

분자맞추기를 리용한 아세토젯산합성효소 (PRO197SER)변이체에 특이적인 살초제의 설계

강훈철, 리형근

위대한 수령 김일성동지께서는 다음과 같이 교시하시였다.

《농민들을 김매는 힘든 일에서 완전히 벗어나게 하려면 여러가지 능률높은 김매는 기계들을 생산보장하는것과 함께 효능높은 살초제를 많이 생산하여 농촌에 보내주어야 합니다.》(《김일성전집》 제86권 235페이지)

지금 세계적으로 살초제의 광범한 리용으로 하여 살초제저항성잡초들이 많이 나타나고있는데 이것이 농업생산에서 난문제의 하나로 제기되고있다. 이에 대처하여 살초제저항성변이잡초에 특이적인 살초제를 새로 개발하기 위한 연구가 활발히 진행되고있다.[1, 2]

우리는 술포닐노소계살초제의 타격대상인 AHAS의 저항성변이체들가운데서 변이빈도률이 가장 큰 PRO197SER변이체에 특이적인 새로운 술포닐노소계살초제를 설계하기 위한 연구를 하였다.

재료와 방법

연구에는 Linux체계를 설치한 고성능컴퓨터(6×4GHz, 16GB)와 분자동력학모의프로그램 Gromacs 4.5.5, 분자맞추기프로그램 AutoDock Vina[6], AutoDock Tools[7], 약물분자구조설계프로그램 Discovery Studio 3.5[4], HyperChem, 그리고 PDB자료기지에서 내리적제한 AHAS-살초제의 복합체구조(1YBH)를 리용하였다.

1) 살초제의 설계

살초제의 설계는 AHAS변이체의 저항성물림새에 대한 선행연구와 지금까지 개발된 술포닐노소계살초제자료[3, 5]에 대한 연구에 기초하여 약물분자구조설계프로그램 Discovery Studio를 리용하여 진행하였다. 선행연구에 의하면 AHAS의 PRO197SER변이체에서 197번 아미노산잔기에서의 변이로 인하여 197번 위치뿐만아니라 200번 잔기에서의 립체배좌에서 큰 변화가 일어나기때문에 활성중심입구의 구조가 정상형에 비해 커진다.[1] 따라서 우리는 술포닐노소계살초제의 벤즐고리의 오르토치환기를 넓어진 활성중심입구에 상보적으로 결합할수 있게 크게 하는 방법으로 새로운 4개의 살초제를 설계하고 각각 이름을 후보 1, 후보 2, 후보 3, 후보 4로 달았다.

2) 분자맞추기초기구조화일의 구축

국제단백질자료기지(PDB)에서 내리적제한 애기장대의 AHAS인 1YBH를 대상으로 프

로그람 Discovery Studio에서 구조의 197번 위치에서 프롤린으로부터 세린에로의 아미노산 잔기교체와 빠진 원자를 보충하고 물분자와 기타 다른 분자들을 제거하였다. 다음 프로그램 Gromacs를 리용하여 5ns동안 분자동력학모의와 클러스터분석을 진행하고 분자맞추기를 위한 초기구조를 얻었다. 즉 GROMOS-96힘마당파라미터를 모의에 적용하였다. SPC물 환경을 설정하고 모의계를 용질로부터 매 방향으로 7Å 떨어진 물립방계속에 조립하였다. 32개의 Na^+ 을 추가하여 계를 중성으로 만들기 위해 줄(SOL)항목을 선택하고 .top화일에 그것에 해당하는 항목을 추가한 후 실지 에네르기최소화단계로 넘어갔다. 급경사하강법을 리용하여 5 000걸음에 걸친 계의 에네르기최소화를 진행하였다. 계의 평형화모의를 100ps 동안 2차에 걸쳐 진행하였다. 마지막으로 얻어진 평형계를 대상으로 하여 300K과 101.3kPa(1atm)의 등온 및 등압조건에서 2fs의 시간걸음(분할폭)으로 5ns동안의 모의를 진행하였다. 모의기간 동적자리표로부터 얻어진 구조들이 매 2ps마다 축적보관되도록 하였다.

