

## In Silico Molecular Docking Comparison of Tubocurarine and the Active Ingredients of *Cimicifugae rhizoma* on Acetylcholine Binding Proteins

Dong-Chan Kim\*

Department of Biomedical Laboratory Science, Gimcheon University, Gimcheon 39528, Korea

Received February 13, 2018 / Revised March 20, 2018 / Accepted March 26, 2018

Actein is the well-known active ingredient of *Cimicifugae rhizoma* (Black cohosh). In this study, we investigated and compared the binding affinity of tubocurarine, actein, and actein derivatives on the B&C domain of the acetylcholine binding protein through *in silico* computational docking studies. The three-dimensional crystallographic structure of the acetylcholine binding protein B&C domain was obtained from the PDB database (PDB ID: 2XYT). An *in silico* computational autodocking analysis was performed using PyRx, Autodock Vina, Discovery Studio Version 4.5, and NX-QuickPharm based on scoring functions. The actein showed an optimum binding affinity (docking energy), with the acetylcholine binding protein at -10.50 kcal/mol as compared to the tubocurarine (-9.80 kcal/mol). The interacting amino acids tryptophan 84 and tryptophan 147, in the B domain of the acetylcholine binding protein active site, significantly interacted with the actein and 27-deoxyactein, and (26R)-actein. The centroid XYZ grid position of the tubocurarine was X=38.300689, Y=112.053467, and Z=51.991022, but the actein and its derivatives showed values around X=26.4, Y=127.3, Z=43.7. These results clearly indicated that actein and its derivatives could be a more potent antagonist to the acetylcholine binding protein than tubocurarine. Therefore, the extract of *Cimicifugae rhizoma* or actein containing biomaterials can substitute for the botulinum toxin-mediated acetylcholine receptor regulation, and be applied to the anti-wrinkle cosmetics industry.

**Key words** : Acetylcholine receptor, actein, autodock, binding affinity, *Cimicifugae Rhizoma*

### 서 론

피부는 노화가 진행됨에 따라 이마, 눈, 입 주위 등의 안면이나 신체 각 부위에 눈에 띄는 주름(wrinkle)이 형성된다. 연령 증가에 따라 주름의 수, 깊이, 범위가 비례하여 증대된다[3]. 피부 주름은 피부에 존재하는 각질층의 수분 저하, 표피의 위축, 진피 교원 섬유 및 탄력 섬유의 변성 등 여러가지 내적, 외적 요인이 복합적으로 작용하여 피부의 3차 구조가 변화되고 고유의 탄력성과 신축성이 저하되어 발생하게 된다. 특히 피부 진피와 표피 사이에서 일어난 피부의 주름은 얼굴 근육이 아주 오랜 기간 동안 특정 방향으로 움직인 결과 형성된다. 얼굴 주름 제거를 위해 미용 원료로 널리 활용된 성분은 비타민 A (retinoid, 레티노이드)이며[10], 최근에는 보툴리움 독소 (botulinum toxin, 이하 보톡스)이라는 근육 마비 유도 물질을 의사 처방 하에 주름 부위에 주사하여 주름을 제거하는 성형 수술이 유행하고 있다[6].

보톡스는 혐기성 세균 *Clostridium botulinum*에서 추출한 생물학적 독(toxin)이다. 보톡스가 신경 세포 내부에 침투하게 되면 신경 세포 말단 부위에 신경전달물질 수송에 관여하는 주머니(vesicle) 표면에 존재하는 인식 수용체 SNARE (Soluble N-Ethylmaleimide-Sensitive Factor Attachment Protein Receptor) 형성을 방해하여 신경 세포 말단 시냅스 공간으로 아세틸콜린(acetylcholine) 방출이 중단되고, 이로 인해 얼굴 근육 세포의 세포막에 존재하는 아세틸콜린 수용체(acetylcholine receptor) 활성이 억제되어 안면 근육 마비가 유도된다. 이러한 작용기작으로 인해 보톡스를 피부에 주사하면 매우 빠른 시간 내에 피부 주름이 효과적으로 개선된다[4]. 하지만, 보톡스는 강한 독성으로 인해 전세계 어느 곳에서도 화장품 원료로 사용할 수 없다. 그러므로 피부 주름 제거 효과가 보톡스와 유사하면서 동시에 무독성 또는 안전성을 확보할 수 있는 피부 주름 억제 기능 조성물에 대한 연구가 더욱 필요한 실정이다.

