

Acetolactate synthase에 대한 고효율 활성 측정방법 및 신규 저해제 탐색

박상희 · 황인택^{1*} · 이관휘¹ · 최정섭¹ · 변종영 · 조광연¹

충남대학교, ¹한국화학연구원

요약 : 분지아미노산 생합성 과정에 관여하는 첫 번째 효소인 acetolactate synthase (ALS)를 대상으로 수행할 수 있도록 고효율 검색방법(High Throughput Screening, HTS)을 개발하였고, 이를 이용하여 식물특이적 효소 저해제로 알려진 107개의 기존 화합물 중에서 새로운 ALS 저해 화합물을 선별하였다. 기존의 방법과 비교할 경우 한사람이 1회 수행한다고 하면 8배 효율이지만 연속적으로 수행한다고 할 경우 1/10 이하의 양, 동일한 재료의 적용, 측정 결과의 계산, enzyme kinetics 등을 감안하면 최소 100배 이상의 효과를 얻을 수 있다. 새로운 ALS 저해제로 탐색된 화합물질은 aminooxyacetic acid, azelaic acid, citric acid, cyanuric fluoride, glyoxylic acid, itaconic acid, malonic acid, niclosamid, oxalic acid, 2-oxoglutaric acid, suramin 등이었다. 앞으로 이들을 기본 구조로 하여 신규 ALS 저해제 초제의 개발을 위한 유도체의 합성에 이용되었으면 한다.(2001년 8월 30일 접수, 2001년 9월 19일 수리)

Key words : acetolactate synthase, ALS inhibitor, high throughput screening, microplate reader, 96-well plate.

서 언

신규 제초제의 개발 기술은 끊임없이 변모 발전하여 왔지만 가장 중요하게 요구되는 것은 적은 양으로 잡초만을 효과적으로 방제하면서 인체와 환경에 영향을 주지 않아야 한다는 것이다(Cobb, 1992; Rendina and Abell, 1994; 황 등, 2001). 그 동안 개발된 제초제의 대부분이 me-too방법에 의한 합성과 random screening으로 선별되었지만 신규 제초제의 개발 확률이 낮아지고 인체에 대한 독성과 환경에 대한 관심이 높아지면서 식물 특이적 대사과정과 관련된 작용점을 가진 제초제의 개발에 관심이 집중되었다. 제초제는 기본적으로 작물을 재배하는데 방해하는 잡초를 제거하기 위하여 개발된 화학물질들이기 때문에 사람과 동물에 대한 독성이 높지 않다. 그러나 인체에 보다 안전한 제초제를 개발하기 위하여 식물체에만 존재하는 광합성과 필수 아미노산 대사에 관여하는 화학물질 탐색에 관심이 모아졌고, 접근 방식도 예전과 달리 target site를 대상으로 이루어지는 합리적 개발방법(rational approach)이 등장하였다(Cobb, 1992, 황 등, 1993; 황과 이, 2001). 즉, 사람과 동물은 광합성을 할 수 없고, 필수 아미노산을 식물로부터 섭취하여야 하기 때문에 사람의 몸 안으로 제초제 성분이 유입된다하여도 제초제가 할 수 있는 일이 없기 때문에 독성이 없거나 낮을 것으로 예상하기 때문이다. 예상대로 지금까지 개발된 아미노산 생합성 저해 제초제들로서 대표적인 glyphosate, sulfonylurea계, imidazolinone계, triazolopyrimidine계 등의 독성은 매우 낮은 것으로 밝혀져 있다. 이들의 경구독성(LD50)은 4,000-5,000 mg/kg으로 우리생활에서 찾아볼 수 있는 술(4,500 mg/kg)과 비슷하다(황 등, 2001). 또한 아주 적은 양으로 잡초를 선택적으로 방제할 수 있기 때문에 세계 굴지의 농약회사에서는 보다

