

고체상 합성법에 의해 합성된 *N*-(3-hydroxysulfonyl)-L-homoserine Lactone 유사체들의 *Vibrio harveyi* 퀴럼 센싱에 대한 저해 효과

김철진 · 박형연¹ · 김재은² · 박희진³ · 이본수⁴ · 최유상⁵ · 이준희⁵ · 윤제용^{3*}

룻거스 뉴저지 주립대학교 화학과, ¹서울대학교 생명공학공동연구원

²삼성전자 종합기술원, ³서울대학교 화학생물공학부

⁴인하대학교 자연과학대학 화학과, ⁵부산대학교 약학대학 약학과

Solid Phase Synthesis of *N*-(3-hydroxysulfonyl)-L-homoserine Lactone Derivatives and their Inhibitory Effects on Quorum Sensing Regulation in *Vibrio harveyi*. Kim, Cheoljin, Hyung-Yeon Park¹, Jaeun Kim², Hee-Jin Park³, Bon Su Lee⁴, Yusang Choi⁵, Joon-Hee Lee⁵, and Jeyong Yoon^{3*}. Department of Chemistry and Chemical Biology, Rutgers, The State University of New Jersey, NJ 08854, USA, ¹Bio-Max Institute, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea, ²Environment Group, Samsung Advanced Institute of Technology, Samsung Electronics Co., Yongin 446-712, Korea, ³School of Chemical and Biological Eng., Seoul National University, Seoul 151-742, Korea, ⁴Department of Chemistry, College of Natural Science, Inha University, Incheon 402-751, Korea, and ⁵Department of Pharmacy, College of Pharmacy, Pusan National University, Busan 609-735, Korea – The inhibitors against *Vibrio harveyi* quorum sensing (QS) signaling were developed by modifying the molecular structure of the major signal, *N*-3-hydroxybutanoyl-L-homoserine lactone (3-OH-C₄-HSL). A series of structural derivatives, *N*-(3-hydroxysulfonyl)-L-homoserine lactones (HSHLs) were synthesized by the solid-phase organic synthesis method. The *in vivo* QS inhibition by these compounds was measured by a bioassay system using the *V. harveyi* bioluminescence, and all showed significant inhibitory effects. To analyze the interaction between these compounds and LuxN, a 3-OH-C₄-HSL receptor protein of *V. harveyi*, we tentatively determined the putative signal binding domain of LuxN based on the sequence homology with other acyl-HSL binding proteins, and predicted the partial 3-D structure of the putative signal binding domain of LuxN by using ORCHESTRA program, and further estimated the binding poses and energies (docking scores) of 3-OH-C₄-HSL and HSHLs within the domain. In comparison of the result from this modeling study with that of *in vivo* bioassay, we suggest that the *in silico* interpretation of the interaction between ligands and their receptor proteins can be a valuable way to develop better competitive inhibitors, especially in the case that the structural information of the protein is limited.

Key words: Quorum sensing inhibitors, autoinducer (AI-1), *N*-(3-hydroxysulfonyl)-L-homoserine lactone (HSL), *Vibrio harveyi*

서 론

퀴럼 센싱(quorum sensing; QS)은 세균의 세포 밀도에 반응하여 유전자 발현을 조절하는 세균의 조절 기전 중 하나이다. 많은 세균들은 자신의 세포밀도에 대한 표지로서 자신의 특이적 수용단백질에 의해 인식될 수 있는 작은 신호물질(quorum signal, 혹은 autoinducer; AI)을 생산하고 분비한다. 이 신호물질-수용단백질 복합체는 목표 프로모터에 직접 결합하거나, 일련의 인산화 연속반응을 유도하여 필요로 하는 유전자의 발현을 조절한다[9]. QS 조절 시스템을 통해

세균들은 병독성, 발광, 그리고 생물막 형성 등 생리적으로 중요한 많은 기능들을 조절한다[1]. 그러므로 QS 조절을 방해하는 저해제의 개발은 우리가 바라지 않는 세균의 활성을 조절하는 유망한 방법일 수 있기 때문에[6, 7, 23], 많은 연구자들이 현재 QS 저해제를 연구하고 있다[4, 22, 23, 25]. 그람 음성 세균에 의해 생성되는 가장 대표적인 QS 신호물질은 *N*-acyl-homoserine lactones(acyl-HSLs)이며[9, 10], 지금까지 발견된 acyl-HSL 신호전달 저해제 중 가장 주목할 만한 것은 furanone 유도체이나[2, 13, 17], 여전히 병원성 세균에 특이적으로 작용하는 보다 나은 QS 저해제가 요구되고 있는 실정이다.

*Vibrio harveyi*는 널리 보편적으로 발견되는 중요한 병원성 해양 세균이며, acyl-HSL에 의한 QS 신호전달과 생물막 형성을 통해 감염성 질병을 일으킨다[9, 24]. *V. harveyi*의

*Corresponding author

Tel: 82-2-880-8927, Fax: 82-2-876-8911

E-mail: jeyong@snu.ac.kr

QS 조절기전이 많이 연구되었음에도 불구하고, *V. harveri* QS 신호전달에 대한 좋은 저해제는 아직 개발되어 있지 않다. *V. harveri*는 동종간 혹은 이종간 신호전달을 위해 3종류의 서로 다른 신호물질을 사용한다[9]. 이들은 각각 *N*-3-hydroxybutanoyl-L-HSL(3-OH-C₄-HSL, AI-1), (2*S*,4*S*)-2-methyl-2,3,3,4-tetrahydroxytetrahydrofuran-borate(AI-2), 그리고 (S)-3-hydroxytridecan-4-one (CAI-1)이며, 이들은 각각 LuxN, LuxQ, 그리고 CqsS라는 센서-인산화 단백질(sensor-kinase proteins)에 의해 인식되어진다[9, 19, 24]. 이중, 3-OH-C₄-HSL이 가장 강력한 신호물질로, QS와 관련된 활성화에 가장 중요하게 작용한다[9, 19].

본 연구에서는 3-OH-C₄-HSL의 분자 구조를 변형함에 의해 가능성 있는 *V. harveri*의 QS 저해제들을 탐색하고자 하였다. 이를 위해 3-OH-C₄-HSL의 lactone head 부분과 hydroxybutanoyl tail 부분을 연결하는 carboxamide 결합 부위를 고체상 합성법(solid phase synthesis method)을 이용해 sulfonamide 결합으로 변형하여 *N*-3-hydroxysulfonyl-L-HSL

을 제조하고, 이를 더욱 다양하게 변형하였다. 이들변형체들과 3-OH-C₄-HSL 수용체인 LuxN과의 상호작용의 형태와 그 결합에너지를 예측해 보기 위해, 비록 LuxN의 삼차 구조가 아직 알려지지 않았지만 다른 acyl-HSL 수용 단백질들과의 부분적인 유사성으로부터 신호결합부위를 추정하여, 그 추정 부위와 QS 저해 후보물질들간의 상호작용을 *in silico*에서 모델링 하였다. 이 결과들을 *in vivo*에서 측정된 *V. harveyi* QS 저해 활성과 비교하여, 이러한 *in silico* 모델링이 보다 나은 QS 저해제의 개발에 유용하게 응용될 수 있음을 확인하였다.

