

세균의 지방산 생합성: 내성균 치료제 개발을 위한 유전체 기반 새로운 항생제 타겟

글 _ 김원곤¹, 이태규² _ ¹한국생명공학연구원 바이오신약연구부, ²크리스탈지노믹스(주)

1. 서론

인체 감염의 가장 흔한 원인균인 포도상구균의 마지막 치료제라고 하던 '반코마이신'에도 고도의 내성을 보이는 포도상구균(vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*, VRSA)이 2002년 미국 질병 통제국(Centers for Disease Control)에서 세계 최초로 보고됨으로써 소위 '슈퍼 박테리아'의 확산 가능성이 매우 높아지고 있다. 이는 '반코마이신'에 의해서만 치료가 되는 메치실린 내성 포도상구균(methicillin-resistant *S. aureus*, MRSA)이 1970년대부터 문제시된 이후 1988년 '반코마이신'에 내성을 보이는 장구균(vancomycin resistant enterococcus, VRE)이 유럽에서 처음으로 발견되었고 1990년후반에는 일본, 미국, 프랑스, 한국에서 보고된 '반코마이신'에 내성을 보이는 포도상구균(vancomycin intermediate-resistant *S. aureus*, VISA) 발생하면서 범세계적인 위기로 떠오른 항생제 내성의 새로운 예로서 내성문제가 얼마나 심각한지를 보여 주고 있어 새로운 개념의 항생제 개발이 시급히 요구되고 있다(Pfultz and Wilkison, 2004; Levy and Marshall, 2004). 지난 35년동안의 항생제 개발연구는 같은 target을 대상으로 하고 기존의 구조를 조금씩 변형하는 방식이었기 때

문에, 지금까지 oxazolidinone이외에 단 한 개의 새로운 class의 항생제가 개발되지 못하였을 뿐만 아니라 결국은 MRSA와 VRE의 내성률이 계속 증가하는 심각한 내성문제를 초래하게 되었다. 따라서 기존에 사용되고 있는 항생제 target과는 전혀 다른 새로운 target을 활용하는 새로운 패러다임의 치료제 개발이 이루어져야 한다.

한편, 미생물 genomic information은 새로운 유전자의 발굴을 가능케 하여 기존의 작용점과는 전혀 다른 새로운 항생제 작용점을 제시하여 주고 있다. 미생물 유전체 연구는 DNA 염기배열을 고속으로 결정하는 DNA sequencing 기술을 바탕으로 1995년 *Haemophilus influenzae*의 genome sequencing을 한 이래, 2003년 3월에 이미 주요 병원 미생물 40종을 포함하여 미생물 79종의 염기서열이 해독되어 공개되어 있고(<http://www.tigr.org>), 100종이상의 미생물 염기서열이 진행중에 있다. 따라서 신 개념의 항생제를 발굴해야 할 당위성을 충족시키기 위해 현재의 항생제 연구는 genomics를 통한 연구결과를 활용하는 새로운 전환점으로 접어들었다. 그 결과 항생제의 신규 target을 선택할 수 있는 범위가 늘어났고, 따라서 항생제의 내성에 대해 보다 적극적으로 대처할 수 있는 계기가 되었다. 항생제의 target으로 선

정되기 위해서는 다음의 몇 가지 조건을 충족시켜야 한다. 그 첫째는 유전자가 생장에 필수적(essential gene)이어야 한다는 것이다. 즉 세포벽 합성, 아미노산 합성, 지방산 합성등에 관여하는 필수 유전자이거나 병독성 요소(virulence factor)로서 이것을 억제하면 감염증이 없어지거나 멈추어야 한다. 둘째로 broad spectrum으로서 유전자가 여러 중요한 임상 감염균에 공통적으로 존재해야 한다. 셋째로 인간 유전자와 상동성이 적어야 하는데 그럼으로써 낮은 독성을 가질 가능성이 크기 때문이다. 이같은 연구는 target 유전자를 없애 그 결과를 보는 방법과 comparative genomics 분석을 포함한 bioinformatics 방법을 통하여 수행할 수 있다(Rosamond and Allsop, 2000; Mcdevitt and Rosenberg, 2001; Read *et al.*, 2001; Miesel *et al.*, 2003).

미생물 유전체와 bioinformatic를 기초로 하여 새로운 항생제 target으로서 활발히 연구되고 있는 것이 fatty acid synthesis 관련 target이다. 특히, 지난 30여년 동안 정확한 기전을 모르고 사용하였던 triclosan 과 50여년 동안 폐결핵 약으로 사용하여 왔던 isoniazid의 target 단백질이 bacterial fatty acid biosynthesis 경로의 마지막 단계에 작용하는 enoyl-ACP reductase인 것으로 최근에 밝혀져 항생제 target으로 검증되었다. 본 총설에서는 미생물 유전체 정보를 활용한 세균의 지방산 생합성 components의 새로운 항생제 target으로의 발굴 및 검증에 대한 연구 동향을 소개하고, enoyl-ACP reductase (FabI)를 중심으로 하는 새로운 항생제 탐색 및 단백질 구조 기반 항생제 개발에 관하여 최근 연구 현황을 기술하고자 한다.

