

식물 치사관련 유전자를 이용하는 신규 제초제 작용점 탐색 및 조절물질 개발동향

황인택* · 이동희¹ · 최정섭 · 김태준 · 김범태 · 박유신¹ · 조광연

한국화학연구원 ¹(주)제노마인

결론 : 신규 제초제 작용점의 발굴은 유전체학과 조합화학 등 새로운 기술이 등장하여 그 가능성이 높아지고 있다. 대략 10^{30} 에서 10^{50} 여 개의 화학물질의 합성이 가능하고 50,000여 개의 식물 유전자 지도가 완성되어 이들의 조합으로 새로운 제초제의 작용점 발굴 가능성이 높아지게 될 것이다. 즉, 고등식물이 가지고 있는 50,000여 개의 유전자 가운데 0.1%, 1.0% 또는 10%가 신규 작용점이 된다면 50, 500, 5000개의 신규 작용점을 발견할 수 있는 것이다. 신규 제초제의 개발을 위해서는 target enzyme의 선택과 결정, 저해제의 설계, 작용점까지 도달하는 과정, 대사적인 운명 등 여러 가지 요인들이 검토되어야 한다. 이러한 과정에서 가장 중요한 것은 확실한 작용점의 선택에 있다. 또한 다양한 생화학적 정보를 통하여 작용점/효소의 저해로부터 고사에 이르는 과정을 이해함은 물론 보다 강력한 저해제의 합성과 살초 과정을 이해할 수 있어야 할 것이다. 그 동안에는 이미 알려진 작용점을 대상으로 신규 화합물을 합성하거나 유도체를 개발하는 것이 대부분이었지만 최근에는 antisense 기법 등을 활용하여 새로운 치사관련 작용점을 찾아내는데 잠재력과 가능성을 확대시켜주고 있다. 새로운 치사관련 작용점을 발굴한 후에는 대상효소의 화학적, 생화학적 기능과 단백질의 구조를 분석하여 강력한 저해제를 설계하는데 활용하게 될 것이다. 치사관련 돌연변이체와 antisense 기법을 활용하고 식물 생리학적 반응을 기초로 하여 리드화합물을 탐색하는 것은 새로운 접근방식이며 농약 화학적 특성을 갖는 효소 저해제들의 합성은 크게 6가지로 요약할 수 있다. 공통특이시약, 기질 유사체 합성, affinity labels, 자살기질체, 반응중간산물, 그리고 extraneous site inhibitors 등을 들 수 있다. 이와 같은 방법으로 후보화합물이 선발된다 하여도 실제 식물에 처리하여 흡수, 이행, 대사 등에 관한 시험이 반드시 이루어져야 새로운 제초제를 탄생시킬 수 있다. 또한 약물의 전달과정과 무독화작용을 통하여 pro-herbicide에 대한 연구를 진행하게 될 것이며, 마지막으로 잡초와 작물간의 선택성이 고려되어야 효소 특이적 접근방식에 의한 신규 선택성 제초제의 개발이 성공할 수 있는 것이다.(2001년 9월12일 접수, 2001년 9월 19일 수리)

Key words : Affinity labels, antisense, extraneous site inhibitors, genomics, ground-state analogues, group specific reagents, herbicide design, lethal phenotypes, lethal target, reaction intermediate analogues, site of action, suicide substrates.

서 론

제초제가 일반적으로 광범위하게 사용된 것은 1940년대 후반부터이고, 그 동안 식량생산 증대에 중대한 역할을 해왔다. 우리나라는 1950년대부터 80년대 초까지 실시된 강력한 식량증산정책에 힘입어 농약의 사용량이 급속히 증가해 왔으며 이와 함께 농약업계는 기존시설을 개선하는 한편 선진국과의 기술 제휴 등으로 상당한 기술축적을 이루었고, 국산원제의 수출량 또한 많이 증가되어 왔다. 그러나 하나의 새로운 농약을 개발하기 위해서는 화합물의 생물활성을 검정하고, 약효, 약해 및 각종 독성시험 뿐만 아니라 제법개발, 시장성 및 경제성 등을 조사하는데 평균 10년 이상이 소요되며 200억~400억 원 정도의 개발비가 투입된다(松中, 2000; 황 등, 2001b). 더욱이 지금까지 농약을 합성하여 상품화 할 수 있는 확률은 평균 20,000분의 1밖에 되지 않아 투자액과 금리 등을 고려한다면 농약산업은 큰 위험부담을 안고 있는 상업이기 때문에 대부분의 국가들이 아직도 새로운 농약을 개발하지 못하고 선진국에서 개발한 원제를 수입, 사용하고 있는 실정이다(한국정밀화학총람,

2001).

신규 제초제의 개발은 산업적인 차원에서 높은 부가가치, 독점적인 권리행사가 가능한 지적소유권 확보 등을 목적으로 선진 다국적 기업들이 확대 통합되고 있다(정 등, 2001). 선진국기업이 새로운 제초제 하나를 개발하여 확보한 수익은 오래 동안 지속되었기 때문에 우리나라와 같이 영세한 산업구조 속에서는 제초제를 포함한 농약산업을 단순히 회사나 이익단체만이 해결해야 한다는 시각에서 탈피하여 국가전략산업으로서 그 중요성을 제고하여야 할 것이다. 또한 21세기 post-genome 시대에는 유용기능 유전자의 확보와 이를 이용하는 산업화 경쟁이 더욱 치열해질 전망이다. 세계적인 신규 제초제의 개발에 있어서도 신규 작용점 탐색이 승패를 결정하게 될 것이다. 이러한 제초제의 신규 작용점 탐색과 새로운 구조의 제초제 개발은 저항성 잡초의 관리에 물론 살초스펙트럼의 확대, 신규 물질특허와 시장개척, 인축에 안전하고 환경 친화력을 증대시키는데 절대적으로 필요하다. 즉, 제초제는 식량확보에 필요한 작물보호약품으로서의 기능과 30조원의 세계 농약시장에서 50.8%를 점유하고 있는 정밀화학제품으로서 국가적인 전략사업으로서의 기능을 동시에 가지고 있다는 것을 인식하여야 할 것이다(황 등, 2001a).

*연락처

신규 제초제의 개발 기술은 끊임없이 발전 변모하여 왔으며, 최근에는 기능 유전자의 발굴과 신규 작용점의 탐색 등 여러 가지 분자생물학 기술이 접목되고 있다(Abell, 1993, 1996; Höfgen, 1994, 1995, 1998; 김 등, 2001; 황 등, 2001a). 또한 창조적인 기능검색 체제와 목적 지향적인 합성기술이 개발되어 기존의 모방적인 방법에서 벗어나 환경 친화성 제초제의 개발체제를 구축하고 있다. 즉, 기존의 화학물질과 작용점을 대상으로 하는 me-too 합성과 random 스크리닝 방법이 지금까지 추진되어 왔던 생리활성 조절물질 개발 방법이었으나 신규 작용점의 부재로 인한 안전성 및 환경오염 문제의 대두로 한계점에 봉착하였고, 이를 극복하기 위하여 새로운 기술이 절실하게 요구되고 있다(Schloss와 Aulabaugh, 1990; Saari, 1999; Rendina 등, 1994). 특히 post-genome 시대의 정보를 적극적으로 활용하는 분자생물학과 생화학적 접근에 의한 신규 작용점 탐색 및 조절물질 개발이 필수적이며, 작용점에서의 효소/수용체를 대상으로 수행되는 고효율 검색방법(high throughput screening, HTS)과 조합화학(combinatorial chemical synthesis, CCS)기술이 접목되어 기존의 방법에 비해 수십 배 또는 수백 배 빠른 속도로 수행할 수 있게 될 것이다(Broach와 Thorner, 1976; 畑中, 2000; Hess 등, 2001). 따라서 생물계놈연구의 시작과 함께 막대한 양의 유전자 정보가 활용되어 생명현상을 해석하기 시작하였기 때문에 신약개발의 시발점에서 유전자 정보를 활용하지 못하면 영원한 기술 예속국으로 전락하게 되어 다국적 기업의 판매시장 신세를 면하지 못하게 될 것이다. 선진국과 치열한 경쟁관계에 있는 세포기능 저분자 물질의 성공적인 개발을 위해서는 유전자의 발현물질인 단백질체(proteomes) 연구를 통하여 세포신호전달 과정과 생체대사조절기구의 생리·생화학적 해석과 생체 내에서의 역할규명이 절대적으로 필요하다. 이는 차세대 신 물질개발의 유일한 돌파구로써 세계의 여러 다국적 기업들은 이미 이러한 연구사업에 착수함으로써 본 사업에 대한 정부지원의 타당성과 시급성이 강조된다. 이러한 접근방식은 신약개발에 있어서 세계적으로 앞선 기술이기 때문에 시간을 다투어 추진되어야 하며, 고급인력과 지식활용 특성상 우리나라 여건에 적합하여 집중적인 투자가 이루어진다면 단기간 내에 선진 7개국의 수준으로의 도약이 가능한 분야이다.