신경 말단에서 분비되는 신경전달 물질 아세틸콜린은 근육 세포막에 존재하는 아세틸콜린 수용체에 결합하여 활성화 시킨다. 아세틸콜린 수용체는 수용체 결합 리간드(ligand)의 종류 따라 무스카린(Muscarinic) 수용체와 니코틴(Nicotinic) 수용체로 나뉘어진다. 그 가운데 니코틴 아세틸콜린 수용체는 아세틸콜린 뿐만 아니라 니코틴과 결합하며, 약 1/1,000초의 지속되는 흥분성 반응을 유발하는 매개체가 된다. 아세틸콜린

#### \*Corresponding author

Tel : +82-54-420-4041, Fax : +82-54-420-4461

E-mail : dckim@gimcheon.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

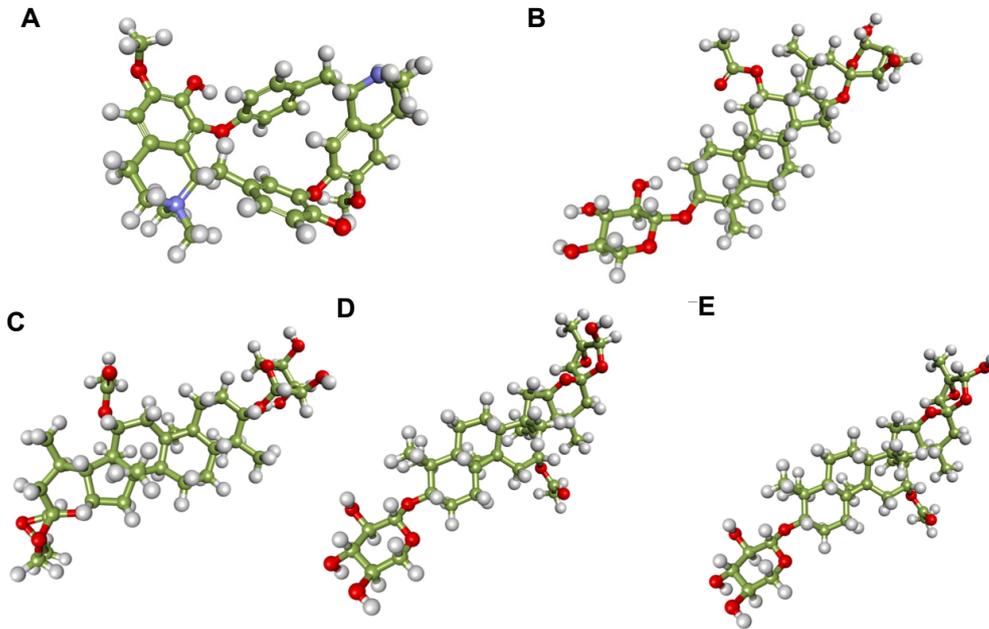


Fig. 1. 3D chemical structure of the AchBP antagonist tubocurarine (A), actein (B), 27-deoxyactein (C), (26S)-actein (D), and (26R)-actein (E).

수용체는 신경계 질환 뿐만 아니라 신경질과 연결된 근육 활성 조절에도 중요한 역할을 하여 혈압증가, 혈관의 이완과 수축, 수족 냉증 유발, 통증 전달에도 관여한다[1].

Tubocurarine (Fig. 1A)은 자연적으로 남아메리카의 *Chondrodendron tomentosum* 이란 식물 껍질에서 발견되는 알칼로이드(alkaloid)성분이다. 남아메리카 인디언이 사냥용 화살의 독으로 사용하였으며, 화학 구조적으로는 benzylisoquinoline의 유도체에 속한다. 약리학적으로는 니코틴 아세틸콜린 수용체의 길항제(antagonist) 작용을 하는 것으로 보고 되었다[5]. 본 연구에는 *in silico* molecular autodocking 분석 방법을 활용하여 여성 호르몬 조절 및 여성 질환 예방을 위한 전통 약재로 널리 처방되어 온[7, 11] 승마(*Cimicifugae Rhizoma*) 추출물에 존재하는 단일 화학 성분들(actein 계열)과 아세틸콜린 결합 단백질(acetylcholine binding protein, 이하 AchBP) 활성 억제제인 tubocurarine과 AchBP에 대한 결합 친화력(binding affinity) 비교 분석을 실시하였다. 결과적으로 본 연구를 통하여 대표적인 승마 추출물 효능 성분인 actein 계열들의 니코틴 아세틸콜린 수용체에 대한 활성 억제 및 보톡스를 대체할 수 있는 피부 주름 억제(anti-wrinkle) 효능을 가진 바이오 신소재로서의 활용 가능성을 제시하고자 한다.