2. Fatty acid synthesis : Bacteria vs. Human

Fatty acid synthase (FAS) system은 두가지 type으로 나누어진다(그림 1). FAS II는 그림 1(b)처럼 박테리아, 식물계에 존재하는 것으로서 FAS를 이루고 있는 각 효소들이 개별적으로 존재하는데 비해, 인간을 포함

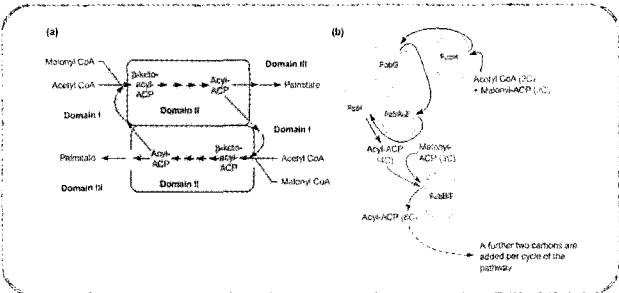


그림 1. The organization of fatty acid biosynthesis in mammals(a) and bacteria(b).

하여 포유동물에 존재하는 FAS I(그림1(a))은 FAS II에 개별적으로 존재하는 각 효소들이 하나의 거대한 단백질의 한 도메인으로서 존재하고 있다.

이 두가지 FAS system은 생화학적으로는 같은 기능을 하고 있지만 sequence homology는 매우 낮은 편이며 이러한 낮은 sequence homology로 인해 예상되는 저독성과 박테리아 생장에 필수적인 점 때문에 항생제 내성을 극복할 수 있는 새로운 항생제 target으로 생각되고 있다.

세균에서의 지방산 생합성 경로와 관련 유전자 및 효소는 각각 그림 2와 표 1과 같이 알려져 있다(Campbell and Cronan, 2001; Heath *et al.*, 2001). 세균의 지방산 생합성에서의 주요한 특징은 9 kDa의 highly acidic한 acyl carrier protein (ACP)이 존재하며, ACP는 효소간에 hydrophobic fatty acyl intermediate를 옮기는 역할을 한다. ACP의 serine 잔기에 연결되어 있는 4'-phosphopantetheine의 sulfhydryl 그룹이 thioester 결

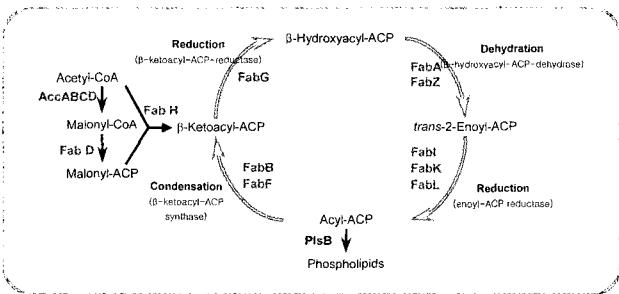


그림 2. Pathway of bacterial fatty acid biosynthesis.

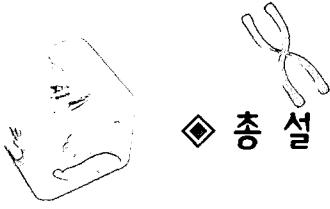


표 1. Genes and enzymes of bacterial fatty acid synthesis

Gene	Protein	Enzyme activity
<i>acpP</i>	ACP	acyl carrier protein
<i>accA</i>	AccA	acetyl-coA carboxylase, carboxyltransferase α -subunit
<i>accB</i>	AccB	acetyl-coA carboxylase, carboxybiotin carboxybiotin carrier protein
<i>accC</i>	AccC	acetyl-coA carboxylase, biotin carboxylase
<i>accD</i>	AccD	acetyl-coA carboxylase, carboxyltransferase β -subunit
<i>fabD</i>	FabD	Malonyl CoA:ACP transacylase
<i>fabH</i>	FabH	β -ketoacyl-Acp synthase III
<i>fabB</i>	FabB	β -ketoacyl-Acp synthase I
<i>fabF</i>	FabF	β -ketoacyl-Acp synthase II
<i>fabG</i>	FabG	β -ketoacyl-Acp reductase
<i>fabA</i>	FabA	β -ketoacyl-Acp dehydratase/isomerase
<i>fabZ</i>	FabZ	β -ketoacyl-Acp dehydratase
<i>fabL</i>	FabI	<i>trans</i> -2-enoyl-Acp reductase I
<i>fabK</i>	FabK	<i>trans</i> -2-enoyl-Acp reductase II
<i>fabL</i>	FabL	<i>trans</i> -2-enoyl-Acp reductase III
<i>plsB</i>	PlsB	<i>sn</i> -Glycerol-3-phosphate acyltransferase
<i>plsC</i>	PlsC	lysophosphatidic acid acyltransferase
<i>plsX</i>	PlsX	Unknown (modifies plsB26 phenotype)
<i>fadR</i>	FadR	Transcriptional activator/repressor
<i>farR</i>	FarR	Transcriptional activator/repressor

