

Chlorsulfuron 및 Imazaquin에 의한 옥수수 Acetolactate Synthase 활성의 저해특성

황인택 · 김기주 · 이희재 · 조광연* · 전재철**

Inhibition Characteristics of Chlorsulfuron and Imazaquin on Acetolactate Synthase Activity of Corn Plants

Hwang I.T., K.J. Kim, H.J. Lee, K.Y. Cho*, and J.C. Chun**

ABSTRACT

The inhibition characteristics of chlorsulfuron [CHL, 2-chloro-*N*-[[(4-methoxy-6-methyl-1,3,5-triazin-2-yl)amino]carbonyl]benzenesulfonamide] and imazaquin [IMA, 2-[4,5-dihydro-4-methyl-4-(1-methyl-1H-5-oxo-1H-imidazol-2-yl)-3-quinolinecarboxylic acid] on acetolactate synthase(ALS) activity of corn plants were investigated. CHL and IMA rapidly inhibited ALS activity of corn plants *in vitro*. Their I_{50} values for ALS activity were 100nM and 5 μ M, respectively, indicating that CHL had 50 times more inhibitory effect on ALS activity than IMA. The first applied herbicide had a dominant inhibitory effect on ALS activity when the two herbicides were applied sequentially. Branched-chain amino acids, valine(Val), leucine(Leu), and isoleucine(Ile) showed a feedback inhibition on ALS activity ; Val or Leu had a more inhibitory effect on ALS activity than Ile. Branched-chain amino acids and CHL or IMA exhibited an additive effect on inhibiting ALS activity. This suggests that branched-chain amino acids inhibit ALS activity by a different mechanism(s) from that of CHL or IMA. Apparent ALS activity, which was measured on the basis of the conversion of pyruvate to acetolactate, was decreased by the addition of 2-ketobutyrate into the ALS reaction mixture in a concentration-dependent manner. In addition, kinetic studies revealed that CHL acts as a noncompetitive inhibitor, while IMA acts as an uncompetitive inhibitor to ALS with respect to pyruvate.

Key words : acetolactate synthase, additive effect, branched-chain amino acids, chlorsulfuron, feedback inhibition, imazaquin, interaction, kinetic study, sequential treatment, simultaneous treatment, synergistic effect.

* 한국화학연구소(KRICT, P.O. Box 107, Yusong, Taejeon, 305-606, Korea).

** 전북대학교 농화학과(Department of Agricultural Chemistry, Chonbuk National University, Jeonju 561-756,

Korea)

<1996. 1. 30 접수>

서 언

분지아미노산의 생합성경로(그림 1)에 공통적으로 작용하는 4개의 효소들 가운데 첫번째 효소인 acetolactate synthase(ALS)는 최소한 3가지 구조 화합물 즉 sulfonyleurea(SU), imidazolinone(IM) 및 triazolopyrimidine(TP)계 제초제의 공통 작용점으로 알려져 있다^{2,16,17,25,27,28}. 이러한 ALS 저해 제초제를 식물체에 처리하면 먼저 성장점 부위와 신생엽에 황화현상과 괴사현상이 나타나고 시간이 경과하면서 식물체의 다른 부위로 증상이 확대된다. ALS 저해 제초제에 의한 전형적인 증상은 anthocyanine 함량의 증가로 엷백이 붉은 색을 나타낸다는 것이다^{2,4}. 한편 ALS 저해 제초제의 처리로 감수성 식물의 성장저해가 수시간 이내에 이루어지지만, 육안으로 증상이 관찰되기까지는 수일 또는 수주일이 필요하다. ALS 저해 제초제의 살초작용이 서서히 일어나는 원인을 Goldberg & John⁶은 다음과 같이 설명하였다. 즉, ALS의 저해로 인하여 분지아미노산이 생합성되지 않으면 체내의 가용성 단백질이 분지아미노산으로 분해되며, 이들이 모두 소모될 때까지 살초작용이 발현되지 않기 때문이라고 하였다.

ALS 저해 제초제에 의한 살초작용은 크게 2가지로 나누어 설명되고 있다. 첫째, ALS가 저해되면 분지아미노산인 valine(Val), leucine(Leu), isoleucine(Ile)의 생합성이 이루어지지 않기 때문에 이들을 구성요소로 하는 단백질의 합성이 저해되어 식물체가 고사된다는 것^{13,14,23}과, 둘째, 이들 제초제를 처리하면 *Salmonella typhimurium*과 같은 미생물의 경우에는 ALS의 기질 중 하나인 2-ketobutyrate가 축적되고 좁개구리밥(*Lemna minor* L.)과 같은 수생식물에서는 2-ketobutyrate의 transamination화 산물인 α -amino-n-butyrate가 축적되어(그림 2) 축적된 기질의 독작용에 의해 미생물이나 식물이 죽게 된다는 것이다^{5,12}. 그러나 아직까지 이러한 keto acid들의 독작용이 고등식물에서는 밝혀지지 않았으며, Shaner & Singh²⁴에 의하면 옥수수에

imazaquin(IMA)을 처리하면 2-ketobutyrate와 α -amino-n-butyrate의 축적이 이루어지나 이들의 축적이 생육저해와는 관련이 없었다고 하였다. ALS 저해 제초제의 처리 후 가장 빠르게 나타나는 생리적 증상으로 세포분열의 저해를 들 수 있는데, ALS의 저해와 세포분열의 저해와의 관련성에 대해서도 아직 뚜렷하게 밝혀지지 않고 있다^{11,18,19,20}.

