

## Triazolopyrimidine계 저해제와 보리 Acetolactate Synthase와의 상호작용

李載涉 · 張秀翼 · 南宮成鍵<sup>1</sup> · 申正休<sup>1\*</sup> · 崔正道\*

충북대학교 생화학과

<sup>1</sup>서울여자대학교 화학과

<sup>1\*</sup>서울대학교 화학과

(1998. 2. 17 접수)

### Interaction of Barley Acetolactate Synthase with Triazolopyrimidine Inhibitors

Jae-Soeb Lee, Soo-Ik Chang, Sung-Keon Namgoong<sup>1</sup>, Jung-Hyu Shin<sup>1\*</sup>, and Jung-Do Choi\*

Department of Biochemistry, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea

<sup>1</sup>Department of Chemistry, Seoul Woman's University, Seoul 139-774, Korea

<sup>1\*</sup>Department of Chemistry, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

(Received February 17, 1998)

**요 약.** Acetolactate synthase(ALS)는 박테리아, yeast, 그리고 고등 식물에서 가치를 가진 아미노산 Val, Leu, Ile의 생합성에 공통적으로 관여하는 필수적인 효소이다. 최근에 개발된 sulfonylurea, imidazolinone, triazolopyrimidine, 그리고 pyrimidyl-oxy-benzoate계 제초제들은 구조적으로 상호 유사성이 없음에도 불구하고 모두 ALS를 작용 표적으로 한다. Triazolopyrimidine(TP)계의 새로운 유도체들을 합성하여 보리의 ALS에 대해 저해활성을 측정하였다. 활성을 나타낸 저해제들의 IC<sub>50</sub> 값은 3.2 nM-0.62 mM로 몇 개의 유도체는 뛰어난 활성을 보였다. 보리 ALS에 대해 triazolopyrimidine 유도체 TP4의 저해활성은 반응 시간이 증가함에 따라 증가하였고, 혼합형 저해유형을 보여주었다. TP4와 imidazolinone 제초제인 Cadre, 그리고 feedback 저해제인 Leu에 대한 dual inhibition 실험 결과 모두 평행한 kinetic pattern이 얻어져 이들 저해제의 결합 부위가 최소한 부분적으로 중복되는 부분이 있음을 시사했다. ALS의 Tyr의 변형은 TP4에 의한 저해 효과를 감소시키는 반면 Trp과 Cys 변형은 TP4의 결합에 영향을 나타내지 않았다.

**ABSTRACT.** Acetolactate synthase (ALS) is the common enzyme in the biosynthesis of branched chain amino acids, Val, Leu, and Ile in bacteria, yeast, and higher plants. The enzyme is target site of several classes of structurally diverse herbicides, including the sulfonylureas, the imidazolinones, the triazolopyrimidines, and the pyrimidyl-oxy-benzoates. We have synthesized new triazolopyrimidine (TP) derivatives, and determined their inhibitory activities on barley ALS. IC<sub>50</sub> values for the active compounds were 3.2 nM-0.62 mM, and some of them appeared to be potent inhibitors. The progress curves for inhibition of ALS by TP4, a representative derivative, indicated that the extent of inhibition increased with incubation time. The inhibition of ALS by TP4 showed mixed-type inhibition with respect to pyruvate. Dual inhibition analyses of TP4 versus imidazolinone Cadre and feedback inhibitor Leu suggested that three different classes of inhibitors bind to ALS in a mutually exclusive manner. Chemical modification of tyrosyl residues of ALS decreased sensitivity of ALS to TP4, while modification of tryptophan and cysteine did not affect the sensitivity.

### 서 론

Acetolactate synthase(ALS, EC 4.1.3.18)는 bacteria, yeast, 그리고 고등식물에서 필수 아미노산인 Val,

Leu, Ile의 생합성 과정에 공통적으로 관여하는 효소이다. ALS는 두분자의 pyruvate로부터 Val, Leu의 생합성 중간체인 2-acetolactate의 생성을 촉매하고,

또한 pyruvate와 2-ketobutyrate로부터 Ile의 생합성 중간체인 2-aceto-2-hydroxybutyrate를 생성하는 촉합 반응을 촉매한다. 고등식물과 미생물에서 ALS가 활성을 갖기 위해선 thiaminepyrophosphate(TPP), Mg<sup>2+</sup>, 그리고 flavin adenine dinucleotide(FAD)의 보조 인자를 필요로 한다.<sup>1-3</sup>