따라서 본 고에서는 신규 제초제 개발을 위한 작용점 탐색의 현주소를 알아보고 앞으로 전개될 식물 치사관련 유전자를 이용하는 신규 제초제 작용점 탐색 및 조절물질 개발에 관한 내용을 조사 정리하였다.

신규 제초제 개발

일반적으로 새로운 제초제를 개발하기 위해서는 후보물질의 탐색과 최적화 작업으로부터 시작되는데, 후보물질 선별은 다음과 같은 세 가지 접근방식에 의해 추진되어 왔다. 첫째, 새로운 화합물에 대한 임의선발(random screening), 둘째, 기존의 제초제나 제초활성이 확인된 천연물질을 새로운 물질합성의 선도물질로 이용하는 방식, 셋째, 주요 대사 과정에 대한 특정 저해제의 합리적 설계(rational design) 등이다(松中, 2000; Schloss와 Aulabaugh, 1990; Saari,

1999; Rendina 등, 1994). 그 동안 개발된 제초제의 대부분이 고전적 약효검색 방법을 통해서 개발되었지만 고전적인 방법은 실험재료 확보를 위한 재배시설, 장비, 넓은 공간과 많은 인원이 필요하기 때문에 단순화, 표준화하려는 노력이 진행되어 왔다. 또한 고전적인 방법으로는 약효검색 결과를 얻기까지 일정기간이 요구되기 때문에 유도체 합성에 시험 결과를 즉각적으로 이용 할 수 없고, 복잡 다양한 생육환경의 유지관리, 검색 가능한 화학물질의 수 등이 제한요소이었다. 이를 개선하기 위하여 소개된 biorational approach 방법은 작용점을 대상으로 화합물을 합성하는 것이다. 대표적인 예로 광합성 전자전달계를 저해하는 제초제 개발은 광합성 전자전달이 일어나는 식물체의 thylakoid membrane 조직만을 추출해서 광 조건 하에서 전자전달과정의 저해능력을 조사하고, 활성이 높은 화합물에 대해서는 다시 세포수준에서 저해활성을 측정한다. 이어서 조직과 전 체식물로 대상을 확대하는 방법으로 실험실 규모에서 대량의 화합물을 짧은 시간 내에 검색할 수 있다는 장점을 가진다(Saari, 1999; 황 등, 1993a,b). 최근에 소개된 또 하나의 방법은 고효율 검색방법(high throughput screening, HTS)이다. 이는 biorational approach 방법으로부터 진일보한 것으로써, 기존의 알려진 작용점 또는 가능한 작용점 효소/수용체를 대상으로 수행하는 방법으로 조합화학 기술과 접목되어야 하며 대부분의 과정이 로봇에 의해 수행될 수 있도록 설계된다는 것이다(Broach and Thorner, 1976; 畑中, 2000; Hess 등, 2001). 이러한 방법으로 약효검색을 수행한다면 기존의 방법과는 비교할 수 없을 정도로 많은 화합물을 신속하게 검정할 수 있다. 그러나 이러한 방법들은 실제 환경의 대상식물에 대해서 *in vivo* 적용시험을 수행해야만 하기 때문에 고전적인 방법의 시설과 장비는 기반기술로 유지되어야만 한다. 따라서 새롭게 개발되는 biorational approach와 HTS 등은 수많은 후보물질 중에서 활성이 없는 화합물을 일차적으로 제거하고 활성이 높은 화합물만을 대상으로 적용시험을 수행하기 때문에 시간과 경비, 노동력을 크게 절감시킬 수 있다는 장점이 있다. 그러나 선별된 후보화합물이 작용점/효소에 대하여 높은 저해활성을 가지고 있다고 할지라도 대상식물에 대한 방제효과와 반드시 일치하지 않으며, 때로는 모핵 화합물이 식물체내에서 분해 또는 변화되어 활성을 나타내는 pro-pesticide도 있다는 점을 감안하면 고전적인 방법의 중요성을 인정하지 않을 수 없다. 이와 같이 *in vitro* 시험에서 작용점/효소를 강력하게 저해하는 물질이 *in vivo* 시험조건에서 효과를 나타내지 못하는 원인은 후보물질이 작용점/효소까지 전달되지 못하는 것과, 대상 작용점/효소가 제초제 개발에 적합하지 못하기 때문이다. 따라서 신규 제초제를 개발하기 위해서는 작용점/효소 선별에 신중을 기해야 하며, 선별된 후보화합물을 실용화시키기 위해서는 작용점까지 신속하게 도달할 수 있도록 가공하는 최적화 기술이 수반되어야 한다(그림 1). 즉, 처리한 후보화합물이 흡수되어 작용점을 저해함으로써 나타나는 외부 형태적 살초증상은 신규 제초제의 개발방향을 설정하는데 중요한 정보를 제공하게 된다.

지금까지 개발된 제초제는 외부 형태적 살초증상에 따라

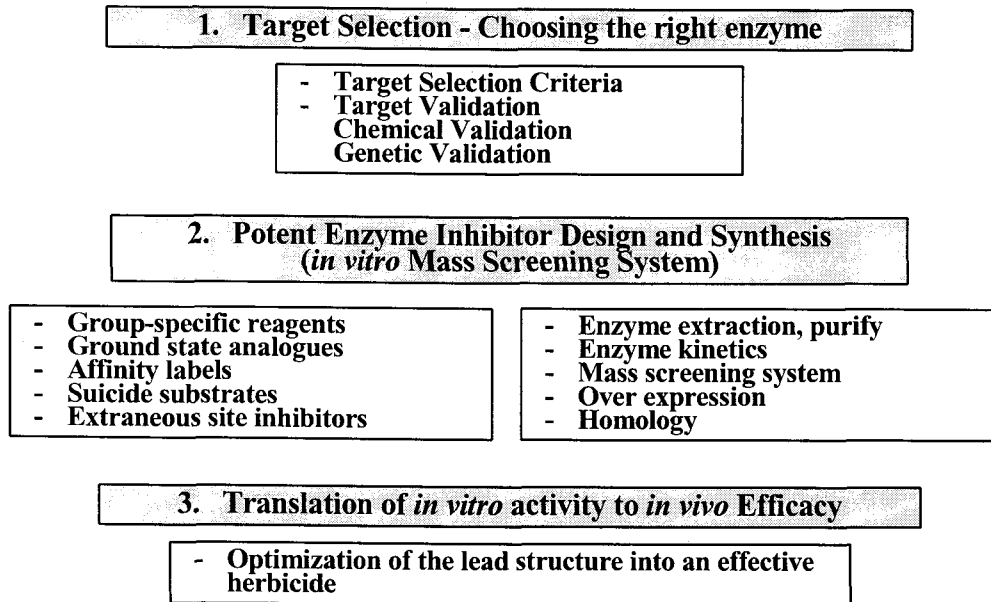


Fig. 1. Designing the target-site-directed herbicides.

크게 3가지로 분류할 수 있다(그림 2). 먼저 형태적 변화를 일으키게 하는 것들로는 지질생합성을 저해하는 aryloxyphenoxypropionates, carbamothioates, cyclohexane diones, petroleum oils 등, 생체 막 생합성을 저해하는 *p*-nitro 가 치환된 diphenylethers계, 광합성의 전자전달을 저해하는 제 1 광계 저해제로 bipyridyliums와 제 2 광계를 저해하는 ureas, triazines, triazinones, uracils, acylanilides, pyridazinones, biscarbamates 등, 산화적 인산화 과정에서 에너지공급을 저해하는 benzonitriles와 metallo-organic arsenicals 등이 이에 해당된다. 성장을 저해하는 것으로는 sulfonylureas, imidazolinones, triazolopyri-

midines, glyphosate와 glufosinate 등 아미노산 생합성저해제, carbamates, dinitroanilines, difenzoquat 등 세포분열을 저해제, chloroacetamides와 같은 핵산 또는 단백질 생합성 저해제가 있고, phenoxyacids, benzoic acids, picolinic acids 등 옥신활성을 보이거나 IAA 투과를 저해하는 naptalam이 있다. 마지막으로 엽록소 파괴 또는 carotenoid 생합성 저해를 통한 백화증상으로 식물체를 죽게 하는 pyridazinones, isoxazolidones, aminotriazole 등으로 구분할 수 있다(Zimdahl, 1993).