재료 및 방법

화합물 합성

고체상 유기 합성법(solid phase organic synthesis method)으로 8개의 *N*-3-hydroxysulfonyl-L-HSL 유도체를 합성하였다. 선행연구에서 사용된 방법에 따라, Fig. 1과 Table 1에

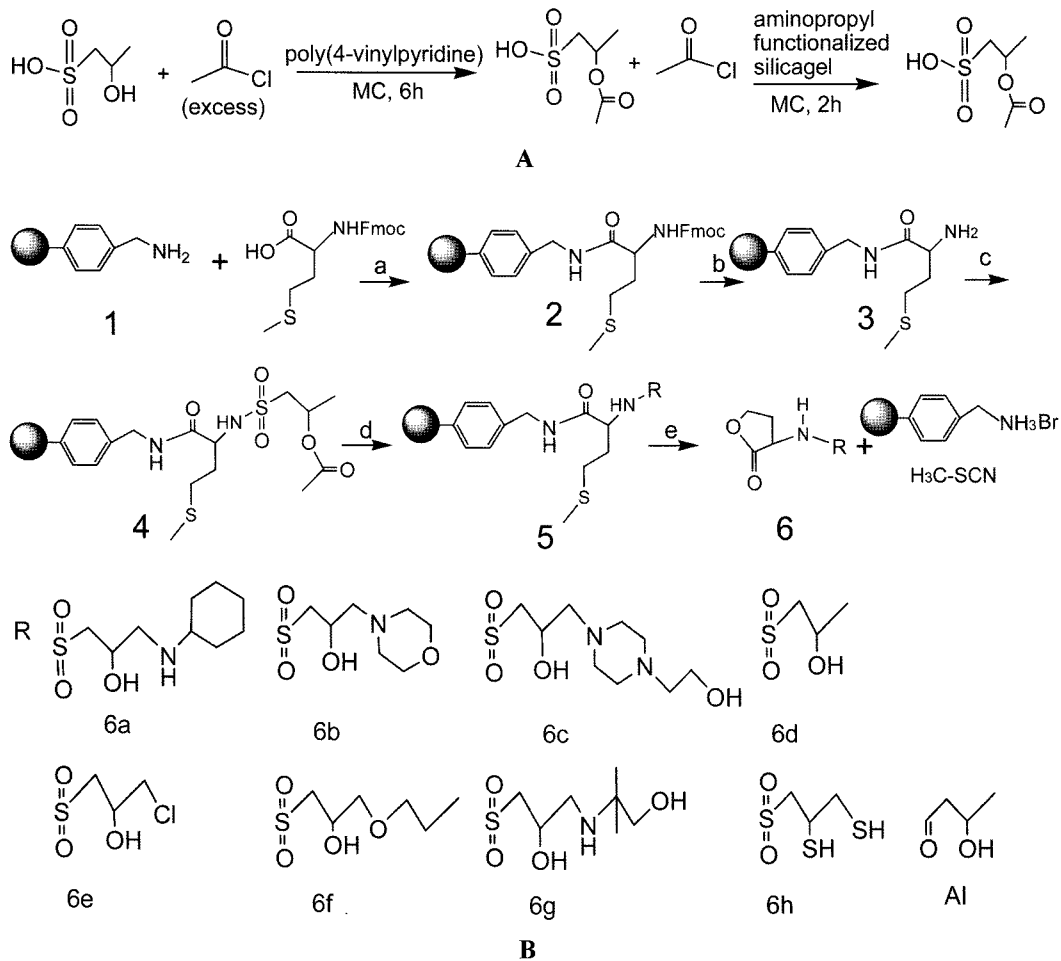
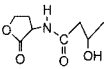
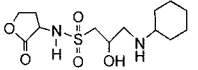
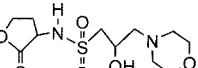
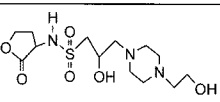
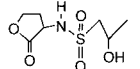
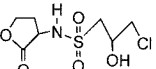
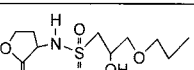
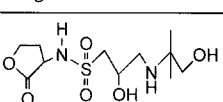
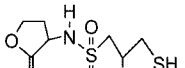


Fig. 1. A. Parallel solution-phase synthesis of esters and B. Solid phase synthesis of *N*-sulfonyl-L-HSL or *N*-acyl-L-HSL. a) DIEA, HOBt, BOP, NMP, 25°C; b) 20% piperidine/DMF, 25°C; c) DIEA, HOBt, BOP, carboxylic acid or sulfonyl chloride, NMP, 25°C; d) THF/1N NaOH (1:1); e) BrCN, CF₃COOH, CHCl₃/H₂O, 25°C [27].

Table 1. Log P (partition coefficient) and volumes of compounds used in this study.

Ligand	Total Volume ^{a)}	Tail Volume ^{a)}	Log P ^{b)}	
AI		159	26	1.38
6a		258	125	1.64
6b		240	100	0.01
6c		297	146	-0.26
6d		167	26	1.38
6e		164	39	0.85
6f		203	83	0.92
6g		219	116	-0.17
6h		142	74	1.05

^{a)} Volume in Å³.

^{b)} Log P values were calculated from SYBYL.

보여지는 방법과 순서로 합성하였다[13, 16]. 모든 합성물은 aminomethyl polystyrene(AM PS) resin으로부터 63%에서 73%의 수율로 추출하였다[6a(70%), 6b(72%), 6c(64%), 6d(73%), 6e(71%), 6f(70%), 6g(63%), 6h(67%), AI(73%)]. 합성된 화합물의 화학구조는 GC/MS 분석법 (Micromass Autospec-Ultima OA TOF GC/MS, UK)[11]과 ¹H-NMR spectroscopy로 확인하였다(Bruker Avance 400 WB, DSX-400, Germany)[28].

Bioassay를 통한 QS 저해 활성의 측정

3-OH-C₄-HSL에 반응하여 발광을 하는 *V. harveri* strain BB886을 report strain으로 하여, 3-OH-C₄-HSL에 대한 발광 정도를 측정함으로써 QS 저해를 정량적으로 측정하였다. *V. harveri* 세포를 30°C LBS 배지(10 g/L tryptone, 5 g/L yeast extract, 20 g/L NaCl)에서 overnight 배양한 후, 이를 bioassay 배지(300 mM NaCl, 50 mM MgSO₄, 0.2%(w/v) vitamin-free casamino acid, 10 mM potassium phosphate, 1 mM L-arginine, 1% glycerol(pH 7.5))에 100배 희석하였

다. 1 μM 3-OH-C₄-HSL과 8개의 저해제 물질들을 그림에 표시된 농도로 첨가하고, 30°C에서 더 배양하였다. 발광과 세 포밀도(optical densities; OD)를 각각 luminometer(Thermo Electron Co.)와 spectrophotometer(HP8452A, Hewlett-Packard)로 600 nm에서 측정한 후, 여러 다른 연구에서처럼 luminescence의 강도를 OD₆₀₀ 값으로 표준화한 luminescence/OD₆₀₀(RLU, relative light units)로 표시하였다[1, 21].

