

04-3-18

신규 제초제 작용점 Coniferyl alcohol dehydrogenase (CAD) 저해제 탐색

황인택¹, 이동희², 김태훈², 이관휘¹, 최정섭¹, 김범태¹, 조광연¹

¹한국화학연구원 생물화학연구부, ²(주)제노마인

목적

지금까지 개발된 제초제의 작용점이 아니면서, 식물에만 존재하는 식물생존필수효소를 새로운 target으로 발굴하고, target enzyme에 대한 저해제를 high throughput screening 기술을 이용하여 화합물은행으로부터 hit를 탐색하고, hit에 대한 유도체를 합성하여 환경친화적인 제초제를 개발하려는 새로운 기술개발.

재료 및 방법

1. 대상화합물: 한국화학연구원 화합물은행
2. 저해제 탐색방법: 단백질의 대량발현 및 정제, 효소활성 측정방법 확립, hit 탐색, lead 유도체 합성, *in vivo* test

결과 및 고찰

Coniferyl alcohol dehydrogenase (CAD) 기능을 가지는 유전자를 대장균 (*E. coli*)으로 전이시켜 효소의 대량 생산체제를 구축하였고, 대상 유전자를 제거시킨 애기장대풀(*Arabidopsis thaliana*)로부터 식물생존 필수 유전자임을 확인하였다. *AtCAD* 단백질의 효소 활성도는 30°C로 조절되는 Benchmark™ Microplate Reader(BMS)와 96-well을 이용하여 측정하였고, Lineweaver-Burk's plot으로 enzyme kinetics를 해석한 결과 K_m 값 및 V_{max} 값이 각각 $1.98 \times 10^{-4} M$ 및 0.238이었다. 대량정제 및 효소활성을 측정할 수 있는 체제를 구축한 후 96-well을 사용하는 고속약효 검색체제(high throughput screening, HTS)로 전환시켰다. 구축된 HTS를 활용하여 한국화학연구원 화합물은행에서 보유하고 있는 45,000여 화합물을 100mM 농도로 처리하여 21개의 hit를 탐색하였다. 이들 중 Nordihydroguaiaretic acid (MW 302.4, IC_{50} 0.18 mM), Agaric acid (MW 416.56, IC_{50} 0.25 mM), Kojic acid (MW 142.11, IC_{50} 1.21 mM), Traumatic acid (MW 228.29, IC_{50} 2.34 mM), *N*-Ethyl maleimide (MW 125.13, IC_{50} 3.30 mM), Sebaic acid (MW 202.25, IC_{50} 6.38 mM), Citric acid (MW 192.13, IC_{50} 7.9 mM), *o*-Chlorocinnamic acid (MW 182.61, IC_{50} 9.81 mM), Itaconic acid (MW 130.1, IC_{50} 9.87 mM), Oxalic acid (MW 90.04, IC_{50} 9.97 mM) 등이 가능성 있는 lead 화합물들이었다. 이들은 아직까지 CAD와 관련된 활성이 보고 되어 있지 않기 때문에 신규 CAD 저해제로서의 기능을 발휘하게 될 것이며, 보다 강력한 CAD 저해 제초제를 합성하는데 유용한 정보를 제공하게 될 것이다. 또한 유도체를 합성하는데 lead compound로서 이용하게 될 것이다. Itaconic acid와 Nordihydroguaiaretic acid 등은 *in vitro* 실험결과에서 뿐만 아니라 *in vivo*에서도 뚜렷한 저해활성을 나타내어 CAD 저해 제초제의 개발 가능성을 높게 해주었다.