우수한 화합물을 계속적으로 탐구하고 있다. 왜냐하면 지금까지 아미노산 생합성과정에 관여하는 75개 정도의 효소 중 5개(Acetolactate synthase, 5-enolpyruvyl shikimate-3-phosphate synthase, glutamate synthetase, acetohydroxyacid reductoisomerase, imidazole glycerol phosphate dehydrogenase 등)만 연구되었기 때문에 대상으로 하는 target enzyme이 많이 남았다는 것이다(Kishore and Shah, 1988). 또한 목적 지향적 분자합성방법으로 조합화학(Combinatorial Chemical Synthesis, CCS)이 등장하여 보다 빠르게, 보다 많은 수의 화합물을 합성하게 되었고 이들의 활성을 검정하기 위한 노력으로 고효율검색방법(High Throughput Screening, HTS)이 조합화학과 동반되어 추진되고 있다(Broach and Thorner, 1976; 畑中 利彦, 2000). 즉, 목표로 하는 작용점(효소/수용체) 수준에서 수많은 화합물의 활성을 신속하게 검색하고 후보화합물을 합성하기 위한 리드화합물을 찾아내는 것이다. 이러한 기술은 대부분의 과정을 로봇으로 조절하게 하여 기존의 방법에 비해 수백 배에서 수천 배 빠른 속도로 수행할 수 있게 되고 있다. 따라서 본 고에서는 분지아미노산 생합성 과정(그림 1)에 관여하는 첫 번째 효소인 acetolactate synthase (ALS)를 대상으로 수행할 수 있도록 개발한 고효율 검색방법과 이를 이용하여 선별한 새로운 ALS 저해 화합물을 소개하고자 한다.

재료 및 방법

식물체로부터 ALS의 추출 방법

범씨 종자를 과중하고 온실에서 생육시키면서 2.5엽기에 도달하였을 때 잎을 수확하고 이를 액체질소와 함께 마쇄하였다. 효소 추출은 Ray의 방법(Ray, 1982)을 수정하여 생체시료 50 g 당 5 mM MgCl₂과 10 mM sodium pyruvate을 용해시킨 0.1 M potassium phosphate 완충용

*연락처

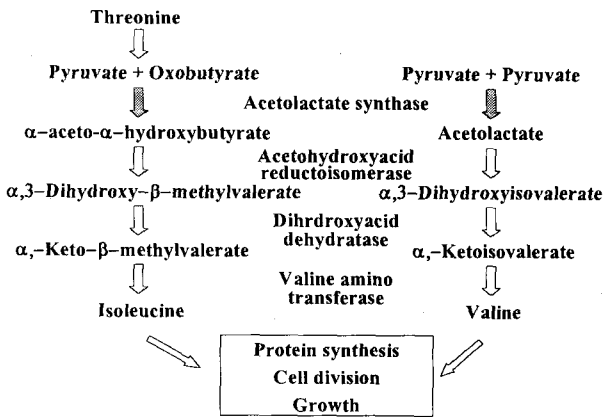


Fig. 1. Biosynthesis of branched chain amino acids in plants

액(pH 7.5) 100 ml를 넣어 균질화 시킨 후 1점의 Miracloth로 거른 여과액을 원심분리(20,000 xg, 4°C, 20min.) 하였다. 상정액을 ammonium sulfate(35%)로 분별 침전시켜 20,000xg, 4°C에서 20분간 원심 분리한 후 상정액은 버리고 침전물을 취하였다. 침전물을 50 mM potassium phosphate(pH 7.0) 완충용액에 현탁시켜 동일한 완충용액으로 포화시킨 Sephadex G-25컬럼을 통과시켰다. 컬럼으로부터 활성부위만을 채취하여 단백질 함량을 측정(Bradford, 1976)하고 조효소액의 단백질 함량이 10 mg/ml가 되도록 희석하여 효소활성 측정에 사용하였다. 잔여 조효소액은 액체질소에 보관하면서 사용하였다.