ALS에 대해 가장 활발히 연구가 수행된 bacteria에서는 세종류의 isozyme(ALS I, II, III)이 발견되었으며, 이들은 각기 다른 조절기작에 의해 생합성되는 것으로 밝혀졌다.<sup>4,5</sup> *E. coli* K12 strain로부터 정제된 ALS I은 large subunit(60 kDa)과 small subunit(9.5 kDa)이 1:1 몰비로 구성되어 있으며, pyruvate의 존재하에서 활성을 갖는 최대 분자량은 200 kDa로 보고되었다.<sup>6</sup> ALS II는 *Salmonella typhimurium*의 유전자를 *E. coli*에서 발현시켜 분리 정제하였는데 분자량이 140 kDa으로서 2개의 large subunit(59.3 kDa)과 2개의 small subunit(9.7 kDa)로 구성되어 있다.<sup>1</sup> 그리고 ALS III는 ilvH 유전자에 의해 encoding되어 있는 62 kDa의 large subunit과 ilvI 유전자에 의해 encoding되어 있는 17 kDa의 small subunit으로 구성되어 있음이 밝혀졌다.<sup>7</sup> Yeast에서 ALS는 낮은 함량과 불안정성 때문에 순수하게 정제하지 못하였으며, 최근 *Saccharomyces cerevisiae* ALS를 *E. coli*에서 대량 발현시켜 정제 하였다.<sup>8</sup> 활성을 갖는 yeast ALS는 75 kDa의 분자량을 갖는 2개의 subunit으로 구성된 dimer로 보고되었다.<sup>8</sup> 식물 ALS도 낮은 함량과 불안정성 때문에 순수 정제에 어려움이 많아 subunit 구성, 효소학적 특성, 그리고 구조와 기능의 상관관계 등 기본적인 연구가 아직 초보적 단계에 있다. 1988년 Duner와 Boger는 보리로 부터 ALS를 거의 순수하게 정제하였는데 한 polypeptide의 분자량이 58 kDa, 그리고 활성도를 갖는 ALS(native form)의 분자량이 440 kDa과 200 kDa이라고 보고하였다.<sup>9</sup> 그 후, 1993년 Beckkaoui 등은 anti-ALS antibody로 Western blot을 수행하여 보리를 비롯한 밀, 옥수수 등에 존재하는 ALS의 분자량이 64 kDa임을 보고하였다.<sup>10</sup> 최근 보리로 부터 순수한 ALS가 정제되어 subunit의 분자량이 64 kDa임이 확인되었으며 몇가지 효소학적 성질이 보고되었다.<sup>11</sup>

박테리아의 ALS는 Val, Leu, 그리고 Ile에 의해 multivalent repression을 받으며,<sup>12</sup> 고등식물에 있어서는 보리와 완두의 ALS가 Val, Leu, 그리고 Ile에

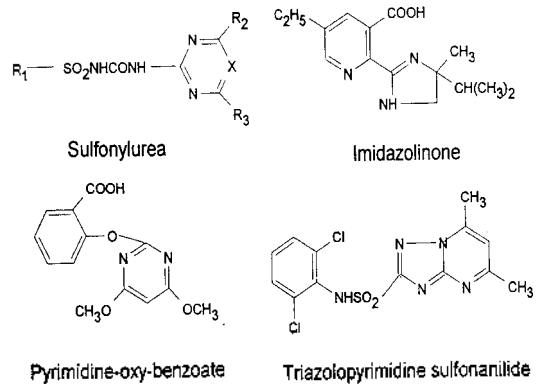


Fig. 1. Four chemical families of herbicides known to inhibit acetolactate synthase.

의해 feedback 저해가 있음이 보고되었다.<sup>13,14</sup> ALS는 가치를 가진 아미노산의 생합성을 조절하는데 중요한 역할을 하는 것으로 판단된다.

최근에 개발된 제초제중 Du Pont의 sulfonylurea,<sup>15,16</sup> American Cyanamide의 imidazolinone,<sup>17</sup> Dow Elanco의 triazolopyrimidine,<sup>18</sup> 그리고 pyrimidyl-oxy-benzoate<sup>19</sup>는 Fig. 1에서 보는 바와 같이 서로 구조적으로 유사성이 없음에도 공통적으로 ALS를 불활성화(inactivation)시켜 제초 활성을 갖는다는 연구 결과들이 보고되었다. Schloss<sup>20</sup> 등은 여러 가지 제초제들과 ALS와의 상호작용을 연구하여, 제초제들이 ALS에 대해 상호 경쟁적으로 결합한다는 것을 보고하였다. ALS mutant들에 대한 cross-resistance 유형을 조사한 결과 다른 계열, 그리고 같은 계열의 다른 제초제들의 결합부위가 서로 중복되는 부분과 중복되지 않는 부분이 함께 존재한다는 것이 제시되었다.<sup>21-23</sup> 본 연구실에서는 새로운 제초제 개발을 위하여 sulfonylurea계와 imidazolinone계,<sup>24</sup> pyrimidyl-oxy(thio)-benzoate계,<sup>19</sup> 그리고 4,6-dimethoxypyrimidine계<sup>25</sup> 저해제들을 합성하여 식물 ALS와의 상호작용을 조사하였다.

본 연구에서는 기존에 알려진 제초제들의 구조와 활성관계를 바탕으로 새로운 triazolopyrimidine 계열의 제초제를 합성하여 보리 ALS와의 상호작용을 조사하였다. Triazolopyrimidine 유도체의 저해활성과 저해유형을 알아보고, ALS와의 결합에 다른 저해제들과 경쟁적 관계 여부를, 그리고 제해제의 결합에 어떤 아미노산이 관여하는지를 화학적 변형에 의한 방법으로 조사하였다.

