

## 트리아졸로피리미딘계 유도체에 의한 보리 Acetolactate Synthase의 저해

金成昊 · 南宮成鎧<sup>1</sup> · 申正休<sup>2\*</sup> · 張秀翼 · 崔正道\*

충북대학교 생화학과

<sup>1</sup>서울여자대학교 화학과

<sup>2</sup>서울대학교 화학과

(1999. 5. 10 접수)

## Inhibition of Barley Acetolactate Synthase by Triazolopyrimidine Derivative

Sung-Ho Kim, Sung-Keon Namgoong<sup>1</sup>, Jung-Hyu Shin<sup>2\*</sup>, Soo-Ik Chang, 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>2</sup>Department of Chemistry, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

(Received May 10, 1999)

**요 약.** Acetolactate synthase (ALS)는 가지를 가진 필수 아미노산 Val, Leu, Ile의 생합성 과정에서 공통적으로 작용하는 효소이다. ALS는 서로 구조적 유사성이 없는 triazolopyrimidine, imidazolinone, sulfonyleurea, 그리고 pyrimidyl-oxy-benzoate 제초제들의 공통적인 작용 표적이다. 보리로부터 부분 정제한 ALS를 이용하여 새로이 합성한 triazolopyrimidine sulfonamide 유도체들의 저해 활성을 측정하였다. 활성을 가진 유도체들의 IC<sub>50</sub> 값은 0.5 nM~8 μM 범위였으며, 그 중에서 탁월한 저해 활성을 갖는 것은 TP1과 TP2 유도체로 IC<sub>50</sub> 값은 각각 0.5 nM과 1.6 nM이었다. 이 저해제들은 기존의 상품화된 제초제인 Metosulam (IC<sub>50</sub>; 3.6 nM), Flumetsulam (IC<sub>50</sub>; 126 nM), 그리고 Cadre (IC<sub>50</sub>; 4 μM)에 비해 보리 ALS에 대한 저해 활성이 보다 우수하였다. 보리 ALS에 대한 TP2의 저해 활성은 반응시간이 증가함에 따라 증가하였고, 혼합형 저해 유형을 보였다. TP2와 imidazolinone 계열의 제초제인 Cadre, 그리고 되먹임 (feedback) 저해제인 Leu에 대한 이중저해 (dual inhibition) 실험 결과 TP2와 Cadre의 경우는 평행한 반응 속도론적 형태가 그러나 TP2와 Leu의 경우는 한 점에서 만나는 반응속도론적 형태가 얻어졌다. 이는 TP2와 Cadre의 결합 부위가 최소한 부분적으로 중복되고 있음을 시사한다. Cys 잔기에 대한 화학적 변형은 TP2와 Cadre의 결합에는 영향을 미치지 않으나, Leu의 결합에는 영향을 미쳤다.

**ABSTRACT.** Acetolactate synthase (ALS) catalyzes the first common reaction in the biosynthesis of branched-chain amino acids, valine, leucine, and isoleucine. ALS is the common target of several classes of structurally diverse herbicides, the triazolopyrimidines, the imidazolinones, the sulfonyleureas, and pyrimidyl-oxy-benzoates. We examined inhibitory activities of newly synthesized triazolopyrimidine sulfonamide derivatives using partially purified ALS from barley. IC<sub>50</sub> values for the active derivatives are 0.5 nM-8 μM. Among them TP1 and TP2 are the most potent ALS inhibitors with IC<sub>50</sub> values of 0.5 nM and 1.6 nM, respectively. These inhibitors are more potent in the inhibition of barley ALS than commercial herbicides, Metosulam (IC<sub>50</sub>; 3.6 nM), Flumetsulam (IC<sub>50</sub>; 126 nM), and Cadre (IC<sub>50</sub>; 4 μM). The progress curves for inhibition of ALS by TP2 showed that the amount of inhibition increases with time. The inhibition of ALS by TP2 was mixed-type inhibition with respect to pyruvate. Dual inhibition analyses of TP2 versus an imidazolinone, Cadre, and Leu showed parallel and intercepting kinetic pattern, respectively. The results

suggest that TP2 binds to ALS competitively with Cadre but not with Leu. Chemical modification of cysteinyl residues in ALS decreased the sensitivity of ALS to Leu, while the modification did not affect the sensitivity of ALS to TP2 and Cadre.

## 서 론

Acetolactate synthase (ALS, EC 4. 1. 3. 18; acetoxydoxyacid synthase, AHAS)는 박테리아, 효모, 그리고 고등 식물에서 가지를 가진 아미노산, Val, Leu, 그리고 Ile의 생합성에 공통적으로 관여하는 효소이다. ALS는 두 분자의 pyruvate를 축합시켜 Leu, Val의 생합성 중간체인 2-acetolactate의 생성반응을 촉매하고, 또한 한 분자의 pyruvate와 한 분자의 2-ketobutyrate로부터 Ile의 생합성 중간체인 2-aceto-2-hydroxybutyrate의 생성 반응을 촉매한다.<sup>1-3</sup>