ALS의 활성 측정방법

조효소액 80 μl, 반응액(10 mM MgCl₂, 10 mM sodium pyruvate, 0.1 mM thiamine pyrophosphate, 10mM flavine adenine dinucleotide를 용해시킨 50mM potassium phosphate 완충용액, pH 7.0) 80 μl, acetone에 용해시킨 저해제 17.8 μl를 96-well에 담고 35°C, 수조에서 30분간 반응시켰다. 효소의 반응은 반응액을 첨가하면서 개시하였고, 6 N H₂SO₄ 10μl를 첨가하여 반응을 종료시켰다. 효소 활성은 Westerfield의 방법(Westerfield, 1945)에 따라 생성된 acetoin양을 다음과 같이 측정하였다. 즉, 반응을 종료시킨 시료는 60°C의 항온수조에서 30분간 decarboxylation 시키고 0.5%(w/v)의 creatine용액 0.5ml와 10% NaOH에 용해시킨 5%(w/v)의 1-naphtol 용액 100 μl를 넣고 vortex mixer로 10초간 섞어 준 다음 60°C의 항온수조에서 30분 동안 발색시켰다. 발색 후 96-well filter/ centrifuge에서 여과 및 원심분리를 동시에 수행하였다. 이를 microplate reader를 사용하여 530 nm에서 흡광도를 측정하고 결과를 computer program excel을 사용하여 계산하였다. 효소의 활성은 같은 방법으로 작성한 standard curve를 이용하여 단백질 mg당 단위 시간에 생성되는 acetoin의 양으로 표시하였다. 단백질의 양은 Bradford법으로 측정하였다(Bradford, 1976).

화학물질의 구입 및 처리

시험에 사용한 화학물은 기존문헌 조사를 통하여 제조할

성이 기대되는 화합물107개를 선별하였다(Dagley and Nicholson, 1970; Kearney and Kaufman, 1988; Hatzios and Hoagland, 1989; Cobb, 1992; Weller et al., 1993; Devine et al., 1993; Dawson et al., 1986; Zollner, 1993; ; Anderson, 1996; Dey and Harborne, 1997). 조사된 화합물은 Sigma 및 Aldrich chemical(USA)사로부터 구매하였으며 알파벳 순서로 정리하여 HIT-일련번호로 코드화 하였다(표 1).

결과 및 고찰

ALS 활성 측정용 HTS 개발

본 논문에 소개한 ALS 활성 측정방법은 기존의 방법을 대량 고속 검정용으로 개량하였다. ALS를 저해하는 새로운 제조제를 개발하기 위해서는 1차 적으로 in vitro 시험을 통하여 ALS 활성을 저해하는 선도화합물을 발굴하고 이를 활용하여 유도체를 합성하게 된다. 유도체들에 대해서는 in vivo 시험을 통하여 최종적인 제조제 후보화합물을 찾는 것이다. 이러한 과정에서 in vitro 시험은 식물의 종류에 관계없이 단순히 ALS 활성을 저해하는 활성화합물을 찾아내는 것이기 때문에 효소의 추출방법이 다른 모든 식물을 대상으로 할 수는 없다. 따라서 적합한 재료를 선택하여 사용하면 된다. 적합한 실험재료로서 봄에는 배추, 산동초, 여름에는, 배추, 무우, 벼, 가을에는 시금치, 호밀, 보리 등이 적합하다고 하였으나(中田昌伸, 1991) ALS 활성이 높고 재배와 취급이 용이한 식물을 대표적으로 사용하는 것이 바람직할 것이다. 추가적으로 추천하고 싶은 식물재료는 완두로 재배가 용이하고 식물체로부터 ALS의 추출 효율과 활성이 높게 나타나기 때문이다(Royuela et al., 1998).