## 재료 및 방법

### *In silico* molecular docking 분석

*In silico* molecular docking 비교 분석을 위해 사용한 software는 기존 선행 연구의 방법을 바탕으로, 2차원, 3차원 구조 분석에 autodock vina PyRx (<http://pyrx.sourceforge.net/>

home) [12]와 Discovery Studio 4.5 (이하 DS4.5) version [9], NX-QuickPharm program [8]을 활용하였다. Tubocurarine과 승마 추출물 생리 활성 성분 actein (Fig. 1B)과 유도체(27-deoxyactein (Fig. 1C), (26S)-actein (Fig. 1D), (26R)-actein (Fig. 1E))들의 결합 타깃 단백질 AchBP의 3차원 구조는 <http://www.rcsb.org>에 등록되어있는 3D 구조(PDB ID: 2XYT)의 domain B와 domain C (이하 domain B&C)를 활용하였다[2]. AchBP 활성 부위에 결합하는 리간드 tubocurarine의 X, Y, Z centroid grid 지표값은 DS4.5에서 X=38.300689, Y=112.053467, Z=51.991022으로 확인되었다. *In silico* autodocking을 위한 최적 외각 dimension(Å)은 X=85.504, Y=77.922, Z=65.699 범위 내에서 tubocurarine과 승마 추출물의 생리 활성 성분 actein과 그 유도체들의 AchBP에 대한 virtual binding affinity profiling을 적용하였다.

### 화학구조 Pubchem CID 및 virtual binding affinity profiling

AchBP antagonist인 tubocurarine (Pubchem CID: 6000)를 비롯하여 actein (Pubchem CID: 24764419), 27-deoxyactein (Pubchem CID: 10974362), (26S)-actein (Pubchem CID: 101203115), (26R)-actein (Pubchem CID: 101203116) 등 화학 성분들의 3차원(3D) 화학 구조는 Pubchem Compound (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pccompound>)에서 제공하는 3D 구조를 바탕으로 *in silico* autodocking 분석 실험에 활용하였다. Virtual binding affinity profiling은 autodock vina PyRx software를 활용하여 tubocurarine과 각 화학 성분들의 AchBP domain B&C에 대한 binding affinity 정량값을 비교

분석하였으며, molecular dynamics 상호 작용 분석, AchBP domain B&C의 특정 아미노산들과 리간드 간의 상호작용 (chemical interaction) 종류, 결합 residue visualization, 및 결합 거리(Å) 분석은 DS4.5과 NX-QuickPharm program을 활용하였다.

**통계 처리**

본 연구의 자료 분석은 SPSS (Statistical Package for the Social Science) WIN 18.0 프로그램 이용하였으며, 반복 실험을 통하여 얻은 모든 분석값은 Mean ± SEM (Standard Error of Mean)으로 나타내었고, 분석된 실험 데이터는 t-test를 실시하여 유의성을 검증하였으며 통계적 유의성 판정을 위한 유의수준은  $p < 0.05$ 은 \*로,  $p < 0.01$ 은 \*\*로 표시하였다.

**결과 및 고찰**

Tubocurarine와 승마 추출물에 함유된 생리 활성 물질 actein과 그 유도체들의 AchBP domain B&C에 대한 molecular docking 비교 분석을 진행하였을 때, tubocurarine의 AchBP domain B&C 활성 부위(active site)에 대한 3D molecular

docking pattern은 Fig. 2A와 같았으며, 2D molecular docking pattern은 Fig. 3A와 같이 분석되었다. 승마 추출물 생리 활성 물질 actein의 AchBP domain B&C 활성 부위에 대한 3D pattern은 Fig. 2A와 같으며, 2D pattern은 Fig. 3B와 같이 분석되었다. Actein의 유도체 27-deoxyactein의 AchBP domain B&C 활성 부위에 대한 3D pattern은 Fig. 2B와 같으며, 2D pattern은 Fig. 3C, (26S)-actein의 AchBP domain B&C 활성 부위에 대한 3D pattern은 Fig. 2C와 같으며, 2D pattern은 Fig. 3D, (26R)-actein의 AchBP domain B&C 활성 부위에 대한 3D pattern은 Fig. 2D와 같으며, 2D pattern은 Fig. 3E와 같이 분석되었다. Fig. 2F 박스 안에 표현된 결과에서 확인할 수 있듯이 기존 docking template에서 확인되는 tubocurarine의 AchBP domain B&C에 3D pattern 결합 부위 및 상호작용 형태 (docking pose)와 본 실험을 통하여 얻어진 tubocurarine의 AchBP domain B&C에 대한 docking pose가 매우 유사한 XYZ grid 값 및 3차원 분석 결과에서도 대부분 overlap 되는 것을 확인할 수 있었다. 이는 본 연구에서 수행된 *in silico* 분석 방법이 기존 선행 연구들과서와 마찬가지로 높은 신뢰성을 가진다고 볼 수 있다.