이와 같이 ALS가 SU, IM 및 TP계 제초제의 일차적인 작용점이라는 사실은 잘 알려져 있

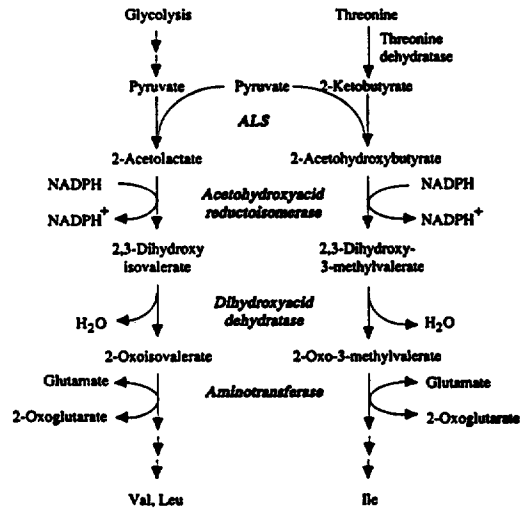


Fig. 1. Biosynthesis of branched-chain amino acids.

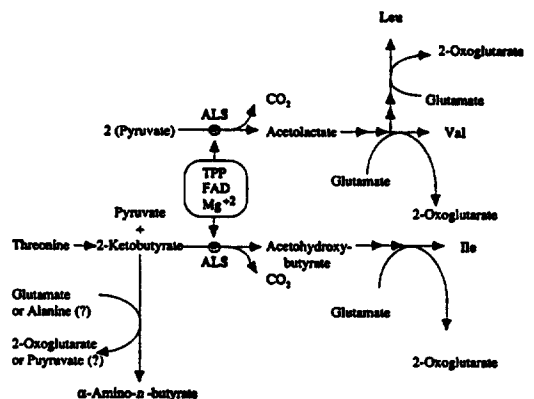


Fig. 2. A tentative scheme to account for the accumulation of α -amino-n-butyrate in responses to ALS inhibitors. ⊗, site of action of ALS inhibitors.

지만 ALS가 저해된 후 식물체의 고사가 이루어지기까지의 일련의 과정은 아직 불분명하다. 구조적으로 서로 다른 SU, IM 및 TP계 제초제들이 공통적으로 동일한 ALS를 저해하지만, 이들의 결합부위 및 결합양식이 서로 다르거나, ALS 동위효소의 존재로 반응이 다르게 나타날 수 있고, 또한 동일한 제초제에 대한 친화도가 식물에 따라 다를 수 있다고 보고되어 있다^{4,7,8,9,15,26}. 한편, SU계 제초제에 저항성인 유전인자를 가진 옥수수 품종의 IM 및 TP계 제초제에 대한 저항성계수의 차이가 크게 나타난다는 사실로 미루어 이들 제초제들이 저해하는 ALS는 동일한 효소가 아니라는 보고도 있다^{4,10,15,22,23}.

따라서 본 연구에서는 SU 및 IM계의 대표적인 약제 chlorsulfuron(CHL)과 imazaquin(IMA)를 이용하여 두 약제의 ALS에 대한 상호작용을 옥수수 잎으로부터 추출한 ALS를 대상으로 조사하였다. 또한 ALS의 기질인 pyruvate 및 2-ketobutyrate에 대한 친화도, CHL 및 IMA의 ALS에 대한 혼합반응, CHL 및 IMA에 의한 ALS활성의 저해특성 등에 대한 일련의 실험을 통하여 두 제초제의 ALS에 대한 저해양식의 차이 및 혼합작용의 특성을 알아보려고 하였다.

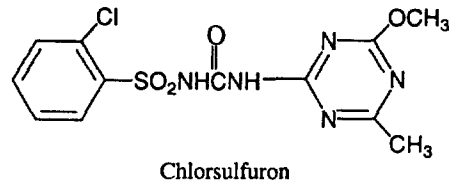
재료 및 방법

1. 식물재료 및 제초제

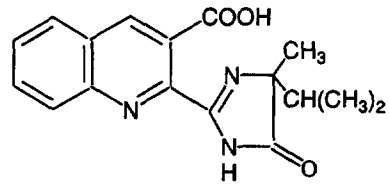
식물재료는 국립종자공급소에서 분양받은 옥수수(형성옥)의 종자를 발토양을 충전한 플라스틱 포트에 파종하여 온실(25±5℃)에서 10일간 키운 식물체의 지상부를 사용하였다. 실험에 사용한 제초제는 한국화학연구소 제초제연구실에서 합성한 것으로 구조는 그림 3에 나타내었다.