또한 이들이 개발된 시기와 밝혀진 작용기구 또는 작용점별로 분류하면 그림 3과 같다. 1940년대에 2,4-D를 포함

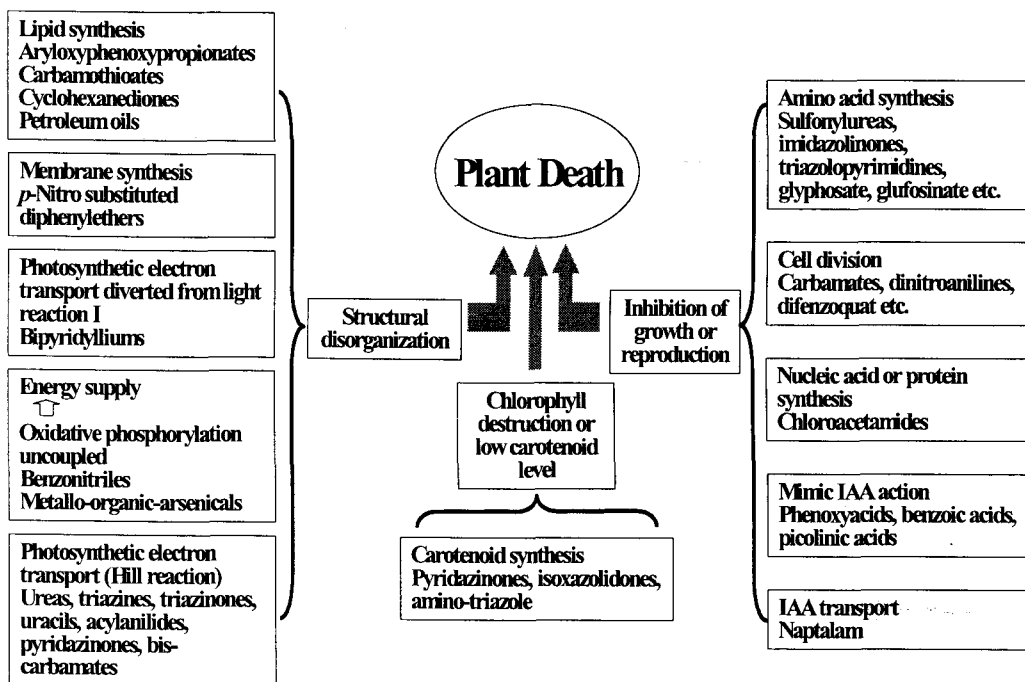


Fig. 2. Summary of herbicide mechanism-of action. (from Zimdahl, 1993)

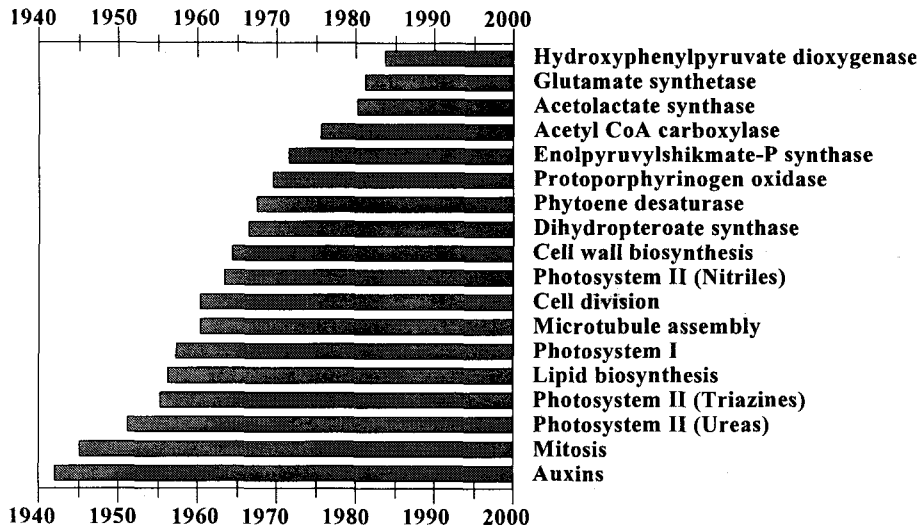


Fig. 3. Year of the announcement for herbicides. (from Saari, 1999)

한 옥신활성 제초제가 개발되어 현재까지 사용되고 있으며, 세포분열 저해제들이 뒤를 이어 개발되었고, 광합성저해제, 지질생합성저해제들로 이어져 1970년대 중반에는 화본과선택제초제(graminicide)로서 acetyl CoA-carboxylase 저해제가 개발되었고, 1980년대에는 acetolactate synthase, glutamate synthetase, hydroxyphenylpyruvate dioxygenase 저해제 들이 개발되었다. 이와 같이 많은 제초제들 대부분이 me-too 방법으로 합성되고 random 스크리닝으로 선발되었기 때문에 상품으로 개발된 이후에 작용점이 밝혀지게 되었고 기존 제초제의 구조 유사체를 합성하거나 밝혀진 작용점을 대상으로 후보화합물을 탐색하게 되었다. 그러나 후보화합물이 개발될 시점이면 선행 제품에 의해 저항성 잡초가 발생되거나 인체와 환경에 대한 국민들의 관심이 높아져서 후속 제초제의 개발이 더욱 어려워졌다(Pillmoor 등, 1995; Saari, 1999).

따라서 인체와 환경에 영향을 주지 않으면서도 대상 식물에는 치명적으로 작용하는 신규 작용점의 탐색이 신규

제초제의 개발에 제한요인이 되어 왔던 것이다. 이와 같은 작용점 탐색을 위해서 그 동안 광합성과 필수아미노산합성 과정 등 식물 특이적인 대사과정 관련 효소에 관심이 집중되어 왔다. 즉, 사람과 동물은 광합성과 필수 아미노산합성 기능이 없기 때문에 이를 저해하는 화합물질들은 인체에 미치는 독성이 없거나 낮을 것으로 예상하기 때문이다. 이러한 이유로 지금까지 개발된 제초제 가운데 광합성 저해제가 20%, 아미노산 생합성 저해제가 17%, 지질생합성 저해제가 13%로 전체의 50%를 차지하고 있다.

지금까지 개발된 제초제의 작용점 또는 작용기구를 조사해보면 pesticide manual에 기록된 243개의 제초제 가운데 147개는 11개의 작용점(acetyl CoA carboxylase, ACCase; acetolactate synthase, ALS; photosystem I, PSI; photosystem II, PSII; protoporphyrinogen oxidase, PPO; phytoene desaturase, PDS; 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase, 4-HPPD; enolpyruvylshikimate-P synthase, EPSPS; glutamine synthetase, GS; dihydropteroate synthase,

Table 1. Metabolic processes affected by herbicides (from Saari, 1999)

Metabolic Process	Number of Active Ingredients
Photosynthesis (I and II)	49 (20%)
Amino acid biosynthesis (ALS, EPSPS, GS)	41 (17%)
Lipid biosynthesis (ACCCase, dthers)	32 (13%)
Cell division	19 (8%)
Tetrapyrrole synthesis	18 (7%)
Auxin function	16 (7%)
Microtubule assembly	13 (5%)
Crotenoid biosynthesis	12 (5%)
Other process	10 (4%)
Unknown	33 (14%)
Total	243(100%)

147 herbicides interfere with 11 known SOA(ACCCase, ALS, PSI, PSII, PPO, PDS, HPPD, EPSPS, GS, DHPS and microtubule).

63 herbicides affect eight well-described MOA but are of unknown SOA(bleaching, mitosis, cell division, cell wall synthesis, uncoupling, lipid synthesis, auxin function, and auxin transport).

33 herbicides have an unknown SOA and ars not associated with any particular MOA.