Tubocurarine은 AchBP domain B&C 활성부위에 위치하는

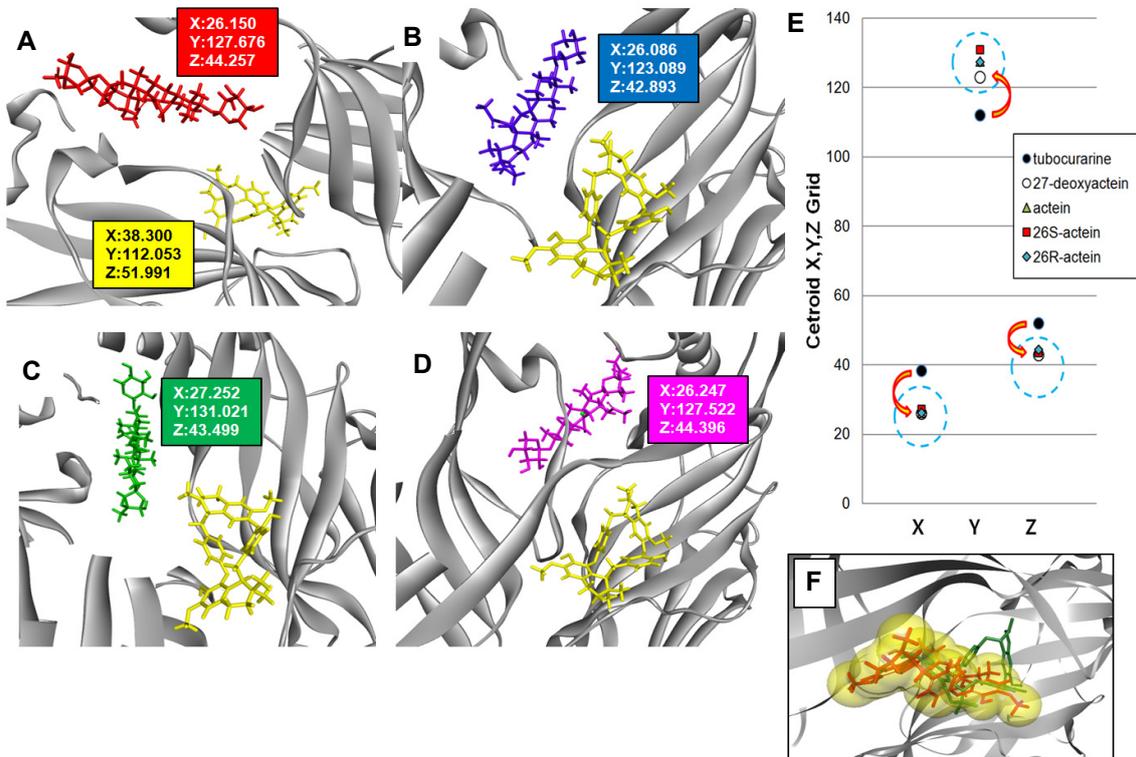


Fig. 2. *In silico* molecular 3D docking pattern of the tubocurarine (yellow color stick), actein (red color stick) (A), 27-deoxyactein (blue color stick) (B), (26S)-actein (green color stick) (C), and (26R)-actein (purple color stick) (D) with the AchBP domain B&C (grey ribbon). The graph represents the X, Y, Z centroid grids of the tubocurarine, actein, and actein derivatives on the AchBP domain B&C active site (E). Superposition 3D patterns of tubocurarine docking pose on the AchBP domain B&C downloaded from 2XYT PDB template (green color stick in box) and from PyRx-docking module (red color stick in box) (F).

9개의 아미노산(AchBP domain B: TYR91, ALA139, LYS141, TRP145, TYR186 / AchBP domain C: TYR53, SER164, SER165, TYR166)과 상호 작용을 하였으며(Fig. 2A and Fig. 3A) 그 중 TYR91, ALA139, TRP145, SER164, TYR166, TYR186 아미노산 들과는 Carbon-Hydrogen 결합을, TYR53, TRP145, TYR186 아미노산들과는 Pi-Pi T shaped 결합을, LYS141, TRP145 아미노산들과는 Pi-Alkyl 결합을, TYR91 아미노산과는 Pi-Pi stacked 결합을, LYS141 아미노산과는 Pi-Cation 결합을, SER 165 아미노산과는 Pi-Donor Hydrogen 결합을 하였다(Fig. 3A). Actein은 AchBP domain B&C 활성 부위에 존재하는 8개의 아미노산(AchBP domain B: MET17, GLN56, TRP84, PRO86, ILE88, GLN119, TYR147 / AchBP domain C: ILE104)과 상호작용을 하였으며(Fig. 2A and Fig. 3B), 그 중 PRO86 아미노산과는 Carbon-Hydrogen 결합을, GLN56, TRP84, ILE88, TYR147 아미노산들과는 conventional hydrogen 결합을, MET17, ILE104 아미노산들과는 Alkyl 결합을, TRP84 아미노산과는 2개의 Pi-Alkyl 결합을 하였다(Fig. 3B). 27-deoxyactein은 AchBP domain B&C 활성 부위에 존재하는 6개의 아미노산(AchBP domain B: TRP84, VAL99, TYR147 / AchBP domain C: SER79, PRO102, ILE104)과 상호작용을 하였으며(Fig. 2B and Fig. 3C), 그 중 SER79, TRP84, VAL99, TYR147 아미노산과는 conventional hydrogen 결합을, PRO102, ILE104 아미노산들과는 Alkyl 결합을 하였다(Fig. 3C). (26S)-actein은 AchBP domain B&C 활성 부위에 존재하는 7개의 아미노산(AchBP domain B: MET17, TRP84, THR85 / AchBP domain