된 malonyl-CoA의 malonate group은 다시 malonyl-CoA: ACP transacylase (FabD)에 의해 ACP로 전달되어 malonyl-ACP가 생성된다. Malonyl-ACP는 다시 β -ketoacyl-ACP synthase (FabH)에 의해 acetyl-CoA과 축합되어 β -ketobutyryl-ACP와 CO₂가 생성된다. 그 다음부터는 적당한 길이의 지방산이 만들어 질 때까지 다음의 각 단계를 반복하는데, 첫 번째 단계는 β -ketoacyl-ACP reductase (FabG)에 의해 keto group이 hydroxyl group으로 NADPH-dependant reduction된다. 두 번째 단계는 β -hydroxyacyl-ACP dehydratase

함으로 hydrophobic fatty acyl intermediate와 연결된다. 지방산 생합성 경로를 통하여 만들어 지는 최종 product는 탄소 16 또는 탄소 18로 구성된 straight-chain의 포화 및 불포화 지방산이며, 이들은 세포막 phospholipid의 hydrophobic portion을 형성한다. 간혹, 생합성 중간체들이 다른 product 예를 들면, quorum sensors, lipid A, vitamine 등으로 전환되기도 한다.

지방산 생합성 경로의 첫 번째 효소는 acetyl-CoA carboxylase (ACC)으로 4개 유전자 (*accABCD*)로부터 생성된 multisubunit 효소이다(그림 1). ACC에 의해 malonyl-CoA가 생성되는데, 이는 두단계 반응으로 구성되어 있다. 첫 번째 반응은 biotin carboxylase (AccC)에 의해서 biotin carboxyl carrier protein (BCCP=AccB)에 붙어 있는 biotin이 carboxylation되는 반응이고, 두 번째 반응은 carboxyltransferase (AccA 및 D)에 의해서 biotin의 carboxyl group이 acetyl-CoA로 전이되어 malonyl-CoA가 생성되는 반응이다. ACC에 의해 생성

(FabA 또는 FabZ)에 의해 탈수되어 *trans*-2-enoyl-ACP가 형성된다. 마지막 단계는 *trans*-2-enoyl-ACP reductase (FabI)에 의해 NADH-dependant reduction되어 acyl-ACP가 형성된다. 이렇게 형성된 acyl-CoA에 β -ketoacyl-ACP synthase (FabB 또는 FabF)에 의해 malonyl-CoA가 축합되어 다시 cycle이 시작된다.

3. 세균 지방산 생합성 효소의 항생제 타겟으로의 발굴 및 검증

세균의 유전체 연구 이전에는 세균의 지방산 생합성 경로 연구는 *E. coli*을 중심으로 이루어 졌기 때문에 주요 병원성 미생물에서의 각 효소의 spectrum이나 특성에 대하여 거의 알려지지 않았다. 그러나, 주요 병원성 미생물의 유전체 정보가 밝혀짐에 따라 병원성 미생물의 지방산 생합성에 관련된 각종 효소가 발굴되었다 (for reviews, Campbell and Cronan, 2001; Heath et

표 2. Identification of *Fab* genes in key respiratory and Gram- positive pathogens

Target	<i>S. aureus</i>	<i>S. pneumoniae</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>H. influenzae</i>
<i>FabG</i>	○	○	○	○
<i>FabK</i>	×	○	○	×
<i>FabI</i>	○	×	○	○
<i>FabA</i>	×	×	×	○
<i>FabZ</i>	○	○	○	○
<i>FabB</i>	×	×	×	○
<i>FabF</i>	○	○	○	×
<i>FabH</i>	○	○	○	○
<i>FabD</i>	○	○	○	○

S. aureus, *Staphylococcus aureus*; *S. pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*; *E. faecalis*, *Enterococcus faecalis*; *H. influenzae*, *Haemophilus influenzae*.

Key: ○ = homologue present in genome X = homologue absent in genome

al., 2001; Payen *et al.*, 2001; Chan *et al.*, 2002).

즉, *S. aureus*에서 *FabI*, *FabH*, *FabG*, *FabD*의 homolog, *S. pneumoniae*에서 *FabH*, *FabD*의 homolog, *P. aeruginosa*에서 *FabI*, *FabD*의 homolog등이 발굴되었다. 이와 같이, 각 지방산 생합성 관련 효소에 대하여 유전체를 분석하여 homolog을 찾아내고, 미생물간의 spectrum를 조사함으로써, 각 지방산 생합성 관련 효소의 antibacterial target으로의 유효성을 평가할 수 있게 되었다. 예를 들면, *E. coli*에 의존된 기존의 결과에 따르면 *FabI*를 세균에서 enoyl reduction 반응을 수행하는 유일한 효소로 믿고 있었으나, genomic sequence를 비교 분석한 결과 *S. pneumoniae*에서는 *FabI* homolog가 없고, *FabI*와는 전혀 homology가 없는 *FabK*이라는 또다른 enoyl-ACP reductase가 있는 것으로 밝혀졌다. 이후 *FabK*는 여러 다른 미생물에도 존재하는 것이 밝혀졌고, *E. faecalis*와 *E. faecium*에는 *FabI*와 *FabK* 모두 존재하는 것으로 밝혀졌다. 그러므로, *FabI* 저해제는 *S. aureus* 등 주요한 병원균에 선택적인 항생효과를 나타낼수 있으나, 광범위 항생제를 개발하기 위해서는 *FabI* 뿐만 아니라 *FabK*도 저해해야 한다는 중요한 사실을 알 수 있게 되었다. 한편, *FabH*는 주요한 병원성 미생물에 잘 conserved 되어 있기 때문에 broad spectrum antibiotic target으로 가능성이 큰 것으로 보인다.