2. ALS의 추출 및 활성 측정

ALS는 Shaner²³의 방법을 약간 변형하여 추출하였다. 옥수수의 지상부를 50g씩 수확하여 액체질소로 동결시킨 뒤 막자사발을 이용하여 마쇄하고, 5mM MgCl₂, 10mM sodium pyruvate



2-chloro-N-[(4-methoxy-6-methyl-1,3,5-triazin-2-yl)amino]carbonyl]benzenesulfonamide



2-[4,5-dihydro-4-methyl-4-(1-methylethyl)-5-oxo-1H-imidazol-2-yl]-3-quinolinecarboxylic acid

Fig. 3. Chemical structures of herbicides used in this study.

를 용해시킨 0.1M potassium phosphate 완충용액(pH 7.5) 100ml를 넣어 균질화시킨 후 1꺼의 Miracloth로 거른 여액을 15,000xg, 4℃에서 15분간 원심분리하여 상등액을 취하였다. 이 상등액을 ammonium sulfate(25-50%)로 분별침전시킨 후 20,000xg, 4℃에서 20분간 원심분리하여 침전물을 취하였다. 원심분리로 얻어진 침전물을 0.1M potassium phosphate 완충용액에 현탁시켜 동일한 완충용액으로 포화된 Sephadex G-25 컬럼을 통과시켰다. 컬럼으로부터 활성부위만을 취하여 조효소로 사용하였다.

효소의 반응은 1ml의 조효소액에 0.9ml의 반응액(10mM MgCl₂, 10mM sodium pyruvate, 0.1mM thiamine pyrophosphate(TPP), 10μM flavine adenine dinucleotide(FAD))를 용해시킨 50mM potassium phosphate 완충용액, pH 7.5)을 첨가하면서 개시하였고, 30℃의 수조에서 30분간 반응시킨 후 10N의 H₂SO₄를 30μl씩 넣어 반응을 종료시켰다.

효소활성은 Westerfeld²⁹의 방법에 따라 생성된 acetoin의 양을 다음과 같이 측정하였다. 반응이 종료된 시료를 60℃의 항온수조에서 15

분간 decarboxylation시키고 0.5%(w/v)의 creatine 용액과 10% NaOH에 용해시킨 5%(w/v)의 1-naphthol용액을 각각 0.5ml씩 넣고 vortex mixer로 약 10초간 섞은 다음 60°C의 항온수조에서 15분간 발색시켰다. 발색반응이 끝난 각 시료를 2,860g에서 3분간 원심분리하여 얻은 상등액의 흡광도를 530nm에서 측정하였다. 효소의 활성은 같은 방법으로 작성한 acetoin의 standard curve를 이용하여 단위시간에 생성되는 단백질 mg당 acetoin의 양으로 표시하였다. 단백질의 양은 Bradford¹⁾의 방법으로 측정하였다.

3. CHL 및 IMA에 의한 ALS 활성의 저해

CHL 또는 IMA의 원제를 acetone으로 용해시켜 반응액 또는 조효소액에 최종농도가 각각 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10, 100 μ M이 되도록 처리한 후 ALS의 활성을 측정하였다. 또한 반응시간 및 제조제의 처리순서에 따른 ALS 활성은 0.01, 0.1, 1 μ M의 CHL 또는 1, 10, 100 μ M의 IMA를 효소액에 첨가하고 5분 후 반응액을 첨가하거나, 역으로 제조제를 반응액에 첨가하고 5분 후 효소액을 첨가하고 5, 10, 30, 60분 간격으로 생성된 acetoin의 양을 측정하였다. ALS에 대한 두 제조제의 혼합처리효과를 조사하기 위해 100nM의 CHL과 10 μ M의 IMA를 효소반응액에 동시처리하거나 10분 간격으로 선후 교차 처리한 후 ALS의 활성을 측정하였다.

4. ALS 활성에 미치는 분지아미노산과 2-ketobutyrate의 영향

분지아미노산이 ALS 활성에 미치는 영향은 Val, Leu 및 Ile을 각각 1mM씩 반응액에 첨가하여 반응시킨 후 생성되는 acetoin의 양을 비교하여 조사하였다. 또한 이들 아미노산을 2가지 또는 3가지 조합으로 각각 1mM씩 처리하여 ALS 활성에 미치는 영향을 조사하였고, 3가지 분지아미노산을 각각 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1mM씩 처리하여 농도에 따른 ALS 활성을 조사하였다. 3가지 분지아미노산과 두 제조제의 상호작용을 알아보하고자 이들 각 아미노산 1mM에 1nM의 CHL 및 10 μ M의 IMA를 혼합처

리하여 그 저해양상을 조사하였다. ALS의 기질에 대한 친화도는 pyruvate 100mM이 포함된 반응액에 2-ketobutyrate를 각각 10, 20, 40, 80, 100mM의 농도가 되도록 첨가하여 반응시킨 후 ALS 활성을 측정하여 조사하였다. 또한 기질에 대한 제조제의 반응차이를 조사하기 위해 1nM의 CHL을 첨가하여 제조제가 첨가되었을 때의 반응도 함께 조사하였다.

5. CHL 및 IMA에 의한 ALS 활성의 저해 특성

옥수수의 잎으로부터 추출한 조효소와 기질인 pyruvate를 1, 2, 3.3, 10, 20, 33.3, 100mM의 농도로 첨가한 반응액에 CHL을 10, 50, 100nM 또는 IMA를 1, 5, 10 μ M의 농도로 각각 처리하여 30분간 반응시킨 후 생성되는 acetoin의 양을 측정하였다. 여기에서 얻은 결과로부터 반응속도의 역수를 $1/v$ 로, 기질농도의 역수를 $1/S$ 로 하여 Lineweaver-Burk 공식에 따라 도시하여 각 제조제에 의한 ALS 활성의 저해특성을 조사하였다.