단위 시간에 많은 종류의 화학물질을 screening하기 위해서는 기본적으로 동일한 상태의 효소를 사용하여 상대적인 활성을 통하여 가장 강력한 리드화합물을 선별할 수 있다. 이를 위해서는 효소 표준품을 사용하는 것이 가장 바람직하지만 상품화된 효소가 없기 때문에 충분한 양의 효소를 추출하여 보관하면서 사용하여야 할 것이다(Böger and Sandmann, 1992; Streibig and Kudsk, 1993). 이를 위해서 추출한 효소액을 1 ml 내외의 작은 병에 나누어 액체질소에 보관하면서 효소활성을 측정할 결과 보관된 효소는 4개월까지 실험에 유효한 활성을 보여 주었다(자료생략). 효소활성 측정방법은 기존에 알려진 시험방법을 기본으로 하여 용기와 조합비율을 조정한다. Ray 등(1982)이 소개한 기존의 실험방법에서는 조효소액 0.45 ml, 기질 0.45 ml, 저해제 100 μl를 test tube에 담고 35°C, 수조에서 30분간 반응시키고 6 N H₂SO₄ 50μl를 첨가하여 반응을 종료시킨다. 이어서 60°C 수조로 옮겨 30분 동안 탈탄산화반응을 진행시키고 0.45 ml의 발색시약을 첨가하여 30분 동안 발색시킨다. 이를 10,000xg에서 5분간 원심분리하여 상정액을 spectrophotometer cell로 분취한 후 530 nm에서 흡광도를 측정한다. 효소의 활성은 동일한 방법으로 작성한 표준곡선을 사용하여 acetoin nmole/mg protein/min으로 환산하게 된다. 그러나 실험용기를 96-well로 하고 결과를 microplate reader로 측정하는 본 실험의 경우

Table 1. Compounds used in this study

Compound	Compound	Compound
α -Aminobutyric acid	Diallylsulphide	N-Ethylmaleimide
Acacetin	6-Diazo-5-oxo-L-norleucine	Niclosamide
Acetohydroxamate	Dicumarol	Nordihydroguaiaretic acid
Acetopyruvic acid	Dicyclohexylcarbodiimide	Oleylamine
N-Acetylimidazole	Diethylpyrocarbonate	Oxalacetic acid
Acrolein	Dihydroxyacetone	Oxalic acid
Agaricic acid	Dinoseb	Oxamic acid
Agmatine	2,2'-Dipyridyl	2-Oxoglutaric acid
Albizzin	5,5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) aldehyde	3-Oxoglutaric acid
Alizerin	D,L-Ethionine sulphone	o-Phenanthroline
3-Amino-1,2,4-triazole	Ethoxyquin	Phenolphthalein
4-Amino-5-imidazolecarboxamide	Ethoxyformic acid	Phenylhydrazine
1-Aminobenzotriazole	Ethylacetoacetic acid	Phenylpyruvic acid
D-2-Aminobutyric acid	Ethyleneglycolmonomethylether	Phospho-ribosylpyrophosphate
Aminoxyacetic acid	Ferulic acid	Primaquine
D,L-2-Aminovaleric acid	Gallic acid	Propionic acid
Ampicillin	Genistein	Purine
Apigenin	Glucosamine 6-phosphate	Putrescine
Azelaic acid	Glyceraldehyde	Pyridine 2,4-dicarboxylic acid
Baicalein	Glyoxylic acid	Pyridoxal
7,8-Benzoquinoline	Glyphosate	Pyrophosphate
Bilirubin	Gossypol	Rhodamin B
Bromoxynil	D-Gulono-1,4-lactone	S-adenosylmethionine
Caffeic acid	Hydroxynorvaline	Sebaic acid
Canavanine	8-Hydroxyquinoline	Sitosterol
Cephalothin	Iproniazid	Spermidine
o-Chlorocinnamic acid	Isonicotinic acid	Spermine
Chlorogenic acid	Itaconic acid	Succinic acid
Chlorpromazine	Kojic acid	Suramin
Cinnamic acid	Malonic acid	Tetradecane
Citric acid	6-Methylaminopurine	Tetrahydrofurane
L-Citrulline	Methylglyoxal	Tranlycypromine
p-Coumaric acid	N-Methyloctadecylamine	Traumatic acid
Cyanide	4-Methylpyrazole	Trifluoperazine
Cyanuric fluoride	Methylthioadenosine	Ubiquinone-5
1,1-Cyclopropanedicarboxylic acid	2-Naphthoic acid	

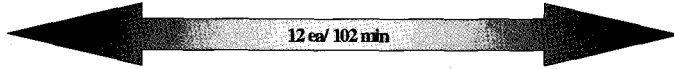
에는 조효소액 80 μ l, 기질 80 μ l, 저해제 17.8 μ l를 96-well에 담고 35°C, 수조에서 30분간 반응시킨다. 6 N H₂SO₄ 10 μ l를 첨가하여 반응을 종료시키고, 이를 60°C 수조로 옮겨 30분 동안 탈탄산화반응을 진행시킨다. 반응 후 100 μ l의 발색시약을 첨가하여 30분 동안 발색시킨다.