3) 효소-살초제의 분자맞추기 실험

얻어진 효소변이체의 초기분자맞추기구조와 새로 설계한 4개의 살초제 후보들의 구조를 AutoDock Tools프로그램에 입력시키고 분자맞추기를 위한 파라미터들을 각각 설정하였다. 즉 결합위치탐색범위를 $54 \text{ \AA} \times 52 \text{ \AA} \times 46 \text{ \AA}$, 자리표중심축자리표를 $x=65.417 \text{ \AA}$, $y=83.528 \text{ \AA}$, $z=12.667 \text{ \AA}$ 로 하였다.

우에서 얻어진 초기구조화일에서 효소의 활성중심을 이루는 16개 잔기를 유연성잔기로 선택하고 리간드의 구조에서 회전가능한 결합을 지적해준 다음 분자맞추기프로그램 AutoDock Vina를 리용하여 분자맞추기를 실행하였다.

결과 및 고찰

1) 살초제후보의 설계

술폰닐뇨소계살초제의 일반구조(그림 1)로부터 PRO197SER에 특이적인 4개의 살초제 후보를 설계하였다.(표)

표에서 보는것처럼 4개의 살초제 후보들은 R_1 과 R_2 위치에서 치환되었다.

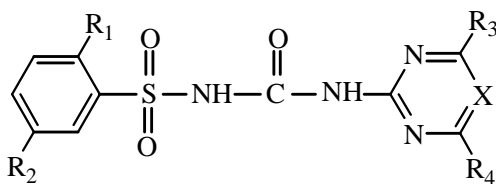
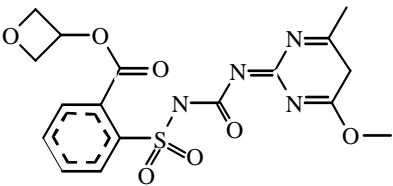
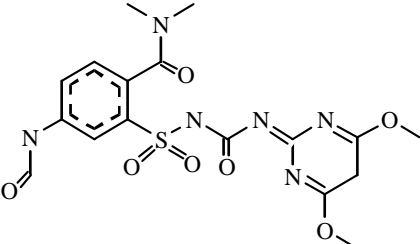
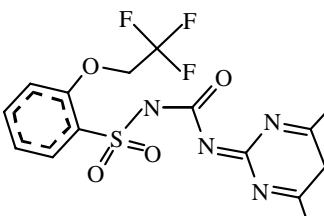


그림 1. 술폰닐뇨소계살초제의 일반구조
 R_1-R_4 : 치환가능한 위치, X: CH 또는 N

표. 살초제후보들의 구조와 화학식

번호	구조	화학식
후보 1		$\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{FN}_4\text{O}_7\text{S}_2$

번호	구조	화학식
후보 2		$C_{17}H_{18}N_4O_7S$
후보 3		$C_{17}H_{20}N_6O_7S$
후보 4		$C_{15}H_{14}F_3N_4O_4S$

2) 분자맞추기를 위한 초기구조구축

분자동력학모의결과 얻어진 PRO197SER의 기본골격구조에 해당하는 RMSD값은 전체 모의시간동안 0.3아래로서 리용가능한 안정한 구조라는것을 보여주었다.(그림 2)

활성중심의 입구를 이루는 잔기들의 거리변화를 통해 정상형에 비해 변이체의 활성중심이 더 크다는것을 알수 있다.(그림 3) 활성중심입구는 처음에 정상형과 변이체가 서로 비슷하였으나 변이체의 활성중심크기가 3ns에서부터 커지기 시작하여 4.5ns에서 안정한 값을 나타냈다.