ALS에 대한 연구가 많이 수행된 enteric bacteria에서는 새 개의 isozymes (ALS I, II, III)가 발견되었는데 이중 ALS I은 *E. coli* K-12에서 분리 정제되었으며 tetramer로 존재한다.<sup>4</sup> 또한 ALS II는 *Samonella typhimurium*의 유전자를 *E. coli* HB101/pDU9에서 발현시켜 분리 정제되었는데 분자량이 140 kDa으로 두 개의 large subunits과 small subunits로 구성되어 있음이 보고되었다.<sup>5</sup> 그리고, ALS III는 분자량이 17 kDa인 small subunit (*ilv* I product)와 분자량이 62 kDa인 large subunit (*ilv* H product)로 구성되어 있음이 밝혀졌다.<sup>6</sup> 효모 *Saccharomyces cerevisiae* ALS는 *E. coli*에서 대량 발현시켜 정제되었으며 활성을 갖는 ALS는 분자량이 75 kDa인 subunit 두 개로 구성된 dimer로 보고되었다.<sup>2</sup> 현재까지 고등 식물 ALS에 대한 연구는 낮은 함량과 불안정성 때문에 순수 정제에 어려움이 많아 subunits의 구성, 단백질의 구조, 그리고 효소학적 특성 등 기본적인 연구가 아직 초보적 단계에 있다. Dumer와 Boger는 보리로부터 ALS를 거의 순수하게 정제하였으며, 단일 polypeptide의 분자량이 58 kDa, 그리고 활성을 갖는 ALS의 분자량이 440 kDa과 200 kDa으로 보고하였다.<sup>7</sup> 최근 본 연구실에서는 보리로부터 ALS를 순수하게 정제하여 subunit의 분자량이 64 kDa 그리고 몇 가지 효소학적 성질을 보고하였다.<sup>8</sup> ALS는 활성을 갖기 위하여 thiamine pyrophosphate (TPP), Mg<sup>2+</sup>, 그리고 flavin adenine dinucleotide (FAD)의 보조 인자를 필요로 한다.<sup>9,10</sup> ALS의 활성에 필요한 FAD의 특이한 성질은

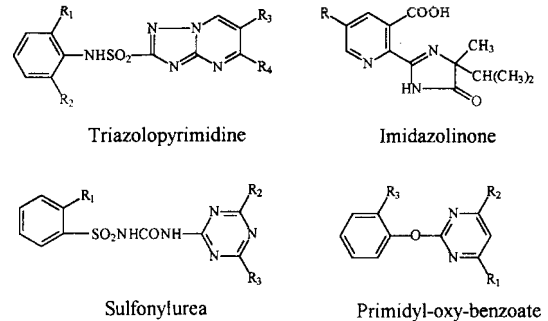


Fig. 1. Four chemical families of herbicides known to inhibit acetolactate synthase.

다른 flavinprotein과 달리 FAD가 산화-환원 반응에 관여하지 않는다는 점이다.<sup>10</sup> 옥수수 ALS의 경우 FAD는 이 ALS의 oligomerization에 관여한다고 보고된 바 있다.<sup>11</sup>

ALS를 표적으로 하는 대표적 제초제들은 Fig. 1에서와 같이 Dow-Elanco 사의 triazolopyrimidine (TP),<sup>12</sup> American Cyanamid 사의 imidazolinone (IM),<sup>13</sup> Du Pont 사의 sulfonylurea (SU),<sup>14,15</sup> 그리고 일본 Kumiai Chemical 사의 pyrimidyl-oxy-benzoate (POB)<sup>16</sup> 등을 열거할 수 있다. 이들 제초제들은 구조적으로 상호 유사성이 없음에도 불구하고 공통적으로 ALS를 불활성화 (inactivation)시켜 제초 활성을 나타낸다. 이들 제초제들은 작물이나 잡초로부터 분리한 모든 ALS에 대해 저해 활성을 나타내나 제초제를 분해하는 대사에 따라 잡초의 선별적 제거가 가능하다. Schloss 등<sup>17</sup>은 여러 종류의 제초제들과 ALS와의 상호작용에 관한 연구를 수행한 결과, 여러 종류의 제초제들이 ALS에 대해 상호 경쟁적으로 결합한다는 것을 보고하였다.

본 연구에서는, triazolopyrimidine sulfonamide계의 새로운 유도체들을 합성하여 보리의 ALS에 대해 저해 활성, 저해 유형, 그리고 ALS의 결합에 있어서 다른 저해제들과의 경쟁적 관계 여부를 조사하였다.

## 실 험

시 약, 본 실험에 사용된 triazolopyrimidine sul-

fonamide 유도체들의 합성은 서울여대 남궁성진 교수 연구실과 서울대 신정유 교수 연구실에서 이미 알려진 합성 방법<sup>18,19</sup>을 응용하여 합성하였으며, imidazolinone 계열의 제초제인 Cadre는 한국 화학 연구소 김대황 박사 연구실에서 합성한 것을 제공받았다. Sodium pyruvate, flavin adenine dinucleotide (FAD), thiamine pyrophosphate (TPP), dithiothreitol (DTT), ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA), L-leucine,  $\alpha$ -naphthol, creatine, Sephadex G-25, dimethyl sulfoxide (DMSO), N-ethylmaleimide (NEM)은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, USA)에서, DEAE-Sephacel 와 Micro Bio-Spin 6 column 은 Bio-Rad Laboratories (Hercules, USA)로부터 구입하였다. 그 외 다른 시약들은 여러 회사로부터 최상급의 시약들을 구입하여 사용하였다.