이상의 세균 지방산 생합성 효소들 중에서 가장 많이 연구되어 있으며 항생제 target으로 확실히 검증된 target이 enoyl-(acyl-carrier protein) reductase (ENR)이다. 앞서 설명한 것처럼 ENR은 bacterial fatty acid synthase system (type II)을 구성하는 효소로 지방산 합성 cycle 중 각 elongation step의 마지막 step을 담당하는, 미생물의 성장에 필수적인 효소이다. 즉 trans-2,3 enoyl moiety의 C-C 이중 결합을 환원시켜 saturated acyl chain으로 변환시키는 효소이다. ENR은 *FabI*, *FabK*, *FabL*의 3가지 isoform이 존재하는데 *S. aureus*를 포함한 대부분의 주요 병원성 미생물에 *FabI*가 존재하고, 다만 *S. pneumoniae*는 *FabK*가 존재한다. 최근에 광범위 항생제로 사용 중인 triclosan (5-chloro-2-(2,4-dichlorophenoxy) phenol)의 target 단백질이 *FabI*로 밝혀져 *FabI*가 항생제 타겟으로 검증되었다(McMurry *et al.*, 1998). *E. coli*의 triclosan-resistant mutant의 *FabI* 유전자 분석하여 *FabI* active site에서의 point mutation이 확인되어 triclosan의 target이 *FabI*임이 검증되었다. 1998년에는 triclosan의 *E. coli* *FabI*에 대한 저해활성이 처음으로 보고되었고 (Heath *et al.*, 1998), 2000년에는 *S. aureus* *FabI*에 대해서도 triclosan의 저해활성이 보고되었다 (Heath *et al.*, 200). 특히 하계도 *E. coli* *FabI*는 NADH의 존성인 반면, *S. aureus*



총설

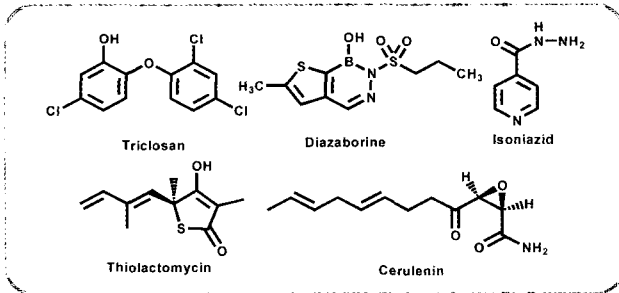


그림 3. Inhibitors of bacterial fatty acid biosynthetic enzyme.

FabI는 NADPH 의존성이었으며 triclosan 저해활성은 FabI-NAD(P)⁺-drug 형태의 ternary complex에서 나타난다. Triclosan과 FabI을 co-crystallize하여 얻은 complex의 구조연구 결과 triclosan은 enzyme-NAD⁺ complex와 binding하며, cofactor의 nicotinamide ring 위에 triclosan의 phenol ring이 위치하는 것으로 밝혀 졌다 (Levy *et al.*, 1999; Ward *et al.*, 1999).

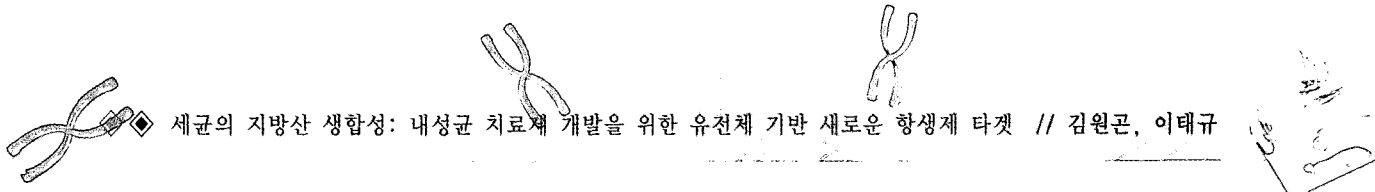
Triclosan은 지난 30년간 항생제로 널리 쓰여 왔다. 주로 비누, 화장품, 치약 등에 사용되고 있으며 장갑감 등의 플라스틱 제품과 carpet, kitchen towel 등의 위생 제품에도 사용되고 있다. 최근에는 병원내 감염의 주 원 인균인 항생제 내성균 MRSA의 치료제로 사용되고 있다. Triclosan 외에도 ENR의 저해제로 Isoniazid, Diazaborine 등이 알려져 있다. Isoniazid는 지난 50년 동안 폐결핵 약으로 널리 쓰이고 있는 것으로 결핵균인 *Mycobacterium tuberculosis*에서 target 단백질이 InhA로 알려 졌고, InhA은 최근에 enoyl-ACP reductase인 것으로 밝혀 졌다. Isoniazid의 작용기전은 catalase-peroxidase (KatG)에 의해 활성형 isoniazid가 된 뒤, enzyme-NAD⁺와 covalent 결합하는 것으로 밝혀 졌다 (Rozwarski *et al.*, 1998).