분자 결합의 모델링

각각 *Pseudomonas aeruginosa*와 *Agrobacterium tumefaciens*의 QS 수용체 단백질들인 LasR과 TraR의 신호 결합부위(signal binding domain)의 아미노산 서열을 LuxN 서열과 비교하여, LasR과 TraR의 신호 결합부위와 부분적으로 잘 보존된 부분을 LuxN의 신호 결합부위로 가정하고 이를 모델링 연구에 사용하였다(Fig. 2). 이 추정 신호 결합부위의 부분적 삼차구조를 ORCHESTRA 프로그램으로 예측하여 [20], 이를 기반으로 FlexX 프로그램을 통해 Fig. 1에 제시된 모든 8개의 저해제 물질들을 리간드로 한 결합 분석을 *in silico*에서 수행하였다[12]. 우선 SYBYL의 sketch module을 사용하여 이들을 결합 형태를 초안한 후[26], RMS(root mean square) gradient를 0.05 이하까지 Gasteiger-Hückel charge로 Tripos force field를 사용하여 최소화하였다[5, 18]. 이러한 FlexX 결합 분석은 run-multiple ligand option을 가지고 수행되었으며, 가능한 결합 형태들 중에서 LuxN의 신호 결합부위에 적절하게 잘 맞는 형태를 최상의 복합체 구조로 선택하여, 이 구조속에서 결합에너지(docking energy)를 계산하였다(Table 2).

결 과

합성된 화합물들의 *V. harveyi* QS 저해 효과.

Fig. 1에 제시된 새로운 8개의 화합물들이 원 신호물질인 3-OH-C₄-HSL과 경쟁하여 QS을 저해하는지 알아보고자, reporter strain인 *V. harveyi* BB886을 이용하여 *in vivo*에서 활성을 측정하였을 때, 모두 *lux* 오페론의 발현을 억제하는 것이 관찰되었다(Fig. 3). 1 μM의 3-OH-C₄-HSL를 각각 1 μM, 5 μM, 10 μM의 합성 화합물과 동시에 처리했을 때, 농도가 높아짐에 따라 발광이 현저히 감소하였다. 이들 화합물들은 reporter strain의 성장 자체에는 영향을 미치지 않았고(data not shown), *V. harveyi*의 *lux* operon 발현이 QS의 조절을 받는다는 점에서, 이 결과는 본 실험에서 합성된 화합물이 *V. harveyi*의 QS를 특이적으로 저해하였음을 보여 준다. 화합물들 중에서 6d, 6e 그리고 6h가 가장 강한 저해 효과를 보여주었으며, 6a와 6b는 고농도에서만 저해효과를 보여주었다(Fig. 3). 이들 화합물들이 3-OH-C₄-HSL와 크기와 구조가 비슷하다는 점에서, 이들 화합물들이 수용체 단

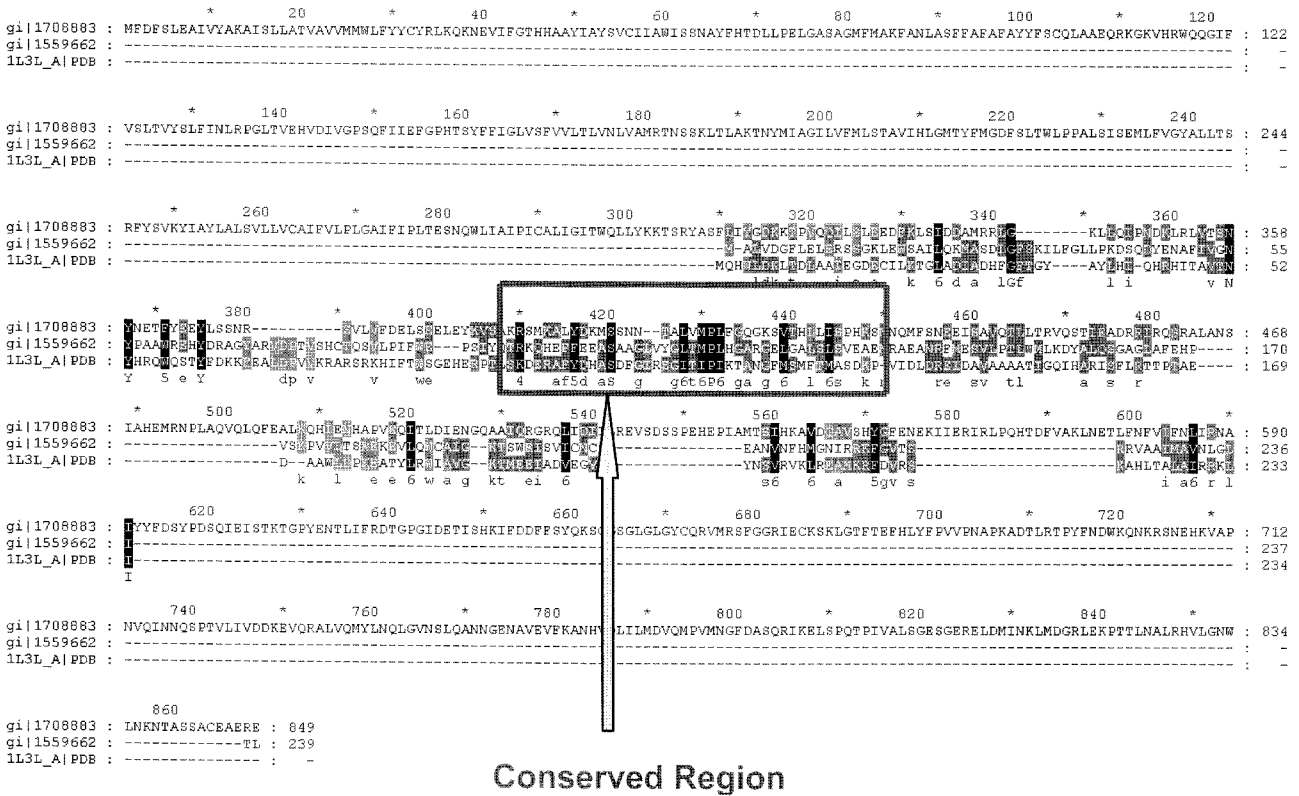


Fig. 2. Alignment of the amino sequence of LuxN (gi|1708883), LasR (gi|1559662), and TraR (1L3L_A|PDB). The conserved region is indicated.

Table 2. Binding energies (docking scores) in the best-docked structure.