DHPS; microtubules)을 저해하는 것으로 연구되었고, 63개의 제초제는 작용점이 밝혀지지 않았지만 8개의 작용기구(bleaching, mitosis, cell division, cell wall synthesis, uncoupling, lipid synthesis, auxin function, auxin transport)와 관련된 것으로 분류할 수 있으며, 나머지 33개의 제초제는 작용점(site of action)은 물론 작용기구(mode of action)조차 알지 못하고 있다(표 1). 따라서 아직까지 작용점이 밝혀지지 않은 99개 제초제의 작용점을 구명하게 되면 신규 제초제를 개발하는 작용점으로 활용할 수 있을 것이다. 또한 식물체가 보유하고 있는 40,000-60,000개의 유전자도 신규 작용점의 탐색 대상이 되고 있는데, 예를 들어 50,000여 개의 유전자 가운데 신규 제초제의 작용점으로 활용할 수 있는 유전자의 확률이 0.1%라면 50개, 1%일 경우 500개, 10%일 경우 5,000개의 신규 작용점이 새롭게 탐색될 수 있을 것이다(Saari, 1999). 따라서 전 세계적으로 유전체 연구가 급속도로 진행되고 있고 *Arabidopsis thaliana*의 유전자 분석이 모두 이루어졌기 때문에(The Arabidopsis Genome Initiative, 2000.) 최근에는 신규 제초제 개발을 위한 작용점 탐색 분야에 기능성 유전체 연구가 집중되고 있다. 기능성 유전체 연구의 단계에서는 목적에 부합하는 유용 유전자의 분리와 확보가 필수 불가결하다. 그러나 유전체 연구를 통하여 생산해 내는 유전자 서열 정보만으로는 그 기능을 추측하기 힘들고, 이들에 대한 지적 재산권을 보호받기 위해서는 기능을 밝혀야만 한다.

유전자 발굴을 통한 신규 작용점 탐색

식물 기능성 유전체 연구는 1) 식물에 내재하는 유전자의 발현을 인위적으로 제한하여 신 기능성 형질 전환 식물

을 창제하거나 2) 이 기술을 대량으로 적용하여 원하는 형질의 식물체를 선발하거나 3) 식물 유전자들의 식물체내 기능을 대량 확인하는 데 이용되는 유전자 기능 확인 및 유용 유전자를 발굴하는 연구로서 현재의 일반적인 식물 생명공학 산업의 제 분야 즉, 신제품 개발 산업, 식품산업, 화학공업 등에 사용되고 있는 기반 기술이며, 향후 이러한 산업의 지속적 발전 뿐 아니라 유망 산업인 환경 정화 및 치유 산업, 식물 유래의 약품 및 specialty chemical 산업의 발달에는 식물 유전자 기능의 이해와 신 기능성 유전자의 발굴 및 이용이 중요한 관건으로 이를 위해서는 식물 기능성 유전체 연구가 필수적이다.

미국에서는 이미 "The 2010 Project"를 통하여 유전자 기능연구를 적극적으로 추진하고 있다(Chory, 2000). 유전자의 분리와 그 기능을 확인하는 효과적인 방법으로 cDNA sequencing과 기존의 mutagenesis 방법이 활용되고 있는데 이들이 가지는 한계를 극복하면서 새로운 유용 유전자를 확인, 분리할 수 있는 신기술로 식물체내 유전자를 무작위로 파괴시킨 변이체를 대량 생산하고 그 기능을 확인하는 random antisense mutagenesis (RAM) 기술을 세계 최초로 포항공대와 (주)제노마인에서 개발하여 활용하고 있다(그림 4, 5).

기능성 유전체의 이용분야 중에서 식물기능 조절 물질의 개발분야에 RAM 기술을 접목시키는 것은 세계적으로 앞서가는 첨단기술이며 신규 제초제가 개발된다면 개발된 제초제의 독점 사용권을 행사할 수 있고, 이를 이용한 저항성 품종개발, 응용 분야 확대적용 등을 통하여 세계적인 제초제의 시장진입과 함께 제 2의 제초제 저항성 작물을 출시할 수 있는 기틀이 되는 것이다. 인체에 대한 유전체 연구는 물론 식물에 대한 유전체 연구에서도 창의적 과학

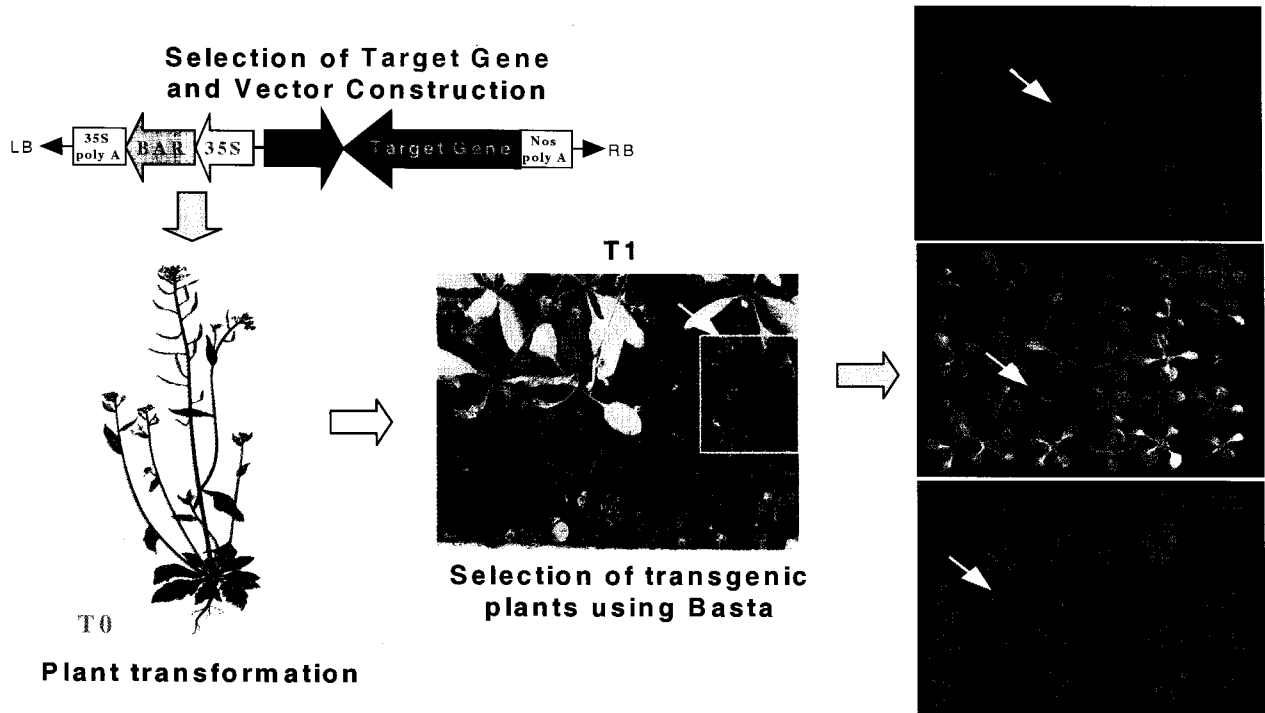


Fig 4. The principle of antisense approach in the reverse genetics (from GenoMine Co.).