결과 및 고찰

1. ALS 활성에 대한 CHL과 IMA의 혼합처리효과

CHL 및 IMA처리에 의한 ALS 활성의 저해효과를 옥수수의 잎으로부터 추출한 ALS를 대상으로 조사한 결과 CHL에 의한 저해효과는 약 10nM의 농도에서부터 나타나기 시작하여 100 μ M의 농도에서는 95% 이상 저해하였다. 한편, IMA에 의한 저해효과는 1 μ M의 농도에서부터 나타나기 시작하여 100 μ M의 농도에서 80% 정도 저해하였다(그림 4). ALS에 대한 50% 활성저해 농도인 I_{50} 값은 CHL의 경우 약 100nM 이었고, IMA의 경우에는 5 μ M로 나타나 CHL이 IMA보다 약 50배 정도 높은 ALS 저해활성을 가지고 있었다.

ALS에 대한 두 제조제의 상호작용을 알아보기 위해 추출한 ALS에 0.01, 0.1, 1 μ M의 CHL과 1, 10, 100 μ M의 IMA를 상호 조합처리하여

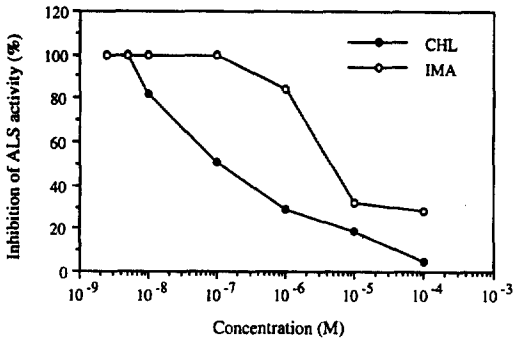


Fig. 4. Effect of CHL and IMA on the ALS activity of corn plants.

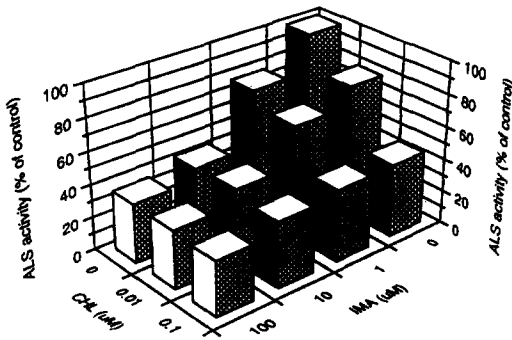


Fig. 5. Interaction between CHL and IMA on inhibition of ALS activity from corn plants.

ALS 활성의 저해정도를 조사한 결과 옥수수 생장에 대한 온실실험에서의 동시처리효과¹¹⁾와 유사한 결과를 나타내었다(그림 5). 두 제초제의 농도조합이 저농도일 때에는 어느 정도 상가적인 결과가 나타났으나, 고농도의 조합처리에서는 뚜렷한 상호작용이 없었다. 온실실험 및 ALS에 대한 실험을 통하여 나타낸 두 제초제의 상호작용은 높은 관련성을 나타내는 경향이었으므로 ALS의 저해가 생육저해의 일차적인 원인으로 작용하는 것으로 생각되었다.

한편, 이들 두 제초제가 ALS에 결합되어 효소활성을 저해하는데 필요한 시간을 조사하기 위해 반응시간별로 acetoin의 생성량을 조사한 결과, CHL은 0.1 및 1μM의 농도에서 IMA는 10 및 100μM의 농도에서 약 10분 이내에 ALS의 활성을 현저히 저해하는 것으로 나타났다(그림 6). 그러나 이들 두 제초제가 저농도로

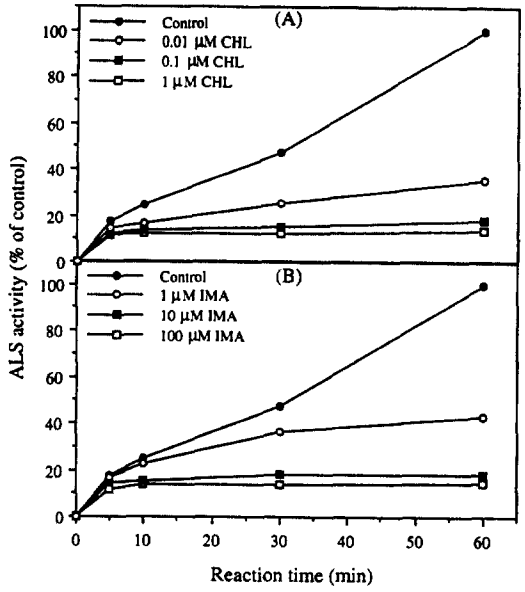


Fig. 6. Inhibition of ALS activity by CHL(A) and IMA(B).