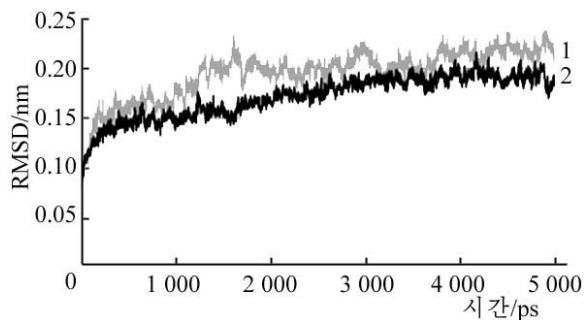


그림 2. 효소기본골격의 RMSD
1-정상, 2-PRO197SER

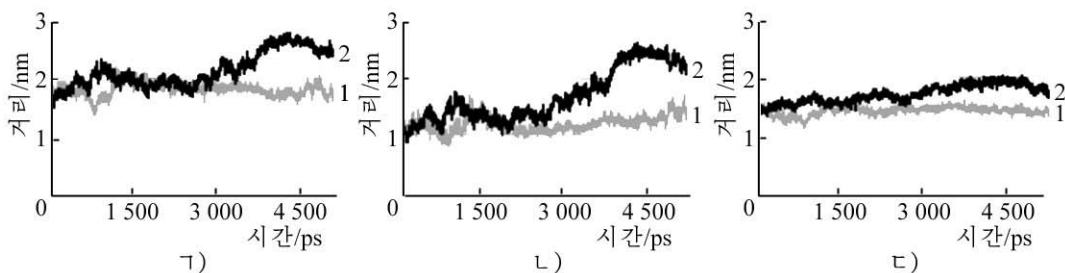


그림 3. 활성중심입구의 크기변화

ㄱ) 199-574사이거리, ㄴ) 199-653사이거리, ㄷ) 197-574사이거리; 1-정상, 2-PRO197SER

3) 효소-살초제의 분자맞추기

변이체 PRO197SER와 설계한 4개의 살초제후보를 각각 분자맞추기한 결과 4개의 살초제후보들에서 각각 20개의 결합형태를 얻었다. 이 20개의 결과 가운데서 활성중심에 결합하면서 결합친화성이 가장 큰 결합형태를 선택하였다.(그림 4)

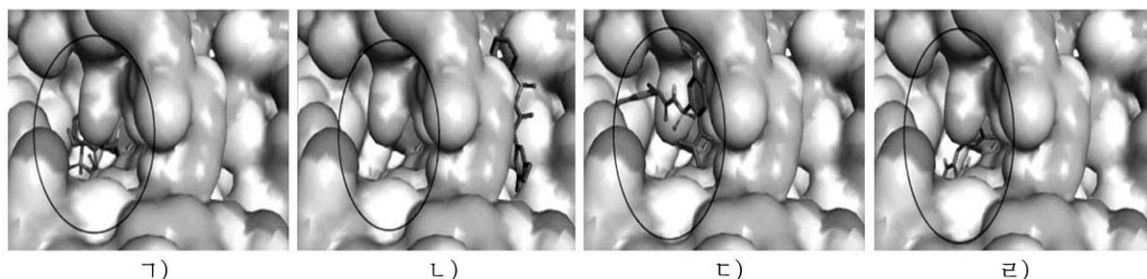


그림 4. 효소-살초제 후보들사이 분자맞추기결과(활성중심을 긴 타원형으로 표시)

1) 변이체-모형 1, 2) 변이체-모형 2, 3) 변이체-모형 3, 4) 변이체-모형 4

그림 4에서 보는바와 같이 후보 2는 20개 결과의 어느 하나도 활성중심에 결합하지 못하였다.