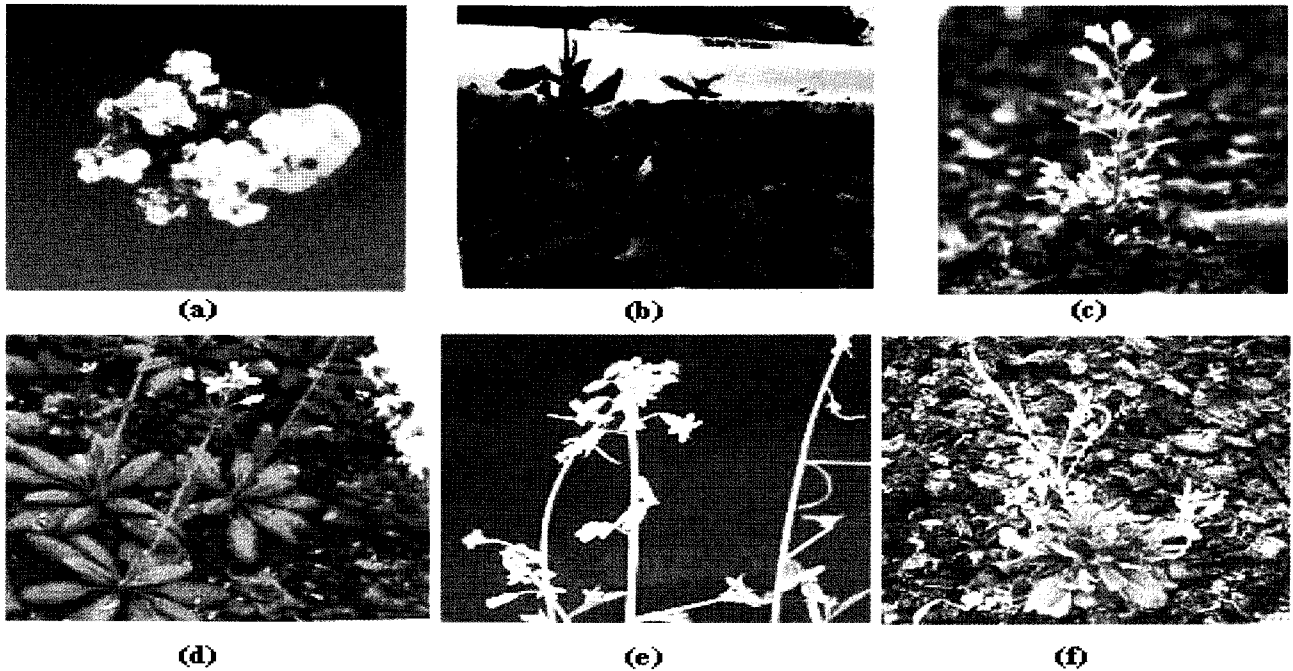


Fig. 5. Examples of morphological mutants obtained by RAM Group, GenoMine. Phenotypic characteristics represent as follows: (a) callus-like form after germination, no hypocotyl, no true leaf, pseudo-flowering and lethal-like, (b) bushy and compact form, multi rosette leaves, growth retardation and low fertility, (c) dwarf, compact cotyledon and leaf, absence of petiole, short stem, a prolonged vegetative phase, a delayed senescence and severe reduction in fertility, (d) rose form in leaf shape, compact cotyledon and leaf and no petiole, (e) downward flowering and helix-like inflorescence, (f) bushy and compact form, multi rosette leaves, a twist in inflorescence and low fertility. (from GenoMine Co.)

기술이 인간의 삶에 유용하게 이용되게 하기 위해서는 유전자 지도가 작성되고, 기능을 확인하여 목적에 알맞게 조절할 수 있어야 한다. 따라서 최종적으로는 유용한 기능을 조절할 수 있는 조절물질의 개발이 필요하게 된다. 기능을 유용하게 활용할 수 있는 유전체 연구가 진행되지 않았던 과거에는 이러한 분야의 연구가 불가능하였지만, 수많은 유전자 정보가 제공될 미래에는 유전자의 기능을 파악하고 조절하는 분야가 어떠한 분야보다 활발하게 추진될 것이다.

따라서 유용 기능성 유전자 발굴 기술인 RAM approach를 통하여 유용 기능성 유전자 자원을 대량으로 발굴하고, 이를 이용하여 독창적이고 강력한 생체기능 조절물질을 개발하고자 하는 연구가 한국화학연구원과 (주)제노마인에서 공동으로 진행되고 있다. RAM을 통하여 발굴되는 유전자의 기능은 매우 다양하기 때문에 이를 확인하고(그림 5), 기능을 조절할 수 있는 화학물질을 개발한다는 것은 식물기능 화학조절의 차원에서 무한한 가치를 창조할 수 있을 것이다. 따라서 앞으로는 식물체에만 존재하면서 환경친화적인 신규 식물기능 조절물질과 제조제만이 세계적인 시장을 확보 할 수 있으며 이는 시간을 다투는 중요한 연구인 것이다. 특히 antisense approach 기법을 이용한 신규작용점 탐색 방법은 유전자 기능을 기초로 출발하는 목표 지향적 접근방식이기 때문에 그 동안의 모방적 창출에서 독창적 신규 식물기능 조절물질 개발의 신기원이 될 것으로 확신한다(Bourque, 1995; Zou 등, 1999; D'Aoust 등, 1999; Tang와 Sturm, 1999).

신규 작용점을 탐색하는 유전공학적 방법으로서 다른 하나는 신규 작용점으로 유망한 것들을 대상으로 접근하는 방법이다. 아무리 많은 후보 작용점이 존재한다 하여도 작용점이 결핍된 식물체가 성장을 하지 못하거나 죽지 않는다면 제조체로서의 작용점이 될 수 없다(Abell, 1993, 1996; Höfgen, 1994, 1995, 1998; 황 등, 2000). 이를 확인하기 위해서는 작용점/효소를 저해하는 것으로 이미 알려진 화학물질을 처리하여 확인할 수 있으나 식물체내에서 화학물질이 변화되거나 작용점까지 도달하지 못하는 경우에는 확인할 수가 없다. 이를 해결하기 위해서는 유망 후보작용점의 유전자 분석을 통하여 확인된 유전자를 antisense기법으로 형질전환 시킨 식물체를 만들었을 때 식물체가 나타내는 결과를 통하여 작용점을 탐색하는 것이다. 즉, 정상적인 식물체의 필수 유전자의 일부를 역방향으로 삽입시켰을 경우 식물체가 죽게 된다면 동일 유전자가 발현하는 단백질/효소의 기능을 억제하는 화학물질을 제조체로 개발하여 처리한다면 필수 유전자 발현 단백질이 만들어지지 않기 때문에 식물체는 반드시 죽게 될 것이다(그림 6).

지금까지 알려진 대표적인 후보 작용점으로서는 4-hydroxy phenylpyruvate dioxygenase, adenylosuccinate synthetase, AMP deaminase, anthranilate synthase, ascorbate peroxidase, asparagine synthetase, auxin transport, cytosolic glutamine synthetase, dihydro dipicolinate synthase, dihydrodipicolinate reductase, carboxypeptidase A, chloroplast NADH dehydrogenase, cinnamyl-

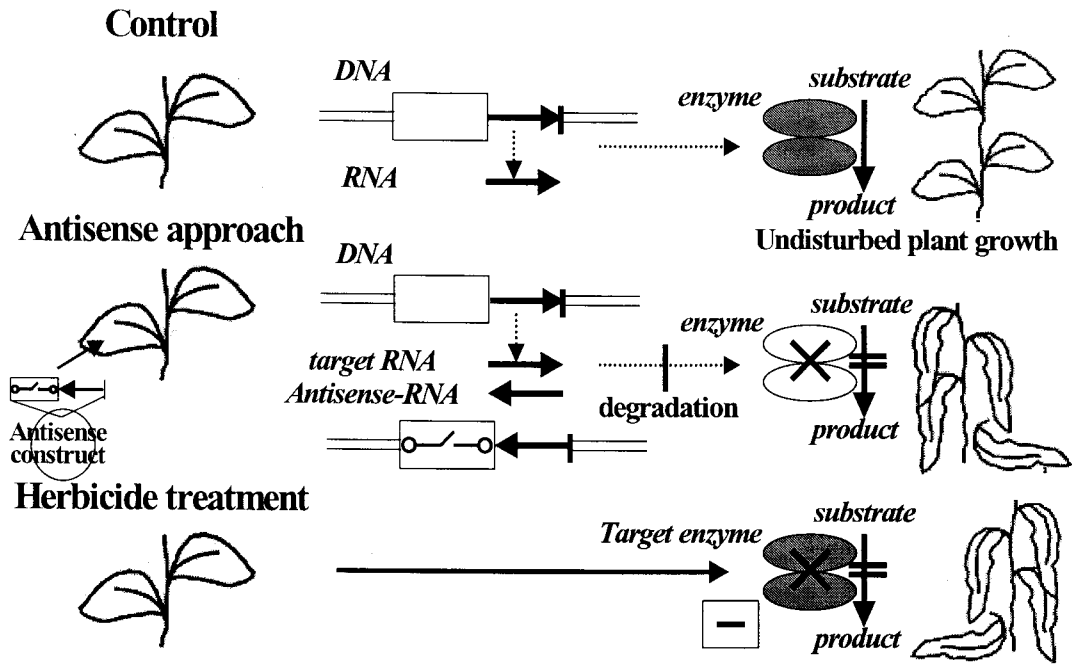


Fig. 6. Antisense technology for target validation(from Höfgen. 1998).

alcohol dehydrogenase, geranylgeranyl diphosphate synthase, glutamate dehydrogenase, glutamate synthetase, glutamate-1-semialdehyde aminotransferase, glutamate synthase, histidine biosynthesis, imidazoleglycerol phosphate dehydratase, isopropylmalate dehydrogenase, isopropylmalate isomerase, pheophorbidase, farnesyl transferase, *p*-hydroxyphenyl pyruvate dioxygenase, plasma membrane H⁺-ATPase, pyruvate orthophosphate dikinase, threonine dehydratase 등이 있으나 앞으로 더욱 많은 후보 작용점이 밝혀지게 될 것이고 이를 조절하는 물질들이 합성 개발될 것으로 생각한다(Kishore와 Shah, 1988; Schloss와 Aulabaugh, 1990; Abell 등, 1993; Rendina와 Abell, 1994; Pillmoor 등, 1995; Abell, 1996; Kleier와 Hsu. 1996; Subramanian, 1997; Bartley 등, 1999; Coulter 등, 1999; Cromartie 등, 1999; Ficarelli 등, 1999; Grossmann와 Schiffer. 1999; Saari, 1999). 특히 제초제 분야에서는 Novartis가 제초제의 target 유전자의 발굴에 이 기술을 적용하고 있으며 이와 관련된 분야에서 수 년 내에 수 십 종의 antisense 이용 상품을 시장에 출시하려고 있다(<http://www.bio.org/food&ag/foodwelcome.html>, Genetic Engineering News 1997).