발색 후 96-well filter/centrifuge를 동시에 수행한다. 이를 microplate reader를 사용하여 530 nm에서 흡광도를 측정하고 결과를 computer program excel을 사용하여 계산한다.

두 가지 검정방법의 효율성을 비교하기 위해서는 기준이

<Basic method>

Reaction/Termination	Decarboxylation	Color developing	Centrifuge	Evaluation Activity	Calculation
12 ea/30 min.	12 ea/30 min.	12 ea/30 min.	12 ea/10 min	12 ea/ 2 min. spectrophotometer	Manual



<HTS system>

Reaction/Termination	Decarboxylation	Color developing	Centrifuge	Evaluation Activity	Calculation
96 ea/30 min.	96 ea/30 min.	96 ea/30 min.	96 ea/10 min	96 ea/ 1 min. microplate reader	Computerize

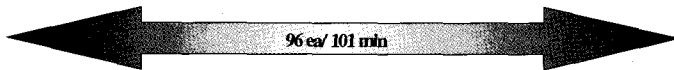


Fig. 2. Comparison of basic method and HTS system in one cycle

설정되어야 할 것이고, 시험결과의 일치성을 전제로 하여야 할 것이다. 본 논문에 소개하는 시험방법은 Ray 등(1982)을 통하여 잘 알려진 반응과 동일한 시약을 사용하기 때문에 시험결과는 동일할 수밖에 없다. 효소반응을 수행할 경우 많은 시험관을 사용하게 되면 처음과 마지막 시료 사이의 시간차이로 인하여 결과가 정확하지 못하게 된다. 따라서 속도를 비교하기 위한 기준을 설정하기는 어렵지만 일반적으로 pipette을 사용하여 12회 분주 하는데 1분 정도 소요되고, 96-well의 구멍이 12 x 8개로 만들어져 있기 때문에 이를 기준으로 하였다. 본 실험방법을 기존의 방법과 비교할 경우 한사람이 1회 수행한다고 하면(그림 1) 효소활성을 측정하는 것까지 8배 효율을 증대시킬 수 있다.

즉, 기존의 방법으로는 12개의 시료를 처리하는데 102분이 소요되지만 본 실험방법으로는 96개의 시료를 처리하는데 101분이 소요되기 때문이다. 그러나 연속적으로 수행한다고 할 경우 기존의 방법으로는 원심분리과정과 spectrophotometer를 사용하여 측정하는 과정 때문에 한 사람이 연속적으로 수행할 수가 없다. 그러나 본 실험방법을 이용할 경우에는 반응 중에도 결과를 측정하는 것은 물론 계산

하는 과정까지 연속적으로 수행할 수 있다. 또한 사용하는 효소, 기질 및 저해제의 양이 1/10 이하이기 때문에 많은 화학물질에 대하여 동일한 재료를 적용시킬 수 있다는 커다란 장점을 가지고 있다. 따라서 이러한 장점들을 감안하면 실질적으로 100배 이상의 효과를 얻을 수 있을 것이다. 효소의 반응특성은 물론 저해제와의 상호작용을 분석하기 위한 enzyme kinetics가 효율적으로 수행될 수 있다는 점은 보이지 않는 기대효과인 것이다.

신규 ALS 저해물질 탐색

지금까지 알려진 ALS 저해 제조제로는 sulfonylurea계, imidazolinone계, triazolopyrimidine sulfonanilide계, pyrimidyloxybenzoic acid계 등이 보고(Rendina and Abell, 1994)되어 있지만 새로운 구조의 ALS 저해 화학물질을 탐색하기 위하여 107개의 식물 특이적 효소 저해제를 대상으로 조사하였다. 처리 화학물질 중에서 최종농도 100 μM로 처리할 경우 11개의 화학물질이 100% 저해하였고(그림 4), 기타 6개의 화학물질은 저해활성을 보였지만 강력하지는 않았다. 대표적인 화학물질로서는 aminoxyacetic acid,