## 실 험

**시 약.** 본 연구에 사용된 저해제인 triazolopyrimidine 유도체들의 합성은 서울대 신정휴 교수 연구실과 서울여대 남궁성건 교수 연구실에서 이미 알려진 합성 경로<sup>30,31</sup>를 응용하여 수행하였으며, NMR과 IR을 이용하여 생성물의 순도를 확인하였다. Cadre는 한국 화학 연구소의 김대황 박사 연구실에서 합성한 것을 제공받았다. Sodium pyruvate, thiamine-pyrophosphate(TPP), flavin adenine dinucleotide(FAD), magnesium chloride, dithiothreitol(DTT), L-Leu, L-Val,  $\alpha$ -naphthol, creatine, ethylenediaminetetra acetic acid(EDTA), dimethyl sulfoxide(DMSO), Sephadex G-25, N-bromosuccinimide(NBS), N-ethylmaleimide 그리고 N-acethylimidazol은 Sigma Chemical Co.로 부터 구입하였다. Potassium dihydrogen phosphate와 dipotassium hydrogen phosphate는 Junsei Chemical Co.로 부터 구입하였고, 그외 다른 시약은 최상급을 여러 회사로 부터 구입하였다.

**보리의 ALS 분리.** 보리 씨앗을 12시간 정도 물에 담근 후 질석에 과중하여 7일간 25°C의 암실에서 재배한 후 줄기를 잘라 ALS 분리에 사용하였다. 보리 줄기 120 g을 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA, 50  $\mu$ M FAD, 5 mM L-Leu, 1 mM DTT와 15% glycerol을 포함하는 50 mM Tris-HCl(pH 7.8) 표준 완충용액 480 ml에 넣고 mixer로 40초씩 4번 균질화하였다. 균질화된 추출물을 8점의 cheese cloth에 거르고 cell debris를 20,000 g에서 8분간 원심 분리하여 제거하였다. 상층액에 30-45% ammonium sulfate saturation으로 분별 침전하여 침전물을 얻었다. 침전물을 최소량의 표준 완충용액에 녹인 후 Sephadex G-25 칼럼에 통과시켰다. 이때 얻은 시료를 적당한 양으로 나누어 -70°C, 또는 액체질소통에 보관후 필요시 사용하였다.

**효소 활동도 측정.** ALS 활동도는 Westerfield 방법을<sup>26</sup> 약간 변형한 Ray 방법에<sup>16</sup> 따라 측정하였다. TPP(0.5 mM), 10  $\mu$ M FAD, 20 mM pyruvate를 포함하는 20 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>(pH 7.0) 완충용액에 효소를 넣고 총 부피가 200  $\mu$ l가 되게 한다. 37°C에서 1시간 동안 반응시킨 후, 6 N 황산(H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)을 20  $\mu$ l 첨가하여 반응을 중지 시킨후 65°C에서 15분간 두면서 acetolactate를 탈카르복실화 시킨다. Creatine 200  $\mu$ l(0.5%), 0.5%  $\alpha$ -naphthol 200  $\mu$ l을 각각 넣고

65°C에서 15분간 incubation 한 후 실온에서 15분간 방치한다. 이 반응 용액을 525 nm에서 흡광도를 측정한다. 활동도 측정에서 흡광도 0.62는 0.1 mM acetolactate의 생성에 해당된다.<sup>16</sup>

**Triazolopyrimidine(TP) 유도체에 의한 저해.** 각각의 저해제들은 dimethyl sulfoxide(DMSO)에 녹인 후 0.1% 이내의 DMSO가 포함되도록 assay 용액에 첨가해 활동도를 측정하여 저해제를 첨가하지 않는 대조 실험 결과와 비교하였다. 저해제의 IC<sub>50</sub> 값은 주어진 조건에서 ALS 활동도를 50% 감소시키는 저해제의 농도를 의미하는데 다음과 같은 식을 이용하여 구하였다.<sup>16</sup>

$$\% \text{ Activity} \equiv 100 / (1 + [\text{In}] / \text{IC}_{50})$$

$$100\% \text{ Activity} \equiv 1 + [\text{In}] / \text{IC}_{50}$$

여기서 % Activity는 저해제 존재 하에서 얻은 활동도를 대조 실험의 활동도에 대해 %로 나타낸 것이며, [In]는 저해제의 농도이다. 저해유형에 관한 실험은 기질의 농도를 2-32 mM 범위에서 다양하게 준비하고 TP4의 농도를 2, 5, 10, 20  $\mu$ M로 각각 준비한 후 전체 반응 용액 안에 여러 농도의 기질 용액과 고정된 농도의 저해제 용액을 넣고 효소액을 첨가하여 반응을 시작하였다. 저해유형을 분석하기 위해 Lineweaver-Burk plot을 이용하였다.

**ALS 저해제들의 결합 부위에 대한 조사.** ALS를 저해하는 TP4와 feedback 저해제인 Leu의 ALS 결합에 상호 경쟁적관계 여부를 알아보기 위해 TP4의 농도를 고정시킨 후 Leu의 농도를 변화시키면서 효소 활동도를 측정하였다. 다른 고정된 TP4 농도에서 동일한 방법으로 반복적으로 반응속도를 측정하였다. 그리고 고정된 TP4 농도에서 imidazolinone Cadre의 농도를 변화시키면서 효소의 활동도를 측정하여 TP4와 Cadre의 결합 부위가 겹치는가를 알아보았다.

