐기가 치환되지 않은 Hydantoin의 경우도 Diphenyl Hydantoin의 MO 계산결과와 비슷한 점으로 보아 수소결합력이외의 입체적 요소가 DPH 유사체별로의 활성을 결정하는 중요한 요인이 될 수 있다.

본 연구는 1990년도 한국과학재단 연구비의 지원으로 이루어졌으며, 이에 감사드립니다.

인 용 문 헌

- (a) R. M. Izatt, T. S. Bradshaw, S. A. Nielsen, J. D. Lamb, J. J. Christensen, and D. Sen, *Chem. Rev.*, **85**, 271 (1985); (b) F. Vögtle and E. Weber Ed., "Host-Guest Complex Chemistry", Springer-Verlag, Berlin, Germany, 1985.
- (a) A. J. Hopfinger, *J. Comput. Chem.*, **8**, 28 (1987); (b) K. D. Mitchell, *J. Mol. Graph.*, **5**, 75 (1987); (c) R. Venkataraghavan, *Acc. Chem. Res.*, **20**, 322 (1987); (d) W. G. Richards Ed., "Computer-Aided Molecular Design", IBC Technical Service, London, U. K., 1989.
- H. H. Merritt and T. J. Putman, *Arch. Neurol. Psychiatry*, **39**, 1003 (1938).
- (a) D. M. Woodbury, "Antiepileptic Drugs: Mechanisms of Action", p. 305, G. H. Glaser, J. K. Penry, and D. M. Woodbury Ed., Raven Press, New York, U. S. A., 1980; (b) M. Willow, E. A. Kuenzel, and W. A. Catterall, *Mol. Pharmacol.*, **25**, 228 (1984).
- W. A. Catterall, *Ann. Rev. Biochem.*, **55**, 953 (1986).
- (a) M. Noda, S. Shimizu, T. Tanabe, T. Takai, T. Kayano, T. Ikeda, H. Takahashi, H. Nakayama, Y. Kanaoka, N. Minamino, K. Kangawa, H. Matsuo, M. A. Raftery, T. Hirose, M. Notake, S. Inayama, H. Hayashida, T. Miyata, and S. Numa, *Nature*, **312**, 121 (1984); (b) E. M. Kosower, *PEBS Lett.*, **182**, 234 (1985).
- B. C. Pressman, E. J. Harris, W. S. Jagger, and J. H. Johnson, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **58**, 1949 (1967).
- (a) M. Dobler, "Ionophores and Their Structures", Wiley-Intersciences, New York, 1981; (b) Y. A. Ovchinnikov, V. T. Ivanov, and A. M. Shkrob, "Membrane Active Complexons", Elsevier, Amsterdam, 1974.
- S. Wolfe, R. J. Bower, H. -S. Shin, C. -K. Sohn, D. F. Weaver, and K. Yang, *Can. J. Chem.*, **66**, 2751 (1988).
- S. Wolfe, S. Bruder, D. F. Weaver, and K. Yang, *Can. J. Chem.*, **66**, 2703 (1988).
- (a) ECEPP/2, QCPE No. 454, Bloomington, IN, U.S.A., 1982; (b) G. Nemethy, M. S. Pottle, and H. A. Scheraga, *J. Phys. Chem.*, **87**, 1883 (1983).
- MM2/MMP2, CDC Cyber Version, QCPE, Bloomington, IN, 47405, U. S. A., 1985.
- (a) G. S. Rao, R. S. Tygi, and R. K. Mishra, *J. Theo. Biol.*, **90**, 377 (1981); (b) H. A. Scheraga, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **83**, 2782 (1986).
- J. L. Kuester and J. H. Mize, "Optimization Techniques with Fortran", McGraw-Hill Book Company, New York, 1973.
- N. C. Cohen, J. M. Blaney, C. Humblet, P. Gund, and D. C. Barry, *J. Med. Chem.*, **33**, 883 (1990).
- J. -H. Lii, S. Gallion, C. Bender, H. Wikström, and N. L. Allinger, K. M. Flurchick, M. M. Teeter, *J. Comput. Chem.*, **10**, 503 (1989).
- N. L. Allinger, R. K. Kok, and M. R. Imam, *J. Comput. Chem.*, **9**, 591 (1988).
- K. Yang and S. Wolfe, To be published separately.
- M. J. S. Dewar, E. G. Zeobisch, E. F. Healy, and J. J. P. Stewart, *J. Am. Chem. Soc.*, **107**, 3902 (1985).
- PCDISP, Serena Software, Box 3076, Bloomington, IN, U. S. A.
- D. H. Haynes, A. Kowalskey, and B. C. Pressman, *J. Biol. Chem.*, **244**, 502 (1969).
- (a) J. W. H. M. Uiterwijk, S. Harkema, and D. Feil, *J. Chem. Soc., Perkin Trans.*, **II**, 721 (1987); (b) M. Billeter, A. E. Howard, I. D. Kuntz, and P. A. Kollman, *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 8385 (1988); (c) G. Wipff, P. A. Kollman, and J. -M.

- Lehn, *J. Mol. Struct.*, **93**, 153 (1983).
23. M. Levitt, *J. Mol. Biol.*, **170**, 723 (1983).
24. J. Janin, S. Wodak, M. Levitt, and B. Maigret, *J. Mol. Biol.*, **125**, 357 (1978).
25. P. D. J. Grootenhuys and P. A. Kollman, *J. Am. Chem. Soc.*, **111**, 2152 (1989).
26. R. A. Masut and J. N. Kushick, *J. Comput. Chem.*, **6**, 148 (1985).
27. J. H. Poupaert, D. Vandervorst, P. Guiot, M. M. M. Moustafa, and P. Dumont, *J. Med. Chem.*, **27**, 76 (1984).
28. M. G. Wong, J. A. Defina, and P. R. Andrews, *J. Med. Chem.*, **29**, 562 (1986).
29. S. Wolfe, K. Yang, R. J. Bowers, H. -S. Shin, and C. -K. Sohn, *Heterocycles*, **28**, 639 (1989).