작용점 지향적 후보물질 탐색

RAM approach를 통하여 확보한 유전자의 기능을 확인하거나, antisense 기법을 이용하여 신규 제초제 작용점을 선정한 이후에는 강력한 저해물질을 탐색하여야 한다(그림 1). 이를 위해서는 효소를 대상으로 하는 활성 검정방법이 확립되어야 하고 여러 가지 접근방법을 동원하여 후보물질을 확보하여야 한다. 이 때 후보물질을 합성하기 위해서는 선도물질이 필요하게 되는데 신규 작용점일 경우에는 선행 연구결과가 없거나 많지 않다. 따라서 대상 작용점의 기능

조절 선도물질에 대한 정보가 전혀 없는 경우에는 효소의 결정구조를 이용하거나 효소의 작용기전 연구에서 얻은 정보를 활용하여 조절물질을 설계하고 합성하여야 한다. 또한 화합물은행에서 보유하고 있는 많은 화합물을 이용하여 새로운 정보를 확보하거나 이미 알려진 각종 효소 저해물질(천연물 포함)을 활용할 수도 있다(Abell 등, 1993; Abell, 1996)

목적 지향적인 후보 화합물 합성과정에서 잘 알려진 작용점을 대상으로 할 경우에는 기존의 조절물질을 기본으로 하여 합성하기 때문에 새로운 물질을 도출하기 쉽다. 그러나 이를 상품으로 개발하기 위해서는 효력과 비용 면에서 기존물질과 차별성을 가지지 않으면 안 된다. 또한 동일한 작용점을 가진 제품들이 사용되고 있다면 새롭게 개발한 상품이 시장에 진입하기도 전에 저항성 잡초가 출현될 수 있다. 이와 달리 새로운 작용점을 목표로 하는 선도물질 개발은 상대적으로 어렵다. 그러나 훌륭한 작용점을 선정하게 되면 대체적으로 다음과 같은 방법으로 접근하게 된다(Abell 등, 1993; Abell, 1996; Saari, 1999; Rendina 등, 1999). 먼저 공통특이시약(group specific reagents)을 활용하게 된다. 이는 단일 효소 특이성은 부족하지만 반응계에서 필요로 하는 기질, 조효소 등이 가지고 있는 공통적인 결합잔기(binding residue)의 구조를 바탕으로 화합물을 합성하는 것이다. 대표적인 예로서 chloroacetamide계 화합물들은 분자내의 chloromethyl기가 식물체내 단백질의 nucleophilic group과 치환반응을 일으키거나 coenzyme A와 수종의 단백질을 alkyl화시키는 것으로 알려져 있다(그림 7).

따라서 chloroacetamide계 제초제의 작용점이 아직까지 분명하게 밝혀지지 않고 있으며 다수의 작용점을 가지고 있는 것으로 여겨지고 있다. 두 번째로는 기질, 생성물, 조효소, allosteric effectors 등의 유사체 합성(ground state

Chloroacetamides - Group Specific Reagents (?)

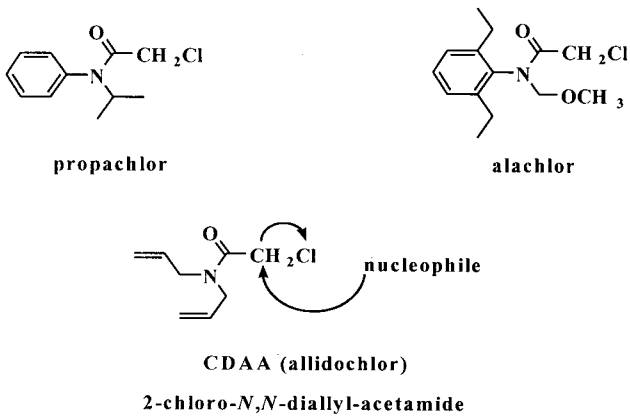


Fig. 7. Chloroacetamide herbicides-possible group specific reagents. (from Abell et al., 1993)

analogues)이다. 이렇게 합성한 화합물들은 특정효소에만 특이적으로 작용하게 되며 대표적인 2가지 화합물 methyl-(4-aminophenylsulphonyl)carbamate(asulam)과 6-fluoro-5-enolpyruvyl dhiminate-3-phosphate(6-fluoro-EPSP)를 예로 들 수 있다(그림 8).

세 번째로는 affinity labels로서 이는 상기 두 가지 특성을 모두 갖도록 합성하는 것이다. 예를 들어 acivicin이라는 화합물은 glutamine 구조 유사체 이면서 anthranilate

Ground State Analogues

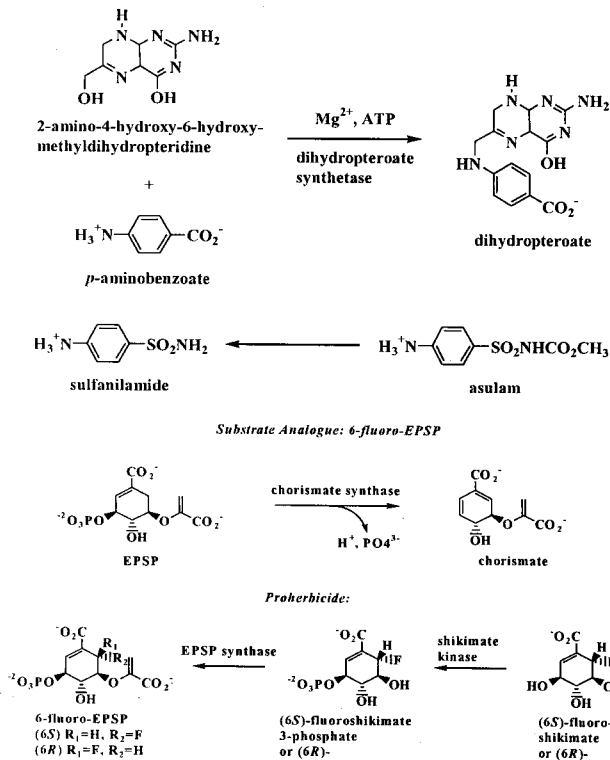


Fig. 8. Examples of ground state analogue inhibitors for dihydropteroate synthetase (top) and chorismate synthase (bottom). (from Abell et al., 1993)

synthase와 glutamate synthase 등을 포함한 glutamine-dependent aminotransferase의 cysteine 잔기를 알킬화 시킴으로써 효소를 불활성화 시킨다(그림 9).

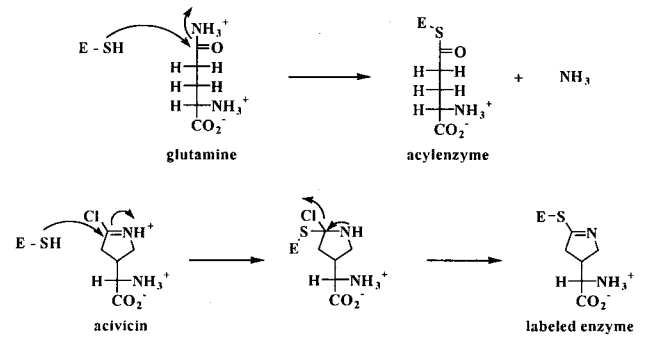


Fig. 9. Acivicin: an example of an label for glutamine-dependent amidotransferases. (from Abell et al., 1993)

네 번째로는 suicide substrates, irreversible inhibitors, kcat inhibitors, Trojan horse reagents 등으로 표현되는 화합물들로 처음에는 기질과 가역적인 결합을 이루지만 시간이 경과하면서 주변의 아미노산 잔기와 추가적인 결합을 하여 불가역적인 상태로 전환되는 것이며 대표적인 예로서 cystathionine- γ -synthase를 불활성화시키는 propargyl glycine이 있다(그림 10).