**Trp, Tyr, 그리고 Cys 잔기의 변형이 저해제 결합에 미치는 영향.** 제초제와의 상호작용이 있는 것으로 추측되는 Trp 잔기를 화학적으로 변형시키기 위해 NBS를 사용하였다.<sup>27</sup> Trp 변형을 위해 50 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>(pH 7.0) 완충용액에서 0.63 mM NBS와 효소액을 25°C에서 20분간 반응시켰다. 이때 기질이 결합하는 자리에 Trp 잔기가 있을 것을 대비해 0.15 M pyruvate를 첨가해 주었다. 반응이 끝난 후 같은 인산완충용액으로 미리 평형화 시킨 gel fil-

tration column(0.5×5 cm)에 loading 하고 3000 rpm 으로 2분간 원심 분리하여 반응하지 않은 NBS와 pyruvate 및 효소반응의 생성물을 제거하였다. 이때 나온 용출액을 TP4 농도별로 처리된 반응용액에 넣어 주어 효소의 활성도를 측정하였다. 대조 실험으로 변형시키지 않은 효소액에 대해 같은 방법으로 저해 실험을 수행하였다. ALS의 저해제 결합 부위의 Tyr 잔기의 존재를 조사하기 위해 N-acethylimidazole를 사용하여 NBS 반응과 같은 방법으로 변형 시험을 수행하였다. 이때 처리해 준 N-acethylimidazole과 pyruvate 농도는 각각 40 mM과 0.15 M이었다. ALS의 저해제 결합 부위에 Cys 잔기의 존재여부를 조사하기 위하여 N-ethylmaleimide를 사용하여 NBS 반응과 같은 방법으로 변형 실험을 수행하였으며, 이때 사용한 N-ethylmaleimide와 pyruvate의 농도는 각각 1.8 mM과 20 mM 이었다.

결 과

**Triazolopyrimidine(TP) 유도체들의 저해활성.** 보리로부터 분리한 ALS를 이용하여 triazolopyrimidine 유도체들의 저해활성을 조사하였다. 이들 유도체들의

Table 1. The structures of triazolopyrimidine sulfonanilide derivatives and their IC<sub>50</sub> values for inhibition of barley ALS

Name	Structure	IC <sub>50</sub>
TP1		19 μM
TP2		ND <sup>d</sup>
TP3		47 μM
TP4		5 μM
TP5		0.31 mM

Table 1. Continued

Name	Structure	IC <sub>50</sub>
TP6		0.62 mM
TP7		0.16 mM
TP8		58 μM
TP9		0.27 mM
TP10		4 μM
TP11		54 μM
TP12		56 μM
TP13		64 μM
TP14		8 μM
TP15		15 μM
TP16		69 μM
TP17		23 μM
TP18		11 μM

Table 1. Continued

Name	Structure	IC <sub>50</sub>
TP19		3.2 nM
TP20		4.3 nM
TP21		24.5 nM
TP22		0.18 mM
TP23		ND
TP24		2.75 μM
TP25		ND
TP26		ND
TP27		7 μM

<sup>a</sup>Not detectable at 1 mM.

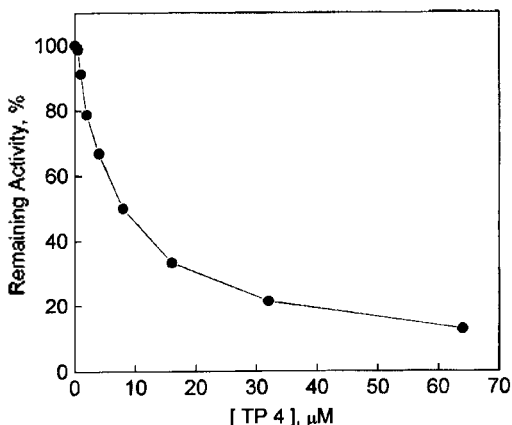


Fig. 2. Dose-response for inhibition of barley ALS by TP4.

구조식과 ALS 활동도를 50% 감소시키는 저해제의 농도를 의미하는 IC<sub>50</sub> 값은 Table 1에 나타내었다. 활성을 가진 유도체들의 IC<sub>50</sub> 값은 3.2 nM에서 0.62 mM 범위였다. 그중 가장 우수한 저해활성을 보이는 것은 TP19로 IC<sub>50</sub> 값이 3.2 nM이고, 이와 비슷한 저해활성을 보이는 유도체는 TP20이다. Table 1에서 유도체들의 구조를 보면, sulfonamide bridge를 중심으로 우측부분에 pyrimidine기나 phenyl기가 존재할 때 보다는 quinoline기가 존재할 때 더 좋은 저해활성을 보임을 알 수 있다. TP1-TP9는 pyrimidine이 존재할

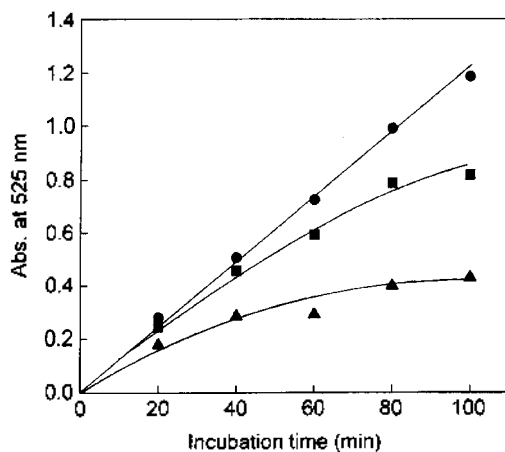


Fig. 3. Rate curves for acetolactate formation by ALS in the presence of TP4. The concentration of TP4 used were 0 (●), 4 (■) and 16 (▲) μM.