처리되었을 때는 고농도에 비해 시간이 경과함에 따라 acetoin의 생성량이 약간 증가하는 경향이였다. 고농도에서 두 제초제에 의한 ALS 활성이 10분 이내에 저해되었으므로, CHL은 100nM, IMA는 10μM의 농도를 선발하여, 각 제초제를 먼저 효소액에 첨가한 후 반응액을 첨가하면서 반응을 시작하여 10분 간격으로 상호 조합처리하였다. ALS 활성은 주로 먼저 처리한 제초제에 의해 저해되었으며, 온실실험에서 나타난 상승적인 효과¹¹⁾는 나타나지 않았다(그림 7). 이러한 결과로 미루어 CHL이나 IMA 중 어느 한 화합물이 먼저 결합하게 되면 다른 화합물의 결합이 저해됨으로써, 먼저 처리한 제초제의 저해작용이 지배적으로 나타나는 것으로 생각되었다. 한편, 시험관내에서의 실험에서 ALS에 대한 두 제초제의 상호작용을 조사하는 경우 ALS의 기질로 pyruvate만 사용하기 때문에 2-ketobutyrate를 기질로 사용하는 경로에 대한 저해효과는 측정할 수 없다⁷⁾. 따라서 온실실험에서 나타난 상승적인 결과¹¹⁾는 시험관내에서의 실험에서는 측정되지 않는 Ile의 합성 경로(그림 1)에 대한 저해활성이 발현되어 나타난 결과로 생각된다.

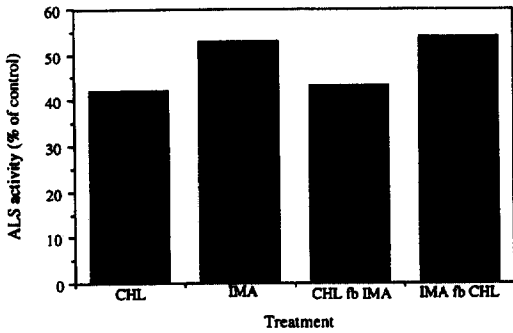


Fig. 7. Relationship between CHL and IMA on inhibition of ALS activity from corn plants. CHL and IMA were applied at a concentration of 100nM and 10 μ M, respectively. fb, followed by.

2. ALS 활성에 대한 분지아미노산의 영향

분지아미노산이 ALS 활성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 3가지 분지아미노산을 각각 1mM씩 처리하여 비교한 결과, 분지아미노산들은 모두 ALS 활성을 저해하였다. 3가지 분지아미노산 중 Ile을 첨가하면 ALS 활성이 약 20% 감소되었고, Val 또는 Leu을 첨가하면 약 40% 감소되었다(그림 8). 이들 아미노산을 2가지씩 조합처리하였을 때는 Val과 Ile의 조합에서 40%, Ile과 Leu조합에서 60%, Val과 Leu의 조합에서 65%의 저해정도를 나타내어 Val과 Leu의 조합이 ALS 활성을 가장 크게 저해하였다. 또한, 3가지 아미노산을 동시에 각각 1mM씩 처리하였을 때에도 ALS 활성이 약 65% 정도 감소되었다. 한편, 3가지 분지아미노산을 각각 0.1, 0.2, 0.4, 0.8mM씩 반응액에 첨가한 결과 이들 아미노산을 각각 1mM씩 첨가하는 것과 유사한 60% 정도의 ALS 활성이 감소되었다(결과제시생략). 또한 이들 아미노산과 두 제초제간의 상호작용을 살펴보기 위해 3가지 분지아미노산을 각각 1mM씩 처리하고 여기에 10 μ M의 CHL 또는 1 μ M의 IMA를 처리한 결과 ALS 활성에 대한 상가적인 저해효과가 나타났다(그림 9). ALS 활성의 Val, Leu 및 Ile에 의한 feedback 저해는 옥수수 이외의 다른 식물에서도 보고되어 있으며 분지아미노산의 생합성과정중 threonine으로부터 2-ketobutyrate를 생성하는데 관여하는 효소인 threonine dehydratase

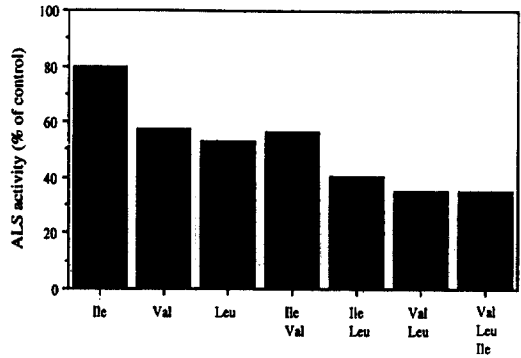


Fig. 8. Effects of branched-chain amino acid Val, Leu, and Ile on ALS activity of corn plants. All branched-chain amino acids were applied at a concentration of 1mM.

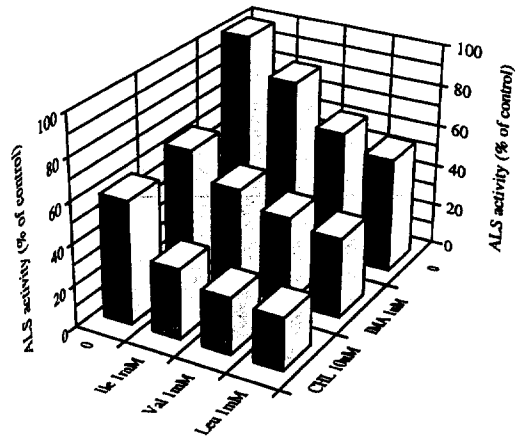


Fig. 9. Interaction between branched-chain amino acid and CHL or IMA on inhibition of ALS activity from corn plants.