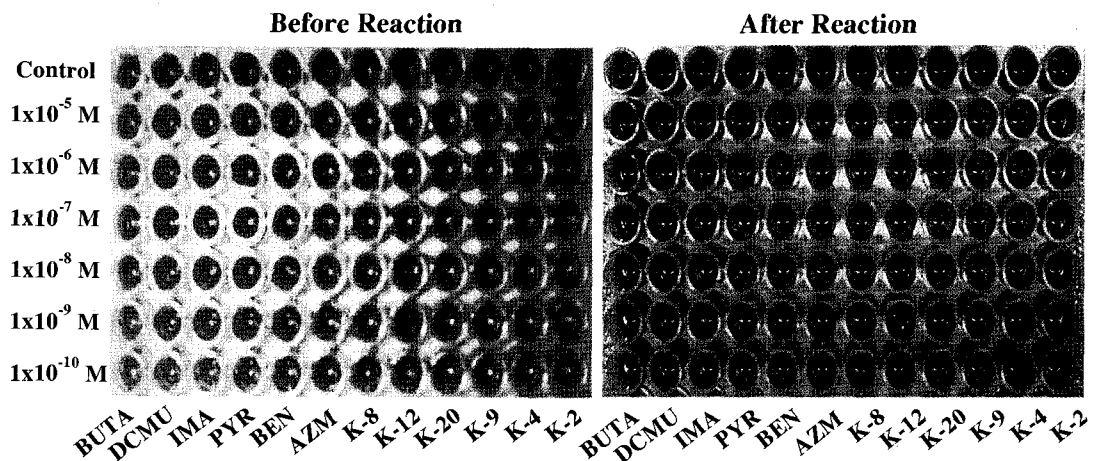


Fig. 3. 96-well plates before and after ALS assay treated with several compounds.

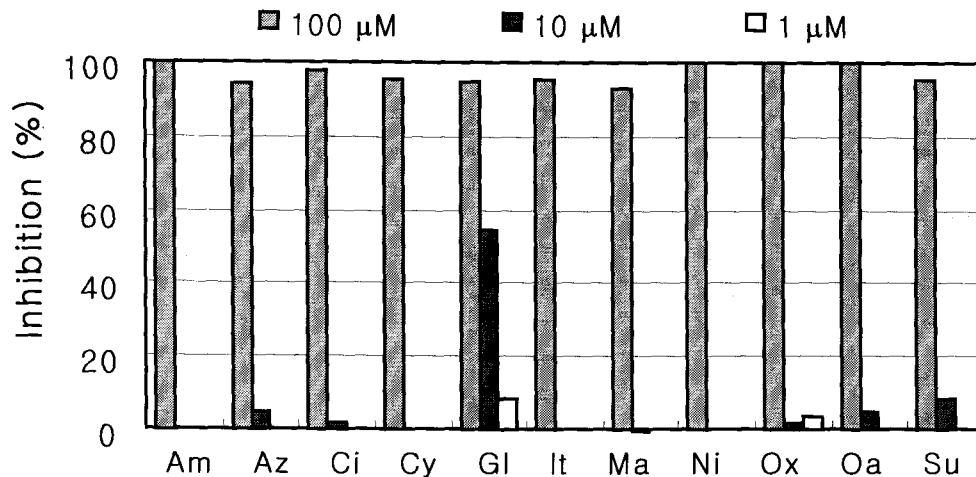


Fig. 4. ALS-inhibiting activity of 11 compounds under (*in vitro*)^a 96-well plate assay.

^a Compounds showing ALS-inhibition are presented and referred to Table 1.