실제로 항생제로 사용되었지는 않았지만 항균활성으로 잘 알려진 천연물 중 그 작용기전이 FAS와 관련된 화합물로 cerulenin, thiolactomycin이 있다. Cerulenin은 곰팡이 *Cephalosporium caerulens*에서 분리된 물질로 yeast, fungi, bacteria 등 다양한 미생물에 항균활성을 갖고 있

는데 (Omura 1981), cerulenin의 target 단백질이 bacterial fatty acid synthesis 경로중 condensation step을 담당하는 FabB 과 FabF인 것으로 밝혀졌다 (Price *et al.*, 2001). 그러나, Cerulenin은 세균 뿐 만아니라 human의 FAS 대해서도 저해활성을 보여 선택성이 없다. Thiolactomycin의 target 단백질은 FabB, FabF, FabH으로 밝혀 졌고, cerulenin과 달리 bacterial condensation enzyme에 선택적인 저해활성을 갖는 것으로 알려져 있다 (Price *et al.*, 2001). Thiolactomycin은 토양 곰팡이 *Nocardia*가 생산하는 물질로 G(-), G(+), *M. tuberculosis* 세균에 항균활성을 갖고 있으나, 매우 낮은 *in vitro* 항균활성이 문제점으로 지적되고 있다 (Miyakawa *et al.*, 1982).

3. FAS 저해제 탐색 및 개발연구

FAS 특히, FabI는 새로운 항생제 target으로 검증이 되었기 때문에 HTS assay를 이용하여 새로운 FabI 저해제 탐색연구가 화합물 라이브러리를 대상으로 외국의 제약회사에서 활발히 실시되었다. AstraZeneca 사는 20만여 개의 화합물 라이브러리를 대상으로 *E. coli* FabI을 이용하여 FabI 저해물질을 탐색한 결과, 흥미롭게도 triclosan이 hit compound로 발견되었다 (Ward *et al.*, 1999). GlaxoSmithKline 사는 FabI 와 FabH 저해물질을 screening 하여 benzodiazapine 계와 imidazole 계의 2개의 새로운 FabI 저해 lead 화합물을 발굴하였다. Benzodiazapine 화합물은 초기에는 *S. aureus* FabI 저해활성이 낮고, 항균활성이 전혀 없었으나, benzodiazapine 화합물을 lead 화합물로 하여 rational design으로 개량한 결과, inhibition potency가 70배 향상되었고 *S. aureus*에 대한 항균활성을 나타내는 aminopyridine 화합물을 개발하였다 (Miller *et al.*, 2002). Aminopyridine 화합물은 다시 optimization과정을 거쳐 naphthyridinone 계 화합물로 발전되는데, 이 화합물은 FabI 저해 활성 뿐 만 아니라, 비록 상대적으로 약하지만 FabK에도 저해 활성을 동시에 가져 FabK를 보유한 *S. pneumoniae*



와 *Enterococcus faecalis*에도 활성을 보임으로서 broad spectrum antimicrobial 활성을 나타내었다 (Seefeld *et al.*, 2003). Imidazole 화합물은 16배의 항균활성 증가, 5배의 FabI 저해활성이 증가되는 개선을 보였다 (Heerding *et al.*, 2001). Affinium Pharmaceuticals 회사가 개발한 FabI 저해제는 pyridopyrimidinones 계열의 화합 화합물로 FabI 저해활성과 *in vivo* 동물실험에서 우수한 활성을 나타내었다 (Manning, 2004). 이러한 일련의 FabI 저해제 연구 결과는 새로운 항생제 target으로서의 FabI의 potential을 여실히 증명하고 있다.

미생물, 식물 등 천연물로부터의 FabI 저해제 탐색 연구 결과는 거이 없는 실정이다. 최근에 토양 곰팡이 *Fusarium sp.*로부터 *S. aureus* FabI 저해활성을 갖는 equisetin 계 화합물을 분리되었다. Equisetin 계 화합물은 *S. aureus*, MRSA에 강력한 항균물질로 알려져 왔으나, 그 동안 그 작용기전이 알려지지 않았었다 (Zheng *et al.*, 2004). 녹차의 성분으로서 항균 활성 물질로 알려진 epigallocatechin gallate, 2, 2', 4'-trihydroxy-chalcone 와 같은 polyphenol 화합물이 FabI와 FabG 저해활성이 있는 것으로 알려져 흥미롭다 (Zhang *et al.*, 2004).