(그림 1)에 대해서도 분지아미노산에 의한 feedback 저해가 이루어진다고 알려져 있다^{3,13,14,23}) 이들 분지아미노산에 의해 어떻게 ALS 활성이 저해되는지에 대해서는 아직 명확하게 알려져 있지 않으나, 이들 분지아미노산이 ALS의 반응자리가 아닌 다른 특정부위에 결합하여 효소의 활성을 저해하는 것으로 추측되며, 이러한 분지아미노산에 의한 ALS 활성의 feedback 저해는 CHL이나 IMA에 의해 증대되는 경향이 있으므로(그림 9) 제초제에 의한 효소의 활성저해와는 다른 양상으로 이루어지는 것으로 생각된다.

3. ALS 활성에 대한 2-ketobutyrate의 영향

ALS는 3가지 분지아미노산을 만드는 생합성 과정에서 2분자의 pyruvate을 중합하여 acetolactate를 생성하는 반응과, 1분자의 pyruvate와 1분자의 2-ketobutyrate을 중합하여 acetoxybutyrate를 생성하는 반응을 촉매한다(그림 1, 2). 이러한 ALS의 반응에는 여러 보조인자들이 관여하는데 TPP와 FAD는 효소의 활성화에 관여하며, Mg^{+2} 은 촉매작용에 직접 관여하지 않지만 효소의 안정화에 관여한다고 알려져 있다^{3,21)}(그림 2). ALS에 의해 생성된 acetolactate의 최종산물은 Val과 Leu이며, acetoxybutyrate의 최종산물은 Ile이다. 이와 같이 ALS는 분지아미노산의 생합성과정중 2가지 다른 반응을 동시에 촉매하므로 CHL과 IMA에 의한 ALS의 저해양상이 pyruvate가 아닌 다른 기질인 2-ketobutyrate에 대해서도 동일하게 나타나는지 조사하기 위해 10, 20, 40, 80, 100mM의 2-ketobutyrate를 100mM의 pyruvate가 들어있는 반응액에 첨가하여 ALS의 활성을 측정하였다. 2-ketobutyrate를 첨가하면 ALS에 의해 생성되는 acetoin의 양이 pyruvate만을 기질로 첨가하였을 때보다 감소되었으며 첨가된 2-ketobutyrate의 농도가 증가할수록 이러한 경향이 증대되었다. 즉, 2-ketobutyrate를 10mM 첨가하였을 때에는 acetoin의 생성량이 20% 정도 감소하였고, 100mM을 첨가하였을 때에는 70% 이상이 감소하였다(그림 10). 이러한 결과는 효소와 결합할 수 있는 기질의 양이 한정적이기 때문에 pyruvate만을 반응액에 첨가하였을 경우에는 ALS가 모두 pyruvate와 결합하여 acetolactate만을 생성물로 만들게 되나 2가지의 기질 즉, 2-ketobutyrate와 pyruvate가 반응액에 공존할 때에는 acetolactate와 acetoxybutyrate가 동시에 생성물로 만들어지기 때문인 것으로 생각된다. 따라서 2-ketobutyrate의 첨가로 acetolactate의 생성이 상대적으로 감소될 것이며, ALS의 활성은 생성된 acetolactate를 acetoin으로 변환시켜 측정하는데 acetoxybutyrate는 acetoin으로 변환되지 않기 때문에 측정가능한 ALS의 활성이 낮아지게 된다. 또한 2가지 기질을 100mM씩

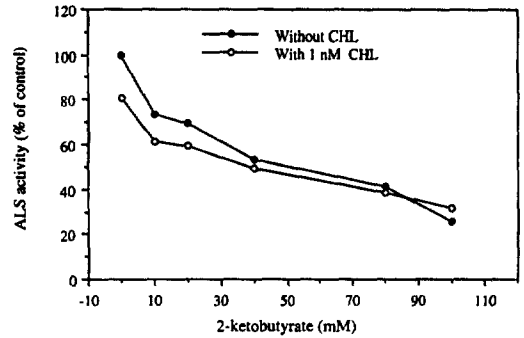


Fig. 10. Interaction between 2-ketobutyrate and CHL on inhibition of ALS activity from corn plants.

같은 농도로 첨가한 경우에는 ALS활성이 80% 이상 감소하였는데 이는 2-ketobutyrate를 기질로 하여 만들어진 acetoxybutyrate가 생성물의 80% 이상을 차지하기 때문일 것으로 생각되었다. 이러한 결과로부터 옥수수 ALS는 pyruvate보다 2-ketobutyrate에 대한 기질친화도가 높을 것으로 추측되었다. 한편 2-ketobutyrate와 함께 1nM의 CHL을 처리하였을 때의 acetoin 생성량은 2-ketobutyrate만을 처리하였을 때보다 다소 낮게 나타났다(그림 10). 이는 2-ketobutyrate에 의한 acetolactate의 생성물 감소와 더불어 CHL에 의한 ALS의 활성저해가 동시에 일어나기 때문인 것으로 생각된다.