C: MET5, SER9, ASN13, ILE104)과 상호작용을 하였으며(Fig. 2C and Fig. 3D), 그 중 MET5, SER9, TRP84 아미노산들과는 conventional hydrogen 결합을, MET17, ILE104 아미노산과는 Alkyl 결합을, THR85 아미노산과는 carbon hydrogen 결합을, TRP84와는 Pi-Alkyl 결합을, ASN13 아미노산과는 unfavorable dono-donor 결합을 하였다(Fig. 3D). (26R)- actein 은 AchBP domain B&C 활성 부위에 존재하는 6개의 아미노산(AchBP domain B: GLN56, TRP84, ILE88, GLN119, TYR147 / AchBP domain C: LYS8)과 상호작용을 하였으며(Fig. 2D and Fig. 3E), 그 중 LYS8, GLN56, TRP84, TYR147 아미노산과는 conventional hydrogen 결합을, TRP84 아미노산과는 Pi-Alkyl 결합을, ILE88 아미노산과는 carbon hydrogen 결합을, GLN119 아미노산과는 unfavorable donor-donor 결합을 하였다(Fig. 3E).

Tubocurarine이 acetylcholine binding protein에 결합하고 있는 정확한 PDB 정보가 [www.rcsb.org](http://www.rcsb.org) 에는 2XYS, 2XYT, 3PMZ 이렇게 총3가지 PDB ID의 연구 결과들이 upload 되어 있다. 2XYS, 2XYT, 3PMZ 모두 *Aplysia Californicad*에서 기원한 것 이다. 단, 3PMZ는 *homo sapiens* express system에서 발현 하였다고 하나, 아직 관련 구조 3PMZ에 대한 연구 논문이 공식 발표 이전이라 본 연구의 reference로 활용하기가 어려웠다. 그리하여, AChBP에 대한 tubocurarine의 결합 구조가 가장 명확하게 밝혀진 2XYT를 docking template로 사용하였다. 또한 통상적으로 다른 종에 기원한 AchBP라 하더라도 Human AchBP와의 매우 높은 구조적 유사성을 나타내므로 이러한