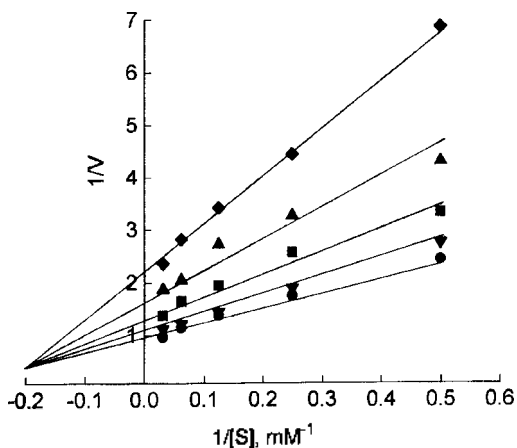


Fig. 4. Lineweaver-Burk plots for inhibition of ALS in the presence of different TP4 concentrations. The levels of TP4 used were 0 (●), 2 (▼), 5 (■), 10 (▲), and 20 (◆) μM.

때인데 그중 4번과 6번 위치에 methyl group이 존재할 때 좋은 활성을 보였다. TP4의 IC<sub>50</sub> 값은 5 μM로 TP1-TP9중 가장 좋은 저해활성을 나타내었다. TP10-TP18은 benzene group에 carboxyl group이나 Val, Leu를 붙인 것인데, 대체로 μM 범위에서 IC<sub>50</sub> 값을 보였다. 그중 가장 좋은 저해활성을 보이는 것은 benzene group의 meta 위치에 carboxyl group이 존재하는 TP10으로 IC<sub>50</sub> 값이 4 μM이다. 그리고 TP19-TP27중 quinoline의 ortho위치에 Br, Cl이 존재하는 TP19와 TP20이 우수한 저해활성을 보였다. TP4의

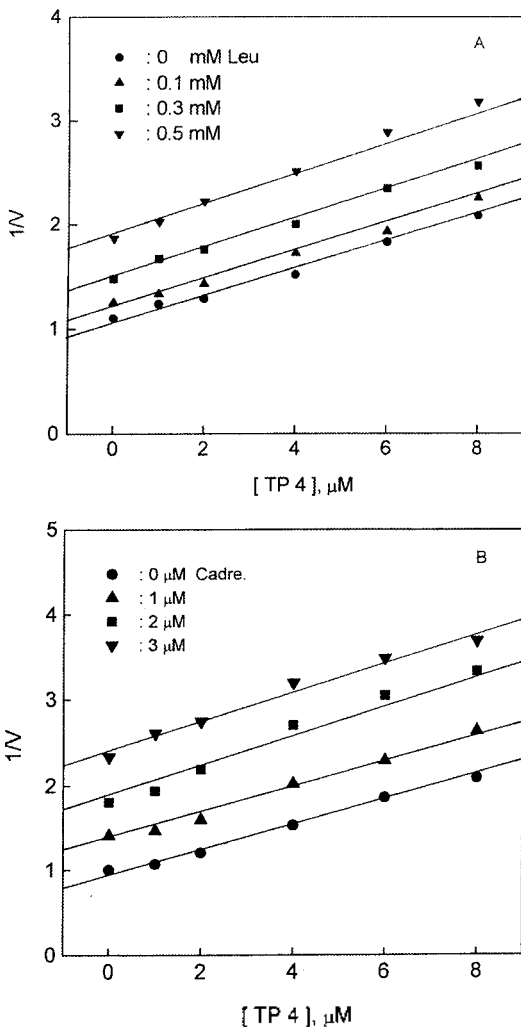


Fig. 5. Dual inhibition analysis of ALS. (A) At different concentrations of TP4 versus Leu at different fixed levels. (B) At different concentrations of TP4 versus Cadre at different fixed levels.