**보리로부터 Acetolactate Synthase의 분리.** 보리 씨앗을 12 시간 동안 물에 담근 후 질석에 파종하여 7 일간 25 °C 암실에서 재배한 후 줄기의 끝 부분 (생장점에서 약 5 cm 정도 아래 부분을 잘라 분리에 이용하였다. 보리 조직 180 g을 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM L-Leu, 1 mM EDTA, 1 mM DTT와 15% (v/v) glycerol을 포함하는 50 mM Tris-HCl (pH 7.8) 완충용액 800 ml에 넣고 mixer로 40 초씩 4 번 균질화하였다. 균질화된 추출물을 8 겹의 cheesecloth에 거른 후 cell debris를 20,000 g에서 8 분간 원심 분리하여 제거하였다. 상층액을 ammonium sulfate 30%로 포화시켜 24,000 g에서 원심 분리하여 침전물을 제거하였다. 상층액을 다시 45%로 포화시켜 원심 분리 후 침전물을 얻었다. 이 침전물을 최소량의 표준 완충용액으로 녹여 Sephadex G-25 column에 통과시켜 염을 제거하였다. 염이 제거된 효소 용액을 표준완충용액으로 평형화되어 있는 DEAE-Sephacel column에 loading시켜 0~300 mM NaCl 농도 기울기를 주어 용출시켰다. 활성을 가진 분획을 모아 PM30 membrane을 이용한 Diaflo ultra-filtrator로 농축시켰다. 농축시킨 효소 용액을 적당한 양으로 나누어 액체 질소에 보관한 후 필요시 사용하였다.

**효소 활성도 측정.** ALS의 활성도는 Westerfeld 방법<sup>20</sup>을 약간 변형시킨 Ray 방법<sup>15</sup>을 기초로 하여 측정하였다. 0.5 mM TPP, 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 되

게 하였다. 37 °C에서 1 시간 동안 반응시킨 후 6 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 20  $\mu$ l 첨가하여 65 °C에서 15 분간 반응시켰다. 0.5% creatine 200  $\mu$ l,  $\alpha$ -naphthol 200  $\mu$ l를 각각 넣고 65 °C에서 15 분간 반응시킨 후 525 nm에서 흡광도를 측정하였다. 흡광도 0.65는 1 mM acetolactate에 해당한다.<sup>21</sup>

**Triazolopyrimidine sulfonamide 유도체들에 의한 ALS의 저해.** 각각의 저해제들을 DMSO에 녹인 후 중류수로 희석하여 반응 용액 내에 DMSO의 농도가 0.1% (v/v) 이내로 포함되도록 여러 농도로 준비하였다. 이 저해제들을 assay 용액에 첨가해 활성도를 측정하여 저해제를 첨가하지 않은 대조 실험과 비교하였다. 저해제들의 IC<sub>50</sub> 값은 효소의 활성도를 50% 감소시키는 저해제의 농도를 의미하며, 다음 식을 이용하여 계산하였다.

$$\% \text{ Activity} = 100 / (1 + [I] / IC_{50})$$

여기서 % Activity는 저해제 존재 하에서 얻은 활성도를 대조 실험의 활성도에 대해 %로 나타낸 것이며, [I]는 저해제의 농도이다.

**TP2에 의한 보리 ALS의 저해 유형 조사.** 고정된 TP2의 농도와 다양한 기질의 농도 (2~32 mM)에서 효소 반응을 수행하여 반응속도를 측정하였다. TP2의 농도 1, 1.5, 2, 3 nM에서 동일한 방법으로 반복적인 실험을 수행하여 얻은 결과를 Lineweaver-Burk plot을 이용하여 저해 유형을 분석하였다.

**ALS 저해제들의 결합 부위에 대한 조사.** TP2와 imidazolinone Cadre의 결합 부위의 상관 관계를 알아보기 위해 이중저해 (dual inhibition) 실험을 수행하였다.<sup>24</sup> TP2의 농도를 고정시키고, Cadre의 농도를 변화시키면서 효소 활성도를 측정하여 반응 속도의 역수를 Cadre 농도에 대해 plot 하였다. 여러 TP2의 농도에서 같은 실험을 반복적으로 수행하였다. 그리고, TP2와 되먹임 (feedback) 저해제인 Leu 결합에 있어서 상호 경쟁적 관계를 조사하기 위하여 Leu의 다양한 농도에서 얻은 반응 속도의 역수를 Leu 농도에 대해 plot 하였다.

**Cys 잔기의 변형이 저해제 결합에 미치는 영향.** Cys 잔기의 변형을 위해 50 mM 인산완충용액 (pH 7.0)에서 효소와, 1 mM N-ethylmaleimide를 25 °C에서 5 분간 반응시켰다. 이때 효소의 활성 부위에 Cys 잔기가 존재할 경우 이를 보호하기 위해 100 mM의

pyruvate를 미리 첨가하였다. 반응이 끝난 후 같은 인산완충용액으로 평형화시킨 Micro Bio-Spin 6 column에 loading하고 2,000 g로 1 분 30 초간 원심 분리하여 반응하지 않은 N-ethylmaleimide와 과량의 pyruvate 및 효소 반응의 생성물을 제거하였다. 이때 나온 용출액을 여러 농도의 TP2, Cadre, Letu를 포함하는 assay 용액에 첨가하여 효소 활성도를 측정하였다. 대조 실험으로 변형시키지 않은 효소 용액에 대해 저해 실험을 수행하여 비교하였다.