Am, aminooxyacetic acid; Az, azelaic acid; Ci, citric acid;
 Cy, cyanuric fluoride; Gl, glyoxylic acid; It, itaconic acid;
 Ma, malonic acid; Ni, niclosamid; Ox, oxalic acid;
 Oa, 2-oxoglutaric acid; Su, suramin

azelaic acid, citric acid, cyanuric fluoride, glyoxylic acid, itaconic acid, malonic acid, niclosamid, oxalic acid, 2-oxoglutaric acid, suramin 등이 검색되었다. 100% 저해하는 화학물질들을 대상으로 처리농도를 감소시켰을 때 저해 활성도 크게 감소되었지만 기존의 저해제 구조와 전혀 다른 화학물질들이 ALS 활성을 저해시킨다는 것은 새로운 유도체의 합성을 위한 활성 화합물로서 매우 가치 있는 것이다. 앞으로 이들을 기본 구조로 하여 신규 ALS 저해 제초제의 개발을 위한 유도체의 합성에 이용되었으면 한다.

참고적으로 aminooxyacetic acid는 alanine aminotransferase, amino levulinate aminotransferase, Phenylalanine ammonia lyase 등의 저해제로 알려져 있으며, azelaic acid는 glutathione transferase, NADP-cytochrome-P450 reductase, tyrosinase, thioredoxin reductase(NADPH) 등의 저해제, citric acid는 cytosol aminopeptidase, malate dehydrogenase, phosphoenolpyruvate carboxylase, ribose bisphosphate carboxylase 등의 저해제, cyanuric fluoride는 galactolipase 저해제, glyoxylic acid는 alanine aminotransferase, pyruvate carboxylase, pyruvate dehydrogenase, pyruvate decarboxylase, ureido glycollate dehydrogenase 등의 저해제, itaconic acid는 isocitrate lyase, proline dipeptidase 저해제로, malonic acid는 acetoacetate decarboxylase, D-aspartate oxidase, creatine kinase, isocitrate lyase, lactate 2-monooxygenase 등의 저해제, niclosamid는 oxidative phosphorylation uncoupler로 oxalic acid는 acetolactate synthase, acyl-lysine deacylase, carboxypeptidase, hydroxypyruvate reductase, lactate dehydrogenase (cytochrome), malate dehydrogenase 등의 저해제, 2-oxoglutaric acid는 acetoacetate decarboxylase, alanopine dehydrogenase, aldehyde reductase, 5-amino

levulinate synthase, carbamoyl-phosphate synthase (ammonia), glutamate-ammonia-ligase adenytransferase, isocitrate lyase, threonine dehydratase 등의 저해제로, suramin은 Ca^{2+} transporting ATPase, H^+ transporting ATPase, Na^+/K^+ transporting ATPase 등의 저해제로 알려져 있다(Martinez and Jenkins, 1965; Jorin et al., 1988). 앞으로 이들에 대한 작용기구는 물론 식물체내에서의 행동, 제초효과 및 선택성 등에 대한 연구가 수행되어야 할 것이며, 이러한 결과를 토대로 신규 후보화합물의 합성이 성공적으로 수행될 수 있을 것이다.

참고문헌

- Anderson, W.P. (1996) Weed Science. Principles and applications. p.388, West Publishing Com. New York.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for quantitation of micro gram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72:248~251.
- Broach, J.R. and J. Thorner (1976) High-throughput screening for drug discovery. Nature, 384(6604):14~16.
- Böger, P. and G. Sandmann (1992) Target assays for modern herbicides and related phytotoxic compounds. Lewis Publishers. Boca Raton, p.299.
- Cobb, A. (1992) Herbicide and Plant Physiology. Chapman & Hall, London, p.200.
- Dagley, S. and D.E. Nicholson (1970) An Introduction to Metabolic Pathways. Blackwell Scientific Publications, p.210.