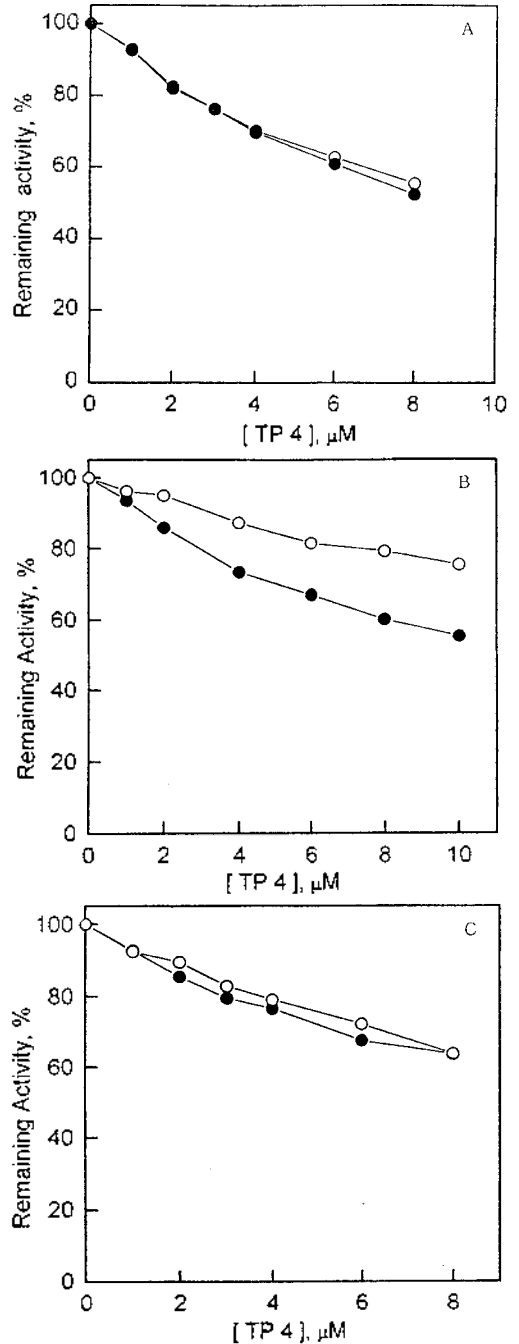


Fig. 6. Effect of chemical modification on the binding of TP4 to ALS. Barley ALS was modified as described in Material and Method. Activity of treated (○) and untreated (●) ALS was assayed in the presence of TP4. (A) Barley ALS was treated with 0.63 mM NBS. (B) Barley ALS was treated with 40 mM *N*-acetylimidazole. (C) Barley ALS was treated with 0.18 mM *N*-ethylmaleimide.

dose-response curve는 Fig. 2에 나타내었다.

**TP4에 의한 ALS의 저해형태.** 효소용액에 TP4와 기질을 첨가한 후 반응시간을 증가시키면서 생성량을 측정할 결과 반응 시간이 증가할수록 저해활성이 증가하였다(Fig. 3). 저해활성이 가장 높은 TP19에 대해서도 같은 방법으로 조사하였는데 TP4와 같은 결과를 보여주었다(결과 미제시). 보리의 ALS에 대한 TP4의 저해유형(inhibition pattern)을 알아보기 위해 몇몇 고정된 저해제 농도에서 기질인 pyruvate의 농도를 변화시켜 가며 얻은 반응속도를 Line-weaver-Burk plot한 결과 혼합형 저해양상(mixed-type inhibition)을 보여주었다(Fig. 4).

**저해제들의 결합 부위.** ALS에 대해 저해제들의 결합부위가 중복되는지 여부를 dual inhibition analysis를 통해 조사하였다. 고정된 Leu의 농도에서 TP4의 농도를 변화시키면서 반응속도를 측정하였다. Leu의 여러 농도에서 동일한 방법으로 실험을 반복 수행하여  $1/V$ 를 TP4의 농도에 대해 plot 하였다. 일련의 평행선이 얻어지면 두 종류의 저해제의 결합부위가 최소한 부분적으로 중복이 됨을 의미하는데,<sup>28</sup> 보리의 ALS에 대한 TP4와 Leu에 대한 dual inhibition 실험에서 Fig. 5(A)에 보인 것과 같이 일련의 평행한 직선이 얻어졌다. Imidazolinone Cadre와 TP4에 대한 실험에서도 평행한 kinetic pattern을 보이고 있다(Fig. 5(B)). 이러한 결과로 TP4, Leu, imidazolinone Cadre의 결합부위는 최소한 부분적으로 중복됨을 시사한다.

**Trp, Tyr 그리고 Cys 변형이 저해제 결합에 미치는 영향.** Trp 잔기의 변형이 저해제의 결합에 미치는 효과를 알아보기 위하여 ALS를 NBS와 반응시킨후 gel를 통과시킨 효소액을 사용해 각 저해제의 다양한 농도에서 assay 하였다. 이때 NBS를 처리하지 않은 효소를 대조 실험으로 사용하였다. Fig. 6(A)에서 보는 바와 같이 NBS 처리는 ALS의 TP4의 결합에 영향을 나타내지 않았다. Tyr을 변형시킨 ALS와 대조군의 ALS에 대해 TP4에 의한 저해를 조사한 결과 저해 감도의 변화가 관찰되었으므로, TP4 결합부위에 Tyr 잔기가 존재할 가능성이 높다(Fig. 6(B)). Cys를 변형시킨 ALS에 대해 TP4 저해감도를 조사한 결과 대조실험과 차이가 없었다(Fig. 6(C)). 따라서 TP4의 결합에 Cys 잔기가 관여하지 않을 것으로 추측된다.

## 고 찰

ALS는 구조적으로 상호 유사성이 없는 여러종류의 제초제들의 작용표적으로 알려져 있다. ALS를 작용표적으로 하는 새로운 제초제의 개발을 위해서는 ALS의 구조와 기능에 관한 연구와 더불어 새로운 제초제의 합성과 저해활성 조사가 필요하다.