## 결 과

**Triazolopyrimidine sulfonamide (TP) 유도체들의 저해 활성.** 새로운 triazolopyrimidine sulfonamide 유도체 25 종과 이미 상품화된 TP 계열의 Flumetsulam과 Metosulam을 합성하여 보리의 ALS에 대해 저해 활성을 측정하였다. 이들 유도체들의 구조식과 ALS 활동도를 50% 감소시키는 저해제의 농도를 의미하는  $IC_{50}$  값을 Table 1에 수록하였다. 새로 합성한 25 종의 TP 유도체들 중에서 23 종의 유도체들이 저해 활

Table 1. The structures of triazolopyrimidine sulfonamide derivatives and their  $IC_{50}$  values for inhibition of barley ALS

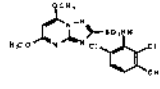
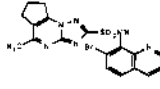
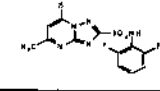
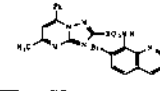
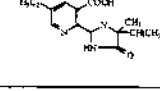
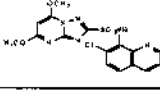
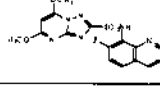
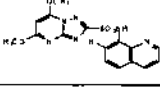
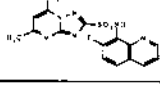
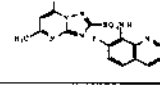
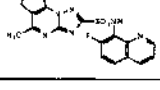
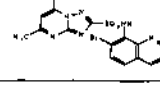
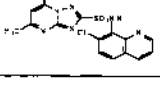
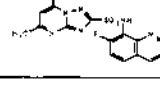
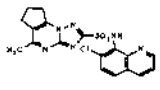
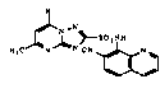
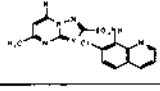
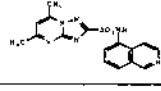
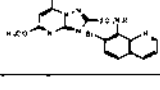
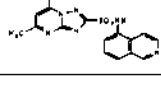
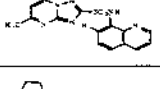
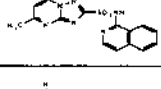
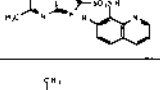
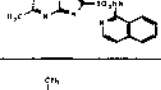
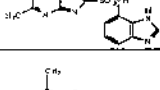
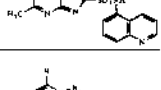
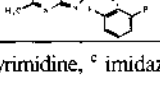
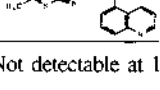
Metosulam <sup>a</sup> (3.6 $\mu$ M)		TP5 (4.5 nM)	
Flumetsulam <sup>b</sup> (126 nM)		TP6 (4.6 nM)	
Cadre <sup>c</sup> (4 $\mu$ M)		TP7 (7.8 nM)	
TP1 (0.5 nM)		TP8 (9.1 nM)	
TP2 (1.6 nM)		TP9 (9.2 nM)	
TP3 (4.1 nM)		TP10 (11 nM)	
TP4 (4.4 nM)		TP11 (12 nM)	

Table 1. Continued

Name ( $IC_{50}$ )	Structure	Name ( $IC_{50}$ )	Structure
TP12 (16 nM)		TP19 (0.15 $\mu$ M)	
TP13 (20 nM)		TP20 (0.24 $\mu$ M)	
TP14 (21 nM)		TP21 (0.40 $\mu$ M)	
TP15 (23 nM)		TP22 (5.0 $\mu$ M)	
TP16 (37 nM)		TP23 (8.0 $\mu$ M)	
TP17 (39 nM)		TP24 (N.D. <sup>d</sup> )	
TP18 (73 nM)		TP25 (N.D.)	

<sup>a,b</sup> triazolopyrimidine, <sup>c</sup> imidazolone, <sup>d</sup> Not detectable at 1 mM

성을 나타내었으며, 이들의  $IC_{50}$  값은 0.5 nM에서 8  $\mu$ M 범위였으며, 표준 물질로 선택한 Metosulam과 Flumetsulam의  $IC_{50}$  값은 각각 3.6 nM과 126 nM이

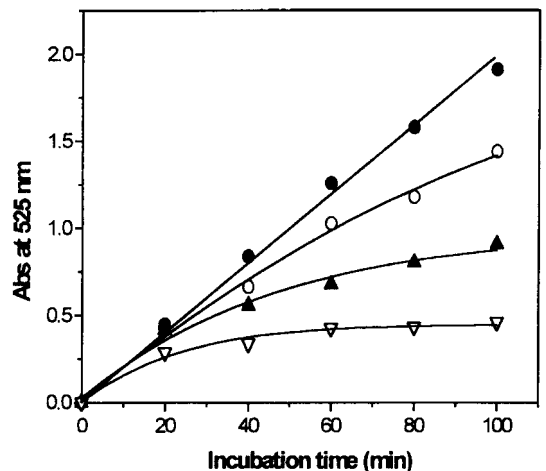


Fig. 2. Rate curves for acetolactate formation by barley ALS in the presence of TP2. The concentration of TP2 used were 0 (●), 0.5 (○), 1.5 (▲), and 4 (▽) nM.