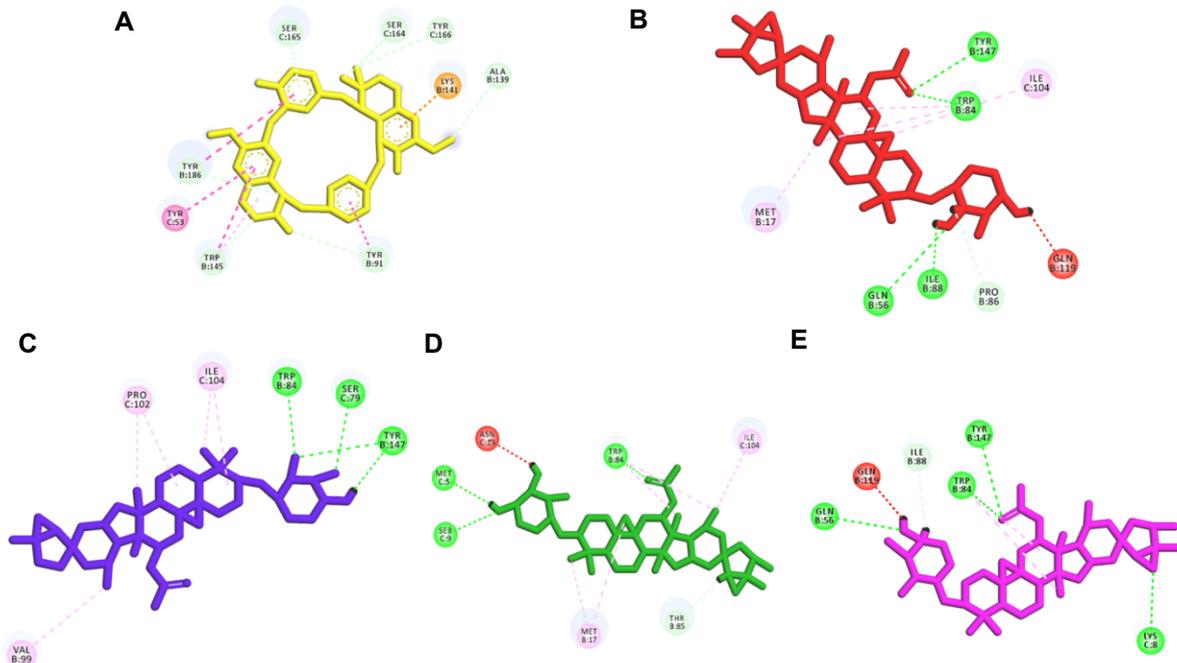


Fig. 3. *In silico* molecular 2D docking pattern of the (A) tubocurarine (yellow color stick), (B) actein (red color stick), (C) 27-deoxyactein (blue color stick), (D) (26S)-actein (green color stick), (E) (26R)-actein (purple color stick) with the AchBP domain B&C amino acids.

Table 1. Binding affinity of the tubocurarine, actein, and actein derivatives on the AchBP domain B&amp;C active site

	Max binding affinity (kcal/mol)	Average binding affinity (kcal/mol)	SEM (n = # of binding mode)
Tubocurarine on the AchBP	-9.80	-8.79	±0.49(n=9)
Actein on the AchBP	-10.50	-9.27*	±0.68(n=9)
27-deoxyactein on the AchBP	-10.60	-9.20*	±0.86(n=9)
(26S)-actein on the AchBP	-9.80	-8.98*	±0.50(n=9)
(26R)-actein on the AchBP	-10.50	-9.54*	±0.47(n=9)

\* $p < 0.05$ .

연구 방법이 acetylcholin receptor ligand에 관한 약리학적 연구에서 널리 허용되고 있다.

PyRx autodock vina로 분석된 tubocurarine의 AchBP domain B&C에 대한 binding mode 가운데 최대 결합 친화도(binding affinity)는 -9.80 kcal/mol, 평균 결합친화도는 -8.79 kcal/mol로 나타났다(Table 1). 반면, actein과 AchBP domain B&C 간의 최대 결합 친화도는 -10.50 kcal/mol, 평균 결합친화도는 -9.27 kcal/mol로 나타났으며, 27-deoxyactein과 AchBP domain B&C 간의 최대 결합 친화도는 -10.60 kcal/mol, 평균 결합친화도는 -9.20 kcal/mol, (26S)-actein과 AchBP domain B&C 간의 최대 결합 친화도는 -9.80 kcal/mol, 평균 결합친화도는 -8.98 kcal/mol, (26R)-actein과 AchBP domain B&C 간의 최대 결합 친화도는 -10.50 kcal/mol, 평균 결합친화도는 -9.54 kcal/mol로 나타났다. Tubocurarine과 actein 그리고 actein 유도체들의 AchBP에 대한 결합 친화도 값을 비교한 결과 대조군인 tubocurarin 보다 승마 추출물의 생리활성물질 actein 계열이 AchBP domain B&C 활성 부위에 대하여 상대적으로 매우 우수한 결합 친화도를 나타내었다(Table 1).

이상의 실험 결과들을 분석해 볼 때, 승마 추출물에 존재하는 actein 성분과 그 유도체들이 tubocurarine에 비하여 AchBP domain B&C와의 상호작용에 있어서 상대적으로 유리한 결합 조건을 가지고 있음을 시사하고 있다. 여기서 특별히 AchBP domain B 존재하는 TRP84 아미노산의 경우, actein과 actein 유도체 모두와 공히 상호작용(conventional hydrogen 결합) 하는 것으로 분석되었다(Fig. 3). 또한 결합친화도 최대 값과 평균값이 상대적으로 대조군 tubocurarine에 비해 높게 분석된 actein, 27-deoxyactein, (26R)-actein의 경우 AchBP domain B에 존재하는 TYR147 아미노산과 conventional hydrogen 결합을 추가적으로 하고 있는 것을 볼 수 있었다. 즉, tubocurarine과 AchBP domain B&C과의 상호작용에서는 볼 수 없는 actein 계열 성분들의 TRP84, TYR147 아미노산들과 conventional hydrogen 결합이 AchBP domain B&C 활성 조절에 있어서 매우 중요한 역할을 하는 주요 인자로 작용할 수 있는 것으로 예상되었다. 또한 승마 추출물 내에 존재하는 actein 계열 성분이 기존 리간드 tubocurarine 보다 AchBP domain B&C 활성 부위에 훨씬 더 안정적으로 결합 할 수 있다는