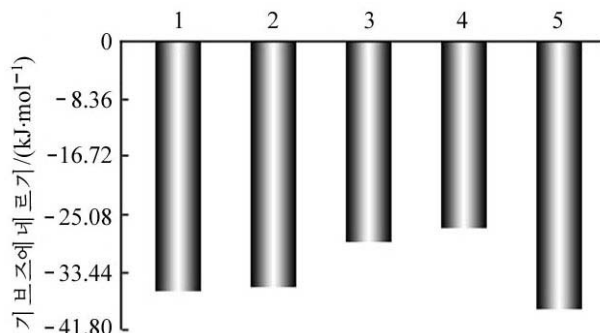


그림 5. AHAS 및 그 변이체-살초제 후보결합의 기브즈에네르기

1-정상-CIE, 2-변이체-후보 1, 3-변이체-후보 2, 4-변이체-후보 3, 5-변이체-후보 4

살초제 후보들의 효소에 대한 친화성을 평가하기 위해 기브즈에네르기를 계산한 결과 4개의 살초제후보 가운데서 후보 4가 -38.87kJ/mol 로서 친화성이 가장 높았으며 후보 1(-35.53kJ/mol)이 정상-CIE사이의 친화성(-35.95kJ/mol)과 비슷하고 후보 2, 3은 각각 -28.84 , -27.17kJ/mol 로서 정상-CIE에 비해 친화성이 약하였다.(그림 5)

이로부터 변이체의 활성중심에 높은 친화성을 가지고 결합하는 후보 1과 4를

후보살초제로 선택하였다.

맺 는 말

술폰닐노소계살초제의 벤졸고리에서 오르토치환기를 변화시켜 종전의 살초제보다 분자구조가 큰 4개의 살초제후보를 설계하였다.

분자동력학적모의와 클러스터분석을 통하여 그것의 RMSD값이 0.141로서 안정한 분자맞추기초기구조를 얻었다.

종전의 살초제에 비해 분자크기가 큰 후보 1과 4는 기브즈에네르기가 각각 -35.53 , -35.95kJ/mol 로서 높은 친화성을 가지고 PRO197SER와 상보적인 결합을 이룬다.

참 고 문 헌

- [1] 김일성종합대학학보(자연과학), 60, 4, 118, 주체103(2014).
- [2] Qin Yu et al.; Experimental Botany, 61, 3925, 2010.
- [3] Jian-Guo Wang et al.; Computer-Aided Molecular Design, 19, 801, 2005.
- [4] Discovery Studio 2.0 Tutorials. Available on: <http://www.accelrys.com/doc/life/dstudio/20/tutorial/>
- [5] Zheng-Ming Li et al.; Science, 11, 618, 2011.
- [6] Ruth Huey et al.; Using AutoDock 4 with AutoDockTools: A Tutorial. The Scripps Research Institute Molecular Graphics Laboratory, 2, 1~56, 2008.
- [7] Using AutodockTools Part 2. Available on: <http://xray.bmc.uu.se/hiccup/>

주체103(2014)년 3월 5일 원고접수

Design of Herbicide Specific to Acetolactate Synthase Mutant(PRO197SER) using Molecular Docking

Kang Hun Chol, Ri Hyong Gun

Many herbicide-resistant weeds which were mutated in their herbicide targeting enzyme have been occurring by constant use of a large amount of herbicides. Thus, discovery of new herbicides specific to resistant weeds is crucial for agriculture. PRO197SER, the resistant mutants of ALS resists to herbicides by widening the size of entrance of active site resulting in herbicides not to bind complementary to the entrance of active site. From this perspective, in the present study, four sulfornylurea herbicide candidates which have bigger molecular size than normal solfornylurea herbicides were designed by attaching new substitute in ortho-position of benzoic ring of general structure of sulfornylureas based on study about sulfornylurea herbicide database. Then, the binding mode and affinity of designed four sulfornylurea herbicide candidates to PRO197SER were calculated by molecular docking. Two of four candidates bound to the active site of PRO197SER with high affinity. Those two could be used as PRO197SER specific herbicides after further testing their activity through in silico such as molecular dynamics simulation and synthesis, *in vitro* and *in vivo* tests.

Key words: herbicide resistance, drug design, molecular docking, sulfornylurea, molecular dynamics