였다. Triazolopyrimidine sulfonamide의 퀴놀린 (quinoline) 유도체들은 대부분 높은 저해 활성을 보이며, 특히 퀴놀린의 오르토 (ortho) 위치에 할로겐 (F, Cl, Br) 기가 치환된 퀴놀린 유도체는 탁월한 억제력을 보였다. 이들 중 퀴놀린의 오르토 위치에 플루오린 (F)이 치환되고, triazolopyrimidine ring의 5번과 7번 위치에 methoxy기와, methyl기가 치환된 TP1과 TP2의 IC<sub>50</sub> 값이 각각 0.5 nM과 1.6 nM로 이미 상품화된 Metosulam (IC<sub>50</sub>: 3.6 nM)과 Flumetsulam (IC<sub>50</sub>: 126 nM) 보다 높은 저해 활성을 보였다. 퀴놀린 고리에서 질소원자의 위치를 바꾼 이소퀴놀린 유도체들 (TP20~TP23)은 IC<sub>50</sub> 값이  $\mu$ M 농도 수준으로 저해 활성이 퀴놀린 유도체에 비해 훨씬 낮으며, 특히 TP24와 TP25는 1 mM 농도에서 저해 활성이 관찰되지 않았다. Triazolopyrimidine 고리에 여러 가지 치환기를 도입했을 경우 저해 활성에 약간의 영향을 미치고 있으나 뚜렷한 경향을 나타내지는 않았다. 새로 합성한 TP 유도체들 중에서 IC<sub>50</sub> 값이 100 nM 미만인 18종의 화합물은 제초제로서 개발 가능성이 있는 것으로 판단된다. 합성한 유도체중 TP1이 가장 높은 효소 억제력을 보였으나 합성 수율이 낮아, 수율이 비교적 높은 TP2를 이용하여 다른 실험들을 수행하였다.

**TP2에 의한 ALS의 저해 형태.** 반응 시간에 따른 TP2에 의한 저해 정도를 알아보기 위해 일정 농도의 기질과 TP2가 들어 있는 반응 용액에 효소를 첨가한 후 반응시간을 증가시키면서 생성물의 양을 측정하고 결과 반응시간이 증가할수록 저해 활성이 증가하는 형태를 보였다 (Fig. 2). 보리 ALS에 대한 TP2의 저해 유형 (inhibition pattern)을 알아보기 위해 몇몇 고정된 TP2 농도에서 기질인 pyruvate의 농도를 2 mM에서 32 mM 범위로 변화시켜 가며 얻은 반응속도를 Lineweaver-Burk plot으로 분석한 결과 혼합형 저해 양상 (mixed-type inhibition)을 보여 주었다 (Fig. 3).

**저해제들의 결합 부위.** ALS에 대해 TP2와 imidazolinone Cadre 및 피드백 (feedback) 저해제인 Leu의 결합 부위가 중복되는지 여부를 알아보기 위해 이중저해 (dual inhibition) 실험을 통하여 조사하였다. Cadre의 농도를 고정시키고 TP2의 농도를 변화시키면서 반응 속도를 측정하였다. Cadre의 여러 농도에서 실험을 반복하여 얻은 1/V를 TP2의 농도에 대해 plot 하였다. 또한 Leu의 경우도 같은 방법으로 반복 수행하였다. 일련의 평행선이 얻어진다면 두 종류의 저해제

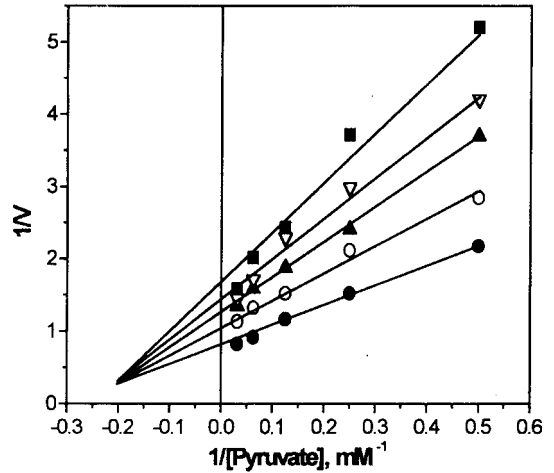


Fig. 3. Lineweaver-Burk plots for inhibition of barley ALS in the presence of different TP2 at various concentrations. The concentrations of TP2 used were 0 (●), 1 (○), 1.5 (▲), 2 (▽), and 3 (■) nM.