본 연구에서는 새로운 triazolopyrimidine 유도체들을 합성하여 보리에서 분리한 ALS에 대해 저해활성을 측정하여 제초제 개발에 직접적으로 접근하며, 저해제 결합에 관여하는 아미노산 잔기를 조사하여 새로운 제초제를 설계하는데 필요한 정보를 제공하고자 한다. 새로 합성된 triazolopyrimidine 유도체들의 저해활성은 ALS 활동도가 50% 감소할 때 저해제 농도인  $IC_{50}$  값으로 측정하였다(Table 1). 이 중  $IC_{50}$  값이 가장 낮은 것은 TP19로 3.2 nM이고, 본 연구에 주로 사용된 TP4는 5  $\mu$ M로 나타났다. TP19를 비롯한 몇 종의 화합물들은 sulfonylurea 계열의 제초제인 chlorsulfuron( $IC_{50}$ : 18-36 nM)보다, 그리고 imidazolinone 제초제들( $IC_{50}$ : 3-12  $\mu$ M) 보다 저해활성이 훨씬 우수한 편으로 새로운 제초제로 개발 가능성이 높은 화합물로 생각된다. TP4는 imidazolinone 계열의 제초제와 비슷한 저해활성을 보이고 있다. Triazolopyrimidine 유도체들의 구조를 보면 sulfonanilide 오른쪽 부분에 benzene이나 pyrimidine이 존재할 때 보다는 quinoline이 존재할 때 더 높은 저해활성을 보이고 있다. 그리고 quinoline의 ortho 위치에 Cl, Br과 같은 halogen 원소가 존재할 때 더 좋은 저해활성을 보인다. TP4와 TP19에 의한 저해활성은 반응 시간이 증가함에 따라 증가하는 것으로 나타났다. TP 유도체 중 TP4는 저해활성이 비교적 높으면서 합성시 수율이 높아 대부분의 연구에 이용하였다. 이미 Ray에 의해 보고된 sulfonylurea 유도체 chlorsulfuron이 ALS 저해의 진행 curve가 반응시간의 증가에 따라 저해 정도가 증가하는 biphasic 형태를 보임을 밝혔고,<sup>16</sup> imidazolinone Cadre 역시 같은 결과를 보였다.<sup>24</sup> 그러나 pyrimidyl-oxy-benzoate (POB)에 의한 ALS curve는 직선으로 반응시간에 상관없이 저해정도가 일정하였다.<sup>19</sup> 반응 시간이 증가하면서 저해효과가 증가하는 biphasic 형태는 저해제가 효소에 친천히, 그러나 강하게 결합한 결과로 볼 수 있다.<sup>16,24</sup> TP4의 저해유형을 알아보기 위해 몇몇

의 고정된 저해제 농도에서 기질의 농도를 변화시키면서 얻은 반응속도를 Lineweaver-Burk plot한 결과 혼합형 저해 유형(mixed-type inhibition)을 보여 주었다. 혼합형 저해의 경우 저해제가 효소나 효소-기질 복합체에 모두 결합하지만, 두 경우 결합 상수가 다르다. 혼합형 저해의 경우 저해제는 기질의 결합 자리가 아닌 regulatory site에 결합하는 것이 대부분의 경우이다. 1991년 Duner 등<sup>29</sup>은 보리 ALS에 대한 sulfonylurea 제초제 chlorsulfuron과 imidazolinone 제초제 Imazaquin은 각각 noncompetitive와 uncompetitive inhibitor로 보고하였다. 그리고 콩의 ALS에 대한 sulfonylurea 제초제 Sulfometuron methyl은 noncompetitive인 반면 bacterial ALS II isozyme에 대해서는 competitive inhibitor로서 고등식물과 bacteria에서의 저해유형의 차이를 보여주고 있다. Imidazolinone계 제초제 Cadre 존재하에서 완두 ALS에 대해 얻은 반응속도 결과는 혼합형 저해유형을 보여 주었다.<sup>24</sup> 여러 저해제들의 결합부위가 겹쳐진다는 보고에<sup>20</sup> 따라 feedback 저해제인 Leu과 imidazolinone계열 Cadre가 결합하는 자리가 TP4의 결합 자리와 겹쳐지는지 알아보았다. ALS에 대한 TP4와 Leu에 대한 dual inhibition 실험 결과로부터 ALS에 있어서 두 저해제의 결합부위가 최소한 부분적으로 겹쳐짐을 예상할 수 있고, Cadre 역시 ALS에 결합하는데 있어서 경쟁적으로 결합한다는 사실을 보여 주고 있다. Wild-type cotton culture에서 분리한 ALS에서 triazolopyrimidine sulfonanilide, sulfonylurea Thifensulfuron, 그리고 imidazolinone Imazethapyr와 feedback inhibitor Leu과의 dual inhibition 분석 결과 제초제의 ALS 결합에 있어서 아미노산과 서로 경쟁적 관계를 제시하였으며,<sup>28</sup> 이러한 결과는 ALS mutant에 대한 cross-resistance 실험결과와 일치한다.<sup>21-23</sup>

저해제들의 결합 부위에 존재하는 아미노산을 알아보기 위해 화학적변형 방법으로 Trp, Tyr, Cys 잔기를 변형시켜 저해제 결합에 미치는 영향을 조사하였다. 대부분의 제초제들이 heterocyclic ring을 가지고 있으므로 이들 제초제의 결합에 Trp 잔기가 관여할 것으로 생각되어 Trp 잔기를 변형시켜 저해제들의 저해활성을 조사한 결과 별다른 변화가 관찰되지 않았으므로 TP4의 결합에 Trp 잔기가 관여하지 않을 것으로 생각된다. Cys 잔기를 변형시킨 ALS에 대해 TP4에 대한 저해활성을 조사한 결과 저해 민감

도의 변화가 없는 것으로 보아 TP4 결합에 Cys 잔기가 관여하지 않는 것으로 추측된다. 그러나 Tyr 잔기를 변형시켜 TP4 결합에 미치는 영향을 살펴본 결과 상당한 변화가 나타났으므로 TP4의 결합에 Tyr 잔기가 영향을 주는 것으로 판단된다. 아미노산의 화학적변형 실험 결과들은 site-directed mutagenesis 방법으로 한 아미노산을 다른 아미노산으로 대체하여 제초제에 내성을 갖는 작물을 개발하는데 이용될 수 있을 것이다.