약리학적 상호작용의 가능성을 제시해 주며 동시에 actein 및 그 유도체가 tubocurarine 보다 상대적으로 우수하게 AchBP domain B&C 활성을 조절 할 수 있는 것으로 사료된다. 앞서도 언급하였지만, AchBP domain B&C 활성부위에 tubocurarine의 결합 X, Y, Z centroid grid는 X=38.300689, Y=112.053467, Z=51.991022로 확인되었다. 이에 반하여 actein과 actein 유도체들의 AchBP domain B&C 활성부위에 대한 centroid grid는 4개의 성분 모두 X=26.4344405, Y=127.3273438, Z=43.761824 주변으로 확인되었다(Fig. 2E). 즉, actein과 actein 유도체 모두 tubocurarine이 결합하는 부위와는 매우 동떨어진 부위에서 AchBP domain B&C와 상호작용을 하는 것으로 보인다. 즉, actein 유도체끼리는 모두 비슷한 3차원적 공간에서 overlap 하고 있는 것으로 분석되었다. 본 연구에 이어 향후 flexible docking을 추가적으로 수행한다면 AchBP domain B&C의 아미노산 잔기들 가운데 어떠한 잔기들이 rotatable하게 설정되었는지 설명이 가능할 것으로 판단된다.

동양 의학 뿐만 아니라 서양의학에서도 승마 추출성분은 전통적으로 여성 호르몬 조절 및 여성 질환 예방과 치료를 위해 널리 활용되었다[7, 13]. Woo 등의 선행 연구에서는 승마 추출 생리 활성 성분 중 하나인 cimicifugoside가 부신수질(adrenal chromaffin)세포의 세포막에 발현하여 세포내 칼슘 생성과 카테콜아민(catecholamine) 분비에 관여하는 아세틸콜린 수용체의 활성을 효과적으로 억제함을 규명한 바 있다[13]. 결론적으로 본 연구를 통하여 대표적인 승마 추출물 효능 성분인 actein과 actein 계열 유도체 성분들의 아세틸콜린 수용체에 대하여 tubocurarine에 비해 AchBP와 높은 상호작용 및 결합친화도를 가진다는 것을 확인하였고 이를 통하여 아세틸콜린 수용체의 활성 억제 가능성 또한 예상 할 수 있었다. 그러므로 본 연구 결과를 바탕으로 승마 추출물 또는 승마 추출물 내에 존재하는 다양한 생리활성 물질을 효과적으로 활용함으로써, 피부 주름 제거 효능은 보톡스와 유사하면서 동시에 무독성(비독성) 또는 안전성을 확보할 수 있는 피부 주름 억제 기능 의약품 또는 화장품 성분 개발이 가능할 것으로 사료된다. 본 연구에서 얻어진 molecular docking 결과를 바탕으로, 향후 cell based assay 또는 *in vitro* binding assay 실험을 추가적으로 추진하여 *in silico* molecular docking 결과와 실제 실험 결과와의 높은 신뢰성과 연관성을 규명하는 것 또

한 신약후보물질 개발 및 기능성 바이오 소재 탐색 연구에 있어서 매우 유용한 분석 기법으로서의 의미를 지닌다고 사료된다.

### 감사의 글

본 연구는 김천대학교 교내 연구과제(과제번호 gc16064)로 수행되었습니다. 또한 결과 분석에 기술적 도움을 주신 이운호 박사님과 NX-QuickPharm program을 활용하도록 도움을 주신 주식회사 뉴로넥스 연구진에도 감사를 전합니다.