FabI 이외에 bacterial fatty acid synthesis 효소로 FabH와 ACC 저해제 탐색연구가 보고되었다. *S. aureus* FabH를 thiolactomycin 보다 100배 강하게 저해하는 합성 화합물 HR12, HR19 물질이 최근 발굴되었고, 이

화합물은 thiolactomycin와 달리 *S. aureus*에도 항균 활성을 보였다 (He *et al.*, 2002). Bayer사는 천연물 중 작용기전이 알려지지 않은 broad-spectrum antibacterial 을 대상으로 그 target을 찾는 연구를 수행하여, moiramide B 와 andrimid 화합물이 FAS의 첫 번째 효소인 acetyl-CoA carboxylase (ACC)을 저해하면서, human ACC 은 저해하지 않은 사실을 밝혀, 최초의 bacterial 선택적 ACC 저해제를 발견하였다 (Freiberg, 2004). Moiramide B 와 andrimid 화합물과 같은 pyrrolidine diones 화합물은 *Pseudomonas fluorescens*, *Enterobacter*, *Vibrio*의 3가지 균주들에서 분리된 물질로 G(+) 와 G(-)세균에 broad spectral 항균활성을 보이는 장점을 갖고 있다. 그 동안 정확한 기전이 알려지지 않아 항생제로 개발하는데 어려움이 있었던 pyrrolidine diones 화합물의 작용 target이 밝혀 졌기 때문에 신약 개발을 위한 chemical optimization이 가능하게 되었다.

Laakso 등은 (2003) 곰팡이, 방선균 배양 추출액 라이브리리를 대상으로 fungal fatty acid synthase 저해 물질을 screening하여 *Penicillium solitum*으로부터 CT2108A 물질을 분리하였다. CT2108A 화합물은 *Candida* FAS (IC₅₀, 160 µg/ml)는 저해하는 반면, human FAS는 저해하지 않았고, *Candida albicans* (MIC, 3.9 µg/ml) 항균 활성을 보였다. CT2108A 화합물의 세포내 target이 FAS인지 validation하는 과정이 남았지만, fungal FAS가 antifungal target으로서 가능성이 있음을 보이는 결과이다.

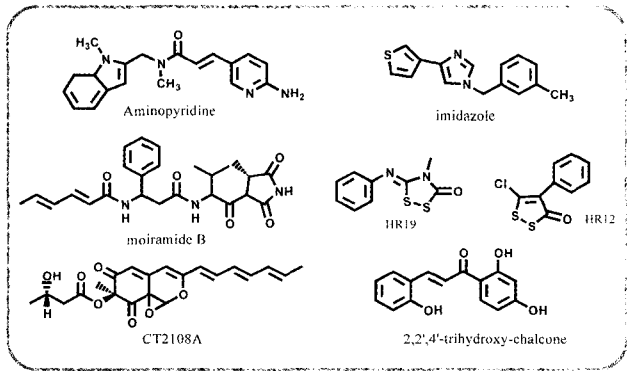
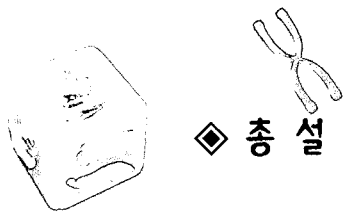


그림 4. Inhibitors of various fatty acid biosynthetic enzymes identified by screening programs.

4. 표적 단백질 구조 기반 항생제 개발

신규 항생제 표적단백질을 발굴하였어도 새로운 항생제를 발굴하려면 많은 시간이 걸리고 있다. 이 같은 이유는 의약발굴에 있어서 초기 선도물질을 찾고 또한 이를 최적화하여 의약후보물질을 발굴하는데 많은 시간이 걸리기 때문이다. 이 문제를 해결하는데 구조기반 신약발굴 기술 (Structure-based drug design, SBDD)을 응용할



수 있다 이 기술은 단백질의 3차 구조를 이용하여 의약 후보물질을 빠르게 발굴 할 수 있는 방법이다. 이를 위해서는 고해상도의 단백질 3차 구조의 확보가 필수적이다. 지난 수년간 구미에서는 Protein Structure Initiative(PSI)가 생기면서 9개의 구조유전체 센터가 참여하는 컨소시엄이 형성되어, 849개 이상의 단백질 구조가 밝혀졌으며, 8개의 감염성 세균 단백질에 적용하여 170여개 이상의 단백질 3차구조를 확보하였다(Schmid, 2004).

고해상도의 단백질 3차 구조를 확보하면, active site를 분석하여 약물이 붙을 수 있는지 즉 druggable한지를 파악할 수 있다. 그리고 virtual screening 방법을 이용하여 가상공간에서 어떤 물질이 표적단백질과 잘 붙는지 고른 뒤에 활성도 평가를 거쳐서 초기 hit 및 선도물질을 발굴할 수 있다. 그리고 표적단백질의 binding pocket을 분석하여 어떤 물질이 잘 붙을 수 있는지 설계하는 de novo ligand design 방법이 있다. Lipid A 생합성에 관여하는 항생제 표적단백질인 LpxC의 억제제를 발굴하는데 이 방법을 응용하였다 (Whittington *et al.*, 2003).