4. CHL 및 IMA에 의한 ALS 활성의 저해 특성

CHL 및 IMA의 ALS에 대한 저해양상을 알아보기 위해 효소의 반응속도를 조사하였다. 반응액의 pyruvate농도를 달리하여 조사한 ALS의 활성을 Lineweaver-Burk plot으로 나타내어 계산한 옥수수 ALS의 K_m 값은 $2.5\mu M$ 이었다(그림 11). Pyruvate에 대한 ALS의 K_m 값은 CHL에 의해 변화되지 않았으나 IMA에 의해서는 농도의존적으로 감소되었다. 또한 CHL은 ALS의 기질인 pyruvate에 대해 비경쟁적 저해양상(noncompetitive inhibition)을 나타내었고(그림 11A) IMA는 반경쟁적 저해양상(uncompetitive inhibition)을 나타내었다(그림 11B). 그러므로 CHL은 ALS의 반응자리에 대한 pyruvate와의 경쟁없이 독

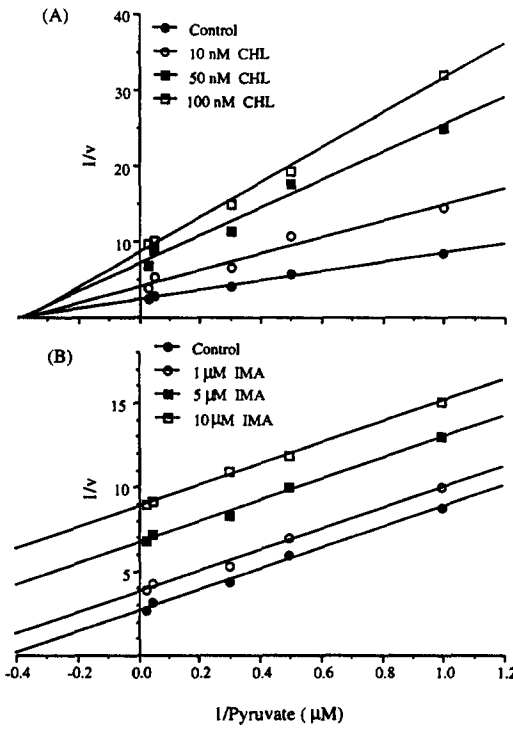


Fig. 11. Lineweaver-Burk plots of ALS in the absence and presence of CHL(A) or IMA(B).

립적으로 효소활성을 저해하는 반면 IMA는 효소와 복합체를 형성하여 효소가 pyruvate와 결합할 수 없게 함으로써 효소의 활성을 저해하는 것으로 설명할 수 있다.

적 요

옥수수 잎으로부터 추출한 ALS를 대상으로 하여 CHL과 IMA의 상호작용, ALS의 기질인 pyruvate 및 2-ketobutyrate에 대한 친화도, 저해 양식의 차이 등을 조사한 결과는 다음과 같다.

1. ALS에 대한 CHL의 I_{50} 값은 100nM이었으며 IMA의 값은 5μM로 나타나 CHL의 ALS 저해활성은 IMA보다 약 50배 정도 높았다.
2. ALS에 대한 시험관내에서의 실험에서 두 제초제의 동시처리시 상가적인 ALS의 저해효과가 나타났으나, 상호 순차적 체계처리의 경우에는 먼저 처리한 제초제에 의한 저해효과가 지배적으로 나타났다.

3. 제초제에 의한 ALS 활성의 저해는 시험관 내에서 10분 이내에 대부분 이루어졌다.
4. ALS의 활성은 분지아미노산에 의해 저해되었는데 Val과 Leu에 의한 저해가 Ile에 의한 저해보다 크게 나타났다. 또한 이들을 동시에 혼합처리하면 0.1mM의 농도에서도 ALS의 활성이 65% 정도 저하되었다.
5. 2-Ketobutyrate를 ALS의 기질로 첨가하면 pyruvate만을 기질로 사용하였을 때보다 측정 가능한 ALS 활성이 2-ketobutyrate에 의해 농도의존적으로 감소되는 경향이였다.
6. ALS의 기질인 pyruvate에 대해 CHL은 비경쟁적 저해제로 IMA는 반경쟁적 저해제로 작용하였다.

인 용 문 헌

1. Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72 : 248-254.
2. Caroline, S. 1991. *Sulfonylurea Herbicides*. PJB Publications. Richmond, VA. pp.51-60.
3. Ciskanik, L.M. and J.V. Schloss. 1985. Reaction intermediates of the acetolactate synthase reaction : Effect of sulfometuron-methyl. *Biochem.* 24 : 3357-3360.
4. Durner, J., V. Gailus, and P. Böger. 1991. New aspects on inhibition of plant acetolactate synthase by chlorsulfuron and imazaquin. *Plant Physiol.* 95 : 1144-1150.
5. Epplevaum, S. and D. Landstein. 1992. Is the inhibitory effect of the herbicide sulfometuron-methyl due to 2-ketobutyrate accumulation? *In* B.K. Singh, H. Flores, and H. Shannon (eds.) *Biosynthesis and Molecular Regulation of Amino Acids in Plants*. Amer. Soc. Plant Physiol., Rockville, MD. pp.352-353.
6. Goldberg, A.L. and A.C. John. 1976. Intracellular protein degradation in mammalian and