Ligand	Binding energy (kcal/mol)
AI	-3.75
6a	-8.03
6b	-8.16
6c	-5.48
6d	-8.76
6e	-7.28
6f	-4.95
6g	-5.91
6h	-5.08

백질인 LuxN에 3-OH-C₄-HSL과 경쟁적으로 결합함에 의해 QS를 저해한 것으로 판단된다.

LuxN의 신호 결합부위의 구조

A. tumefaciens와 P. aeruginosa의 acyl-HSL 수용체 단백질인 TraR이나 LasR과는 달리, V. harveyi의 LuxN은 세포막에 존재하는 kinase/phosphatase이다[9]. 그러므로, LuxN의 삼차구조가 아직 밝혀지지 않았음에도 불구하고 다른 LuxR-type 수용체 단백질과는 많이 다른 구조를 가질 것이라고 추정할 수 있다. 그러나 3-OH-C₄-HSL이 acyl-HSL이라는 점에서, LuxN의 3-OH-C₄-HSL 결합 부위가 LasR이나

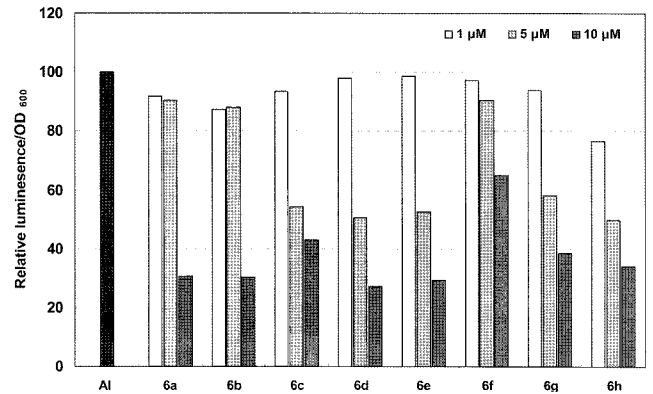


Fig. 3. In vivo QS inhibition by compounds synthesized in this study. The luminescence induced by 1 μM 3-OH-C₄-HSL was set to 100% and the reduced levels of luminescence by adding the compounds were relatively presented in percentage. AI(autoinducer), 1 μM 3-OH-C₄-HSL only and others, 1 μM 3-OH-C₄-HSL plus inhibitor compounds at the indicated concentration.

TraR과 같은 acyl-HSL 수용체 단백질들의 acyl-HSL 결합 부위와 부분적으로 유사할 것이라고 예상할 수 있었다. LasR과 TraR의 acyl-HSL 결합 부위가 이미 알려져 있기 때문에, LuxN의 아미노산 서열을 LasR과 TraR의 acyl-HSL 결합 부위와 서로 비교해 보았을 때, 부분적으로 보존된 부위를 발견할 수 있었으므로(Fig. 2), 이 부위를 LuxN의 3-OH-C₄-

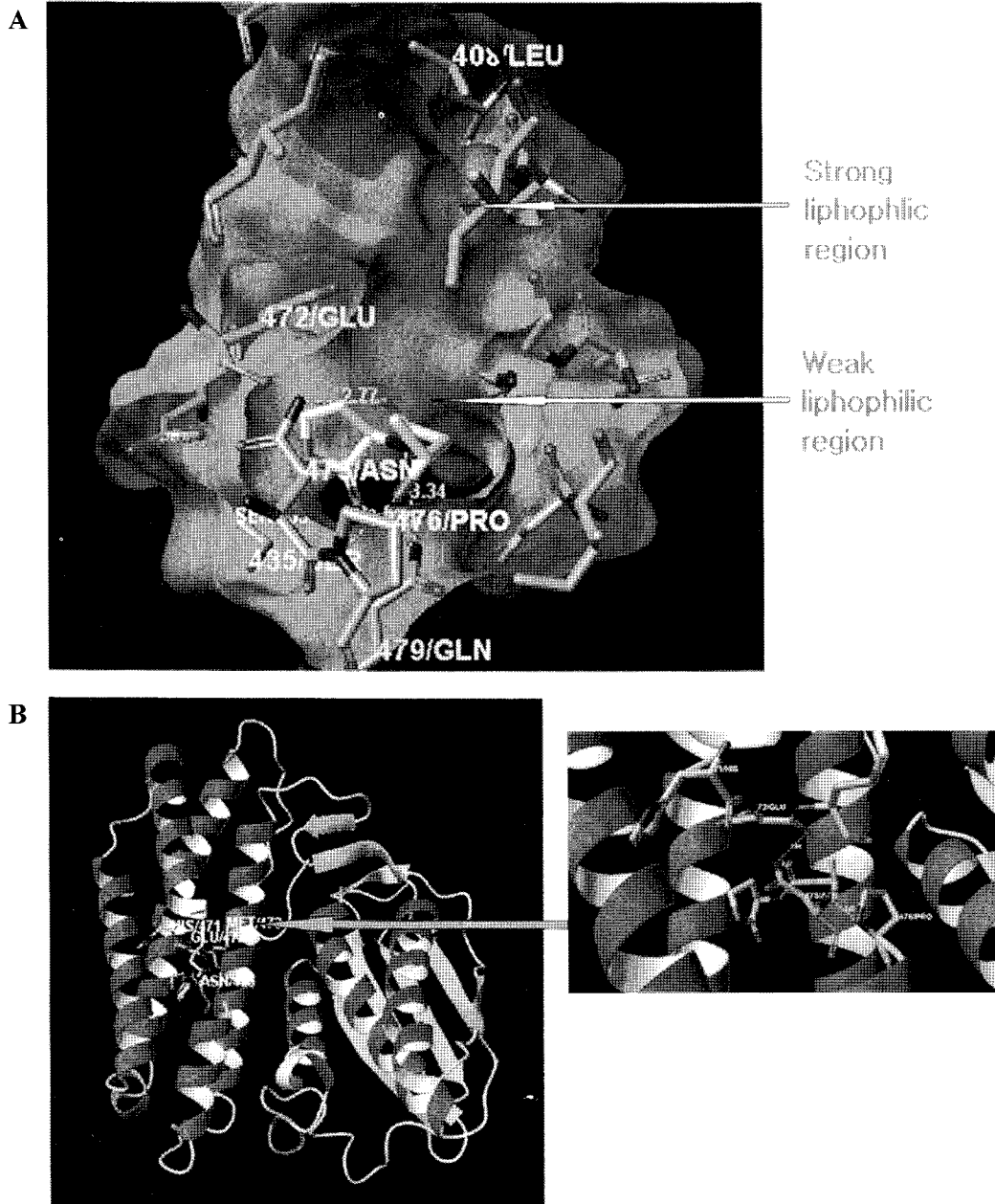


Fig. 4. The putative structure of the LuxN signal binding pocket (A) and the best docking poses of 3-OH-C₄-HSL in the signal binding pocket (B) from the modeling study using the FlexX docking program.