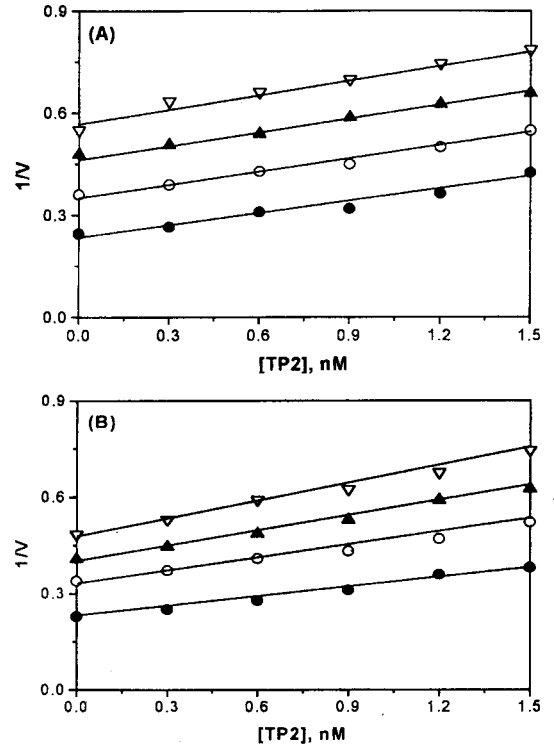


Fig. 4. Dual inhibition analysis of barley ALS. (A) At different concentrations of TP2 versus Cadre at different fixed concentrations. The concentrations of Cadre used were 0 (●), 1 (○), 2 (▲), and 3 (▽)  $\mu$ M. (B) At different concentrations of TP2 versus Leu at different fixed concentrations. The concentrations of Leu used were 0 (●), 0.1 (○), 0.2 (▲), and 0.3 (▽) mM.

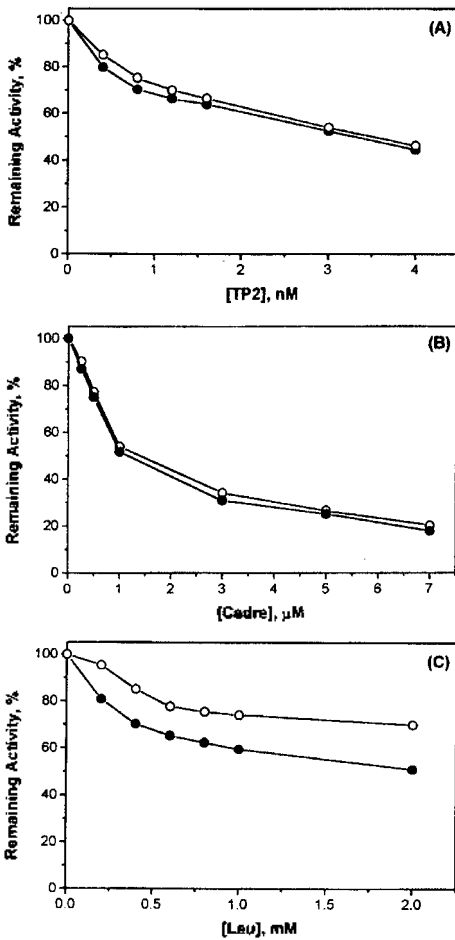


Fig. 5. Effect of N-ethylmaleimide (NEM) treatment on the inhibition of barley ALS by inhibitors. Barley ALS was treated with 1 mM NEM in the presence of 100 mM pyruvate for 5 min at 25 °C. The reaction was performed in 50 mM potassium phosphate (pH 7.0). Excess NEM, pyruvate, and product acetolactate were removed by gel filtration. Activity of untreated (●) and treated (○) ALS was assayed in the presence of TP2 (A), Cadre (B), and Leu (C).

의 결합 부위가 최소한 부분적으로 중복이 됨을 의미한다.<sup>22</sup> TP2와 Cadre의 경우 (Fig. 4A)는 일련의 평행한 직선이 얻어졌으나, TP2와 Leu의 경우 (Fig. 4B)에는 평행선이 얻어지지 않았다. 이는 TP2와 Leu의 결합 부위는 중복되지 않지만, TP2와 Cadre의 결합 부위는 최소한 부분적으로 중복됨을 시사한다.

Cys 잔기의 변형이 저해제의 결합에 미치는 영향. Cys 잔기의 변형이 저해제의 결합에 미치는 영향을 알아보기 위하여 ALS를 N-ethylmaleimide (NEM)과 반응시

킨 후 미 반응 산물들을 제거시킨 효소액을 각 저해제의 다양한 농도에서 assay하였다. 이에 대조 실험으로 NEM을 처리하지 않은 효소용액을 비교한 결과 NEM의 처리는 ALS의 TP2와 Cadre의 결합에는 영향을 나타내지 않았지만 (Fig. 5A, 5B), Leu의 저해 감도에 있어서 대조 실험과 차이를 보였다 (Fig. 5C). 이는 Cys 잔기가 TP2와 Cadre의 결합 부위에는 존재하지 않지만 Cys 잔기의 변형이 Leu의 결합에 직접 또는 간접적으로 영향을 미치고 있음을 알 수 있다.

## 고 찰

ALS는 식물과 미생물에서 필수아미노산, valine, leucine, 그리고 isoleucine의 생합성에 공통적으로 관여하는 효소이다. 최근에 개발된 sulfonylureas, imidazolinones, triazolopyrimidines 제조제들은 구조적으로 상호 유사성이 없음에도 불구하고, 모두 ALS를 불활성화 시킴으로 제초 활성을 나타낸다. ALS를 표적으로 하는 새로운 제조제를 개발하기 위하여 본 연구에서는 triazolopyrimidine sulfonamide의 새로운 유도체를 합성하여 보리에서 분리한 ALS에 대해 저해 활성 및 저해 유형 등을 조사하였다.