### References

1. Auerbach, A. 2015. Activation of endplate nicotinic acetylcholine receptors by agonists. *Biochem. Pharmacol.* **97**, 601-608.
2. Brams, M., Pandya, A., Kuzmin, D., van Elk, R., Krijnen, L., Yakel, J. L., Tsetlin, V., Smit, A. B. and Ulens, C. 2011. A structural and mutagenic blueprint for molecular recognition of strychnine and d-tubocurarine by different cytochrome loop receptors. *PLoS Biol.* **9**, e1001034.
3. Calleja-Agius, J., Muscat-Baron, Y. and Brincat, M. P. 2007. Skin ageing. *Menopause Int.* **13**, 60-64.
4. Duplantier, A. J., Kane, C. D. and Bavari, S. 2016. Searching for therapeutics against botulinum neurotoxins: a true challenge for drug discovery. *Curr. Top. Med. Chem.* **16**, 2330-2349.
5. Gao, F., Bern, N., Little, A., Wang, H. L., Hansen, S. B., Talley, T. T., Taylor, P. and Sine, S. M. 2003. Curariform antagonists bind in different orientations to acetylcholine-binding protein. *J. Biol. Chem.* **278**, 23020-23026.
6. Green, J. B. and Keaney, T. C. 2017. Aesthetic treatment with botulinum toxin: approaches specific to men. *Dermatol. Surg.* **43 Suppl 2**, S153-S156.
7. Hill, D. A., Crider, M. and Hill, S. R. 2016. Hormone therapy and other treatments for symptoms of menopause. *Am. Fam. Physician* **94**, 884-889.
8. Kim, D. C. 2017. Identification of quercetin as a potential band 3 protein antioxidant using ektacytometry and *in silico* molecular docking technology. *Int. J. Appl. Engin. Res.* **12**, 8812-8816.
9. Lim, S., Othman, R., Yusof, R. and Heh, C. 2017. Rational drug discovery of HCV helicase inhibitor: Improved docking accuracy with multiple seedings of Autodock Vina and in situ minimization. *Curr. Comput. Aided Drug Des.* **13**, 160-169.
10. McDaniel, D. H., Mazur, C., Wortzman, M. S. and Nelson, D. B. 2017. Efficacy and tolerability of a double-conjugated retinoid cream vs 1.0% retinol cream or 0.025% tretinoin cream in subjects with mild to severe photoaging. *J. Cosmet. Dermatol.* **16**, 542-548.
11. Rice, S., Amon, A. and Whitehead, S. A. 2007. Ethanolic extracts of black cohosh (*Actaea racemosa*) inhibit growth and oestradiol synthesis from oestrone sulphate in breast cancer cells. *Maturitas* **56**, 359-367.
12. Trott, O. and Olson, A. J. 2010. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J. Comput. Chem.* **31**, 455-461.
13. Woo, K. C., Park, Y. S., Jun, D. J., Lim, J. O., Baek, W. Y., Suh, B. S. and Kim, K. T. 2004. Phytoestrogen cimicifugoside-mediated inhibition of catecholamine secretion by blocking nicotinic acetylcholine receptor in bovine adrenal chromaffin cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **309**, 641-649.

## 초록 : *In Silico* 분자결합 분석방법을 활용한 tubocurarine과 승마 추출성분 actein의 아세틸콜린 결합 단백질 활성 부위에 대한 결합 친화도 비교 분석

김동찬\*

(김천대학교 임상병리학과)

Actein은 널리 알려진 승마 추출물의 주요 생리 활성 효능 성분이다. 본 연구에서는 acetylcholine 수용체의 활성을 억제하는 것으로 활용된 AchBP 단백질 길항제(antagonist) tubocurarine과 승마 추출물의 효능 성분 actein 및 actein 유도체(27-deoxyactin, (26S)-actein, (26R)-actein)들의 AchBP 단백질 B와 C domain 활성 부위에 대한 친화도 분석 실험을 컴퓨터 분자결합 분석 방법을 통해 비교하였다. AchBP 단백질 B와 C domain의 3차원 구조 정보는 PDB database (PDB ID: 2XYT)를 활용하였다. *In silico* 결합 분석을 수행하기 위해 PyRx, Autodock Vina, Discovery Studio Version 4.5, and NX-QuickPharm 프로그램을 각 분석 조건에 따라 활용하였다. AchBP 단백질 B와 C domain 활성 부위에 대한 actein의 최대 결합친화도는  $-10.50$  kcal/mol로 나왔으며 이는  $-9.80$  kcal/mol로 분석된 tubocurarine의 결합 친화도 보다 훨씬 더 높고 효율적인 것으로 분석되었다. Tubocurarine에 비하여 결합친화도 값이 높게 분석된actein, 27-deoxyactein, (26R)-actein 유도체 성분들과 상호작용 하는 AchBP 단백질 활성 부위의 아미노산들 가운데 tryptophan 84와 tyrosine 147이 높은 결합친화도를 형성하는데 매우 중요한 역할을 하는 아미노산으로 예상이 되었다. Tubocurarine의 AchBP 단백질 활성 부위에 대한 X,Y,Z Grid 값은  $X=38.300689$ ,  $Y=112.053467$ ,  $Z=51.991022$ 으로 나왔으나 actein과 actein 유도체들은 대부분  $X=26.4$ ,  $Y=127.3$ ,  $Z=43.7$  값 주변에 centroid grid를 형성하였다. 즉, tubocurarine이 결합하는 부위와는 다른 부위에 결합하여 AchBP의 활성에 영향을 주는 것으로 사료되었다. 이상의 연구 결과들을 분석해 볼 때, 아세틸콜린 수용체 길항제 tubocurarine보다 승마 추출물 생리 활성 물질인 actein과 그 유도체들이 보다 더 효율적인 아세틸콜린 수용체 길항제로 작용할 수 있음을 확인하였다. 결론적으로 승마 추출물 또는 actein 성분은 피부 주름 개선 효능을 지닌 보톡스를 대체하거나 또는 주름 개선용 화장품 신물질 연구 개발 분야에 효율적으로 활용할 수 있을 것으로 사료된다.