HSL 결합부위로 추정하였다. 이 부위는 N-말단의 세포막 결합 부위(from 1st to 301st amino acid)와 C-말단 kinase 부위(from 459th to 679th amino acid) 사이에 있는 400th~460th 아미노산 사이에 위치한다[8]. 우리는 이 위치의 부분적 아미노산 서열을 가지고, ORCHESTRA 프로그램을 사용하여 *in silico* 모델링을 통해 부분적 삼차구조를 예측하였다.

Fig. 4(A)는 모델링 결과로부터 얻어진 LuxN 추정 신호 결합부위의 예상 구조를 보여준다. 두 개의 주머니(small and large pocket)를 가진 자루 같은 구조를 가지며, small pocket은 Ser435, Glu438, Ile439, Asn475, Pro476, Glu479,

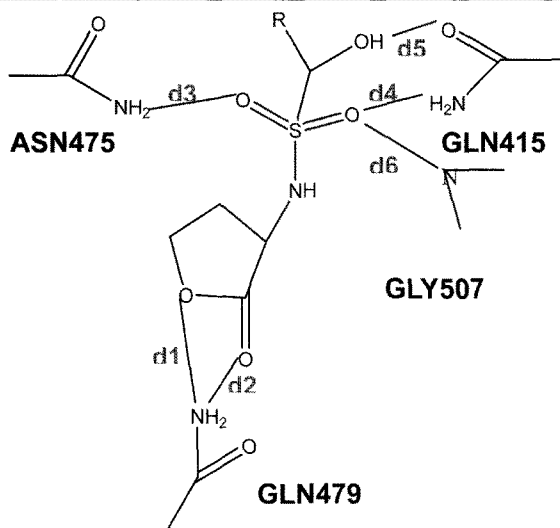
Asp503, Leu504으로 둘러 쌓여 있고, small pocket 반대편에 위치한 large pocket은 Leu412, Gln415, Val442, Leu446, Leu465, Ile469, His471, Glu472, Gly507, Ala510, Ile511으로 둘러 쌓여 있다. 모든 pocket의 총 부피는 477³이고 large pocket은 small pocket보다 더 강한 소수성을 띤다.

LuxN과 3-OH-C₄-HSL 및 합성물들의 결합 형태

Fig. 4(B)는 FlexX 프로그램을 이용한 모델링으로 얻어진 LuxN과 3-OH-C₄-HSL 사이의 최선의 결합 형태를 보여주는데, 3-OH-C₄-HSL과 중요한 아미노산 잔기들이 표시되어

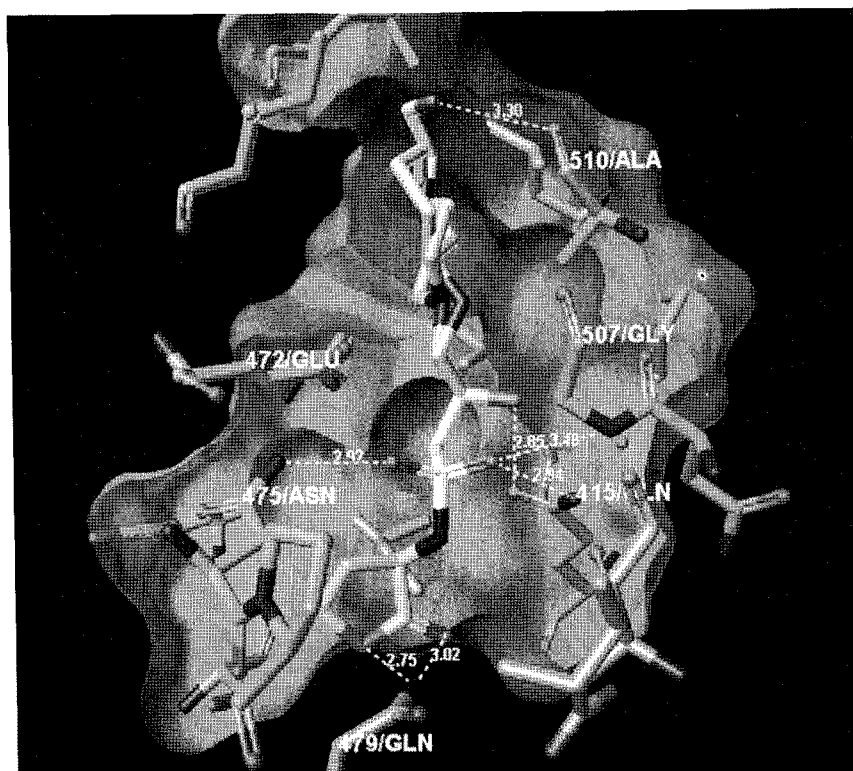
Table 3. Distance of hydrogen bonds between ligands and key residues (Å).

	d1	d2	d3	d4	d5	d6
6a	2.75	3.02	2.92	2.95	2.85	3.18
6b	2.75	3.02	2.92	2.95	2.83	3.19
6c	2.75	3.02	2.92	2.95	2.83	3.18
6d	2.75	3.02	2.92	2.95	2.87	3.19
6e	2.75	3.02	2.92	2.95	2.86	3.18
6f	2.75	3.02	2.92	2.95	2.85	3.18
6g	2.74	3.10	3.35	2.87		3.11
6h	2.75	3.02	2.92	2.95		3.18



있다. 3-OH-C₄-HSL과 LuxN 사이의 결합에너지는 -3.75 kcal/mol였으며, 결합 형태에는 다음의 두 가지 특징이 예측되었다. 첫째, lactone head와 carboxamide bond body는 logP value(0.277, Table 1)로부터 추론하였을 때, small pocket의 약한 소수성 부위에 위치해 있고, 주변의 아미노산 잔기들과 3개의 수소결합(lactone head의 carbonyl oxygen과 Gln479의 질소사이에, 그리고 amide bond의 carbonyl oxygen과 Asn475 사이에, 그리고 수산기와 Pro476 사이에)을 형성한다는 점, 둘째, acyl tail 부분은 large pocket의 강한 소수성 부위를 향하고 있어, 주위 아미노산 잔기들과의 수소결합 및 소수성 결합은 최대화 하고, 반대로 공간적 상충은 최소화 하고 있다는 점이다. 그러나 수산기와 Pro476 사이의 수소결합은 수산기의 크기와 친수성 때문에 acyl tail 이 large pocket에 결합하는 것을 방해하여, 3-OH-C₄-HSL의 결합력을 낮추고 있다. 이러한 점 때문에 만약 더 적합한 리간드가 존재한다면, 충분히 3-OH-C₄-HSL의 결합을 경쟁적으로 방해할 수 있었다.

비슷한 방식으로 새로이 합성한 화합물들을 가지고 FlexX 모델링을 수행하였다. 우선 공통적으로 존재하는 lactone head와 sulfonamide bond body가 신호 결합부위의 극성 아미노산 잔기들과 수소결합을 형성하는지 여부와, 다양한 tail 부분 치환기들이 소수성이 강한 large pocket에 적절히 위치할 수 있는지 여부를 조사하였다. 그 결과, Table 3과 Fig. 5, 6에서 보여지는 것처럼, 1) 모든 화합물의 lactone head가


Fig. 5. The best docking poses of Group A compounds in the signal binding pocket of LuxN. Some residues were deleted for clarity.