초기 scaffold를 얻게 되면 이어서 화학합성을 통한 최적화 작업을 수행하게 되는데, 이때에도 화합물과 표적 단백질 결합체의 3차 구조를 풀게 되면 최적화 작업을 빠르게 진행할 수 있다. 즉 화합물 합성과 평가 그리고 구조분석을 통해 보다 효과가 우수하고 약물물성이 좋은 물질을 발굴하여 전임상 후보물질을 정할 수 있다. 따라서 미생물 유전체학을 통해 발굴된 신규 표적단백질의 3차구조를 이용하여 새로운 항생제를 만들 수 있다. 또한 합성이 힘들어서 scaffold로 부적합하다고 알려진 천연물도 표적단백질 결합체와의 3차 구조 정보를 얻게 되면 천연물의 특정 부위를 scaffold로 선정하여 합성하는데 응용할 수도 있기에 천연물을 통해 매우 다양한 scaffold를 얻을 수 있게 된다. 이는 tyrosyl-tRNA synthetase (TyrRS)의 억제제 발굴에 응용되었다 (Qiu, 2001).

한편 표적단백질의 3차 구조를 응용하게 되면 broad spectrum이나 특정 균주를 표적으로 하는 항생제를 개발할 수 있다. 특히 항생제에 대한 내성이 표적 단백질

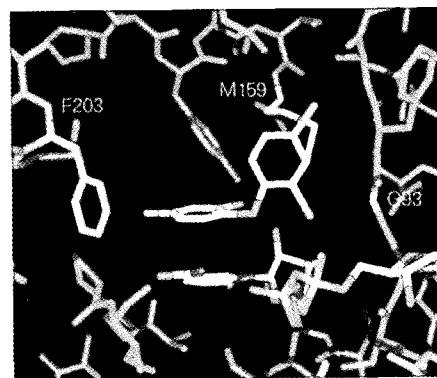


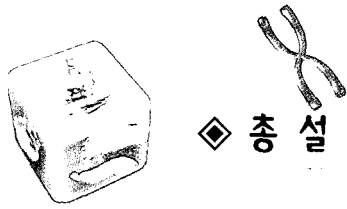
그림 5. *E. coli* ENR에 붙은 triclosan의 구조.

의 변이에서 생긴 경우에는 구조적 변화를 연구하여 내성에 듣는 항생제를 발굴할 수도 있다. 최근에 triclosan에 대한 내성 균주가 출현하면서 내성을 극복할 수 있는 새로운 접근이 필요하게 되었다. 내성을 지닌 균주의 ENR을 아미노산배열을 분석한 결과 93번째 아미노산인 글리신이 발린으로 바뀐 균주의 경우 95배의 내성을 지니고 있고, 이외에도 159번째 아미노산인 메타오닌과 203번째 아미노산인 페닐알라닌이 각각 트레오닌과 루신으로 바뀐 경우 내성을 띄고 있었다. 그 결과 효소의 활성부위가 좁아지면서 더 이상 triclosan이 결합하지 못한다는 것을 알게 되었다 (Levy *et al.*, 1999).

그러므로 이를 극복할 수 있는 새로운 항생제가 필요하게 되었고 구조기반 신약발굴 방법을 적용하여 효소의 변형된 3차 구조를 파악한 후 *in-silico* drug screening과 신약설계를 통해 전혀 새로운 구조의 신 물질을 발굴하고 있다(그림 6).

4. 결론 및 전망

세균의 fatty acid biosynthesis는 membrane lipid 생합성의 첫번째 step을 담당하는 미생물 성장에 필수적이고, human과의 homology가 거의 없기 때문에 새로운 항생제 target으로 유망하다. 특히, enoyl-ACP reductase 중 FabI는 지방산 합성 cycle 중 elongation step의 마지막 step을 담당하는 효소로서, *S. pneumoniae*



Manning, D.D. 2004. Structure guided design, synthesis and in vitro characterization of aqueous soluble inhibitors of bacterial fatty acid biosynthesis. 44th ICAAC. Abst F-318.

McMurry, L.M., M. Oethinger, and S.B. Levy. 1998. Triclosan targets lipid synthesis. *Nature* 394, 531-532.

Mcdevitt, D. and M. Rosenberg. 2001. Exploiting genomics to discover new antibiotics. *Trends in Microbiol.* 9, 611-617.

Miesel, L., J. Greene, and T.A. Black. 2003. Genetic strategies for antibacterial drug discovery. *Nature.* 4, 442-456.

Miller, W.H., M.A. Seefeld, K.A. Newlander, I.N. Uzinskas, W.J. Burgess, D.A. Heerding, C.C.K. Yuan, M.S. Head, D.J. Payne, S.F. Rittenhouse, T.D. Moore, S.C. Pearson, V. Berry, W.E. DeWolf Jr., P.M. Keller, B.J. Polizzi, X. Qiu, C.A. Janson, and W.F. Huffman. 2002. Discovery of aminopyridine-based inhibitors of bacterial enoyl-ACP reductase (FabI). *J. Med. Chem.* 45. 3246-3256.