새로 합성한 TP 유도체 25 중 중에서 23 종이 보리의 ALS에 대해 저해 활성을 나타내었으며 이들의 IC<sub>50</sub> 값은 0.5 nM~8 µM 범위였다 (Table 1). 활성을 가진 23 종의 TP 유도체 중 9 종의 유도체 (TP1~TP9)는 IC<sub>50</sub> 값이 10 nM이하로 TP 계열의 상업화된 제조제 Metosulam (IC<sub>50</sub>; 3.6 nM)과 비교하여 저해 활성이 비슷한 수준이며 또 다른 제조제 Flumetsulam (IC<sub>50</sub>; 126 nM) 보다는 저해 활성이 훨씬 우수한 편이다. 그 외 8종의 유도체 (TP10~TP17)도 IC<sub>50</sub> 값이 10~50 nM 범위로 Metosulam 보다는 저해 활성이 다소 낮으나 Flumetsulam 보다는 저해 활성이 높은 편이다. 이미 상용화된 sulfonylurea 제조제, Ally, Clasic, Londax 등의 식물 ALS에 대한 IC<sub>50</sub> 값이 5~100 nM 범위<sup>23</sup>로, 본 연구에서 합성한 TP 유도체들의 저해 활성은 이들과 비슷한 수준이다. 그러나 imidazolinone 계 제조제 (IC<sub>50</sub>; 3~12 µM) 보다는 저해 활성이 훨씬 우수한 편이다. 따라서 본 연구에서 합성한 TP 유도체 중 IC<sub>50</sub> 값이 50 nM 미만인 유도체들 (TP1~TP17)은 개발 가능성이 매우 높다고 판단된다. 높은 활성을 가진 triazolopyrimidine

sulfonamide 유도체의 구조를 살펴보면 amide의 아미노기에 퀴놀린 (quinoline)이 결합된 경우 높은 저해 활성을 보이며, 특히 퀴놀린의 오르토 (ortho)위치에 F, Cl, Br 같은 halogen기가 치환되었을 경우 뛰어난 억제력을 보여주고 있다. 한편 퀴놀린 고리에서 질소 원자의 위치를 바꾼 이소퀴놀린 (isoquinoline)의 유도체 (TP20~TP23)는 IC<sub>50</sub> 값이  $\mu$ M 농도 수준으로 퀴놀린 유도체에 비해 저해 활성이 매우 낮은 편이며, 특히 이소퀴놀린 유도체 TP24와 TP25는 1 mM 수준의 농도에서 저해 활성이 관찰되지 않았다. 합성한 TP 유도체 중 TP1이 가장 높은 활성을 보였으나 합성 수율 관계로 약간 낮은 활성을 가진 TP2를 대부분의 실험에 이용하였다.

TP2에 의한 ALS의 저해는 반응 시간이 증가함에 따라 증가하는 것으로 나타났다 (Fig. 2). Sulfonylurea 계열의 제초제와 imidazolinone 계열의 제초제도 같은 형태의 저해를 보였다.<sup>24,25</sup> 그러나 저해 활성이 낮은 pyrimidyl-oxy-benzoate 유도체에 의한 완두 ALS의 저해는 반응 시간에 상관없이 저해 정도가 일정하였다.<sup>26</sup> 반응 시간이 증가함에 따라 저해 효과가 증가하는 biphasic 형태는 저해제가 효소에 천천히, 그러나 강력하게 결합하는 경우에 나타나는 형태로 보고되었다.<sup>24,25</sup> TP2에 의한 ALS의 저해 유형을 Lineweaver-Burk plot으로 분석한 결과 혼합형 저해 유형을 보였다 (Fig. 3). 혼합형 저해의 경우 저해제가 효소나 효소-기질 복합체에 모두 결합하지만, 두 경우 결합 상수가 다르다. 1991년 Dumer 등<sup>27</sup>은 보리 ALS에 대해 sulfonylurea 계 제초제 Chlorosulfuron과 imidazolinone 계 제초제 Imazaquin은 각각 noncompetitive와 uncompetitive 저해 유형을 보인다고 보고하였다.

Imidazolinone 계 Cadre<sup>24</sup>와 pyrimidyl-oxy-benzoate 유도체<sup>26</sup>는 완두 ALS에 대해 모두 혼합형 저해 유형을 보였다. 보리 ALS에 대해 TP2의 결합이 imidazolinone 계 제초제 Cadre, 그리고 피드백 (feedback) 저해제 Leu의 결합과 경쟁적 관계 여부를 이중저해 (dual inhibition) 실험으로 조사하였다 (Fig. 4). ALS에 대한 TP2의 결합은 Cadre와 경쟁적 관계였으나, Leu과는 비경쟁적 관계로 나타났다. 따라서 ALS에 있어서 TP2와 Cadre의 결합 부위는 최소한 부분적으로 겹쳐짐을 예상할 수 있다. 제초제에 내성을 갖는 ALS 돌연변이종에 대한 cross-resistance 유형을 조사한 결과, 다른 계열의 제초제, 또는 같은 계열의 다른 제초

제들의 결합 부위가 중복되는 부분과 중복되지 않는 부분이 함께 존재한다는 것이 제시되었다.<sup>28,29</sup> 저해제들의 결합 부위에 존재하는 아미노산 잔기를 알아보기 위하여 화학적 변형 방법으로 Cys 잔기를 변형시켜 저해제 결합에 미치는 영향을 조사하였다 (Fig. 5). ALS의 Cys 잔기의 변형은 TP2나 Cadre의 결합에는 영향이 없었으며, Leu의 결합에는 상당한 저해 감도 차이를 보였다. 이 결과는 TP2나 Cadre의 결합 부위에는 Cys 잔기가 존재하지 않으나, Leu이 결합하는 regulatory site 부근에 Cys 잔기가 존재할 가능성이 있다. 또한 이 결과는 dual inhibition 실험에서 보여준 TP2의 결합 부위가 Cadre의 결합 부위와는 중복되나, Leu의 결합 부위와는 중복되지 않는다는 결과와 일치한다.