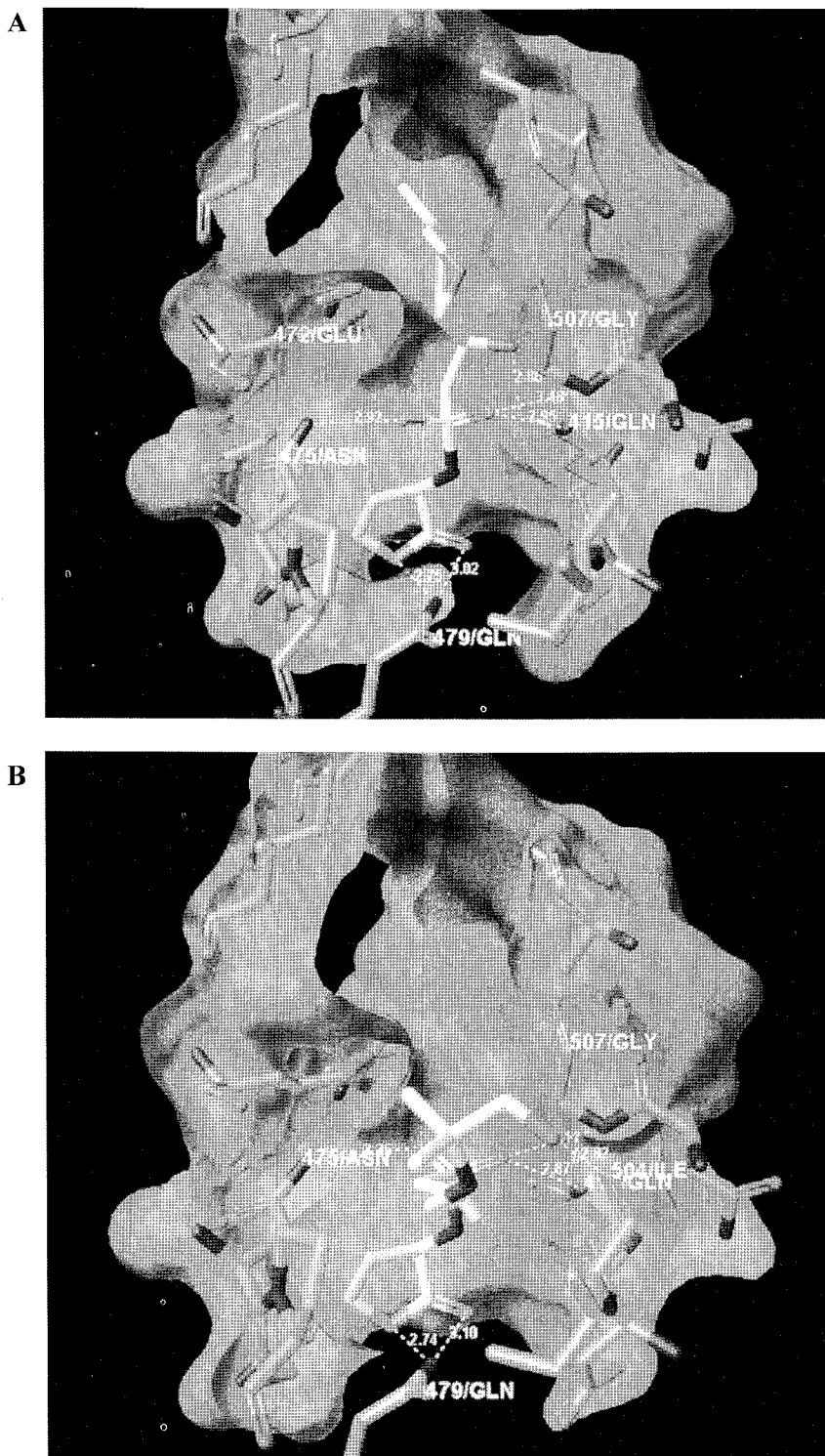


Fig. 6. The best docking pose of Group B compounds. (A) 6d, 6e, 6f, and 6h. (B) 6g.

logP 값으로부터 예상된 바 대로 small pocket 안에 존재하면서 2개의 수소결합(lactone 환 산소 및 carbonyl 산소와 Gln479 사이에)을 형성한다는 것, 2) sulfonamide body가 Asn475와 수소결합을 형성한다는 것, 3) tail 부분들은 대체로 소수성 pocket에 적절히 들어갈 수 있다는 것 등을 확인

할 수 있었다. 이러한 결합 형태에서는 Table 3에서 보이듯이, head와 body 부분에서 형성된 수소결합의 방향과 거리가 모든 화합물에서 거의 같기 때문에, 결합에너지는 large pocket에 tail 부분이 결합하는 특성에 의해 주로 결정되는 것으로 보인다.

본 실험에 사용된 모든 화합물은 tail 부분에 환 형태의 치환기를 포함하는 A 그룹(6a~6c)과 그렇지 않은 B 그룹(6d~6h)으로 나누어 질 수 있다. 그룹 A 화합물들의 결합 형태에서는 Fig. 5에서 보이는 것처럼, 1) 세번째 탄소의 수산기 산소가 Gln415와 함께 수소결합을 형성한다는 점. 2) tail 부분이 large pocket의 아미노산 잔기들과 소수성 상호작용을 한다는 점 등의 공통점이 관찰되었다. 한편 large pocket이 좁고 깊은 모양을 가지고 있기 때문에, 그룹 A 화합물들의 tail 부분에 있는 환형 치환기들은 공간적 방해물을 피하기 위해 large pocket에 수직으로 위치한다.

Fig. 4와 5를 비교해 보면, 그룹 A 화합물들의 head는 3-OH-C₄-HSL의 head와는 small pocket 안에서 다른 방향으로 위치하고 있음을 알 수 있다. 또한 Sulfonamide body에서의 수소결합 형성이 lactone head에서 형성되는 2개의 수소결합과 large pocket에서의 소수성 상호작용을 확실하게 해주기 때문에, 그룹 A 화합물들의 결합에너지가 원 신호물질인 3-OH-C₄-HSL의 결합에너지보다도 더 좋게 나옴을 알 수 있다. 이들 그룹 A 화합물들 중, 6c의 tail 부분은 large pocket에서의 logP 값이 비교적 좋지 않았지만(LogP=-0.26), tail 부분 끝의 수산기와 Ala510 사이에 수소결합이 형성될 수 있으므로 large pocket속에 위치할 수는 있었다. 그러나 이 친수성 기 때문에 소수성 pocket안에서의 6c의 결합에너지는 6a나 6b보다 나빴다.