Miyakawa, S., K. Suzuki, T. Noto, Y. Harada, and H. Okazaki. 1982. Thiolaactomycin, a new antibiotic IV. biological properties and chemotherapeutic activity in mice. *J. Antibiot.* 35, 411-419.

Omura S. 1981. Cerulenin. *Methods Enzymol.* 72, 520-532.

Payne, D.J., P.V. Warren, D.J. Holmes, Y. Ji, and J.T. Lonsdale. 2001. Bacterial fatty-acid biosynthesis: a genomics-driven target for antibacterial drug discovery. *Drug Discov. Today* 6, 537-544.

Pfultz, R.F. and B.J. Wilkinson. 2004. The escalating challenge of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Curr. Drug targets-infect. Disord.* 4, 273-294.

Price, A.C., K.H. Choi, R.J. Heath, Z. Li, S.W. White, and C.O. Rock. 2001. Inhibition of beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthases by thiolaactomycin and cerulenin. structure and mechanism. *J. Biol. Chem.* 276, 6551-6559.

Qiu X, C.A. Janson, W.W. Smith, S.M. Green, P. McDevitt, K. Johanson, P. Carter, M. Hibbs, C. Lewis, A. Chalker, A. Fosberry, J. Lalonde, J. Berge, P. Brown, C.S. Houge-Frydrych, and R.L. Jarvest. 2001. Crystal structure of *Staphylococcus aureus* tyrosyl-tRNA synthetase in complex with a class of potent and specific inhibitors. *Protein Sci.* 10, 2008-2016.

Read, T.D., S.R. Gill, H. Tettelin, and B.A. Dougherty. 2001. Finding drug targets in microbial genomics. *Drug Discov. Today.* 6, 887-892.

Rosamond, J. and A. Allsop. 2000. Harnessing the power of the genome in the search for new antibiotics. *Science* 287, 1973-1976.

Rozwarski, D.A., G.A. Grant, D.H.R. Barton, W.R. Jacobs Jr., and J.C. Sacchettini. 1998. Modification of the NADH of the isoniazid target (InhA) from *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* 279, 98-102.

Sanders, W.J., V.L. Nienaber, C.G. Lerner, J.O. McCall, S.M. Merrick, S.J. Swanson, J.E. Harlan, V.S. Stoll, G.F. Stamper, S.F. Betz, K.R. Condroski, R.P. Meadows, J.M. Severin, K.A. Walter, P. Magdalinos, C.G. Jakob, R. Wagner, and B.A. Beutel. 2004. Discovery of potent inhibitors of dihydroneopterin aldolase using CrystaLEAD high-throughput X-ray crystallographic screening and structure-directed lead optimization. *J. Med. Chem.* 25, 1709-1718.

Schmid, M.B. 2004. Innovation: Seeing is believing: the impact of structural genomics on antimicrobial drug discovery *Nature Reviews Microbiol.* 2, 739-746.

Seefeld, M.A., W.H. Miller, K.A. Newlander, W.J. Burgess, W.E. DeWolf Jr., P.A. Elkins, M.S. Head, D.R. Jakas, C.A. Janson, P.M. Keller, P.J. Manley, T.D. Moore, D.J. Payne, S. Pearson, B.J. Polizzi, X. Qiu, S.F. Rittenhouse, I.N. Uzinskas, N.G. Wallis, and W.F. Huffman. 2003. Indole naphthyridinones as inhibitors of bacterial enoyl-ACP reductases FabI and FabK. *J. Med. Chem.* 46, 1627-1635.

Ward, W.H.J., G.A. Holdgate, S. Rowsell, E.G. Mclean, R.A. Pauptit, E. Clayton, W.W. Nichols, J.G. Colls, C.A. Minshull, D.A. Jude, A. Mistry, D. Timms, R. Cambel, N.J. Hales, C.J. Britton, and W.F. Taylor. 1999. Kinetic and structural characteristics of the inhibition of enoyl (acyl carrier protein) reductase by triclosan. *Biochemistry* 398, 12514-12525.

Whittington, D.A., K.M. Rusche, H. Shin, C.A. Fierke, and D.W. Christianson. 2003. Crystal structure of LpxC, a zinc-dependent deacetylase essential for endotoxin biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 8146-815.

Zhang, Y.M. and C.O. Rock. 2004. Evaluation of epigallocatechin gallate and related plant polyphenols as inhibitors of the FabG and FabI reductases of bacterial type II fatty acid synthase. *J. Biol. Chem.* 279, 30994-31001.

Zheng, C.J., J.H. Kim, T.G. Lee, Y.H. Kim, and W.G. Kim. 2004. New bacterial enoyl reductase inhibitor of microbial origin. 44th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC), PP193.

약 력



김원곤

- 1982. 3-1986. 2 서울대학교 농업생명과학대학 식품공학과 (학사)
- 1986. 3-1988. 2 서울대학교 대학원 식품공학과 (석사)
- 1992. 3-1996. 2 서울대학교 대학원 식품공학과 (박사)
- 1997. 4-1999. 4 미국 NIEHS/NIH (Post-doc.)
- 1989. 3-현재 한국생명공학연구원 연구원, 선임연구원, 책임연구원