- Dawson, R.M.C., D.C. Elliott, W.H. Elliott, and K.M. Jones (1986) Data for Biochemical Research. Cearendon Press, Oxford, p.408.
- Devine, M., S.O. Duke and C. Fedtke (1993) Physiology of the Herbicide Action. p.441, PTR Prentice Hall, New Jersey.
- Dey, P.M. and J.B. Harborne (1997) Plant Biochemistry. p.554, Academic Press, New York.
- Hatzios, K.K. and R.E. Hoagland (1989) Crop safeners for herbicides. 400p. Academic Press, New York.
- Jorin, J., R. Lopez-Valbuena, and M Tena (1988) Purification and properties of phenylalanine ammonia-lyase from sunflower (*Helianthus annuus* L.) hypocotyls. Biochemica et Biophysica Acta. 964:73~82
- Kearney, P.C. and D.D. Kaufman (1988) Herbicides. Chemistry, degradation, and mode of action. p.403, Marcel Dekker, Inc. New York.
- Kishore, G.M. and D.M. Shah (1988) Amino acid biosynthesis inhibitors as herbicides. Ann. Rev. Biochem. 57:627~663
- Martinez-Carrion, M. and W.T. Jenkins (1965) D-alanine-D-glutamate transaminase. II. Inhibitors and the mechanism of transamination of D-amino acids. The Journal of Biological Chemistry 240(9):3547~3552.
- Ray, T.B. (1982) Site of action of chlorsulfuron: a new herbicide for cereals. Pestic. Biochem. Physiol. 17:10~17.
- 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.
- Royuela, M., A. Gonzalez, A-I. Cesar, A-T. Pedro M. and G-M. Carmen (1998) Imazethpyr inhibition of acetolactate synthase in *Rhizobium* and its symbiosis with pea. Pestic. Sci. 52:372~380.
- Streibig, J.C. and P. Kudsk (1993) Herbicide bioassays. 270p. CRC press. Boca Raton.
- Weller, S.C., F.D. Hess, J.R. Abernathy, A.P. Appleby, G.F. Warren, J.H. Dawson, R. Liebl, J.L. Ahlrichs, T.N. Jordan, G.E. Van Scoyoc, G.E. Ruhl, Leap, D.I., H.A. Holt, C.S. Throssell, D.C. Thill, D.R. Griffith, and P.A. Banks (1993) Herbicide Action. p.621, Purdue University, West Lafayette, Indiana.
- Westerfield, W.W. (1945) A colorimetric determination of blood acetoin. J. Biol. Chem. 161:495~502.
- Zolliner, H. (1993) Handbook of enzyme inhibitors. 520p. VCH. New York.
- 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.
- 中田 昌伸 (1991) アセトラクテート合成酵素の植物材料と阻害化合物の選抜. 雑草研究 36(3):266~273.
- 황인택, 홍경식, 조광연, 요시다 시게오 (1993) Cyanobacteria를 이용한 광합성 전자전달저해제의 생합리적 스크리닝. 한잡초지 13(2):81~88.
- 황인택, 문영희, 한성수, 전재철 (2001) 제초제와 환경. 한잡초지 21(2):146~166.
- 황인택, 이동희 (2001) 신규 제초제 개발을 위한 유용 기능성 유전자 발굴 및 기능조절 물질 탐색. 정밀화학 61:45~52.
- 황인택, 최정섭, 박상희, 이관휘, 이병희, 홍경식, 조광연 (2001) 식물 특정효소저해제의 생물활성 조사에 의한 신규 제초제 작용점 탐색. 한국농약과학회지 5(1):36~45.

High Throughput Screening for Searching a New Inhibitors of Acetolactate Synthase

S.H. Park, I.T. Hwang, K.H. Lee, J.S. Choi, J.Y. Pyon, K.Y. Cho(KRICT, Chungnam National University)

Abstract : This study was conducted to develop a high throughput system for screening acetolactate synthase (ALS) inhibitors, and to detect basic mother molecules for developing new novel herbicide candidates. The high throughput screening (HTS) method using 96-well plate and microplate reader was developed. This method is 8 times more effective than basic technique in one cycle per person. Furthermore, considering for less than 1/10 volume of materials required for ALS test and enzyme kinetics with 16 times faster speed compared to those of former procedure, this HTS method has more than 100 times higher efficacy than basic system in a consecutive procedure. We discovered 11 new ALS inhibitors such as 2-oxoglutaric acid, aminooxyacetic acid, azelaic acid, citric acid, cyanuric fluoride, itaconic acid, malonic acid, niclosamide, oxalic acid, glyoxylic acid, and suramin from 107 commercial plant-specific inhibitors using this technique. We hope these results might be useful to discover lead compounds for developing new novel herbicide candidate.

*Corresponding author (Tel: 042-860-7441, Fax: 042-861-4913, e-mail: ithwang@pado.kRICT.re.kr)