그룹 B 화합물들의 결합 형태는 tail 부분의 구조에 따라 다양했다. 6d와 6e는 둘 다 large pocket에 대해 적당한 부피와 logP 값을 가지는 반면, 전자가 풍부한 염소기와 소수성 large pocket사이의 상호 밀침 때문에, 6e는 6d보다 결합에너지가 나빴다. 이와 비슷하게 적당한 부피와 logP 값에도 불구하고, 6f 역시 극성 산소원자와 소수성 large pocket사이의 밀침 때문에 결합에너지가 좋지 못했다. 6c처럼 6g 또한 tail 부분 끝의 수산기가 large pocket안에서 수소결합을 형성할 수 있으나, 크고 친수성을 가지는 tail 부분 때문에 밀침 현상이 나타났다. 6h는 6e와 비슷한 결합형태를 가짐에도 불구하고, Table 3에 표시된 d5 수소결합이 없기 때문에 6h의 결합에너지는 6e보다 나빴다.

고 찰

본 연구에서는 *V. harveyi* QS에 대한 새로운 저해제를 개발하기 위하여, body 부분이 sulfonamide 결합으로 변형되고, 다양한 구조의 tail 부분 치환기를 가지는 화합물들을 고체상 유기합성법으로 합성한 후, 이들 화합물들의 실제 *in vivo* QS 저해 효과를 측정하고, 또한 수용체 단백질인 LuxN의 추정 신호결합 부위와의 결합 형태 및 에너지를 *in silico* 모델링을 통해 분석하였다. 이렇게 모델링으로 예측한 결합 구조를 바탕으로 각 화합물이 가지는 서로 다른 저해능을 설명하고자 하였다. 본 연구에서 시도된 모든 화합물들은, 원

신호물질인 3-OH-C₄-HSL보다 LuxN의 추정 신호 결합부위에 더 적합한 자세로 결합할 수 있어, 더 나은 결합에너지를 보여주었으며, 실제로 *in vivo*에서도 좋은 저해력을 보여주었다. 이는 모델링으로 얻어진 결합에너지(Table 2)와 *in vivo* 저해력(Fig. 3) 사이에 일정 정도 상관관계가 있음을 의미한다.

선행연구에서, 본 연구팀은 모델링 연구를 통해 얻은 구조 정보를 기반으로 *A. tumefaciens*의 TraR과 *P. aeruginosa*의 LasR의 활성을 저해하는 QS 저해제를 개발한 바 있다[14, 15]. TraR과 LasR의 경우, X-선 결정학적 연구로부터 이들 단백질들의 신호 결합부위의 삼차구조에 대한 정보를 얻을 수 있었으나[3, 27], *V. harveyi*의 LuxN의 경우는 이러한 삼차구조가 보고된 바 없고, LuxN이 TraR이나 LasR과는 다른 형태의 막 단백질이기 때문에, 리간드-LuxN간 상호작용 분석을 위한 믿을 수 있는 *in silico* 모델을 얻기가 매우 어려웠다. 그러나, 세균 QS 저해제 개발을 위한 지속적, 선도적 연구의 일환으로, 본 연구에서는 LasR, TraR과 LuxN의 부분적 아미노산 서열 유사성으로부터 LuxN의 신호 결합부위를 추정하고, 그 부위의 부분적 삼차구조를 기반으로 *in silico* 모델링을 수행하여 리간드-LuxN 간의 상호작용과 그 결합 형태 및 에너지를 분석하는 새로운 시도를 수행하였다. 이러한 방법은 이전에 시도된 바가 없으나, 본 연구팀은 acyl-HSL 구조와 *in silico* 모델링에 기반한 QS 저해제 개발에 대한 이전의 연구 경험으로부터, 아직 삼차 구조가 알려지지 않은 수용체 단백질에 대한 상호작용 연구라는 새로운 시범적인 시도으로써 본 연구를 수행하였다. 본 연구에서 시도된 모든 화합물들이 *in vivo* 에서 의미있는 QS 저해력을 보여주었다는 점에서, 이러한 모델링 연구가 특히 수용체 단백질의 삼차구조 정보가 제한적인 경우에 보다 나은 경쟁적 저해제의 개발에 가치있는 방법이라고 할 수 있을 것이다.

요 약

Vibrio harveyi 퀴럼 센싱(quorum sensing; QS) 신호전달에 대한 저해제들이 주 신호물질인 *N*-3-hydroxybutanoyl-L-homoserine lactone(3-OH-C₄-HSL)의 분자 구조를 변형함에 의해 개발되었다. 일련의 구조 변형체들인 *N*-(3-hydroxysulfonyl)-L-homoserine lactones(HSHLs)들은 고체상 유기합성법(solid-phase organic synthesis method)으로 합성되었다. 이 물질들의 생체내 퀴럼 센싱 저해능이 *V. harveyi* 발광을 이용한 bioassay를 system에 의해 측정되었을 때, 모두 의미있는 저해효과를 보여주었다. 이 물질들과 3-OH-C₄-HSL 수용체 단백질인 LuxN 사이의 상호작용을 분석하기 위하여 LuxN의 신호 결합 부위를 다른 acyl-HSL 결합 단백질들과의 유사성에 기초하여 시험적으로 결정하였다. 이 추정 신호결합 부위의 부분적 삼차구조를 ORCHESTRA program을 이용하여 예측하였으며, 이 부위 내에서 3-OH-C₄-HSL와 HSHLs의 결합 형태와 에너지를 계산하였다. 이렇게 모델링

을 통해 얻어진 결과와 생체 내 bioassay를 통해 얻어진 결과의 비교를 통해, 수용체 단백질과 그 리간드 사이의 상호작용에 관한 *in silico* 해석이 특히 단백질의 삼차 구조에 대한 정보가 제한적인 경우에 보다 나은 저해제 개발을 위한 유용한 방법이 될 수 있음을 제안한다.

감사의 글

본 연구는 환경부 “차세대 핵심환경기술개발사업”으로 지원받은 과제(과제번호; 102-081-067)이며, 2009년도 정부(과학기술부)의 재원으로 한국과학재단의 지원을 받아 수행된 연구임(과제 관리번호; R01-2007-000-20732-0). 또한 이 논문은 2007년 정부(교육인적자원부)의 재원으로 한국학술진흥재단의 지원을 받아 수행된 연구임(과제번호; KRF-2007-331- C00222).