다섯 번째로 반응 중간산물 유사체(reaction intermediate analogues)의 합성이다. 이는 특정 작용점에 대한 선택적 조절물질을 탐색하기 위하여 유용하게 사용되는 방법이다. 이렇게 합성한 물질들은 특정 효소에 대한 선택적 기능 조절효과가 매우 높다. 왜냐하면 효소와 기질의 반응

Suicide Substrate

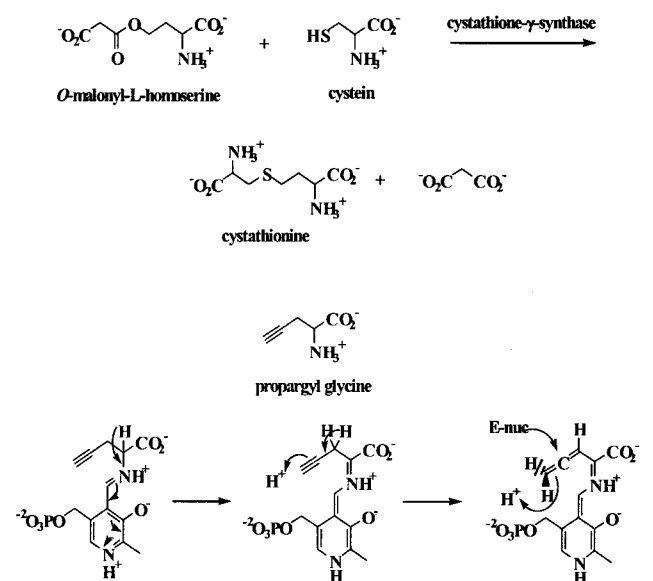


Fig. 10. An example of a suicide substrate: propargyl glycine and the postulate mechanism of inactivation of cystathionine- γ -synthase. (from Abell et al., 1993)

을 통한 화학적 전이과정에서 반응 중간산물과 효소의 결합력은 기질이나 생성물과의 결합력보다 훨씬 크기 때문이다.

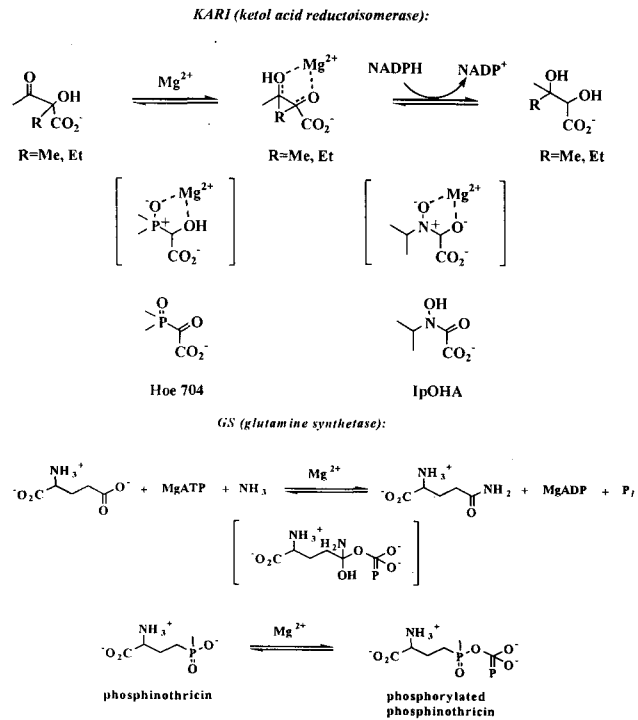


Fig. 11. Examples of reaction intermediate analogue inhibitors of ketol acid reductoisomerase (top) and glutamine synthetase (bottom). (from Abell et al., 1993)

마지막으로 extraneous site inhibitors의 합성으로 이는 가장 최근에 인식된 방법으로 대표적인 화합물은 많이 알려진 acetolactate synthase와 acetyl CoA carboxylase 저해물질들로서 효소의 주된 활성부위에 결합하지 않고 측면 부위에 부분적으로 결합하기 때문에 대상 효소의 작용특성 연구를 통해서서는 후보화합물을 예측할 수 없지만 아주 적은 양으로서 높은 효과를 나타낸다(그림 12). 그러나 저항성이 빨리 나타날 수 있다는 단점을 가지고 있다.

이상과 같이 소개한 여러 가지 방법 중에서 가장 바람직한 것은 extraneous site inhibitors의 합성이지만 반응 중간산물 유사체를 합성하는 것도 효과적이다. 또한 이렇게 합성한 후보물질들은 대상효소에 대해서는 매우 선택적으로 작용하지만, 대상 효소를 보유하고 있는 모든 식물체에 대해서는 비선택적으로 작용하게 될 것이다. 그러나 작물과 잡초에 대한 선택성은 대부분이 식물체 내에서의 대사과정에 기인하는 것이기 때문에 최적화작업을 통하여 선택성과 적용작물을 선정할 수 있게 된다. 선택성이 발현되지 않는 화합물의 경우에는 비선택성 제초제로 개발하게 되며, 이는 유전공학적인 기술을 통하여 Round-up ready 작물과 같이 국산 제초제 저항성 작물의 생산 가능성을 더욱 높게 해주는 것이다.

참고문헌

Abell, L.M., J.V. Schloss, and A.R. Rendina (1993) Target-site directed herbicide design. Amer. Chem. Soc. Symp. Ser. pp.16~37.

Abell, L.M. (1996) Biochemical approaches to herbicide discovery: advances in enzyme target identification and inhibitor design. Weed Sci. 44:734~742.

Bartley, G.E., P.A. Scolnik, and P. Beyer (1999) Two *Arabidopsis thaliana* carotene desaturases, phytoene desaturase and ζ -carotene desaturase, expressed in *Escherichia coli*, catalyze a poly-cis pathway to yield pro-lycopene. Eur. J. Biochem. 259: 396~403.

Bourque, J.E. (1995) Antisense strategies for genetic manipulations in plants. *Plant Science* 105:125~149

Broach J.R. and J. Thorner (1976) High-throughput screening for drug discovery. *Nature* 384(6604):14~16.

Chory, J., J.R. Ecker, S. Briggs, M. Caboche, G.M. Coruzzi, D. Cook, J. Dangl, S. Grant, M.L. Guerinet, S. Henikoff, R. Martienssen, K. Okada, N.V. Raikhel, C.R. Somerville, and D. Weige (2000) National Science Foundation-Sponsored Workshop Report: "The 2010 Project" Functional Genomics and the Virtual Plant. A Blueprint for Understanding How Plants Are Built and How to Improve Them. *Plant Physiol.* 123:423~425.

Coulter, C.V., J.A. Gerrard, J.AE Kraunsoe, and A.J. Pratt (1999) *Escherichia coli* dihydrodipicolinate synthase and dihydrodipicolinate reductase: kinetic and

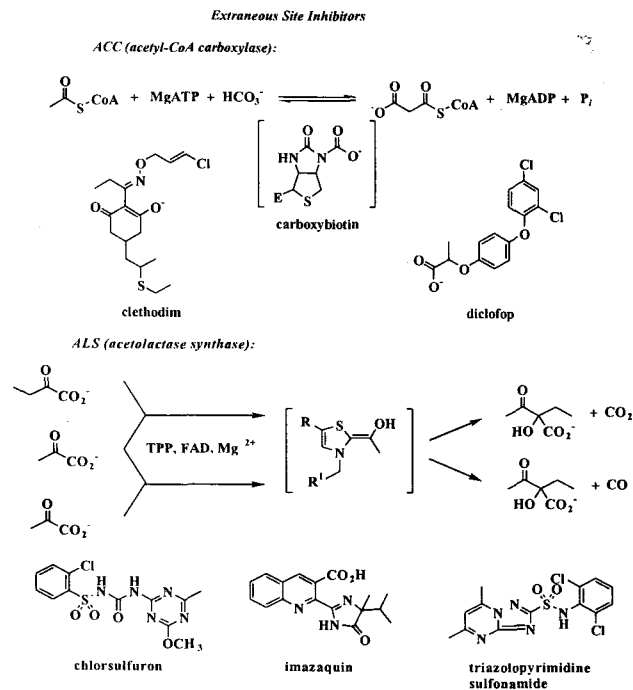


Fig. 12. Examples of extraneous site inhibitors : acetyl-CoA carboxylase (top) and acetolactate synthase (bottom). (from Abell et al., 1993)