본 연구에서 합성한 제초제중 TP19, TP20, 그리고 TP4 등은 ALS에 대한 저해활성이 우수하여 새로운 제초제로 개발 가능성이 충분하다고 판단되며, 작물에 대한 선택성, 토양에서의 분해 등 개발에 필요한 연구를 계속 수행하고자 한다.

본 연구는 교육부 기초과학연구소(BSRI-96-3434) 및 한국과학재단(95-0420-09-01-3)의 지원에 의하여 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

## 인 용 문 헌

- Schloss, J. V.; Van Dyk, D. E.; Vasta, J. F.; Kuntz, R. M. *Biochemistry*, **1985**, *24*, 4952.
- Muhitch, M. J.; Shaner, D. L.; Stidham, M. A. *Plant Physiol.* **1987**, *83*, 451.
- Stoner, F. C.; Umbarger, H. E. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1964**, *17*, 587.
- Kishore, G. M.; Shah, D. M. *Ann. Rev. Biochem.* **1988**, *57*, 647.
- Mazur, B. J.; Chui, C. F.; Smith, J. K. *Plant Physiol.* **1987**, *85*, 1110.
- Eoyang, L.; Siverman, P. M. *J. Bacteriol.* **1984**, *157*, 184.
- Vyazmensky, M.; Sella, C.; Barak, Z.; Chipman, D. M. *Biochemistry* **1996**, *35*, 10339.
- Poulsen, C.; Stougaard, P. *J. Bacteriol.* **1989**, *185*, 433.
- Duner, J.; Boger, P. Z. *Naturforsch* **1988**, *43C*, 850.
- Beckkaoui, F.; Schorr, P.; Crosby, W. L. *Plant Physiol.* **1993**, *88*, 475.
- Chong, C. K.; Chang, S. I.; Choi, J. D. *J. Biochem. Mol. Biol.* **1997**, *30*, No 4, 274.
- Gollop, N.; Chipman, D. M.; Barak, Z. *Biochem. Biophys. Acta.* **1983**, *748*, 34.
- Miflin, B. J. *Arch Biochem. Biophys.* **1971**, *146*, 542.
- Lee, E. H.; Ahn, T. W.; Choi, J. D. *Korean*



- Biochem. J.* (presently *J. Biochem. Mol. Biol.*) **1991**, 24, 285.
15. Chaleff, R. S.; Maurais, C. T. *Science* **1984**, 224, 1441.
16. Ray, T. B. *Plant Physiol.* **1984**, 75, 827.
17. Shaner, D. L.; Anderson, P. C.; Stidham, M. A. *Plant Physiol.* **1984**, 76, 545.
18. Babczinski, P.; Zelinski, T. *Pest. Sci.* **1991**, 31, 305.
19. Choi, J. D.; Moon, Y.; Chang, S. I.; Chae, J. K.; Shin, J. H. *Korean Biochem. J.* (presently *J. Biochem. Mol. Biol.*) **1993**, 26, 638.
20. Schloss, J. V.; Ciskanik, L. M.; Van Dyk, D. E. *Nature*. **1988**, 331, 360.
21. Gabard, J. M.; Charest, P. J.; Lyer, Y. N.; Miki, B. L. *Plant Physiol.* **1989**, 93, 962.
22. Landstenin, D.; Arad, S.; Barak, Z.; Chipman, D. M. *Plant Physiol.* **1993**, 191, 1.
23. Hofgen, R.; Laber, B. *Plant Physiol.* **1995**, 107, 469.
24. Ahn, T. W.; Kim, D. W.; Choi, J. D. *Korean Biochem. J.* (presently *J. Biochem. Mol. Biol.*) **1992**, 25, 636.
25. Shim, H. O.; Kim, D. W.; Chang, S. I.; Choi, J. D. *J. Biochem. Mol. Biol.* **1995**, 28, 471.
26. Westerfeld, W. W. *J. Biol. Chem.* **1943**, 161, 495.
27. Eyzaguirre, J. In *Chemical Modification of Enzyme: Active Site Studies*; Eyzaguirre, J., Ed.; Ellis Horwood Ltd, Chichester., 1987; pp 9-22.
28. Subramanian, M. V.; Loney-Gallant, V.; Dais, J. M.; Mireless, L. C. *Plant Physiol.* **1991**, 96, 310.
29. Durner, J.; Gailus, V.; Boger, P. *Plant Physiol.* **1991**, 95, 1144.
30. Schloss, J. V. In *Chemistry of Plant Protection: Herbicides Inhibiting Branched Chain Amino Acid Biosynthesis-Recent Developments*; Stetter, J., Ed.; Springer-Verlag: Berlin, **1994**, 3 and references cited therein.
31. Kleschick, W. A.; Costales, M. J. *Synthesis and Chemistry of Agrochemicals III*; Baker, D. R.; Fenyes, J. G.; Steffens, J. J., Ed.; ACS, Washington, DC, **1992**, 10 and references cited therein.