본 연구에서 합성한 TP 계열의 제초제 중 20여종은 ALS에 대한 저해 활성이 우수하여 새로운 제초제로 개발할 가능성이 높다고 판단되어, 온실 실험 등 개발에 필요한 연구를 계속 수행하고자 한다.

본 연구는 교육부 기초과학연구소 지원 프로그램 (BSRI-97-3434)과 한국과학재단 (95-0402-09-01-3)의 지원에 의해 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

## 인용문헌

- Grimminger, H.; Umbarger, H. E. *J. Bacteriol.* **1979**, *137*, 846.
- Poulsen, C.; Stougaard, P. *Eur. J. Biochem.* **1989**, *185*, 433.
- Southad, M. D.; Copeland, L. *Physiol. Plant* **1996**, *98*, 824.
- Eoyang, L.; Silverman, P. M. *J. Bacteriol.* **1984**, *157*, 184.
- Schloss, J. V.; Van Dyk, D. E.; Vasta, J. F.; Kuntz, R. M. *Biochemistry.* **1985**, *24*, 4952.
- Vyazmensky, M.; Sella, C.; Barak, Z.; Chipman, D. M. *Biochemistry.* **1996**, *35*, 10339.
- Dumer, J.; Boger, P. Z. *Naturforsch.* **1988**, *43C*, 850.
- Chong, C. K.; Chang, S. I.; Choi, J. D. *J. Biochem. Mol. Biol. (formerly Korean Biochem. J.)* **1997**, *30*, 274.
- Muhitch, M. J.; Shaner, D. L.; Stidham, M. A. *Plant Physiol.* **1987**, *83*, 451.
- Stomer, F. C.; Umbarger, H. E. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1964**, *17*, 587.
- Singh, B. K.; Schmitt, G. K. *FEBS.* **1989**, *258*, 113.

12. Subramanian, M. V.; Loney, V. *British Crop Protection Council, Society of Chemical Industry*. **1989**, 42, 97.
  13. Shaner, D. L.; Anderson, P. C.; Stidham, M. A. *Plant Physiol.* **1984**, 76, 545.
  14. Chaleff, R. S.; Maurais, C. T. *Science*. **1984**, 224, 1441.
  15. Ray, T. B. *Plant Physiol.* **1984**, 75, 827.
  16. Nezu, Y.; Ojima, F.; Miyazawa, T. *Eur. Pat. Appl.* **1987**, 223, 406.
  17. Schloss, J.V.; Ciskanik, L. M.; Vandyk, D. E. *Nature*. **1988**, 331, 360.
  18. Schloss, J. V. In *Chemistry of Plant Protection: Herbicides Inhibiting Branched Amino Acid Biosynthesis-Recent Developments*; Stetter, J., Ed.; Springer-Verlag: Berlin, **1994**; 3 and references cited therein.
  19. Kleschick, W. A.; Costales, M. J. *Synthesis and Chemistry of Agrochemicals III*; Baker, D. R.; Fenyes, J. G.; Steffens, J. J., Ed. ACS: Washington, D. C., U.S.A., **1992**; 10 and references cited therein.
  20. Westerfeld, W. W. *J. Biol. Chem.* **1943**, 101, 495.
  21. Larossa, R. A.; Schloss, J. V. *J. Biol. Chem.* **1984**, 259, 8753.
  22. Subarmanian, M. V.; Loney-Gallant, V.; Dais, J. M.; Mireless, L. C. *Plant Physiol.* **1991**, 96, 310.
  23. Beyer Jr, E. M.; Duffy, M. J.; Hay, J. V.; Schlueter, D. D. *Herbicides*: Kearney, P. C.; Kaufman, D. D., Ed.; Marcel Dekker, Inc.: New York, U.S.A., **1988**; Vol. 3, p 117.
  24. Ahn, T. W.; Kim, D. W.; Choi, J. D. *J. Biochem. Mol. Biol. (formerly Korean Biochem. J.)* **1992**, 25, 636.
  25. Shin, H. O.; Kim, D. W.; Chang, S. I.; Choi, J. D. *J. Biochem. Mol. Biol. (formerly Korean Biochem. J.)* **1995**, 28, 471.
  26. Choi, J. D.; Moon, Y.; Chang, S. I.; Chae, J.K.; Shin, J. H. *J. Biochem. Mol. Biol. (formerly Korean Biochem. J.)* **1993**, 26, 638.
  27. Durner, J.; Gailus, V.; Boger, P. *Plant Physiol.* **1991**, 95, 1144.
  28. Hall, L. M.; Devine, M. D. *Plant Physiol.* **1990**, 93, 962.
  29. Landstein, D.; Arad, S.; Barak, Z.; Chipman, D. M. *Plant Physiol.* **1993**, 191, 1.
-