- inhibition studies of two putative herbicide targets. *Pestic. Sci.* 55:887~895.
- Cromartie, T.H., K.J. Fisher, J.N. Grossman (1999) The discovery of a novel site of action for herbicidal bisphosphonates. *Pestic. Biochem. & Physiol.* 63(2): 114~126.
- D'Aoust, M.A., S. Yelle, and B. Nguyen-Quoc (1999) Antisense inhibition of tomato fruit sucrose synthase decreases fruit setting and the sucrose unloading capacity of young fruit. *Plant Cell* 11:2407~2418.
- Ficarelli, A., F. Tassi, and F.M. Restivo (1999) Isolation characterization of two cDNA clones encoding for glutamate dehydrogenase in *Nicotina plumbaginifolia*. *Plant Cell Physiol.* 40(3):339~342.
- Grossmann, J. and H. Schiffer (1999) Protoporphyrinogenoxidase-inhibiting activity of the new, wheat-selective isoindolone herbicide, cinidon-ethyl. *Pestic. Sci.* 55:687~695.
- Hess, F.D., R.J. Anderson and J.D. Reagan (2001) High throughput synthesis and screening: the partner of genomics for discovery of new chemicals for agriculture. *Weed Sci.* 49:249~256.
- Höfgen, R., K.B. Axelsen, C.G. Kannangara, I. Schuttke, H.D. Pohlentz, L. Willmitzer, B. Grimm, and D. von Wettstein (1994) A visible marker for antisense mRNA expression in plants: Inhibition of chlorophyll synthesis with a glutamate-1-semialdehyde aminotransferase antisense gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91:1726~1730.
- Höfgen, R., B. Laber, I. Schuttke, A. Klonus, W. Streber, and H. Pohlentz (1995) Repression of acetolactate synthase activity through antisense inhibition. *Plant Physiol.* 107:469~477.
- Höfgen, R. (1998) Antisense gene expression as a tool for evaluating molecular herbicide targets. *Extended summaries-8th International Congress of Pesticide Chemistry*, pp.175~177.
- Kishore, G.M. and D.M. Shah (1988) Amino acid biosynthesis inhibitors as herbicides. *Ann. Rev. Biochem.* 57:627~663.
- Kleier, D.A. and F.C. Hsu (1996) Phloem mobility of xenobiotics. VII. The design of phloem systemic pesticides. *Weed Sci.* 44:749~756.
- Pillmoor, J.B., S.D. Lindell, G.G. Briggs, and J. Wright (1995) The influences of molecular mechanism of action in herbicide design. *Amer. Chem. Soc. Symp. Ser.* pp.292~303.
- Rendina, A.R. and L.M. Abell (1994) *Biochemical Approaches to Herbicide Discovery*, enzyme target selection and inhibitor design. *Amer. Chem. Soc. Symp. Ser.* pp.407~424.
- Saari, L.L. (1999) A prognosis for discovering new herbicide sites of action. In "Pesticide Chemistry and Bioscience: The Food-Environment Challenge" Ed. by G.T. Brooks and T.R. Roberts Royal Society of Chemistry, Cambridge. pp.207~220.
- Schloss, J.V. and A. Aulabaugh (1990) Acetolactate synthase and ketol-acid reductoisomerase: Targets for Herbicides Obtained by Screening and *de novo* Design. *Z. Naturforsch.* 45c, pp.544~551.
- Subramanian, M.V., S.A. Brunn, P. Bernasconi, B.C. Patel, and J.D. Reagan (1997) Revisiting auxin transport inhibition as a mode of action for herbicides. *Weed Sci.* 45:621~627.
- Tang, G-Q. and A. Sturm (1999) Antisense repression of sucrose synthase in carrot (*Daucus carota* L.) affects growth rather than sucrose partitioning. *Plant Molecular Biology* 41:465~479.
- The Arabidopsis Genome Initiative (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408(14):796~815.
- Zimdahl, R.L. (1993) *Fundamentals of weed science*. Academic Press, Inc. San Diego, p.450.
- Zou, J.T., Q. Qi, V. Katavic, E.F. Marillia, and D.C. Taylor (1999) Effect of antisense repression of an *Arabidopsis thaliana* pyruvate dehydrogenase kinase cDNA on plant development. *Plant Molecular Biology* 41:837~849.
- 畑中 利彦 (2000) ハイスループットスクリーニング技術の新しい動向, SPAとLEAD seeker, 化学と生物 38 (8):555~560
- 松中 昭一 (2000) 農薬のおはなし, 日本規格協会, 東京 pp.16~18.
- 김진석, 김성문, 마상용, 박재읍 (2001) 제초제 작용생리 연구동향과 전망. *한국잡초학회지* 21(2):122~145.
- 정봉진, 김대황, 조광연 (2001) 신규제초제 개발현황. *한국잡초학회지* 21(2):1167~180.
- 황인택, 홍경식, 조광연, 요시다 시게오 (1993a) Cyanobacteria를 이용한 광합성 전자전달저해제의 생합리적 스크리닝. *한국잡초학회지* 13(2):81~88
- 황인택, 김진석, 조광연, 요네야마 코이치, 요시다 시게오 (1993b) 신규 합성 화합물들이 cyanobacteria의 광합성 전자전계에 미치는 영향. *한국잡초학회지* 13(2):89~95.
- 황인택, 최정섭, 박상희, 이관희, 이병희, 홍경식, 조광연 (2001a) 식물특정효소 저해제의 생물활성 조사에 의한 신규제초제작용점 탐색. *농약과학회지* 5(1):36~45.
- 황인택, 문영희, 한성수, 전재철 (2001b) 제초제와 환경. *한국잡초학회지* 21(2):146~166.

A prognosis discovering lethal-related genes in plants for target identification and inhibitor design

Hwang, I.T.*, D.H. Lee¹, J.S. Choi, T.J. Kim, B.T. Kim, Y.S. Park¹, K.Y. Cho (KRICT, ¹GenoMine Inc. P.O. Box 107, Yusong, Taejeon 305-600, ¹Environmental Eng. Bldg. 225, Pohang University of Science and Technology, Pohang, Kyungbuk, 790-784)

Abstract : New technologies will have a large impact on the discovery of new herbicide site of action. Genomics, combinatorial chemistry, and bioinformatics help take advantage of serendipity through the sequencing of huge numbers of genes or the synthesis of large numbers of chemical compounds. There are approximately 10^{30} to 10^{50} possible molecules in molecular space of which only a fraction have been synthesized. Combining this potential with having access to 50,000 plant genes in the future elevates the probability of discovering new herbicidal site of actions. If 0.1, 1.0 or 10% of total genes in a typical plant are valid for herbicide target, a plant with 50,000 genes would provide about 50, 500, and 5,000 targets, respectively. However, only 11 herbicide targets have been identified and commercialized. The successful design of novel herbicides depends on careful consideration of a number of factors including target enzyme selections and validations, inhibitor designs, and the metabolic fates. Biochemical information can be used to identify enzymes which produce lethal phenotypes. The identification of a lethal target site is an important step to this approach. An examination of the characteristics of known targets provides of crucial insight as to the definition of a lethal target. Recently, antisense RNA suppression of an enzyme translation has been used to determine the genes required for toxicity and offers a strategy for identifying lethal target sites. After the identification of a lethal target, detailed knowledge such as the enzyme kinetics and the protein structure may be used to design potent inhibitors. Various types of inhibitors may be designed for a given enzyme. Strategies for the selection of new enzyme targets giving the desired physiological response upon partial inhibition include identification of chemical leads, lethal mutants and the use of antisense technology. Enzyme inhibitors having agrochemical utility can be categorized into six major groups: ground-state analogues, group specific reagents, affinity labels, suicide substrates, reaction intermediate analogues, and extraneous site inhibitors. In this review, examples of each category, and their advantages and disadvantages, will be discussed. The target identification and construction of a potent inhibitor, in itself, may not lead to develop an effective herbicide. The desired *in vivo* activity, uptake and translocation, and metabolism of the inhibitor should be studied in detail to assess the full potential of the target. Strategies for delivery of the compound to the target enzyme and avoidance of premature detoxification may include a proherbicidal approach, especially when inhibitors are highly charged or when selective detoxification or activation can be exploited. Utilization of differences in detoxification or activation between weeds and crops may lead to enhance selectivity. Without a full appreciation of each of these facets of herbicide design, the chances for success with the target or enzyme-driven approach are reduced.

*Corresponding author (Fax : +82-42-861-4913, E-mail : ithwang@pado.kRICT.re.kr)