REFERENCES

- Bassler, B. L., M. Wright, and M. R. Silverman. 1994. Multiple signaling systems controlling expression of luminescence in *Vibrio harveyi*: sequence and function of genes encoding a second sensory pathway. *Mol. Microbiol.* **13**: 273-286.
- Baveja, J. K., G. Li, R. E. Nordon, E. B. H. Hume, N. Kumar, M. D. P. Willcox, and L. A. Poole-Warren. 2004. Biological performance of a novel synthetic furanone-based antimicrobial. *Biomaterials* **25**: 5013-5021.
- Bottomley, M. J., E. Muraglia, R. Bazzo, and A. Carfi. 2007. Molecular insights into quorum sensing in the human pathogen *Pseudomonas aeruginosa* from the structure of the virulence regulator LasR bound to its autoinducer. *J Biol Chem.* **282**(18): 13592-13600.
- Castang, S., B. Chantegrel, C. Deshayes, R. Dolmazon, P. Gouet, R. Haser, S. Reverchon, W. Nasser, N. Hugouvieux-Cotte-Pattat, and A. Doutheau. 2004. *N*-Sulfonyl homoserine lactones as antagonists of bacterial quorum sensing. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **14**: 5145-5149.
- Clark, M., R. D. Cramer III, and N. Van Opdenbosch. 1989. Validation of the General Purpose Tripos 5.2 Force Field. *J. Comp. Chem.* **10**: 982-1012.
- Daniels, R., J. Vanderleyden, and J. Michiels. 2004. Quorum sensing and swarming migration in bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **28**: 261-289.
- Defoirdt, T., N. Boon, P. Bossier, and W. Verstraete. 2004. Disruption of bacterial quorum sensing: an unexplored strategy to fight infections in aquaculture. *Aquaculture* **240**: 69-88.
- Freeman, J. A., B. N. Lilley, and B. L. Bassler. 2000. A genetic analysis of the functions of LuxN: a two-component hybrid sensor kinase that regulates quorum sensing in *Vibrio harveyi*. *Mol. Microbiol.* **35**(1): 139-149.
- Henke, J. M. and B. L. Bassler. 2004. Bacterial social engagements. *Trends Cell Biol.* **14**(11): 648-656.
- He, X. and C. Fuqua. 2006. Rhizosphere Communication: Quorum sensing by the Rhizobia. *J. Microbiol. Biotechnol.* **16**: 1661-1677.
- Hsu, C. S. and M. Green. 2001. Fragment-free accurate mass measurement of complex mixture components by gas chromatography/field ionization-orthogonal acceleration time-of-flight mass spectrometry: an unprecedented capability for mixture analysis. *Rapid Commun. Mass Sp.* **15**: 236-239.
- Jacek, S., B. Markus, S. Isabel, D. Hans-Martin, and S. Martin. 2001. Synthesis, molecular modeling, and structure-activity relationship of benzophenone-based CAAX-peptidomimetic farnesyltransferase inhibitors. *J. Med. Chem.* **44**: 2886-2899.
- Kim, C., J. Kim, H. Y. Park, R. J. C. McLean, C. K. Kim, J. Jeon, S. S. Yi, Y. G. Kim, Y. S. Lee, and J. Yoon. 2007. Molecular modeling, synthesis, and screening of new bacterial quorum-sensing antagonists. *J. Microbiol. Biotechnol.* **17**: 1598-1606.
- Kim, C, J. Kim, H. Y. Park, H. J. Park, J. H. Lee, C. K. Kim, and J. Yoon. 2008. Furanone derivatives as quorum-sensing antagonists of *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **80**(1): 37-47.
- Kim, C, J. Kim, H. Y. Park, J. H. Lee, H. J. Park, C. K. Kim, and J. Yoon. 2009. Structural understanding of quorum-sensing inhibitors by molecular modeling study in *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* In press.
- Ko, D. H., D. J. Kim, C. S. Lyu, I. K. Min, and H. S. Moon. 1998. New cleavage approaches to combinatorial synthesis of homoserine lactones. *Tetrahedron Lett.* **39**: 297-300.
- Manefield, M., T. B. Rasmussen, M. Henzter, J. B. Andersen, P. Steinberg, S. Kjelleberg, and M. Givskov. 2002. Halogenated furanones inhibit quorum sensing through accelerated LuxR turnover. *Microbiol.* **148**: 1119-1127.
- Miller, K. J. 1990. Additivity methods in molecular polarizability. *J. Am. Chem. Soc.* **112**: 8533-8542.
- Miller, M. B., and B. L. Bassler. 2001. Quorum sensing in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **55**: 165-99.
- Montalvao, R. W., R. E. Smith, S. C. Lovell, and T. L. Blundell. 2005. CHORAL: a differential geometry approach to the prediction of the cores of protein structures. *Bioinformatics* **21**: 3719-3725.
- Niu, C., S. Afre, and E. S. Gilbert. 2006. Subinhibitory concentrations of cinnamaldehyde interfere with quorum sensing. *Letters in Applied Microbiology* **43**: 489-494.
- Persson, T., T. H. Hansen, T. B. M. E. Rasmussen, M. Givskov, and J. Nielsen. 2005. Rational design and synthesis of new quorum-sensing inhibitors derived from acylated homoserine lactones and natural products from garlic. *J. Org. Biomol. Chem.* **3**: 253-262.
- Rasmussen, T. B., and M. Givskov. 2006. Quorum-sensing inhibitors as anti-pathogenic drugs. *Int. J. Med. Microbiol.* **296**: 149-161.

24. Semmelhack, M. F., S. R. Campagna, C. Hwa, M. J. Federle, and B. L. Bassler. 2004. Boron Binding with the Quorum Sensing Signal AI-2 and Analogues. *Org. Lett.* **6**: 2635-2637.
25. Smith, K. M., Y. Bu, and H. Suga. 2003. Library screening for synthetic agonists and antagonists of a *Pseudomonas aeruginosa* autoinducer. *Chem. Biol.* **10**: 563-571.
26. SYBYL molecular modeling software 1999. Tripos Inc., South Hanley Rd, Suite 303, St. Louis, MO 63144.
27. Zhang, R. G., T. Pappas, J. L. Brace, P. C. Miller, T. Oulmassov, J. M. Molyneaux, J. C. Anderson, J. K. Bashkin, S. C. Winans, and A. Joachimiak. 2002. Structure of a bacterial quorum-sensing transcription factor complexed with pheromone and DNA. *Nature* **417**: 971-974.
28. The NMR-data for the compound **6a**: ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ =7.89 (s, 1H, NH), 4.79 (s, 1H, OH) 4.53 (ddd, J=5.96 Hz, 1H, CH-Lac), 4.46 (ddd, J=5.96 Hz, 1H, CH-Lac), 3.88 (m, 2 H, CH_2), 3.47-3.44 (m, 1 H, CH-Lac), 2.90 (d, J=6.96 Hz, 2H, CH_2), 2.70 (d, J=6.12 Hz, 2H, CH_2), 2.52-2.49 (m, 1H, CH-Lac), 2.10-2.08 (m, 1H, CH-Lac), 2.0 (s, 1H, NH), 1.65 (m, 2H, CH_2), 1.48-1.39 (m, 8H, CH_2); HRMS (CI) calcd for $\text{C}_{13}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}$ ($\text{M}^+ + 1$) 320.4100, found 320.4101 (Abbreviations: DIEA; diisopropyl ethylamine, HOBt; 1-hydroxybenzotriazole, BOP; benzotriazol-1-yl-oxy-tris(dimethylamino)phosphonium hexafluorophosphate, NMP; N-methyl-2-pyrrolidone, THF; tetrahydrofuran, and DMF; dimethylformamide).

(Received July 3, 2009/Accepted Sep. 8, 2009)