- bacterial cells. Part 2. *Annu. Rev. Biochem.* 45 : 747-755.
7. Gollop, N., Z. Barak, and D.M. Chipman. 1987. A method for simultaneous determination of the two possible products of acetohydroxy acid synthase. *Anal. Biochem.* 160 : 323-331.
 8. Hay, J.V. 1990. Chemistry of sulfonylurea herbicides. *Pestic. Sci.* 29 : 247-262.
 9. Hawkes, T.R. and J.L. Howard. 1989. Herbicides that inhibit the biosynthesis of branched-chain amino acids. In A.D. Dodge(ed.) *Herbicides and Plant Metabolism*. Cambridge University Press, Cambridge. pp.113-137.
 10. Hawkes, T.R. and S.E. Thomas. 1990. Imidazolinones : Factors determining their herbicidal efficacy. *Proc. Workshop. Biosynthesis of Branched-Chain Amino Acids*. pp.373-389.
 11. 김기주 · 황인택 · 최정섭 · 조광연 · 변종영. 1996. Chlorsulfuron과 imazaquin에 대한 옥수수의 생리적 반응. *한잡초지*. 16(1) : 인쇄중.
 12. LaRossa, R.A. and T.K. van Dyk. 1987. Toxic accumulation of α -ketobutyrate caused by inhibition of the branched-chain amino acid biosynthetic enzyme acetolactate synthase in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* 169 : 1372-1378.
 13. Mifflin, B.J. 1971. Cooperative feedback control of barley acetohydroxyacid synthetase by leucine, isoleucine, and valine. *Arch. Biochem. Biophys.* 146 : 542-550.
 14. Mifflin, B.J. and P.R. Cave. 1972. The control of leucine, isoleucine, and valine biosynthesis in a range of higher plants. *J. Exp. Bot.* 23 : 511-516.
 15. Muhitch, M.J. and D.L. Shaner. 1987. Imidazolinones and acetohydroxyacid synthase from higher plants. *Plant Physiol.* 83 : 451-456.
 16. Pillmor, J.B. and J.C. Caseley. 1987. The biochemical and physiological effects and mode of action of AC 222,293 against *Alopecurus myosuroides* Huds. and *Avena fatua* L. *Pestic. Biochem. Physiol.* 27 : 340-349.
 17. Ray, T.B. 1981. Studies on the mode of action of DPX-4189. *Proc. Br. Crop Prot. Conf. Weeds* 1 : 7-14.
 18. Rost, T.L. 1984. The comparative cell cycle and metabolic effects of chemical treatments on root tip meristems. III. Chlorsulfuron. *J. Plant Growth Regul.* 3 : 51-63.
 19. Rost, T.L. and R. Thomas. 1985. Reversal of chlorsulfuron-induced inhibition of mitotic entry by isoleucine and valine. *Plant Physiol.* 77 : 481-482.
 20. Rost, T.L. and F. Daniel. 1990. Is there a relationship between branched-chain amino acid pool size and cell cycle inhibition in roots treated with imidazolinone herbicides? *J. Plant Growth Regul.* 9 : 227-232.
 21. Schloss, J.V. 1984. Interaction of the herbicide sulfometuron-methyl with acetolactate synthase : A slow binding inhibitor in flavins and flavoproteins. In R.C. Bray, P.C. Engel, and S.C. Mayhew(eds.) *Walter de Gruyter & Co., Berlin*. pp.737-740.
 22. Shaner, D.L., B.K. Singh, and M.A. Stidham. 1990. Interaction of imidazolinones with plant acetohydroxy acid synthase : Evidence for *in vivo* binding and competition with sulfometuron-methyl. *J. Agric. Food Chem.* 38 : 1279-1282.
 23. Shaner, D.L. 1986. Physiological responses of corn(*Zea mays*) to AC 243,977 in combination with valine, leucine, and isoleucine. *Pestic. Biochem. Physiol.* 25 : 248-257.
 24. Shaner, D.L. and B.K. Singh. 1993. Phytotoxicity of acetohydroxyacid synthase inhibitors is not due to accumulation of 2-ketobutyrate and/or 2-aminobutyrate. *Plant Physiol.* 103 : 1221-1226.
 25. Shaner, D.L. 1991. The Imidazolinone Herbi-

- cides. CRC Press, Boca Raton, FL. pp.71-90.
26. Singh, B.K. and M.A. Stidham. 1988. Separation and characterization of two forms of acetoxy acid synthase from black mexican sweet corn cells. *J. Chromat.* 444 : 251-261.
27. Stidham, M.A. 1991. Herbicides that inhibit acetoxyacid synthase. *Weed Sci.* 39 : 428-434.
28. 武田俊司. 1987. スルホニウレア系除草剤の第一次作用点と選択性機構. *日本農薬学会誌.* 12 : 759-768.
29. Westerfeld, W.W. 1948. A colorimetric determination of blood acetoin. *J. Biol. Chem.* 161 : 495-502.